

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



INTERAKCE FENYLPROPIONOVÝCH KYSELIN SE ŽELEZEM
RIGORÓZNÍ PRÁCE

Vedoucí školitel: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Mgr. Jakub Mísař

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY



INTERACTION OF PHENYLPROPIONIC ACIDS WITH IRON

RIGOROUS THESIS

Supervisor: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Mgr. Jakub Mísař

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci na téma „Interakce fenypropionových kyselin se železem“ vypracoval samostatně, jedná se tak o mé původní autorské dílo. Všechna využitá literatura a ostatní prameny, které jsem použil při zpracování této rigorózní práce, jsou uvedeny v seznamu využitých odborných literatury. Předkládaná rigorózní práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Mgr. Jakub Mísař

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování směřuje nejdříve k paní PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. Zejména děkuji za její čas, strávený konzultacemi nad tématem, užitečnými radami při experimentální práci v laboratoři a celkově za soustavnou spolupráci při tvorbě této rigorózní práce.

Za poskytování odborných rad ohledně tématu bych chtěl poděkovat panu Doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D.

Velmi děkuji rovněž své rodině i blízkým za neúnavnou podporu při studiu a tvorbu potřebného zázemí.

V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat celé katedře Farmaceutické botaniky a ekologie za dočasné propůjčení laboratoře a tím i možnosti naměřit výsledky pro rigorózní práci. Tato rigorózní práce byla podpořena granty GAUK 1220314B, FRVŠ 664/2011/A, projektem SVV 260 293 a výzkumným programem PRVOUK P 40.

Obsah rigorózní práce

1. Úvod	8
2. Cíl práce	9
3. Teoretická část práce	10
3.1. Obecné informace o železu	10
3.2. Příjem železa potravou	10
3.3. Železo součástí enzymů	11
3.4. Metabolismus železa	11
3.4.1. Absorbce	11
3.4.2. Absorbce a distribuce nehemového železa	12
3.4.3. Exkrece	13
3.4.4. Regulace	13
3.5. Faktory, ovlivňující absorpci železa	13
3.6. Nemoci	14
3.6.1. Nedostatek	14
3.6.2. Nadbytek	15
3.7. Chelatace	16
3.8. Volné radikály	18
3.8.1. Antioxidanty	19
3.8.2. Oxidační stres	20
3.8.3. Onemocnění, spojovaná s vlivem volných radikálů	20
3.8.4. Haber-Weissova reakce a Fentonova reakce	21
3.9. Redukce	22
3.10. Fenolové sloučeniny	23
3.10.1. Polyfenoly a jejich účinky	23
3.10.1.1. Fenolové kyseliny	24
3.10.1.2. Flavonoidy	27
3.10.2. Příjem polyfenolů a jejich metabolismus	29
3.10.3. Možnost ovlivnění Fentonovy reakce	32
3.11. Indikátor ferrozín	32
3.12. Strukturální vlastnosti testovaných fenylpropionových kyselin	32
4. Experimentální část	35
4.1. Využívaný materiál	35
4.2. Využívané přístroje	35
4.3. Využívané chemikálie	35
4.4. Testované látky	36
4.5. Použité vzorce v rigorózní práci	36
4.6. Příprava reagenčních roztoků a vzorků testovaných látek	37

4.6.1.	Příprava roztoku železnatých iontů o koncentraci 250 μM	37
4.6.2.	Příprava zásobního roztoku železitých iontů o koncentraci 5 mM.....	37
4.6.3.	Příprava čerstvého roztoku železitých iontů o koncentraci 250 μM	37
4.6.4.	Příprava indikačního roztoku ferrozinu o koncentraci 5 mM.....	38
4.6.5.	Příprava zásobního roztoku hydroxylaminu o koncentraci 100 mM.....	38
4.6.6.	Příprava vzorků testovaných látek.....	38
4.7.	Metodika.....	39
4.7.1.	Sestrojení kalibrační křivky železnatých iontů.....	39
4.7.2.	Metodika pro stanovení schopnosti redukce železitých iontů	41
4.7.3.	Metodika pro stanovení schopnosti chelatace železnatých iontů	42
4.7.4.	Metodika pro stanovení schopnosti chelatace železitých iontů.....	44
5.	Výsledky	46
5.1.	Sestrojení kalibrační křivky železnatých iontů.....	46
5.2.	Interakce fenypropionových kyselin se železem.....	47
5.2.1.	3-fenypropionová kyselina.....	48
5.2.1.1.	Schopnost chelatace iontů železa	48
5.2.1.2.	Schopnost redukce iontů železa.....	48
5.2.2.	3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina.....	49
5.2.2.1.	Schopnost chelatace iontů železa	49
5.2.2.2.	Schopnost redukce iontů železa.....	49
5.2.3.	3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina.....	50
5.2.3.1.	Schopnost chelatace iontů železa	50
5.2.3.2.	Schopnost redukce iontů železa.....	50
5.2.4.	3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina.....	51
5.2.4.1.	Schopnost chelatace iontů železa	51
5.2.4.2.	Schopnost redukce iontů železa.....	51
5.2.5.	3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina.....	52
5.2.5.1.	Schopnost chelatace iontů železa	52
5.2.5.2.	Schopnost redukce iontů železa.....	52
5.2.6.	3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina.....	53
5.2.6.1.	Schopnost chelatace iontů železa	53
5.2.6.2.	Schopnost redukce iontů železa.....	53
5.2.7.	3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina.....	54
5.2.7.1.	Schopnost chelatace iontů železa	54
5.2.7.2.	Schopnost redukce iontů železa.....	54
6.	Diskuze a závěr	55
7.	Seznam využití odborné literatury	61
8.	Abstrakt.....	67
9.	Abstract.....	68

Využívané zkratky

ATP	Adenosintrifosfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HA	Hydroxylamin hydrochlorid
NTVŽ	Netransferinově vázané železo
REM	Rapid eye movement
SIH	Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon
SOD	Superoxiddismutasa

1. Úvod

Železo se řadí mezi velmi důležité prvky lidského organismu, kdy průměrný jedinec disponuje zásobou zhruba 3- 5 g tohoto prvku. Železo se podílí na významných procesech, jako jsou transport kyslíku, syntéza DNA a další. Tento prvek je schopen přijímat nebo odevzdávat elektrony, dochází tak k přeměnám mezi železitými ionty a ionty železnatými. Právě oxidační stav často bývá klíčový pro správnou funkci iontů železa v organismu.

Za běžných okolností plní volné radikály v lidském organismu fyziologické funkce. V určitých situacích mohou však být nebezpečné. Reaktivní formy kyslíku a dusíku mohou napadat buňky lidského těla, což může vést k poškození lipidů, proteinů i samotné DNA a obecně k produkci oxidačního stresu, který bývá spojován s mnoha dalšími onemocněními. Velmi reaktivní hydroxylový radikál je na příklad produkován Fentonovou reakcí, jejíž důležitou součástí jsou i volné ionty železa.

Fenolové sloučeniny jsou početně významná skupina obsahových látek rostlin. Byla identifikována řada různých struktur, od vysoce polymerovaných molekul až po jednoduché nízkomolekulární fenolové kyseliny. Fenolové kyseliny jsou často součástí příjmu potravy, jindy však vznikají až v průběhu trávení.

Po absorpci těchto látek není vyloučeno ovlivnění Fentonovy reakce. Pokud by byly fenolové kyseliny schopny ionty železa chelatovat, je zde určitý potenciál k potlačení oxidačního stresu. Na druhou stranu, za určitých okolností by mohla vést redukce železitých iontů k potenciaci Fentonovy reakce a k produkci nebezpečných volných radikálů.

2. Cíl práce

Cílem této rigorózní práce bylo vhodným způsobem kvantifikovat schopnost chelatace a redukce iontů železa vybranými fenylpropionovými kyselinami v prostředí o různém pH. Testované látky obsahovaly na společném skeletu (fenylpropionová kyselina) rozdílný počet hydroxylových skupin. Jednalo se o 3-fenylpropionovou, 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou, 3-(4-hydroxyfenyl)propionovou, 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionovou, 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionovou, 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionovou a 3-fenyl-3-hydroxypropionovou kyselinu.

Dle podobně situované studie, kde byly testovány interakce železa s deriváty benzoové kyseliny, se dalo hypoteticky očekávat, že vyšší schopnosti chelatace iontů železa budou dosahovat fenylpropionové kyseliny, které mají ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny na aromatickém jádře ¹. U redukce železitých iontů na ionty železnaté byla predikována obdobná strukturní závislost, která byla pozorována při testování redukce měďnatých iontů fenolovými kyselinami. V již provedené studii se měď-redukční schopnost odvíjela zejména od počtu hydroxylových skupin ve struktuře testované látky ².

Cílem tak bylo určit strukturní závislost mezi strukturou testovaných kyselin a jejich schopností chelatovat a redukovat ionty železa, celkově zhodnotit naměřené výsledky a sepsat rigorózní práci.

3. Teoretická část práce

3.1. Obecné informace o železu

Železo patří mezi velmi důležité prvky lidského organismu. Pro procesy jako jsou transport kyslíku, syntéza DNA nebo produkce ATP je železo nezbytnou součástí. Pokud buňka zaznamená stav nedostatku železa, zastavuje se její růst a následně dochází až k buněčné smrti. Železo je tak velmi důležitým prvkem, zejména díky své schopnosti přijímat nebo odevzdávat elektrony (dochází k přeměně mezi železnatými ionty a ionty železitými). Na druhou stranu, tento fakt může být za určitých okolností pro organismus škodlivý³. Výměna elektronů s řadou jiných substrátů může prostřednictvím Fentonovy reakce vyústit k produkci reaktivních kyslíkových radikálů, které následně mohou způsobovat oxidační stres, peroxidaci lipidů i poškození DNA. To může v důsledku ohrozit životaschopnost některých buněk⁴. Mimo jiné, železo je nezbytnou složkou i mnoha enzymů³.

U dospělého člověka je hladina železa v organismu přibližně 3- 5 g. Téměř 60 % tohoto množství je pak začleněno v hemoglobinu. Hemoglobin plní úlohu přenašeče kyslíku, kdy transportuje kyslík z plic do periferních tkání a následně odvádí oxid uhličitý z periferie zpět do plic⁵. Dále tento prvek nalezneme v parenchymatických buňkách jater (1 g), retikuloendoteliálních makrofázích, kostní dřeni a ve svalech³. Železo je také složkou myoglobinu, což je protein, který je důležitý pro poskytování kyslíku svalové tkáni⁵.

3.2. Příjem železa potravou

Pro lidský organismus může být vyvážená strava adekvátním zdrojem železa. Toto tvrzení platí však pouze za předpokladu, že jedinec netrpí nějakým metabolickým onemocněním⁶. V upravené Tabulce č. 1 nalezneme potraviny, které jsou bohaté na ionty železa⁷. Biologická dostupnost železa se pak liší v návaznosti na formu, ve které je přítomno v příslušné potravíně. Nejvyšší biologickou dostupnost má hemové železo, které je strukturálně zabudováno ve středu molekuly hemoglobinu či myoglobinu. Bohatým zdrojem tohoto typu železa jsou například ryby, maso a mořské plody. Absorbce hemového železa pak bývá přibližně 15- 35 %. Druhým typem železa, který nalezneme v potravě je železo nehemové. Často bývá přítomno v semenech, obilovinách a listové zelenině. Míra vstřebávání je zde už nižší, přibližně 2 až 20 % v závislosti na chemické formě (anorganické nebo organické). Nejčastěji se v potravinách vyskytuje nehemové železo ve formách s nízkou molekulovou hmotností jako jsou citrát, fosfát, fytát, oxalát nebo hydroxid železitý⁶. Jak bude i uvedeno později, přítomnost dalších fosfátů, fytátů, oxalátů nebo uhličitánů v potravě může snižovat absorpci nehemového železa. Kyselina askorbová nebo nižší žaludeční pH naopak absorpci nehemového železa zvyšují⁸. Mezi chemické formy nehemového železa s vyšší molekulovou hmotností patří například ferritin nebo laktoferin.

Pro účel obohacování potravin železem se dále můžeme setkat také se síranem železnatým či chloridem železitým ⁶.

Potravina	Obsažené železo mg . 100 g potraviny ⁻¹
Majoránka (sušené koření)	374,2
Tymián (sušené koření)	123,6
Hřib smrkový (sušený)	69,7
Játra vepřová	15,3
Hořká čokoláda (obsah kakaa 70-85 %)	11,9
Játra telecí	10,2
Játra hovězí	8,4
Játra kuřecí	6,7
Lískové ořechy	5,8
Čočka	5,0
Špenát	3,3

Tabulka č. 1: Potraviny, které jsou bohatým zdrojem železa ⁷

3.3. Železo součástí enzymů

Právě díky své schopnosti přijímat a odevzdávat elektrony jsou ionty železa součástí mnoha enzymů. Běžně se tento prvek vyskytuje v metaloproteinech, kde může být železo přímo vázáno na protein přes vazbu Fe-S, případně je uzavřeno ve struktuře hemu. Proteiny jako hemoglobin, myoglobin, cytochromoxidas a další podobné enzymy známe poměrně dlouho. Uskupení, kde je železo vázáno na protein přes síru, je již novější záležitostí ³.

3.4. Metabolismus železa

3.4.1. Absorbce

Absorbce železa probíhá převážně na začátku tenkého střeva. V této oblasti, která je poměrně stále blízko žaludku, je nižší pH. To napomáhá k rozložení železa z potravy. Nejčastěji bývá železo v lidské stravě přítomno buď jako součást hemu, nebo ve formě železitých iontů, které jsou vázány na určitou molekulu. Absorbce nehemového železa je již poměrně vysvětlena. O absorpci hemového železa je pak informací méně ³.

3.4.2. Absorbce a distribuce nehemového železa

Anorganické nehemové železo je součástí mnoha potravin. Na příklad ho nalezneme ve vejcích a zelenině⁵. Železité ionty jsou nejprve redukovány na ionty železnaté. Tato přeměna je uskutečněna apikální membránou duodena pomocí reductasy (duodenální cytochrom b). Exprese cytochromu b je zvýšena při nedostatku železa nebo na příklad při stavu hypoxie organismu. Obvykle je za den absorbováno zhruba 1 až 2 mg železa³. Ženy v období menstruace však mohou absorbovat i více jak 3 mg železa denně v souvislosti s vyššími ztrátami tohoto prvku⁸. Redukované železnaté ionty jsou transportovány přes apikální membránu pomocí Transportéru pro kovové ionty 1. Tento transportér není specifický pouze pro železnaté ionty. Substrátem pro tento přenašeč jsou také ionty měďnaté, zinečnaté, manganaté a další. Zajímavostí však je, že ionty vápníku a hořčíku tento transportér nepřijme. Přenesené ionty železa jsou pak v enterocytech začleněny do ferritinu po předchozí oxidaci na ionty železité nebo uvolněny do krevního oběhu pomocí enzymu ferroportinu 1. Enzym hefeitin se podílí na oxidaci železnatých iontů na ionty železité. Na metabolismus železa má vliv i ceruloplazmin, který také disponuje feroxidasovou aktivitou³. Do krevního oběhu tak přechází železo už ve formě železitých iontů⁵. Transferin je hlavním přenašečem železa v lidském organismu se specifitou pro železité ionty³. Tento glykoprotein má dvě vazebná místa právě pro trojmocné železo. Objev transferinu, jakožto přenašeče železa, se datuje již do roku 1946⁵.

Za běžných okolností je zhruba třetina transferinu nasycena železem, přičemž plazmatické hladiny železa, které není vázané na transferin, jsou zanedbatelně nízké³. Koncentrace železa je u zdravých dospělých jedinců zhruba 14- 32 $\mu\text{mol/l}$ ⁵. Jiný stav samozřejmě nastává, pokud je v organismu železa nadbytek³.

Uvolnění iontů železa z transferinu nastává při vazbě transferinu na jeho transferinový receptor. Celý komplex transferin-transferinový receptor je následně endocytózou přenesen do cytosolu buňky a železité ionty jsou redukovány na ionty železnaté. Právě železnaté ionty mají velmi nízkou afinitu k transferinu a jsou z něho uvolňovány a následně opět přenášeny transportérem pro kovové ionty 1. Uvolnění železitých iontů nastává také v kyselém prostředí³. Při nadbytku železa dochází k hromadění právě netransferinově vázaného železa (NTVŽ). Toto NTVŽ pak může přispívat k patologiím, které se pojí s nadbytkem železa⁵.

Železo uvnitř buněk může být začleněno a skladováno díky ferritinu nebo přeneseno do mitochondrií, kde je využito na příklad pro syntézu hemu³. Erytroblasty kostní dřeně potom využívají železo vázané na transferin k syntéze hemoglobinu⁸.

Ferritin je protein, jehož přesné složení se mění v závislosti na tkáni, ve které se vyskytuje. Železo přichází ve formě železnatých iontů, následně je oxidováno na železité ionty a začleněno do ferritinu. Když organismus poté železo vyžaduje, ferritin potřebné železo uvolní. Malé

množství ferritinu se nachází i v krvi. Toto množství je úměrné k zásobě celkově uloženého železa v těle³. Ferritin tak skladuje železo a tím pomáhá chránit organismus před oxidačním stresem, vyvolaným Fentonovou reakcí⁹.

Dalším úložištěm železa je hemosiderin. Zdá se, že hemosiderin je degradovaná forma ferritinu. Vyskytuje se v siderozomech, což jsou lyzozomy, které obsahují železo³.

3.4.3. Exkrece

U lidí dosud nebyl popsán žádný přesný exkreční mechanismus pro železo³. To bývá z organismu odstraňováno na příklad ztrátou krve, potem nebo olupováním kůže⁵. Vyloučené denní množství obvykle bývá shodné s množstvím přijatým, tj. přibližně 1 až 2 mg za den³.

Většina železa se nachází v červených krvinkách. Na konci života erytrocytu dochází k jeho fagocytóze makrofágy retikuloendoteliálního systému. Hemoglobin je degradován a železo, které je následně uvolněno se vrací do oběhu vazbou na transferin. Transferin pak dodává železo organismu, zejména buňkám, které železo vyžadují. Syntéza hemoglobinu je velmi důležitá, proto při nedostatku železa pro tuto syntézu je většina buněk schopná potřebné železo do oběhu uvolnit³. Pro samotnou syntézu hemoglobinu je potřeba denně zhruba 20- 25 mg železa. Proto musí být tento prvek důsledně recyklován⁵.

3.4.4. Regulace

V lidském organismu je přítomen velmi silný regulační mechanismus pro vstřebávání železa, který je dán důsledkem nedostatečných fyziologických mechanismů pro vylučování železa. Na příklad uptake železa bývá až desetkrát zvýšen v případě nedostatečné hladiny železa v organismu a týká se hemového i nehemového železa⁶.

Klíčovou úlohu pro homeostázu železa hraje peptidový hormon hepcidin. Tento hormon je produkován především v játrech. Hladiny hepcidinu kolísají v závislosti na stavu železa v organismu. Vyšší hladiny hepcidinu snižují vstřebávání železa a naopak⁵.

3.5. Faktory, ovlivňující absorpci železa

Absorbce železa mohou ovlivňovat i další složky potravy. Ve výsledku tak může být absorpce inhibována nebo naopak i zvýšena v závislosti na přítomných podmínkách. Pro měření absorpce jsou využívány stabilní izotopy nebo radioizotopy železa. Tyto částice jsou začleněny do přijaté stravy. Následně se vypočítá množství těchto (radio)izotopů, které jsou začleněny do erytrocytů, případně se měří celková tělesná radioaktivita. Negativní kontrolou je pak samotný subjekt, kdy se měří stejné hodnoty, aniž by byly předtím přijaty již zmíněné (radio)izotopy železa¹⁰.

Absorbce nehemového železa je negativně ovlivněna i složkami, které běžně nalezneme v potravinách. Jsou to na příklad fytáty, polyfenoly, vápník nebo mléko ⁶.

Kyselina fytová a její soli (fyty) slouží jako zásobárna fosfátů v semenech a zrnech. Zajímavostí je, že tyto látky disponují silnými chelatačními účinky. Ve výsledku pak dochází k navázání kovů a tvorbě nerozpustných sloučenin ¹⁰. Byla provedena studie u lidí, přičemž absorbce železa byla silně závislá na množství fytátů v potravě. Množství 2 mg současně přijatých fytátů inhibovalo absorpci železa o 18 %, 250 mg fytátů pak dokonce až o 82 % ¹¹.

Na druhou stranu, mezi látky povzbuzující absorpci železa patří kyselina askorbová či proteiny svalové tkáně ⁶.

3.6. Nemoci

At' už nedostatek či nadbytek železa může být pro lidský organismus škodlivý. Tyto odchylky od fyziologického stavu jsou buď získané, nebo mají určitou souvislost s dědičností. Vliv na hladinu železa má i strava, která obsahuje na příklad nevhodné množství železa (nedostatek nebo naopak nadbytek), větší ztráta krve, transfúze červených krvinek nebo mutace určitých genů ⁵.

3.6.1. Nedostatek

Nedostatek železa je hlavní příčinou anémie. Vzhledem k tomu, že přibližně dvě třetiny celkového železa jsou využívány k syntéze hemoglobinu, nedostatek železa má vliv na produkci zdravých červených krvinek ⁵.

3.6.1.1. Anémie z nedostatku železa

Obrovské množství populace (zhruba 3 miliardy lidí na celém světě) trpí chudokrevností v důsledku nedostatku železa, zejména pak díky sníženému příjmu železa z potravy, nižší schopnosti absorbce tohoto prvku nebo mají zvýšenou potřebu železa. Právě vyšší potřebu železa nalezneme u dárců krve, těhotných žen nebo při stavech ztráty krve včetně krvácení do zažívacího traktu nebo u některých forem rakoviny. Na nedostatečnou hladinu železa v organismu jsou náchylnější i děti a ženy. Nedostatek železa může způsobit předčasný porod, špatný vývoj růstu i ovlivnění nervového systému. Pacienti s anémií pak nejčastěji popisují příznaky jako jsou chronická únava, špatná tolerance zátěže, bolest hlavy a špatná schopnost se koncentrovat. Neléčená anémie pak může vést až ke komplikacím jako jsou arytmie, angina pectoris nebo infarkt. Je zde i určitá souvislost s nižší porodní hmotností nebo opožděným růstem v dětství. Lehčí případy nedostatku železa se korigují úpravou dietních návyků. Závažnější stavy, spjaté s nedostatkem železa, vyžadují transfúzi červených krvinek nebo intravenózní podání železa ⁵.

Homeostáza železa je narušena u většiny onkologických pacientů, ti bývají postiženi anémií ve více jak 40 % případů a při léčbě chemoterapií dosahuje tato úroveň až 80 %. Nízká

systémová hladina železa je z části způsobena i nádorem samotným, který využívá tento kov ke svému růstu. Dostupnost železa je zásadní i pro buněčnou proliferaci ⁴.

3.6.2. Nadbytek

Nadbytek železa vede k tvorbě depozit tohoto prvku v životně důležitých orgánech, jako jsou játra, srdce, slinivka břišní a další. To má pak za následek tvorbu volných radikálů, které mohou poškozovat proteiny, buněčné membrány či samotnou DNA a ve výsledku vést až k buněčné smrti. Neléčený chronický nadbytek železa zvyšuje riziko vzniku cirhózy jater, rakoviny, srdečních arytmií a srdečního selhání, neurodegenerativních onemocnění jako jsou Alzheimerova, Parkinsonova nebo Huntingtonova nemoc a obecně k předčasné smrti. Léčba spočívá ve flobotomii a železo-chelatační terapii ⁵.

3.6.2.1. Hemochromatóza

Nejčastější genetickou poruchou, která bývá spojována s přebytkem železa v lidském organismu, je hemochromatóza. Vzniká mutací několika genů, které ovlivňují regulační osu ferroportin-hepcidin. Tato choroba je spojena s vyšší absorpcí železa z potravy a jeho hromaděním v játrech, srdci, pankreatu a v dalších důležitých orgánech, kde následně dochází až k dysfunkci daného orgánu ⁵. V těle bývá nahromaděno i více jak 40 g železa, což je desetinasobek fyziologického stavu. Toto onemocnění se diagnostikuje měřením koncentrace sérového železa, ferritinu a saturace transferinu. Nejčastěji se přistupuje k snižování hladin železa pomocí odběrů krve ¹².

3.6.2.2. Aceruloplazminémie

Aceruloplazminémie je odchylka, která vzniká zmutováním genu pro ceruloplazmin. Ceruloplazmin vystupuje jako ferroxidasa a hraje důležitou úlohu při nasedání iontů železa na transferin. Pro toto onemocnění jsou charakteristické nízké sérové hladiny ceruloplazminu a akumulace železa v mozku, pankreatu a hepatocytech ⁵.

3.6.2.3. Parkinsonova choroba

Jedná se o jedno z nejrozšířenějších neurodegenerativních onemocnění. Pro Parkinsonovu chorobu jsou typické motorické, ale i nemotorické symptomy jako jsou změny v REM spánku, různé poruchy chování a další. Některé studie naznačují souvislost patogeneze tohoto onemocnění právě s hromaděním železa ve specifických oblastech mozku, zejména v bazálním gangliu - substantia nigra. Také hladina transferinu v mozku bývá zvýšena u pacientů, kteří jsou postiženi tímto onemocněním ¹³.

3.6.2.4. Alzheimerova nemoc

Zvýšený příjem železa je rizikovým faktorem i pro toto vážné neurodegenerativní onemocnění ¹⁴. Pro Alzheimerovu nemoc je typická přítomnost extracelulárních beta-amyloidů a intraneuronálních neurofibril. K patogenezi tohoto onemocnění opět mohou přispívat změny v homeostáze železa ¹⁵.

3.6.2.5. Předávkování se železem

Byly hlášeny i úmrtí v důsledku předávkování se přípravky, obsahující vysokou hladinu železa. Toxicita pak byla pravděpodobně spojena s tvorbou hydroxylových radikálů prostřednictvím Fentonovy reakce a vytvářením oxidačního stresu. Jsou stanoveny maximální doporučené dávky pro příjem tohoto mikroprvku. Děti do 13 let by neměly přijmout denně více jak 40 mg železa v potravě či doplňcích stravy. U dospělých je pak tato hranice 45 mg. Musíme vzít v potaz, že tento limit platí pouze pro zdravé lidi s průměrnou úrovní fyzické aktivity. Vyšší dávky pak mohou vyústit v žaludeční problémy, nevolnost, bolest břicha, zvracení nebo zácpu ⁶.

3.6.2.6. Vliv železa na nádorové buňky

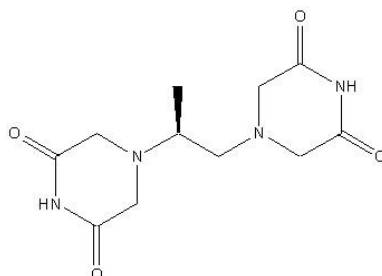
Chronický oxidační stres je i jedním z mechanismů, díky kterým může dojít k maligní transformaci buněk. Na druhou stranu, vysoké hladiny oxidačního stresu mají potenciál k zastavení růstu nádorových buněk, případně je úplně zničit. Nádorové buňky mají obecně méně antioxidantních enzymů než přítomné zdravé buňky. Tím pádem jsou náchylnější k oxidačnímu útoku. Navíc nádorové buňky mají vyšší metabolické nároky, přičemž dochází k zvýšení počtu transferinových receptorů (exportní protein ferroportin je naopak utlumen). Tyto rozdíly v metabolismu železa u buněk nádorového bujení a zdravých buněk by mohly vést k atraktivní terapeutické myšlence pro léčbu rakoviny ¹⁶. Již bylo popsáno několik látek, které byly schopny *in vitro* selektivně indukovat apoptózu v nádorových buňkách, případně *in vivo* nádor zmenšovat. Mechanismy tohoto působení však nebyly doposud plně popsány ¹⁷.

Druhou cestou pak může být snižování obsahu železa, tím i přísun tohoto prvku pro nádorové buňky a v konečném důsledku zastavení růstu zvrhlých buněk ¹⁶. Cytotoxické účinky chelátorů železa jsou vysvětlovány schopností těchto látek železo vyčerpat, čímž je inhibován enzym ribonukleotidreduktasa, který ionty železa obsahuje. Tím je omezena syntéza DNA ¹⁷. Potenciálně by zde měly využití právě chelátory železa ¹⁶. Optimální struktura chelátoru se však stále ještě hledá ¹⁷.

3.7. Chelatace

Schopnosti látek chelatovat se využívá i v běžné praxi. Chelatační činidla se na příklad využívají pro jejich ochranný vliv před nežádoucím kardiotoxickým účinkem, který vyvolávají antracykliny ⁴. Antracyklinová antibiotika (např. doxorubicin, daunorubicin) patří mezi často používaná protinádorová léčiva ¹⁸. Když hovoříme o kardiotoxicitě, zejména se jedná se o stav

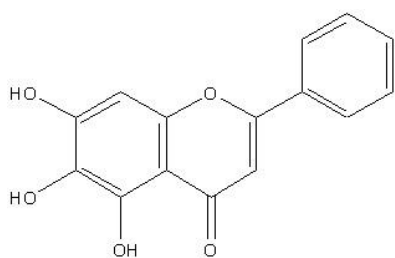
srdečního selhání, vyvolaný produkcí oxidačního stresu v souvislosti redoxní reakce železa a antracyklinů. Bisdioxopiperazin dexrazoxan je pak jediný schválený lék, který je určen k prevenci antracykliny navozeného srdečního selhání. Dexrazoxan snižuje výskyt tohoto jevu přibližně o 80 %¹⁹. Vzorec č. 1 zobrazuje strukturu dexrazoxanu.



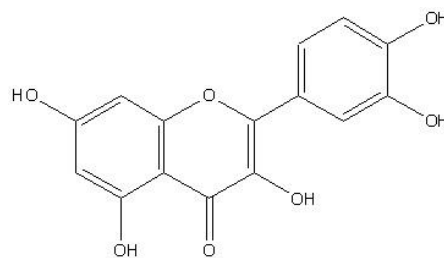
Vzorec č. 1: Dexrazoxan

Volné železo v organismu je schopné katalyzovat tvorbu nebezpečných hydroxylových radikálů. Právě chelatace tohoto železa se jeví jako zajímavý terapeutický přístup. Použití klasických chelátorů železa je však poměrně riskantní za předpokladu, že v organismu není zrovna přebytek iontů železa. Byly vyvinuty i látky zvané prochelátory, které plní úlohu chelatace železa jen po své aktivaci za specifických stresových podmínek v organismu²⁰. Chelátory železa díky své schopnosti zabraňovat Fentonově reakci svým způsobem fungují jako antioxidanty¹⁷.

I látky obsažené v rostlinách mohou vykazovat jistou schopnost chelatace. Již byly testovány chelatační schopnosti flavonoidů. Baikalein (Vzorec č. 2) s 6,7-dihydroxyskupinou dosahoval podobného chelatačního účinku jako klinicky používaný chelátor železa deferoxamin. Flavonoidy, které obsahovaly 3-hydroxylovou skupinu, 4-ketoskupinu a poloze 2,3 dvojnou vazbu s katecholovým kruhem B, byly také podobně chelatačně aktivní jako již zmiňovaný deferoxamin. Těchto hodnot dosahovaly však pouze v blízkosti neutrálního pH prostředí. Již jako méně účinné chelátory železa se jevíly flavonoidy s 5-hydroxylovou a 4-ketonickou skupinou²¹. Chelatační aktivita flavonoidů byla porovnávána i se silnými chelátory jako je na příklad salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon¹⁸. Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) je relativně nový lipofilní chelátor železa²². Testované flavonoidy samozřejmě nevykazovaly tak silný chelatační potenciál jako SIH. Vyšší schopnosti chelatace však dosahovaly flavonoidy, které oproti ostatním, ve své struktuře obsahovaly 4-ketonickou a 5-hydroxylovou skupinu. Jednalo se o kvercetin (Vzorec č.3) a kvercitrin. Dalším chelatačním místem se pak zdála být přítomnost *ortho*-katecholové skupiny v kruhu B¹⁸.



Vzorec č. 3: Baikalain



Vzorec č. 2: Kvercetin

Chelatace železnatých iontů některými polyfenoly tak může přímo ovlivňovat Fentonovu reakci a tím bránit produkci vysoce reaktivních hydroxylových radikálů. Navíc mohou polyfenoly fungovat i jako kooxidanty, kdy se podílí na regeneraci určitých vitamínů ²³.

3.8. Volné radikály

Během poslední doby se často mluví o volných radikálech. Volný radikál lze definovat jako částici s nepárovým elektronem. Záporně nabité elektrony zaujímají v atomech či molekulách místa o určité energetické hladině. Tento specifický prostor se nazývá orbital. Jednotlivý orbital pak může obsahovat nejvíce dva elektrony s opačným spinem. Pokud se pak vyskytuje v atomu či molekule i jen jeden jediný orbital s nepárovým elektronem, lze o částici hovořit jako o volném radikálu. Volný radikál poznáme dle tečky, uvedené v jeho vzorci. Zmíněná tečka symbolizuje nepárový elektron ²⁴. Pro volné radikály je typická nestabilita, kdy se snaží reagovat s okolními molekulami, čímž by sami dosáhly stabilnějšího stavu. Tato reaktivita pak pro lidský organismus představuje nebezpečí ²⁵. Přehled častých reaktivních forem kyslíku a dusíku zobrazuje upravená Tabulka č. 2 ²⁴.

Název reaktivní formy kyslíku/dusíku	Značka
Superoxid	O ₂ •
Hydroxylový radikál	HO•
Peroxy	ROO•
Alkoxy	RO•
Oxid dusnatý	NO•
Oxid dusičitý	NO ₂ •

Tabulka č. 2: Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku ²⁴

Volné radikály však plní i fyziologické funkce²⁴. Na příklad fagocyty využívají volné radikály při soupeření s bakteriemi²⁵. Dále se volné radikály v lidském organismu účastní i mnoha jiných procesů (imunitní odpověď, přenos energie a další). V jistých případech pak mohou volné radikály organismu i škodit²⁴. Zdrojem volných radikálů je i záření z vnějšího prostředí nebo akutní stavy, při kterých dochází k zvýšené produkci právě těchto radikálů. Příkladem může být infarkt myokardu²⁵.

3.8.1. Antioxidanty

Koncentrace těchto radikálů je běžně v rovnováze s koncentracemi antioxidantů, které organismus také produkuje. Mezi významné antioxidanty patří superoxiddismutasa (SOD), glutathion peroxidasa, ale i neenzymové antioxidanty jako jsou kyselina askorbová, alfa-tokoferol, karotenoidy, cystein, glutathion, bilirubin či flavonoidy²⁶.

3.8.1.1. Superoxiddismutasa

Tento enzym je schopen volné radikály likvidovat. Díky této vlastnosti je pro lidský organismus nepostradatelný. Volné radikály jsou pomocí superoxiddismutasy přeměňovány na již méně reaktivní peroxid vodíku. Ten je následně redukován na vodu a kyslík pomocí enzymu zvaného katalasa. Přeměny peroxidu vodíku na vodu a kyslík je schopen i enzym glutathionperoxidasa²⁵. V buňkách jsou dostupné dva typy superoxiddismutas. Enzym SOD-1 nalezneme v cytosolu. Označuje se jako Zn-SOD. Druhý typ superoxiddismutasy (SOD-2) je pak popisován jako Mn-SOD a chrání mitochondrie²⁷.

3.8.1.2. Kyselina askorbová

Kyselina askorbová je známá též pod názvem vitamín C a jedná se o první objevený vitamín²⁵. V plazmě dosahuje mikromolárních koncentrací a jedná se o významné redukční činidlo. Díky své schopnosti redukovat železité ionty na ionty železnaté se podílí i na absorpci železa²⁴.

3.8.1.3. Vitamín E

Na rozdíl od vitamínu C je tokoferol (vitamín E) rozpustný v tucích a nerozkládá se vlivem zvýšené teploty. Nejčastěji je zastoupen v rostlinných klíčcích. Tokoferol tak patří mezi přirozené antioxidanty. Pomáhá bránit buněčné organely před vlivem volných radikálů. Zajímavostí je, že antioxidační působení vitamínu E je spojeno s přeměnou samotného tokoferolu na volný radikál. Ten je ale opět poměrně rychle regenerován na aktivní formu. Na tuto zpětnou přeměnu má pravděpodobně vliv i glutathion a vitamín C²⁵.

Mezi antioxidanty můžeme řadit i proteiny jako je transferin, který je schopen železo vázat. V konečném důsledku se pak železo nemůže podílet na reakcích, díky kterým se vytváří volné

radikály. Proteiny s feroxidasovou aktivitou pak udržují železo v oxidačním stavu železitých iontů. Touto aktivitou disponují na příklad ferritin nebo ceruloplazmin ²⁴.

3.8.2. Oxidační stres

Nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidační kapacitou organismu potom může vyústit v oxidační stres. Oxidační stres pak může být zodpovědný za vícero patologických stavů. Právě látky, které jsou schopny železo chelátovat, mají potenciál ke snížení produkce reaktivních kyslíkových radikálů a tím i omezení oxidačního stresu ²⁷.

I během zánětu dochází k oxidačnímu vzplanutí díky aktivovaným makrofágům a neutrofilům. Je tak produkováno velké množství volných radikálů, jako jsou již zmíněný superoxid, oxid dusnatý a další. Za těchto podmínek může být antioxidační kapacita překonána, což může vést k poškození lipidů, proteinů i samotné DNA ²⁶.

Peroxidace lipidů je jev, kdy volné radikály (nejčastěji hydroxylový nebo alkoxylový radikál) atakují mastné kyseliny (zejména polyenové mastné kyseliny). Tyto kyseliny obsahují více dvojných vazeb. Po útoku volných radikálů ztrácejí polyenové mastné kyseliny dvojnou vazbu a dochází k tvorbě dalších reaktivních metabolitů. Ve výsledku je pak ovlivněna fluidita lipidů, propustnost biologických membrán i ovlivnění enzymů, které jsou přítomny v těchto membránách ²⁴. Tvorba volných radikálů pomocí Fentonovy reakce se tak může i významně podílet při vzniku aterosklerózy, kdy dochází k oxidaci LDL cholesterolu ²⁸.

Volné radikály mohou poškozovat aminokyseliny či proteiny v lidském organismu. Vlivem oxidace reaktivních radikálů vzniká z cysteinu kyselina cysteinová nebo kynurenin z tryptofanu. Dále se můžeme setkat i s hydroxylací aminokyselin. Důsledky těchto dějů mohou být závažné, proteiny pak mění své funkce či vznikají antigeny, které mohou vést k autoimunitní reakci ²⁴.

Hydroxylový radikál je tak reaktivní, že může atakovat i samotnou deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). V konečném důsledku pak mohou volné radikály zapříčinit translační chyby, mutace nebo inhibici proteosyntézy následkem poškození deoxyribonukleové kyseliny. Hydroxylový radikál je schopen i přerušit či jinak modifikovat polynukleotidový řetězec ²⁴.

3.8.3. Onemocnění, spojovaná s vlivem volných radikálů

Oxidační stres se pak také může podílet na vzniku závažných onemocnění jako jsou rakovina, Parkinsonova a Alzheimerova nemoc, diabetes mellitus, ateroskleróza nebo infarkt myokardu ²⁶.

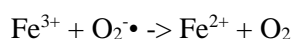
Při akutním srdečním infarktu dochází k omezení přísunu krve do srdce. Tkáň postupně degeneruje a relativně brzy odumírá. Srdeční tkáň se přirozeně snaží tomuto nebezpečí bránit, nastává rozšíření kolaterálních cév se snahou o obnovení srdeční výživy. Tento jev se nazývá

reperfuze. Je zde myšlenka, že právě při reperfuzi, která je spojena s vyšší nabídkou kyslíku, dochází k nejvyšší produkci volných radikálů ²⁵.

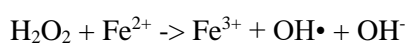
Zajímavostí je, že hromadění oxidovaných biomolekul koreluje s procesem stárnutí ²⁶. Existují i teorie, podle kterých ve starším organismu dochází k snadnější a vyšší produkci volných radikálů ²⁵. Ve starším věku tak může být někdy potřeba antioxidanty dietně suplementovat ²⁹.

3.8.4. Haber-Weissova reakce a Fentonova reakce

Za určitých podmínek je železo schopno usnadnit tvorbu volných radikálů, které představují nebezpečí pro buňky lidského těla. Nejsilnějším oxidačním činidlem jsou pak hydroxylové radikály. Superoxid redukuje železité ionty na ionty železnaté (Rovnice č. 1) a ty pak reagují s peroxidem vodíku za tvorby nebezpečného hydroxylového radikálu (Rovnice č. 2) ²⁷.



Rovnice č. 1: Redukce železitých iontů na ionty železnaté superoxidem ²⁷



Rovnice č. 2: Fentonova reakce ²⁷

Druhá zmíněná reakce, při které dochází k tvorbě hydroxylového radikálu, je známa pod názvem Fentonova reakce. Obě reakce dohromady, kdy superoxid reaguje s peroxidem vodíku v přítomnosti železa za současné produkce molekulárního kyslíku, hydroxylového radikálu a hydroxylového aniontu se může souhrnně nazvat Haber-Weissova reakce ²⁷.

Zmíněné železnaté a železité ionty (Fe^{2+} a Fe^{3+}) jsou přítomny jen za určitých *in vitro* laboratorních podmínek. V biologickém systému tomu tak není. Tyto ionty tvoří komplexy s molekulou s volným elektronovým párem, která se nazývá ligand. Ligandem může být aminokyselina, protein, lipid, ATP nebo fosfát či citrát. Náboj iontu železa je vložen do celkového náboje komplexu. Komplex se železnatými ionty se pak značí X-Fe (II), se železítými X-Fe (III) ²⁴.

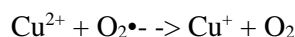
Produkce hydroxylových radikálů tak vyžaduje přítomnost volného železa a reaktivního kyslíkového radikálu ²⁷. Fyziologicky v organismu není mnoho volných, redoxně aktivních iontů železa. Odhaduje se, že méně jak 5 % (50 až 100 μM) z celkové kapacity železa v buňce je přítomno právě v této redoxně aktivní formě ³⁰. NADPH-oxidasa je také schopna generovat superoxid. Tento jev je obvykle spojován se zánětlivými stavy, na kterých se podílejí makrofágy

a neutrofilů. Mnoho tkání pak obsahuje enzym xanthinoxidasu. Xanthinoxidasu je také schopna produkovat superoxid a peroxid vodíku. Superoxid se dále vyskytuje v mitochondriích, kde je součástí dýchacího řetězce ²⁷.

Volné radikály jsou často nestabilní. Superoxid je na příklad spontánně rozložen na peroxid vodíku a molekulární kyslík. Jak již bylo popsáno, ještě rychleji tato přeměna probíhá pomocí enzymu superoxidodismutasy ²⁷.

Superoxid i peroxid vodíku jsou v organismu přítomny i za fyziologických podmínek. Tento fakt podporuje i skutečnost, že superoxidodismutasy jsou v lidském organismu bohatě zastoupeny. Z toho vyplývá, že železo, které je také součástí Haber-Weissovy reakce, musí být pečlivě regulováno, aby se zabránilo produkci radikálů a tím i možnému poškození buněk. Téměř veškeré železo je v lidském organismu začleněno do proteinů, v plazmě je vázáno na transferin nebo je součástí hemoglobinu či myoglobinu. Volné železo se vyskytuje jen málo ²⁷. Volné železo se fyziologicky využívá k přenosu železa do enzymů. Pro tento přenos je však životně důležitý správně fungující antioxidační systém ²⁴.

Haber-Weissova reakce neprobíhá jen s volnými ionty železa. Produkci volných radikálů může katalyzovat i měď (Rovnice č. 3) ³¹.



Rovnice č. 3: Haber-Weissova reakce s ionty mědi ³¹

Měďnaté ionty jsou superoxidovým radikálem redukovány. Redukci na měďnaté ionty však může způsobit i jiné redukční činidlo (na příklad glutathion, vitamín C a další). Prostřednictvím Fentonovy reakce pak měďné ionty katalyzují vznik hydroxylového radikálu ³¹. I měď samozřejmě hraje v organismu významnou fyziologickou roli. Ionty mědi jsou součástí proteinů, které jsou pro organismus důležité. Dále se měď podílí na respiraci, správných neurologických funkcích nebo i ovlivňuje metabolismus železa ³².

3.9. Redukce

Stabilita oxidačních stavů železa je závislá na přítomném pH. Železnaté ionty jsou více stabilní v kyselém prostředí. V alkalickém prostředí jsou naopak snadněji oxidovány na ionty železité. Významná hodnota pH v lidském organismu je 7,4 (krevní plazma, cytoplazma buněk), kyselejší prostředí pak nalezneme v zanícené tkáni. Hodnoty nižší jak 6,0 se vyskytují na příklad v lysozomech nebo v rostlinných vakuolách ³³.

Vzhledem k přítomnosti různých redukčních činidel (kyselina askorbová, glutathion) se železo vyskytuje v buňkách zejména ve formě železnatých iontů. Seskupení železa s fenoly (především flavonoidy) tak může katalyzovat dismutaci superoxidového aniontu, což v konečném důsledku může vést k Fentonově reakci ³³.

3.10. Fenolové sloučeniny

V poslední době se zvyšuje výskyt onemocnění, které mají určitou souvislost s výživou a často bývají slučovány pod pojem metabolický syndrom. I díky tomu se zvyšuje zájem o bioaktivní rostlinné látky s potenciálním ochranným potenciálem ³⁴. Právě přijímaná strava a životní styl mají zásadní význam pro prevenci chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, poruchy kognitivních funkcí, diabetes mellitus druhého typu nebo rakovina. Středomořská strava pak často bývá spojována s dlouhověkostí a lepší kvalitou života. Tato strava je bohatá na ovoce, zeleninu, olivový olej, luštěniny, celozrnné pečivo a ryby. Důležitou složkou jsou i nenasycené mastné kyseliny a polyfenoly ³⁵. Velká skupina polyfenolů, do které samozřejmě fenolové kyseliny také patří, často vykazuje chemickou antioxidační aktivitu *in vitro*. Při zkoumání *in vivo* se pak ukazuje, že účinky na živý organismus jsou pleiotropní ³⁴.

3.10.1. Polyfenoly a jejich účinky

Souvislost polyfenolů s prevencí rakoviny prostaty byly zkoumány již dříve. Ne vždy byly výsledky konzistentní, ale panuje všeobecná shoda, že polyfenoly jsou do budoucna velkým příslibem pro léčbu rakoviny prostaty ³⁶. Mluví se i o ochranném vlivu před karcinogenezí žaludku a tlustého střeva ³⁷. Některé studie hovoří i o interakci polyfenolů s endotelovými buňkami a buňkami hladkého svalstva. Tyto interakce by mohly ovlivnit endoteliální dysfunkci, krevní tlak a tím i snížit riziko kardiovaskulárních onemocnění ³⁴. Některé studie naznačují, že polyfenoly jsou schopny indukovat významné antioxidační enzymy, jako jsou superoxiddismutasa, katalasa nebo glutathionperoxidasa a inhibovat expresi genů pro enzymy jako je xanthinoxidasa ²³.

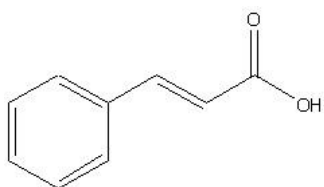
Polyfenoly mohou ovlivnit i uptake jiných důležitých látek jako jsou kyselina listová, thiamin nebo glukóza. Zde pak záleží na jednotlivé polyfenolové sloučenině. Některé mohou uptake těchto látek zvýšit, jiné zas absorpci snižují ³⁸. Vše má tak i svou stinnou stránku. Za určitých okolností mohou i tyto látky potenciálně lidskému organismu škodit ³⁹.

Obecně fenolové sloučeniny představují jednu z nejpočetnějších skupin obsahových látek v rostlinné říši. Byly identifikovány tisíce různých struktur ³⁹. Tyto polyfenoly jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin. Podílí se na růstu a reprodukci rostliny, hrají však i úlohu ochrannou, ať už před viry, mykotickými infekcemi, parazity nebo predátory. Mimo jiné mohou mít vliv i na zbarvení rostliny ⁴⁰. Strukturálně se mohou vyskytovat ať už jako nízkomolekulární fenolové kyseliny či vysoce polymerované molekuly, jako na příklad tanin ³⁹. Rozmanitost

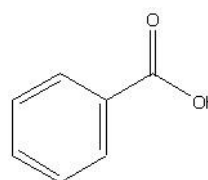
polyfenolů vedla k mnoha způsobům kategorizace těchto přírodních látek. Polyfenoly tak můžeme klasifikovat na základě jejich zdroje, biologické funkce nebo dle chemické struktury ²³.

3.10.1.1. Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny jsou strukturně velmi jednoduché molekuly ³⁹. Biosyntéza fenolových kyselin vychází z aminokyseliny fenylalanin. Fenolové kyseliny se dělí na deriváty kyseliny skořicové (Vzorec č. 4), např. kyselina ferulová, sinapová, kávová nebo kumarová, a kyseliny benzoové (Vzorec č. 5), např. kyselina *p*-hydroxybenzoová, syringová, vanilová nebo gallová ⁴¹. Fenolové kyseliny jsou charakterizovány přítomností aromatického kruhu a organické karboxylové funkční skupiny. V ovoci a zelenině bývají častěji ve vyšších koncentracích zastoupeny deriváty kyseliny skořicové než deriváty kyseliny benzoové. Přítomnost fenolových kyselin se může podílet na pocitu svíravé a hořké chuti ⁴².



Vzorec č. 5: Kyselina skořicová



Vzorec č. 4: Kyselina benzoová

Fenolové kyseliny se většinou nenachází v rostlinách samostatně ve volném stavu (případně jsou tak obsaženy jen ve velmi nízkých koncentracích). Při určitých odchylkách od fyziologického stavu, kontaminací mikroorganismy nebo za jiných okolností může dojít v rostlině k hromadění volných fenolových kyselin. Existují i případy, kdy slouží zastoupení obsažených volných fenolových kyselin v rostlině jako chemotaxonomické kritérium. Příkladem může být mezidruhový rozdíl u papriky. *Capsicum frutescens* (Solanaceae) obsahuje fenolové kyseliny pouze v jejich glykosylované formě na rozdíl od *Capsicum annum* (Solanaceae), kde nalezneme i volné fenolové kyseliny ⁴³. Fenolové kyseliny lze však v rostlinách nalézt častěji v jejich vázané formě (estery, glykosidy a další) ⁴².

Vedle šlechtění rostlin za účelem zvýšení jejich výnosu či odolnosti vůči chorobám se v poslední době vyvíjí i nové odrůdy, které obsahují vyšší obsah fenolových kyselin. Je zde určitá vidina silnějšího antioxidačního efektu, a tudíž i zvýšení prospěšnosti lidskému zdraví ⁴².

Zastoupení vybraných fenolových kyselin v zelenině zobrazuje upravená Tabulka č. 3

Matečná rostlina (čeled')	Obsah fenolových kyselin (mg.100 g ⁻¹ čerstvé plodiny)	Nejvíce zastoupená fenolová kyselina
<i>Beta vulgaris</i> (Chenopodiaceae)	27,0	Ferulová kyselina
<i>Brassica oleracea</i> (Brassicaceae)	15,0	Sinapová, kávová kyselina
<i>Raphanus sativus</i> (Brassicaceae)	12,0	Kumarová, ferulová kyselina
<i>Capsicum annuum</i> (Solanaceae)	4,7	Kumarová, ferulová kyselina
<i>Brassica rapa</i> (Brassicaceae)	4,6	Sinapová, ferulová kyselina
<i>Allium cepa</i> (Alliaceae)	1,0	Kumarová kyselina
<i>Cucurbita pepo</i> (Cucurbitaceae)	0,9	Kumarová, kávová kyselina

Tabulka č. 3: Zastoupení vybraných fenolových kyselin v zelenině

3.10.1.1.1. Fenypropionové kyseliny

- 3-fenypropionová kyselina

Kyselina 3-fenypropionová byla na příklad izolována z kořene *Zoysia japonica* (Poaceae). Tato rostlina je v symbiotickém vztahu s bakteriemi kmene *Arthrobacter humicola*. 3-fenypropionová kyselina vykazuje schopnost inhibovat klíčení semen a růst u ředkviček. Efekt potlačující růst a klíčení semen byl popsán u této fenypropionové kyseliny již dříve. Do budoucna zde tak existuje potencionální cesta k vývoji ekologického herbicidu ⁴⁴.

3-fenypropionová kyselina a další deriváty fenolových kyselin byly přítomny i v kořenovém exsudátu okurky (*Cucumis sativus*, Cucurbitaceae). I v tomto případě zde tyto látky slouží jako autotoxiny. Omezují růst rostliny, a tím mají v důsledku vliv na kvalitu výsledných plodin ⁴⁵.

- 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina

Tato fenylpropionová kyselina byla izolována mimo jiné z *Dendrobium moniliforme* (Orchidaceae) ⁴⁶, dále na příklad z *Petasites tricholobus* (Asteraceae) ⁴⁷ či z kořenového systému *Hemarthria altissima* (Poaceae) ⁴⁸. Mezi další rostliny, ze kterých byla *p*-hydroxyfenylpropionová kyselina izolována patří i svízele (*Galium verum*, Rubiaceae) ⁴⁹. Nať svízele lze využít dle lidového léčitelství pro jeho močopudné účinky ⁵⁰. Droga snižuje i chuť k jídlu a žvýkání čerstvého svízele napomáhá při léčení problémů v dutině ústní ⁵¹.

Spolu s dalšími obsahovými látkami byla izolována 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina také z rostliny *Lepisorus contortus* (Polypodiaceae) ⁵².

Kyselina 3-(4-hydroxyfenyl)propionová je mimo jiné i metabolitem naringenu a luteolinu ⁵³. Bohatým zdrojem luteolinu jsou celer, petržel, brokolice, mrkev či květy chryzantémy ⁵⁴.

Ve studii intestinální mikroflóry u myši byla kyselina 3-(4-hydroxyfenyl)propionová jedním z hlavních metabolitů flavonového glykosidu apigenin-7-glukosidu ⁵⁵.

- 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina

Z experimentální práce (Labib) je známo, že kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová společně s dalším metabolitem (floroglucinolem) vzniká v průběhu trávení flavanonu hesperetinu. Bohatým zdrojem hesperetinu jsou citrusy, jako na příklad *Citrus reticulata* (Rutaceae) či *Citrus aurantifolia* (Rutaceae) ⁵³.

- 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

Další ze studií testovala střevní metabolismus luteolinu a kvercetinu. Anaerobní bakterie *Eubacterium ramulus* je schopna přeměňovat tyto flavonoidní aglykony na zmíněnou kyselinu 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionovou ⁵⁶. 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionovou kyselinu lze triviálním názvoslovím označit jako kyselinu dihydrokávovou. Jak již je z názvu patrné, současně s kyselinou kávovou se jedná o metabolity kyseliny chlorogenové, která je poměrně hojně zastoupena v kávě ⁵⁷. Některé studie ukazují, že pravidelné pití kávy může snižovat riziko vzniku diabetes mellitus druhého typu, hypertenze či jiných kardiovaskulárních onemocnění ⁵⁸.

Často jsou tak fenolové kyseliny vytvářeny v průběhu metabolismu složitějších látek (na příklad flavonoidů), které mají široké zastoupení v potravě.

3.10.1.2. Flavonoidy

Flavonoidy se dělí do jednotlivých podskupin, kde je dohromady popsáno více jak 5000 sloučenin. Rozdělení flavonoidů do podskupin a příklady jejich aglykonů zobrazuje upravená Tabulka č. 3 ³⁹.

Podskupina flavonoidů	Příklad aglykonů
Flavonoly	Kvercetin, Kempferol, Myricetin
Flavony	Apigenin, Luteolin
Flavanoly	Katechiny, Epikatechiny
Flavanony	Hesperitin, Naringenin
Antokyany	Cyanidin, Pelargonidin, Delfinidin
Isoflavony	Genistein, Dadzein

Tabulka č. 4: Rozdělení flavonoidů do podskupin a příklady jejich aglykonů ³⁹

Mnoho flavonoidů má antioxidační účinky, dále pak mohou vykazovat i účinky antiproliferační, některé i jistou fytoestrogenní aktivitu ⁵⁹. Polyfenoly se tak ve velké míře podílejí na antioxidačních účincích ovoce ²³. Flavonoidy hrají důležitou úlohu i při růstu rostliny. U flavonoidů jsou mimo účinky protizánětlivé, antialergenní nebo antivirotické popisovány i jiné schopnosti, mezi které se řadí vychytávání volných radikálů, schopnost redukce a chelatace kovů či účast na regulaci buněčné signalizace a expresi genů. Tyto sekundární metabolity rostlin mají široké zastoupení v ovoci, zelenině i bylinách. Nalezneme je však i v populárních nápojích jako jsou na příklad čaj nebo víno ⁴³. Grapefruity a pomeranče tvoří hlavní zdroj flavanonů (naringenin, hesperidin), flavan-3-oly zase najdeme zejména v čaji nebo v čokoládě. Isoflavony (genistein, dadzein) a antokyany (cyanidin, delfinidin) se často nachází v bobulích. V neposlední řadě je nutno zmínit flavonoly (kvercetin, kempferol, myricetin), které jsou bohatě obsaženy v cibuli, jablcích či brokolici ⁵⁹.

3.10.1.2.1. Příklady bylin s obsahem flavonoidů

- Zlatobýl obecný (*Solidago virgaurea*, Asteraceae)

Mezi obsahové látky, které nalezneme v této rostlině, patří na příklad flavonoidní glykosidy hyperosid, rutin, kvercitrin či isokvercitrin. Zlatobýl se využívá pro své močopudné, protizánětlivé a mírně analgetické účinky. Kvetoucí nař této rostliny se často využívá při problémech močových cest ⁴³.

- Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*, Vacciniaceae)

Zejména plod této rostliny je bohatý na antokyany – další podskupinu flavonoidů⁶⁰. Nalezneme zde zejména glykosidně vázané aglykony malvidin, cyanidin a delphinidin⁴³. *Vaccinium macrocarpon* (Vacciniaceae) se pak využívá i jako farmaceutická surovina, nalezneme ji v četných čajových směsích i doplňcích stravy⁶¹. Dále mezi obsahové látky patří terpeny, organické kyseliny, komplexní sacharidy a cukry⁶².

Obzvláště proantocyanidiny jsou špatně absorbovány v tenkém střevě. Po dosažení tlustého střeva dochází vlivem střevní mikroflóry k produkci četných metabolitů, kterými jsou na příklad fenylctové, fenylpropionové, skořicové či benzoové kyseliny. Volné frakce těchto fenolových kyselin byly v moči identifikovány u lidí, kteří předtím požili brusinky⁶².

70 až 90% infekcí močových cest bývá způsobeno uropatogenním mikroorganismem *Escherichia coli*. Přestože nejsou zcela pochopeny všechny mechanismy účinku, v případě infekce močových cest dochází při užívání brusinek k potlačení části symptomů. Pravidelné užívání pak působí profylakticky⁶².

Jedna z hlavních hypotéz předpokládá, že brusinky a jejich metabolity působí proti bakteriální kolonizaci ve fázi ulpívání bakterií na buňkách močových cest. To může poté ovlivnit i samotnou progresi infekce. Metabolity, které vznikají v průběhu trávení, přispívají k znesnadnění nasedání bakterií na buňky močových cest. Inhibice adheze *E. coli* byla testována i u 3-fenylpropionové kyseliny, 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny a 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny, které byly testovány v rámci této rigorózní práce pro své železo-chelatační a redukční účinky⁶².

U brusinek jsou popisovány také účinky antioxidační, bakteriostatické i antivirotické⁶¹.

- Lípa srdčitá (*Tilia cordata*, Tiliaceae)

V této rostlině nalezneme flavonoidní aglykony jako jsou kvercetin nebo kempferol. Lípa se využívá při nachlazení nebo i pro svůj zklidňující účinek. Květ této rostliny patří mezi lékopisné drogy⁴³.

- Měsíček lékařský (*Calendula officinalis*, Asteraceae)

V této krásně oranžově kvetoucí rostlině jsou zastoupeny zejména flavonoidní glykosidy isokvercitrin a rutin. Měsíček se mimo jiné využívá při hojení ran a pro své protizánětlivé účinky. *Calendulae flos* patří opět mezi lékopisné drogy⁴³. Nať měsíčku v čerstvém stavu se využívá i v homeopatii, zejména pak při povrchových defektech jako jsou drobná poranění, popáleniny a omrzliny⁵⁰.

- Bez černý (*Sambucus nigra*, Sambucaceae)

Mezi další lékopisné drogy patří samozřejmě i květ bezu. Mezi flavonoidní glykosidy, obsažené v této rostlině, patří rutin, astragalín, isokvercitrin a hyperosid. Tato rostlina je známa také pro své protizánětlivé a mírně močopudné účinky⁴³. Květ bezu lze zevně použít při koupelích a ke kloktání⁵⁰.

- Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*, Hypericaceae)

Relativně hojně jsou v této bylině zastopeny flavonoidní glykosidy rutin, isokvercitrin nebo hyperosid. V českém lékopisu je uveden článek *Hyperici herba*. Třezalková nať je známa pro své antidepressivní účinky. Z hlediska indukce enzymů cytochromu P450 (zejména podjednotka 3A4) by mělo být odborně konzultováno vzájemné užívání této rostliny s jinými léky⁴³.

Určité polyfenolové látky tak vykazují různě silnou schopnost k ovlivnění cytochromu P450. Známým a poměrně silným inhibitorem CYP3A4 je grapefruitová šťáva (hlavními polyfenoly jsou zde naringin a narirutin). I flavonoly a flavony jsou schopny působit na enzymy CYP1A2, CYP2C9 nebo CYP2D6. Antokyany mohou ovlivnit CYP2C19⁶³.

3.10.2. Příjem polyfenolů a jejich metabolismus

Polyfenoly jsou tak běžně přítomny v lidské stravě. Rozdíly při zpracování potravin hrají samozřejmě roli v konečném obsahu fenolových kyselin a flavonoidů u jednotlivých produktů. Na příklad během vaření můžeme ztratit i více jak 75 % obsažených polyfenolů. Celkový obsah polyfenolů dostupných v potravě se liší v závislosti na konkrétní potravě a způsobu její úpravy³⁹.

Stravou přijaté polyfenoly jsou v organismu metabolizovány podobně jako ostatní xenobiotika³⁹. Flavonoidy se vyskytují většinou ve své glykosidní formě (výjimkou jsou pak flavan-3-oly, pocházející z čaje). Struktura molekuly má vliv i na vstřebávání daného flavonoidu⁵⁹. Během cesty flavonoidů k cílovým orgánům dochází k četným modifikacím (metabolismus v játrech, tenkém a tlustém střevě). Postupně dochází ke zjednodušování struktury a tvorbě příslušných metabolitů⁴³.

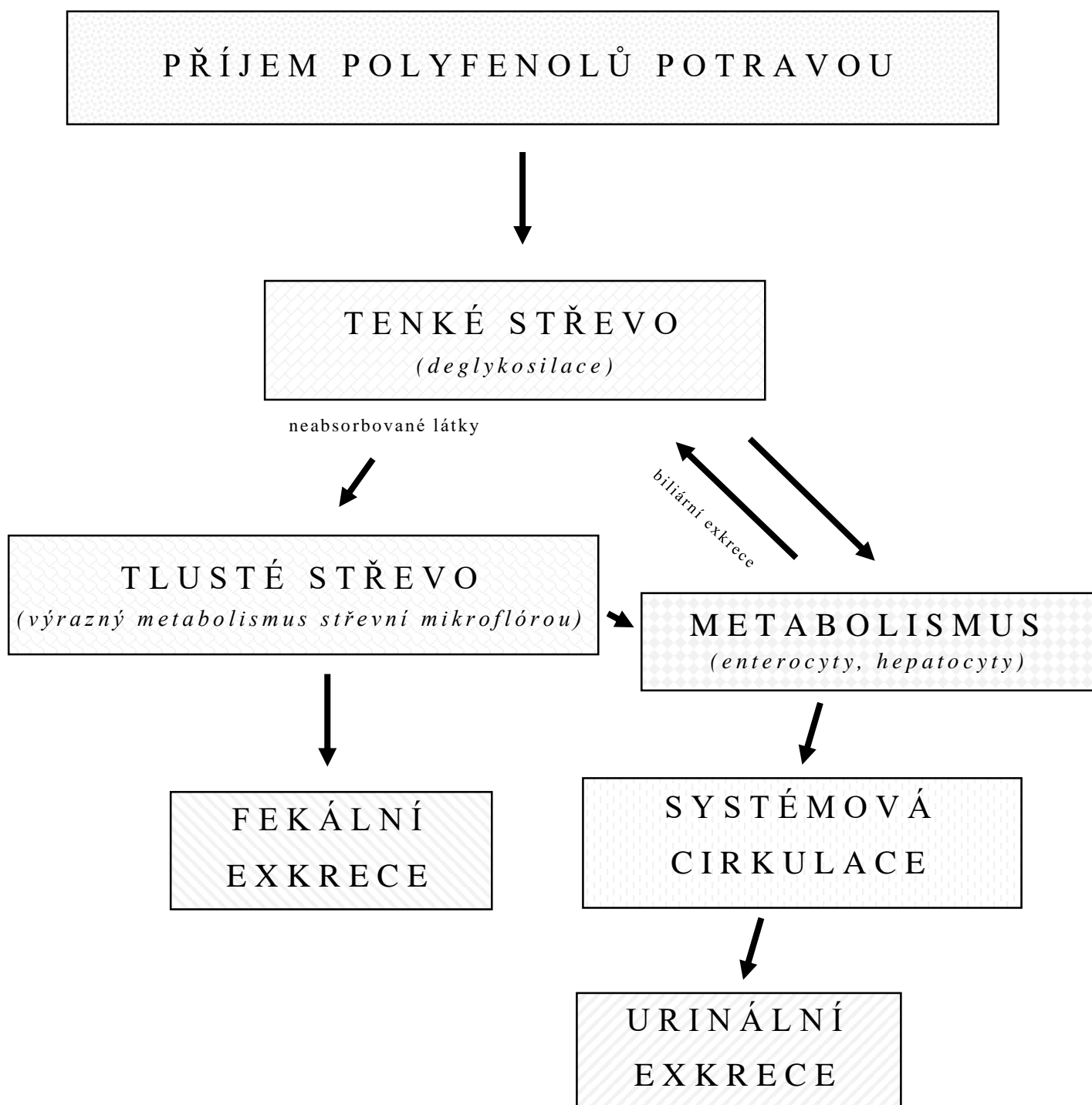
Pouze minoritní množství je absorbováno z horní části gastrointestinálního traktu. Stravou přijaté flavonoidy jsou poměrně špatně absorbovány⁵⁹. Odhaduje se, že pouze 5-10 % z celkového příjmu polyfenolů se v tenkém střevě absorbuje. Zbývající polyfenoly (90-95 % z celkového příjmu) se mohou koncentrovat v lumen střeva. V gastrointestinálním traktu může docházet k hydrolýze glykosidů na odpovídající aglykony. Ty jsou poté absorbovány stejně jako nízkomolekulární polyfenoly. Absorbované aglykony jsou následně metabolizovány

methyloací katechol-O-methyltransferasou nebo konjugovány s kyselinou glukuronovou či sírovou. Konjugované a methylované sloučeniny jsou pak vylučovány močí nebo žlučí ⁵⁹.

Fenolové sloučeniny, které nebyly absorbovány, se dále dostávají do tlustého střeva, kde jsou dále hydrolyzovány místní mikroflórou ⁵⁹.

Po absorpci v tenkém střevě dochází k metabolismu první fáze (oxidace, redukce, hydrolýza). Druhá fáze metabolismu spočívá zejména v konjugačních reakcích v enterocytech a hepatocytech, což vede k tvorbě rozpustných konjugátů (glukuronidy, sírany). Ty jsou pak uvolňovány do systémové cirkulace a závěrem vylučovány močí nebo žlučí ⁵⁹.

Tlustého střeva pak dosahují na příklad flavonoidy, které nebyly zatím absorbovány nebo flavonoidy, které již byly vstřebány a nyní jsou vyloučeny jako konjugáty žlučí ⁵⁹. Polyfenoly vylučované žlučí, jak již bylo zmíněno, mohou být ještě dekonjugovány a přes enterohepatální cirkulaci znovu reabsorbovány ⁵⁹. Právě střevní mikroflóra je tak zodpovědná za přeměnu polyfenolové struktury na metabolity s nízkou molekulovou hmotností, které mohou být ještě následně absorbovány a vykazovat účinky na lidský organismus. Nejvyšší koncentrace mikrobiálního osídlení je v tlustém střevě. Z mnoha druhů bakterií, které by se mohly podílet na metabolismu fenolových látek, bylo identifikováno několik druhů (*Escherichia coli*, *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Eubacterium sp.*). Metabolismus polyfenolů střevní mikroflórou zahrnuje štěpení glykosidických vazeb a destrukci heterocyklické struktury. V závislosti na struktuře výchozí molekuly jsou pak tvořeny příslušné metabolity. Biologická dostupnost polyfenolů nebo jejich metabolitů tak závisí nejen na jejich příjmu potravou, ale i na rozdílech ve složení střevní mikroflóry. Interindividuální rozdíly mohou být značné. Po požití stravy bohaté na flavonoidy byly prokázány zvýšené hladiny fenolových kyselin v plazmě a v moči ⁵⁹. Metabolismus polyfenolů v lidském organismu stručně zobrazuje Obrázek č. 1 ⁶⁴.



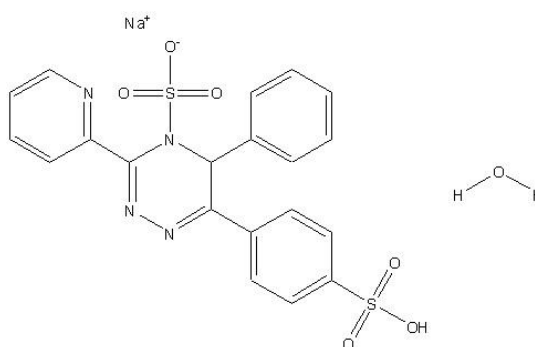
Obrázek č. 1: Schéma metabolismu polyfenolů v lidském organismu ⁶⁴

3.10.3. Možnost ovlivnění Fentonovy reakce

Pokud by flavonoidy nebo jejich metabolity byly schopné chelátovat železo, je zde určitý potenciál k potlačení oxidačního stresu ²⁴. Na druhou stranu, redukce iontů železa by mohla vést za určitých podmínek k potenciaci Fentonovy reakce. To samé by se dalo říci i o iontech mědi, které se také účastní Fentonovy reakce. Určité flavonoidy dokonce redukují měďnaté ionty snadněji než ionty železité ⁶⁵.

3.11. Indikátor ferrozin

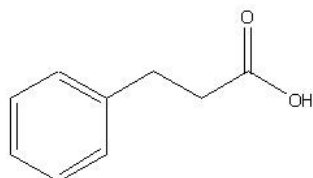
Ferrozin (Obrázek č. 2) je indikátor, který tvoří specificky barevný komplex s železnatými ionty. Železité ionty s tímto indikátorem nereagují. Lze využít poměrně rychlé tvorby barevných komplexů, které vytváří indikátor ferrozin se železnatými ionty po předchozí redukci testovanou látkou. Vzniklý komplex je možno následně měřit spektrofotometricky ⁶⁶.



Vzorec č. 6: Ferrozin

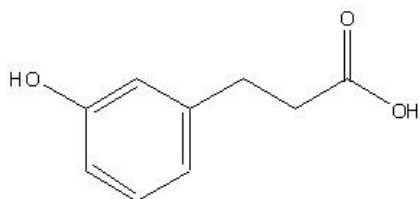
3.12. Strukturní vlastnosti testovaných fenypropionových kyselin

- 3-fenylpropionová kyselina (Mw= 150,17)



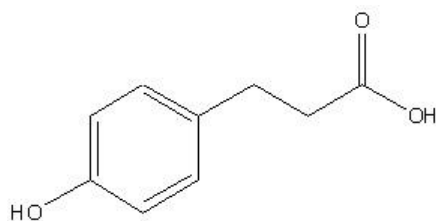
Vzorec č. 7: 3-fenylpropionová kyselina

- 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (Mw= 166,17)



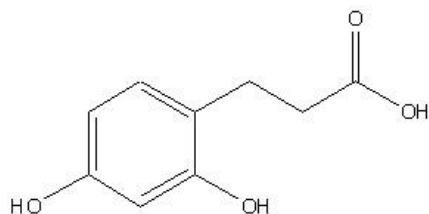
Vzorec č. 8: 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina

- 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina (Mw= 166,17)



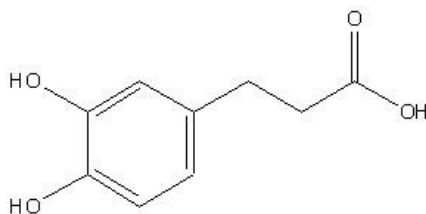
Vzorec č. 9: 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina

- 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Mw= 182,17)



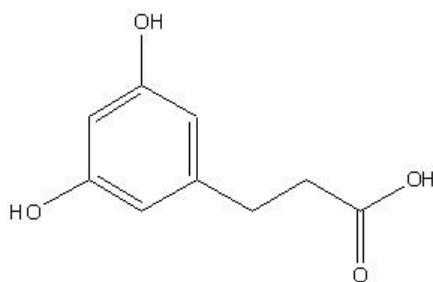
Vzorec č. 10: 3(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

- 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Mw= 182,17)



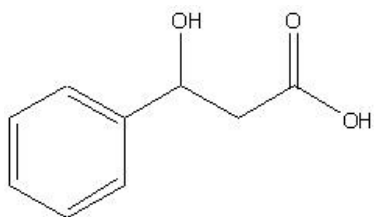
Vzorec č. 11: 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

- 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Mw= 182,17)



Vzorec č. 12: 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

- 3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina (Mw= 166,17)



Vzorec č. 13: 3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina

4. Experimentální část

4.1. Využívaný materiál

Automatické pipety o různém objemu (Brand)

Vícekanálové pipety o různém objemu (Biohit)

Mikrotitrační destičky (Brand)

4.2. Využívané přístroje

Váhy KERN ABT120- 5DM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany)

Třepačka IKA VORTEX GENIUS 3 (IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)

Třepačka IKA MS 3 digital (IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)

Spektrofotometr SYNERGY HT Multi- Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

4.3. Využívané chemikálie

Heptahydrát síranu železnatého (Penta)

Hexahydrát chloridu železitého (Penta)

Hydroxylamin hydrochlorid (Sigma- Aldrich)

Ferrozín (Fluka)

Dimethylsulfoxid (Lach-Ner)

15 mM acetátové pufrý o pH 4.5 a 5.5 (kyselina octová, octan sodný, ultračistá voda)

15 mM HEPES pufrý o pH 6.8 a 7.5 (HEPES, HEPES sůl, ultračistá voda)

4.4. Testované látky

3-fenylpropionová kyselina (Vzorec č.7)

3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (Vzorec č. 8)

3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina (Vzorec č. 9)

3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Vzorec č. 10)

3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Vzorec č. 11)

3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Vzorec č. 12)

3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina (Vzorec č. 13)

4.5. Použité vzorce v rigorózní práci

Všechny struktury molekul, které jsou součástí této rigorózní práce, byly vytvořeny v programu ChemDraw Professional 15.0.

4.6. Příprava reagenčních roztoků a vzorků testovaných látek

4.6.1. Příprava roztoku železnatých iontů o koncentraci 250 μM

Heptahydrát síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $M_w=278,02 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) jsme dle navážky rozpustili v potřebném množství ultračisté vody. Výsledná koncentrace roztoku činila 250 μM .

4.6.1.1. Kontrolní zkouška železnatých iontů

Po připravení 250 μM roztoku železnatých iontů jsme museli provést kontrolu jeho správného naředění.

- Do jamky na mikrotitrační destičce jsme pipetovali:
 - 100 μl dimethylsulfoxidu
 - 50 μl roztoku železnatých iontů o koncentraci 250 μM
 - 50 μl roztoku ferrozinu o koncentraci 5 mM
- Mikrotitrační destičku jsme vložili do spektrofotometru a měřili jsme absorbanci při vlnové délce 562 nm.
- Pokud se hodnota naměřené absorbance blížila jedné, kontrolní zkouška byla pozitivní a mohli jsme pokračovat v dalším měření.

4.6.2. Příprava zásobního roztoku železitých iontů o koncentraci 5 mM

Hexahydrát chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $M_w= 270,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) jsme dle navážky rozpustili v potřebném množství ultračisté vody. Výsledná koncentrace roztoku činila 5 mM. Tento roztok jsme používali pro přípravu čerstvého roztoku železitých iontů o koncentraci 250 μM .

4.6.3. Příprava čerstvého roztoku železitých iontů o koncentraci 250 μM

Ze zásobního roztoku železitých iontů jsme v čas potřeby pomocí ultračisté vody naředili čerstvý roztok železitých iontů o koncentraci 250 μM .

4.6.3.1. Kontrolní zkouška železitých iontů

Po přípravě 250 μM roztoku železitých iontů jsme museli provést kontrolu jeho správného naředění.

- Do jamky na mikrotitrační destičce jsme pipetovali:
 - 100 μl dimethylsulfoxidu
 - 50 μl roztoku železitých iontů o koncentraci 250 μM
 - 50 μl hydroxylaminu hydrochloridu o koncentraci 10 mM
 - 50 μl roztoku ferrozinu o koncentraci 5 mM
- Mikrotitrační destičku jsme vložili do spektrofotometru a měřili jsme absorbanci při vlnové délce 562 nm.
- Pokud se hodnota naměřené absorbance blížila jedné, kontrolní zkouška byla pozitivní a mohli jsme pokračovat v dalším měření.

4.6.4. Příprava indikačního roztoku ferrozinu o koncentraci 5 mM

Disodnou sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové kyseliny (ferrozin), $M_w = 492,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, jsme dle navážky rozpustili v potřebném množství ultračisté vody. Výsledná koncentrace roztoku činila 5 mM.

4.6.5. Příprava zásobního roztoku hydroxylaminu o koncentraci 100 mM

Hydroxylamin hydrochlorid ($M_w = 69,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) jsme dle navážky rozpustili v potřebném množství ultračisté vody. Výsledná koncentrace zásobního roztoku činila 100 mM. Z tohoto roztoku jsme dále ředěním získali pracovní roztok hydroxylaminu o koncentraci 10 mM.

4.6.6. Příprava vzorků testovaných látek

Vzorky testovaných látek jsme dle potřebné koncentrace rozpouštěli v dimethylsulfoxidu.

4.7. Metodika ^{21, 67}

4.7.1. Sestrojení kalibrační křivky železnatých iontů

Pro sestavení kalibrační křivky jsme si nejdříve museli připravit reagenční roztoky. Následně jsme přidávali jednotlivé látky do přesně určených jamek mikrotitrační destičky. Poté jsme mikrotitrační destičku vložili do spektrofotometru, kde jsme měřili absorbanci při vlnové délce 562 nm. Na závěr jsme vynesli kalibrační křivku a určili závislost koncentrace železnatých iontů vůči naměřeným hodnotám absorbance. Schématické zobrazení jamek mikrotitrační destičky pro toto stanovení ukazuje Obrázek č. 2.

- Připravili jsme si základní reagenční roztoky. Pro stanovení kalibrační křivky jsme využili 5 mM roztok ferrozinu v ultračisté vodě a 5 mM roztok heptahydrátu síranu železnatého v ultračisté vodě.
- Postupným ředěním jsme si dále připravili vodné roztoky železnatých iontů o koncentracích 75, 150, 250, 500 a 750 μM .
- Do všech, při tomto stanovení používaných, jamek mikrotitrační destičky jsme nejdříve napipetovali 150 μl ultračisté vody.
- Do jednotlivých testovacích jamek jsme následně pipetovali 50 μl roztoku železnatých iontů o příslušné koncentraci. Do kontrolních jamek jsme místo roztoku železnatých iontů pipetovali 50 μl ultračisté vody.
- 50 μl vodného roztoku ferrozinu jsme přidali do horní poloviny jamek mikrotitrační destičky (jamky s ferrozinem). Do dolní poloviny jamek jsme pak pipetovali stejné množství (50 μl) ultračisté vody. Tyto jamky sloužily jako slepé vzorky.
- Spektrofotometricky jsme měřili absorbanci při vlnové délce 562 nm.
- Sestrojili jsme kalibrační křivku železnatých iontů.

	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 0 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 75 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 150 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 250 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 500 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 500 μM
Jamky s ferrozinem						
Slepé vzorky						

	Kontrolní jamky (bez železnatých iontů)
	Testovací jamky (přidány železnaté ionty o příslušné koncentraci)
	Jamky s vodným roztokem ferrozinu
	Slepé vzorky (místo ferrozinu přidána ultračistá voda)

Výsledný obsah jednotlivé jamky:

150 μl ultračisté vody
 50 μl roztoku Fe^{2+} nebo ultračisté vody
 50 μl roztoku ferrozinu nebo ultračisté vody

Obrázek č. 2: Schématické zobrazení jamek na mikrotitrační destičce pro sestavení kalibrační křivky železnatých iontů

4.7.2. Metodika pro stanovení schopnosti redukce železitých iontů

Dle tohoto metodického postupu jsme v určeném pořadí přidávali jednotlivé látky. V kontrolních jamkách jsme využili hydroxylamin hydrochlorid (kompletní redukce železitých iontů na ionty železnaté) jako pozitivní kontrolu. 5 mM roztok ferrozinu jsme využili jako indikátor, který byl schopen tvorby barevného komplexu s redukovanými železnatými ionty. V dolních dvou řadách byla místo indikátoru pipetována ultračistá voda, jakožto slepý vzorek. Schématické zobrazení jamek mikrotitrační destičky pro toto stanovení ukazuje Obrázek č. 3.

- Do testovacích jamek jsme pipetovali 150 μ l zvoleného pufru. Do jamek kontrolních jsme pak pipetovali pufr o pH 4,5.
- Následně jsme do příslušných testovacích jamek mikrotitrační destičky přidali 50 μ l roztoku testované látky nebo 50 μ l rozpouštědla. Do kontrolních jamek jsme místo testované látky pipetovali stejné množství (50 μ l) roztoku hydroxylaminu.
- V čas potřeby jsme si naředili zásobní roztok železitých iontů na požadovanou koncentraci 250 μ M.
- 50 μ l tohoto čerstvého roztoku železitých iontů jsme pipetovali do všech jamek mikrotitrační destičky.
- Mikrotitrační destičku jsme nechali třepat po dobu dvou minut.
- Na závěr jsme přidali 50 μ l roztoku ferrozinu do horní poloviny jamek destičky (jamky s ferrozinem). Do dolní poloviny jamek (slepé vzorky) jsme pipetovali 50 μ l ultračisté vody.
- Absorbanci jsme měřili spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Následně jsme v čase 4 minuty 30 vteřin od přidání indikátoru znovu proměřili absorbanci při stejné vlnové délce.

	Roztok testované látky C₁= 10 mM	Roztok testované látky C₂= 1 mM	Roztok testované látky C₃= 0,1 mM	Rozpouštědlo DMSO	Kontrolní jamky HA
Jamky s ferrozinem	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

	Kontrolní jamky
	Testovací jamky
X	Jamky s vodným roztokem ferrozinu
X	Slepé vzorky (místo ferrozinu přidána ultračistá voda)

Výsledný obsah jednotlivé jamky:

150 μ l příslušného pufru
50 μ l roztoku testované látky/ DMSO/ HA
50 μ l 0,250 mM roztoku Fe³⁺
50 μ l roztoku ferrozinu nebo ultračisté vody

Obrázek č. 3: Schématické zobrazení jamek na mikrotitrační destičce pro měření redukce železitých iontů

4.7.3. Metodika pro stanovení schopnosti chelatace železnatých iontů

Dle tohoto metodického postupu jsme v určeném pořadí přidávali jednotlivé látky. Pro tvorbu barevného komplexu s železnatými ionty jsme jako indikátor opět využili 5 mM roztok ferrozinu (úlohu slepého vzorku plnili dolní dvě řady mikrotitrační destičky, kde jsme místo indikátoru pipetovali stejný objem ultračisté vody). Schématické zobrazení jamek mikrotitrační destičky pro toto stanovení ukazuje Obrázek č. 4.

- Do všech jamek mikrotitrační destičky jsme pipetovali 150 μ l zvoleného pufru.
- Následně jsme do příslušných testovacích jamek mikrotitrační destičky přidali 50 μ l roztoku testované látky nebo 50 μ l rozpouštědla do jamek kontrolních. Při měření

v prostředí o pH 7,5 jsme ještě přidali 50 μl hydroxylaminu o koncentraci 10 mM do všech jamek mikrotitrační destičky.

- Dále jsme pipetovali do všech jamek 50 μl vodného roztoku železnatých iontů o koncentraci 250 μM .
- Mikrotitrační destičku jsme nechali třepat po dobu dvou minut.
- Na závěr jsme přidali 50 μl roztoku ferrozinu do horní poloviny jamek destičky (jamky s ferrozinem). Do dolní poloviny jamek (slepé vzorky) jsme pipetovali 50 μl ultračisté vody.
- Absorbanci jsme měřili spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Následně jsme v čase 4 minuty 30 vteřin od přidání indikátoru znovu proměřili absorbanci při stejné vlnové délce.

	Roztok testované látky $C_1= 10 \text{ mM}$	Roztok testované látky $C_2= 1 \text{ mM}$	Roztok testované látky $C_3= 0,1 \text{ mM}$	Rozpouštědlo DMSO
Jamky s ferrozinem	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X

	Kontrolní jamky
	Testovací jamky
X	Jamky s vodným roztokem ferrozinu
X	Slepé vzorky (místo ferrozinu přidána ultračistá voda)

Výsledný obsah jednotlivé jamky:

150 μl příslušného pufru
 50 μl roztoku testované látky/ DMSO
 50 μl roztoku 10 mM HA v prostředí o pH 7,5
 50 μl 0,250 mM roztoku Fe^{2+}
 50 μl roztoku ferrozinu nebo ultračisté vody

Obrázek č. 4: Schématické zobrazení jamek na mikrotitrační destičce pro měření chelatace železnatých iontů

4.7.4. Metodika pro stanovení schopnosti chelatace železitých iontů

Dle tohoto metodického postupu jsme v určeném pořadí přidávali jednotlivé látky. Hydroxylamin hydrochlorid sloužil k redukci železitých iontů železa na ionty železnaté. Pro tvorbu barevného komplexu s železnatými ionty jsme jako indikátor opět využili 5 mM roztok ferrozinu (úlohu slepého vzorku plnili dolní dvě řady mikrotitrační destičky, kde jsme místo indikátoru pipetovali stejný objem ultračisté vody). Schématické zobrazení jamek mikrotitrační destičky pro toto stanovení ukazuje Obrázek č. 5.

- Do všech jamek mikrotitrační destičky jsme pipetovali 150 μ l pufru o pH 4,5.
- Následně jsme do příslušných testovacích jamek mikrotitrační destičky přidali 50 μ l roztoku testované látky nebo 50 μ l rozpouštědla do jamek kontrolních.
- V čas potřeby jsme si naředili zásobní roztok železitých iontů na požadovanou koncentraci 250 μ M.
- 50 μ l tohoto čerstvého roztoku železitých iontů jsme pipetovali do všech jamek mikrotitrační destičky.
- Mikrotitrační destičku jsme nechali třepat po dobu dvou minut.
- Pipetovali jsme 50 μ l hydroxylamin hydrochloridu o koncentraci 10 mM.
- Mikrotitrační destičku jsme opět nechali třepat, nyní však již jen jednu minutu.
- Na závěr jsme přidali 50 μ l roztoku ferrozinu do horní poloviny jamek destičky (jamky s ferrozinem). Do dolní poloviny jamek (slepé vzorky) jsme pipetovali 50 μ l ultračisté vody.
- Absorbanci jsme měřili spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Následně jsme v čase 4 minuty 30 vteřin od přidání indikátoru znovu proměřili absorbanci při stejné vlnové délce.

	Roztok testované látky C₁= 10 mM	Roztok testované látky C₂= 1 mM	Roztok testované látky C₃= 0,1 mM	Rozpouštědlo DMSO
Jamky s ferrozinem	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X

	Kontrolní jamky
	Testovací jamky
X	Jamky s vodným roztokem ferrozinu
X	Slepé vzorky (místo ferrozinu přidána ultračistá voda)

Výsledný obsah jednotlivé jamky:

150 µl pufru o pH 4,5
50 µl roztoku testované látky/ DMSO
50 µl 0,250 mM roztoku Fe²⁺
50 µl roztoku 10 mM HA
50 µl roztoku ferrozinu nebo ultračisté vody

Obrázek č. 5: Schématické zobrazení jamek na mikrotitrační destičce pro měření chelatace železitých iontů

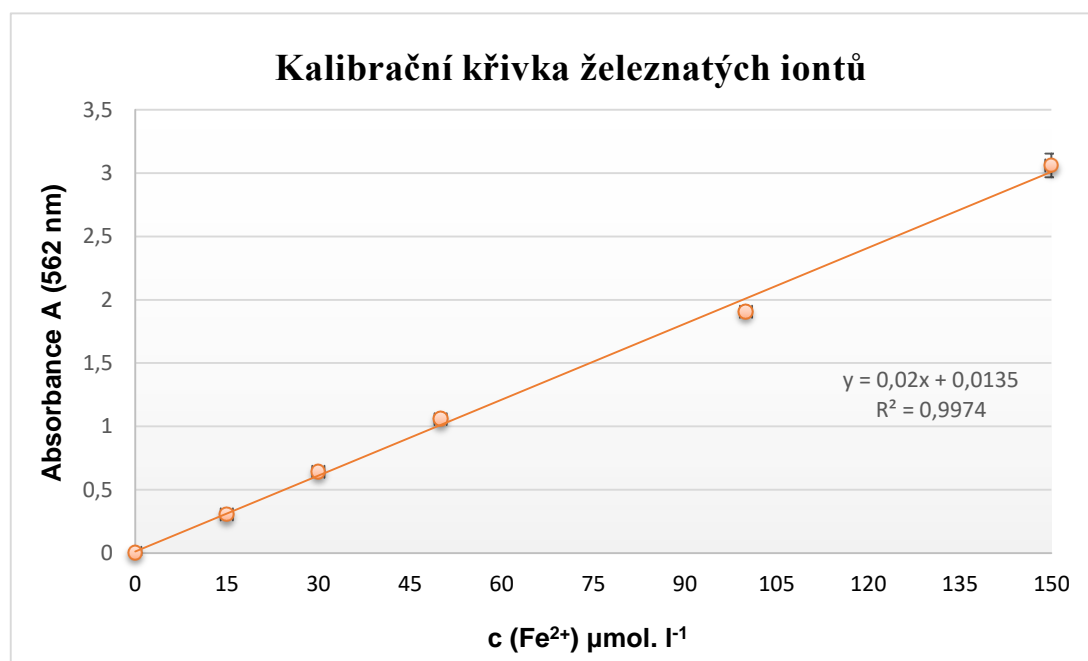
5. Výsledky

5.1. Sestrojení kalibrační křivky železnatých iontů

Dle metodického postupu pro stanovení kalibrační křivky pro železnaté ionty jsme naměřili příslušné hodnoty absorbance. Využili jsme vodné roztoky železnatých iontů o koncentraci 75 μM , 150 μM , 250 μM , 500 μM a 750 μM (Tabulka č. 4). Naměřené hodnoty absorbance jsme převedli pomocí programu Microsoft Excel do grafu kalibrační křivky (Obrázek č. 6). Čím byla v roztoku vyšší koncentrace železnatých iontů, tím byla vyšší i hodnota absorbance. Jednalo se o lineární závislost.

Původní koncentrace železnatých iontů (μM)	0	75	150	250	500	750
Konečná koncentrace železnatých iontů (μM)	0	15	30	50	100	150
Průměrná hodnota absorbance (A)	0,00	0,31	0,64	1,06	1,90	3,06

Tabulka č. 5: Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky železnatých iontů



Obrázek č. 6: Kalibrační křivka železnatých iontů

5.2. Interakce fenylpropionových kyselin se železem

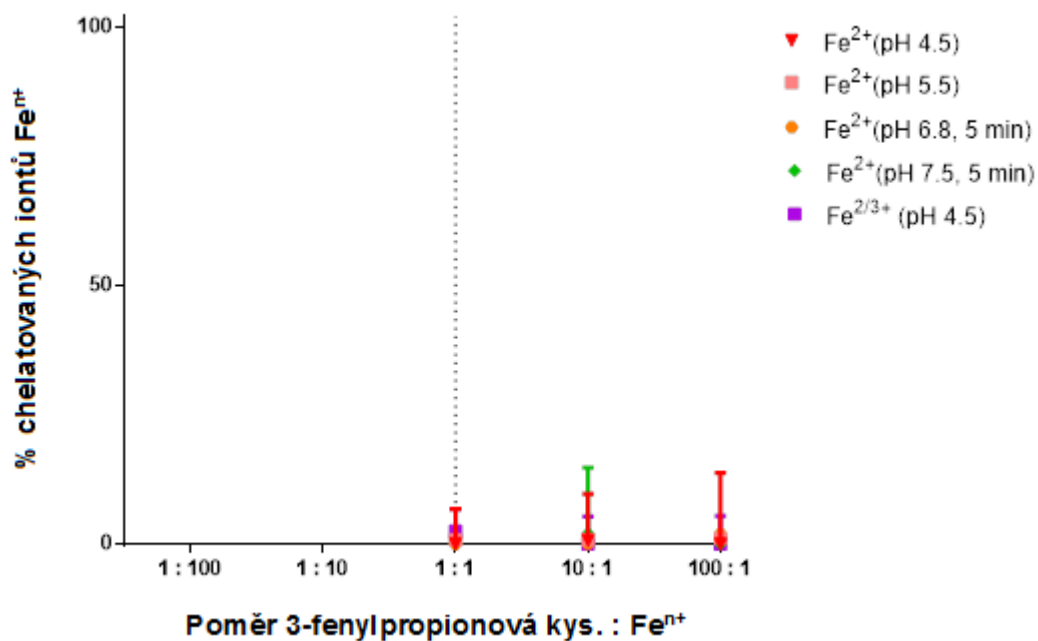
V rámci této rigorózní práce jsme testovali schopnost sedmi fenylpropionových kyselin chelatovat a redukovat ionty železa v prostředí o různém pH. Pro měření jsme využili metodiky, založené na indikátoru ferrozinu, který chelatuje železnaté ionty a tvoří s nimi barevný komplex. Tento komplex jsme následně měřili spektrofotometricky, výslednou hodnotu absorbance jsme pak převedli do grafů a získali tím informaci o schopnosti testované fenylpropionové kyseliny chelatovat nebo redukovat ionty železa.

U chelatačního měření jsme jako kontrolu využili rozpouštědlo DMSO, které nemá žádné železo-chelatační účinky. V grafu je vždy na ose X poměr koncentrací testované fenylpropionové kyseliny a roztoku použitých iontů železa. Osa Y zobrazuje procentuálně vyjádřenou schopnost chelatovat přítomné ionty železa. Schopnost chelatace iontů železa jsme testovali u všech látek. Výsledky jsou zobrazeny v následujících obrázcích: 3-fenylpropionová kyselina (Obr. 7), 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 9), 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 11), 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 13), 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 15), 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 17) a 3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina (Obr. 19).

U redukčního měření byla kontrola založena na silném redukčním činidlu hydroxylamin hydrochloridu, které bylo schopno redukovat 100% železitých iontů na ionty železnaté. V grafu je vždy na ose X poměr koncentrací testované fenylpropionové kyseliny a roztoku železitých iontů. Osa Y zobrazuje procentuálně vyjádřenou schopnost redukovat přítomné ionty železa. Schopnost redukce železitých iontů na ionty železnaté jsme testovali u všech látek. Výsledky jsou zobrazeny v následujících obrázcích: 3-fenylpropionová kyselina (Obr. 8), 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 10), 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 12), 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 14), 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 16), 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 18) a 3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina (Obr. 20).

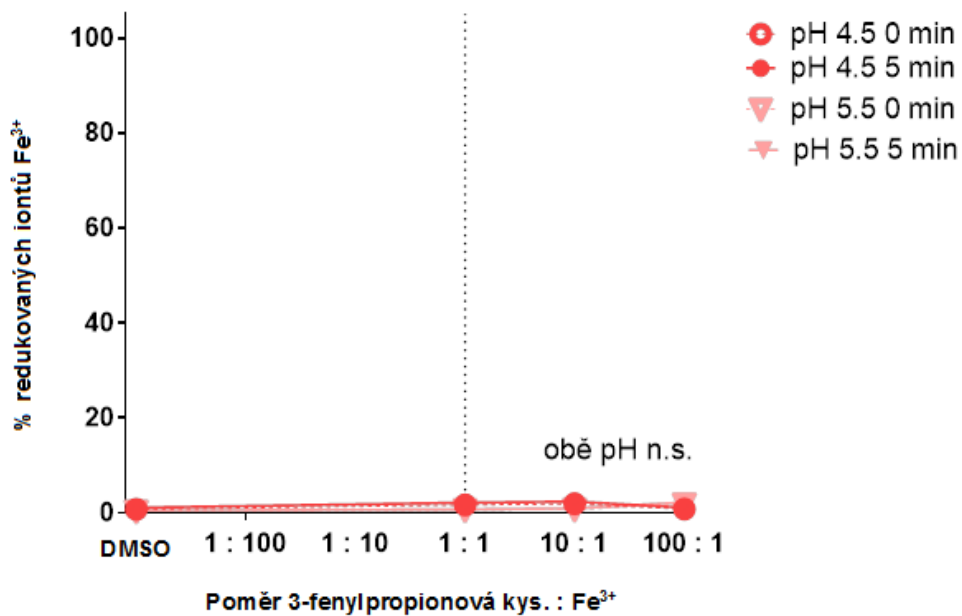
5.2.1. 3-fenylpropionová kyselina

5.2.1.1. Schopnost chelatace iontů železa



Obrázek č. 7: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-fenylpropionové chelatovat ionty železa v prostředí o různém pH a čase 5 minut od přidání indikátoru

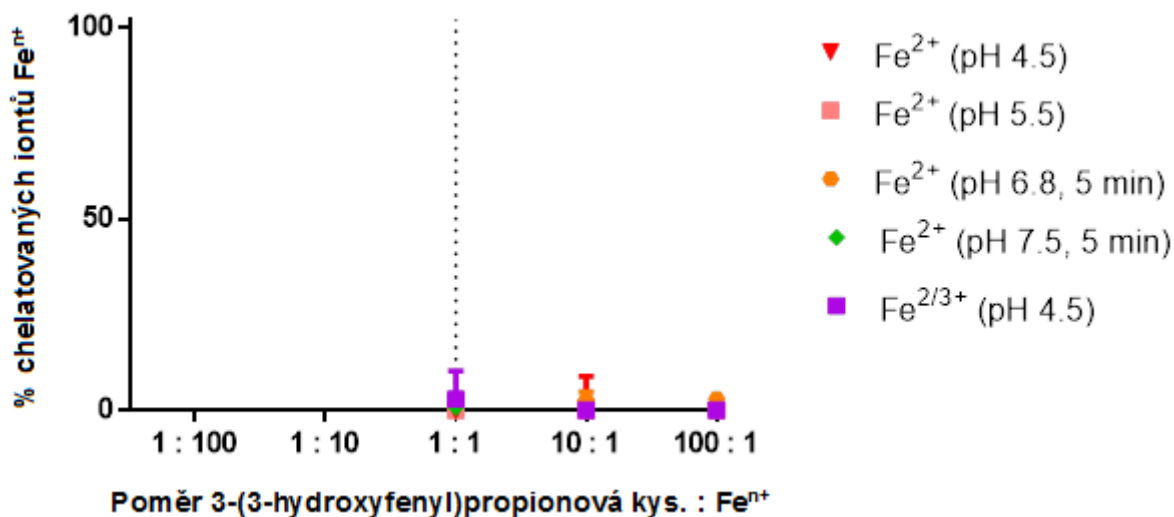
5.2.1.2. Schopnost redukce iontů železa



Obrázek č. 8: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-fenylpropionové redukovat železité ionty v prostředí o různém pH

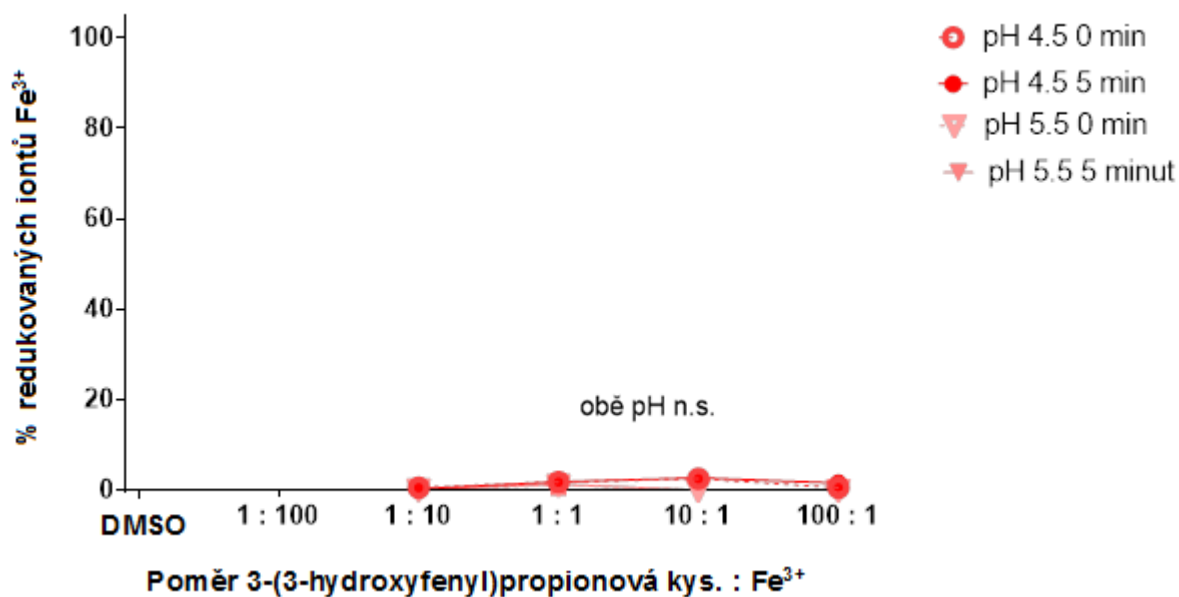
5.2.2. 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina

5.2.2.1. Schopnost chelatace iontů železa



Obrázek č. 9: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové chelatovat ionty železa v prostředí o různém pH a čase 5 minut od přidání indikátoru

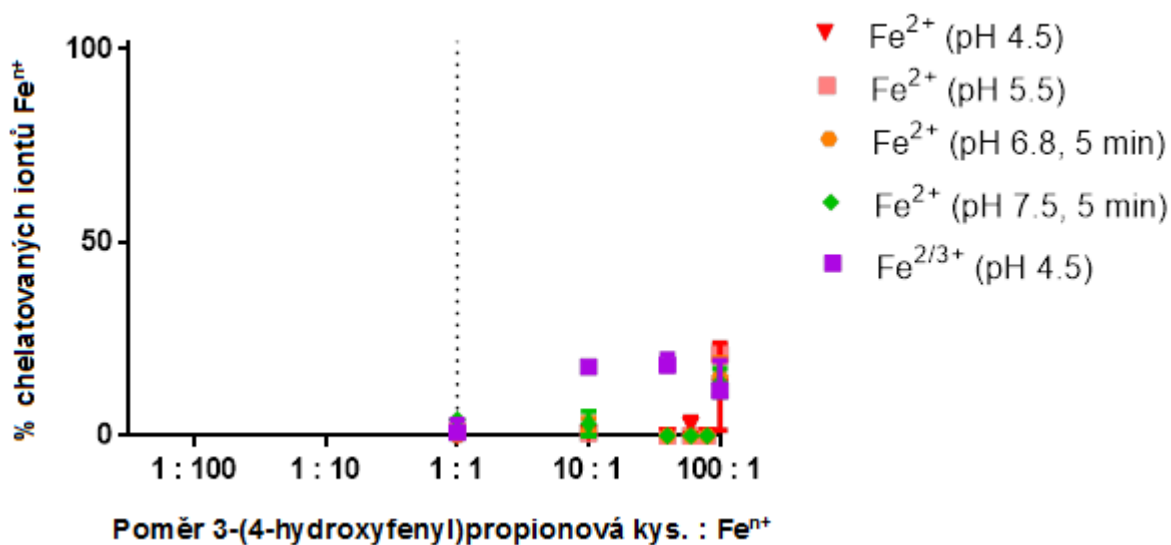
5.2.2.2. Schopnost redukce iontů železa



Obrázek č. 10: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové redukovat železité ionty v prostředí o různém pH

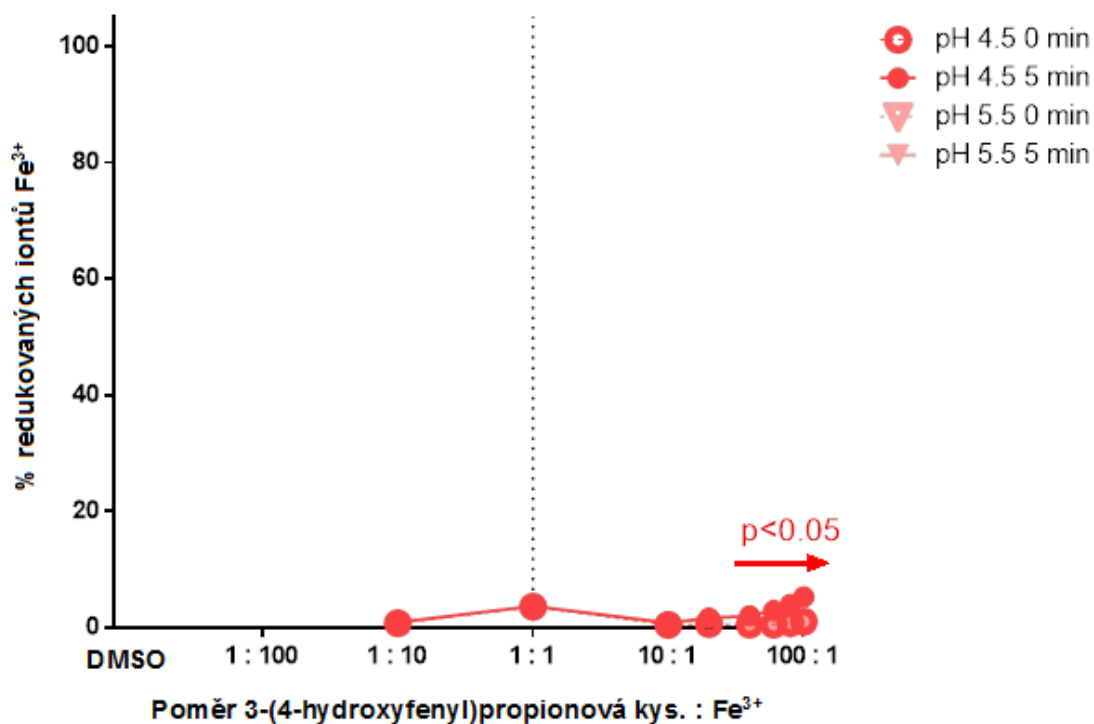
5.2.3. 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina

5.2.3.1. Schopnost chelatace iontů železa



Obrázek č. 11: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(4-hydroxyfenyl)propionové chelatovat ionty železa v prostředí o různém pH a čase 5 minut od přidání indikátoru

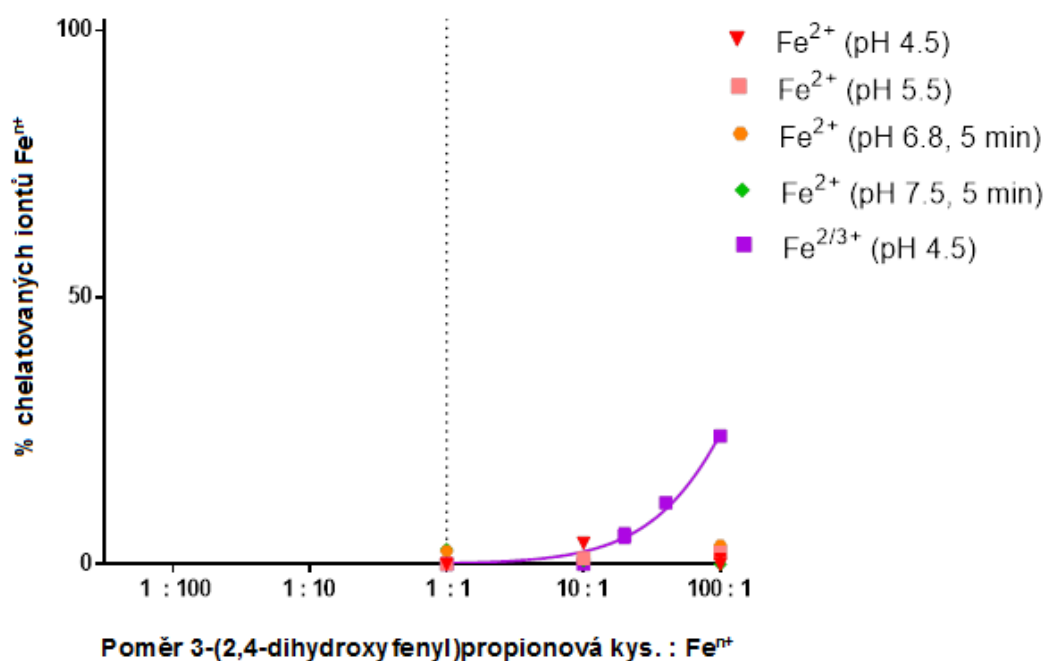
5.2.3.2. Schopnost redukce iontů železa



Obrázek č. 12: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(4-hydroxyfenyl)propionové redukovat železitě ionty v prostředí o různém pH

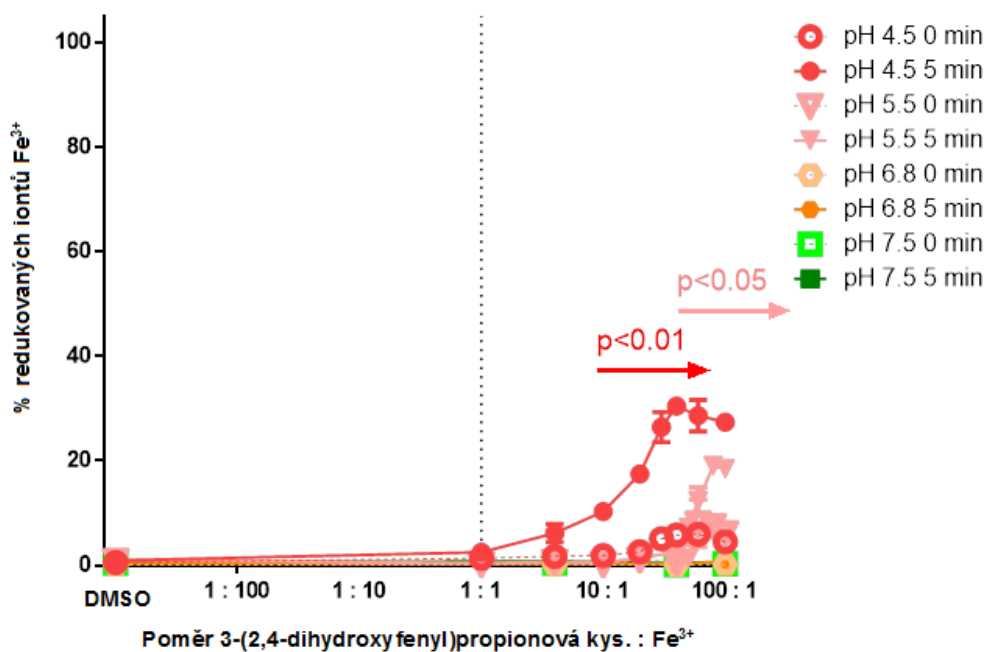
5.2.4. 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

5.2.4.1. Schopnost chelatace iontů železa



Obrázek č. 13: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové chelatovat ionty železa v prostředí o různém pH a čase 5 minut od přidání indikátoru

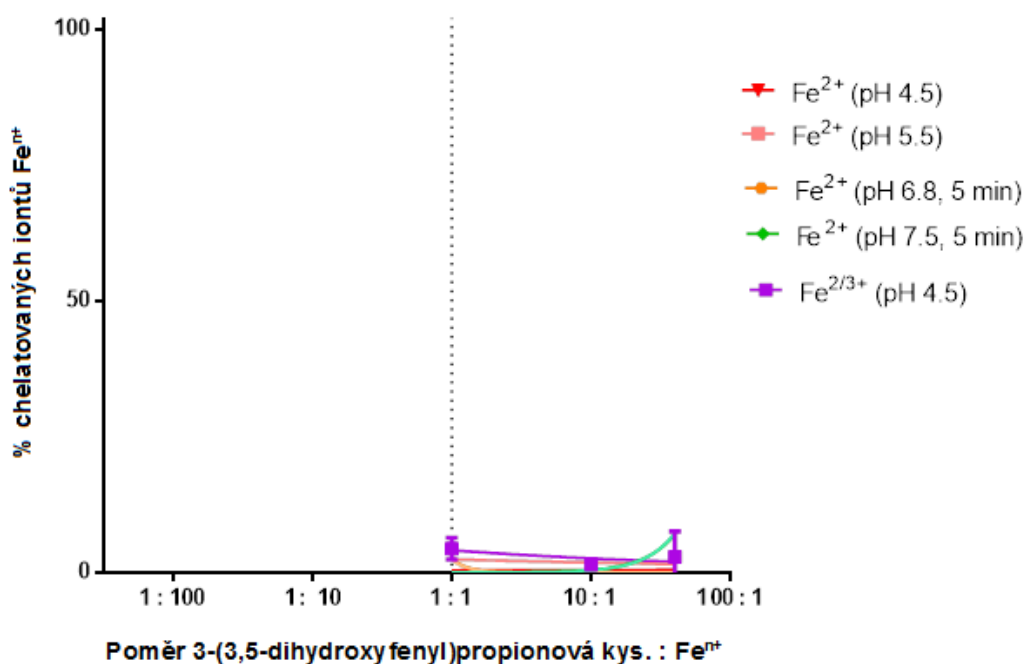
5.2.4.2. Schopnost redukce iontů železa



Obrázek č. 14: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové redukovat železité ionty v prostředí o různém pH

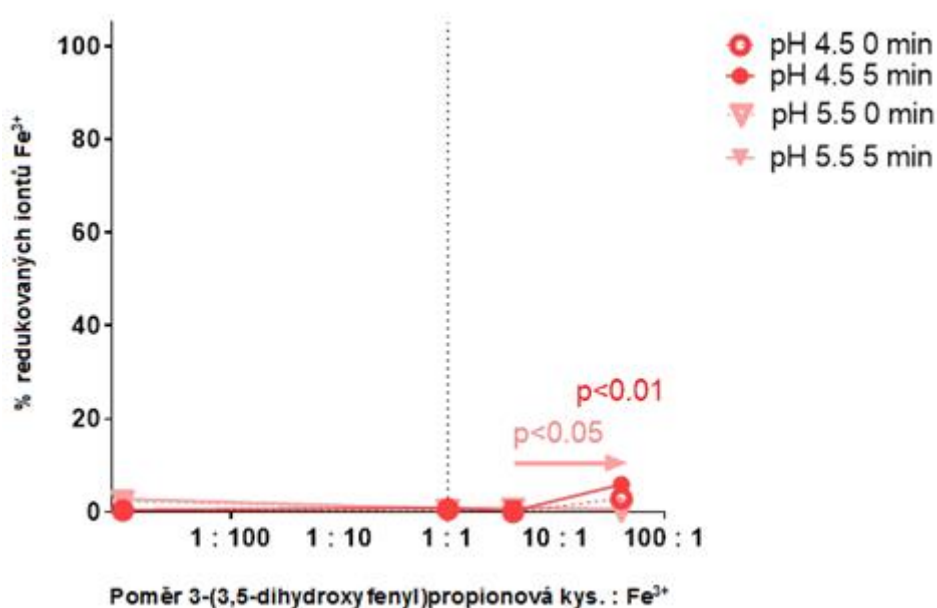
5.2.5. 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

5.2.5.1. Schopnost chelatace iontů železa



Obrázek č. 15: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové cheltovat ionty železa v prostředí o různém pH a čase 5 minut od přidání indikátoru

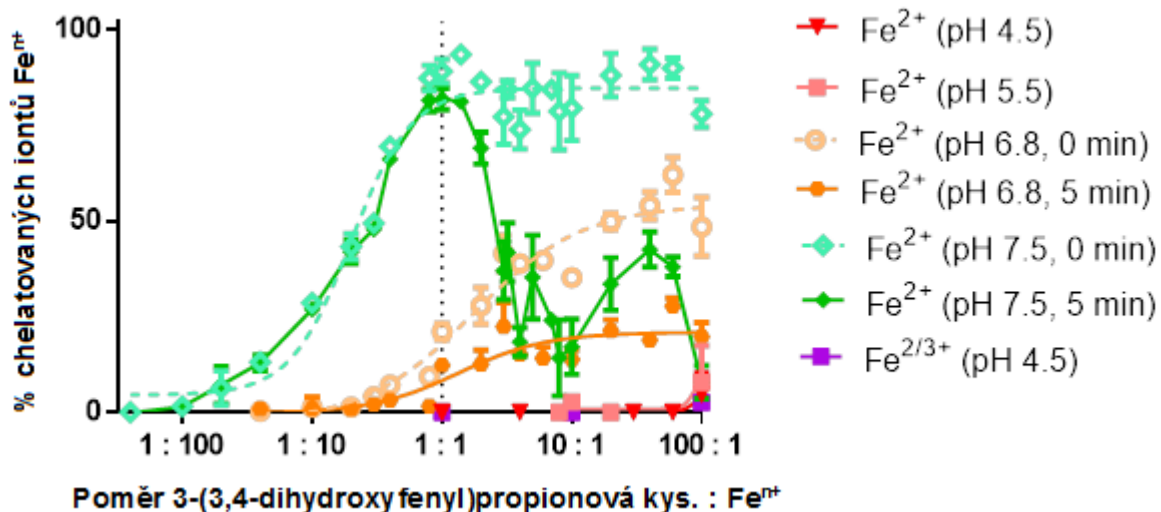
5.2.5.2. Schopnost redukce iontů železa



Obrázek č. 16: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové redukovat železitě ionty v prostředí o různém pH

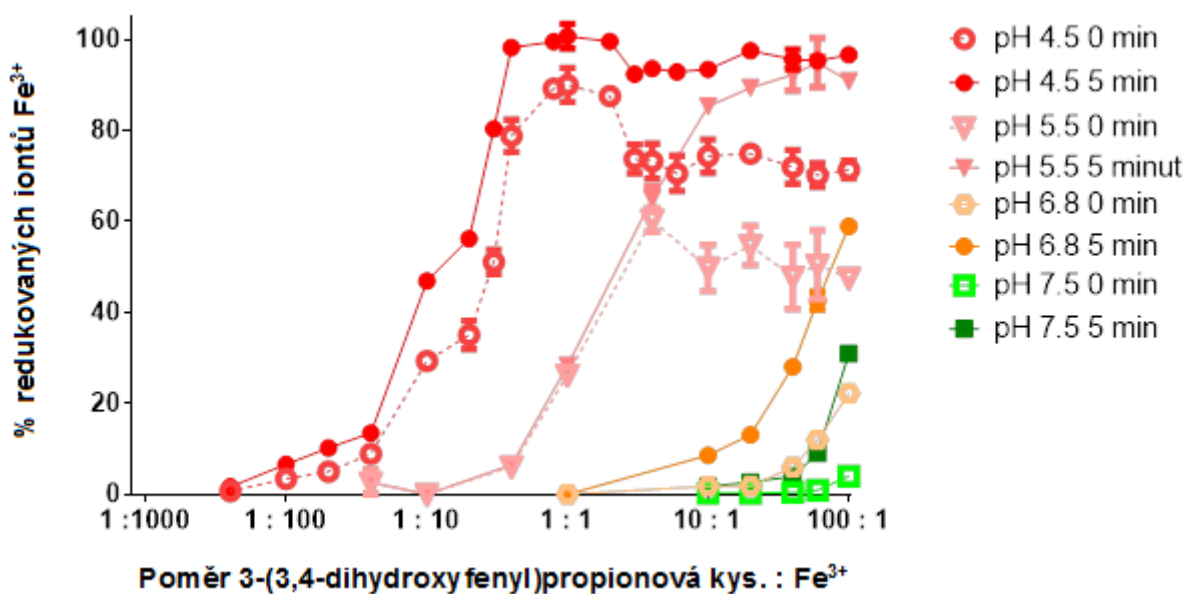
5.2.6. 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

5.2.6.1. Schopnost chelatace iontů železa



Obrázek č. 17: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové chelatovat ionty železa v prostředí o různém pH

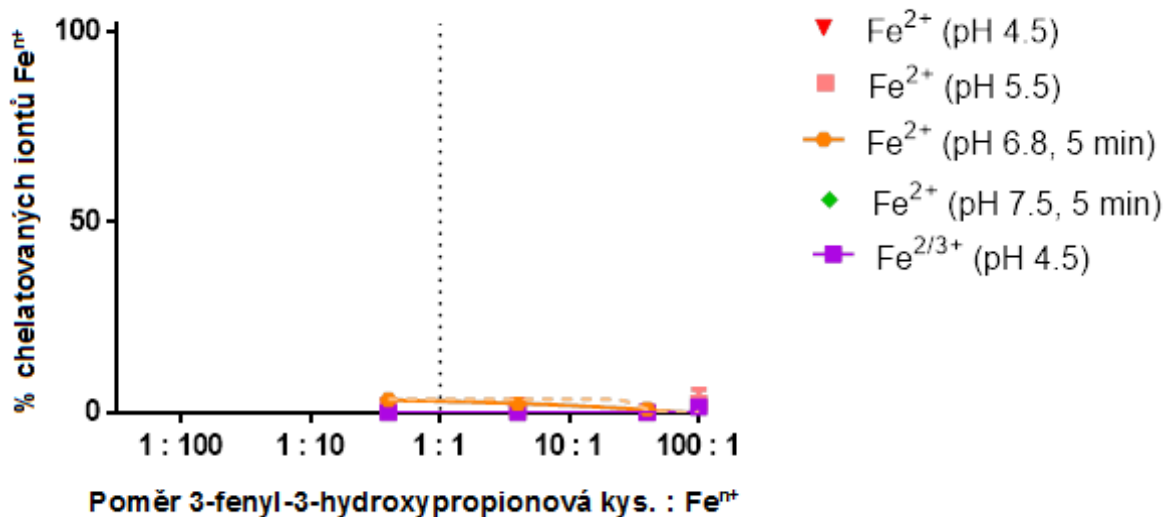
5.2.6.2. Schopnost redukce iontů železa



Obrázek č. 18: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové redukovat železité ionty v prostředí o různém pH

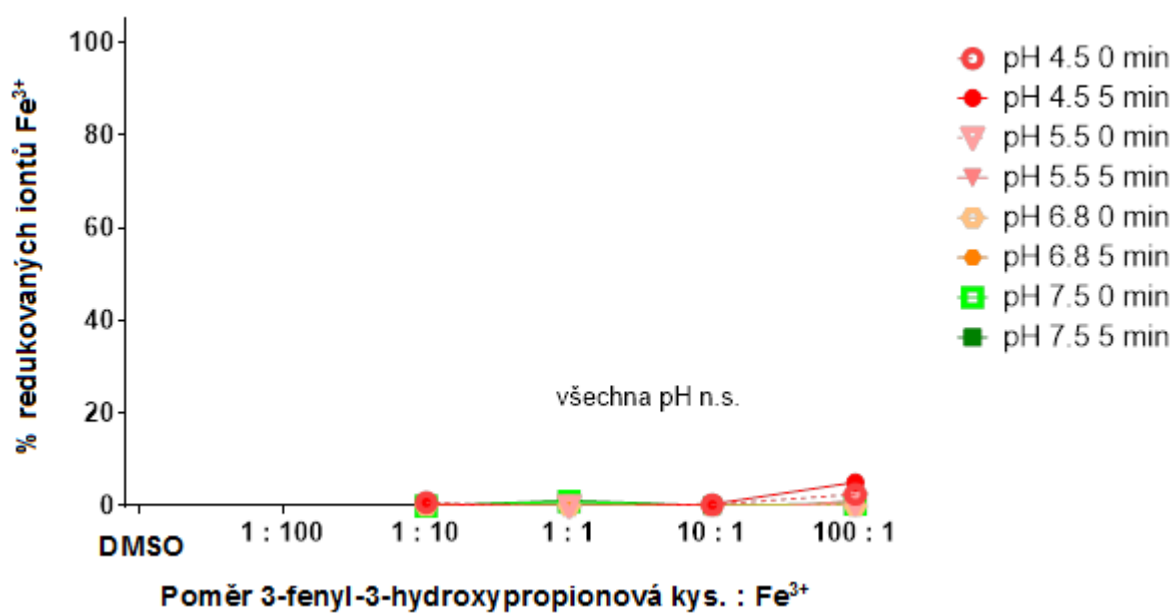
5.2.7. 3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina

5.2.7.1. Schopnost chelatace iontů železa



Obrázek č. 19 : Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-fenyl-3-hydroxypropionové chelatovat ionty železa v prostředí o různém pH a čase 5 minut od přidání indikátoru

5.2.7.2. Schopnost redukce iontů železa



Obrázek č. 20: Grafické znázornění schopnosti kyseliny 3-fenyl-3-hydroxypropionové redukovat železité ionty v prostředí o různém pH

6. Diskuze a závěr

Železo patří mezi velmi důležité prvky lidského organismu. Ionty železa se podílí na významných procesech jako jsou transport kyslíku, syntéza DNA a další³.

Za určitých podmínek je však železo schopno usnadnit tvorbu volných radikálů, které představují nebezpečí pro buňky lidského těla. Velmi reaktivní hydroxylový radikál je na příklad produkován Fentonovou reakcí, která je katalyzována volnými ionty železa²⁷.

Nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidační kapacitou organismu potom může vyústit v oxidační stres. Oxidační stres může být zodpovědný za vícero patologických stavů²⁷.

Obecně, fenolové sloučeniny představují jednu z nejpočetnějších skupin obsahových látek v rostlinné říši. Byly identifikovány tisíce různých struktur³⁹. Polyfenoly tak můžeme klasifikovat na základě jejich zdroje, biologické funkce nebo dle chemické struktury²³. Strukturně se mohou fenolové sloučeniny vyskytovat ať už jako nízkomolekulární fenolové kyseliny či látky s vyšší molekulovou hmotností, tvořící polymery³⁹. Významnou skupinou polyfenolů jsou také flavonoidy.

Pokud by flavonoidy nebo jejich metabolity (často fenolové kyseliny) byly schopné chelatovat železo, je zde určitý potenciál k potlačení oxidačního stresu²⁴.

Na druhou stranu, redukce iontů železa by mohla za určitých podmínek vést k potenciaci Fentonovy reakce. To samé by se dalo říci i o iontech mědi, které se také účastní Fentonovy reakce⁶⁵.

Hlavním cílem této rigorózní práce bylo kvantifikovat schopnost chelatace a redukce iontů železa vybranými fenylpropionovými kyselinami v prostředí o různém pH. Všechny látky měly společný strukturní základ (fenylpropionovou kyselinu), lišily se pak v rozdílné substituci hydroxylovými skupinami. Testovali jsme sedm fenolových kyselin, konkrétně to byla 3-fenylpropionová, 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, 3-(4-hydroxyfenyl)propionová, 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová, 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová, 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová a 3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina. Tyto látky často vznikají ze složitějších molekul (např. flavonoidů) v průběhu trávení.

Pro měření jsme využili metodiky, založené na indikátoru ferrozinu, který chelatuje železnaté ionty a tvoří s nimi barevný komplex. Tento komplex jsme následně měřili spektrofotometricky, výslednou hodnotu absorbance jsme pak převedli do grafů a získali tím informaci o schopnosti testované fenylpropionové kyseliny chelatovat nebo redukovat ionty železa.

První testovanou látkou byla 3-fenylpropionová kyselina, která neobsahovala ve své struktuře žádnou hydroxylovou skupinu. Tato fenolová kyselina v podstatě nebyla schopna chelatovat ionty železa. Železo-chelatační schopnost kyseliny 3-fenylpropionové je zobrazena na Obrázku č. 7.

Ani z hlediska redukce železitých iontů na ionty železnaté nevykázala tato testovaná látka statisticky významné hodnoty oproti rozpouštědлу dimethylsulfoxidu (Obrázek č. 8).

Jako další jsme testovali kyselinu 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou. Tato fenolová kyselina stejně jako kyselina 3-fenylpropionová nebyla schopna chelatace iontů železa (Obrázek č. 9).

Redukční schopnost měla tato kyselina také velmi omezenou. O schopnosti této látky redukovat železité ionty na ionty železnaté se prakticky nedá hovořit. Redukční měření kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové ukazuje graf na Obrázku č. 10.

Další testovanou kyselinou s jednou hydroxylovou skupinou byla kyselina 3-(4-hydroxyfenyl)propionová. Bez ohledu na hodnotu pH okolního prostředí, tato fenylpropionová kyselina v nižších koncentracích prakticky nechelatovala ionty železa. Od koncentrace testované látky 0,25 mM (koncentrační poměr 1:1) začala vykazovat mírné chelatační účinky. V prostředí o pH 4,5 a koncentračním poměru 40:1 vůči iontům železa chelatovala tato kyselina přibližně 18 % přítomných železitých a železnatých iontů. Se zvyšující se koncentrací testované látky nedocházelo již ke zvýšení chelatačních účinků. Schopnost chelatace naopak poklesla (koncentrační poměr 100:1 11 % chelatace přítomných iontů železa v prostředí o pH 4,5). Výraznější chelatace pouze železnatých iontů byla zaznamenána až při relativně vysokém koncentračním poměru 100:1. V prostředí o pH 4,5 bylo chelatováno cca 12 % přítomných železnatých iontů, při pH 5,5 21 %, v prostředí o pH 6,8 15 % a při nejvyšším pH (7,5) chelatovala tato kyselina cca 13 % železnatých iontů. Chelatační graf iontů železa je na Obrázku č. 11.

3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina redukovala železité ionty jen málo a až při vyšších koncentracích (viz. Obrázek č. 12).

Další testovaná látka obsahovala ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny. Jednalo se o kyselinu 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionovou. Tato kyselina chelatovala jen železité ionty a to až při koncentračním poměru 100:1 (v této koncentraci byla schopna chelatovat cca 24 % přítomných iontů železa) v prostředí o pH 4,5. S nižší koncentrací této kyseliny klesala i její chelatační schopnost (koncentrační poměr 10:1 = chelatace železa cca 11 %, při koncentračním poměru 1:1 již látka prakticky nevykazovala chelatační účinky). Na rozdíl od chelatace železitých iontů, při žádném pH nebyla pozorována chelatace železnatých iontů. Železo-chelatační účinky kyseliny 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové ukazuje Obrázek č. 13.

Nejvyšších redukčních účinků dosáhla kyselina 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová v prostředí o pH 4,5. Při koncentracích nižších než 0,25 mM (tj. koncentrační poměr 1:1 testovaná látka : ionty železa) tato látka železité ionty prakticky neredukovala. Se zvyšujícím se koncentračním poměrem se pak zvyšovala schopnost redukce až do koncentrace testované látky 15 mM (koncentrační poměr 60:1), kdy bylo dosaženo oblasti redukčního maxima (cca 30 %). S nadále se zvyšující koncentrací testované látky začala schopnost redukce železitých iontů lehce klesat (koncentrační poměr 60:1, 28 %). V prostředí o vyšším pH dosahovala tato testovaná látka nižší redukční aktivity. Nejvyšší schopnost redukce v prostředí o pH 5,5 bylo dosaženo až při koncentraci testované látky 20 mM (koncentrační poměr 80:1), přičemž bylo zredukováno 18 % přítomných železitých iontů. V prostředí o pH 6,8 a 7,5 pak často nebyla redukční schopnost statisticky významnější než rozpouštědlo dimethylsulfoxid. Obrázek č. 14 zobrazuje schopnost redukce železitých iontů kyselinou 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionovou.

Další testovanou kyselinou se dvěma hydroxylovými skupinami na aromatickém jádře byla kyselina 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová. Se zvyšující se koncentrací testované látky se mírně zvyšovala i chelatační schopnost iontů železa. Oproti ostatním testovaným kyselinám s dihydroxylovými skupinami však byla chelatační aktivita velmi nízká. Obrázek č. 14 zobrazuje chelatační schopnost kyseliny 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové.

Železo-redukční schopnost kyseliny 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové byla v jistých koncentracích významnější než u rozpouštědla dimethylsulfoxidu. Nejvyšší redukční aktivity bylo dosaženo v nejkyselějším prostředí o hodnotě pH 4,5. Testovaná látka byla schopna při koncentračním poměru 40:1 redukovat zhruba 5 % přítomných železitých iontů. V prostředí o vyšším pH pak byla železo-redukční schopnost ještě nižší. Graf s redukčními účinky na železité ionty je na Obrázku č. 15.

Kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová byla jedinou testovanou látkou se dvěma hydroxylovými skupinami s katecholovým uspořádáním. Tato kyselina byla v naší rigorózní práci nejsilnějším chelatačním i redukčním činidlem. Docházelo k chelataci železnatých iontů již při velmi nízkých koncentracích testované látky. V prostředí o pH 7,5 a koncentračním poměru 1,4:1 byla tato fenylpropionová kyselina schopna chelatovat přes 80 % přítomných železnatých iontů. Se zvyšující se koncentrací testované látky se chelatační schopnost již nezvyšovala, naopak docházelo k poklesu (v pH 7,5 při koncentračním poměru 5:1 bylo dosaženo chelatace železnatých iontů cca 40 %, při koncentračním poměru 8:1 testovaná látka chelatovala již jen 21 % železnatých iontů). Po dosažení koncentračního poměru 10:1 (11 % chelatace) však začaly chelatační účinky mírně sílit (při koncentračním poměru byla zaznamenána chelatace přibližně 37 % železnatých iontů). V prostředí o pH 7,5 schopnost chelatace již klesala se zvyšující se koncentrací testované látky. V kyselějších prostředích látka chelatovala méně

a zpravidla docházelo k vyšší chelataci železnatých iontů se zvyšující se koncentrací testované látky. Chelataci iontů železa 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionovou kyselinou lze vidět na Obrázku č. 16.

Jak již bylo zmíněno, kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová dosáhla v našem měření i nejvyšších hodnot redukce a to již při nízkých koncentračních poměrech. Již od koncentračního poměru 1:100 redukovala tato fenylpropionová kyselina železité ionty významněji než rozpouštědlo dimethylsulfoxid. Oblasti maximální redukční aktivity bylo dosaženo již při koncentračním poměru testovaná látka : železité ionty 0,4:1 při měření v nejkyseljším testovaném prostředí (pH 4,5). S rostoucí hodnotou pH prostředí se snižovala redukční aktivita kyseliny 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové. Obrázek č. 17 ukazuje graf schopnosti kyseliny 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové redukovat železité ionty.

Poslední testovanou látkou byla 3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina. Oproti jiným testovaným látkám také obsahovala hydroxylovou skupinu, ta již ale nebyla vázána přes aromatický kruh. Schopnost chelatace i redukce iontů železa však byla velmi nízká (Obrázek č. 18 a 19).

V předchozí práci v naší laboratoři, publikované zatím jen formou diplomové práce, byly testovány interakce železa s deriváty benzoové kyseliny. Vyšší schopnost chelatovat železité ionty dosahovaly testované látky, které ve své struktuře obsahovaly dvě hydroxylové skupiny na aromatickém jádře oproti derivátům benzoové kyseliny, které neobsahovaly žádnou hydroxylovou skupinu, případně jen jednu ¹. V této rigorózní práci jsme testovali deriváty fenylpropionové kyseliny. Nejvyšší železo-chelatační aktivitou disponovala kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová. Oproti ostatním testovaným látkám vykazovaly vyšší železo-chelatační potenciál zejména 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová, 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová a 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina. Ostatní testované fenylpropionové kyseliny chelatovaly jen minimálně. Dochází tu tak k určité shodě s dříve publikovanou prací, kde byly testovány interakce železa s deriváty benzoových kyselin. I v této rigorózní práci vykazovaly vyšší schopnost chelatace látky, které ve své struktuře obsahovaly dvě hydroxylové skupiny na aromatickém jádře. Pro chelataci iontů železa se může zdát být výhodnější postavení dvou hydroxylových skupin na aromatickém jádře v poloze *ortho*. Oproti studii s deriváty benzoových kyselin ¹, byla v této rigorózní práci schopna chelatace i fenylpropionová kyselina pouze s jednou hydroxylovou skupinou na aromatickém jádře, kyselina 3-(4-hydroxyfenyl)propionová. Nutno však podotknout, že chelatační účinky kyseliny 3-(4-hydroxyfenyl)propionové byly jen mírné a vyjádřené jen při vyšších chelatačních poměrech a jen u železitých iontů.

V jiné *in vitro* studii byly analyzovány flavonoidy a jejich železo-chelatační aktivita. Katecholové uspořádání u látek typu kvercetinu zvyšovalo chelatační aktivitu dané látky ⁶⁸. Naše rigorózní práce tento fakt opět potvrzuje. Ze všech testovaných fenylpropionových kyselin disponovala právě 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina nejvyšší schopnosti chelatovat ionty železa a to již v poměrně nízkých koncentracích.

Pro ověření strukturní závislosti by však bylo zapotřebí větší skupiny testovaných látek.

Ukazuje se, že chelatační aktivitu iontů železa nezanedbatelně ovlivňuje i hodnota pH okolního prostředí. Již byl testován vliv pH prostředí na chelataci iontů železa vybranými flavonoidy. S rostoucí hodnotou pH prostředí stoupala i chelatační aktivita jednotlivých látek ⁶⁹. V této rigorózní práci nejsilnější chelátor, kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová, také chelatovala železnaté ionty nejvíce při nejvyšším zkoumaném pH 7,5. Tato chelatace probíhala při nižším koncentračním poměru než v ostatních kyselějších prostředích.

Další podobná studie prověřovala měď-redukční aktivitu metabolitů kvercetinu. Nejvyšší schopnost redukovat měďnaté ionty dosahovaly testované látky, které ve své struktuře obsahovaly *ortho*-dihydroxylové uspořádání ². Teoreticky se dala očekávat podobná strukturní závislost i u iontů železa. V této rigorózní práci skutečně absolutně nejvyšší schopnosti redukovat železité ionty dosáhla kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová. Jako jediná ze všech testovaných fenylpropionových kyselin ve své struktuře skutečně obsahovala právě *ortho*-dihydroxylové uspořádání. Již nižší redukční schopnost, ale stále statisticky významnou, dosáhly testované látky, které mají ve své struktuře také dvě hydroxylové skupiny (již však ve vzájemné poloze *meta*). Jednalo se o kyselinu 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionovou a 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionovou). Redukční aktivitu také vykazala kyselina 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina, která má pouze jednu hydroxylovou skupinu na aromatickém jádře v poloze 4. Pro přesnější ověření strukturních závislostí redukce železitých iontů by však opět bylo potřeba většího množství testovaných látek.

Ve studii, která testovala redukční účinky měďnatých iontů metabolity kvercetinu, se zvyšovala redukční aktivita testovaných látek se zvyšující se hodnotou pH prostředí ². Testované fenylpropionové kyseliny v této rigorózní práci naopak vykazovaly vyšší redukční schopnost při nižším pH. Zřejmě se může jednat o zásadní odlišnost mezi měďnatými ionty a ionty železitémi. Tato skutečnost byla ukázána i v předchozí práci, která zkoumala železo-redukční účinky ⁷⁰. 3,4-dihydroxybenzoová také snadněji redukovala železité ionty v prostředí o nižším pH (4,5) ¹.

Ve studii redukčních účinků metabolitů kvercetinu byla jednou z testovaných látek kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová). Se zvyšující se hodnotou pH se zvyšovala i schopnost redukovat měďnaté ionty. V prostředí o pH 7,5 již dosahovala relativně významných redukčních účinků ². Kyselinu 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou jsme testovali i v této rigorózní práci,

zkoumána však byla její chelatační a redukční aktivita vůči iontům železa. V porovnání s jejími redukčními účinky na ionty mědi byla schopnost kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové redukovat železité ionty zanedbatelná.

Testované látky v této rigorózní práci obsahovaly ve své struktuře rozlišný počet hydroxylových skupin. Fenypropionové kyseliny, které neměly ve své struktuře žádnou hydroxylovou skupinu (3-fenypropionová kyselina) nebo neměly hydroxylovou skupinu vázanou na aromatickém jádře (3-fenyl-3-hydroxypropionová kyselina), dosahovaly velmi nízkých železo-chelatačních a redukčních účinků. Kyselina 3-fenypropionová na příklad nedosáhla statisticky významnějších hodnot redukce železitých iontů než použité rozpouštědlo dimethylsulfoxid. Testované fenolové kyseliny s jednou hydroxylovou skupinou vykazovaly jistou chelataci i redukci železitých iontů, nelze je však považovat za nikterak silné chelatační nebo redukční činidla pro ionty železa. Z testovaných kyselin se dvěma hydroxylovými skupinami projevila absolutně nejvyšší železo-chelatační a redukční schopnost kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina. Oproti ostatním testovaným látkám s dihydroxylovým uspořádáním na aromatickém jádře zaujímaly zde přítomné dvě hydroxylové skupiny katecholové uspořádání.

Vzájemné uspořádání *ortho* hydroxylových skupin na aromatickém jádře má tak u fenypropionových kyselin pravděpodobně zásadní vliv na chelataci i redukci iontů železa.

Mezi jednotlivými fenolovými kyselinami jsou tak velké rozdíly z hlediska jejich aktivity, ať už myslíme chelataci iontů železa či redukci železitých iontů na ionty železnaté. V lidském organismu tak v průběhu metabolismu polyfenolů může docházet k přeměnám z chelatačně/redukčně aktivní sloučeniny na sloučeninu, která schopnost chelatace či redukce nevykazuje nebo naopak z neaktivní sloučeniny může vzniknout aktivní metabolit. Fenolové kyseliny (metabolity složitějších látek) by se pak mohly podílet na některých účincích, které jsou přisuzovány právě sloučenině, ze které v průběhu trávení vznikají. Veškeré měření v této rigorózní práci probíhalo za podmínek *in vitro*. Lidský organismus je však mnohem komplikovanější systém a můžeme pouze na teoretické úrovni spekulovat nad chováním se podobných látek v podmínkách *in vivo*.

7. Seznam využití odborné literatury

1. Vavřichová N.: Železo-chelatační účinky metabolitů flavonoidů – malých polyfenolických látek. Univerzita Karlova, Hradec králové 2016.
2. Mísař J.: Měď redukující účinky metabolitů kvercetinů. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2016.
3. Mladěnka P., Hrdina R., Hübl M., Šimůnek T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica (Hradec Králové)* 48, 127- 135 (2005).
4. Gozzelino R., Arosio P. Iron Homeostasis in Health and Disease. *International journal of molecular sciences* 17, 130 (2016).
5. Chifman J., Laubenbacher R., Torti S. V. A systems biology approach to iron metabolism. *Advances in experimental medicine and biology* 844, 201- 225 (2014).
6. Zielińska-Dawidziak M. Plant ferritin-- a source of iron to prevent its deficiency. *Nutrients* 7, 1184- 1201 (2015).
7. ©On-line databáze složení potravin ČR, verze 5.15.: <http://www.nutridatabase.cz/vyhledavani-potravin/podle-nutrientu/?id=35>; použito 14. 7. 2016
8. Winter W. E., Bazydlo L. A., Harris N. S. The molecular biology of human iron metabolism. *Laboratory medicine* 45, 92- 102 (2014).
9. He D., Marles-Wright J. Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology. *New biotechnology* 32, 651-657 (2015).
10. Lim K. H., Riddell L. J., Nowson C. A., Booth A. O., Szymlek-Gay E. A. Iron and zinc nutrition in the economically- developed world: a review. *Nutrients* 5, 3184-3211 (2013).
11. Hallberg L., Brune M., Rossander L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *The American journal of clinical nutrition* 49, 140- 144 (1989).
12. Bureš J., Horáček J., pořadatelé. *Základy vnitřního lékařství*. Galén, Praha 2003.
13. Hu Y., Yu S. Y., Zuo L. J., Piao Y. S., Cao C. J., Wang F., Chen Z. J., Du Y., Lian T. H., Liu G. F., Wang Y. J., Chan P., Chen S. D., Wang X. M., Zhang W. Investigation on Abnormal Iron Metabolism and Related Inflammation in Parkinson Disease Patients with Probable RBD. *PloS one* 10, 0138997 (2015).
14. Campdelacreu J. Parkinson disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurología* 29, 541- 549 (2014).
15. Bandyopadhyay S., Rogers J. T. Alzheimer's disease therapeutics targeted to the control of amyloid precursor protein translation: maintenance of brain iron homeostasis. *Biochemical pharmacology* 88, 486- 494 (2014).

16. Foy S. P., Labhassetwar V. Oh the irony: Iron as a cancer cause or cure? *Biomaterials* 32, 9155- 9158 (2011).
17. Bystrom L. M., Guzman M. L., Rivella S. Iron and reactive oxygen species: friends or foes of cancer cells? *Antioxidants & redox signaling* 20, 1917- 1924 (2014).
18. Kaiserová H., Šimůnek T., van der Vijgh W. J., Bast A., Kvasničková E. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochimica et biophysica acta* 1772, 1065- 1074 (2007).
19. Deng S., Yan T., Jendry C., Nemecek A., Vincetic M., Gödtel-Armbrust U., Wojnowski L. Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both topoisomerase II isoforms. *BMC Cancer* 14, 842 (2014).
20. Jansová H., Macháček M., Wang Q., Hašková P., Jirkovská A., Potůčková E., Kielar F., Franz K. J., Šimůnek T. Comparison of various iron chelators and prochelators as protective agents against cardiomyocyte oxidative injury. *Free radical biology & medicine* 74, 210- 221 (2014).
21. Mladěnka P., Macáková K., Filipský T., Zatloukalová L., Jahodář L., Bovicelli P., Silvestri I. P., Hrdina R., Saso L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry* 105, 693- 701 (2011).
22. Šimůnek T., Boer C., Bouwman R. A., Vlasblom R., Versteilen A. M., Sterba M., Gersl V., Hrdina R., Ponka P., de Lange J. J., Paulus W. J., Musters R. J. SIH--a novel lipophilic iron chelator--protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *Journal of molecular and cellular cardiology* 39, 345- 354 (2005).
23. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231- 1246 (2010).
24. Štípek S. a kolektiv. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Grada, Praha 2000.
25. Youngson M. R. *Antioxidanty, cesta ke zdraví - Jak odstranit vliv volných radikálů*. Yota, Brno 1995.
26. Koskenkorva-Frank T. S., Weiss G., Koppenol W. H., Burckhardt S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free radical biology & medicine* 65, 1174- 1194 (2013).
27. Mladěnka P., Šimůnek T., Hübl M., Hrdina R. The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free radical research* 40, 263- 272 (2006).
28. Yuan X. M., Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Annals of medicine* 35, 578-591 (2003).

29. Adjimani P. J., Asare P. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology reports* 2, 721- 728 (2015).
30. Valko M., Jomova K., Rhodes C. J., Kuča K., Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of toxicology* 90, 1-37 (2016).
31. Ahuja A., Dev K., Tanwar R. S., Selwal K. K., Tyagi P. K. Copper mediated neurological disorder: Visions into amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer and Menkes disease. *Journal of trace elements in medicine and biology* 29, 11- 23 (2015).
32. Kozłowski H., Kolkowska P., Watly J., Krzywoszynska K., Potocki S. General aspects of metal toxicity. *Current medicinal chemistry* 21, 3721- 3740 (2014).
33. Chobot V., Hadacek F., Kubicova L. Effects of selected dietary secondary metabolites on reactive oxygen species production caused by iron (II) autoxidation. *Molecules* 19, 20023- 20033 (2014).
34. Kerimi A., Williamson G. At the interface of antioxidant signalling and cellular function: Key polyphenol effects. *Molecular nutrition & food research* 60, 1770- 1788 (2016).
35. Tresserra-Rimbau A., Rimm E. B., Medina-Remón A., Martínez-González M. A., López-Sabater M. C., Covas M. I., Corella D., Salas-Salvadó J., Gómez-Gracia E., Lapetra J., Arós F., Fiol M., Ros E., Serra-Majem L., Pintó X., Muñoz M. A., Gea A., Ruiz-Gutiérrez V., Estruch R., Lamuela-Raventós R. M.; PREDIMED Study Investigators. Polyphenol intake and mortality risk: a re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Medicine* 12, 77 (2014).
36. Lall R. K., Syed D. N., Adhami V. M., Khan M. I., Mukhtar H. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *International journal of molecular sciences* 16, 3350- 3376 (2015).
37. Raiola A., Rigano M. M., Calafiore R., Frusciantè L., Barone A. Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of inflammation* 2014, 139873 (2014).
38. Ly C., Yockell-Lelièvre J., Ferraro Z. M., Arnason J. T., Ferrier J., Gruslin A. The effects of dietary polyphenols on reproductive health and early development. *Human reproduction update* 21, 228- 248 (2015).
39. Martin K. R., Appel C. L. Polyphenols as dietary supplements: A double- edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements* 2, 1- 12 (2009).
40. Liu R. H. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in nutrition* 4, 384- 392 (2013).
41. Laddomada B., Caretto S., Mita G. Wheat Bran Phenolic Acids: Bioavailability and Stability in Whole Wheat-Based Foods. *Molecules* 20, 15666- 15685 (2015).

42. Kaushik P., Andújar I., Vilanova S., Plazas M., Gramazio P., Herraiz FJ., Brar NS., Prohens J. Breeding Vegetables with Increased Content in Bioactive Phenolic Acids. *Molecules* 20, 18464- 18481 (2015).
43. Rice- Evans C., Packer L. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York 2003.
44. Chung E. J., Park J. H., Park T. S., Ahn J. W., Chung Y. R. Production of a Phytotoxic Compound, 3-Phenylpropionic Acid by a Bacterial Endophyte, *Arthrobacter humicola* YC6002 Isolated from the Root of *Zoysia japonica*. *The plant pathology journal* 26, 245- 252 (2010).
45. Bu R., Xie J., Yu J., Liao W., Xiao X., Lv J., Wang C., Ye J., Calderón-Urrea A. Autotoxicity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings is alleviated by silicon through an increase in the activity of antioxidant enzymes and by mitigating lipid peroxidation. *Journal of Plant Biology* 59, 247- 259 (2016).
46. Zhao N., Yang G., Zhang Y., Chen L., Chen Y. A new 9,10-dihydrophenanthrene from *Dendrobium moniliforme*. *Natural product research* 30, 174- 179 (2016).
47. Zhang Y., Guo F., Zeng P., Jia Q., Li Y., Zhu W., Chen K. [Phenolic components from *Petasites tricholobus*]. *China journal of Chinese materia medica* 37, 1782- 1787 (2012).
48. Tang C. S., Young C. C. Collection and Identification of Allelopathic Compounds from the Undisturbed Root System of *Bigaltea limpograss* (*Hemarthria altissima*). *Plant physiology* 69, 155- 160 (1982).
49. Pijewska L. Isolation of phloretic acid from plant material. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy* 25, 465- 467 (1973).
50. Schönfelder I., Schönfelder P. *Léčivé rostliny*. J. Otto- Ottovo nakladatelství, Praha 2010.
51. Zentrich J. A. *Encyklopedie moderního bylinářství P- Z*. Fontána, Olomouc 2014.
52. Yang J. H., Kondratyuk T. P., Jermihov K. C., Marler L. E., Qiu X., Choi Y., Cao H., Yu R., Sturdy M., Huang R., Liu Y., Wang L. Q., Mesecar A. D., van Breemen R. B., Pezzuto J. M., Fong H. H. S., Chen Y. G., Zhang H. J. Bioactive Compounds from the Fern *Lepisorus contortus*. *Journal of natural products* 74, 129- 136 (2011).
53. Labib S., Erb A., Kraus M., Wickert T., Richling E. The pig caecum model: a suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Molecular nutrition & food research* 48, 326- 332 (2004).
54. Pandurangan A. K., Esa N. M. Luteolin, a bioflavonoid inhibits colorectal cancer through modulation of multiple signaling pathways: a review. *Asian pacific journal of cancer prevention* 15, 5501- 5508 (2014).

55. Hanske L., Loh G., Sczesny S., Blaut M., Braune A. The bioavailability of apigenin-7-glucoside is influenced by human intestinal microbiota in rats. *The Journal of nutrition* 139, 1095- 1102 (2009).
56. Braune A., Gütschow M., Engst W., Blaut M. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Applied and environmental microbiology* 64, 5558- 5567 (2001).
57. Lee K., Lee B. J., Bu Y. Protective Effects of Dihydrocaffeic Acid, a Coffee Component Metabolite, on a Focal Cerebral Ischemia Rat Model. *Molecules* 20, 11930- 11940 (2015).
58. O'Keefe J. H., Bhatti S. K., Patil H. R., DiNicolantonio J. J., Lucan S. C., Lavie CJ. Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 1043- 1051 (2013).
59. Gao K., Xu A., Krul C., Venema K., Liu Y., Niu Y., Lu J., Bensoussan L., Seeram N. P., Heber D., Henning S. M. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *The Journal of nutrition* 136, 52-57 (2006).
60. Kašparová M. Borůvka černá (*Vaccinium myrtillus* L.). *Praktické lékařství* 5, 143- 145 (2009).
61. Karlíčková J. Nové poznatky o účincích *Rhodococcum vitis-idaea*. *Praktické lékařství* 3, 296- 298 (2007).
62. de Llano D. G., Esteban-Fernández A., Sánchez-Patán F., Martínlvarez P. J., Moreno-Arribas M. V., Bartolomé B. Anti-Adhesive Activity of Cranberry Phenolic Compounds and Their Microbial-Derived Metabolites against Uropathogenic *Escherichia coli* in Bladder Epithelial Cell Cultures. *International journal of molecular sciences* 16, 12119- 12130 (2015).
63. Davies M. N., Yáñez A. J. *Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology*. John Wiley & Sons, New Jersey 2013.
64. Cardona F., Andrés-Lacueva C., Tulipani S., Tinahones F. J., Queipo-Ortuño M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24, 1415-1422 (2013).
65. Mira L., Fernandez M. T., Santos M., Rocha R., Florêncio M. H., Jennings K. R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free radical research* 36, 1199- 1208 (2002).
66. Říha M., Hašková P., Martin J., Filipický T., Váňová K., Vávrová J., Holečková M., Homola P., Vitek L., Palicka V., Šimůnek T., Mladěnka P. Protective Effects

- of D-Penicillamine on Catecholamine-Induced Myocardial Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, 5213532 (2016).
67. Filipský T., Mladěnka P., Macáková K., Hrdina R., Saso L., Marchetti F., Pettinari C. In vitro characteristics of 1-phenyl-3-methyl-4-acylpyrazol-5-ones iron chelators. *Biochimie* 94, 125- 131 (2012).
68. Stonawská M.: Chelatace železnatých a železitých iontů flavonoidy. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2011.
69. Hrabalíková J.: Vliv pH na chelataci železa. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2010.
70. Macáková K., Mladěnka P., Filipský T., Říha M., Jahodář L., Trejtnar F., Bovicelli P., Proietti Silvestri I., Hrdina R., Saso L. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food chemistry* 135, 2584- 2592 (2012).

8. Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Mgr. Jakub Mísař

Konzultant: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Název rigorózní práce: Interakce fenylpropionových kyselin se železem

Železo patří do skupiny důležitých prvků v lidském organismu, zejména pak díky schopnosti přijímat nebo odevzdávat elektrony (přeměna mezi železitými a železnatými ionty). Tento prvek je nezbytnou součástí organismu. Za jistých okolností však může i škodit (na příklad účast na Fentonově reakci). Fenolové kyseliny jsou strukturně velmi jednoduché molekuly, které jsou součástí běžné stravy nebo vznikají v průběhu trávení.

V této *in vitro* studii jsme testovali interakce (chelataci a redukci) mezi fenylpropionovými kyselinami a ionty železa. Celkově bylo měřeno sedm fenylpropionových kyselin při různých pH prostředích. Pro měření jsme využili spektrofotometrickou metodu, založenou na indikátoru ferrozinu.

Mezi testovanými sloučeninami se stupeň chelatace a redukce iontů železa lišil. Vyšší schopnost chelatace iontů železa dosahovaly všechny sloučeniny s dihydroxylovým uspořádáním a kyselina 3-(4-hydroxyfenyl)propionová. Největší redukční aktivitu vůči železitým iontům dosáhla kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová s katecholovou skupinou.

Chelatace nebo redukce železa fenylpropionovými kyselinami by mohla v lidském organismu ovlivňovat kinetiku železa.

KLÍČOVÁ SLOVA: Železo, Fenylpropionová kyselina, Ferrozin, Redukce, Chelatace

9. Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Mgr. Jakub Mísař

Consultant: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of thesis: Interaction of phenylpropionic acids with iron

Iron belongs to a group of important elements in human body, especially due to ability to accept or donate electrons (conversion between the ferric and the ferrous ions). This element is essential part of human body. Under certain circumstances it may even harm (for example participation in the Fenton reaction). Phenolic acids are structurally very simple molecules, which are part of common diet or they are formed during the digestion.

In this *in vitro* study we tested interaction (chelation and reduction) between the phenylpropionic acids and the iron ions. Seven phenylpropionic acids were evaluated at different pH values. For measurement we used spectrophotometric method, based on the indicator ferrozine.

The degree of chelation or reduction of iron ions differed between tested compounds. Higher ability to chelate iron ions achieved all dihydroxycompounds and the 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid. The most active ferric reduction achieved by 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid with catechol group.

Iron chelation or reduction by phenylpropionic acids could lead to influence the kinetics of iron in the human body.

KEYWORDS: Iron, Phenylpropionic acid, Ferrozine, Reduction, Chelation