

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie a farmaceutické botaniky



# **HLEDÁNÍ PŘÍRODNÍCH CHELÁTORŮ KOBALTU**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Kateřina Kadlecová

**CHARLES UNIVERSITY**

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany



# **SEARCHING FOR NATURAL COBALT CHELATORS**

Diploma thesis

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Kateřina Kadlecová

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové

Kateřina Kadlecová

Děkuji PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, revize a připomínky. Dále katedře farmakologie a toxikologie za možnost navštěvovat jejich laboratoř, používat chemikálie a přístroje pro zhotovení experimentální části. Děkuji také Mgr. Monice Moravcové za pomoc při měření chelatační aktivity látek. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za trpělivost, ochotu a podporu během celého studia.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Studentka: Kateřina Kadlecová

Školitel: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Název diplomové práce: Hledání přírodních chelátorů kobaltu

Kobalt, jako stopový prvek, se v lidském těle nejvíce nachází jako centrální atom vitamínu B12. Jeho nedostatek se projevuje poškozením psychického stavu, ztrátou paměti, demencí nebo megaloblastickou anemií. Při nadměrném množství je pro tělo toxický, což bylo nejvíce popsáno u pacientů s MoM endoprotézou kyčelního kloubu. Kobalt způsobuje poškození okolní tkáně až její destrukci, nebo také kardiotoxicitu, hypofunkci štítné žlázy, ztrátu paměti a sluchu. Flavonoidy jsou přírodní polyfenolické sloučeniny se schopností vázat kovy, odstraňovat volné radikály a chránit před oxidačním stresem.

Cílem práce bylo stanovit chelatační aktivitu u vybraných flavonoidů za využití spektrofotometrického měření *in vitro* při 4 patofyziologicky relevantních pH prostředí (pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Z testovaných látek vykazovaly chelatační aktivitu pouze 3-hydroxyflavon a baikalein. 3-hydroxyflavon v poměru 1:1 dosahoval při pH 7,5 až 100 % chelatace a při pH 6,8 asi 60 % chelatace. Baikalein byl reaktivní při pH 7,5 a 6,8, kdy při poměru 10:1 dokázal navázat asi 50 % kobaltnatých iontů. Při pH 4,5 a 5,5 nereagovala žádná z látek.

Dále bylo ověřeno, zda tyto látky ovlivňují lýzu červených krvinek v přítomnosti kobaltu. Pro *in vivo* experiment byla použita potkaní krev. Samotný 3-hydroxyflavon ovlivnil lýzu významněji, ta dosahovala v poměru 4:1 až 20 %, s ionty kobaltu pouze 10 %. U baikaleinu byla zjištěna lýza pod 10 %, samotný baikalein způsoboval v poměru 4:1 lýzu do 20 % a v případě s ionty kobaltu dosahoval až 90 %.

Diplomová práce prokázala, že některé flavonoidy mohou chelatovat ionty kobaltu. Dále bylo zjištěno, že baikalein se v *in vivo* prostředí chová jako prooxidant, což by se mohlo využít při terapii nádorových onemocnění.

# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Student: Kateřina Kadlecová

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of diploma: Searching for natural cobalt chelators

Cobalt, as a trace element, is mostly found in the human body as the central atom of vitamin B12. Its deficiency is manifested by psychological impairment, memory loss, dementia or megaloblastic anemia. In excess amount, it is toxic to the body, which has been most described in patients with MoM hip replacement surgery. Cobalt causes damage to surrounding tissue until it is destroyed, or also cardiotoxicity, thyroid hypofunction, memory and hearing loss. Flavonoids are natural polyphenolic compounds with the ability to bind metals, scavenge free radicals and hence protect against oxidative stress.

The aim of the work was to determine the cobalt chelating activity of a row of flavonoids using spectrophotometric measurements *in vitro* at 4 pathophysiologically relevant pH conditions (pH 4.5, 5.5, 6.8 and 7.5). Of the test substances, only 3-hydroxyflavon and baicalein showed chelation activity. 3-hydroxyflavon in a 1:1 ratio achieved 100 % chelation at pH 7.5 and about 60 % at pH 6.8. Baicalein was reactive at pH 7.5 and 6.8, when at 10:1 it was able to bind about 50 % of cobalt ions. At pH 4.5 and 5.5, none of the substances responded.

In addition, it was investigated whether these substances affected red blood cell lysis in the presence of cobalt. Rat blood was used for the *in vivo* experiment. 3-hydroxyflavon alone affected lysis more significantly, with a ratio of 4:1 to 20 %, with cobalt ions only 10 %. In baicalein, lysis was found to be below 10 %, baicalein alone caused up to 20 % lysis in a 4:1 ratio, and in the case of cobalt ions it was up to 90 %.

The diploma thesis has shown that some flavonoids are able to chelate cobalt ions. Furthermore, *in vivo* experiment, baicalein in particular acts as a prooxidant, which could be used in cancer therapy.

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část .....	2
2.1	Kobalt .....	2
2.1.1	Výskyt v přírodě.....	2
2.1.2	Součást lidského těla .....	3
2.1.3	Toxicita kobaltu.....	6
2.2	Chelatace .....	7
2.2.1	Chelatační terapie .....	8
2.2.2	Chelatační vlastnosti flavonoidů .....	10
2.3	Flavonoidy .....	10
2.3.1	Výskyt v přírodě.....	11
2.3.2	Antioxidační aktivita .....	12
2.3.3	Protizánětlivá aktivita.....	12
2.3.4	Kardioprotektivní účinky .....	12
2.3.5	Ovlivnění inzulínové rezistence .....	13
2.3.6	Flavonoidy a neurodegenerativní onemocnění.....	13
2.3.6.1	Parkinsonova choroba (PD).....	13
2.3.6.2	Alzheimerova choroba (AD) .....	14
2.3.7	Protinádorová aktivita .....	14
2.3.8	Farmakokinetika flavonoidů .....	15
2.3.9	Jednotliví zástupci flavonoidů z experimentálního měření.....	16
2.4	Lýza červených krvinek.....	30
3	Cíl práce .....	31
4	Experimentální část.....	32
4.1	Materiál.....	32
4.1.1	Chemikálie .....	32
4.1.2	Přístroje a pomůcky.....	33
4.2	Metodický postup .....	34
4.2.1	Metodický postup pro spektrofotometrické stanovení chelátorů kobaltu .....	34
4.2.1.1	Před experimentem .....	34
4.2.1.2	Provedení experimentu .....	35
4.2.2	Metodický postup lýzy červených krvinek .....	36
4.2.2.1	Před experimentem .....	36
4.2.2.2	Provedení experimentu .....	36

4.3	Matematické a statistické metodiky .....	38
4.3.1	Stanovení chelátorů kobaltu .....	38
4.3.2	Lýza erytrocytů .....	38
5	Výsledky .....	39
5.1	Výsledky spektrofotometrického stanovení chelátorů kobaltu .....	39
5.2	Výsledky lýzy červených krvinek .....	49
6	Diskuse.....	51
7	Závěr .....	54
8	Seznam zkratk .....	55
9	Literatura.....	57
10	Obrazové přílohy .....	65



# 1 Úvod

Kobalt je těžký kov patřící mezi stopové prvky důležité pro fungování lidského organismu. Využívá se na barvení skla, v průmyslu, nukleární medicíně a je součástí slitin. V přírodě se nachází v komunálním odpadu či kravském hnoji a dostává se do potravního řetězce. Člověk by ho měl přijímat v potravě ve výši asi 3 µg denně. Kobalt se v lidském těle vyskytuje nejvíce jako centrální atom korinového jádra vitamínu B12, díky kterému probíhá syntéza ribonukleových kyselin, metabolismus aminokyselin a mastných kyselin. Při jeho nedostatku hrozí megaloblastická anemie, ztráta paměti, deprese nebo demence.

Nadměrné množství kobaltu v lidském těle se nejvíce projevilo u pacientů s endoprotézou kyčelního kloubu ze slitiny kobaltu. Nanočástice kobaltu se dostávaly do okolní tkáně, kde způsobovaly až tzv. pseudotumory, toxicita se také projevila neuropatií, hypofunkcí štítné žlázy, kardiotoxicitou, retinopatií nebo ztrátou sluchu. Kvůli nadměrnému množství kobaltu v těle byla také iniciována Fentonova reakce, která poskytuje reaktivní formy kyslíku (ROS), a tím způsobuje oxidační stres a poškození tkání.

Jako chelátory byly vybrány flavonoidy, které mají schopnost vytvářet vazby s kovy, vychytávat volné radikály a chránit před oxidačním stresem. Chelatační terapie je založena na schopnosti ligandu reagovat s kovem a vyloučit ho ven z těla. Cílem je najít selektivní chelátor, který by chelatoval pouze kobalt a nesnižoval koncentrace ostatních kovů důležité pro lidské tělo.

Cílem práce bylo stanovení chelatační aktivity u vybraných flavonoidů *in vitro* za využití spektrofotometrického měření při pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5 a stanovit *in vivo*, zda se chelatace projeví na lýze červených krvinek.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Kobalt

Kobalt je namodralý kov, který řadíme mezi přechodné prvky. V periodické soustavě prvků se nachází ve čtvrté periodě a deváté skupině, v triádě železa. Projevuje se paramagnetizmem a obsahuje nepárové elektrony. V přírodě se vyskytuje hlavně v podobě oxidů a komplexních sloučenin s oxidačním číslem II a III. Minerály smaltin, erytrid a kobaltin, které obsahují kobalt se používaly hlavně na barvení skla již ve starověkém Egyptě nebo Číně. Minerály se roztavily a vznikající oxid kobaltu se vléval do roztaveného skla, kdy se ve studené vodě srážel a vytvořil vrstvu modrých částic, které se rozemlely na tzv. smalt. Kobalt se nepoužíval jen kvůli své modré barvě, ale dodával sklu pevnost a odolnost vůči atmosférickým vlivům. [1]

Kobalt byl izolován jako elementární kov až v 18. století. Dnes se používá hlavně jako součást slitin s niklem, železem, hliníkem, chromem, molybdenem nebo titanem, především jako slitiny, které zabraňují korozi, slitiny s nízkou roztažností, teplotně odolné povlaky nebo jako protézy kolen, kyčlí a zubní komponenty. Malé množství kobaltu je také přítomno v magnetu. Díky své schopnosti zvyšovat hustotu saturace železa se používá jako měkký magnet. Kobalt se také využívá v katodách baterií společně s lithiem a niklem.  $\text{Co}^{3+}$  (kobaltité ionty) nemá magnetický moment a vytváří tak vrstvu mezi ostatními kovy, a tím katodu stabilizuje. Jestli je ale kobalt důležitý nebo se nechá nahradit jiným přechodným prvkem vyžaduje další studie.

#### 2.1.1 Výskyt v přírodě

Bylo zjištěno, že se kobalt společně s niklem nachází v komunálním odpadu a v kravském hnoji, což způsobuje toxicitu pro rostliny. Snižuje růst jejich kořenů, chlorózu a jejich celkové odumírání. Navíc se tyto kovy dostávají do potravy a narušují tak potravní řetězec. Nejspíše se váží na organický uhlík, který je jejich součástí. Těžký kov, který se dostává do rostlin přes jejich kořeny se ve velkém množství zadržuje právě tam, ve vakuolách kořenových buněk a do nadzemní části se dostává opravdu nepatrné množství. Řešením by mohlo být přidání organické hmoty, aby se z kovů nemohly vytvořit soli, které se do rostlin dostávají více. Nicméně akumulace těžkých kovů v půdě by se měla stále kontrolovat pro posouzení enviromentálního hlediska. [2]

Existují rostliny, které se nazývají tzv. hyperakumulátory těžkých kovů, jako je např. *Noccaea caerulescens* (Brassicaceae), která zadržuje kobalt a nikl především v mladých listech.

V rostlině jsou poté přenášeny pomocí floému. Nadměrné množství kovu se ale neprojevuje nijak toxicky. [3]

Nadměrné vychytávání těžkých kovů pomocí kořenových buněk je zapříčiněno zvýšenou expresí genů pro kovové transportéry. Kov je poslán do nadzemních částí, a tak zůstává méně v kořenových vakuolách a více ve vakuolách v listech. Kovy se v rostlinách váží na různé ligandy, jako jsou organické kyseliny, aminokyseliny (především histidin) nebo bílkoviny. Pouze okrajově se zmiňují chelátory, které by sloužily pro detoxikaci rostlin. [4]

Kobalt je velmi výhodný pro symbiotické bakterie rodu *Rhizobium*, které pro fixování dusíku potřebují kobalamin, jsou hlavně v kořenech luštěnin (Fabaceae). Kobalt také přispívá ke zpomalení stárnutí listů a odolnosti semen vůči suchu. Toxicita je hlavně spojená s oxidačním stresem a narušením homeostázy železa, protože s železem soutěží o transportéry. Proto rostliny, které akumulují kobalt, mají nejspíše upravené homeostatické mechanismy pro železo. [5]

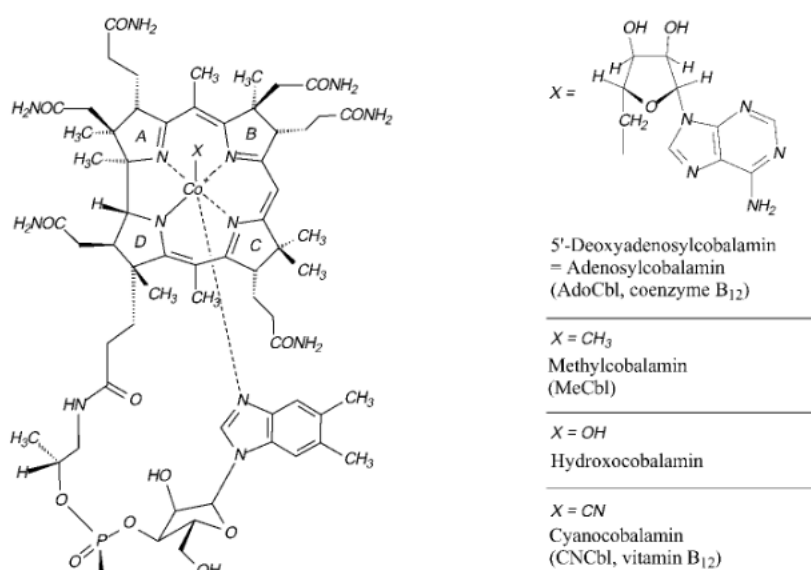
### 2.1.2 Součást lidského těla

Kobalt se ve své organické formě vyskytuje hlavně v zelených částech rostlin, obilninách, rybách a vodě. Jeho anorganická forma je pro lidské tělo toxická, hromadí se v tkáních a může vyvolávat imunologické reakce. Využívá se ale například v pivním průmyslu pro snižování tvořící se pěny. Hlavním radioizotopem, který se dostává do těla je  $^{60}\text{Co}$ , který se využívá v průmyslu a nukleární medicíně. V minulosti byly kontaminovány podzemní vody tímto izotopem kvůli úniku z jaderného odpadu v Severní Americe, kdy vznikl v reaktoru. [6]

Člověk by měl denně přijmout 3  $\mu\text{g}$  kobaltu, jehož celková koncentrace v těle je asi 1–2 mg. Nejvíce zastoupený je v srdci, slezině, játrech a ledvinách, dále v mozku a slinivce. Do lidského organismu se dostává několika cestami, je přijímán perorálně, respiračním systémem, transdermálně nebo jako součást biomateriálů, které se používají jako náhrada lidských tkání. [7]

Absorpce kobaltu probíhá v tenkém střevě do centrálního kompartmentu, ve kterém ale dlouho nezůstává, protože je vychytáván zejména ledvinami a játry. Transport kobaltu v erythrocytech je spojen s vápenatými ionty, ale není součástí sodnodraselné pumpy. Hlavně se váže na albumin a hemoglobin, má tedy nízké procentuální zastoupení volné frakce. Nejvíce se vylučuje močí, během prvních 24 hodin se eliminuje až 40 %, ale studie prokazují, že po roce zůstává v těle asi ještě 10 %, které jsou zachovány nejspíše natrvalo. [8]

V lidském těle se kobalt nejvíce vyskytuje jako součást vitamínu B12. Vitamín B12, tedy kobalamin, má ve svém korinovém jádře jako centrální atom kobalt. Člověk vitamín neumí vyrobit, proto jej musí přijímat hlavně živočišnou potravou – masem, vejci nebo vnitřnostmi a malé množství vytváří bakteriální flóra v intestinu. Denně bychom měli přijmout 5-20  $\mu\text{g}$ , ze kterých si v těle vytvoříme zásoby na několik let. [9] Ve své struktuře obsahuje vitamín B12 modifikovaný tetrapyrrol, tedy makrocyklus o čtyřech pyrrolech spojené přes atomy uhlíku, kdy jeden chybí. Na něm je připojena pomocí aminopropanolové vazby báze nazývaná se dimethylbenzimidazol s ribosou tvořící dohromady nukleotid. Může být nahrazena jinou bází, např.: purinem. A třetí složku tvoří ligand: kyanid, adenosyl, methyl, deoxyadenosyl. Z toho vyplývají i příslušné názvy cyanokobalamin, adeno-, methyl-, deoxyadenosyl-. (obr. 1) Methylkobalamin a deoxyadenosylkobalamin se přirozeně vyskytují v buňkách. Kobalt svými silnými nukleofilními vlastnostmi kontroluje vazbu a její štěpení. [10]



Obrázek 1 – Chemická struktura vitamínu B12.

Při perorálním příjmu se vitamín B12 dostává do žaludku, kde se napojuje na transkobalamin I, který mu poskytuje ochranu v kyselém prostředí. Pomocí vnitřního faktoru proběhne jeho absorpce v distálním ileu, transportuje se do enterocytu, a díky transkobalaminu II se dostává do portální cirkulace a uvolňuje se z vazby v játrech. [9]

Fyziologickou funkcí vitamínu B12 je methylace či demethylace, pracuje jako kofaktor transferas při syntéze ribonukleových kyselin, metabolismu aminokyselin a mastných kyselin a tvorbě dalších signálních molekul. Uplatňuje se jako donor methylové skupiny při vytvoření

tymidinu pro DNA, s jeho pomocí probíhá konverze 5-methyltetrahydrofolátu na 5, 10-methylentetrahydrofolát. Další reakcí, kde je zapotřebí kobalt je izomerace methylmalonyl CoA na sukcinyl CoA. [9]

V první reakci vystupuje jako koenzym metioninsyntetasy, kdy přenesení methyl z methyltetrahydrofolátu na homocystein a zapříčiní tak vznik methioninu. Vzniklý tetrahydrofolát poté působí jako koenzym thymidylátsyntetasy a pomáhá vytvořit thymidin z deoxyuridinu. Vzniklý thymidin se stává jako fosfát součástí DNA. V tomto metabolické procesu se také uplatňuje kyselina listová, především pro přenos uhlíku. Druhá reakce probíhá v nervové tkáni, kdy vitamín B12 je koenzymem methylmalonyl-CoA-mutasy, která přeměňuje kyselinu methylmalonovou na kyselinu jantarovou. [11]

Při nedostatku vitamínu B12 se zpomaluje obnovení tkání, zejména kostní dřeň a sliznice. Příčinou je hlavně malnutrice, další onemocnění jako je Crohnova choroba, autoimunitní thyreoidita, chronická pankreatitida, resekce žaludku, tenkého střeva nebo nejčastěji vrozený deficit vnitřního faktoru a další. Nejvíce jsou poškozené tkáně s rychlou diferenciací buněk, tedy právě červené krvinky, kdy dochází k megaloblastické anemii. Při nedostatku vnitřního faktoru se nazývá perniciózní anemií. [11] Dále poškozuje psychický stav, způsobuje náladovost, změnu osobnosti, ztrátu paměti, demenci nebo depresi. Také zvyšuje riziko infarktu myokardu nebo mrtvice. Pokud je v krvi přítomno méně než 200 pg/ml vitamínu a jsou přítomny některé ze symptomů, s největší pravděpodobností to znamená jeho nedostatek.

Terapií je podávání samotného vitamínu B12 nejvíce v podobě cyanokobalaminu pomocí intramuskulární injekce, perorální léčba není zatím tolik účinná. Při terapii se u pacienta sledují hladiny sérového vitamínu B12, homocysteinu a kyseliny methylmalonové a celková reakce na léčbu. [12]

Denně se podává 300–1000 µg podle stavu pacienta asi jeden týden a poté se množství a frekvence postupně snižuje. Při perorálním podání se volí bílkovina nejčastěji získaná extrakcí sliznice žaludku prasat, ale účinnost narušuje hlavně možnost neutralizace vnitřního faktoru v žaludečním prostředí. [11]

Kobalt se také v těle nachází v enzymech, které nejsou součástí korinového jádra. Jedná se o methionin aminopeptidasu, prolidasu, nitrilhydratasu, glukosoisomerasu a další. V lidském těle byly vytvořeny systémy pro regulaci hladin kobaltu pro udržení homeostázy. Jedná se o uptake systém, effluxní systém, metalochaperony a proteiny pro skladování kovů. Uptake systém byl nejvíce rozvinut u gramnegativních bakterií, pomocí receptorů na vnější membráně

jsou aktivovány proteinové přenašeče, které přenášejí ionty kobaltu přes membrány. Effluxní systém se skládá z protonové pumpy pro transport nadměrného množství kobaltu ven z buňky pro její ochranu před toxicitou. Metalochaperony jsou bílkoviny, které dodávají ionty kovů apoenzymům a usnadňují jejich zrání do aktivní formy.

### 2.1.3 Toxicita kobaltu

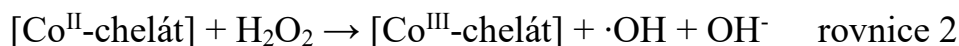
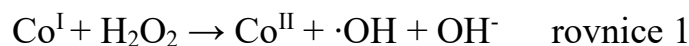
V letech 2006 až 2010 se jako endoprotézy kyčelního kloubu hojně používaly tzv. metal-on-metal (MoM), které byly vyrobeny především ze slitin obsahující kobalt a chrom. Tyto kovy se pacientům usazovaly v synoviální tekutině, plazmě, erytrocytech, moči a v okolní tkáni. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency uvádí, že koncentrace iontů kobaltu v krvi vyšší než 7 µg/l ukazuje na možné poškození tkáně a implantát by měl být odstraněn. Bylo ale prokázáno, že 10-70 µg/l v krvi nevyvolává žádné významné klinické příznaky, které se objevily až u pacientů s endoprotézou s koncentrací kobaltu více než 300 µg/l. Dnes se již upustilo od těchto náhrad, ale stále existuje mnoho pacientů s artroskopií kyčelního kloubu MoM *in situ*. [13]

V protézách postupně dochází k opotřebení, vzniklým třením se uvolňují nanočástice kovu, které mají za následek zvýšenou lokální a systémovou koncentraci, která může způsobovat poškození tkání. Částice kovu nepříznivě ovlivňují kostní buňky a u některých citlivých pacientů mohou vyvolat opožděnou buněčnou přecitlivělost na kobalt, která se projeví jako zánětlivá masa, tzv. pseudonádor, který zničí okolní tkáň. Velmi málo byly hlášeny maligní nádory svalů a kostí. U pacientů s implantáty byly také popsány onemocnění jako chronická demyelinizační neuropatie, kardiotoxicita, únava, anorexie, retinopatie, ztráta paměti, závrať, ztráta sluchu, dušnost, hypofunkce štítné žlázy a další. Dále bylo zjištěno, že toxicita kobaltu může souviset s nízkou vazností kobaltu na albumin, a tedy vzniku velké koncentrace volné frakce kobaltu. [14]

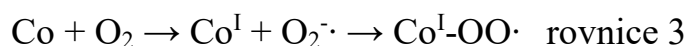
Zvýšeným množstvím kobaltu v lidském těle také mohou trpět pracovníci při výrobě slitin nebo v průmyslové výrobě tvrdých kovů. Setkávají se s ním prostřednictvím kůže nebo ho ve větší míře inhalují, což v minulosti vedlo k rakovině plic. Za toxickou dávku se považuje 0,003–0,006 µg/m<sup>3</sup>. Mechanismem účinku je hlavně oxidační stres a poškození DNA. [15]

Kvůli nadměrnému množství kobaltu vznikají volné radikály, které inhibují opravu DNA, způsobují její křížení a indukují výměnu sesterských chromatid a proteinů, modifikují báze DNA a zvyšují peroxidaci lipidů. Sloučeniny kobaltu mají karcinogenní účinky a zvyšují

frekvenci UV indukovaných mutací. Kobalt takto vytváří pomocí Fentonovy reakce hydroxylové radikály ( $\cdot\text{OH}$ ), které jsou považovány za nejsilnější ROS. (rovnice 1, 2)



Bylo prokázáno, že reakce kobaltnatých iontů s peroxidem vodíku neprodukuje pouze  $\cdot\text{OH}$ , ale také singletový kyslík. Tyto radikály jsou tvořeny v lysozomech hepatocytů za přítomnosti  $\text{Co}^{\text{II}}$ . Suspenze kobaltu reaguje s kyslíkem za vzniku radikálového meziprojektu  $\text{Co}^{\text{I}}\text{-OO}\cdot$ , nejedná se však o Fentonovu reakci, ale pro tyto studie byla použita analytická metoda ion trapping a EPR (elektronová paramagnetická rezonance). (rovnice 3)



Reakce vzniklého radikálového meziprojektu za přítomnosti enzymu SOD (superoxiddismutasa), která je důležitým antioxidačním prvem živých buněk, poskytuje peroxid vodíku a  $\text{Co}^{\text{I}}$ . (rovnice 4) [16]



V přítomnost  $\text{CoCl}_2$  dochází k hypoxii neurálních buněk vlivem poškození mitochondriální DNA. To bylo prvně zjištěno při studiích na potkanech a dále studováno na signalizačních kaskádách, kde bylo určeno, že kobaltnaté ionty vyvolávají oxidační stres. [17]

## 2.2 Chelatace

Principem chelatace je začlenění minerálního iontu nebo kationtu do chelatovného činidla, vzniká tak koordinační komplex s vazbami mezi chelátory a ionty kovů. Vychází z řeckého chelos, znamenající dráp. Síla těchto vazeb je závislá především na typu kovu, na afinitě kovu ke tkáním a k chelátorům. Cílem je vytvořit takový komplex, který zabrání mobilizaci kovu do tkání, speciálně do ledvin a jater a možné reabsorpci a který se lépe vylučuje močí či stolicí. Ve vodě rozpustné komplexy jsou transportovány krví a vylučovány močí, zatímco lipofilní mohou více penetrovat membránami. Jejich účinnost se popisuje jako poměr chelátu a nevázaného kovu. [18]

Chelatační činidla neboli ligandy se váží s atomy kovů jednou nebo více vazbami kovalentními nebo koordinačními prostřednictvím atomů síry, dusíku nebo kyslíku. Podle počtu vazeb se ligand nazývá monodentát, bidentát nebo polydentát. Tzv. ideální chelátor by měl být rozpustný ve vodě, netoxický, vysoce afinitní ke kovu, měl by zachovat chelatační

vlastnost při pH tělních tekutin a vytvářet takové komplexy, které eliminují toxické kovy ven z těla. Rozeznávají se dva typy vytvořených komplexů: stabilní, který brání interakci kovu s biomolekulami a otevřený neboli košíkový, který naopak tuto interakci podporuje a může znamenat oxidační stres. [19]

### 2.2.1 Chelatační terapie

Kobalt se řadí mezi esenciální těžké kovy, které jsou při nízké koncentraci v těle relativně neškodné. Jejich homeostáza je regulována transportními bílkovinami a organelami jako jsou mitochondrie. V posledních letech se ale zvýšila možnost kontaminace hlavně kvůli elektronickému odpadu, spalování fosilních paliv, likvidaci komunálního odpadu nebo těžbě. Hromadění v lidském těle má za následek poškození nervového, dýchacího, dermálního nebo trávicího systému. [20]

Toxicita způsobena kovy nemá přesně specifické příznaky, zvláště pokud je expozice dlouhodobá a v nízkých dávkách. Do lidského těla se mohou dostat v podobě kovových nanočástic, které se vyznačují vysokým poměrem povrchu k hmotnosti, mohou tak procházet přes buněčnou membránu a inhibovat mitózu, růst a dělení buněk. Přesný mechanismus toxicity ale není znám, jejich monitorování zahrnuje měření koncentrace počtu částic, plochu povrchu a jejich složení k určení limitních hodnot expozice na pracovišti. V těle se nanočástice přenášejí pomocí lymfy a centrálního kompartmentu do dalších orgánů jako jsou játra, ledviny, kostní dřeň, srdce a další.

Kovové ionty v těle aktivují T lymfocyty, tím iniciují zánět, který díky cytokinům postihuje okolní buňky, což se může projevit jako změna ústní sliznice, kožní patologické stavy, horečka, únava nebo ovlivňují hypotalamo-hypofyzární osu nadledvin. Velmi důležité se jeví včasné rozpoznání intoxikace a odstranění kovového zdroje, např. protézy, ale primární léčbou intoxikace těžkými kovy je chelatační terapie. V klinické praxi se mezi prvními látkami používal 2,3-dimerkaptopropanol k léčbě intoxikace arsenem a ethylendiamintetraacetát (EDTA) k léčbě intoxikace olovem. Dnes se již nepoužívají, především kvůli redistribuci toxických kovů do mozku a nežádoucím účinkům. [21]

Existuje jen málo důkazů, které by informovaly o zvýšené eliminaci kobaltu v případech podezření na protetickou kyčelní toxicitu kobaltu. V jedné studii byl popsán pacient s 506  $\mu\text{g/l}$  kobaltu, za referenční hodnotu se považuje asi 7  $\mu\text{g/l}$ , pacient byl léčen podáváním 2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonátem (DMPS). Vylučování kobaltu močí se zvýšilo a tím se snížila hladina kobaltu v séru, některé příznaky toxicity se zlepšily, ale nakonec byla



protéza odstraněna. Tato léčba může mít nežádoucí účinky jako ekzém, astma nebo nedostatek mědi a zinku. V další studii byla pacientovi podávána EDTA mezi stanovením diagnózy a odstraněním protézy. V prvních dnech se hladina kobaltu snižovala, avšak poté se opět začala zvyšovat, za příčinu se uvedlo pokračovací uvolňování kovu z kyčle a možná redistribuce. Po odstranění protézy bylo pozorováno u pacientů zlepšení až vymizení příznaků, ale neurologické potíže většinou přetrvávaly, dokonce se po několika letech rozvinula dyspnoe. [22]

V klinické praxi byla také využita výměna pomocí katetru jednoho objemu plazmy u pacienta, který byl před explantací MoM kyčelního kloubu. Využila se tu schopnost kobaltu vázat se na albumin, a tedy při terapeutické plazmatické výměně (TPE) snižovat hladiny kobaltu. Den před výměnou mu byl podáván glukonát vápenatý, který zapříčinil pokles plazmatické hladiny kobaltu a chromu, avšak ta se opět po několika hodinách vrátila na vysoké hodnoty. Při explantaci pacient ztratil asi 1litr krve a bylo mu podáno několik jednotek červených krvinek a krystaloidní roztok. Po operaci opět hodnoty kobaltu klesly, k tomu ještě dostal N-acetylcystein jako chelatační látku a infuzi. Chelatace u něj dále nebyla doporučena kvůli hypotenzi a polyurii, dokonce mu byl diagnostikován diabetes insipidus. Po několika dnech se hypotenze již neprojevovala a nebyly dále potřeba fluidní bolusy, tkáň v okolí implantátu byla relativně zdravá, a dokonce se mu mírně zlepšil zrak i sluch. Z toho můžeme usoudit, že TPE je bez odstranění MoM marná, protože dochází k rebound fenomenu, tedy ke znovu zvýšení hladin kobaltu vlivem vyrovnávání jejich hladin mezi tkání a intravaskulárním prostorem. TPE se ale v klinické toxikologii používá pouze zřídka, v tomto případě hlavně kvůli renálnímu selhání a neschopnosti vylučovat komplex chelátoru a iontu kovu. [23]

Další studie přinesly informace o chelatačních vlastnostech N-acetylcysteinu, který by mohl zachytit ionty kobaltu v systémové cirkulaci po implantaci náhrady kyčelního kloubu. U pokusů se zvířaty se zjistila jeho vyšší účinnost v porovnání se sodnou solí EDTA nebo kyselinou dimerkaptojantarovou (DMSA). Další látkou z klinické praxe je kyselina dimerkapto-1-propansulfonová (DMPS), která přinesla prokazatelně zvýšené vylučování kobaltu. [24]

Běžně se pro léčbu intoxikace železem využívá látek deferoxamin, deferipron nebo deferasirox při talasemii a penicilamin, triethylentetramin při přetížení mědi u Wilsonovy choroby.

Chelátotvorná činidla lze využívat při selektivním zaměření na inhibici nádorových buněk a mikrobu, jedná se hlavně o komplexy platiny nebo hydroxykarbamid. Mechanismem

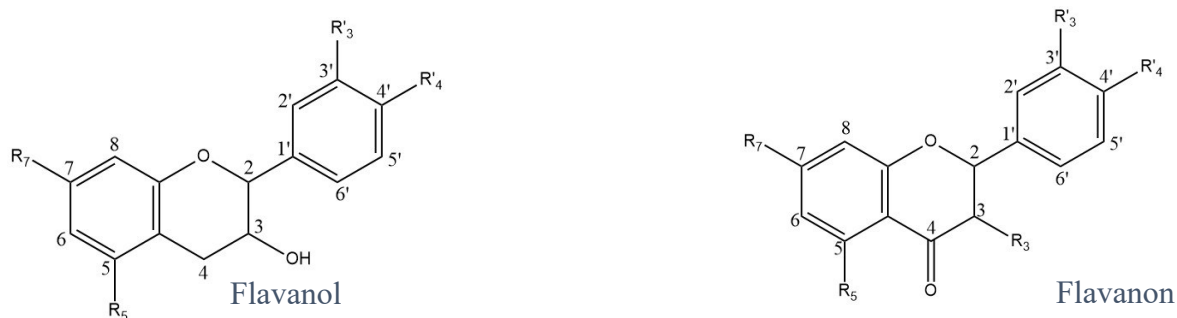
účinku je modulace funkce bílkovin, inhibice enzymů podílející se na syntéze DNA nebo narušení metabolických cest kovů a poškození lysozomů komplexy kovů. Mohly by se také používat pro úpravu funkce makrofágů nebo při ochraně před kardiotoxicitou protinádorových léků. Chelátory se dále uplatňují pro diagnostiku rakovinných nebo zánětlivých onemocnění. [25]

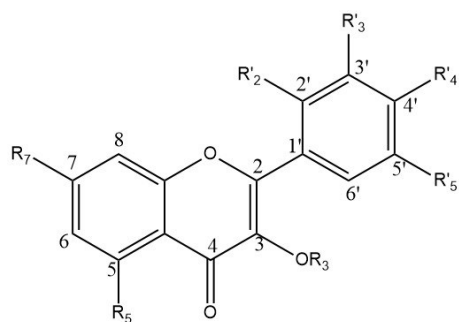
### 2.2.2 Chelatační vlastnosti flavonoidů

Flavonoidy mohou reagovat s přechodnými kovy, které mají schopnost vytvářet oxidy, buď hydrolyzou nebo odstraněním atomu kyslíku – jsou tedy oxofilní. Míra chelatace závisí na přítomnosti pyrokatecholů a kombinacích hydroxylových a karbonylových skupin v chemické struktuře flavonoidů. Proto můžeme rozlišovat flavonoidy s jedním nebo s více chelatačními místy. Jestliže ale dochází u flavonoidu k tvorbě pyrogallolů, snižuje to počet vazebných míst pouze na jedno. Stabilita komplexů je dána iontovou silou a polaritou kovů, flavonoidy vystupují jako donory elektronů a zaplňují tak volné orbitaly přechodových kovů. Vytváří se tak koordinační vazby mezi kovem a ligandem a vznikající stabilní komplex. Fenolové skupiny flavonoidů odštěpují proton, který nahrazují ionty kovů, tím se snižuje pKa fenolů a lépe probíhá chelatace, protože je účinnější při nižších hodnotách pKa. Vazba iontu kovu na polyfenol je zprostředkována oxofilní přitažlivostí kovu a atomy deprotonovaného kyslíku a zajišťuje tak vytvoření stabilního pětičlenného nebo šestičlenného kruhu. Flavonoidy mají také tendence darovat elektrony radikálům, které mají vyšší redukční potenciál a působí tak antioxidačně, což maximalizuje přítomnost katecholové skupiny, dvojně vazby v poloze 2,3, oxoskupiny v poloze 4 nebo 3,5-hydroxy skupiny. Tyto substituenty zajišťují stabilní delokalizaci elektronů. [26]

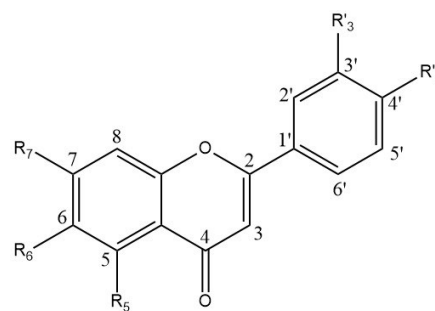
## 2.3 Flavonoidy

Flavonoidy patří do skupiny fenolických sloučenin, které mají ve své struktuře fenylobenzopyranové jádro s uhlíkatým skeletem připojeném na chromanovém jádře, vlastníci alespoň jednu hydroxylovou skupinu. Dělí se do několika skupin: antokyany, flavanoly, flavanony, flavonoly, flavonony, isoflavony a chalkony. (obr. 2) [27]

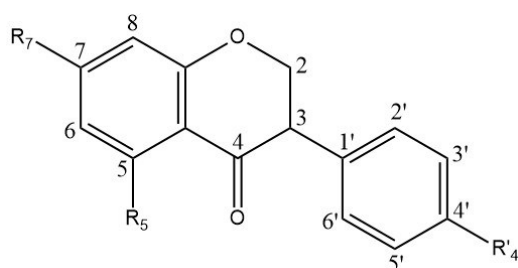




Flavonol



Flavon



Isoflavon

Obrázek 2 – Chemické struktury některých základních skupin vytvořené v programu ChemDraw

O jejich používání se traduje již od starověkého Řecka, kde je Hippokratés využíval pro jejich antimikrobiální vlastnosti k léčbě vředů a periodontálních abscesů. [28] K jejich izolaci z citrusů došlo až ve 20. století, kdy byly nazvány jako vitamín P.

### 2.3.1 Výskyt v přírodě

Flavonoidy se ve velkém množství nacházejí v ovoci, zelenině, červeném víně, černém čaji nebo v sóje. V rostlinách jsou nositelem barvy, vůně nebo chuti a svými biologickými vlastnostmi podporují lidské zdraví a pomáhají snižovat riziko onemocnění. [29] Jsou to sekundární metabolity rostlin, které vznikají hlavně fenylypropanovou cestou z aminokyseliny fenylyalaninu. Vyskytují se jako aglykony, ale častěji ve formě glykosidů s glukosou, galaktosou, arabinosou nebo rhamnosou. V rostlinách ovlivňují fyziologické procesy související s růstem a vývojem, včetně buněčného dělení, klíčení semen a tvorby fotosyntetických pigmentů. Hromadění fenolických látek v těle rostlin je dáno setkáním s abiotickými stresory jako je sucho, teplo, chlad, toxické těžké kovy a ultrafialové záření pro ochranu rostliny před těmito faktory. Tyto stresory ovlivňují homeostázu a nadměrnou tvorbu ROS a reaktivních forem dusíku (RNS), které poškozují membrány a orgány. Flavonoidy svými antioxidačními vlastnostmi vycítávají volné radikály a chrání rostlinu před oxidačním stresem. [30]

### 2.3.2 Antioxidační aktivita

Oxidační stres nastává při nerovnováze mezi produkcí ROS a antioxidantů, vede k ovlivnění DNA, proteinů, sacharidů a lipidů. Tyto volné radikály ale nemusejí být vždy škodlivé, pokud jsou správně ovládány, mohou se chovat jako intracelulární poslové. Nicméně ve většině případů způsobují denaturaci bílkovin, mutaci DNA, rakovinné bujení, osteoartrózu nebo kardiovaskulární onemocnění.

Flavonoidy využívají několik možností reakce s volnými radikály. Patří sem zhášení volného radikálu, kdy mechanismem účinku je přímé odstranění kyslíkových radikálů poskytnutím atomu vodíku nebo transfer elektronu. Dále chelatace kovů, potlačování enzymů, které se váží na radikály, jako jsou xantinoxidasa, lipoxygenasa, nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) oxidasa a další anebo stimulace enzymů, které působí antioxidačně. Hydroxyskupiny (OH skupiny) v chemické struktuře flavonoidů jsou hlavními donory atomů vodíku za vzniku relativně stabilního fenoxylového radikálu, proto počet OH skupin ovlivňuje antioxidační aktivitu. [31]

### 2.3.3 Protizánětlivá aktivita

Protizánětlivé působení flavonoidů spočívá v inhibici regulačních enzymů především kinas, které jsou zahrnuty v několika kaskádách, a fosfodiesteras jako je cAMP foafodiesterasa. Zablokováním degradace cAMP, jako sekundárního posla, se zvýší jeho koncentrace vedoucí k protizánětlivé odpovědi. Blokace zánětu je umožněna také transkripční faktorů imunitního systému jako je nukleární faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), který se váže na RNA polymerasu a řídí expresi genů důležitých pro zánětlivou reakci. Flavonoidy ovlivňují metabolismus kyseliny arachidonové, inhibují syntézu prostaglandinů, tromboxanu a leukotrienů, mohou snížit uvolnění histaminu a prostaglandinů z mastocytů a zabraňují funkci T lymfocytů. [32]

### 2.3.4 Kardioprotektivní účinky

Flavonoidy ovlivňují produkci oxidu dusnatého (NO), který je důležitý pro dilataci cév, adhezi trombocytů a krevní srážlivost. Svými antioxidačními vlastnostmi snižují tvorbu volných radikálů a působí vazoprotektivně. Některé studie dokonce potvrzují, že přiměřená konzumace červeného vína by mohla snížit riziko kardiovaskulárních onemocnění – chránit před aterosklerózou a ischemickou chorobou srdeční, snižovat krevní tlak. [33]

Flavonoidy, hlavně v hroznovém víně, snižují oxidaci LDL cholesterolu a tím brání jeho usazování v cévách. Přesný mechanismus není znám, ale nejspíše se jedná o inhibici tvorby volných radikálů nebo ochranu oxidace alfa-tokoferolu, čímž oddalují začátek peroxidace

lipidů. Díky volným radikálům jsou nenasycené mastné kyseliny v buněčných membránách oxidovány, probíhá peroxidace lipidů a v konečném důsledku rakovinné bujení. [33]

### 2.3.5 Ovlivnění inzulínové rezistence

Metabolický syndrom může vzniknout při incidenci rizikových faktorů jako je obezita, inzulínová rezistence, dyslipidémie nebo hypertenze. Flavonoidy ze zeleného čaje, jako je epigallokatechin gallát, snižují inzulínovou rezistenci svými antioxidantními vlastnostmi. Stimulují uptake glukosy v adipocytech pomocí translokace GLUT 4 a inhibují tumor nekrotizující faktor (TNF) alfa. Flavonoidy z hroznového vína snižují hyperglykémii a hyperinzulinémii a zvyšují mRNA expresi adiponektinu, proteinu, který potlačuje tvorbu volných radikálů. Flavonoidy mohou také chránit beta buňky před apoptózou, jako antioxidanty působí proti volným radikálům a peroxidaci lipidů a mohou tak ovlivňovat sekreci inzulínu. [34]

### 2.3.6 Flavonoidy a neurodegenerativní onemocnění

Flavonoidy mají neuroprotektivní účinky, jako antioxidanty zabraňují oxidačnímu stresu neuronů, ale hlavně inhibují NADPH oxidasu a následné vytvoření ROS. Díky sníženému uvolňování cytokinů a downregulaci protizánětlivých transkripčních faktorů mají schopnost potlačit prozánětlivou reakci neuronů. Mohou také modulovat signální dráhy buněk, působí hlavně na proteinkinasy, jako jsou fosfatidylinositol-3-kinasa (PI3K), proteinkinasa regulovaná extracelulárním signálem (ERK1/2) a proteinkinasa C (PKC). [35]

#### 2.3.6.1 Parkinsonova choroba (PD)

PD je charakterizována selektivní degenerací dopaminergních neuronů v substantia nigra, což vede ke snížení dopaminu ve striatu, projevující se jako bradykineze, svalový třes, rigidita svalového tonu a další. Flavonoidy aktivací PKC inhibují expresi genů indukovanou 6-hydroxydopaminem (6-OHDA), který je jednou z molekul, ta způsobuje degeneraci dopaminergní dráhy a hromadí se v cytosolu. Používá se jako jeden z modelů pro navození parkinsonismu u laboratorních zvířat pro testování nových léků. [35,36]

Rizikovým faktorem pro rozvinutí PD je malnutrice – velmi častá v pozdějším věku života, kvůli které dochází ke změně složení a kolonizaci mikrobů ve střevech. Dle preklinických studií na myších bylo prokázáno, že bakterie ovlivňují rozvoj úzkostí, paměť, schopnost učit se a motoriku. Spolu s malnutricí dochází k rozvoji zánětu střev, následně ke gastrointestinální dysfunkci a idiopatické zácpě. Pokles počtu bakterií znamená zvýšení

propustnosti sliznic střev a může vést k tvorbě toxinů. Příjem flavonoidů v potravě by tedy mohl být do budoucna klíčem pro zlepšení kvality života a snížení rizikových faktorů PD. [37]

#### 2.3.6.2 Alzheimerova choroba (AD)

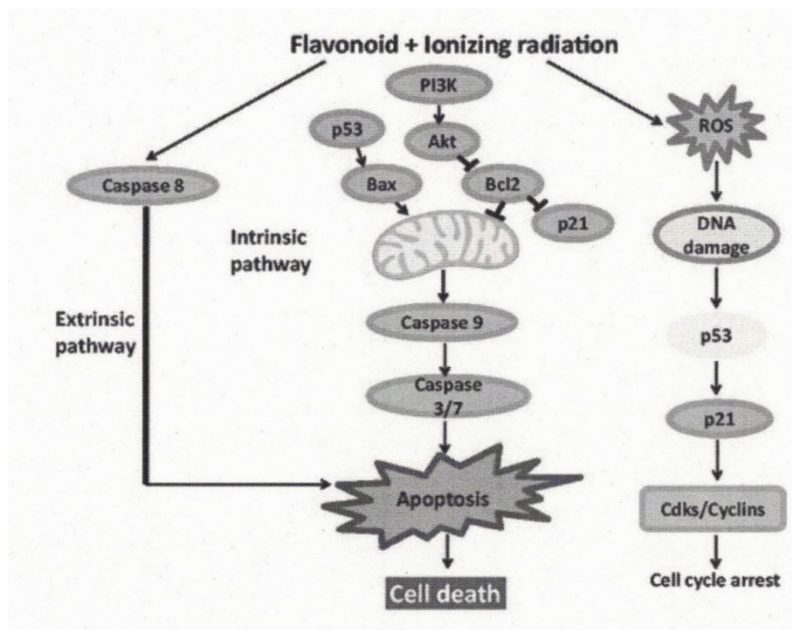
Alzheimerova choroba se vyznačuje nadbytkem amyloidních beta fibril ( $A\beta$ ) a tau proteinu v mozku, které vedou ke snížení počtu neuronů. Flavonoidy, konkrétně podskupina anthokyaniny, se dokážou svojí chemickou strukturou začlenit do rýhy amyloidního beta fibrilu a snížit tak neurodegeneraci. To bylo zjištěno v preklinických studiích na myších. [38]

Pokles acetylcholinu v synapsích souvisí s rozvojem demence, proto se v léčbě používají inhibitory acetylcholinesteras. Na základě výsledků ze studií byla u některých flavonoidů zaznamenána tato aktivita. Podobně jako u PD se flavonoidy v potravě využívají jako nutraceutika pro snížení rozvoje demence a osídlení střev mikrobioty. Bývají někdy upravovány do podoby polymerních nanočástic, které lépe prochází hematoencefalickou bariérou a mohou se tak užívat jako účinné látky v léčbě AD. [39]

#### 2.3.7 Protinádorová aktivita

Flavonoidy přijímané potravou mohou ovlivňovat mnoho biochemických drah podílejících se na karcinogenezi. Za normálních podmínek působí jako antioxidanty, ale u rakovinných buněk působí i jako prooxidanty, způsobují apoptózu, nekrózu, inhibují proliferaci signalizačních cest nebo způsobují supresi prozánětlivých cytokinů. Rozeznáváme dvě kaskády apoptózy, kde působí flavonoidy: vnější, která ovlivňuje TNF a kaspázu 8 a vnitřní mitochondriální cestu, aktivující kaspázu, 9, 3, 7 pomocí proteinů Bcl-2. Obě vedou k inhibici exprese onkogenních genů v nádorových buňkách a k jejich naprogramované smrti. (obr. 3) [40]

Při léčbě rakoviny se využívá metoda zvaná radioterapie, kdy zářením vznikají ROS, které poškozují buněčné membrány a DNA. Tento signál se přenáší na proteiny (např. p53), které mění aktivitu jiných genů a dochází tak k zástavě buněčného cyklu. [41]



Obrázek 3 - Buněčné dráhy ovlivněné flavonoidy a radiací, kde lze vidět vnější (extrinsic) a vnitřní (intrinsic) kaskádu.

### 2.3.8 Farmakokinetika flavonoidů

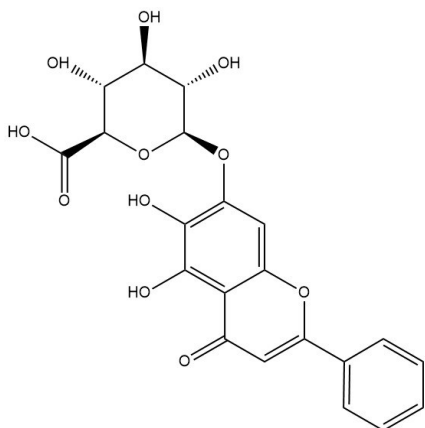
Flavonoidy, které člověk přijímá perorálně jsou v tenkém střevě hydrolyzovány na aglykony, které pomocí difuze vstupují do buněk a jsou konjugovány enzymy druhé fáze metabolismu. Intracelulárně konjugované metabolity jsou přenášeny do trávicího traktu. Flavonoidy obsahující katechol, hlavně kvercetin, jsou methylovány v tenkém střevě a játrech. Metabolity, které vznikly glukuronidací byly nalezeny v lymfě a další v krvi, což naznačuje, že flavonoidy z potravy se v těle transportují pomocí lymfatického systému a zejména pomocí portální žíly. Při porovnání perorálního a intravenózního podání flavonoidů bylo prokázáno nižší množství při perorálním podání. A proto metabolity druhé fáze metabolismu mají nižší především protinádorové účinky. Tyto účinky jsou velmi závislé na koncentraci přítomné v krvi. I když se flavonoidy nevstřebávají v tenkém střevě, mohly by se dostat do tlustého střeva, kde by je metabolizovaly enterobakterie na jejich aglykony. Dále bylo zjištěno, že radioaktivně značený kvercetin podávaný potkanům byl nejvíce přítomen v gastrointestinálním traktu v porovnání s okolními tkáněmi, z čehož lze usuzovat, že flavonoidy se nekumulují v orgánech. Proto zvýšení akumulace v cílovém orgánu by mohlo přispět k prevenci karcinogeneze. [42]

Přenos metabolických cest flavonoidů do mikroorganismů jako je *Escherichia coli* nebo *Saccharomyces cerevisiae* se dnes využívá v metabolickém inženýrství. Konstruují se tak enzymatické kaskády *in vivo*, které nepotřebují přidávat meziproducty a vytvářejí se tak flavonoidy přímo v mikroorganismech. Bohužel je velmi složité dosáhnout dostatečného

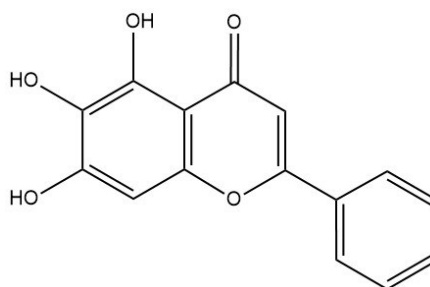
množství flavonoidů. Dále se využívá tzv. bezbuněčných systémů, které pomáhají vytvářet biosyntetické dráhy *in vitro*, díky kterým může substrát difundovat přes buněčnou membránu a kontrolovat reakční podmínky a např. koncentraci substrátu nebo kofaktoru. To se dnes ale moc nevyužívá kvůli velice nákladné syntéze bílkovin *in vitro*. [43]

### 2.3.9 Jednotliví zástupci flavonoidů z experimentálního měření

#### Baikalin a baikalein



Obrázek 4 – Chemická struktura baikalinu (5,6-dihydroxy-2-fenyl-4H-1-benzopyran-4-on-7-O- $\beta$ -glukuronová kyselina)



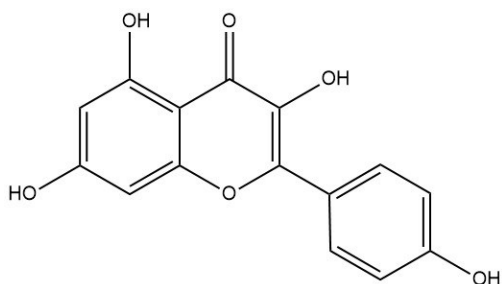
Obrázek 5 – Chemická struktura baikaleinu (5,6,7-trihydroxyflavon)

Baikalein je aglykonem baicalinu, oba jsou izolovány z rostlin rodu *Scutellaria* z čeledi Lamiaceae, nejznámější z nich je *Scutellaria baicalensis*. Tyto rostliny jsou pěstovány především v Asii – Číně, Vietnamu, Japonsku a dalších zemích. Největší koncentrace flavonoidů byla nalezena v kořenu: baicalinu v množství 10 % a baikaleinu 5 %. Patří do skupiny flavonů, které vznikají z flavanonů zavedením dvojné vazby mezi atomy C2 a C3 a odběrem dvou atomů vodíku. Reakce je katalyzována enzymem flavonsyntasa II, která je součástí cytochromu P450. [44, 45]

Rostliny se používaly již v tradiční čínské medicíně, především na zánětlivá onemocnění, infekce dýchacích cest, krvácení nebo hypertenzi. Pro zvýšení syntézy flavonů se používá bakterie *Agrobacterium rhizogenes*, díky které se tvoří chlupaté kořenové vlásky. Dnes se ale spíše klade důraz na moderní technologie sekvenování genů, které mohou být také regulátory produkce flavonoidů. [46]



## Kempferol

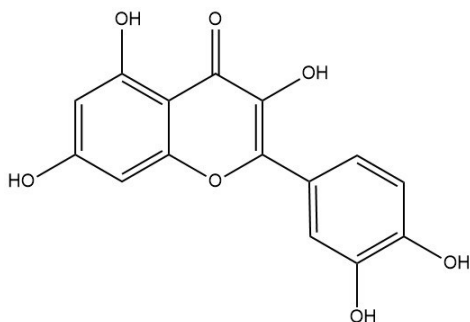


Obrázek 6 – Chemická struktura kempferolu (3, 5, 7-trihydroxy-2(4-hydroxyfenyl) chromen-4-on)

Kempferol patří do skupiny flavonolů, které jsou nejrozšířenější a nejaktivnější z flavonoidů. Vyskytují se ve velkém množství rostlin, ovoce a zeleniny, hlavně v čaji, brokolici, jablkách, jahodách nebo fazolích a mají nejširší škálu účinků. Nejvíce z nich je diskutovaný protinádorový účinek, kdy kempferol nevykazuje toxicitu na ostatní buňky jako při klasické chemoterapii. V uplynulých letech bylo z výsledků studií zachyceno spojení nadměrného množství přijatých flavonolů a rizika mozkové mrtvice, to však bylo posledními studiemi vyvráceno a dokonce zjištěno, že toto riziko snižují. [47]

Jako nejvyužívanější cesta pro izolaci kempferolu byla využita enzymatická hydrolýza za vzniku glykosidů kempferolu z čajových semen, které byly extrahovány pomocí organických rozpouštědel. Byla to ale metoda velmi časově náročná, pracovalo se s velkými objemy a nebezpečnými rozpouštědly. Proto se dnes používá tzv. superkritická fluidní extrakce, která nevede ke ztrátě nebo rozkladu cílových sloučenin, pracuje s oxidem uhličitým jako rozpouštědlem netoxickým, nehořlavým a snadno oddělitelným od extraktu. [48]

## Kvercetin

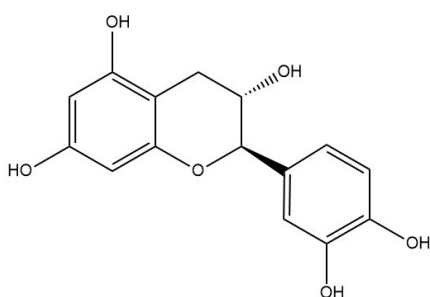


Obrázek 7 – Chemická struktura kvercetinu (2-(3,4- dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-on)

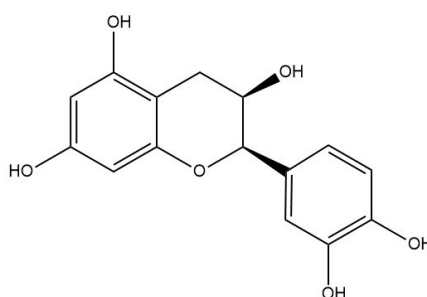
Kvercetin řadíme do podskupiny flavonolů, díky své lipofilní povaze aglykonu je dobře absorbován přes fosfolipidovou dvojvrstvu ve střevních buňkách pomocí difuze. Ve své glykosidické formě obsahuje hydrofilní monosacharid, který je absorbován do cytosolu střevních buněk pomocí sodíko-glukosového kontransportéru (SGLT – 1). Poté je rozštěpen pomocí  $\beta$  glukosidas a probíhá glukuronidace, sulfatace nebo methylace a transport do krve. Bylo zjištěno, že se váže na plazmatické proteiny, proto se snižuje jeho biologická dostupnost v buňkách. Kvercetin se obecně nachází hlavně v orgánech, kde probíhá metabolismus a exkrece, což jsou střeva a játra. Vylučování probíhá velmi pomalu, odhadovaný poločas je až 28 hodin. Je přítomen např. v jablkách, rajčatech, cibuli, čaji, ořechách, ale také ve farmaceuticky významných rostlinách jako je *Ginkgo biloba*, *Sambucus canadensis* nebo *Hypericum perforatum*. Ve studené vodě je zcela nerozpustný, sráží se do podoby žlutých krystalů. Je špatně rozpustný v teplé vodě, ale v alkoholu a tucích se rozpouští dobře.

V několika studiích se zvířaty a poté s lidmi bylo zjištěno, že perorální podávání větších dávek kvercetinu v několika týdnech vede ke snížení systolického a diastolického tlaku, dokonce i u lidí s metabolickým syndromem. Jednalo se o zkoušky randomizované, dvojité slepé a zkřížené. Zjistilo se, že flavonoid způsobí vyplavení acetylcholinu a tím relaxaci cév a také reguluje celkový objem krve v závislosti na objemu tělesných tekutin a zmírňuje kontrakci vyvolanou noradrenalinem. K vazodilataci přispívá mimo jiné také zvýšená produkce NO. Navíc působí na renin angiotenzin aldosteronový systém – pomocí snížení exprese mRNA angiotenzin konvertujícího enzymu blokuje jeho aktivitu. [49, 50]

### Katechin a epikatechin



Obrázek 8 – Chemická struktura katechinu ((2R, 3S)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3, 5, 7-triol)

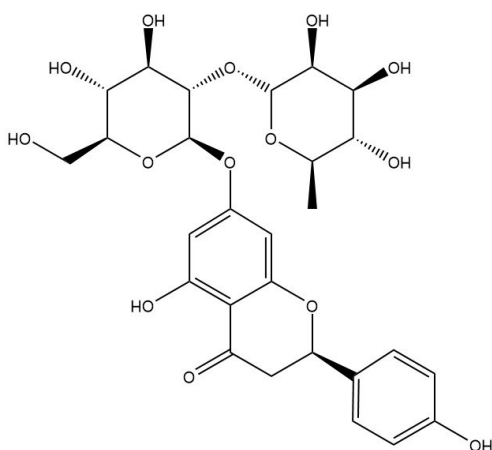


Obrázek 9 – Chemická struktura epikatechinu ((2R, 3S)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3,5,7-triol)

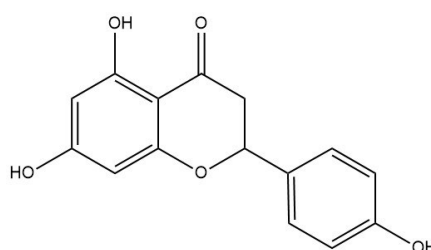
Katechin byl pojmenován podle *Acacia catechu*, protože z ní byl prvně izolován. Nejvíce se nachází v čaji, jablkách, hroznech nebo v bobulích. [51] Připojuje se na cílovou strukturu pomocí farmakoforu – katecholová skupina na kruhu B a resorcinol na kruhu A. Bylo prokázáno, že tyto kruhy lze elektrochemicky oxidovat. Začíná se v B kruhu, tedy tam, kde je nižší redoxní potenciál, odkud se elektron přenáší do kruhu A. Mechanismus oxidace se porovnával při různých pH, kdy bylo zjištěno, že při vyšším pH vznikaly produkty, které se snadno oxidují, tedy mají dobré antioxidační vlastnosti. [52]

Katechin a epikatechin jsou dva stereoizomery, kdy epikatechin je v *cis* konfiguraci. Nejvíce se nachází v kakaových bobech a je jednou z bioaktivních složek, které přináší benefity pro vaskulární systém. Bylo zjištěno, že s vyšší suplementací epikatechinu se vytváří více mitochondrií v tkáních, a to podporuje oxidativní fosforylaci v elektronovém transportním řetězci a moduluje mitochondriální dýchání. [53]

### Naringin a naringenin



Obrázek 10 – Chemická struktura naringinu ((2S)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-5-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on)

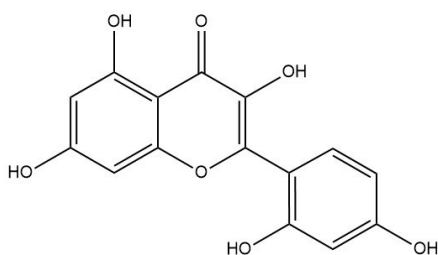


Obrázek 11 – Chemická struktura naringenu (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on)

Naringin patří do skupiny flavanonů, jedná se o glykosid. Aglykonem je naringenin a cukernou složku představuje disacharid neohesperidosa. V rostlinách *Citrus aurantium*, *Citrus medica*, *Drynaria fortunei* a dalších citrusových plodech se nachází jako hlavní složka. Pro jeho izolaci se využívá extrakce pomocí methanolu, separace a čištění. Naringin se využívá mimo jiné pro reparaci kostí, zvyšuje hustotu kostního minerálu a pevnost kostí a inhibuje vylučování vápníku močí. U potkanů byl prokázán účinek podobný statinům, tedy snižování hladiny lipidů. [54]

Naringenin, tedy flavanon, obsahují hlavně citrusové plody, rajčata nebo také *Ficus carica*. Vzniká z naringinu pomocí hydrolyzy a je důležitým meziproduktem v biosyntéze flavonoidů. Klinické testování naringenu je zatím pouze v začátcích, protože je molekula relativně chemicky nestabilní a její izolace a čištění potřebuje vysoké náklady. Nicméně z některých studií vyplývá, že spolu s dalšími flavonoidy zrychluje metabolismus a dokáže pomocí termogenního účinku snižovat hmotnost hlavně u obézních lidí. [55]

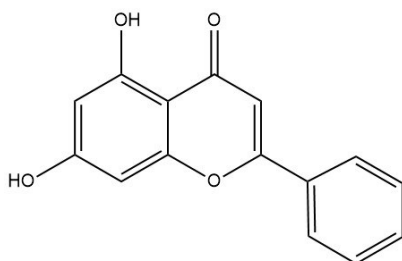
### Morin



Obrázek 12 – Chemická struktura morinu (2-(2,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-on)

Morin je flavonol vyskytující se v několika rostlinách, zejména v čeledi Moraceae – *Morus alba*. Potencuje inhibiční aktivitu xantinoxidasy, má pleiotropní účinky na signální dráhy s kinasami, modifikuje strukturu enzymů a inhibuje degranulaci mastocytů, tím snižuje vyplavování IgE a cytokinů a potenciálně by se mohl používat u pacientů s alergickým zánětem v dutině nosní. [56] Morin a kvercetin jsou si navzájem izomery, mají tedy podobnou biologickou aktivitu, avšak rozdíly v B kruhu ovlivňují jejich farmakokinetiku po perorálním podání. Zatímco metabolity kvercetinu jsou přítomny pouze v centrální kompartmentu, morin koexistuje se svými metabolity. [57]

### Chrysin

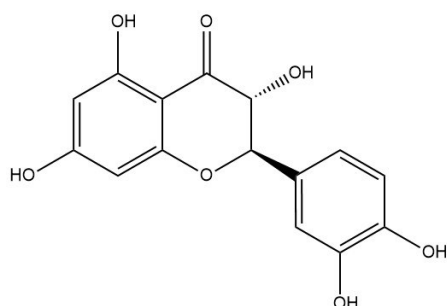


Obrázek 13 – Chemická struktura chrysinu(5,7-dihydroxy-2-fenylchromen-4-on)

Flavon chrysin je nejvíce obsažen v medu, propolisu nebo také v rostlině z čeledi Passifloraceae – *Passiflora caerulea*. Ta roste hlavně v tropických oblastech Jižní Ameriky, vzácněji poté v Asii nebo Austrálii. Působí hepatoprotektivními a antihyperlipidickými účinky,

kteře jsou dokonce srovnatelné se simvastatinem, snižuje hladinu triglyceridů, mastných kyselin, cholesterolu a lipoproteinu C. Podobně jako morin snižuje alergický zánět dýchacích cest degranulací žírných buněk. Byl zjištěn jeho účinek na GABA (gama-aminomáselná kyselina) receptory a tím jeho anxiolytický účinek, kterým se vyznačuje např. *Passiflora incarnata*. Pokud se chrysin přijímá potravou ve větším množství, než je doporučená denní dávka, což představuje asi 500 µg, působí toxicky. Chrysin se oxiduje, tím se snižuje tvorba DNA *de novo* a snižuje počet buněk. [58]

### Taxifolin

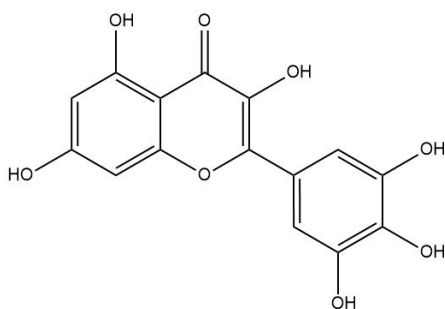


Obrázek 14 – Chemická struktura taxifolinu((2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxy-2,3-dihydrochromen-4-on)

Tento flavanon byl poprvé izolován z *Pseudotsuga taxifolia*, poté z *Larix sibirica*, *Larix dahurica* a *Larix gmelinii*. Patří do skupiny důležitých suplementů, je součástí některých komerčních přípravků pro léčbu hemoroidů nebo chronické žilní nedostatečnosti. Jeho vzorec je velmi podobný kvercetinu, který má v kruhu C navíc jednu dvojnou vazbu. [59]

Mimo hlavní účinky flavonoidů byla u taxifolinu pozorována i antipsoriatická aktivita. Jedná se o onemocnění kůže, při kterém bylo zjištěno, že taxifolin dokáže inhibovat transkripční faktory a pozastavit proliferaci buněk anebo zmírňovat již započatou psoriázu. Dále u něj byla zjištěna schopnost snižovat kyselinu močovou v hepatocytech a snižovat aktivitu xantinoxidasy a zabránit tak manifestaci dny. [60]

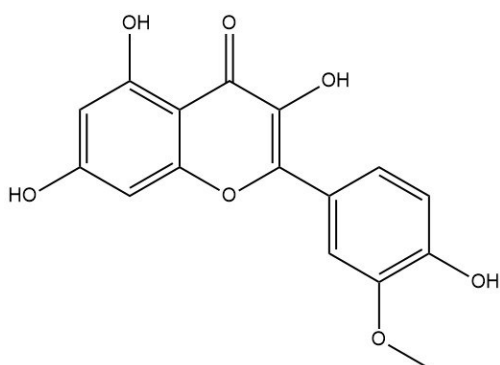
## Myricetin



Obrázek 15 – Chemická struktura myricetinu (3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyfenyl)chromen-4-on)

Myricetin obsahuje několik OH skupin, nazývá se proto polyhydroxyflavonol a má velký potenciál pro antioxidační aktivitu. Nejvíce se nachází v čeledích Myricaceae, Ericaceae, Vitaceae, Fagaceae a dalších. V ovoci a zelenině se vyskytuje jako glykosid. Poprvé byl izolován z kůry *Myrica rubra*. Ovlivňuje metabolismus cukrů a tuků, dokáže snižovat riziko obezity a vykazuje inzulínovou rezistenci. Pracuje hlavně přes jaderný receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem (PPAR $\gamma$ ) a vazebné proteiny. Zvyšuje minerální hustotu kostí, inhibuje blokádu alkalické fosfatasy a osteokalcinu a chrání tak před diabetickou osteoporózou. V nedávných studiích byl navržen jako potenciální sloučenina, která by mohla být nápomocná v léčbě onemocnění Covid – 19, ale to vyžaduje další zkoumání. [61]

## Isorhamnetin

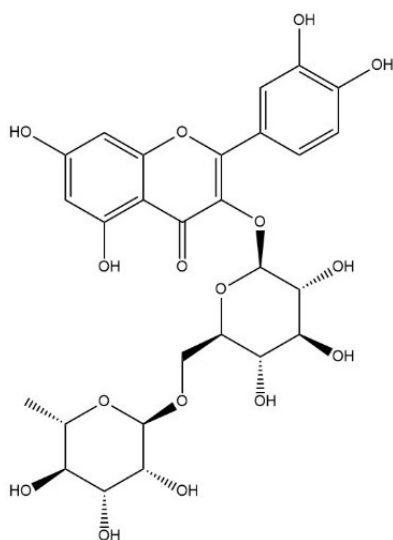


Obrázek 16 – Chemická struktura isorhamnetinu (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)chromen-4-on)

Isorhamnetin se nejvíce nachází v rostlinách *Hippophae rhamnoides* z čeledi Elaeagnaceae a *Ginkgo biloba* z čeledi Ginkgoaceae, kde společně s kvercetinem a kempferolem tvoří nejvýznamnější zástupce flavonů. Dále se vyskytuje v jablkách, hruškách nebo třešních a ostružinách. Vedle protizánětlivé a antioxidační aktivity u něj byla zkoumána schopnost inhibovat růst *Mycobacterium tuberculosis*. Je proto molekulou, která má relevantní

biologický účinek proti některým kmenům mykobakterií a možný antituberkulózní účinek, který byl také zkoumán u jeho izomerů tamarixetinu a kvercetin. Nicméně isorhamnetin vykazoval tento účinek nejvyšší díky svému log P, protože buněčná stěna mykobakterií obsahuje lipidy a je tak pro hydrofilní sloučeniny jako je kvercetin nepropustná. A dále díky přítomnosti methoxy skupiny v poloze 3 v kruhu B, která zvyšuje stabilitu a účinnost. Vzhledem k výsledkům studie, by mohl být isorhamnetin prezentován jako doplněk stravy pro prevenci tuberkulózy. [62]

### Rutin



Obrázek 17 – Chemická struktura rutinu (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxochromen-4-on)

Rutin je glykosidem kvercetin, obsažen v několika druzích rostlin, kdy za zmínku stojí *Fagopyrum esculentum* z čeledi Polygonaceae jako hlavní zdroj, *Ruta graveolens* (Rutaceae), *Sophora japonica* (Fabaceae) nebo *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae). Mezi hlavní nevýhody rutinu můžeme zařadit nízkou rozpustnost ve vodě, nízkou stabilitu, omezenou propustnost membrán a tím špatnou biologickou dostupnost, prakticky se nevyužívá pro lokální aplikaci. Proto byl rutin připraven ve formě lyofilizovaných nanokrystalů, což zlepšilo rozpustnost nebo enkapsulován do substituentů cyklodextrinu. Dále se také využívá začlenění hydroxyethylových skupin. Pro extrakci rutinu z přírodních zdrojů se využívají konvenční i inovativní metody. Tzv. Soxhletova extrakce nese několik nevýhod kvůli vysokým teplotám, které způsobují rozklad sloučeniny a velké množství spotřebovaných organických rozpouštědel. Jako nejvhodnější se jeví ethanol, methanol, aceton nebo diethylether. Mezi novější metody, ze stále se rozvíjející „zelené chemie“, se řadí technologie založené na

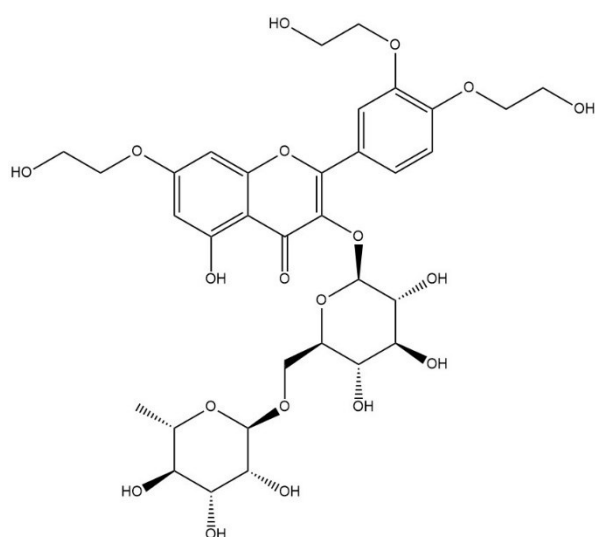
infračerveném záření, mikrovlnné energii, enzymové extrakci nebo ultrazvuku. Používají se také jiná rozpouštědla, jako jsou iontové kapaliny nebo eutektická rozpouštědla. Tato technika přináší výhody v podobě šetrnosti k životnímu prostředí, nízkého objemu rozpouštědel nebo rychlosti. [63]

Pro stanovení obsahu flavonoidů v rostlinných extraktech se využívá tzv. kolorimetrická metoda. Je založena na schopnosti vytvářet komplexy flavonoidu s chloridem hlinitým. Dále se využívá tenkovrstvá chromatografie. Pomocí metod kapalinové chromatografie, plynové chromatografie nebo kapilární elektroforézy a dalších lze identifikovat a kvantifikovat příslušné flavonoidy. [63]

Oxerutiny neboli hydroxyethylrutosidy se získávají hydroxylací rutinu a slouží k léčbě chronické žilní nedostatečnosti nebo hemoroidů. Tyto polysyntetické flavonoidy zvyšují tonus žilní stěny, tím zvyšují kapilární rezistenci, zmenšují průsvit postižených žil a následně snižují tvorbu edému a působí protizánětlivě. [63]

Pro své antioxidační vlastnosti je využíván v dermatologii k zamezení vnitřního stárnutí, které se projevuje vráskami, tenkou a suchou pokožkou, šedivěním a vypadáváním vlasů, což je způsobeno nahromaděním volných radikálů a sníženou schopností opravovat poškození DNA kožních buněk v pokročilém věku. [64]

### Trihydroxyethylrutin

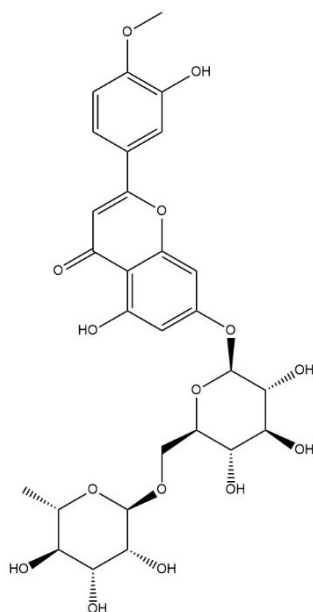


Obrázek 18 – Chemická struktura trihydroxyethylrutinu (2-[3,4-bis(2-hydroxyethoxy)fenyl]-5-hydroxy-7-(2-hydroxyethoxy)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-on)



Trihydroxyethylrutin neboli troxerutin či vitamín P4 je derivátem rutinu, který najdeme v kávě, čaji, obilovinách, zelenině a ovoci. Byl izolován ze *Styphnolobium japonicum*, syn. *Sophora japonica* (Fabaceae). Patří do skupiny flavonoid-3-*o*-glykosidů, tedy v pozici C3 je substituován cukernou složkou. Protože obsahuje hydroxyethyl skupiny je více rozpustný ve vodě než rutin, významně je absorbován gastrointestinálním traktem a má tak lepší biologickou dostupnost. Využívá se při léčbě hemoroidů pro ochranu endoteliálních buněk. Byl u něj prokázán renoprotektivní účinek, který zlepšil glomerulární filtraci, snížil hladinu albuminu a kreatinu v moči. Také snižuje fyzickou únavu, byl podáván samecům potkanů, kteří byli podrobeni vyčerpávajícímu plaveckému testu a poté u nich byly změřeny biochemické parametry: zvýšila se hladina glukosy a SOD a snížila aktivita kreatinkinasy a LDH (laktátdehydrogenasa). Acylované deriváty jako monoester nebo diester troxerutinu prokázaly vyšší lipofilitu a tím biologickou dostupnost a antioxidační aktivitu. [65]

### Diosmin



Obrázek 19 – Chemická struktura diosminu (5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxochromen-4-on)

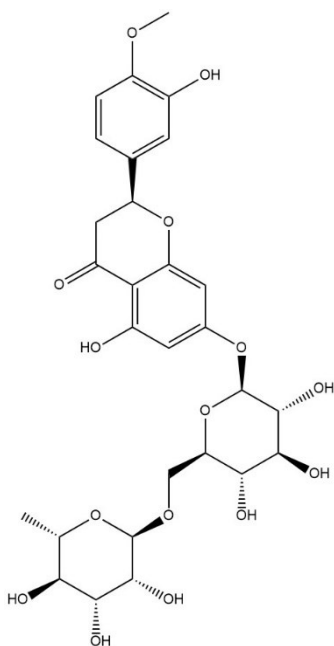
Diosmin je flavonoidní glykosid, který lze získat z hesperidinu. V praxi je obsažen v mikronizované čištěné flavonoidní frakci (MPFF), které je mechanicky snížen průměr pevných částic, což zlepšuje vstřebávání ve střevě, a která je složená z 90 % diosminu a 10 % hesperidinu. MPFF se využívá k léčbě křečových žil a chronické žilní nedostatečnosti, která se projevuje otoky, bolestí, svěděním nebo pocitem těžkých nohou. Pacientům zlepšuje tyto symptomy a také zvyšuje jejich kvalitu života. Bylo prokázáno, že flavonoidy modulují

noradrenergní dráhu a tím zvyšují tonus žilní stěny. Srovnatelné klinické účinky má užívání 1000 mg MPFF jednou denně a užívání nemikronizovaného diosminu v dávce 600 mg jednou denně. [66]

Vyšší ionizační konstanta diosminu vyjadřuje jeho sníženou schopnost prostupu buněčnou membránou a rozpustnost ve vodě. To je řešeno využitím diosminových nanočástic. Po podání je pomocí enzymů hydrolyzován na aglykonovou formu diosmetin, který se dobře absorbuje do systémové cirkulace, ale jeho množství není nijak výrazné. Proto se využívá i aktivního transportu. Mezi hlavní metabolity v lidské plazmě patří glukuronidované deriváty.

Diosmin byl izolován z listů *Premna integrifolia* (Verbenaceae), která snižuje toxicitu aflatoxinu. Zmírňuje oxidační stres a chrání játra. Také se nachází v *Citrus* sp. (Rutaceae). [67]

### Hesperidin



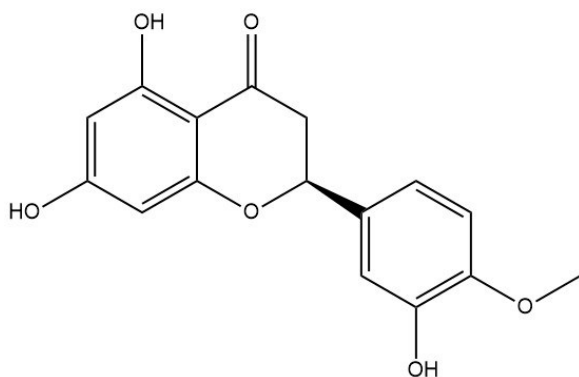
Obrázek 20 – Chemická struktura hesperidinu ((2S)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrochromen-4-on)

Hesperidin se hojně vyskytuje v citrusových plodech: v citronu, pomeranči, limetce nebo grapefruitu, dále v *Mentha x piperita* (Lamiaceae) a v *Porphyra dentata* (Bangiaceae). Jeho nejvyšší obsah je v kůře citronu, ale extrakcí methanolem se z citronových semen dostane více hesperidinu než ze slupky. Nezralé citrusy mohou obsahovat více hesperidinu než ty zralé. Označuje se také jako hesperetin 7-*o*-glykosid, ve vodě se téměř nerozpouští, ale v organických rozpouštědlech propylenglykolu nebo v polyethylenglykolu ano. Podává se jak lokálně, tak

systemově, společně s diosminem tvoří MPFF. Přináší dobré výsledky v léčbě kardiovaskulárních chorob, diabetu mellitu, neurodegenerativních onemocnění a rakoviny. Aplikace na kůži urychluje obnovu bariéry, inhibuje tvorbu melaninu v melanocytech a bělí tak kůži. Urychluje hojení ran hlavně u diabetiků nebo pacientů s žilním onemocněním. [68]

Nedávné studie potvrdily spojitost mezi hesperidinem a onemocněním Covid-19. Hesperidin má schopnost se vázat vodíkovými vazbami s několika aminokyselinami klíčových proteinů viru s nízkou vazebnou energií, tím vytváří silnou a specifickou vazbu a inhibuje tak virové proteasy. Ze všech zkoušených přírodních látek s antivirovým účinkem se hesperidin jevil jako nejlepší. [69]

### Hesperetin

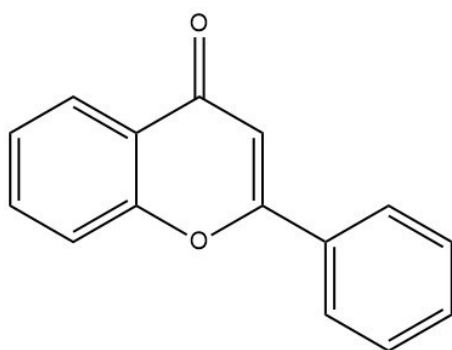


Obrázek 21 – Chemická struktura hesperetinu ((2S)-5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on)

Aglykon hesperidinu se nazývá hesperetin, nachází se také nejvíce v citrusech, např. v *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium* (Rutaceae). Jeho biologické účinky jsou velice podobné hesperidinu. Za zmínku stojí jeho snížení výskytu nádorů v tlustém střevě díky antioxidační aktivitě a ochraně střev a jater u potkanů. Inhibuje buněčnou proliferaci a snižuje cévní endoteliální růstový faktor (VEGF). V porovnání s hesperidinem má dokonce lepší vlastnosti pro vyvolání apoptózy, protože přítomnost cukerné složky glukosy a rhamnosy toto snižuje. [70]

Hesperetin se dnes využívá jako doplněk stravy pro zlepšení prokrvení a jako vazoprotektivum. Také u něj bylo prokázáno, že zlepšuje průtok krve v oku a obnovuje funkce sítnice. Proto se zkoumají různé systémy řízeného uvolňování pro transport látky do zadních segmentů oka a prodloužení kontaktu léčiva. [71] Společně s naringeninem se používá v tradiční čínské medicíně Zhi Zhu Wan jako žaludeční tonikum, k léčbě hemoroidů a prevenci tromboembolie.

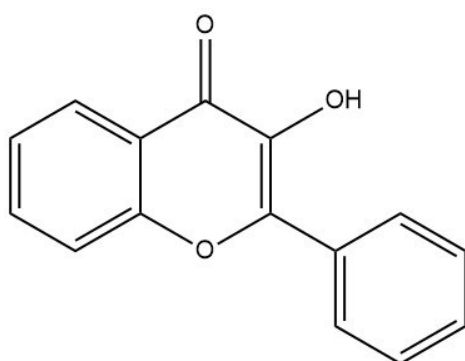
## Flavon



Obrázek 22 – Chemická struktura flavonu (2-fenylchromen-4-on)

Flavony jsou jednou ze základních skupin flavonoidů, které charakterizuje přítomnost dvojných vazby mezi C2 a C3 a oxo skupiny ve čtvrté poloze. Tvoří primární pigmenty v bílých a světle zbarvených květech, mohou absorbovat UVB záření a chránit rostliny před hmyzem a houbami. Nejvíce flavonů obsahují květy *Matricaria chamomilla* (Asteraceae) a *Petroselinum crispum* (Apiaceae) v podobě derivátů apigeninu, dále jsou v olivovém oleji, medu, luštěninách, obilovinách, ovoci nebo zelenině. Nejvíce jsou přijímány jako flavon-*o*-glykosidy, které se mimo jiné hojně vyskytují v čeledi Lamiaceae a v citrusových šťávách. Po absorpci se hydrolyzují na aglykony a jsou metabolizovány glukuronidací či sulfatací a poté se dostávají do systémové cirkulace. C-glykosidy jsou spíše aktivní ve střevním lumenu než v centrálním kompartmentu kvůli snížené dostupnosti. Po konzumaci vařené petržele léčebnou skupinou pacientů byla pozorována zvýšená aktivita antioxidantních enzymů v krvi. Jiné studie přinesly snížení celkového cholesterolu, protizánětlivou aktivitu nebo zvýšení žilního tonu. [72]

## 3-hydroxyflavon

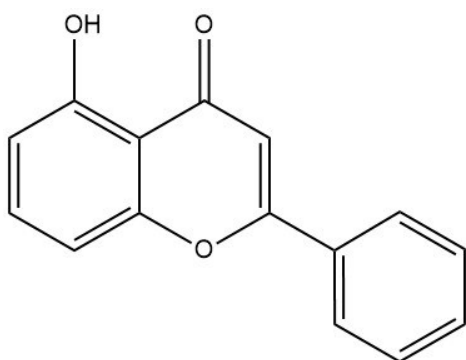


Obrázek 23 – Chemická struktura 3-hydroxyflavonu (3-hydroxy-2-fenylchromen-4-on)

OH skupina na C3 v kruhu C poskytuje interakci pomocí vodíkových můstků. Bylo prokázáno, že jeho chemická struktura s řadou rezonančních struktur je z flavonoidů nejstabilnější. Díky dvojně vazbě mezi C2 a C3 a OH skupině v poloze 3 mají nejlepší

antioxidační účinky. Dokáže vychytávat volné radikály lépe než 5-hydroxyflavon nebo 7-hydroxyflavon, může také vytvořit tautomerickou formu a ve viditelné oblasti světla vykazuje dvě fluorescenční pásma, což se využívá v lékařství jako sonda pro identifikaci řetězce DNA. [73]

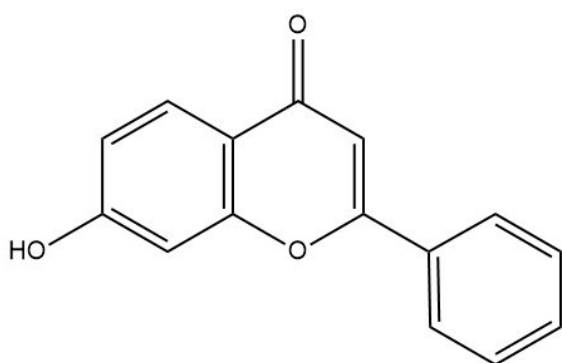
#### 5-hydroxyflavon



Obrázek 24 – Chemická struktura 5-hydroxyflavonu (5-hydroxy-2-fenylchromen-4-on)

OH skupina na C5 je docela běžnou součástí chemických struktur flavonoidů. Nazývá se chromofor, tedy je zodpovědná za barvu. Můžeme zde najít intramolekulární šestičlennou kruhovou vodíkovou vazbu, kdy vodík na pozici C5 je silně vázán a velmi odolný vůči acetylaci či methylaci. Tato vodíková vazba je silnější než pětičlenná vazba v 3-hydroxyflavonu. [74]

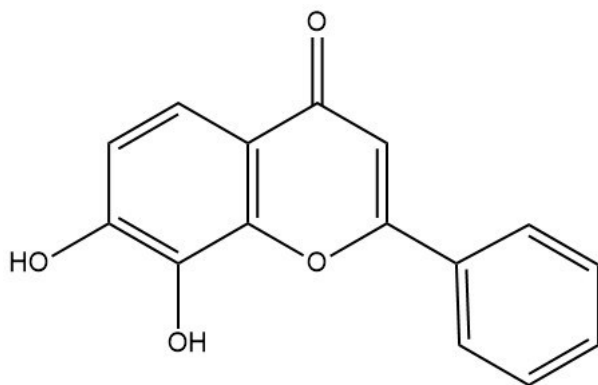
#### 7-hydroxyflavon



Obrázek 25 – Chemická struktura 7-hydroxyflavonu (7-hydroxy-2-fenylchromen-4-on)

Většina aktivních flavonů má rovněž v pozici C7 OH skupinu, která má nejvyšší aciditu, tedy zodpovídá za acidobazické vlastnosti flavonoidů. Kyselost je zvýšena v excitovaných stavech, a tedy poskytuje schopnost fluorescence v neutrálním a kyselém mediu. Díky přenosu protonů v molekule se vytváří tautomer. [75]

## 7,8-dihydroxyflavon



Obrázek 26 – Chemická struktura 7,8-dihydroxyflavonu (7,8-dihydroxy-2-fenylchromen-4-on)

7,8-dihydroxyflavon se nachází v *Godmania aesculifolia* (Bignoniaceae), *Tridax procumbens* (Asteraceae) a *Primula* sp. (Primulaceae). Bylo prokázáno, že se jedná o agonistu receptoru tyrosinkinasy, konkrétně tropomyosin receptor kinas B. Pro stimulaci tohoto receptoru je velmi důležitá OH skupina v poloze C8. Díky schopnosti dostat se přes hematoencefalickou bariéru by se flavonoid mohl využívat k léčbě parkinsonismu, který nastává při deficitu signalizace na tyrosinkinasových receptorech. Další studie potvrdila slibné terapeutické využití podávání 7,8-dihydroxyflavonu v léčbě Downova syndromu, kde obnovuje vývoj hipokampu a kognitivních funkcí. Také zmírňuje poruchy sociální komunikace a mohl by se využívat při léčbě autismu. Dále by mohl být alternativní náhradou antidepresiv u pacientů rezistentní na základní léčbu a zlepšovat stavy spojené se stresem. Při chronickém podávání byly ale objeveny nežádoucí účinky spojené se záchvaty, které připomínaly epilepsii, tudíž jsou potřebné další studie *in vivo*. [76]

## 2.4 Lýza červených krvinek

Lýzou červených krvinek se rozumí nekróza buněk, při které dochází ke zvětšení intracelulárního obsahu a následné ruptuře plazmatické membrány a vylití obsahu do extracelulárního prostředí. LDH je cytoplazmatický enzym, který se takto dostává do média buněčných kultur a je přítomen téměř ve všech buňkách. LDH katalyzuje oxidaci laktátu na pyruvát a produkuje NADH (rovnice 5). Vzniklý přírůstek NADH + H<sup>+</sup> se poté stanovuje spektrofotometrickým měřením. [77]



### 3 Cíl práce

Cílem této práce bylo najít vhodné přírodní látky, které by byly schopné *in vitro* chelatovat kobalt. Pro spektrofotometrické měření byly vybrány flavonoidy, u kterých byla již v minulosti zjištěna schopnost chelatovat jiné kovy jako železo nebo měď.

Dále bylo u látek se schopností chelatovat kobalt ověřeno, zda se chelatace projeví i na lýze erytrocytů v přítomnosti kobaltu. Pro tento experiment *in vivo* byla použita potkaní krev.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

- chlorid kobaltnatý ( $\text{CoCl}_2$ )
- spektrofotometrický indikátor
  - disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové ( $\text{Na}_2\text{NFDSA}$ )
- testované látky: (obr. 4–26)

Flavony:

- baikalin
- baikalein
- chrysin
- diosmin
- flavon
- 5-hydroxyflavon
- 7-hydroxyflavon
- 7,8-dihydroxyflavon

Flavonoly:

- kempferol
- kvercetin
- morin
- myricetin
- 3-hydroxyflavon
- isorhamnetin
- rutin
- trihydroxyethylrutin

Flavanony:

- naringin
- naringenin
- taxifolin
- hesperidin
- hesperetin



Flavanoly:

- katechin
- epikatechin
- rozpouštědla:
  - dimethylsulfoxid (DMSO) – Lach-Ner (ČR)
  - superčistá voda připravená pomocí přístroje Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)
- další látky:
  - pro přípravu pufrů:  
kyselina octová, octan sodný, kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonová (HEPES) a sodná sůl HEPES (NaHEPES)
  - fyziologický roztok, originální registrovaný preparát od B. Braun (Německo)
  - glukosa
  - heparin 5000 IU/ml, originální registrovaný preparát od Zentivy (ČR)
  - Triton X
  - disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na<sub>2</sub>EDTA)
  - dithiothreitol
  - nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>)
  - tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)
  - potkaní krev samců kmene Wistar: Han, VELAZ, s.r.o., ČR, získaná jako vedlejší produkt z experimentů, kdy se využívá potkaní aorta na testování vasodilatačních účinků

Látky, kde není uveden výrobce, byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Německo).

#### 4.1.2 Přístroje a pomůcky

- spektrofotometr Helios gama (Spectronic Unicam, Spojené Království)
- spektrofotometr pro mikrotitrační destičku Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Vermont, USA)
- analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- vortex mixér IKA<sup>®</sup> Vortex Genius 3 (IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- třepačka pro mikrotitrační destičky IKA<sup>®</sup> MS 3 digital (IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- automatické jednokanálové pipety (Brand, Německo): 10-100 μl, 20-200 μl, 100-1000 μl
- vícekanálová pipeta (Biohit, Německo): 30-300 μl

- semi-mikro polystyrenové UV kyvety (BrandTech Scientific Inc, Spojené Království)
- mikrotitrační destičky – 96 jamek (Brand, Německo)
- mikrozkušavky – 1,5 ml; 2,0 ml (Eppendorf, Německo)
- špičky k pipetám o objemu 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l a 5 ml (Eppendorf, Německo)
- zkumavky centrifugační – 15 ml, 50 ml (Brand, Německo)
- centrifuga VWR Compact Star CS4 (VWR International Ltd, Spojené Království)
- centrifuga MIKRO 22R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Německo)
- BioRad TC 20 cell counter (Bio-Rad Laboratories, Inc., Česká republika)
- spektrometr TECAN Infinite M200PRO (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko)
- inkubátor Hood TH 15 (Edmund Bühler GmbH, Německo)

## 4.2 Metodický postup

### 4.2.1 Metodický postup pro spektrofotometrické stanovení chelátorů kobaltu

#### 4.2.1.1 Před experimentem

Příprava jednotlivých pufrů:

- Acetátové pufrы o pH 4,5 a 5,5 obsahovaly 15 mM octanu sodného a 27,3 mM kyseliny octové pro pH 4,5, respektive 2,7 mM kyseliny octové pro pH 5,5.
- HEPES pufrы o pH 6,8 a 7,5 obsahovaly 15 mM NaHEPES a 71,7 mM HEPES pro pH 6,8, respektive 14,3 mM HEPES pro pH 7,5.

Příprava zásobních roztoků:

- Příprava 5 mM roztoku  $\text{CoCl}_2$  ( $M_w$  129,84 g/mol) rozpuštěním navážky  $\text{CoCl}_2$  v superčisté vodě.
- Příprava 5 mM roztoku indikátoru  $\text{Na}_2\text{NFDSA}$  ( $M_w$  377,249 g/mol) rozpuštěním  $\text{Na}_2\text{NFDSA}$  v superčisté vodě.

Příprava pracovních roztoků:

- Příprava 300  $\mu$ M roztoku  $\text{CoCl}_2$  za využití zásobního roztoku  $\text{CoCl}_2$ , který byl naředěn superčistou vodou.

- Příprava 1,8 mM roztoku Na<sub>2</sub>NFDSA za využití zásobního roztoku Na<sub>2</sub>NFDSA, který byl naředěn superčistou vodou.
- Příprava jednotlivých roztoků flavonoidů v různých koncentracích, všechny navážky byly ředěny pomocí rozpouštědla DMSO.

#### 4.2.1.2 Provedení experimentu

Do jamek mikrotitrační destičky bylo postupně napipetováno:

- 150  $\mu$ l pufru (pH 4,5; 5,5; 6,8; 7,5) do všech jamek, celý experiment byl proveden při jednom pH a poté se opakoval se všemi následujícími pufrů.
- 50  $\mu$ l roztoku flavonoidu při různých koncentracích, každý sloupec mikrotitrační destičky obsahoval jinou koncentraci příslušné látky.
- Do posledních dvou sloupců tzv. kontrolních jamek bylo napipetováno místo roztoku flavonoidu 50  $\mu$ l DMSO.
- 50  $\mu$ l 300  $\mu$ M roztoku CoCl<sub>2</sub> do všech jamek kromě posledního sloupce, tam bylo napipetováno 50  $\mu$ l superčisté vody.
- Destička byla poté vložena do třepačky, kde se po dobu 2 minut nechala třepat pro promíchání všech komponentů a možného vytvoření komplexu kobaltu s flavonoidem.
- Poté se do posledních dvou řádků tzv. slepých vzorků pipetovalo 50  $\mu$ l superčisté vody a do dvou vrchních řádků těsně před měřením 50  $\mu$ l 1,8 mM roztok Na<sub>2</sub>NFDSA.
- Následně byla pomocí spektrofotometru v jednotlivých jamkách destičky naměřena absorbance při vlnových délkách 490 nm a 540 nm v čase 0 a 5 minut a při pH 4,5 i v čase 10 minut.
- Pomocí excelové tabulky bylo vypočteno, na kolik procent se chelatace odehrála a byl vytvořen graf závislosti % chelatovaných iontů Co<sup>2+</sup> na poměru testované látky: Co<sup>2+</sup>.

Při měření ale docházelo v jednotlivých jamkách k tvorbě sraženin, proto bylo namísto 150  $\mu$ l pufru pipetováno 100  $\mu$ l pufru a 50  $\mu$ l DMSO pro lepší rozpustnost.

	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	0 <sup>+</sup>	0 <sup>-</sup>
Na <sub>2</sub> NFDSA						
Na <sub>2</sub> NFDSA						
Slepé vzorky						
Slepé vzorky						

V zelených jamkách je napipetováno 100  $\mu$ l pufru + 50  $\mu$ l DMSO, 50  $\mu$ l roztoku testované látky o příslušné koncentraci  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  a  $C_4$ , 50  $\mu$ l roztoku  $\text{CoCl}_2$  a v prvních dvou řadách 50  $\mu$ l roztoku  $\text{Na}_2\text{NFDSA}$  ( $\times$ ) a ve spodních dvou řadách 50  $\mu$ l superčisté vody ( $\times$ ).

Ve sloupci pozitivní kontroly ( $0^+$ ) je napipetováno 100  $\mu$ l pufru + 50  $\mu$ l DMSO, 50  $\mu$ l DMSO, 50  $\mu$ l roztoku  $\text{CoCl}_2$ , 50  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{NFDSA}$  ( $\times$ ) a 50  $\mu$ l superčisté vody ( $\times$ ).

V jamkách negativní kontroly ( $0^-$ ) je napipetováno 100  $\mu$ l pufru + 50  $\mu$ l DMSO, 50  $\mu$ l DMSO, 50  $\mu$ l superčisté vody, 50  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{NFDSA}$  ( $\times$ ) a 50  $\mu$ l superčisté vody.

## 4.2.2 Metodický postup lýzy červených krvinek

### 4.2.2.1 Před experimentem

- Příprava 5 mM zásobního roztoku  $\text{CoCl}_2$  ( $M_w$  129,84), pro rozpuštění navážky se použil fyziologický roztok, který se zahřál přibližně na 37°C.
- Příprava 1 mM roztoku glukosy za rozpuštění ve fyziologickém roztoku, příprava fyziologického roztoku, oba se zahřály přibližně na 37°C.
- Příprava lyzačního pufru:
  - Nejprve byl připraven fosfátový pufru o pH 7,8 z dihydrogenfosforečnanu draselného  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,72g/100ml) a hydrogenfosforečnanu draselného  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (3,48g/100ml).
  - K pufru byl přidán 10% Triton X; 0,1 M EDTA; 1 M dithiothreitol a superčistá voda.
- Příprava reakčního pufru: 6mM  $\text{NAD}^+$  byl smíchán s 0,1 M TRIS a 2 M laktátem. Přípravuje se v den měření aktivity LDH.

### 4.2.2.2 Provedení experimentu

- Potkaní krev se ihned po odejmutí nechala centrifugovat při 5400 otáčkách/min po dobu 10 min v centrifuze VWR CS4.
- Oddělená krevní plazma se odstranila a přidalo se dvojnásobné množství fyziologického roztoku a opět centrifugovalo 10 minut při 5400 otáčkách/min.
- Opět se odstranila plazma a byl opakován předešlý krok.
- Naposledy se odstranil supernatant a červené krvinky se opatrně přemístily do 50 ml zkumavky.

- Do ní byl přidán heparin (5000 IU/ml) v množství 20  $\mu$ l na 1 ml suspenze červených krvinek.
- Do zkumavky bylo přidáno devítinásobné množství 1 mM roztoku glukosy a pomocí reverzního pipetování byla suspenze přenesena do jednotlivých mikrozkušavek o objemu 1,5 ml.
- Do mikrozkušavek bylo přidáno 10  $\mu$ l testovaného flavonoidu při různých koncentracích a do kontrolních vzorků, kterých bylo 5 (3 pozitivní a 2 negativní) 10  $\mu$ l DMSO. Mikrozkušavka s příslušnou koncentrací testované látky byla připravena duplicitně: jedna byla označena + a druhá –.
- Dále bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku  $\text{CoCl}_2$  do vzorků + a do pozitivních kontrol a 50  $\mu$ l fyziologického roztoku do vzorků – a do negativních kontrol.
- Po dobu 4 hodin se nechaly zkumavky inkubovat při 100 otáčkách/min a 37°C.
- Ještě před inkubací se odebral vzorek krve, který se zředil fyziologickým roztokem 2000krát a 20 000krát a pomocí přístroje BioRad TC byl určen celkový počet erytrocytů.
- Po inkubaci se vzorky centrifugovaly při 37°C, 10 min a 5400 otáčkách/min v centrifuze MICRO 22R.
- Z každé mikrozkušavky bylo odebráno 250  $\mu$ l supernatantu do nových mikrozkušavek nadepsaných „před lýzou“, které se zatím daly do lednice.
- Z původních mikrozkušavek se musel precizně odstranit všechnen supernatant a přidat lyzační pufr. To se poté promíchalo na vortexu a nechalo asi 20 minut při pokojové teplotě.
- Mikrozkušavky se daly do centrifugy MICRO 22R při 10 000 otáčkách/min na 10 minut při 37°C.
- Znovu se odebralo 250  $\mu$ l supernatantu do mikrozkušavek označených „po lýze“.
- Mikrozkušavky „před lýzou“ a „po lýze“ se nechaly zamrazit na -80°C.
- V den měření se mikrozkušavky vyndaly z mrazícího boxu a chvíli nechaly k dosažení pokojové teploty.
- Vzorky „před lýzou“ byly zředěny fyziologickým roztokem v poměru 1:1 a vzorky „po lýze“ v poměru 1:5.
- Vzorky byly promíchány pomocí vortexu a duplicitně pipetovány v objemu 50  $\mu$ l do mikrotitrační destičky.

- Těsně před tzv. kinetickým měřením bylo přidáno 300 µl reakčního pufru vždy do třech sloupců a hned měřena absorbance při 340 nm, protože při této vlnové délce absorbuje vznikající NADH. To bylo opakováno s dalšími sloupci mikrotitrační destičky.

## 4.3 Matematické a statistické metodiky

### 4.3.1 Stanovení chelátorů kobaltu

Byly naměřeny absorbance testovaných vzorků s indikátorem a slepých vzorků bez indikátoru, které od sebe byly odečteny a tento rozdíl byl vydělen rozdílem absorbance kontrolních vzorků (s kobaltem, ale bez testované látky) a jejich slepých vzorků (s kobaltem bez indikátoru, kde byly ještě odečteny rozdíly mezi absorbancí negativních vzorků s/bez přítomnosti indikátoru). Z tohoto výpočtu bylo stanoveno množství nezchelatovaného kobaltu. Výsledky byly předloženy jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}.$$

Ze statistických metod byl použit test ANOVA a Bonferroni post-hoc test, podle kterých se absorbance porovnávala. Výsledné grafy a 95% konfidenční intervaly pro porovnání chelatace vznikly pomocí programu Graph Pad Prism verze 9.0 pro Windows (GraphPad Software, USA).

### 4.3.2 Lýza erytrocytů

Výsledkem experimentu bylo získání procentuálního vyjádření lýzy erytrocytů ze spektrofotometricky měřené aktivity LDH dle vzorce:  $\frac{2x k_{BL}}{2x k_{BL} + 6x k_{AL}}$ , kde BL je před lýzou a AL

po lýze. Poté byla podle vzorce  $1 - \left( \frac{\% \text{ lýzy vzorek}}{\% \text{ lýzy slepý vzorek}} \right)$  porovnána míra lýzy vzorků s testovanými

látkami s pozitivním anebo negativním slepým vzorkem (tzn. s kobaltnatými ionty nebo místo nich s fyziologickým roztokem). A tím bylo zjištěno, zda testovaná látka ovlivňuje lýzu erytrocytů. Výsledky byly předloženy jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka  $s =$

$$\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}.$$

Statistická významnost byla stanovena studentovým T-testem a testem ANOVA, sloužící pro porovnání lýzy vzorků se slepými vzorky. Výsledné grafy byly vytvořeny pomocí programu GraphPad verze 9.0 pro Windows (GraphPad Software, USA).

## 5 Výsledky

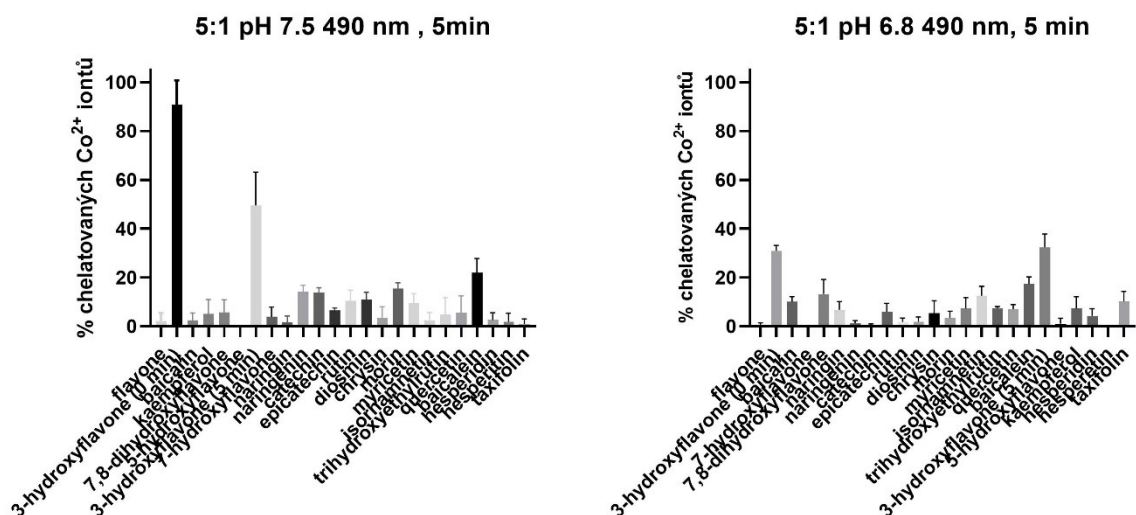
### 5.1 Výsledky spektrofotometrického stanovení chelátorů kobaltu

U všech 23 testovaných látek byla zkoumána chelatační aktivita podle metodického postupu z kapitoly 4.2.1. U jednotlivých látek byla změřena absorbance pomocí spektrofotometrického měření *in vitro* při vlnových délkách 490 nm a 540 nm při čtyřech patofyziologicky relevantních podmínkách pH (pH 4, 5; 5, 5; 6, 8; 7, 5) v čase 0; 5 minut a při pH 4,5 10 minut. Chelatační aktivita se stanovovala pomocí měření volných nezchelatovaných kobaltnatých iontů, ke kterým se těsně před měřením přidal indikátor Na<sub>2</sub>NFDSA žluté barvy. Pokud potenciální chelátor nedokázal vytvořit komplex s kobaltnatými ionty, výsledná barva roztoku se změnila na oranžovou, tedy barvu komplexu Na<sub>2</sub>NFDSA s kobaltem. Z koncentrace (mM) přidaného potenciálního chelátoru byl určen poměr chelátoru: Co<sup>2+</sup> a jeho logaritmus. Z naměřených hodnot absorbance s indikátorem a bez něj byl stanoven rozdíl absorbancí a vypočtena procentuální úspěšnost chelatace. Poté byl vytvořen graf závislosti % chelatovaných iontů Co<sup>2+</sup> na poměru testované látky a Co<sup>2+</sup>. Flavonoidy baikalín (obr. 28a, b), baikalein (obr. 29a, b), kempferol (obr. 30a, b), kvercetin (obr. 31a, b), 3-hydroxyflavon (obr. 32a, b), 5-hydroxyflavon (obr. 33a, b) a 7,8-dihydroxyflavon (obr. 34a, b) byly změřeny ve všech pH ve více koncentracích. Poté byl proveden tzv. screening flavonoidů, tedy proměření zbylých látek pouze při pH 6,8 a 7,5 v koncentracích 3 mM; 1,5 mM; 0,3 mM s cílem zkusit chelatační aktivitu, která by byla případně více prozkoumána při dalších koncentracích. Obr. 27a, b uvádějí přehled všech testovaných látek v poměru 5:1 při pH 7,5 a 6,8 a při vlnových délkách 490 nm a 540 nm.

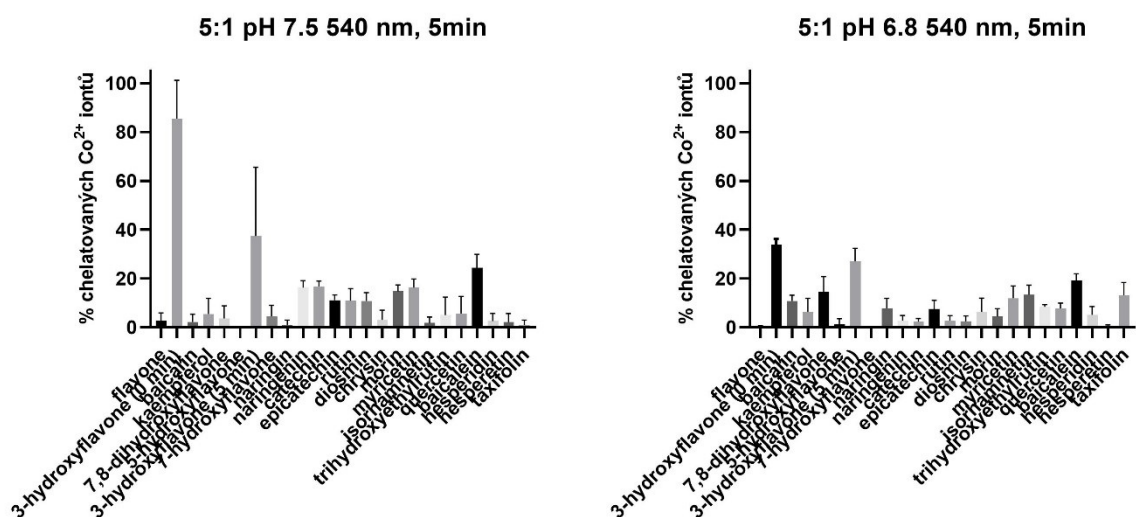
Ze všech zkoušených látek vykazovaly chelatační aktivitu pouze dvě: 3-hydroxyflavon a baikalein. 3-hydroxyflavon byl reaktivní při pH 6,8 a 7,5, při nižším pH chelatace neproběhla. V poměru 1:1 dosahoval až 100 % chelatace při pH 7,5 a asi 60 % chelatace při pH 6,8. Baikalein reagoval také pouze při pH 6,8 a 7,5, kdy v poměru 10:1 dokázal navázat asi 50 % kobaltnatých iontů, je tedy slabším chelátorem kobaltu než 3-hydroxyflavon.

Na obr. 35 je uvedena stabilita komplexu baikaleinu s kobaltem, který byl měřen v čase 0 a 5 minut. V grafu je vidět pokles stability po 5 minutách a pouze hodnoty, u nichž byla chelatace nad 5 %. Při pH 7,5 a 6,8 je největší stabilita komplexu v poměru 1:1 v obou vlnových délkách a s rostoucím poměrem klesá. Obr. 36 uvádí stabilitu 3-hydroxyflavonu opět po 5

minutách a pouze s hodnotami chelatace nad 5 %. Při pH 7,5 je stabilita nejvyšší při poměru 1:1 a se zvyšujícím poměrem klesá. U pH 6,8 je komplex stabilní až při vyšším poměru a téměř se nemění.

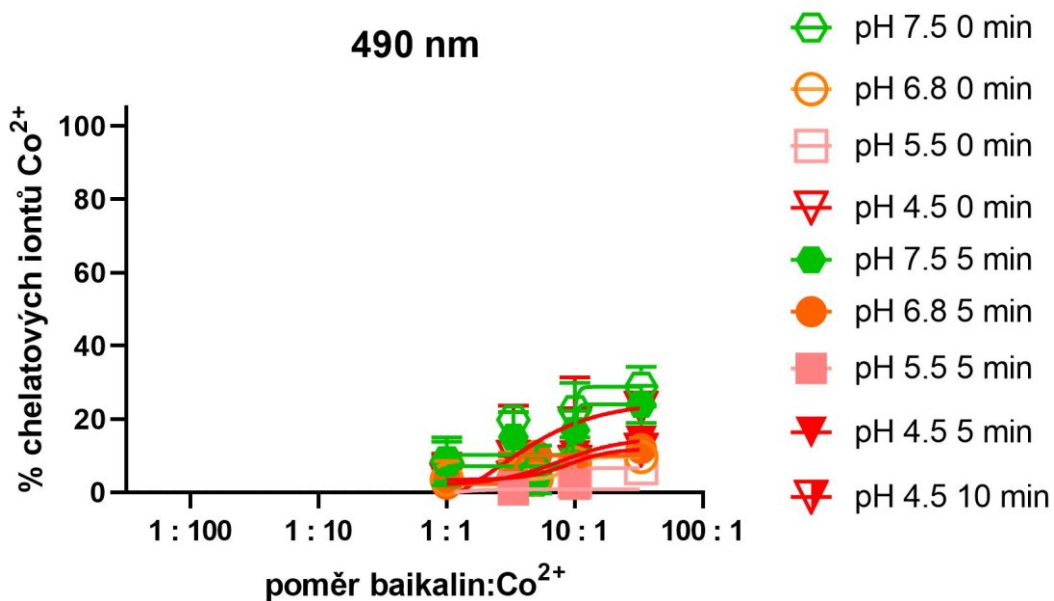


Obrázek 27a – Přehled všech testovaných flavonoidů a jejich účinnost chelatace kobaltu při 490 nm.

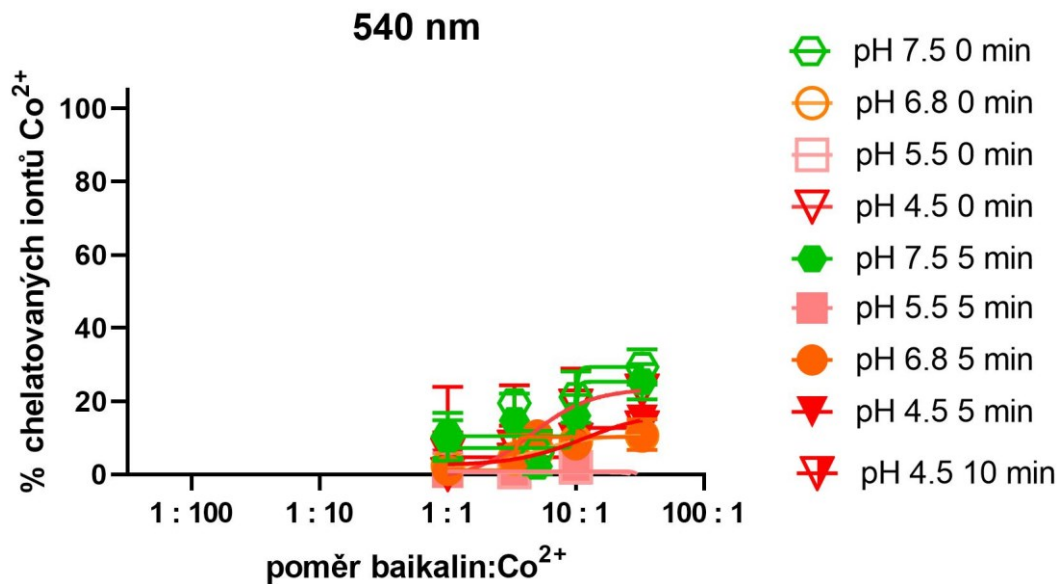


Obrázek 27b – Přehled všech testovaných flavonoidů a jejich účinnost chelatace kobaltu při 540 nm.

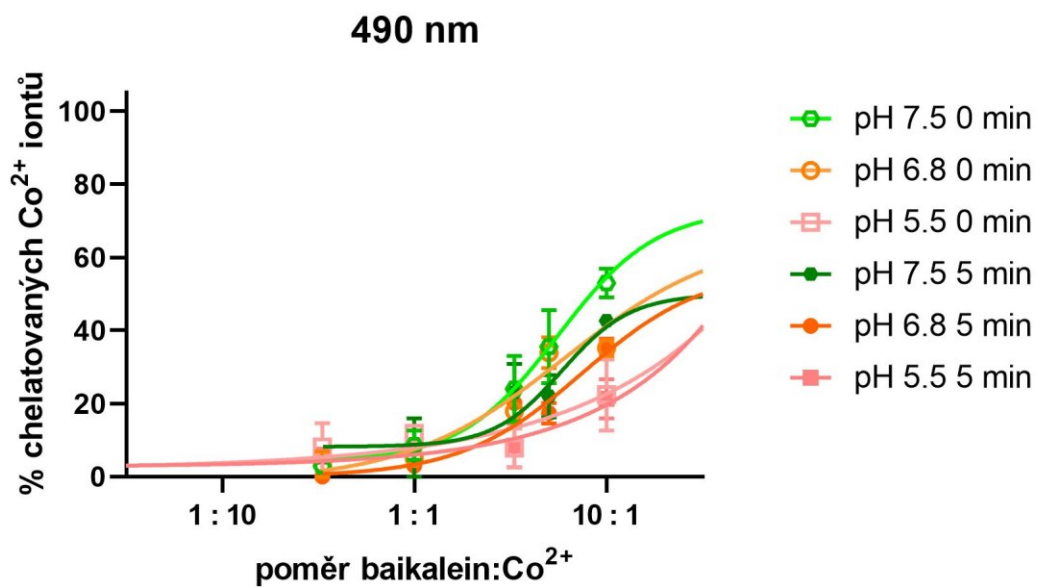




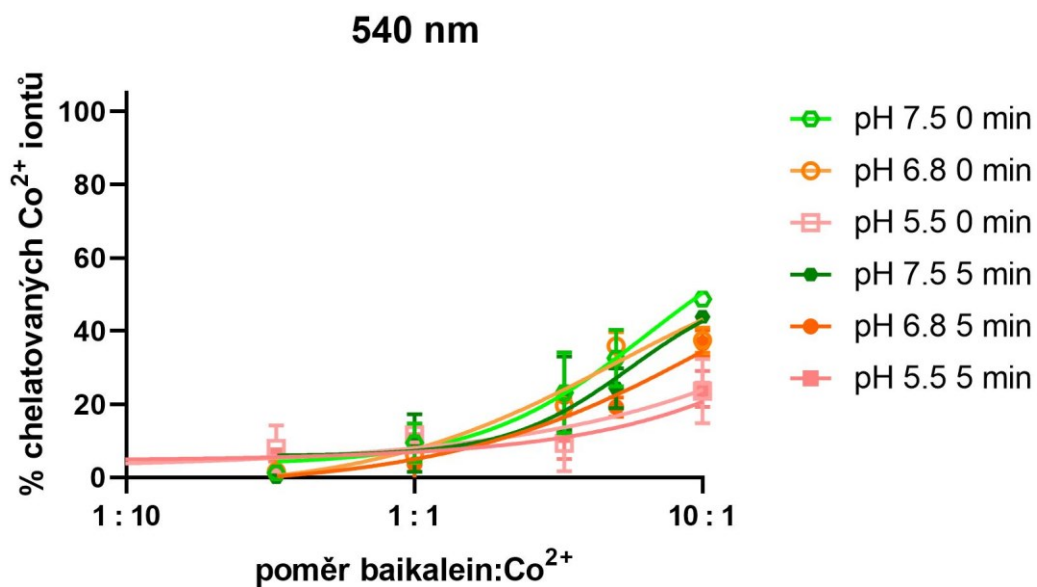
Obrázek 28a – Účinnost chelatace kobaltu baicalinem při 490 nm.



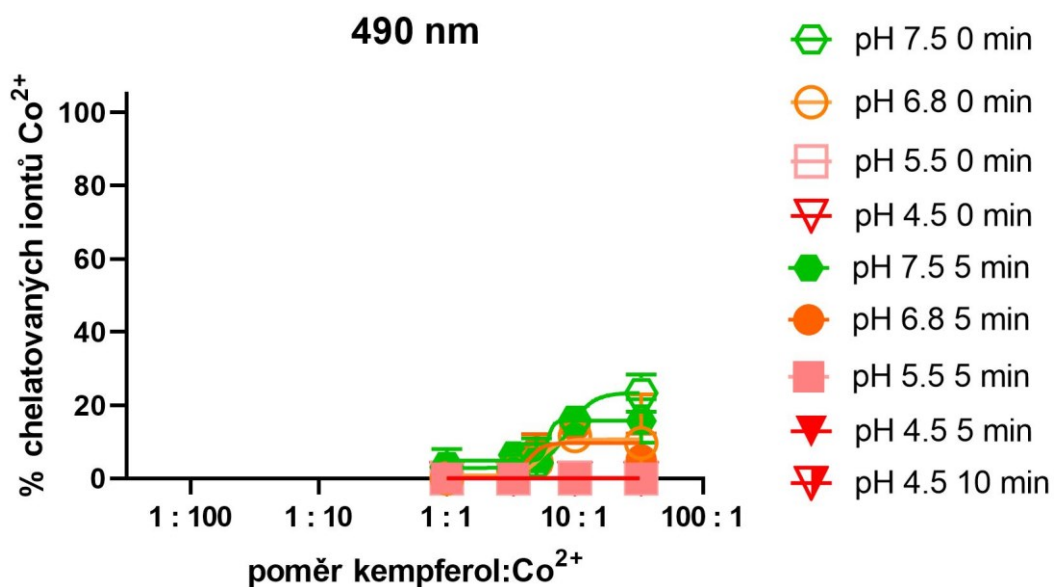
Obrázek 28b – Účinnost chelatace kobaltu baicalinem při 540 nm.



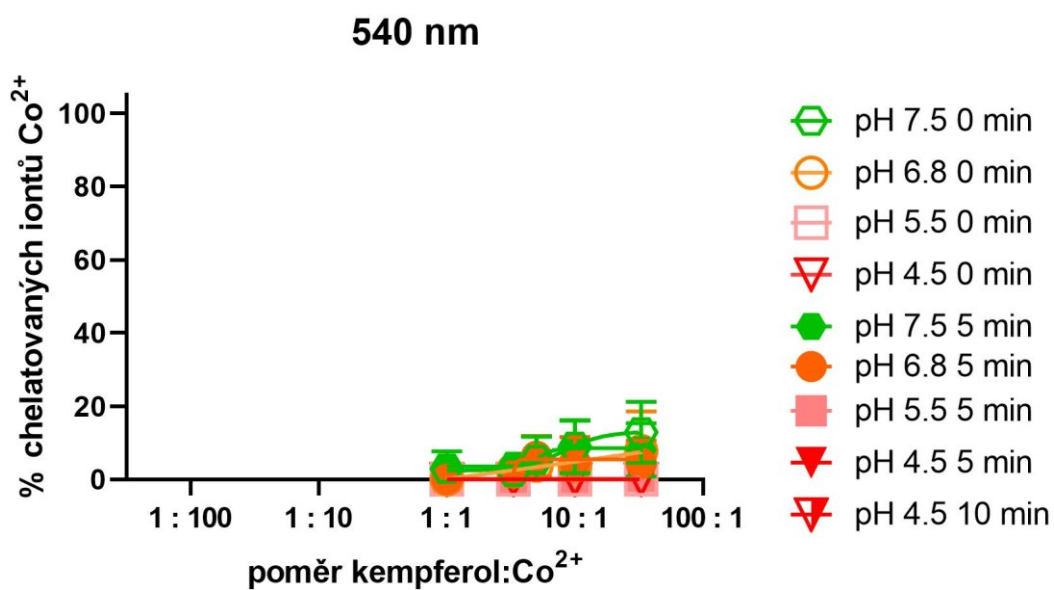
Obrázek 29a – Účinnost chelatace kobaltu baikaleinem při 490 nm.



Obrázek 29b – Účinnost chelatace kobaltu baikaleinem při 540 nm.

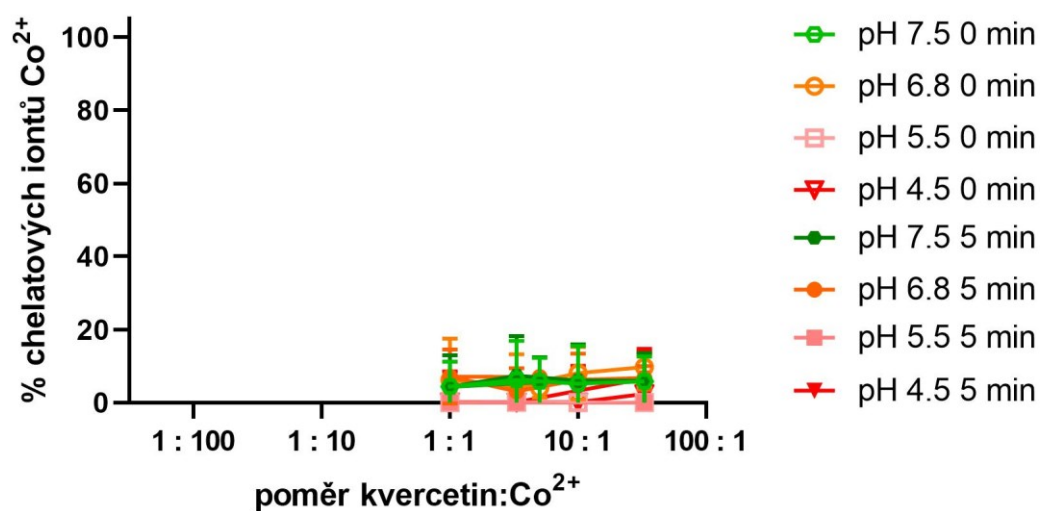


Obrázek 30a – Účinnost chelatace kobaltu kempferolem při 490 nm.



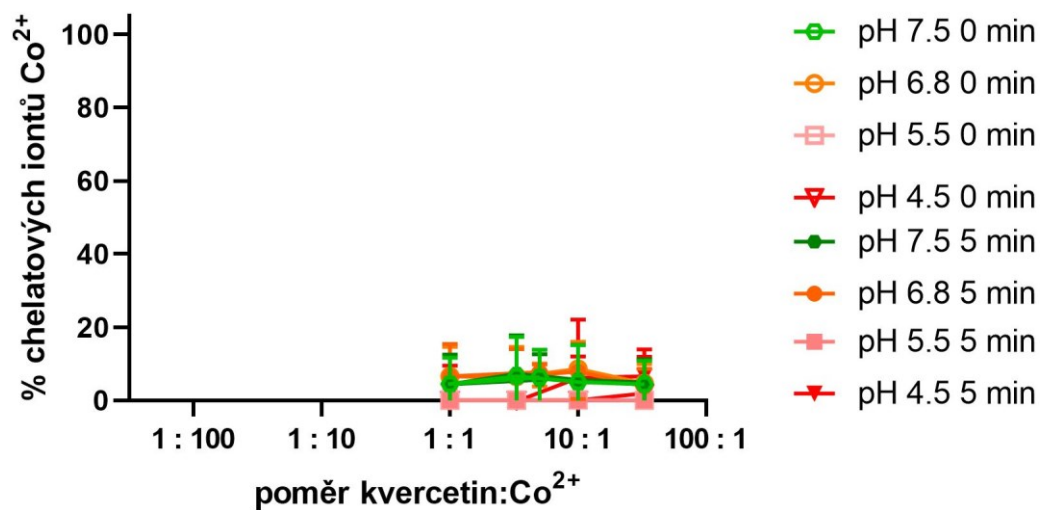
Obrázek 30b – Účinnost chelatace kobaltu kempferolem při 540 nm.

### 490 nm

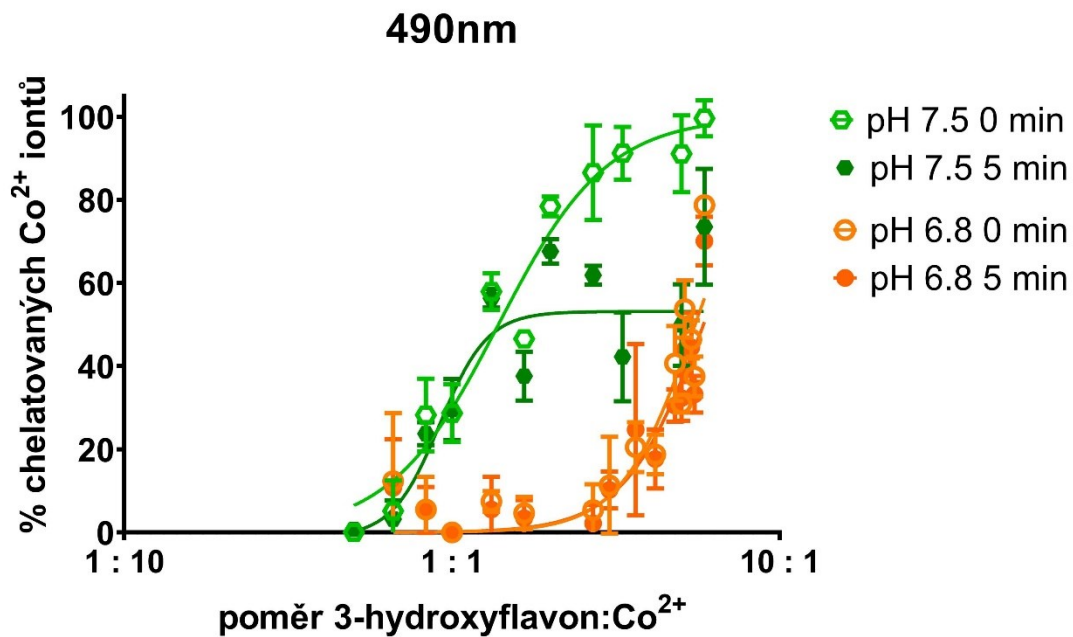


Obrázek 31a – Účinnost chelatace kobaltu kvercetinem při 490 nm.

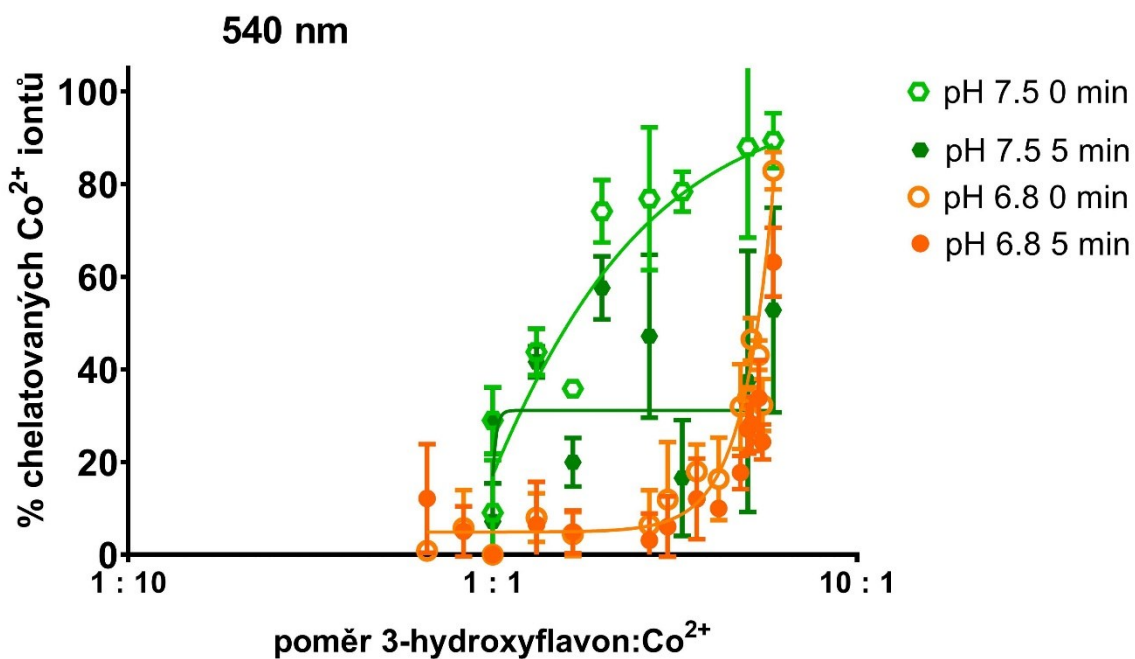
### 540 nm



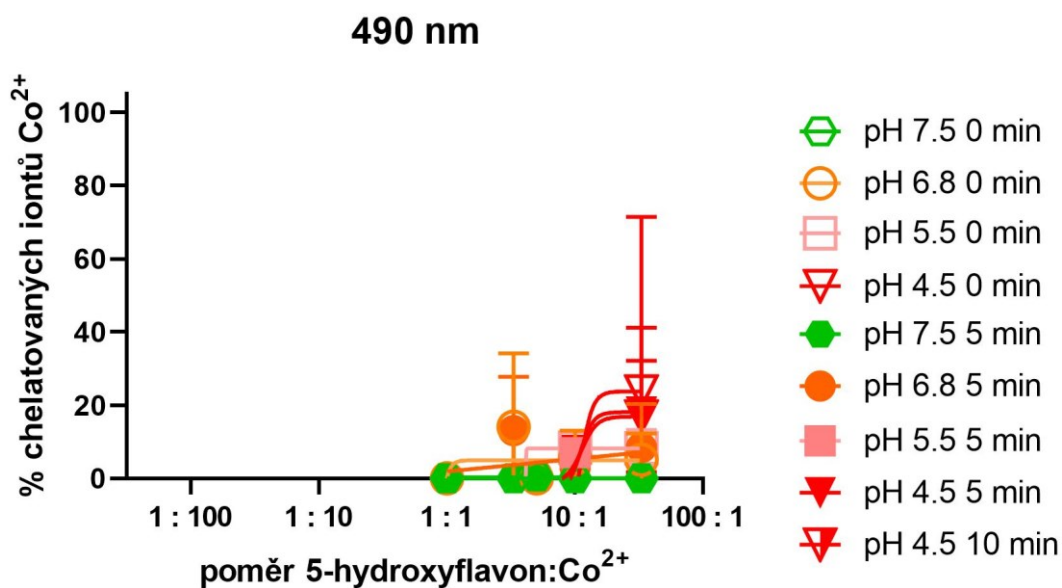
Obrázek 31b – Účinnost chelatace kobaltu kvercetinem při 540 nm.



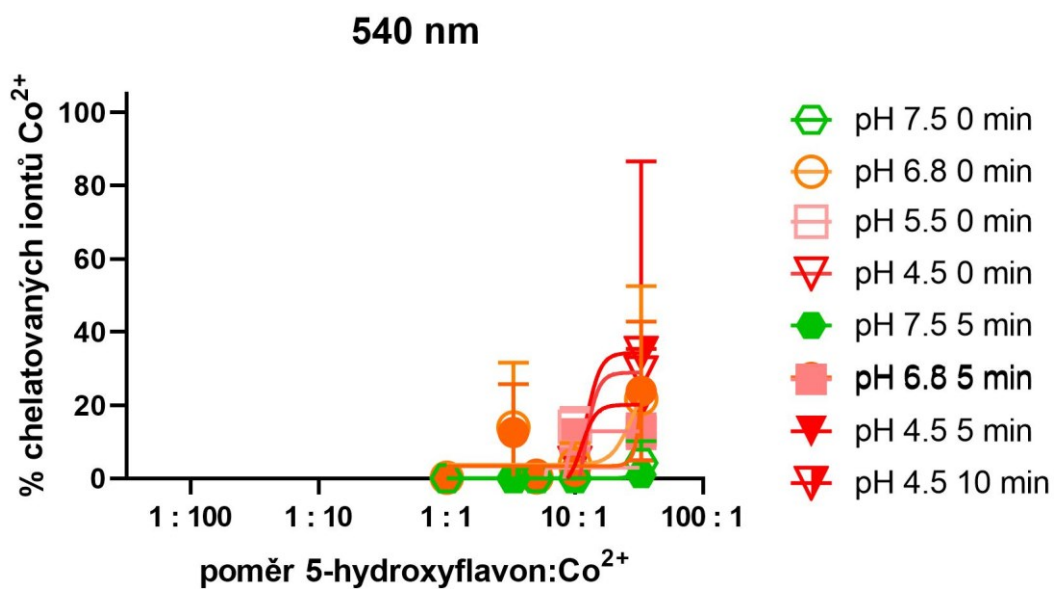
Obrázek 32a – Účinnost chelatace kobaltu 3-hydroxyflavonem při 490 nm.



Obrázek 32b – Účinnost chelatace kobaltu 3-hydroxyflavonem při 540 nm.

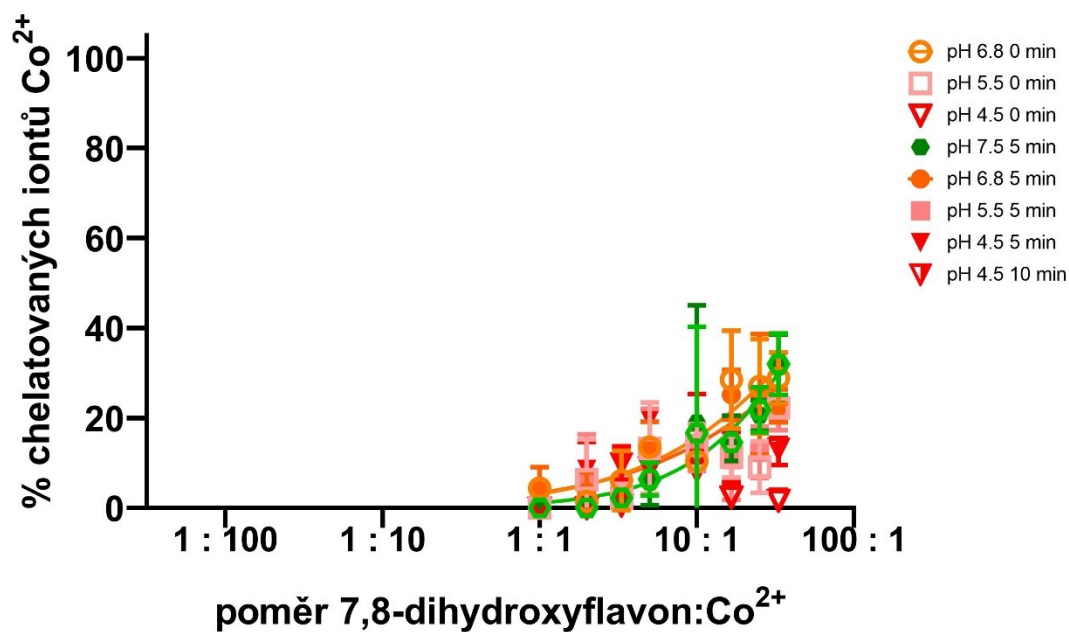


Obrázek 33a – Účinnost chelatace kobaltu 5-hydroxyflavonem při 490 nm.



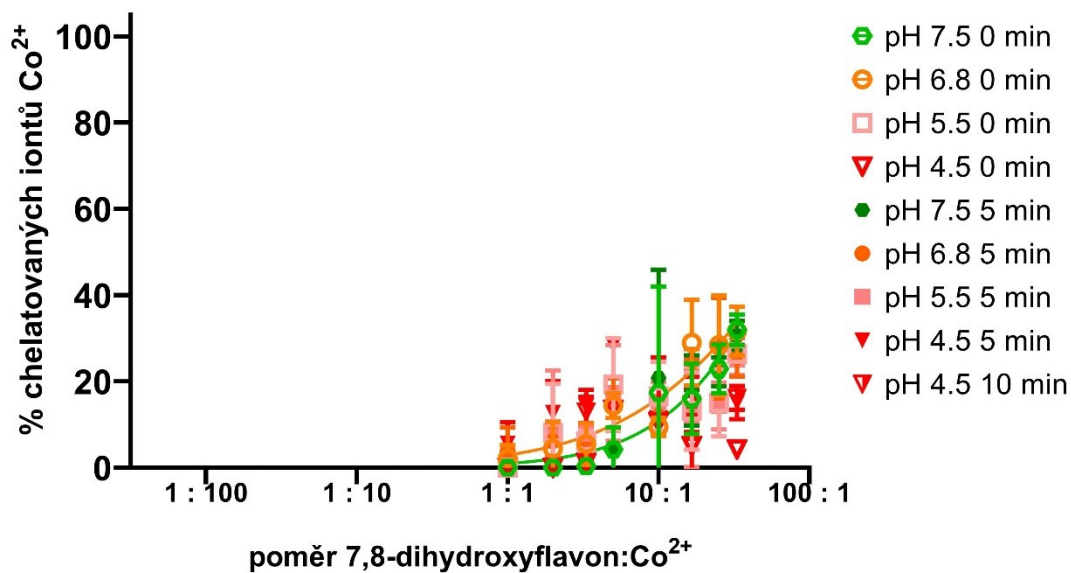
Obrázek 33b – Účinnost chelatace kobaltu 5-hydroxyflavonem při 540 nm.

## 490nm

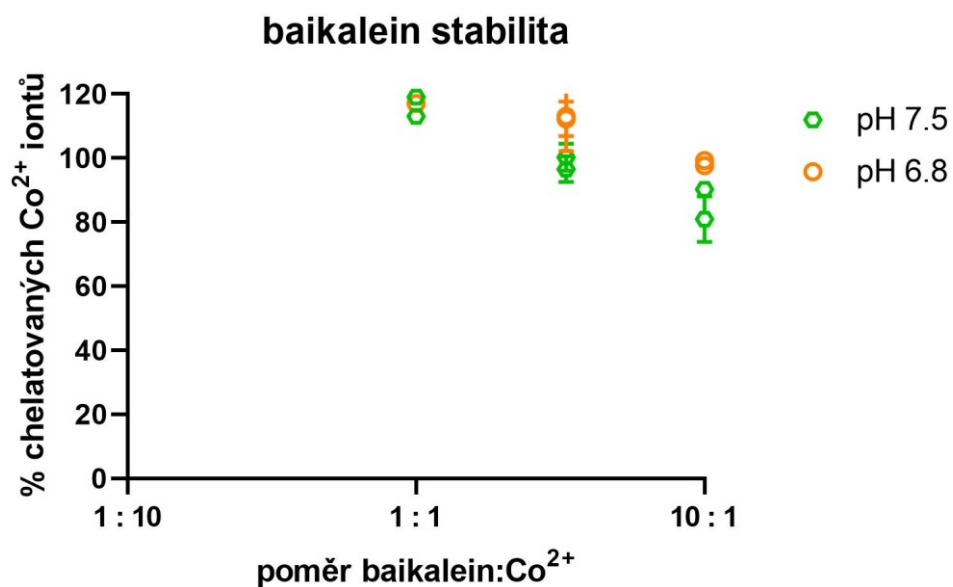


Obrázek 34a – Účinnost chelatace kobaltu 7,8-dihydroxyflavonem při 490 nm.

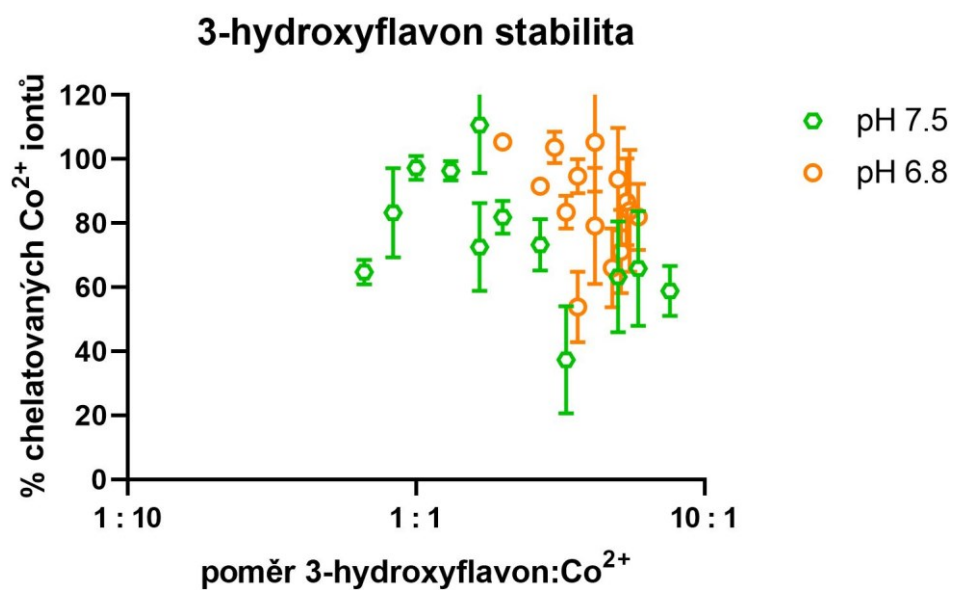
## 540 nm



Obrázek 34b – Účinnost chelatace kobaltu 7,8-dihydroxyflavonem při 540 nm.



Obrázek 35 – Stabilita baikaleinu a  $\text{Co}^{2+}$ .



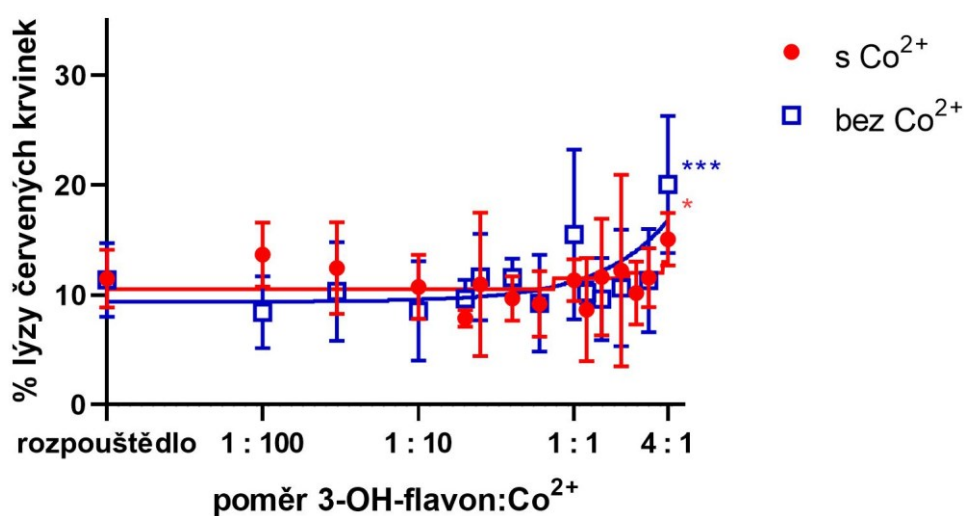
Obrázek 36 – Stabilita 3-hydroxyflavonu a  $\text{Co}^{2+}$ .



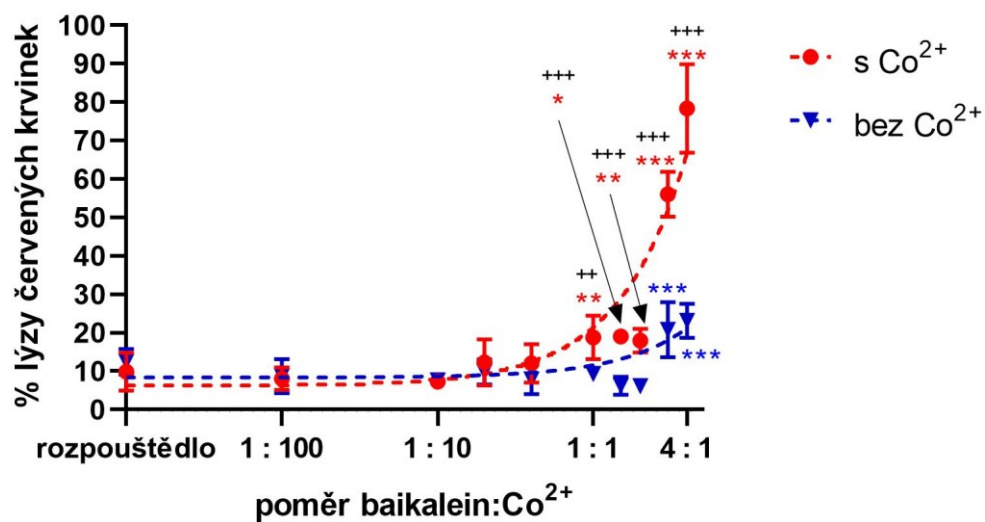
## 5.2 Výsledky lýzy červených krvinek

Podle metodického postupu z kapitoly 4.2.2 byl proveden experiment lýzy červených krvinek, kde byl zkoumán vliv testovaných látek na změnu lýzy, buď samotných nebo v komplexu s kobaltem. Tento experiment byl proveden u 3-hydroxyflavonu a baikaleinu, tedy u látek, ve kterých byla prokázána chelatační aktivita. Výsledky byly vypočteny jako % lyzovaných erytrocytů a porovnány s pozitivní kontrolou, kde byly pouze kobaltnaté ionty bez testované látky, která byla nahrazena rozpouštědlem.

3-hydroxyflavon (obr. 37) ovlivnil lýzu červených krvinek okolo 10 %. Samotný 3-hydroxyflavon ovlivnil lýzu významněji, která dosahovala až 20 %, s ionty kobaltu ji ovlivnil nejvíce v poměru 4:1. U měření s baikaleinem (obr. 38) byla zjištěna lýza pod 10 %, samotný baikalein v poměru 4:1 způsobuje lýzu do 20 %, v případě s ionty kobaltu dosahuje až 90 %.



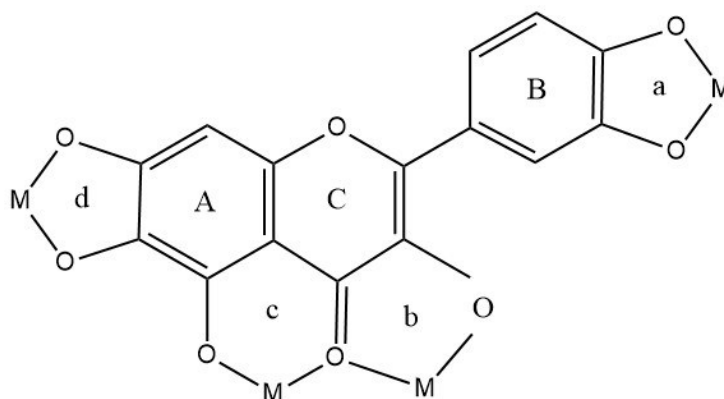
Obrázek 37 – Účinek 3-hydroxyflavonu na lýzu červených krvinek za přítomnosti kobaltnatých iontů nebo bez jejich přítomnosti se statickou významností \* $p < 0,05$  a \*\*\* $p < 0,001$  vs. slepý vzorek.



Obrázek 38 – Účinek baikalainu na lýzu červených krvinek za přítomnosti kobaltnatých iontů nebo bez jejich přítomnosti se statistickou významností \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  a \*\*\* $p < 0,001$  vs. slepý vzorek a významností mezi vzorky s flavonoidy s /bez kobaltu odpovídající ++ $p < 0,01$  a +++ $p < 0,001$ .

## 6 Diskuse

Schopnost flavonoidů chelatovat přechodné kovy je jedním z mechanismů jejich antioxidační aktivity. Cílem této práce bylo najít zástupce této skupiny, které by měly schopnost chelatovat kobalt. Již z provedených studií byly navrženy důležité struktury a polohy substituentů, které jsou v chemické struktuře flavonoidů hlavní pro vytvoření komplexu ligandu a kovu. (obr. 39) [78]



Obrázek 39 – Hlavní místa chelatace: a: 3', 4' dihydroxy skupina na kruhu B, b: 3-hydroxy-4-keto na kruhu C, c: 5-hydroxy-4-keto uskupení, d: 6,7-dihydroxy skupina na kruhu A.

Z experimentální části je patrné, že chelatovaly pouze dva flavonoidy: 3-hydroxyflavon a baikalein. 3-hydroxyflavon (obr.23) jako jediný ze skupiny flavonolů chelatoval kobalt díky své 3-hydroxy-4-keto skupině. Chelatace probíhala v poměru 1:1 (3-hydroxyflavon:  $\text{Co}^{2+}$ ) při pH 6,8 a 7,5. Největší aktivitu ale dosahoval při pH 7,5 v čase 0 minut při 490 nm, kdy byla chelatace 100 %. Z toho lze usoudit, že chelatace proběhla při vyšším pH, kdy se z fenolické skupiny snadněji odštěpoval proton. 3-hydroxyflavon dosahoval 100 % chelatace při dřívějším měření s železem při všech pH v poměru 10:1. [79] Ze studií, které se zaměřovaly na chelátory mědi byla 3-hydroxy-4-keto skupina 3-hydroxyflavonu velmi účinná, a dokonce při nižších pH vykazoval aktivitu podobnou s klinicky užívaným chelátorem mědi trientinem. [80]

Baikalein (obr.5) ze skupiny flavonů má potenciálně dvě místa pro chelataci: 5-hydroxy-4-keto skupinu a 6,7-dihydroxyskupinu. Ze dřívějších studií chelatace železa vyplývá, že nejdůležitějším místem je dihydroxyskupina, respektive trihydroxy skupina v kruhu A. Baikalein se ukázal jako velmi silným chelátorem železa ve všech pH v poměru 1:1, jeho schopnost chelatovat železo je největší z flavonoidů a srovnává se s deferoxaminem. [79] Nicméně z výsledků je patrné, že se jedná o slabý chelátor kobaltu, protože zde vykazoval svoji aktivitu při poměru 10:1 pouze při pH 6,8 a 7,5, kdy byla chelatace naměřena kolem 50 %. Při

měření s mědí vykazoval podobnou chelatační aktivitu jako trientin. [80] Z výše uvedeného vyplývá, že se nepodařilo najít selektivní chelátor pro kobaltnaté ionty.

Při měření 5-hydroxyflavonu došlo k tvorbě sraženin, které byly hlavně vidět ve slepých vzorcích. Tedy tam, kde bylo více superčisté vody – z toho bylo patrné, že přídavek DMSO by mohl tvorbu sraženin zastavit. Proto byla navržena změna napipetovaného množství jednotlivých pufrů. Namísto 150  $\mu$ l pufru bylo použito pouze 100  $\mu$ l a k tomu bylo přidáno 50  $\mu$ l DMSO pro zlepšení rozpustnosti sraženin, které se poté již netvořily. Pomocí pH metru bylo zkontrolováno výsledné pH: u HEPES pufrů byl rozdíl zanedbatelný, ale u octanových pufrů bylo naměřeno pH vyšší, např. u pufru s pH 4,5 společně s DMSO bylo pH 5,4.

Dále byly provedeny experimenty *in vivo* s 3-hydroxyflavonem a baikaleinem, které měly ukázat, zda se chelatace projeví na lýze erytrocytů, buď se samotnou testovanou látkou, nebo v komplexu s kobaltnatými ionty. Komplex baikaleinu a kobaltnatých iontů způsoboval až 90 % lýzu, což naznačuje, že v biologickém prostředí působí toxicky.

Jeho prooxidační aktivita nejspíše souvisí s přítomností trihydroxy skupiny na kruhu A, protože je úměrná počtu OH skupin. K tvorbě radikálů přispívá také dvojná vazba v poloze 2 a keto skupina v poloze 4. Prooxidační aktivita závisí na koncentraci příslušného kovu, koncentraci flavonoidu a na biologickém materiálu. Při vychytávání ROS v těle z flavonoidů vzniká fenolický radikál, který je velice reaktivní, ale poté se z něj stává chinon, který může být stabilizován konjugací s neutrofilem. Baikalein má navíc schopnost autooxidace. V mitochondriích může způsobit respirační vzplanutí kyanidem a zvýšit produkci ROS. [81]

Flavonoidy, které mají oxidační vlastnosti, mohou v komplexu s kovem reagovat podle Fentonovy reakce a poškozovat tak organismus. (rovnice 2)



U některých látek se jejich cytotoxická aktivita využila pro léčbu rakovinových onemocnění. Bylo prokázáno, že baikalein v přítomnosti měďnatých iontů vyvolává apoptózu linií rakovinových buněk, nikoli buněk somatických. Jeho prooxidační aktivita byla zkoumána v buňkách karcinomu lidského prsu, kdy jeho schopnost vytvoření ROS v komplexu s mědí umožnil apoptózu buněk závislých na mitochondriích. [82] Otázkou je, zda i komplex baikaleinu s kobaltem má takové účinky.

U baikaleinu byl také objeven kardioprotektivní účinek, který je zprostředkován vznikajícím peroxidem vodíku při autooxidaci v extracelulárním prostoru. Možným

mechanismem účinku by mohla být inhibice vápenatých iontů při ischemii myokardu, ale jsou vyžadovány další studie, které by to mohly potvrdit či vyvrátit. Baikalein měl dobré výsledky, pokud byl podán jako prevence hypoxie. Avšak pokud byl předložen při samotné hypoxii, měl nežádoucí účinky. Přesto stále platí, že nadměrné zvýšení ROS v organismu vede např. ke zvýšení LDH. Paradoxně se jeho kardioprotektivní účinky projeví oxidačními vlastnostmi navzdory očekávané antioxidaci. [83]

## 7 Závěr

Závěrem této práce lze říct, že se podařilo najít látky ze skupiny flavonoidů, které by při spektrofotometrickém měření vykazovaly chelatační účinky vůči kobaltu. Měření probíhalo *in vitro* za relevantních pato/fyziologických pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Jedná se o 3-hydroxyflavon, který vykazoval 100 % chelataci v poměru 1:1 při pH 7,5. Druhým flavonoidem byl baikalein, který chelatoval asi 50 % kobaltu v poměru 10:1 při pH 7,5.

U těchto látek bylo dále zkoumáno, zda mají schopnost ovlivnit lýzu erytrocytů v přítomnosti kobaltu. Zajímavý výsledek přinesl baikalein, který v komplexu s kobaltem dosahoval až 90 % lýzy erytrocytů, a tedy místo antioxidačních vlastností působil *in vivo* jako prooxidant. Jeho schopnost vytvořit ROS byla využita např. jako kardioprotektivní účinek a při navození apoptózy buněk karcinomu prsu. Z toho vyplývá, že výsledky z *in vitro* měření provedené hlavně ve vodném prostředí se nemusí shodovat s těmi z biologického prostředí – proto by se experimentů *in vivo* mělo uskutečnit více. Do budoucna je cílem najít selektivní chelátor kobaltu, protože chelatační terapie by mohla být nejlepší cestou při intoxikaci těžkými kovy.

## 8 Seznam zkratek

ROS – reaktivní formy kyslíku

Co<sup>3+</sup> – kobaltité ionty

MoM – metal-on-metal

·OH – hydroxylový radikál

EPR – elektronová paramagnetická rezonance

SOD – superoxiddismutasa

EDTA – ethylendiamintetraacetát

DMPS – 2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonát

TPE – terapeutická plazmatická výměna

DMSA – dimerkaptojantarová kyselina

RNS – reaktivní formy dusíku

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

OH skupiny – hydroxyskupiny

NF-κB – nukleární faktor kappa B

NO – oxid dusnatý

TNF – tumor nekrotizující faktor

PI3K – fosfatidylinositol-3-kinasa

ERK1/2 – proteinkinasa regulovaná extracelulárním signálem

PKC – proteinkinasa C

PD – Parkinsonova choroba

6-OHDA – 6-hydroxydopamin

AD – Alzheimerova choroba

SGLT – 1 – sodíko-glukosový kotransportér

GABA – kyselina gama-aminomáselná

PPAR $\gamma$  – receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem

LDH – laktátdehydrogenasa

MPFF – mikronizovaná čištěná flavonoidní frakce

VEGF – cévní endoteliální růstový faktor

CoCl<sub>2</sub> – chlorid kobaltnatý

Na<sub>2</sub>NFDSA – disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové

DMSO – dimethylsulfoxid

HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonová

NaHEPES – sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonové

Na<sub>2</sub>EDTA – disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

NAD<sup>+</sup> – nikotinamidadenindinukleotid

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan



## 9 Literatura

- [1] MÜHLETHALER, Bruno – THISSEN, Jean a kol., *Smalt*, Studies in conversation 14(2), 1969. DOI: 10.2307/1505347, s. 47–49.
- [2] BHATTACHARYYA, P. – CHAKRABARTI, K. a kol., *Cobalt and nickel uptake by rice and accumulation in soil amended with municipal solid waste compost*, Ecotoxicology and Environmental Safety 69, 2008. DOI: 506-512, s. 506–507.
- [3] DENG, Teng-Hao-Bo – CHEN, Jie-Qian a kol., *Quantification of nickel and cobalt mobility and accumulation via the phoem in the hyperaccumulator Noccaea caeruleascens (Brassicaceae)*, Metallomics, 13(4), 2021. DOI: 10.1093/mtomcs/mfab012, s. 1–2.
- [4] VERBRUGGEN, Nathalie – HERMANS, Christian a kol., *Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants*, New phytologist 181(4), 2009. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x., s. 763–765.
- [5] HU, Xiu – WEI, Xiangying a kol., *Cobalt: An essential micronutrient for plant growth?*, Frontiers in Plant Science 16(12), 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.768523, s. 1–3.
- [6] COLLINS, Richard N. – KINSELA, Andrew S. a kol., *The aqueous phase speciation and chemistry of cobalt in terrestrial environments*, Chemosphere 79(8), 2010. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.03.003., s. 766.
- [7] CZARNEK, Katarzyna – TERPILOWSKA, Sylwia a kol., *Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body*, Central European Journal of Immunology 40(2), 2015. DOI: 10.5114/ceji.2015.52837., s. 236–237.
- [8] SIMONSEN, Lars Ole – HARBAK, Henrik a kol., *Cobalt metabolism and toxikology – a brief update*, Science of the Total Environment 15, 2012. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.009., s. 212–213.
- [9] ŠVIHOVEC, Jan a kol., *Farmakologie*, Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN: 978-80-271-2150-2, s. 468–469.
- [10] OSMAN, Deenah – COOKE, Anastasia a kol., *The requirement for cobalt in vitamin B12: A paradigm for protein metalation*, Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research 1868(1), 2021. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118896., s. 1–3.

- [11] MAREK, Josef a kol., *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, Praha: Grada Publishing, 2005. ISBN: 80-247-0839-6, s. 242–245.
- [12] ROBERT C. – BROWN, David L. a kol., *Vitamin B12 deficiency*, *American Family Physician* 1,67(5), 2003., s. 985–986.
- [13] NEWTON, Ashley W. – RANGANATH, Lakshminarayan a kol., *Differential disatribution of cobalt, chromium and nickel between whole blood, plasma and urine in patients after metal-on-metal (MoM) hip arthroplasty*, *Journal of Orthopaedic Research* 30(10), 2012. DOI: 10.1002/jor.22107., s. 1640–1642.
- [14] BRADBERRY, S. M. – WILKINSON, J. M. a kol., *Systemic toxicity related to metal hip prostheses*, *Clinical Toxicology (Phila)* 52(8), 2014. DOI: 10.3109/15563650.2014.944977., s. 838–839.
- [15] SUH, Mina – THOMPSON Chad M. a kol. *Inhalation cancer risk assessment of cobalt metal*, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 79, 2016. DOI: 10.1016/j.yrtph.2016.05.009., s. 74–75.
- [16] JOMOVA, Klaudia – VALKO, Marian a kol., *Advances in metal-induced oxidative stress and human disease*, *Toxicology* 10(283), 2011. DOI: 10.1016/j.tox.2011.03.001., s. 74–76.
- [17] VALKO, M. – MORRIS, H. a kol., *Metals, toxicity and oxidative stress*, *Current Medicinal Chemistry* 12(10) 2005. DOI: 10.2174/0929867053764635., s. 1180–1182.
- [18] SEARS, Margaret E.: *Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification-a review*, *Scientific World Journal* 18, 2013. DOI: 10.1155/2013/219840., s. 2.
- [19] FLORA, Swaran J. S. – PACHAURI, Vidhu a kol., *Chelation in metal intoxication*, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7(7), 2010. DOI: 10.3390/ijerph7072745., s. 2746–2749.
- [20] KIM, Jong-Joo – KIM, You-Sam a kol., *Heavy metal toxicity: An update chelating therapeutic strategies*, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 54, 2019. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.05.003., s. 226–228.
- [21] LACHOWICZ, Joanna Izabela – LECCA, Luigi Isaia a kol., *Metals and metal-nanoparticles in human pathologies: from exposure to therapy*, *Molecules.* 26(21), 2021. DOI: 10.3390/molecules26216639., s. 4–13.

- [22] DEVLIN, John J. – POMERLEAU, Adam C. a kol., *Clinical features, testing and management of patients with suspected prosthetic hip-associated cobalt toxicity: a systematic review of cases*, J.Med. Toxicol. 9(4), 2013. DOI: 10.1007/s13181-013-0320-0., s. 413–413.
- [23] GRANT, Michelle L. – KARP, Julie K. a kol., *Does therapeutic plasma exchange have a role in the treatment of prosthetic hip-associated cobalt toxicity? A case report and literature review*, Transfusion 56(9), 2016. DOI: 10.1111/trf.13720., s. 2369–2372.
- [24] FOX, Kimberly A. – PHILLIPS, Todd M. a kol., *Fatal cobalt toxicity after total hip arthroplasty revision for fractured ceramic components*, Clin. Toxicol. (Phila) 54(9), 2016. DOI: 10.1080/15563650.2016.1214274., s. 876.
- [25] KONTOGHIORGHES, George, *Advances on chelation and chelator metal complexes in medicine*, Int. J. Mol. Sci. 21(7), 2020. DOI: 10.3390/ijms21072499., s. 2–4.
- [26] LAKEY-BEITIA, Johant – BURILLO, Andrea M. a kol., *Polyphenols as potencial metal chelation compounds against Alzheimer's disease*, J. Alzheimers Dis. 82, 2021. DOI: 10.3233/JAD-200185., s. 11–13.
- [27] DURAZZO, Alessandra – LUCARINI, Massimo a kol., *Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health*, Phytother Res. 33(9), 2019. DOI: 10.1002/ptr.6419., s. 2223.
- [28] CUSHNIE, Tim T. P. – LAMB, Andrew J. a kol., *Antimicrobial activity of flavonoids*, Int. J. Antimicrob Agents. 26(5), 2005. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002., s. 344.
- [29] KUMAR, Shashank – PANDEY, Abhay K. a kol., *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*, ScientificWorldJournal. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/162750., s. 1–2.
- [30] SHARMA, Anket – SHAHZAD, Barbara a kol., *Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress*, Molecules. 24(13), 2019. DOI: 10.3390/molecules24132452., s. 2–3.
- [31] BANJARNAHOR, Sofna D.S. – ARTANTI, Nina a kol., *Antioxidant properties of flavonoids*, Medical Journal of Indonesia 23(4), 2014. DOI: 10.13181/mji.v23i4.1015., s. 239–242.
- [32] MALEKI, Soheila J. – CRESPO, Jesus F. a kol., *Anti-inflammatory effects of flavonoids*, Food Chem. 299, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125124., s. 3–4.

- [33] GHOSH, Dilip – SCHEEPENS, Arjan a kol., *Vascular action of polyphenols*, Mol. Nutr. Food Res. 53, 2009. DOI: 10.1002/mnfr.200800182., s. 323–325.
- [34] RUSSO, Benedetta – PICCONI, Fabiana a kol., *Flavonoids and Insulin-Resistance: From Molecular Evidences to Clinical Trials*, Int. J. Mol. Sci. 20(9), 2019. DOI: 10.3390/ijms20092061., s. 5–6.
- [35] SOLANKI, Isha – PARIHAR, Priyanka a kol., *Neurodegenerative diseases: From available treatments to prospective herbal therapy*, Neurochem. Int. 95, 2016. DOI: 10.1016/j.neuint.2015.11.001., s. 104–106.
- [36] CHIA, Shyh Jenn – TAN, Eng-King a kol., *Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease*, Int. J. Mol. Sci. 21(7), 2020. DOI: 10.3390/ijms21072464., s. 3–4.
- [37] ARYAL, Sunisha – SKINNER, Taylor a kol., *The Pathology of Parkinson's Disease and Potential Benefit of Dietary Polyphenols*, Molecules. 25(19), 2020. DOI: 10.3390/molecules25194382., s. 16–17.
- [38] ULLAH, Asad – MUNIR, Sidra a kol., *Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent*, Molecules. 25(22), 2020. DOI: 10.3390/molecules25225243., s. 14–15.
- [39] REDDY, V. Prakash – ARYAL, Puspa a kol., *Polyphenols in Alzheimer's Disease and in the Gut-Brain Axis*, Microorganisms. 8(2), 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8020199., s. 9–10.
- [40] KOPUSTINSKIENE, Dalia M. – JAKSTAS, Valdas a kol., *Flavonoids as Anticancer Agents*. Nutrients. 12(2), 2020. DOI: 10.3390/nu12020457., s. 6–8.
- [41] TIWARI, Prabha – MISHRA, Kaushala Prasad a kol., *Flavonoids sensitize tumor cells to radiation: molecular mechanisms and relevance to cancer radiotherapy*, Int. J. Radiat. Biol. 96(3), 2020. DOI: 10.1080/09553002.2020.1694193., s. 363.
- [42] NISHIUMI, Shin – MIYAMOTO, Shingo a kol., *Dietary flavonoids as cancer – preventive and therapeutic biofactors*, Front. Biosci. (Schol. Ed.) 3(4), 2011. DOI: 10.2741/229., s. 1338–1339.
- [43] SAJID, Moon – CHANNAKESAVULA, Chaitanya N. a kol., *Synthetic biology towards improved flavonoid pharmacokinetics*, Biomolecules. 11(5), 2021. DOI: 10.3390/biom11050754., s. 7.

- [44] DINDA, Biswanath – DINDA, Subhajit a kol., *Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders*, Eur. J. Med. Chem. 131, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.004., str. 69.
- [45] MARTENS, Stefan – MITHÖFER, Axel a kol., *Flavones and flavone synthases*, Phytochemistry. 66(20), 2005. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.07.013., 2401.
- [46] ZHAO, Qing – CHEN, Xiao-Ya a kol., *Scutellaria baicalensis, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants*, Sci. Bull. (Beijing). 61(18), 2016. DOI: 10.1007/s11434-016-1136-5., s. 1393–1394.
- [47] WANG, Ze-Mu – ZHAO, Di a kol., *Flavonol intake and stroke risk: a meta-analysis of cohort studies*, Nutrition. 30(5), 2014. DOI: 10.1016/j.nut.2013.10.009., s. 518.
- [48] CHEN, Allen Y. – CHEN, Yi Charlie a kol., *A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention*, Food Chem. 138(4), 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.139., s. 2.
- [49] LI, Yao – YAO, Jiaying a kol., *Quercetin, Inflammation and immunity*, Nutrients. 8(3), 2016. DOI: 10.3390/nu8030167., s. 2–3.
- [50] MARUNAKA, Yoshinori – MARUNAKA, Rie a kol., *Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure*, Molecules. 22(2), 2017. DOI: 10.3390/molecules22020209., s 3–4.
- [51] ISEMURA, Mamoru, *Catechin in human health and disease*, Molecules. 24(3), 2019. DOI: 10.3390/molecules24030528., s. 1.
- [52] JANEIRO, Patricia – BRETT, Ana Maria Oliveira a kol., *Catechin electrochemical oxidation mechanisms*, Analytica Chimica Acta 518, 2004. DOI: 10.1016/j.aca.2004.05.038., s. 109–110.
- [53] DAUSSIN, Frédéric N. – HEYMAN, Elsa a kol. *Effects of (-)-epicatechin on mitochondria*, Ntr. Rev. 79(1), 2021. DOI: 10.1093/nutrit/nuaa094., s. 26–34.
- [54] CHEN, Rui – QI, Qiao-Ling a kol., *Therapeutic potential of naringin: an overview*, Pharm. Biol. 54(12), 2016. DOI: 10.1080/13880209.2016.1216131., s. 3203–3206.
- [55] SALEHI, Bahare – FOKOU, Patrick Valere Tsouh a kol., *The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials*, Pharmaceuticals (Basel). 12(1), 2019. DOI: 10.3390/ph12010011., s. 1–11.

- [56] KIM, Jie Wan – LEE, Jun Ho a kol., *Morin inhibits Fyn kinase in mast cells and IgE-mediated type I hypersensitivity response in vivo*, *Biochem. Pharmacol.* 77(9), 2009. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.01.019., s. 1509–1510.
- [57] HOU, Y. C. – CHAO, P. D. L a kol. *Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats*, *J. Pharm. Pharmacol.* 55(2), 2003. DOI: 10.1211/002235702487., s. 199–200.
- [58] MANI, Renuka – NATESAN, Vijayakumar a kol., *Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action*, *Phytochemistry.* 145, 2018. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.09.016., s. 188–193.
- [59] SUNIL, Christudas – XU, Baojun a kol., *An insight the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin)*, *Phytochemistry.* 166, 2019. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112066., s. 4–5.
- [60] DAS, Abhijit – BAIDYA, Ratna a kol., *Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review*, *Biomed. Pharmacother.* 142, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112004., s. 7.
- [61] SONG, Xiaominting – TAN, Lu a kol., *Myricetin: A review of the most recent research*, *Biomed. Pharmacother.* 134, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111017., s. 1, 7.
- [62] JNAWALI, Hum Nath – JEON, Dasom a kol., *Antituberculosis activity of a naturally occurring flavonoid, isorhamnetin*, *J. Nat. Prod.* 22, 2016. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01033., s. 961–963.
- [63] GULLÓN, Beatriz – LÚ-CHAU, Thelmo a kol., *Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability*, *Trends in food science and technology* 67, 2017. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.07.008., s. 220–235.
- [64] CHOI, Seong Jin – LEE, Sung-Nae a kol., *Biological effects of rutin on skin aging*, *Int. J. Mol. Med.* 38(1), 2016. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2604. s. 357–363.
- [65] AHMADI, Zahra – MOHAMMADINEJAD, Reza a kol., *Biological and Therapeutic effects of troxerutin: molecular signaling pathways come into view*, *J. Pharmacopuncture*, 24(1), 2021. DOI: 10.3831/KPI.2021.24.1.1., s. 2–9.

- [66] CAZAUBON, Michele – BENIGNI, Jean-Patrick a kol., *Is there difference in the clinical efficacy of diosmin and micronized purified flavonoid fraction for the treatment of chronic venous disorders? Review of available evidence*, *Vasc. Health. Risk. Manag.* 16, 2021. DOI: 10.2147/VHRM.S324112., s. 591–598.
- [67] ZHENG, Yizhou – ZHANG, Rui a kol., *Metabolism and pharmacological activities of the natural health-benefiting compound diosmin*, *Food Funct.* 11(10), 2020. DOI: 10.1039/d0fo01598a., s. 8472–8477.
- [68] MAN, Mao-Qiang – YANG, Bin a kol., *Benefits of hesperidin for cutaneous functions*, *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2, 2019. DOI: 10.1155/2019/2676307., s. 2–11.
- [69] BELLAVITE, Paolo – DONZELLI, Alberto a kol., *Hesperidin and SARS-CoV-2: New light on the healthy function of citrus fruits*, *Antioxidants (Basel)*. 9(8), 2020. DOI: 10.3390/antiox9080742., s. 5–6.
- [70] ROOHBAKHSH, Ali – PARHIZ, Hamideh a kol., *Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases*, *Life Sci.* 124, 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.12.030., s. 67.
- [71] ADELLI, Goutham R. – HINGORANI, Tushar a kol., *Evaluation of topical hesperetin matrix film for back-of-the-eye delivery*, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 92, 2015. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.02.006., s. 2–3.
- [72] HOSTETLER, Gregory L. – RALSTON, Robin a kol., *Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism and bioactivity*, *Adv. Nutr.* 8(3), 2017. DOI: 10.3945/an.116.012948., s. 423–427.
- [73] BUTUN, Burcu – TOPCU, Gulacti a kol., *Recent advances on 3-hydroxyflavone derivatives: structures and properties*, *Mini. Rev. Med. Chem.* 18(2), 2018. DOI: 10.2174/1389557517666170425102827., s. 99–102.
- [74] CHOU, Pi-Tai – CHEN, Youn-Chan a kol., *Spectroscopy and dynamics of excited-state intramolecular proton-transfer reaction in 5-hydroxyflavone*, *Chemical Physics Letters* 340, 2001. DOI: 10.1016/S0009-2614(01)00399-2. s., 89–90.
- [75] SERDIUK, Illia – VARENIKOV, Andrii S. a kol., *7-hydroxyflavone revisited: spectral, acid-base properties, and interplay of the protolytic forms in the ground and excited states*, *J. Phys. Chem. A*. 118(17), 2014. DOI: 10.1021/jp412334x., s. 3069.

- [76] EMILI, Marco – GUIDI, Sandra a kol., *Treatment with the flavonoid 7,8-dihydroxyflavone: a promising strategy for a constellation of body and brain disorders*, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 62(1), 2022. DOI: 10.1080/10408398.2020.1810625., s. 23–42.
- [77] CHAN, Francis Ka-Ming – MORIWAKI, Kenta a kol., *Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity*, Methods Mol. Biol. 979, 2013. DOI: 10.1007/978-1-62703-290-2\_7., s. 1–2.
- [78] MLADĚNKA, Přemysl – ZATLOUKALOVÁ, Libuše a kol., *Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity*, Free Radic. Biol. Med. 49(6), 2010. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010., s. 966.
- [79] MLADĚNKA, Přemysl – MACÁKOVÁ, Kateřina a kol., *In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids*, J. Inorg. Biochem. 105(5), 2011. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.02.003., s. 696–697.
- [80] ŘÍHA, Michal – KARLÍČKOVÁ, Jana a kol., *In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids*, RSC Adv. 4(62), 2014. DOI: 10.1039/C4RA04575K., s. 32637.
- [81] PROCHÁZKOVÁ, D. – BOUŠOVÁ, I. a kol., *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*, Fitoterapia. 82(4), 2011. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.01.018., s. 518–519.
- [82] LIU, Zheng-Hong – YANG, Cheng-Xi a kol., *Baicalein, as a prooxidant, triggers mitochondrial apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells through mobilization of intracellular copper and reactive oxygen species generation*, Onco. Targets. Ther. 12, 2019. DOI: 10.2147/OTT.S222819., s. 10756–10759.
- [83] WOO, Anthony Y.H. – CHENG, Christopher H.K. a kol., *Baicalein protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation damage via a prooxidant mechanism*, Cardiovascular Research 65, 2005. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.09.027., s. 244–252.



## 10 Obrazové přílohy

Obrázek 1 – MARTENS, J. H. – WARREN, H. Barg a kol., *Microbial production of vitamin B12*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(3), 2002. DOI: 10.1007/s00253-001-0902-7., s. 276.

Obrázek 2 – Chemické struktury některých základních skupin vytvořené v programu ChemDraw.

Obrázek 3 – TIWARI, Prabha – MISHRA, Kaushala Prasad a kol., *Flavonoids sensitize tumor cells to radiation: molecular mechanisms and relevance to cancer radiotherapy*, *Int. J. Radiat. Biol.* 96(3), 2020. DOI: 10.1080/09553002.2020.1694193., 365.

Obrázek 4–26 Chemické struktury jednotlivých flavonoidů vytvořené v programu ChemDraw.

Obrázek 27a, b – Přehled všech testovaných flavonoidů a jejich účinnost chelatace kobaltu při 490 nm a 540 nm, grafy vytvořeny v programu GraphPad.

Obrázek 28–34 (a, b) Účinnosti chelatace kobaltu jednotlivými flavonoidy při 490 nm a 540 nm, grafy vytvořeny v programu GraphPad.

Obrázek 35 – Stabilita baikaleinu a  $\text{Co}^{2+}$ , graf vytvořen v programu GraphPad.

Obrázek 36 – Stabilita 3-hydroxyflavonu a  $\text{Co}^{2+}$ , graf vytvořen v programu GraphPad.

Obrázek 37 – Účinek 3-hydroxyflavonu na lýzu erytrocytů, graf vytvořen v programu GraphPad.

Obrázek 38 – Účinek baikaleinu na lýzu erytrocytů, graf vytvořen v programu GraphPad.

Obrázek 39 – Hlavní místa chelatace, vytvořen v programu ChemDraw.