

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKEJ BOTANIKY A EKOLÓGIE

RIGORÓZNA PRÁCA

**STANOVENIE CHELATÁCIE IÓNOV MEDI U FLAVÓNOV BATHOCUPROINOVOU
METÓDOU**

ASSESSMENT OF COPPER CHELATION OF FLAVONES BY BATHOCUPROINE METHOD

Vedúci rigoróznej práce: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Vedúci katedry: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, august 2014

Mgr. Alena Michalicová

POĎAKOVANIE

Ďakujem všetkým, ktorí mi pomohli pri získavaní podkladov pre túto rigoróznou prácu a vytvorili podmienky na jej spracovanie. Osobitné poďakovanie patrí vedúcej rigorózneho práce, PharmDr. Jane Karlíčkovéj, Ph.D., za jej cenné rady, pripomienky a ochotu. Tiež by som sa chcela poďakovať Doc. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D. a jeho spolupracovníkom z katedry Farmakológie a toxikológie za pomoc s experimentálnou časťou rigorózneho práce.

Táto práca bola spracovaná za podpory grantov GAUK 605712C a FRVŠ 664/2011/A a výskumného programu PRVOUK P-40.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri vypracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. CIEĽ PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
3.1. STOPOVÉ PRVKY.....	9
3.1.1. Meď.....	9
3.1.1.1. Chemické vlastnosti.....	9
3.1.1.2. Využitie.....	9
3.1.1.3. Metabolizmus medi v ľudskom organizme.....	10
3.1.1.4. Biologický význam.....	10
3.1.1.5. Meď v zdraví a chorobe.....	10
3.2. SEKUNDÁRNY METABOLIZMUS.....	13
3.2.1. Flavonoidy.....	13
3.2.1.1. Štruktúra a rozdelenie.....	14
3.2.1.2. Biosyntéza.....	15
3.2.1.3. Farmakokinetika a metabolizmus.....	16
3.2.1.4. Biologická aktivita.....	16
3.2.2. Potraviny a liečivé rastliny bohaté na flavonoidy.....	22
3.2.3. Mikrobiálna produkcia flavonoidov.....	23
3.2.4. Flavóny.....	23
3.2.4.1. 5-hydroxyflavón.....	24
3.2.4.2. Baikaleín.....	24
3.2.4.3. Baikalín.....	25
3.2.4.4. Chryzín.....	25
3.2.4.5. Mosloflavón.....	26
3.2.4.6. Negleteín.....	26
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	27
4.1. POMÔCKY.....	27
4.1.1. Materiál.....	27
4.1.2. Chemikálie.....	27
4.1.3. Prístrojové vybavenie.....	27

4.2. PRÍPRAVA ROZTOKOV.....	28
4.2.1. Príprava základných roztokov.....	28
4.2.2. Príprava pracovných roztokov.....	28
4.3. VŠEOBECNÉ POSTUPY.....	29
4.3.1. BCS test – Cu ⁺ - Chelatácia meďných iónov v pufre (pH 4.5,5.5,6.8,7.5).....	29
4.3.2. BCS test – Cu ²⁺ - Chelatácia meďnatých iónov v pufre (pH 4.5,5.5,6.8,7.5).....	30
4.4. ŠTATISTICKÁ ANALÝZA.....	31
5. VÝSLEDKY.....	32
5.1. KALIBRAČNÁ KRIVKA.....	32
5.2. CHELATÁCIA MEDI U VYBRANÝCH FLAVÓNOV.....	34
5.3. KONFIDENČNÉ INTERVALY.....	40
5.4. STABILITA KOMPLEXOV S MEĎNÝMI A MEĎNATÝMI IÓNMÍ.....	52
5.4.1. Meďné ióny.....	52
5.4.2. Meďnaté ióny.....	52
5.5. POROVNANIE CHELATAČNEJ AKTIVITY JEDNOTLIVÝCH FLAVÓNOV.....	53
6. DISKUSIA A ZÁVER.....	54
7. LITERATÚRA.....	57
8. ABSTRAKT.....	61
9. ABSTRACT.....	62

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

Skratka	Názov
4-kumaroyl-CoA	4-kumaroyl-koenzým A
5-OH	5-hydroxyflavón
AIDS	syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
APOE4	apolipoproteín E4
ATP	adenozíntrifosfát
ATP7A	gén kódujúci med' transportujúcu adenzíntrifosfatázu
ATP7B	gén kódujúci med' transportujúcu adenzíntrifosfatázu
BCS	disodná soľ bathocuproindisulfónovej kyseliny
BMI	index telesnej hmotnosti (Body Mass Index)
CTR1	transportér medi
Cu	med'
CuCl	chlorid med'ný
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT1	divalentný transportér kovov
Fe	železo
GIT	gastrointestinálny trakt
Glu	glukuronová kyselina
HA	hydroxylamín
HCl	kyselina chlorovodíková
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazín-1-ethánsulfonová kyselina
HIV	vírus nedostatku ľudskej imunity (Human Immunodeficiency Virus)
CHS	chalkon-syntáza
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou (Low Density Lipoprotein)
malonyl-CoA	malonyl-koenzým A
Mw	molekulová hmotnosť
NaCl	chlorid sodný
-OH	hydroxylová skupina
Se	selén
Zn	zinok

Tab.1: Zoznam použitých skratiek.

1. ÚVOD

Meď je jedným z esenciálnych prechodných prvkov a v ľudskom tele sa podieľa na mnohých fyziologických procesoch. Pre správne fungovanie organizmu je udržanie homeostázy medi nevyhnutné a jej poruchy vedú k rôznym patologickým zmenám a ochoreniam, ako je napríklad Wilsonova choroba, Menkesov syndróm, Alzheimerova choroba a iné. Chelátory medi, látky schopné tvoriť chelatačné komplexy s voľnými iónmi medi, by mohli predstavovať sľubné terapeutické riešenie ochorení spôsobených nadmerným množstvom týchto iónov v organizme[1].

Rastliny syntetizujú veľké množstvo organických látok, ktoré všeobecne rozdeľujeme do dvoch hlavných kategórií, a to primárne a sekundárne metabolity. Primárny metabolizmus je základom pre všetky živé organizmy a je charakterizovaný ako súhrn vzájomných vzťahov enzýmovo-katalytických reakcií, ktoré organizmu poskytujú energiu, biosyntetické intermediáty a kľúčové makromolekuly (proteíny a DNA). Sekundárny metabolizmus zahŕňa najmä biosyntetické procesy vedúce ku vzniku sekundárnych metabolitov. Sekundárne metabolity síce nie sú pre život rastlín nevyhnutné, plnia však množstvo významných funkcií pri ochrane rastlín pred bylinožravcami, patogénmi a UV žiarením, ďalej pôsobia ako atraktanty pre opeľovačov, podieľajú sa na transporte kovov cez biologické membrány, atď.[2].

Podľa chemickej štruktúry delíme sekundárne metabolity na (a) flavonoidy, fenolové a polyfenolové zlúčeniny, (b) terpenoidy a (c) alkaloidy obsahujúce dusík a zlúčeniny obsahujúce síru. Najpočetnejšiu skupinu fenolových sekundárnych metabolitov tvoria flavonoidy, ktoré sa ďalej delia na rôzne podskupiny – flavóny, flavonoly, flaván-3-oly, atď[3].

Niektoré sekundárne metabolity by mohli predstavovať potenciálne chelátory medi a chelatačnej aktivite šiestich vybraných flavónov je venovaná aj táto rigorózna práca.

2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto rigorózneho práce je nadviazať na doterajší výskum chelatačnej aktivity prechodných prvkov u flavonoidov, stanoviť schopnosť chelatacie iónov medi u šiestich vybraných flavónov so substitúciou na kruhu A (5-hydroxyflavón, baikaleín, baikalín, chryzín, mosloflavón a negleteín) pri štyroch rôznych pH (4.5, 5.5, 6.8 a 7.5) a odvodiť vzťahy medzi štruktúrou týchto látok a ich meď-chelatačnou aktivitou.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. STOPOVÉ PRVKY

Stopové prvky sú prvky nevyhnutné pre správny vývoj a fungovanie ľudského tela. V organizme sa nachádzajú len v limitovanom množstve (cca do 0,005%). Táto skupina obsahuje 8 prechodných prvkov (meď, vanád, chróm, magnézium, železo, kobalt, zinok a molybdén) a 3 nekovy (selén, fluór a jód). Mimoriadna pozornosť je venovaná medi (Cu), zinku (Zn) a selénu (Se), ktoré majú v organizme vďaka svojim vlastnostiam dôležité úlohy v rôznych biochemických procesoch[4].

3.1.1. Meď

Meď bola jedným z vôbec prvých objavených kovov a spolu so zlatom a striebrom sa dlho používala pri razení mincí či výrobe zbraní. Existujú dôkazy, že rôzne nádoby na varenie, vyrobené či už z medi alebo jej zliatin, sa používali pred viac ako 5000 rokmi.

3.1.1.1. Chemické vlastnosti

Meď je chemický prvok s protónovým číslom 29 a v periodickej tabuľke sa nachádza medzi prechodnými prvkami. Ide o ušľachtilý kov červenej farby s kockovou, plošne strednou kryštálovou štruktúrou. Má vysokú tepelnú vodivosť, tvárnosť za tepla aj za studena a je korózii vzdorná[5].

3.1.1.2. Využitie

Meď je na technické účely využívaná buď ako čistý kov alebo vo forme zliatin s rôznymi prvkami (mosadze, bronzy). Väčšina medených výrobkov nachádza uplatnenie pri výrobe elektrických drôtov, v pokrývačstve a klampiarstve. Je súčasťou niektorých doplnkov stravy a v poľnohospodárstve sa zas využíva pri ochrane dreva, kože a tkanív či pri ošetrovaní chorôb rôznych poľnohospodárskych plodín. Všeobecne známe biocídne vlastnosti medi sa využívajú na kontrolu a prevenciu rastu širokej škály mikrobiálnych organizmov[6-8].

3.1.1.3. Metabolizmus medi v ľudskom organizme

U cicavcov je hlavným zdrojom medi potrava a u človeka je jej priemerný príjem asi 1 mg na deň. Skonzumovaná meď je absorbovaná z črevného lúmen cez slizničnú bariéru do intersticiálnej tekutiny a portálnej krvi. Tento viacstupňový proces je regulovaný nešpecifickými transportérmi kovov, ako sú napríklad DMT1, ATP7A a CTR1. Z krvi je meď transportovaná prevažne do pečene, centrálnemu orgánu skladovania a homeostázy medi, v menšom množstve do obličiek, mozgu a ďalších tkanív. Z pečene sa vylučuje buď do krvi, kde cirkuluje naviazaná na ceruloplazmín, alebo do žlče. Oba tieto procesy sú riadené génom ATP7B a jeho poruchy môžu viesť k nadmernej akumulácii medi. Hlavnou cestou vylučovania medi je žlč, množstvá vylúčené v moči sú zanedbateľné[9].

3.1.1.4. Biologický význam

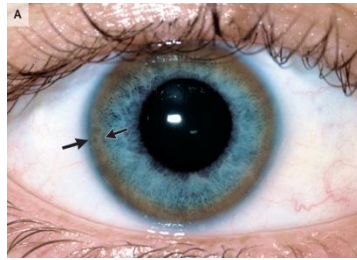
V ľudskom organizme je meď po železe a zinku tretím najrozšírenejším stopovým prvkom. Zabezpečuje správne fungovanie rôznych enzýmov, ktoré sa zúčastňujú dôležitých metabolických procesov, ako je napríklad bunkové dýchanie, tvorba ATP, biosyntéza neurotransmitterov, tvorba peptidových hormónov, eliminácia voľných radikálov, tvorba sietí elastínu, kolagénu a keratínu, produkcia melanínu a homeostáza železa. Meď ďalej ovplyvňuje myelinizáciu nervových vlákien, reguláciu cirkadiálneho rytmu a taktiež súvisí s procesom koagulácie a angiogenézy. Na druhej strane však môže byť vďaka svojim chemickým vlastnostiam vysoko toxická. Vyskytuje sa totiž v dvoch oxidačných stavoch Cu (I) a Cu (II), medzi ktorými dochádza k reverzibilnej výmene. Táto výmena je základom enzymatických reakcií, no môže viesť aj k produkcii škodlivých voľných radikálov, ktoré majú za následok závažné poškodenia nukleových kyselín, proteínov a lipidov. Citlivá regulácia homeostázy medi je teda pre správne fungovanie organizmu kľúčovým bodom[6].

3.1.1.5. Meď v zdraví a chorobe

Poruchy mechanizmov zodpovedných za homeostázu medi majú za následok vážne zdravotné komplikácie postihujúce najmä mozog. Najčastejšími chorobami spôsobenými výkyvom hladiny medi sú Wilsonova choroba (prebytok medi) a Menkesov syndróm (deficit medi[10]).

Wilsonova choroba

Wilsonova choroba je vzácné sa vyskytujúce, geneticky podmienené, metabolické ochorenie charakterizované nadmernou akumuláciou medi a následnou intoxikáciou pečene, mozgu, rohovky (obr.1) a ďalších orgánov. Porucha vylučovania medi z organizmu je spôsobená mutáciami génu ATP7B, zodpovedného za transport medi z hepatocytov do žlče. Defekt tohto génu spôsobuje, že meď prijatá potravou nemôže byť inkorporovaná do transportného enzýmu ceruloplazmínu a následne z tela vylúčená[11].



Obr.1: Tzv. Kayser-Fleischer prsteň – pigmentový hrdzavo hnedý kruh okolo rohovky[12].

Menkesov syndróm

Menkesov syndróm je multisystémová letálna porucha metabolizmu medi zapríčinená mutáciami ATP7A génu. Medzi charakteristické prejavy patrí progresívna neurodegenerácia, poruchy spojivového tkaniva, hypotermia, hypoglykémia, pretrvávajúca žltacka po narodení a štruktúrne zmeny vlasov (obr.2). Klinický priebeh tohto ochorenia je veľmi závažný a väčšina pacientov postihnutých klasickým Menkesovým syndrómom umiera v rannom detstve do tretieho roka života. Miernejšou formou je tzv. syndróm okcipitálneho rohu (Occipital horn syndrome) postihujúci najmä spojivé tkanivá[9].



Obr.2: Typické štruktúrne zmeny vlasov pri Menkesovom syndróme[13].

Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba, vyznačujúca sa cerebrovaskulárnymi a neuronálnymi poruchami vedúcimi k postupnému zhoršovaniu kognitívnych funkcií, je celosvetovo najčastejšie sa vyskytujúca forma demencie[14, 15]. Medzi hlavné neuropatologické prejavy patria senilné plaky (extracelulárne depozity amyloidu- β) a neurofibrilárne kľbká (intracelulárne agregáty tvorené proteínom tau)[16].

V súčasnosti je dostupná len symptomatická liečba, preto je na prevenciu kladený obrovský dôraz. Medzi hlavné faktory ovplyvňujúce vznik a rozvoj Alzheimerovej choroby patrí vek, pohlavie, rodinná anamnéza, prítomnosť APOE4 alely, systolický krvný tlak, BMI, hladina cholesterolu, fyzická aktivita a spôsob stravovania.

Je dokázané, že existuje korelácia medzi určitými typmi stravy (napr. stredomorská kuchyňa) a zníženým výskytom Alzheimerovej choroby. Medzi dve hlavné zložky potravy ovplyvňujúce rozvoj rôznych ochorení patria mikronutrienty (vitamíny a minerály) a makronutrienty (cukry, tuky, bielkoviny). Deficit mikronutrientov dôležitých v metabolizme aminokyselín a v antioxidantných procesoch je spájaný s kognitívnymi poruchami u starších ľudí. Na druhej strane vysoký príjem nasýtených mastných kyselín zvyšuje oxidatívny stres a ukladanie amyloidu- β v mozgu.

U veľkého množstva pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou sú pozorované poruchy v metabolizme medi, ktorá hrá podľa viacerých štúdií kľúčovú rolu v procese oxidatívneho stresu. Oxidatívny stres je patogénny proces veľmi úzko spojený so vznikom Alzheimerovej choroby, preto sa predpokladá, že potrava s nízkym obsahom medi by mohla predchádzať vzniku tejto choroby[14, 17].

Ostatné ochorenia

Systémové zmeny spôsobené poruchami metabolizmu medi sú spojené aj s ďalšími chronickými ochoreniami, ako napríklad diabetes, kardiovaskulárne ochorenia, ateroskleróza, atď. So zvýšenou hladinou medi a následným oxidačným stresom súvisí aj vznik niektorých špecifických nádorových ochorení (rakovina prsníka, krčka maternice, vaječníkov, prostaty, pľúc, žalúdka a leukémia)[14].

Vzhľadom na prítomnosť porúch homeostázy medi u rôznych patologických stavov, by mohli chelátory medi predstavovať sľubný terapeutický nástroj[18].

3.2. SEKUNDÁRNY METABOLIZMUS RASTLÍN

Rastliny sú schopné syntetizovať obrovské množstvo organických zlúčenín, ktoré vo všeobecnosti rozdeľujeme na primárne a sekundárne metabolity, presné hranice medzi týmito dvoma skupinami sú však často ťažko definovateľné. Primárne metabolity hrajú esenciálnu úlohu pri životne dôležitých procesoch, ako je fotosyntéza, dýchanie, správny rast a vývoj. Do tejto kategórie patria fytosteroly, lipidy, nukleotidy, aminokyseliny a organické kyseliny. Sekundárne metabolity síce nie sú pre život rastliny nevyhnutné, majú však veľký význam pri ochrane rastlín pred bylinožravcami, mikrobiálnymi infekciami a UV žiarením, pôsobia ako atraktanty pre opel'ovačov a pre zvieratá roznášajúce semená na svojich telách alebo v truse, ďalej ako alelopatické medzičlánky a signálne molekuly pri tvorbe koreňových hlúz fixujúcich vzdušný dusík u strukovín.

Na základe biosyntetického pôvodu delíme sekundárne metabolity do troch hlavných kategórií – (a) flavonoidy, fenolové a polyfenolové zlúčeniny, (b) terpenoidy a (c) alkaloidy obsahujúce dusík a zlúčeniny obsahujúce síru.

Fenoly obsahujú vo svojej štruktúre najmenej jeden aromatický kruh, na ktorý je naviazaná jedna alebo viac hydroxylových (–OH) skupín[3].

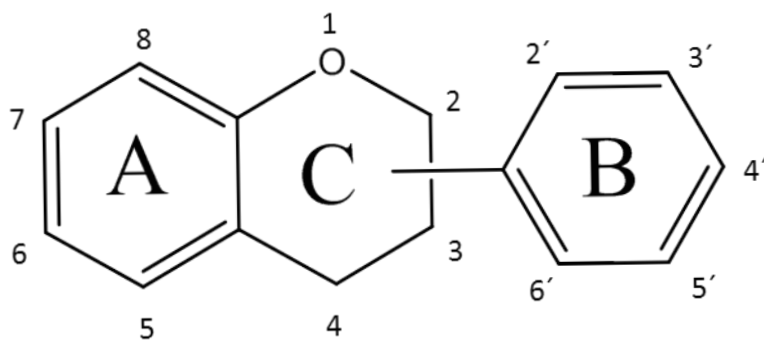
3.2.1. Flavonoidy

Najpočetnejšiu skupinu fenolov tvoria flavonoidy, ktoré sú neoddeliteľnou súčasťou našej každodennej stravy. Nachádzajú sa najmä v ovocí, zelenine, mnohých liečivých rastlinách a môžeme ich nájsť napríklad aj v káve, čaji alebo červenom víne. V ľudskom organizme sú schopné ovplyvňovať aktivitu rôznych enzýmov a regulovať fungovanie mnohých bunkových systémov. Niektoré flavonoidy vykazujú tiež výrazné antioxidačné, antihepatotoxické, antialergické, protizápalové, antiosteoporotické, antidiabetické či dokonca antitumorózne vlastnosti[19, 20]. Už v roku 1930 bola z pomarančov izolovaná nová látka. V tej dobe bola pomenovaná ako vitamín P a až neskôr sa zistilo, že šlo o flavonoid rutín. Odvtedy bolo identifikovaných viac ako 4000 druhov flavonoidov[21].

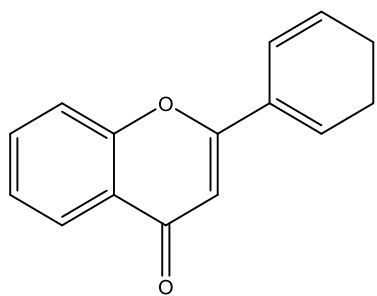
3.2.1.1. Štruktúra a rozdelenie

Flavonoidy sú polyfenolové sekundárne metabolity vyskytujúce sa buď vo forme aglykónu (necukornatá zložka) alebo naviazané na molekulu cukru vo forme glykozidu. U všetkých flavonoidov je základom štruktúry tzv. flaván (obr.3), skladajúci sa z dvoch benzénových jadier (A a B), ktoré sú navzájom spojené trojuhlíkatým reťazcom – pyránom (C). Podľa typu substituentov naviazaných na základný skelet sa flavonoidy delia na flavóny, flavonoly, flavan-3-oly, izoflavóny, flavanóny a antokyanidíny. V menších množstvách je možné nájsť aj dihydroflavonoly, flavan-3,4-dioly, kumaríny, chalkóny, dihydrochalkóny a auróny (obr.4)[3].

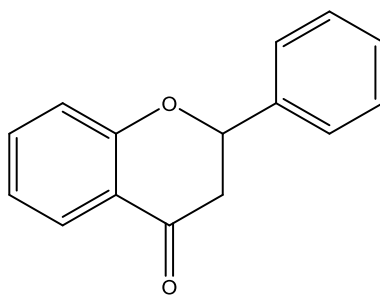
Jednotlivé skupiny flavonoidov sa líšia úrovňou oxidácie a substitúciou na kruhu C. V rámci skupiny sa jednotlivé zlúčeniny odlišujú substitúciou na kruhoch A a B[21].



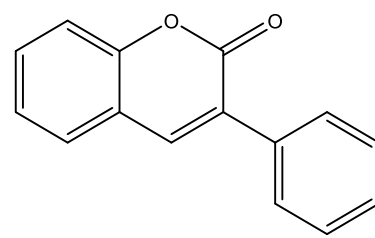
Obr.3: Flaván – spoločný štruktúrny základ flavonoidov[22].



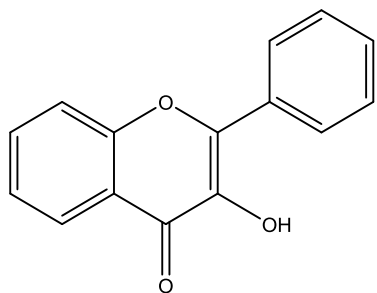
Flavón



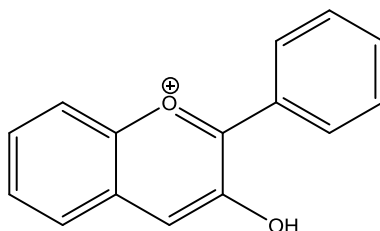
Flavanón



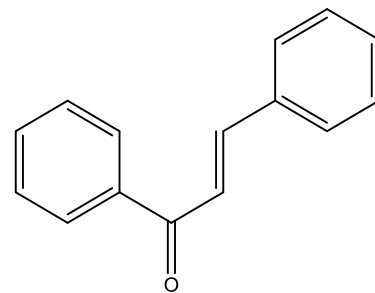
Kumarín



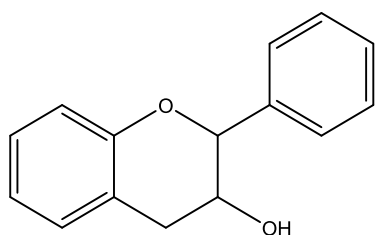
Flavonol



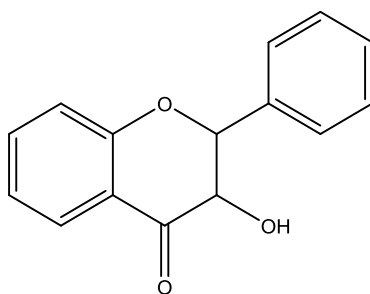
Antokyanidín



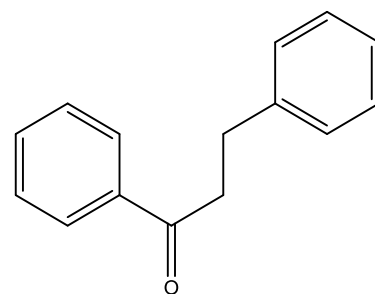
Chalkón



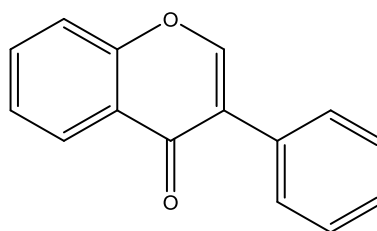
Flavan-3-ol



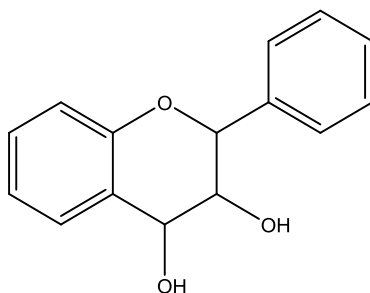
Dihydroflavonol



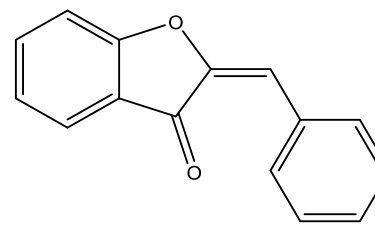
Dihydrochalkón



Izoflavón



Flavan-3,4-diol

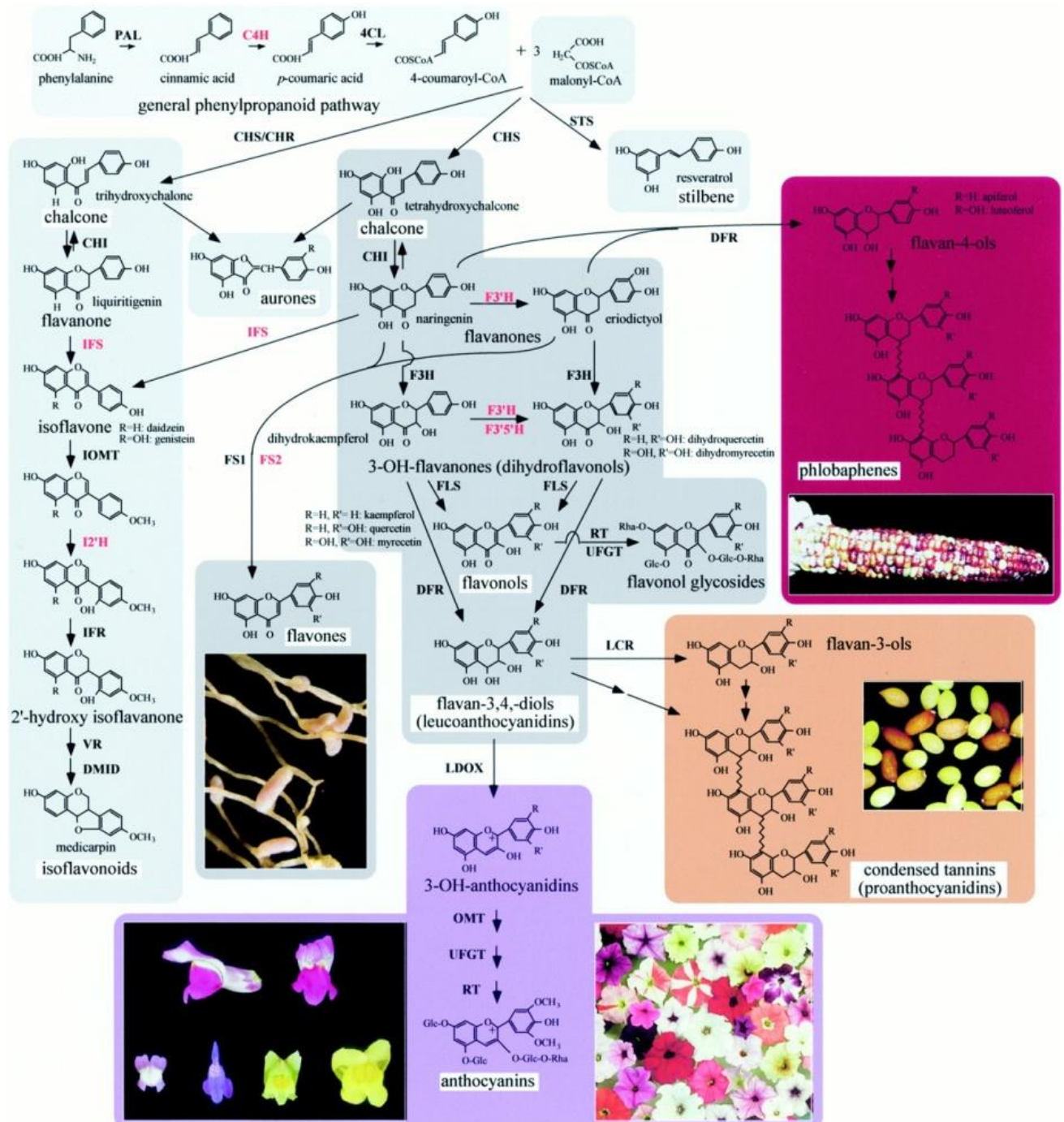


Aurón

Obr.4: Jednotlivé podskupiny flavonoidov[3].

3.2.1.2. Biosyntéza

Flavonoidy sú biosyntetizované tzv. fenylypropanoidovou dráhou. Prvým krokom biosyntézy flavonoidov je vznik 4-kumaroyl-koenzýmu A (4-kumaroyl-CoA), odvodeného od L-fenylalanínu. Ten vstupuje za pomoci enzýmu chalkon-syntázy (CHS) do kondenzačnej reakcie s tromi molekulami malonyl-koenzýmu A (malonyl-CoA) a vzniká kľúčový medziprodukt – tetrahydroxychalkón. Prostredníctvom následných enzymaticky katalyzovaných metabolických modifikácií sú rastliny schopné vytvárať rôzne podskupiny flavonoidov (obr.5)[23, 24].



Obr.5: Základná schéma biosyntézy jednotlivých typov flavonoidov[23].

3.2.1.3. Farmakokinetika a metabolizmus

Flavonoidy nachádzajúce sa v ovocí, zelenine či liečivých rastlinách môžu byť veľmi prospešné pri prevencii rôznych ochorení, ako sú kardiovaskulárne choroby alebo rakovina. Tento efekt je závislý na ich množstve v potrave a schopnosti organizmu vstrebať tieto látky.

Metabolizmu a farmakokinetike flavonoidov je v poslednom desaťročí venovaná veľká pozornosť. Podľa štúdií existujú medzi jednotlivými typmi flavonoidov značné rozdiely a je dokázané, že v strave najpočetnejšie obsiahnuté flavonoidy nemusia zákonite vykazovať najvyššiu koncentráciu flavonoidov alebo ich metabolitov *in vivo*. Črevná absorpcia jednotlivých flavonoidov sa pohybuje od 0 do 60% a polčas eliminácie od 2 do 28 hodín. Absorbované flavonoidy podstupujú v epitelových bunkách tenkého čreva a hlavne v pečeni rozsiahle metabolické premeny[25].

3.2.1.4. Biologická aktivita

Rozsiahly výskyt flavonoidov v rastlinnej ríši nie je náhodný. Nielen že majú v kvetoch funkciu farbených pigmentov, ale pôsobia tiež ako inhibítory enzýmov, prekursorov toxických látok, chelatačné činidlá škodlivých kovov, redukčné činidlá a taktiež chránia rastliny pred UV žiarením. Zároveň sú zapojené do procesov, ako je fotosyntéza, dýchanie, prenos energie, morfogenéza, aktivita rastlinných rastových hormónov, regulácia a génová expresia. Prostredníctvom potravinového reťazca sa flavonoidy dostávajú aj do ľudského organizmu. Existuje veľké množstvo údajov dokazujúcich širokú škálu biologických aktivít flavonoidov u ľudí. V medicíne sú napríklad využívané na ochranu cievnej integrity, ako antiosteoporotické alebo antihepatotoxické prostriedky. U niektorých flavonoidov bola testovaná ich aktivita na experimentálnych nádorových modeloch, a to *in vitro* aj *in vivo*. Iné flavonoidy zas vykazujú inhibičnú aktivitu rôznych enzýmov. Vďaka svojim antiulceróznym, antispasmodickým a antidiarhoickým účinkom priaznivo ovplyvňujú aj gastrointestinálny trakt[24]. Flavonoidy teda vykazujú širokú paletu biologických vlastností, najlepšie preštudovaná je však ich schopnosť pôsobiť ako antioxidanty.

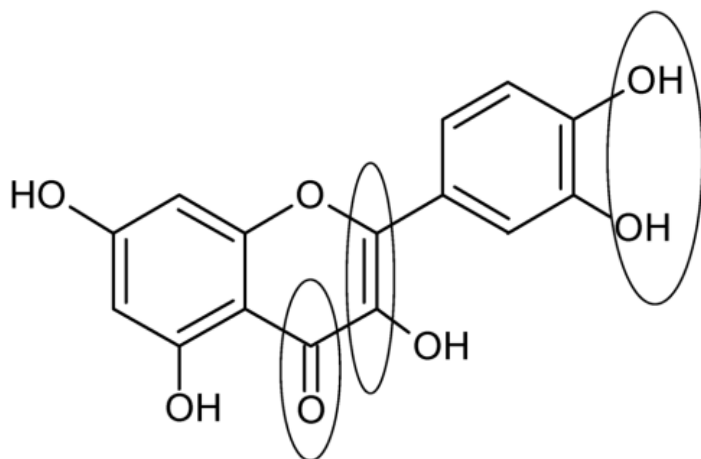
Antioxidačná aktivita flavonoidov

Veľké množstvo voľných radikálov v živých organizmoch môže spôsobiť rozsiahle poškodenia tkanív, bunkovú smrť, alebo môže viesť k rôznym ochoreniam, ako je rakovina, kardiovaskulárne poruchy, ateroskleróza, nervové poruchy a mnohé iné.

Antioxidanty sú látky schopné vychytávať voľné radikály a zabraňovať tak závažným poškodeniam organizmu. Antioxidačné pôsobenie bolo dokázaná aj u mnohých flavonoidov a tiež flavónov. Ich antioxidačná aktivita závisí najmä od usporiadania funkčných skupín. Substitúcia, konfigurácia a celkový počet hydroxylových skupín významne pôsobia na mechanizmus antioxidačného pôsobenia, či už na vyplavovanie voľných radikálov alebo schopnosť vytvárať chelatačné komplexy s iónmi prechodných kovov (meď, železo), čím ovplyvňujú ich dostupnosť ako katalyzátorov oxidačno-redukčných procesov[21].

Antioxidačná aktivita flavonoidov je vo všeobecnosti spojená s tromi chemickými znakmi (obr.6):

- *ortho*-dihydroxy štruktúra v kruhu B
 - prítomnosť dvojnej väzby medzi 2. a 3. uhlíkom v kruhu C
- a/a lebo
- prítomnosť oxo skupiny na uhlíku 4 v kruhu C



Obr.6: Vplyv chemickej štruktúry na antioxidačnú aktivitu flavonoidov[26].

Flavóny, ako napríklad chryzín, luteolín či apigenín, obsahujúce na kruhu A alebo B dve až tri hydroxylové skupiny vykazujú antioxidačnú aktivitu už vo veľmi nízkych koncentráciách[27].

Flavonoidy a ochorenia srdca

Epidemiologické pozorovania, klinický výskum ako aj experimentálne štúdie dokazujú ochranný účinok flavonoidov a flavónov (apigenín, akacetín) na kardiovaskulárny systém. Ich protektívne účinky zahŕňajú inhibíciu oxidácie LDL lipoproteínov, zníženie cievnej permeability, antiagregačnú a antiflogistickú aktivitu, hypotenzné a priame vazodilatačné pôsobenie. Tento biologický potenciál flavonoidov otvára nové možnosti ich využitia v primárnej a sekundárnej prevencii aterosklerózy a jej klinických následkov (infarkt myokardu, mozgová mŕtvica, atď.) či dokonca ako potenciálnych terapeutických prostriedkov[27, 28].

Antitumorózny efekt

Rakovina je jedno z najrozšírenejších smrteľných ochorení, postihujúce ľudí na celom svete. V dôsledku tohto ochorenia dochádza k progresívnej transformácii zdravých buniek na malígne[27].

Podľa niektorých štúdií môže príjem flavonoidov v potrave znížiť riziko vzniku nádorových ochorení prsníkov, hrubého čreva, pľúc, prostaty a pankreasu. Predpokladaným mechanizmom protinádorového účinku by mala byť inhibícia proliferácie, zápalu, invázie, metastáz a aktivácia apoptózy[29].

Medzi flavóny redukujúce riziko rakoviny tráviaceho alebo dýchacieho traktu patrí napríklad luteolín. Apigenín zas môže viesť k zníženiu miery recidívy a riziku vzniku určitých druhov rakoviny, prevažne prsníka, zažívacieho traktu, kože, prostaty a niektorých hematologických malignít[27].

Antihepatotoxická aktivita

Flavonoidy získané z pestreca mariánskeho, *Sylibum marianum* (*Asteraceae*), boli po stáročia používané v ľudovom liečiteľstve na liečbu ochorení pečene. Účinné zložky nachádzajúce sa v zmesi nazývanej sylimarín majú preukázateľne pozitívny efekt na zdravé, alebo nie trvalo poškodené bunky, no vykazujú tiež priaznivý vplyv na regeneračnú schopnosť pečene po čiastočnej hepatektómii. Antihepatotoxický účinok bol zistený aj u ďalších flavonoidov, ako napríklad kolaviron, hispidulín, kvercetín alebo oxerutín[21, 24].

Antialergická aktivita

Antialergický efekt flavonoidov sa vysvetľuje ich schopnosťou ovplyvňovať produkciu histamínu. Flavonoidy inhibujú enzýmy zodpovedné za uvoľňovanie histamínu z mastocytov a bazofilných granulocytov. Ako príklad môžeme uviesť flavonoid kvercetín[24].

Protizápalová aktivita

Zápal je prirodzená reakcia imunitného systému na akútne poranenie tkaniva, mikrobiálnu infekciu alebo chemické podráždenie. Dlhodobý zápal však môže viesť k rôznym typom chronických ochorení. Významnú úlohu zápal zohráva napríklad pri astme, ateroskleróze, Alzheimerovej chorobe, reumatoidnej artritíde, diabete, Crohnovej chorobe a mnohých ďalších. U niektorých flavonoidov, ako napríklad hesperidín, apigenín, luteolín alebo kvercetín, bola preukázaná schopnosť významne ovplyvňovať funkciu imunitného systému a zápalových buniek. Zasahujú najmä na úrovni enzymatických systémov, podieľajúcich sa na vzniku zápalového procesu, predovšetkým tyrozín a serín-treonín proteín kinázy[21, 27].

Diabetes mellitus

Nesprávne stravovanie a celkový životný štýl má často za následok obezitu, ktorá môže viesť až k inzulínovej rezistencii a vzniku diabetes mellitus druhého typu.

Značný dôraz je preto kladený najmä na prevenciu vzniku tohto ochorenia a na zníženie rizikových faktorov. Z rastlinnej ríše sa osvedčilo niekoľko flavónov ako napríklad baikalín a luteolín, ktoré sú schopné inhibovať α -glukozidázu, enzým štiepiaci v tenkom čreve vyššie sacharidy obsiahnuté v potrave na jednoduché monosacharidy (glukózu). Tieto flavóny vykazujú tiež potenciál znižovať postprandiálnu hyperglykémiu[27, 30].

Flavonoidy a ochorenia GIT

Flavonoidy môžu priaznivo ovplyvňovať aj rôzne poruchy gastrointestinálneho traktu, ako sú žalúdočné vredy, hnačka, chronický zápal či rakovina. Pri ochrane slizníc uplatňujú flavonoidy rozličné mechanizmy – inhibícia sekrécie žalúdočnej kyseliny, priamy prostaglandín E2 závislý cytoprotektívny efekt či antioxidantné pôsobenie. Ich baktericídny účinok na *Helicobacter pylori* zas pomáha znižovať črevnú motilitu a sekréciu a zlepšuje tak akútne

i chronické hnačky. Ochrana črevnej sliznice pred oxidačným stresom redukuje chronické zápalové procesy[31].

Flavón rutín je známy svojim ulceroprotektívnymi účinkami proti žalúdočným léziám spôsobených alkoholom a tiež proti gastritíde a peptickému vredu vyvolaných oxidatívnym stresom a zápalom. Ďalším potenciálnym flavónom by mohol byť nobiletín, u ktorého je dokázaný protektívny účinok pred poškodením žalúdočnej sliznice potkanov alkoholom a kyselinou chlorovodíkovou. Gastroprotektívne účinky boli tiež dokázané u chryzínu, baikalínu, či oroxylínu A[27].

Antibakteriálna, antifungálna a antivirotická aktivita

Neustály nárast odolnosti patogénnych vírusov, baktérií, húb a prvokov voči dostupným liekom je celosvetovým problémom. Preto je čoraz väčšia pozornosť venovaná hľadaniu nových potenciálnych látok s odlišnými mechanizmami účinku. Jednou z možností by mohli byť aj rastlinné flavonoidy, ktoré majú vo svojom bohatom spektre biologických aktivít aj preukázateľné antimikrobiálne, antivirotické a antifungálne účinky[32, 33].

Antimikrobiálne účinky flavonoidov boli pozorované u širokej škály mikroorganizmov *in vitro* (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, atď.[21, 32]. Medzi flavóny s antimikrobiálnou aktivitou patria luteolín, apigenín, 8-bromoflavón a iné[27].

Antivirotická aktivita flavonoidov je spojená hlavne s inhibíciou rôznych enzýmov spojených so životným cyklom testovaných vírusov (*herpes simplex vírus typ 1 a 2*, *influenza vírus*, *adenovírus*, *poliovírus*, *HIV*, *respiračný syncytiálny vírus*, *varicella zoster vírus*, atď[33]. Spomedzi flavónov sú to skutelarín, dinatín, robustaflavón a ďalšie.

Iné typy flavónov sú zas známe schopnosťou inhibovať klíčenie spór rastlinných patogénov, preto bolo ich antifungálne použitie skúmané aj u človeka. Ako príklad môžeme uviesť ginkgetín, bilobetín alebo izokryptomerín[27].

Anti-HIV aktivita

AIDS predstavuje najväčšiu a najničivejšiu pandémiu súčasnosti, ktorou bolo v celosvetovom meradle infikovaných približne 70 miliónov ľudí. Niektoré potenciálne liečivá sú už v klinickom testovaní, no problémom sú hlavne ich závažné vedľajšie účinky. Určitým

riešením by mohli byť v budúcnosti aj niektoré typy flavonoidov, u ktorých bola anti-HIV aktivita vedecky dokázaná. Z flavónov ide o morín, kverketagetín, talasiolín či 3-methoxyflavón[27].

Ostatné účinky

Flavonoidy a flavóny ovplyvňujú aj mnohé ďalšie biologické procesy a predstavujú širokú škálu ďalších veľmi zaujímavých aktivít. Niektoré z nich pôsobia napríklad ako inhibítory xantín-oxidázy, fosfodiesterázy, majú spazmolytický, vazorelaxačný, antitrombotický, fotoprotektívny, antiosteoporotický, imunomodulačný či antihelmintický účinok. Ďalšie sa zas využívajú v terapii hyperplázie prostaty[27].

3.2.2. Potraviny a liečivé rastliny bohaté na flavonoidy

Flavonoidy tvoria najpočetnejšiu skupinu fenolových zlúčenín a vyskytujú sa prakticky vo všetkých častiach rastlín. Tieto rastlinné metabolity sú neoddeliteľnou súčasťou ľudskej a zvieracej stravy. Flavonoidy sú v potravinách zodpovedné najmä za farbu, chuť, prevenciu tukov pred oxidáciou a ochranu vitamínov a enzýmov. V ľudskej strave patria medzi najhojnejšie zastúpené flavonoidy sójové izoflavóny, flavonoly a flavóny. Vo väčšine ovocia zas môžeme nájsť proanthokyanidíny, ich množstvo je však veľmi variabilné. Príprava a spracovanie potravín môže hladinu flavonoidov výrazne znižovať.

Veľká pozornosť je vďaka rozsiahlym biologickým vlastnostiam v súčasnosti venovaná aj liečivým rastlinám s obsahom flavonoidov. Ako príklad môžeme uviesť izoflaván glabridín, obsiahnutý v sladovke hladkoplodej, *Glycyrrhiza glabra* (*Fabaceae*), ktorý je schopný inhibovať oxidáciu LDL a chrániť tak organizmus pred vznikom kardiovaskulárnych chorôb. V boji proti tejto skupine ochorení by mohlo preventívne pôsobiť aj pitie čierneho alebo zeleného čaju, ktoré má za následok znižovanie koncentrácie cholesterolu v krvi a krvného tlaku. Podľa niektorých štúdií by mohli mať flavonoidy vyskytujúce sa v bobuliach pozitívny účinok na pamäť u starších ľudí. Terapeutický efekt flavonoidov ovplyvňuje predovšetkým ich rozpustnosť.

Príklady potravín – citrusy, čaj, červené víno, bobule, cibuľa, ovocné a paradajkové šupy.

Príklady liečivých rastlín – *Ruta graveolens* (*Rutaceae*), *Cannabis sativa* (*Cannabaceae*), *Fagopyrum esculentum* (*Polygonaceae*), *Aloe vera* (*Aloaceae*)[21, 34-36].

3.2.3. Mikrobiálna produkcia flavonoidov

Vzhľadom na nízke množstvá flavonoidov získaných rastlinnou produkciou a extrémnosť reakčných podmienok pri chemickej produkcii sa v súčasnosti mnoho výskumných skupín zameriava na produkciu flavonoidov v mikroorganizmoch, a to prostredníctvom metabolického inžinierstva a syntetickej biológie. Na tento účel sú využívané rôzne prokaryoty a eukaryoty, ako napríklad *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces venezuelae* a *Phellinus igniarius*[37-39].

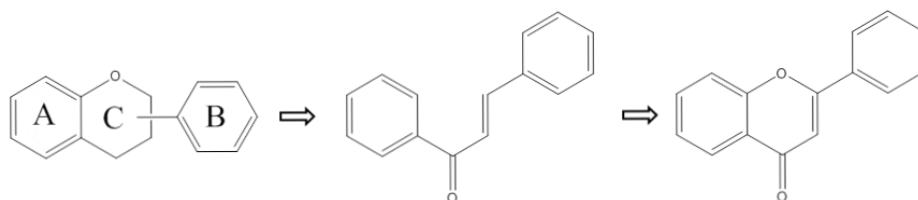
3.2.4. Flavóny

Flavóny sú jednou z hlavných podskupín flavonoidov. Ide o prírodné produkty, patriace do skupiny kyslíkatých heterocyklov, prítomných najmä v ovocí a zelenine.

Vo významnejších množstvách sa nachádzajú v zeleri, petržlene, niektorých bylinách a polymetoxylované flavóny boli objavené v citrusoch. Sú súčasťou každodennej stravy a vďaka množstvu biologických účinkov majú na naše zdravie pozitívny vplyv. Podobne ako flavonoidy vykazujú napríklad antioxidačnú, protizápalovú, antimikrobiálnu, antialergickú, protinádorovú, či cytotoxickú aktivitu.

Rôzne biologické účinky sú závislé od povahy substituentov na základnom flavónovom skelete. Aj keď sú u flavónov pozorované na základnom skelete rôzne druhy substitúcií, ako napríklad hydroxylácia, metylácia, *O*- alebo *C*-alkylácia, či glykozylácia, najčastejšie sa vyskytujú v podobe tzv. 7-*O*-glykozidov.

Flavóny sú bezfarebné až žlté kryštalické látky, rozpustné vo vode a ethanole. Vznikajú cyklizáciou z chalkónov (obr.7)[3, 40, 41].



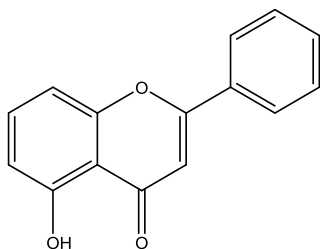
Obr.7: flavonoid \rightleftharpoons chalkón \rightleftharpoons flavón.

Táto práca je venovaná biologickej aktivite nasledujúcich šiestich vybraných flavónov.

3.2.4.1. 5-HYDROXYFLAVÓN (Primuletín)

- antioxidačný a protizápalový účinok
- schopnosť aktivovať vápnikové a ATP-senzitívne draselné kanály, čo má za následok vazorelaxačný efekt
- slabý cytotoxický efekt na B 16 melanómové bunky
- antagonistický účinok na androgónový receptor, možné využitie v terapii rakoviny prostaty
- vďaka prítomnosti chelatačnej 5-hydroxy-4-keto skupiny je schopný vytvárať komplexy s iónmi kovov (Cu (II), Fe (III), atď.)

Výskyt – rastliny patriace do *Primula* sp. (*Primulaceae*) a *Dionisya* sp. (*Primulaceae*)[42]

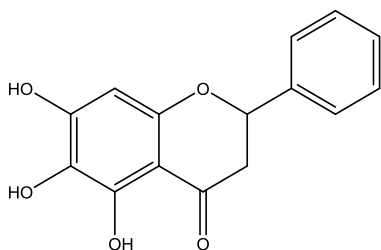


Obr.8: 5-hydroxyflavón

3.2.4.2. BAIKALEÍN

- aglykón baikalínu
- vďaka schopnosti inhibovať niektoré typy lipoxigenáz vykazuje protizápalovú aktivitu
- hepatoprotektívny účinok, v tradičnej čínskej medicíne je využívaný pri rôznych ochoreniach pečene, ako napríklad hepatitída, žltacka, karcinóm a cirhóza
- schopnosť indukovať apoptózu v rakovinových bunkách pankreasu (účinnější než baikalín)
- antibakteriálny účinok
- schopnosť tvoriť chelatačné komplexy s iónmi kovov

Výskyt – *Scutellaria baicalensis* (*Lamiaceae*), *Oroxylum indicum* (*Bignoniaceae*)[43-47]

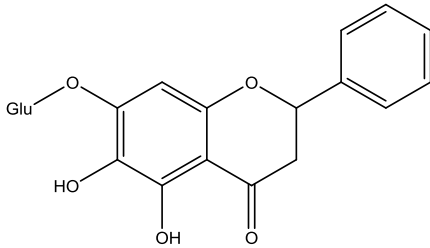


Obr.9: Baikaleín

3.2.4.3. BAIKALÍN

- glukuronid baikaleínu
- hepatoprotektívny účinok , v tradičnej čínskej medicíne je využívaný pri ochoreniach pečene, ako napríklad hepatitída, žltáčka, karcinóm a cirhóza
- schopnosť indukovať apoptózu v rakovinových bunkách pankreasu
- schopnosť tvoriť chelatačné komplexy s iónmi kovov

Výskyt – *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae)[43, 46, 47]

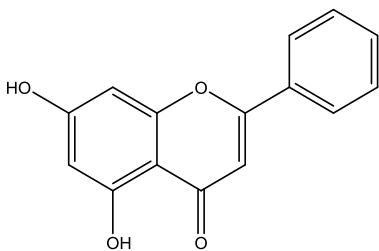


Obr.10: Baikalín

3.2.4.4. CHRÝZÍN

- silný inhibítor aromatázy, enzýmu zodpovedného za premenu testosterónu na estrogény, vo vysokých dávkach sa používa na zvýšenie hladiny testosterónu
- protizápalový účinok
- potenciálny anxiolytický účinok

Výskyt – *Passiflora caerulea* (Passifloraceae), *Passiflora incarnata* (Passifloraceae), *Oroxylum indicum* (Bignoniaceae)[48-51]

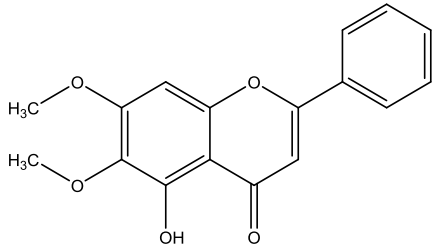


Obr.11: Chryzín

3.2.4.5. MOSLOFLAVÓN

- antioxidačné pôsobenie
- protizápalový efekt
- imunomodulačný účinok

Výskyt – *Desmos chinensis* (Annonaceae), *Actinocarya tibetica* (Boraginaceae)[52-54]

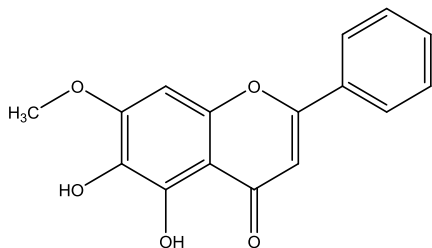


Obr.12: Mosloflavón

3.2.4.6. NEGLETEÍN

- antioxidačné pôsobenie
- protizápalový efekt
- imunomodulačný účinok

Výskyt – *Centaurea clementei* (Asteraceae), *Actinocarya tibetica* (Boraginaceae), *Mosla chinensis* (Lamiaceae), *Bauhinia purpurea* (Fabaceae)[52-56]



Obr.13: Negleteín

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. POMÔCKY

4.1.1. Materiál

- 96-jamkové mikrotitračné doštičky (Brand)
- Automatické pipety rôznych objemov
- Viackanálové pipety rôznych objemov (Brand)

4.1.2. Chemikálie

- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner)
- Disodná soľ bathocuproindisulfónovej kyseliny (BSC) (Sigma Aldrich)
- Hematoxylín (HEM) (Sigma Aldrich)
- Hydroxylamín hydrochlorid (HA) (Sigma Aldrich)
- Pentahydrát síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich)
- Pufre – octan sodný (pH 4,5 a 5,5) a HEPES (pH 6,8 a 7,5)
- Testované látky (Sigma Aldrich) – flavóny – 5-hydroxyflavón, baikaleín, baikalín, chryzín, mosloflavón, negleteín

4.1.3. Prístrojové vybavenie

- Analytické váhy KERN ABT120-5DM
- Spektrofotometer pre mikrotitračné doštičky SYNERGY HIT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Trepačka na mikrotitračné doštičky IKA® MS 3 digital
- Trepačka na skúmavky IKA® VORTEX GENIUS 3
- Ultrazvukový kúpeľ KRAINTEK®

4.2. PRÍPRAVA ROZTOKOV

4.2.1. Príprava základných roztokov

- **Disodná soľ bathocuproindisulfónovej kyseliny (BCS)** – 5 mM roztok bol pripravený rozpustením príslušného množstva BCS v destilovanej vode
 - $M_w(\text{BCS}) = 564,54 \text{ g/mol}$
- **Hydroxylamín hydrochlorid (HA)** – 100 mM roztok bol pripravený rozpustením príslušného množstva HA v destilovanej vode
 - $M_w(\text{HA}) = 69,49 \text{ g/mol}$
- **Meďnaté ióny (Cu^{2+})** – 5 mM roztok Cu^{2+} bol pripravený rozpustením príslušného množstva pentahydrátu síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) v destilovanej vode
 - $M_w(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 249,69 \text{ g/mol}$
- **Meďné ióny (Cu^+)** – 5mM roztok Cu^+ bol pripravený rozpustením príslušného množstva chloridu meďného (CuCl) vo vodnom roztoku 0,1 M kyseliny chlorovodíkovej (HCl) a 1 M chloridu sodného (NaCl)
 - $M_w(\text{CuCl}) = 98,99 \text{ g/mol}$
- **Pufre** – roztoky pufrův boli pripravené z octanu sodného pre pH 4,5 a 5,5 a z HEPES pre pH 6,8 a 7,5

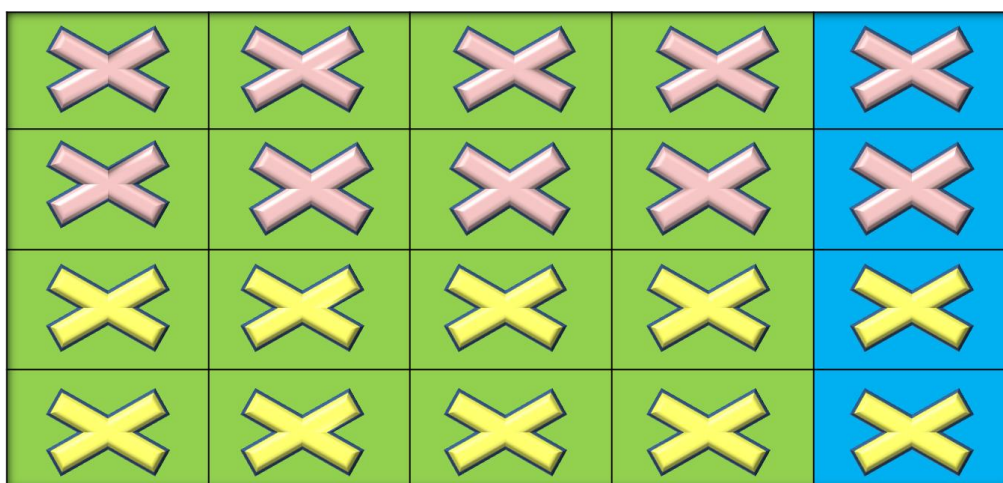
4.2.2. Príprava pracovných roztokov

- **Hydroxylamín hydrochlorid (HA)** – 1 mM a 10 mM roztok HA v destilovanej vode
- **Ióny medi Cu^+ a Cu^{2+}** – 250 μM roztoky v DMSO
- **Testovaná látka (flavóny)** – základný roztok obvykle 10 mM v DMSO, ďalšie riedenia v DMSO podľa potreby

4.3. VŠEOBECNÉ POSTUPY

4.3.1. BCS test – Cu^+ - Chelatácia meďných iónov v pufre (pH 4.5,5.5,6.8,7.5)

Do všetkých jamiek mikrotitračnej dosky sme napipetovali 100 μl príslušného pufru, 50 μl HA – 1 mM (pH 6.8 a 7.5) alebo 10 mM (pH 4.5 a 5.5), 50 μl 250 μl roztoku Cu^+ iónov v DMSO a nechali miešať 1 minútu na trepačke. Do **testovacích jamiek** sme pridali 50 μl testovanej látky príslušnej koncentrácie, do **kontrolných jamiek** zas 50 μl DMSO a nechali miešať 2 minúty. Nakoniec sme pridali 50 μl 5 mM roztoku **BCS** alebo **vody** (obr. 14). Vodu je nutné pipetovať ako prvú. Absorbanciu sme merali pri 484 nm v čase 0 a 5 minút (druhé meranie sme spustili v čase 4 min 30 s).




Obr.14: Schéma mikrotitračnej doštičky.

Finálny obsah jamky:

- 100 μl pufru
- 50 μl HA (1 mM/10 mM)
- 50 μl 250 μl roztoku Cu^+ v DMSO
- 50 μl testovanej látky (flavón) / 50 μl DMSO
- 50 μl 5 mM roztoku BCS / vody

 Roztok testovanej látky $c_1 - c_x$

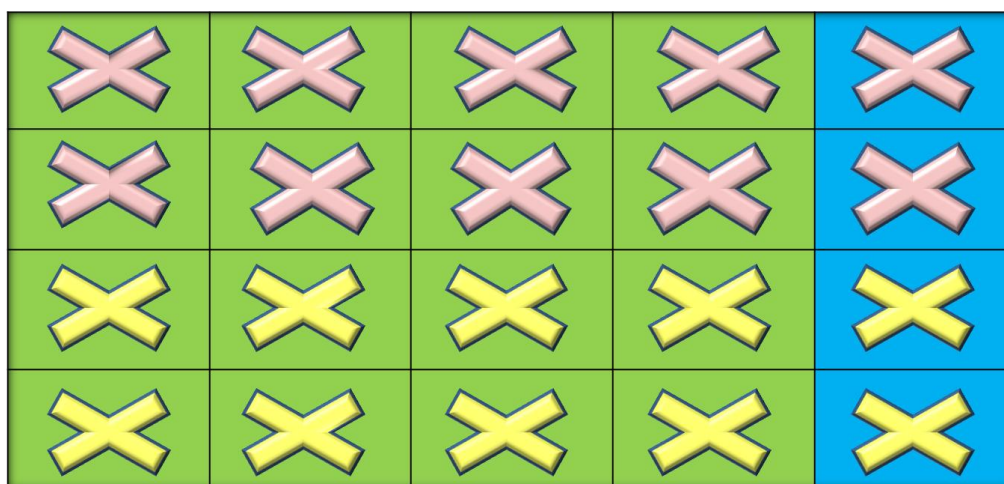
 Kontrolné jamky $c = 0$

 Jamky s indikátorom

 Slepé vzorky

4.3.2. BCS test – Cu^{2+} - Chelatácia meďnatých iónov v pufré (pH 4.5,5.5,6.8,7.5)

Do všetkých jamiek mikrotitračnej dosky sme napipetovali 100 μl príslušného pufru. Do **testovacích jamiek** sme pridali 50 μl testovanej látky príslušnej koncentrácie a do **kontrolných jamiek** zas 50 μl DMSO. Do všetkých jamiek sme pridali 50 μl 250 μl roztoku Cu^{2+} iónov v DMSO a nechali miešať 2 minúty na trepačke. Potom sme pridali 50 μl roztoku HA – 1 mM (pH 6.8 a 7.5) alebo 10 mM (pH 4.5 a 5.5) a nechali miešať 1 minútu na trepačke. Nakoniec sme pridali 50 μl 5 mM roztoku **BCS** alebo **vody** (obr. 15). Vodu je nutné pipetovať ako prvú. Absorbanciu sme merali pri 484 nm v čase 0 a 5 minút (druhé meranie sme spustili v čase 4 min 30 s).




Obr.15: Schéma mikrotitračnej doštičky.

Finálny obsah jamky:

- 100 μl pufru
- 50 μl testovanej látky (flavón) / 50 μl DMSO
- 50 μl 250 μl roztoku Cu^{+} v DMSO
- 50 μl HA (1 mM/10 mM)

 Roztok testovanej látky $c_1 - c_x$

 Kontrolné jamky $c = 0$

 Jamky s indikátorom

 Slepé vzorky

4.4. ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

Množstvo zostávajúcej medi bolo vypočítané z rozdielu absorbančie medzi testovanou látkou (vzorka s indikátorom) a jeho zodpovedajúceho blanku (vzorka bez indikátora) vydeleného rozdielom kontrolnej vzorky (známe množstvo medi bez testovanej látky) a jej blanku.

Na štatistickú analýzu bol použitý program MS Excel a GraphPad Prism verzia 6 pre Windows (GraphPad Software, USA). Pri porovnaní účinnosti jednotlivých chelátorov bol použitý test ANOVA s Bonferroniho post testom. Všetky krivky boli zostavené z najmenej piatich bodov, od 0 po 100 % chelatáciu.

Výsledky boli spracované ako priemer \pm smerodajnej odchýlky vypočítanej podľa

vzorca:
$$\sigma = \frac{\sqrt{\frac{x-x^2}{n}}}{n}$$

xstredná hodnota vzorky

nveľkosť vzorky

Rozdiely medzi testovanými látkami boli zisťované porovnaním 95 % konfidenčných intervalov.

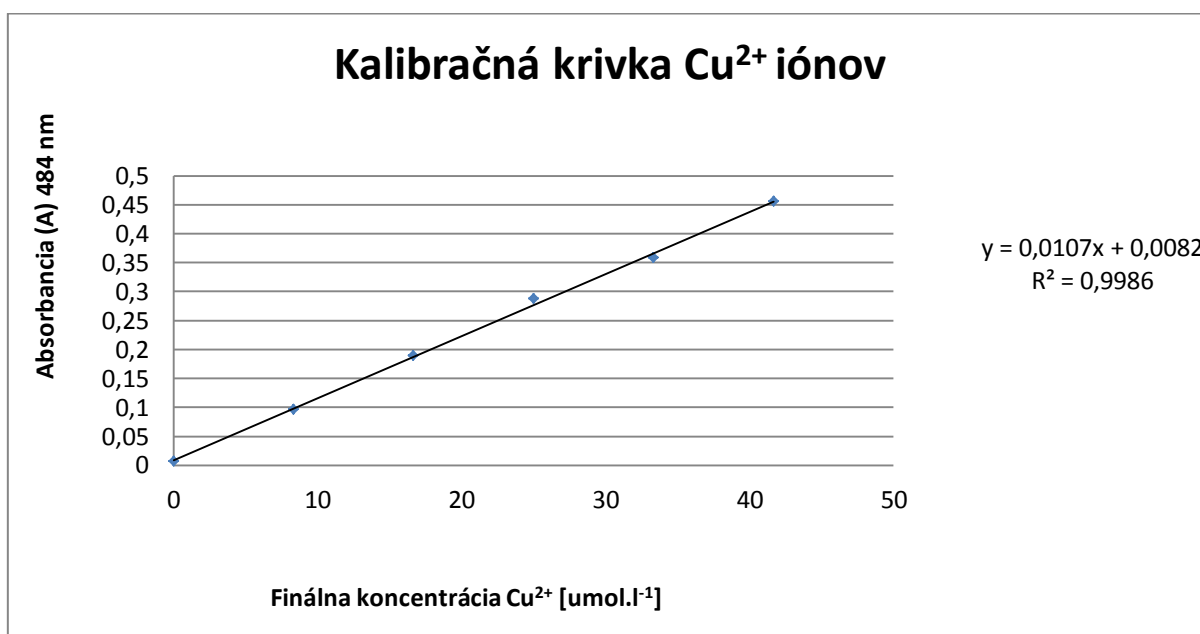
5. VÝSLEDKY

5.1. KALIBRAČNÁ KRIVKA

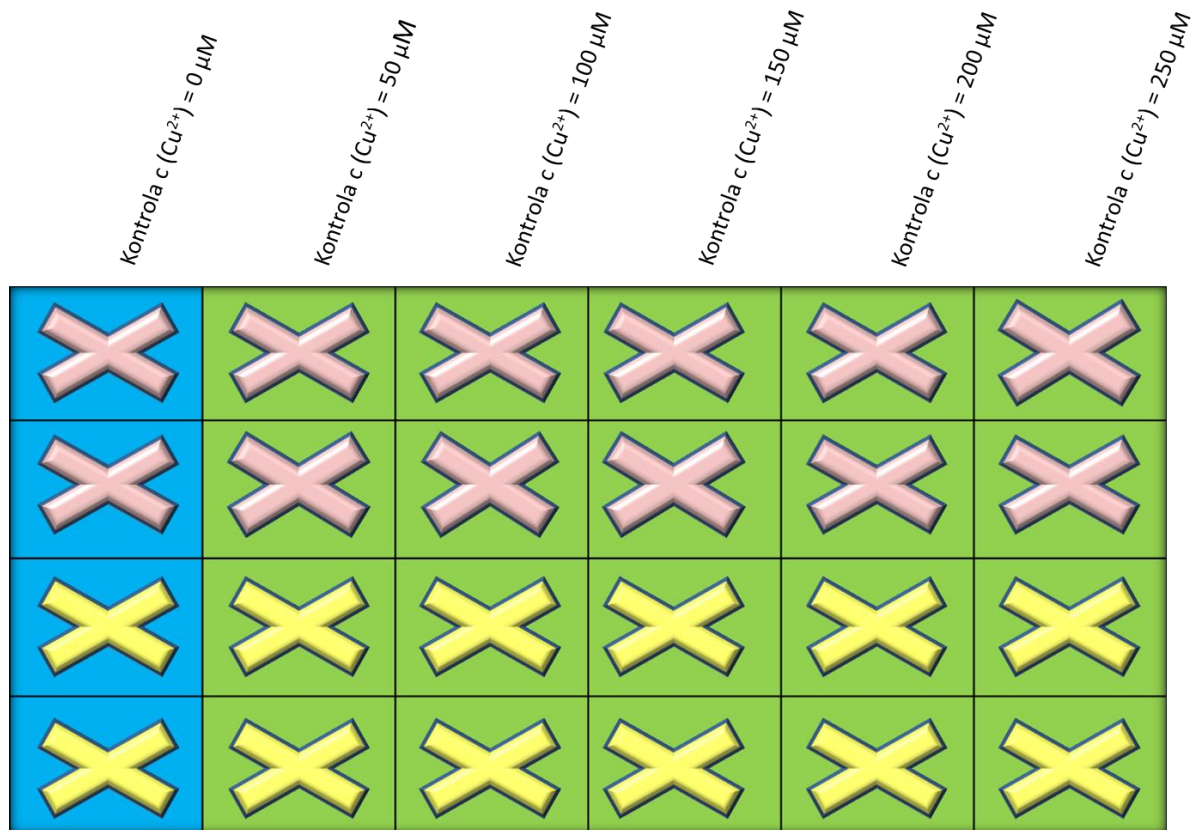
Z nameraných hodnôt absorbancií v čase 5 minút (tab.2) bol zostrojený graf kalibračnej krivky. Boli použité nasledovné koncentrácie meďnatých iónov: 0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM a 250 μM (obr.17). Závislosť absorbancie na koncentrácii meďnatých iónov je lineárna(obr.16).

pH 6,8	5 min					
Základná c [μM]	0	50	100	150	200	250
Finálna c [μM]	0	8,333333	16,66667	25	33,33333	41,66667
A + bathocuproin	0,051	0,139	0,233	0,336	0,406	0,502
	0,045	0,13	0,224	0,317	0,391	0,488
A – bathocuproin	0,042	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
	0,041	0,038	0,04	0,039	0,042	0,039
A rozdiel	0,0095	0,1	0,193	0,2965	0,365	0,4625
	0,0035	0,091	0,184	0,2775	0,35	0,4485
Priemer	0,0065	0,0955	0,1885	0,287	0,3575	0,4555
SD	0,005	0,09325	0,18625	0,28225	0,35375	0,452





Tab.2: Namerané hodnoty absorbancie v čase 5 minút.



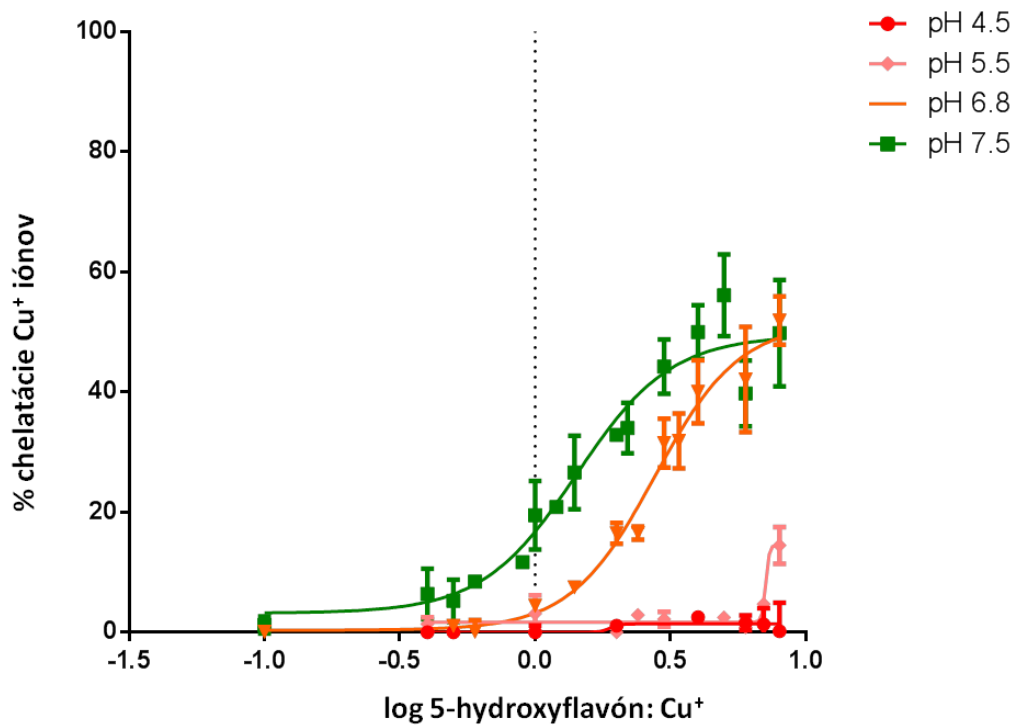
Obr.16: Kalibračná krivka meďnatých iónov v čase 5 minút.



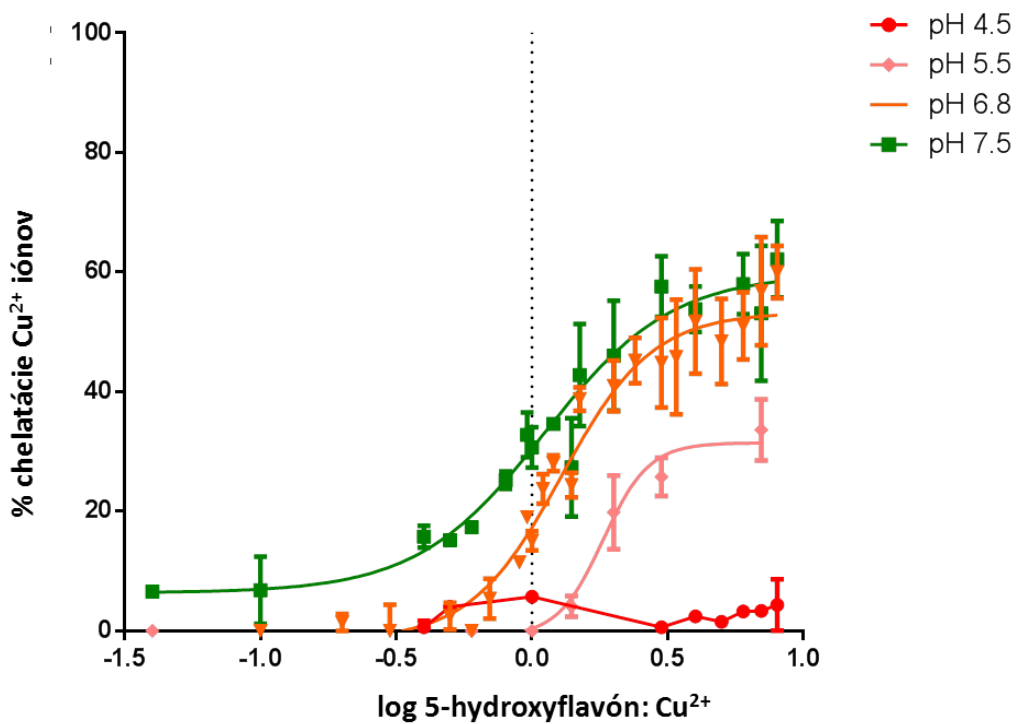
Obr.17: Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení chelatácie Cu²⁺ iónov.

-  Roztok testovanej látky $c_1 - c_x$
-  Kontrolné jamky $c = 0$
-  Jamky s indikátorom
-  Slepé vzorky

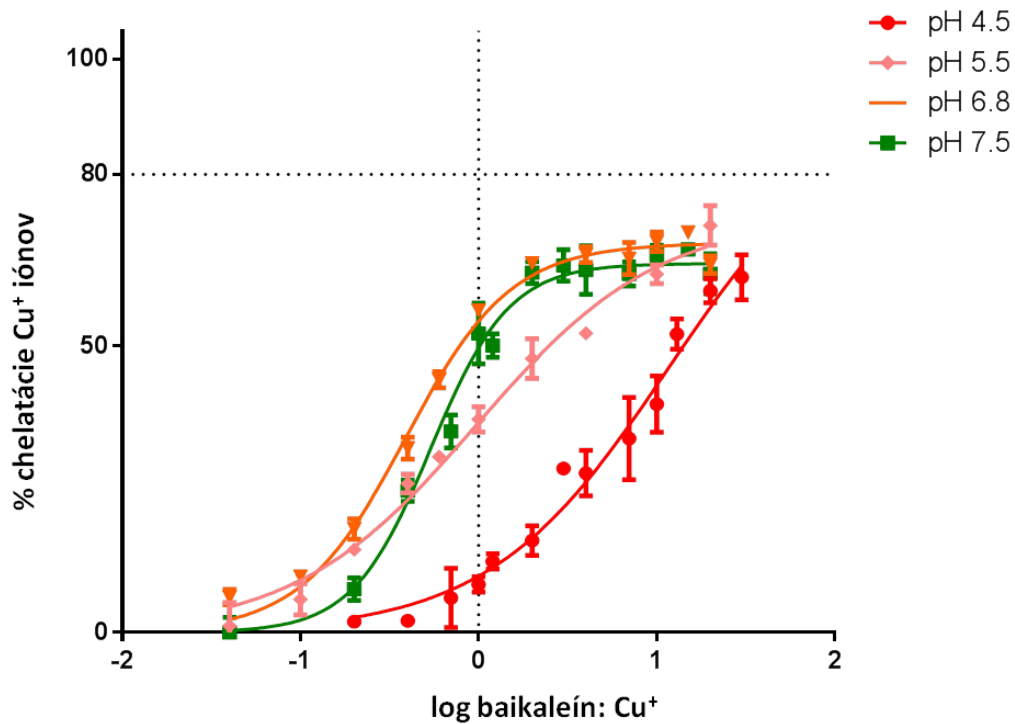
5.2. CHELATÁCIA MEDI U VYBRANÝCH FLAVÓNOV



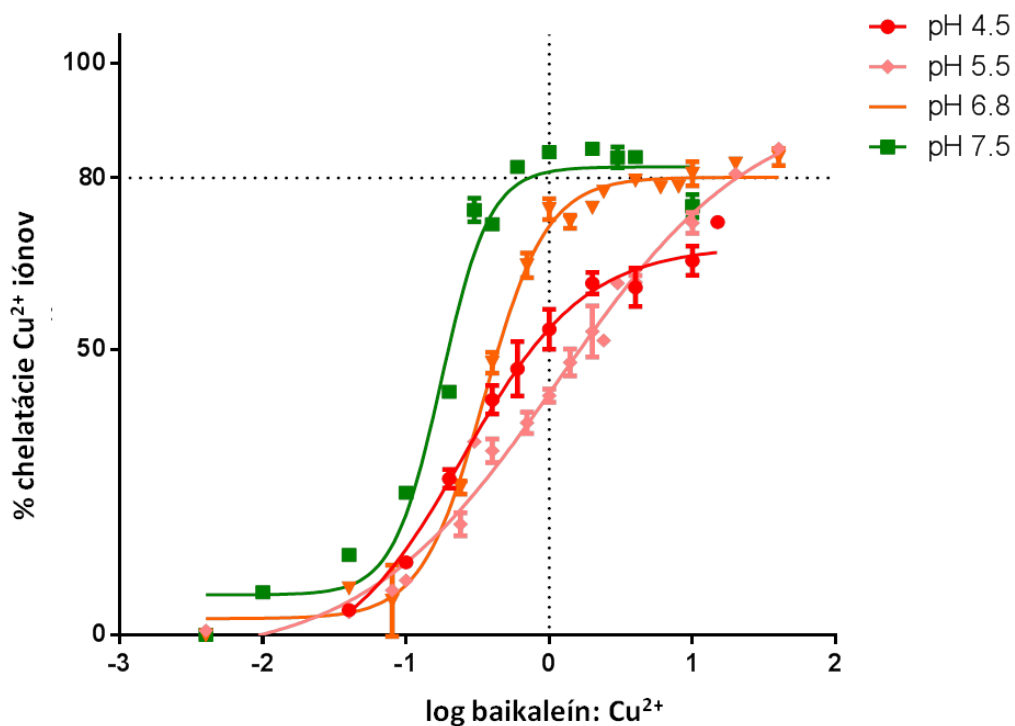
Obr.18: Chelatácia Cu⁺ pri rôznych hodnotách pH: 5-hydroxyflavón.



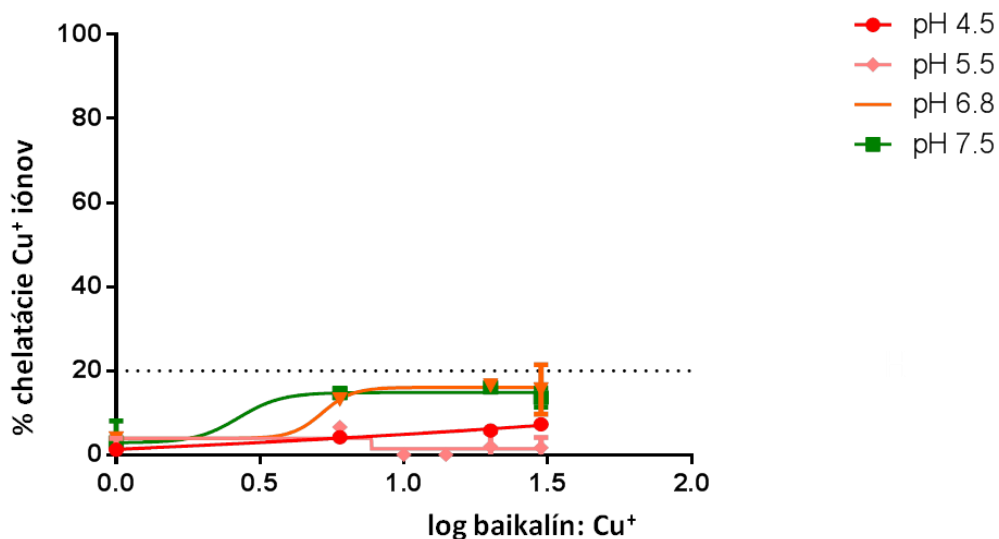
Obr.19: Chelatácia Cu²⁺ pri rôznych hodnotách pH: 5-hydroxyflavón.



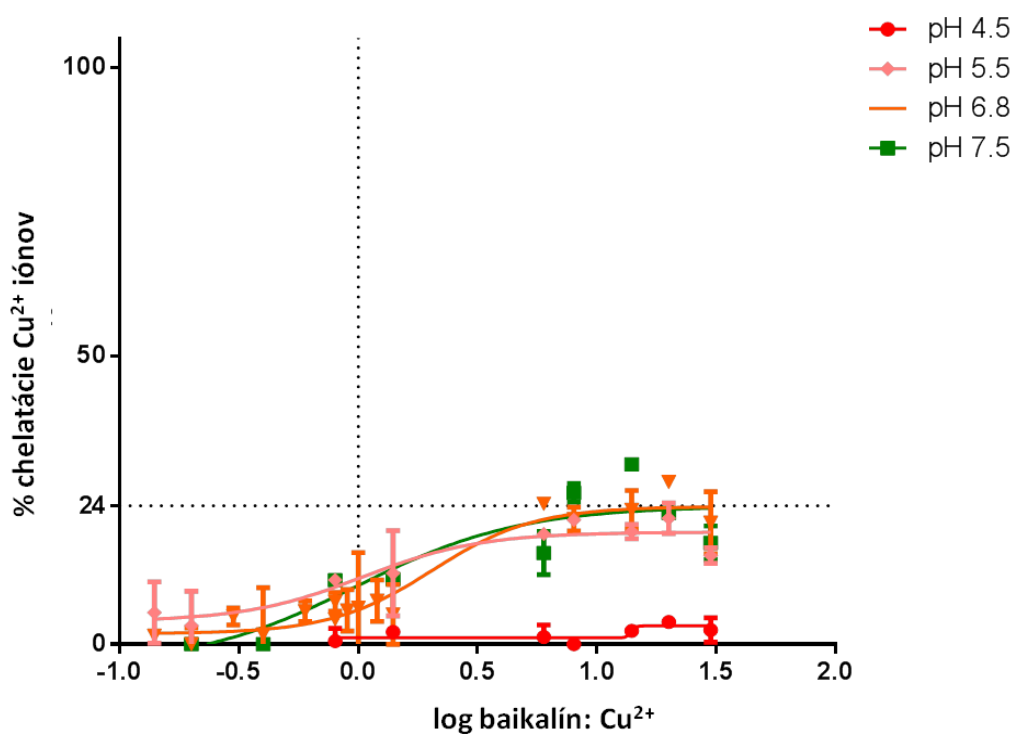
Obr.20: Chelatácia Cu^+ pri rôznych hodnotách pH: baikaleín.



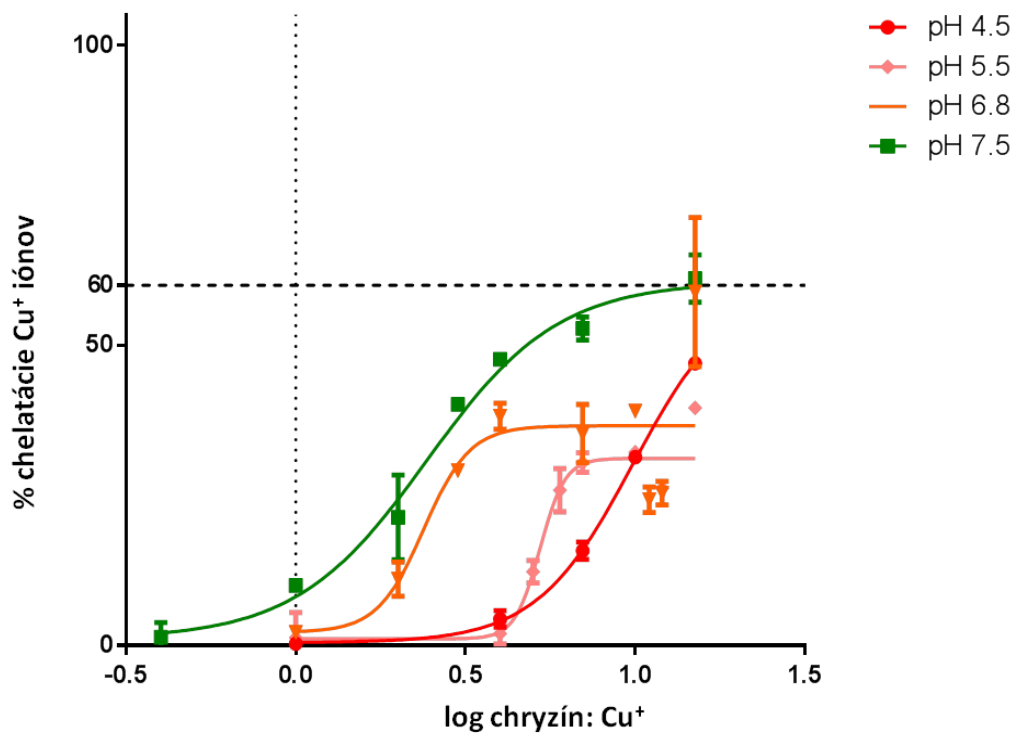
Obr.21: Chelatácia Cu^{2+} pri rôznych hodnotách pH: baikaleín.



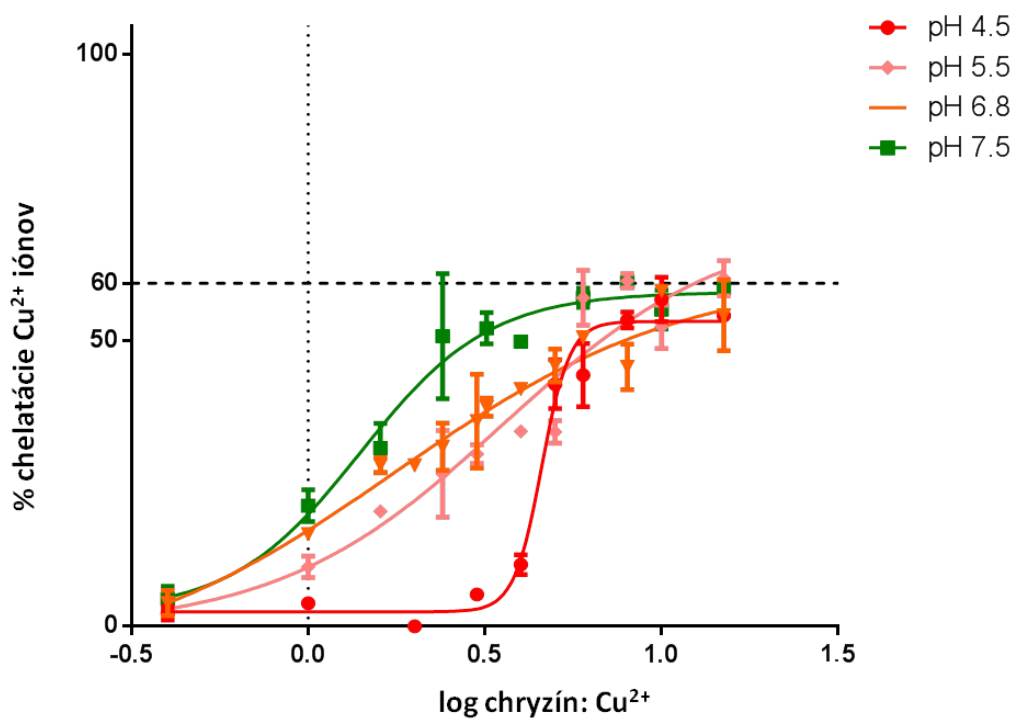
Obr.22: Chelatácia Cu⁺ pri rôznych hodnotách pH: baikalín.



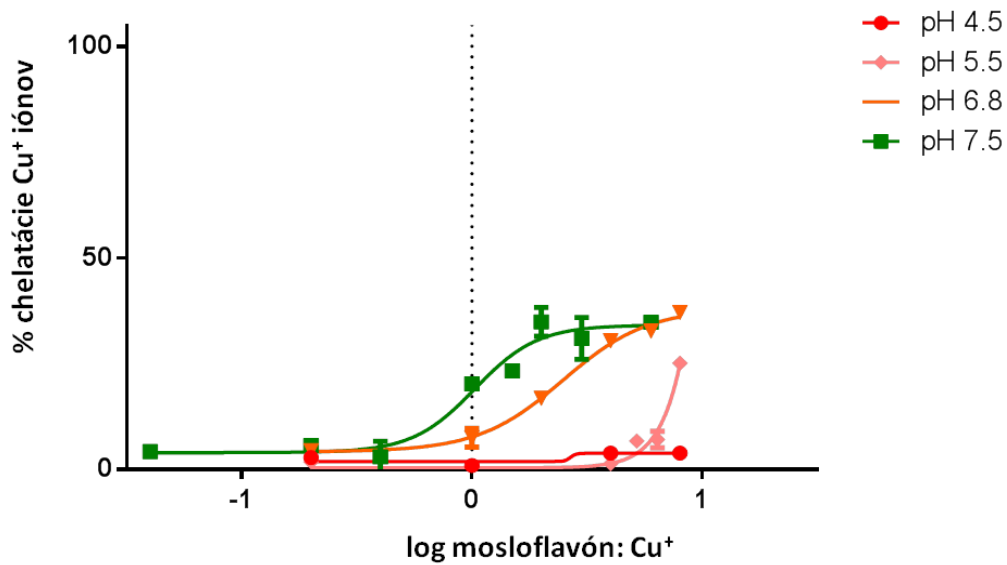
Obr.23: Chelatácia Cu²⁺ pri rôznych hodnotách pH: baikalín (pri koncentrácii 10 a 25 mM tvorí baikalín zrazeniny, javí sa to ako 100 % chelatácia).



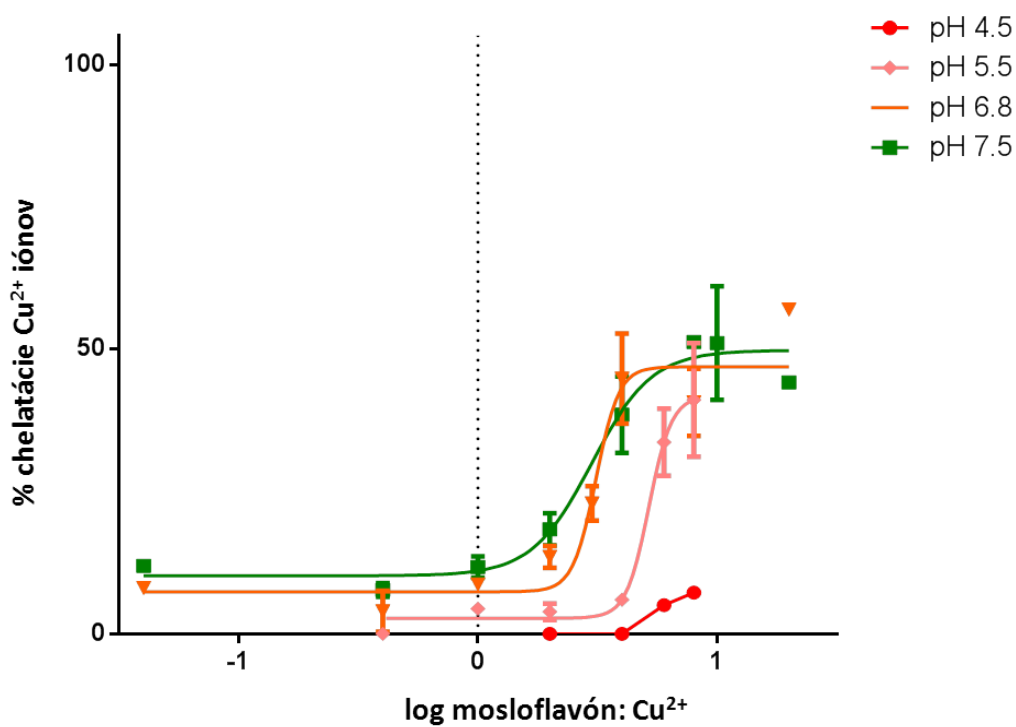
Obr.24: Chelatácia Cu⁺: chryzín.



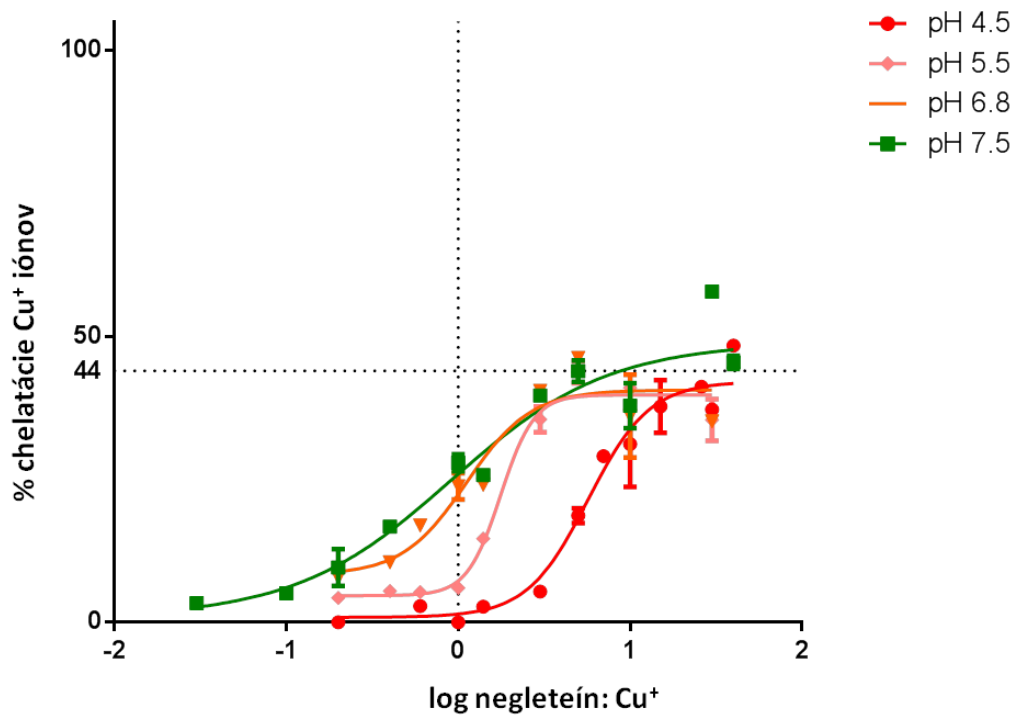
Obr.25: Chelatácia Cu²⁺ pri rôznych hodnotách pH: chryzín.



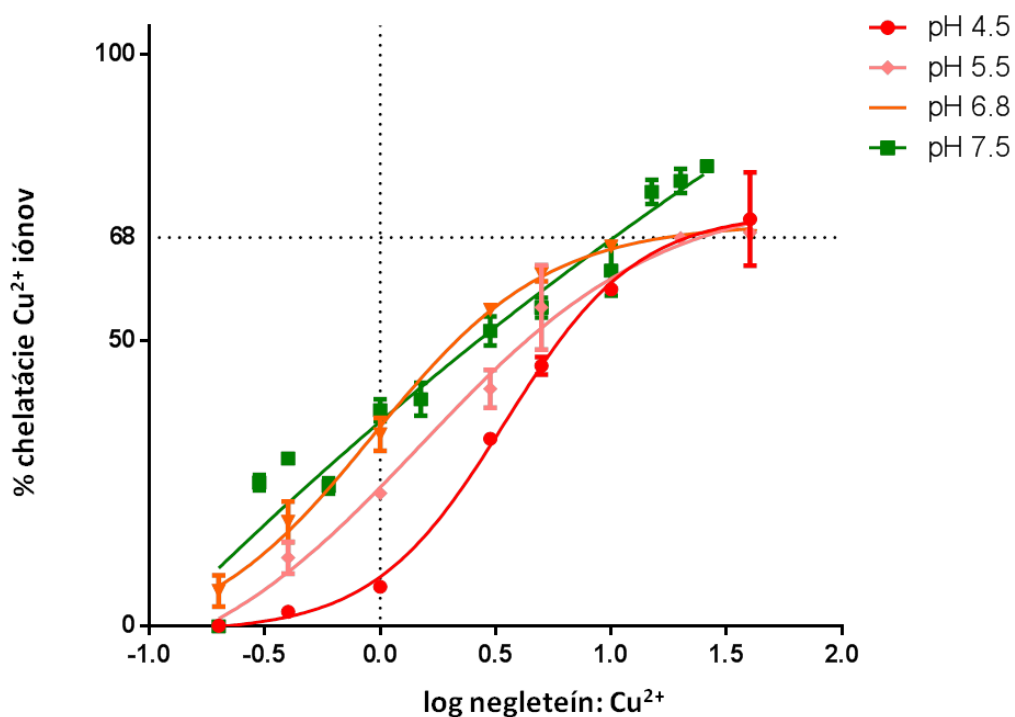
Obr.26: Chelatácia Cu⁺ pri rôznych hodnotách pH: mosloflavón.



Obr.27: Chelatácia Cu²⁺ pri rôznych hodnotách pH: mosloflavón.

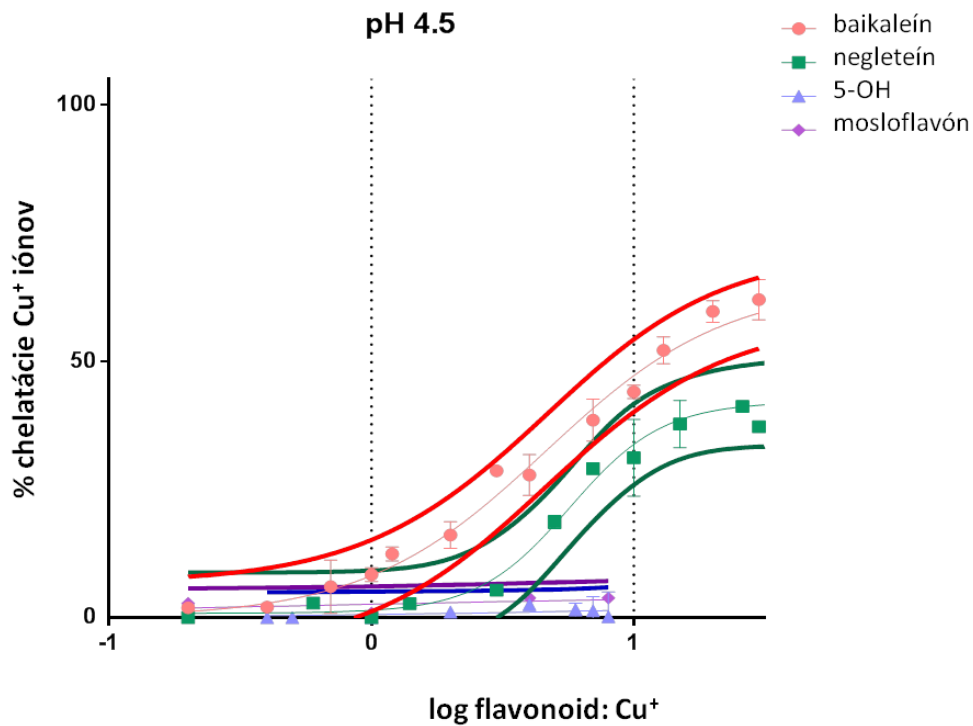


Obr.28: Chelátacia Cu^+ pri rôznych hodnotách pH: nagleteín.

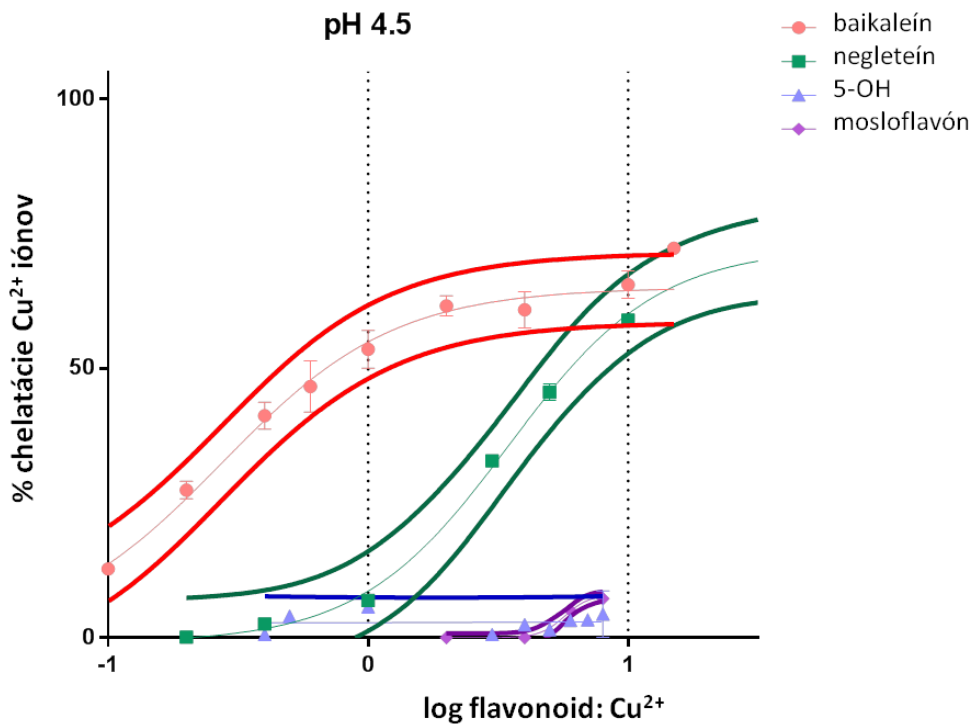


Obr.29: Chelátacia Cu^{2+} pri rôznych hodnotách pH: nagleteín.

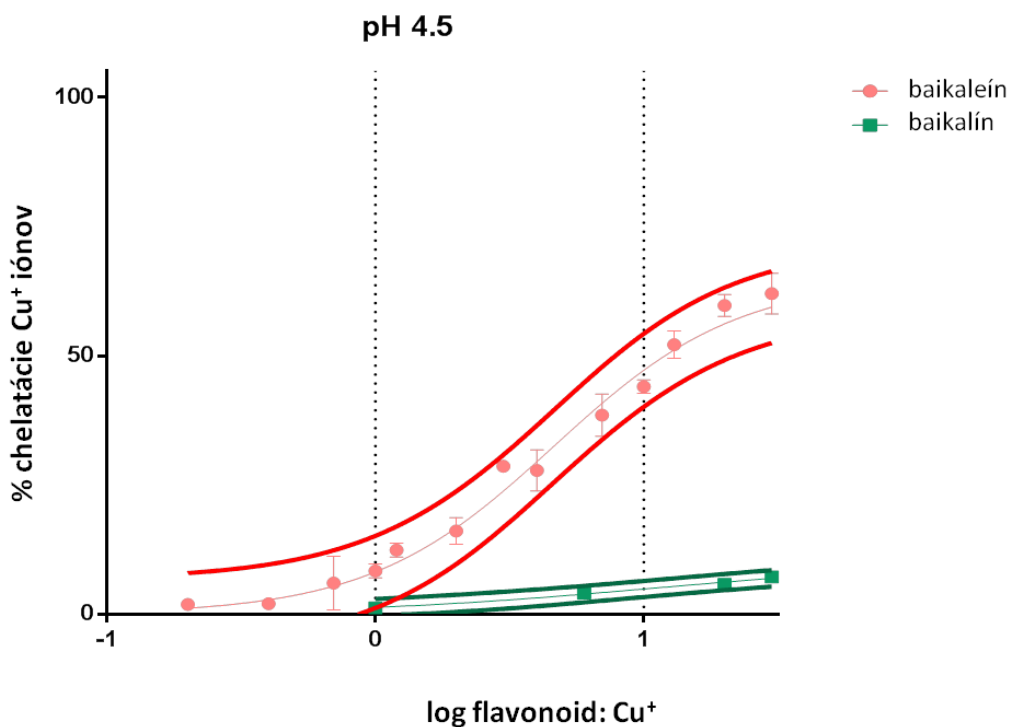
5.3. KONFIDENČNÉ INTERVALY



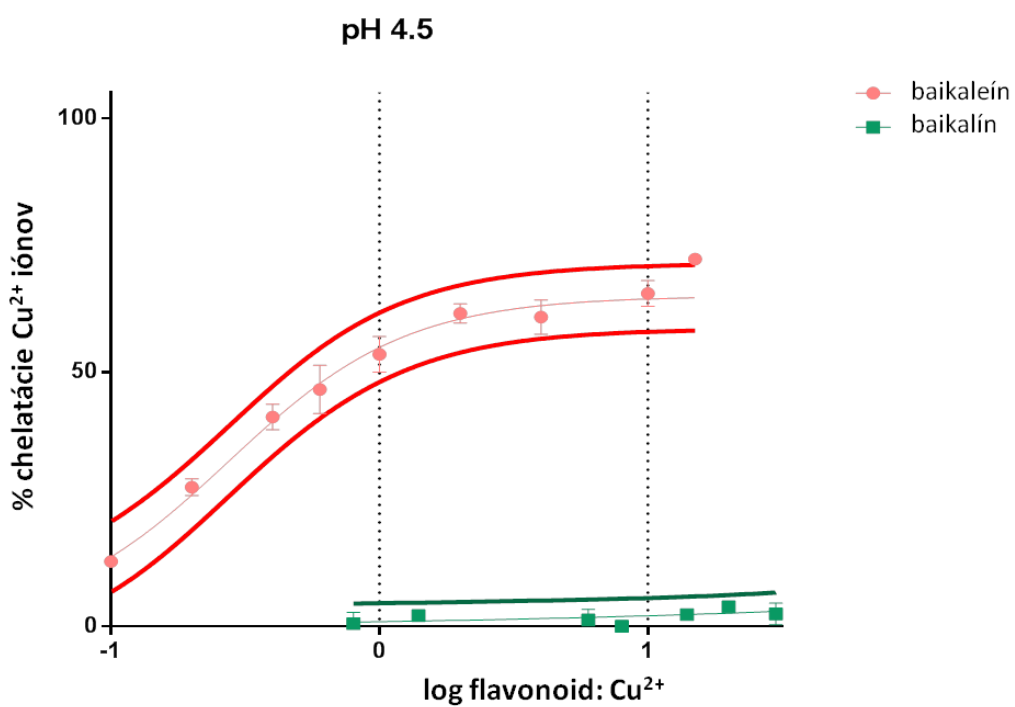
Obr.30: Porovnanie chelatácie Cu^+ iónov u vybraných flavónov pri pH 4.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



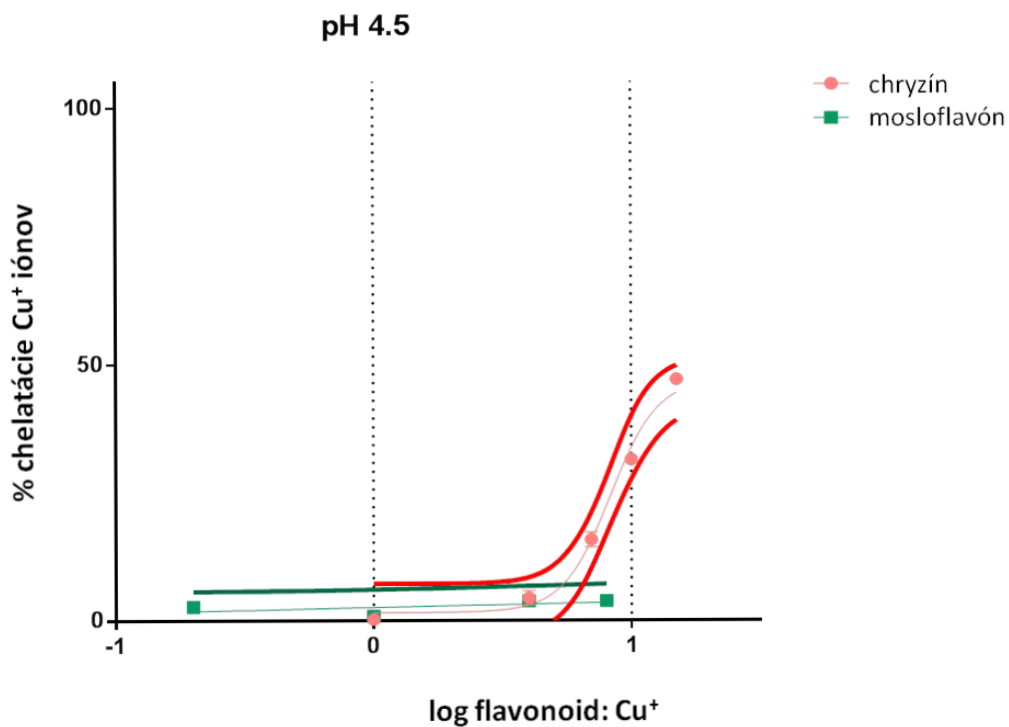
Obr.31: Porovnanie chelatácie Cu^{2+} iónov u vybraných flavónov pri pH 4.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



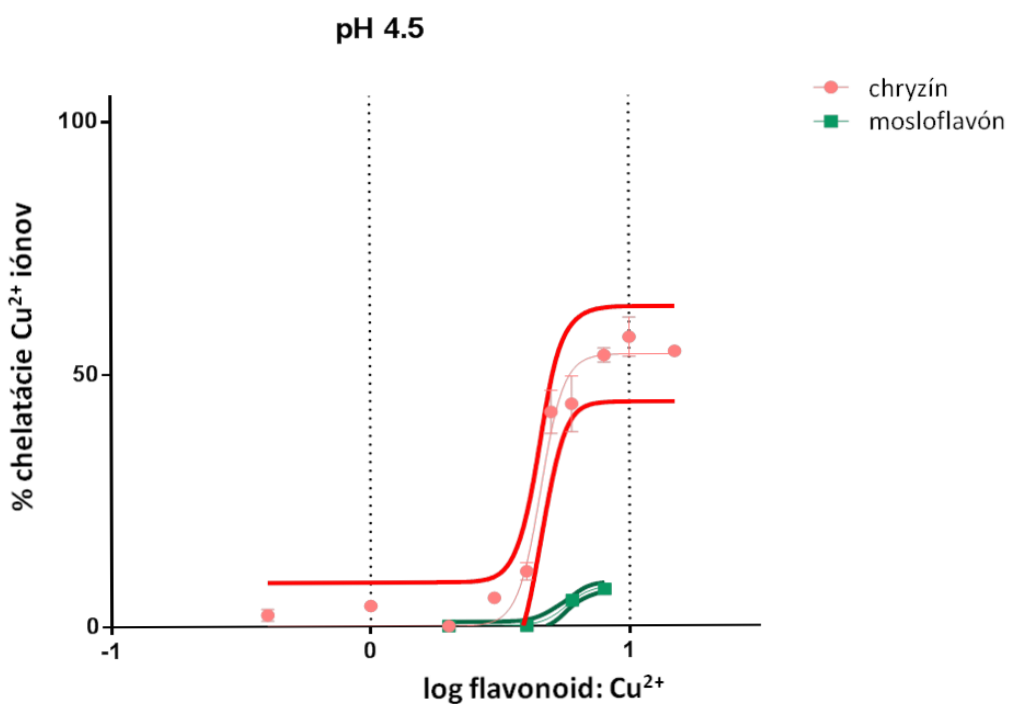
Obr.32: Porovnanie chelatácie Cu^+ iónov u vybraných flavónov pri pH 4.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



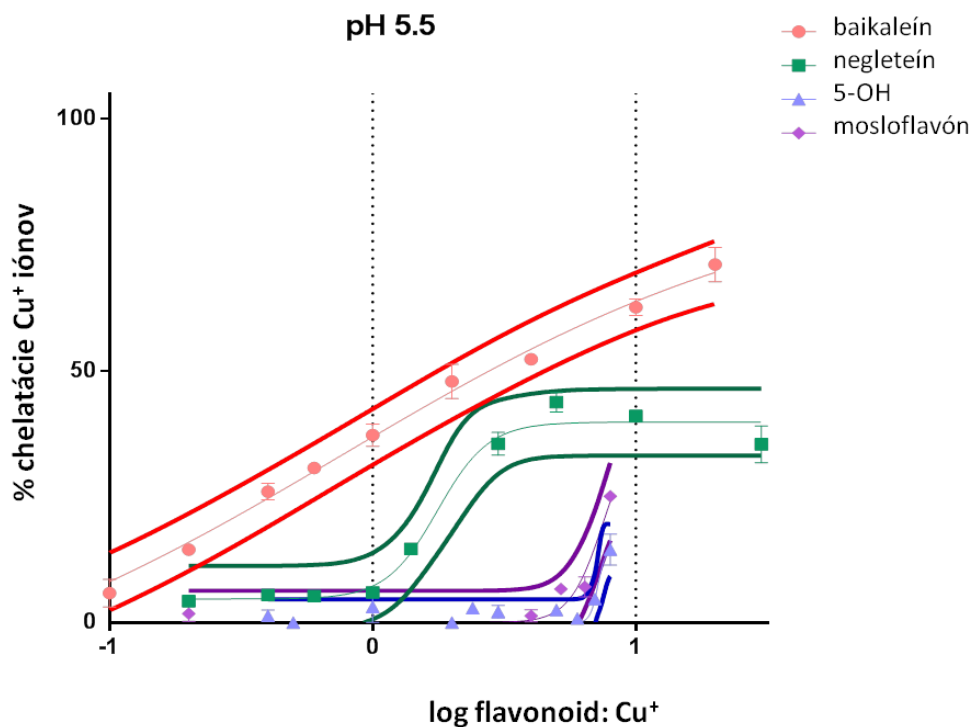
Obr.33: Porovnanie chelatácie Cu^{2+} iónov u vybraných flavónov pri pH 4.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



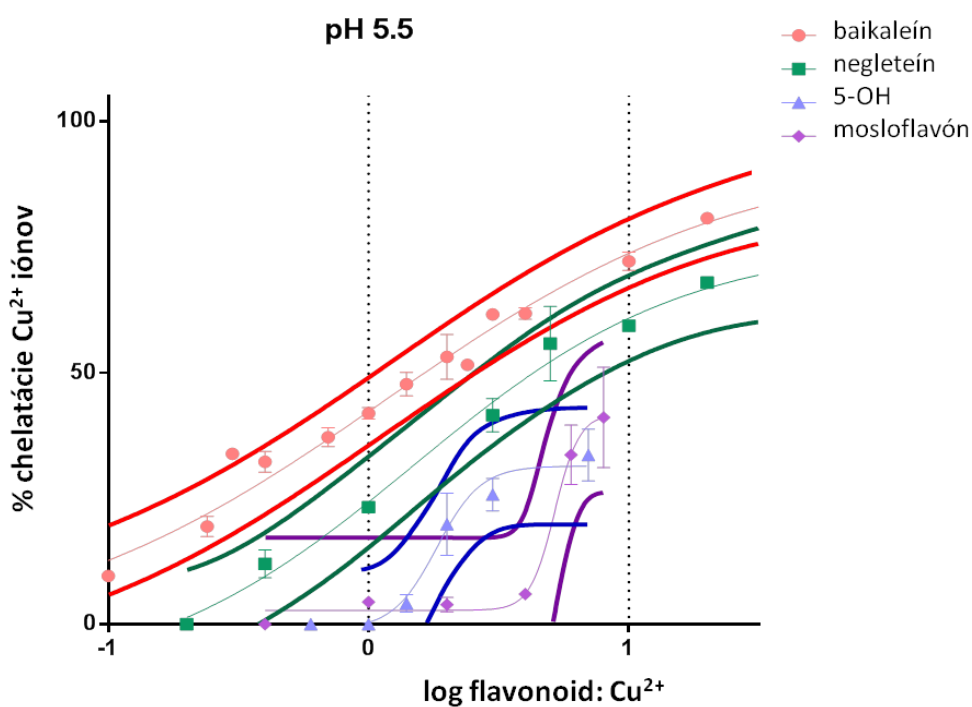
Obr.34: Porovnanie chelátácie Cu⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 4.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



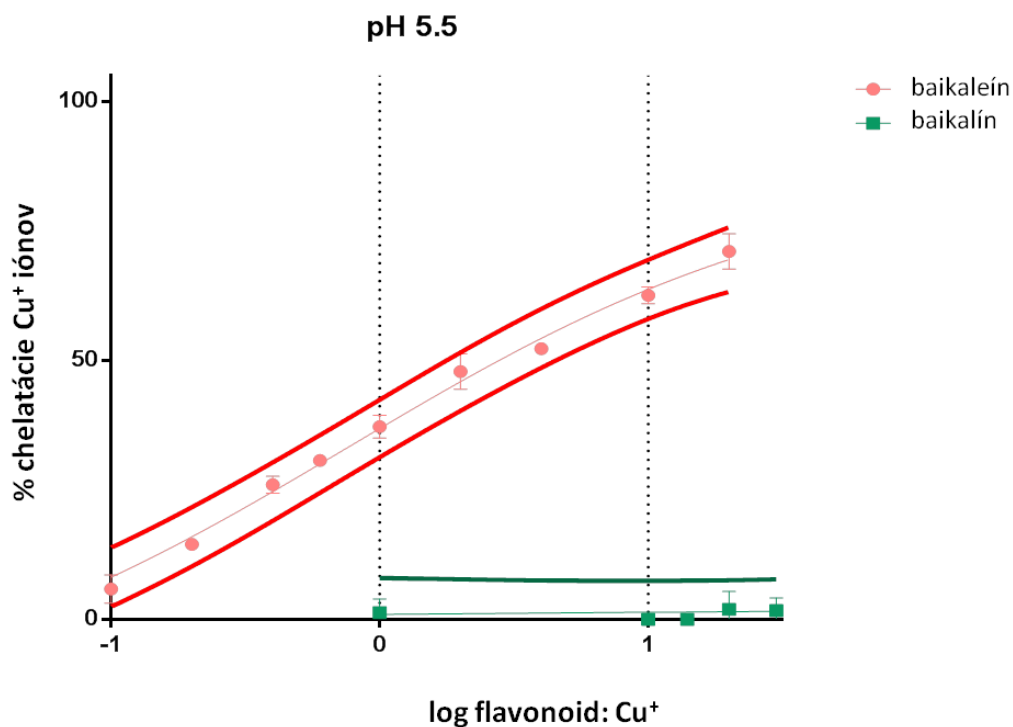
Obr.35: Porovnanie chelátácie Cu²⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 4.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



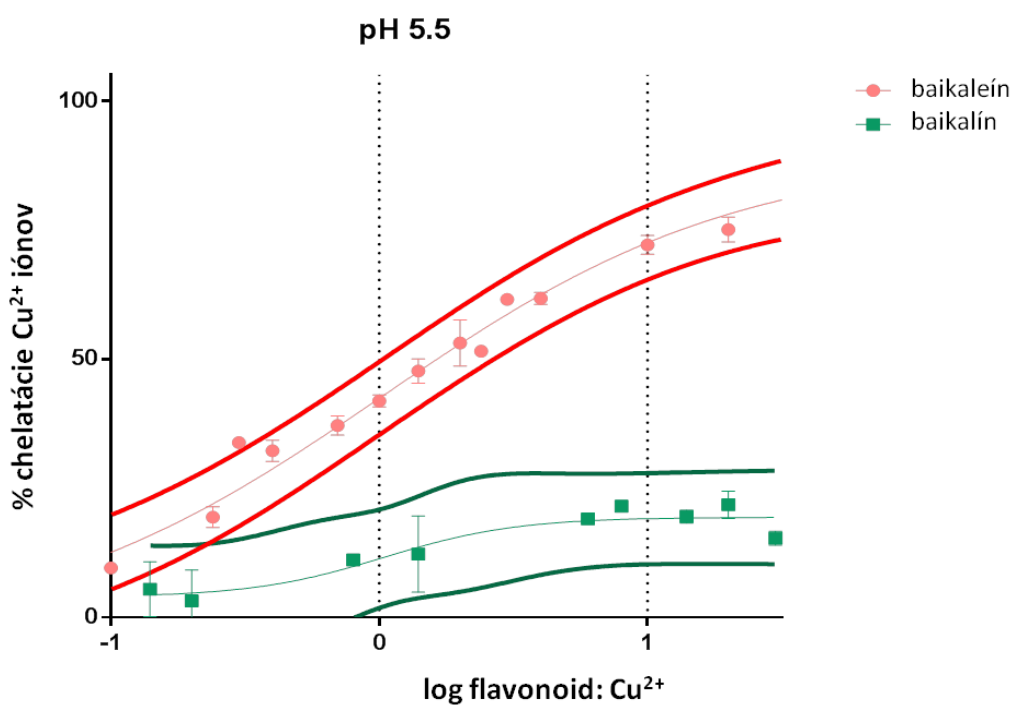
Obr.36: Porovnanie chelatácie Cu⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 5.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



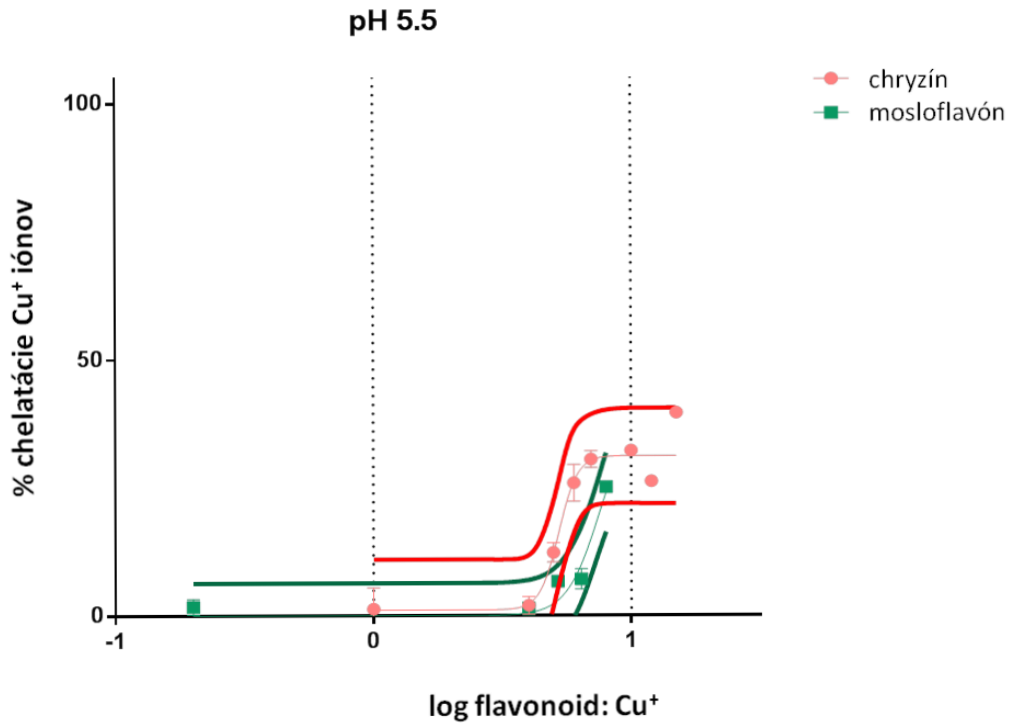
Obr.37: Porovnanie chelatácie Cu²⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 5.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



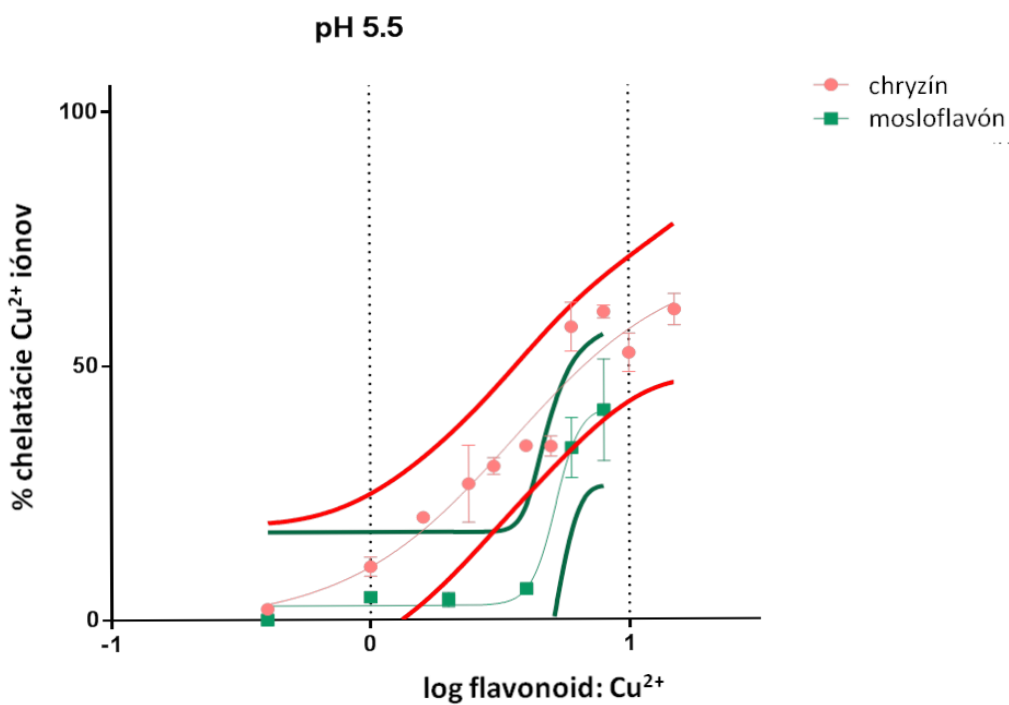
Obr.38: Porovnanie chelátácie Cu⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 5.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



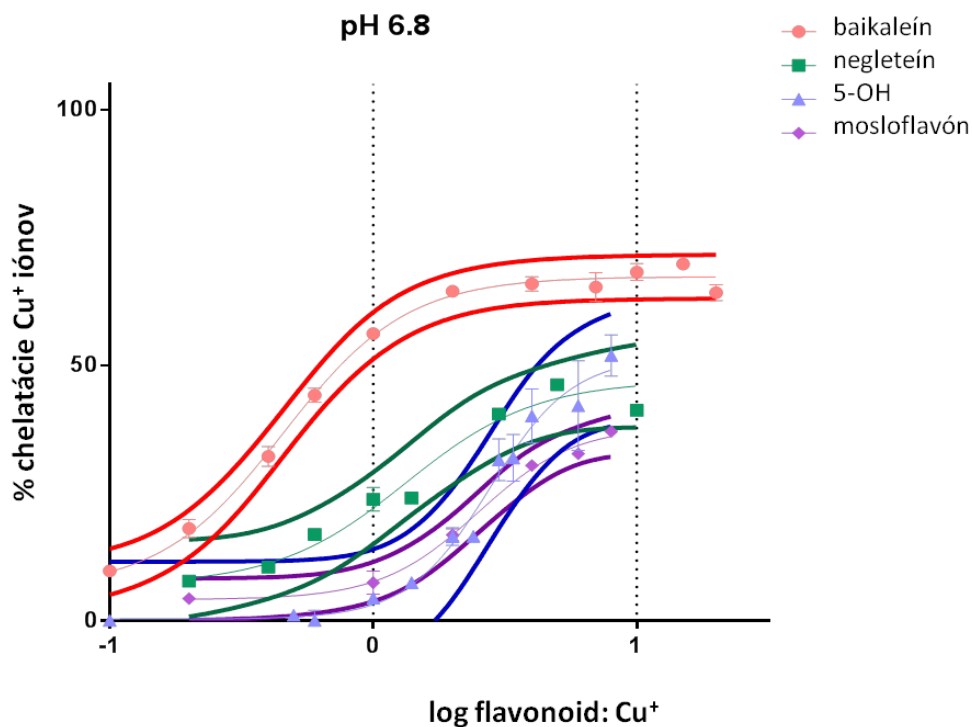
Obr.39: Porovnanie chelátácie Cu²⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 5.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



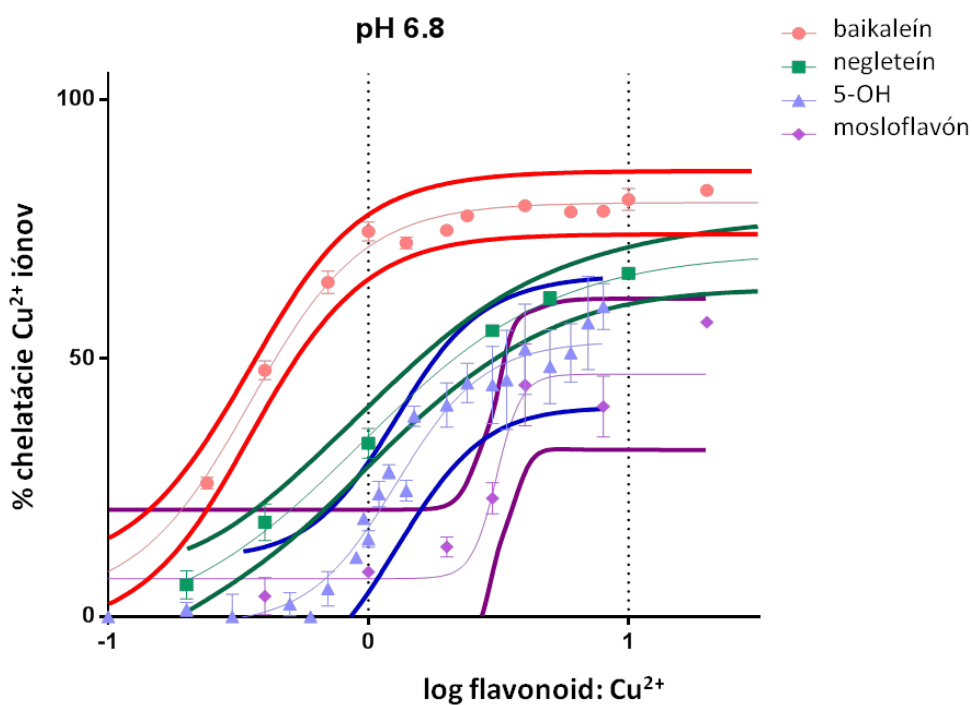
Obr.40: Porovnanie chelatácie Cu^+ iónov u vybraných flavónov pri pH 5.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



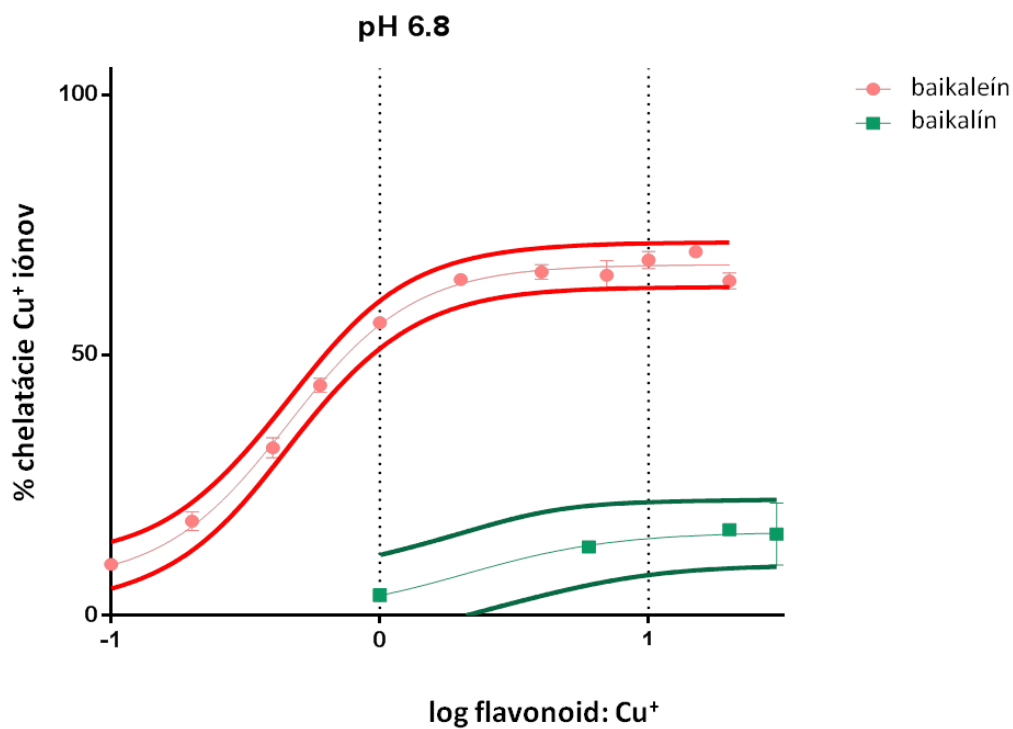
Obr.41: Porovnanie chelatácie Cu^{2+} iónov u vybraných flavónov pri pH 5.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



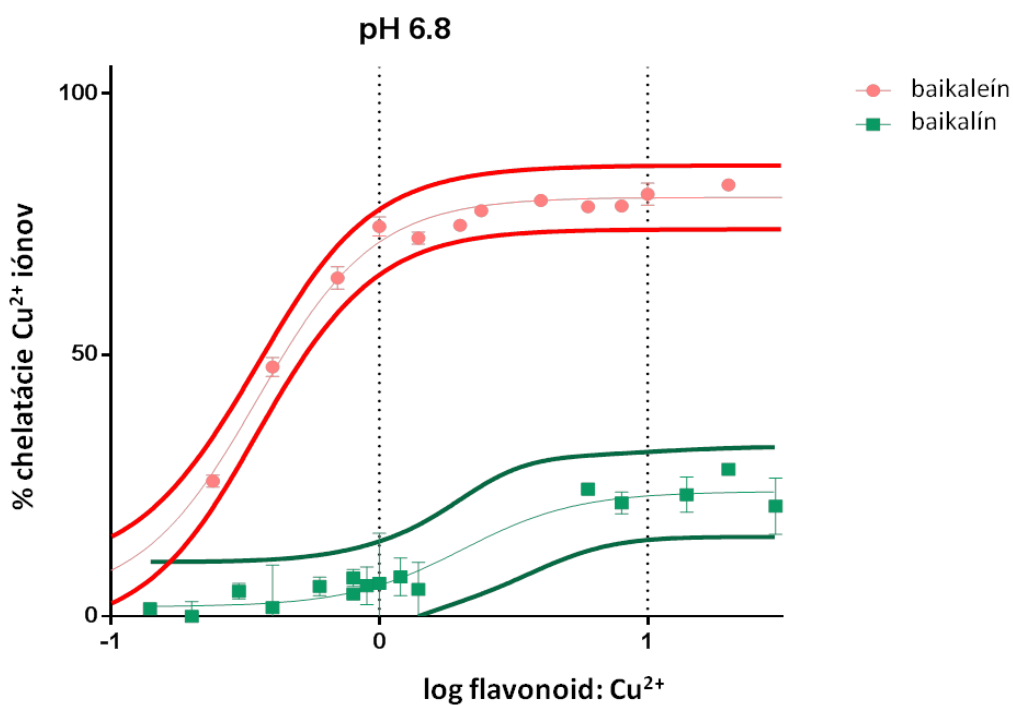
Obr.42: Porovnanie chelatácie Cu⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 6.8 so znázornením konfidenčných intervalov.



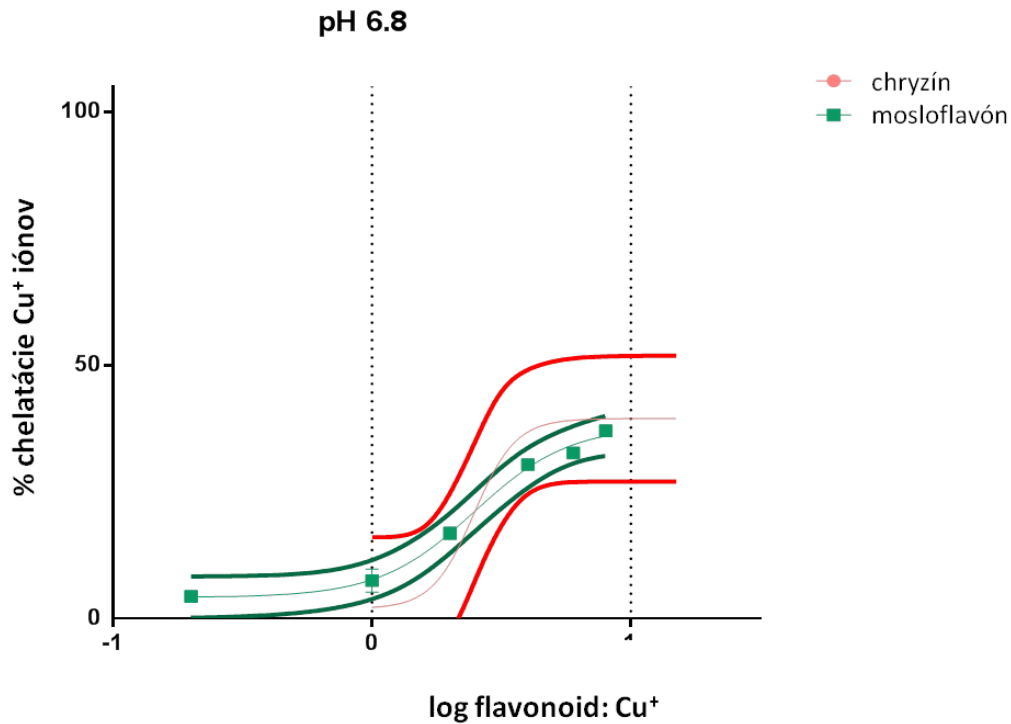
Obr.43: Porovnanie chelatácie Cu²⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 6.8 so znázornením konfidenčných intervalov.



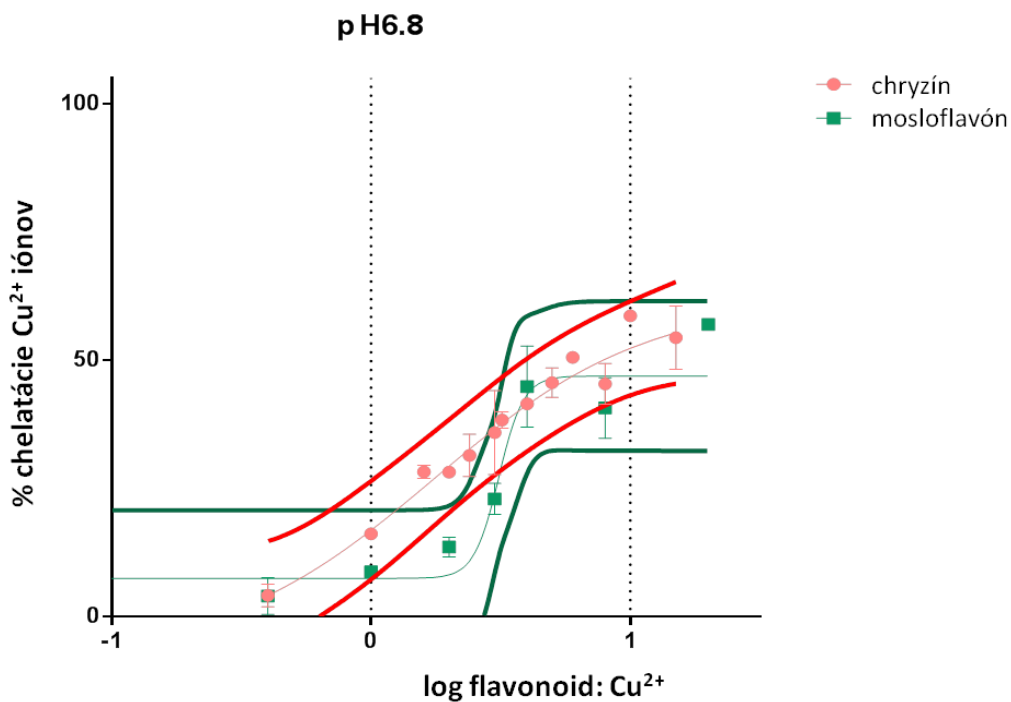
Obr.44: Porovnanie chelátácie Cu⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 6.8 so znázornením konfidenčných intervalov.



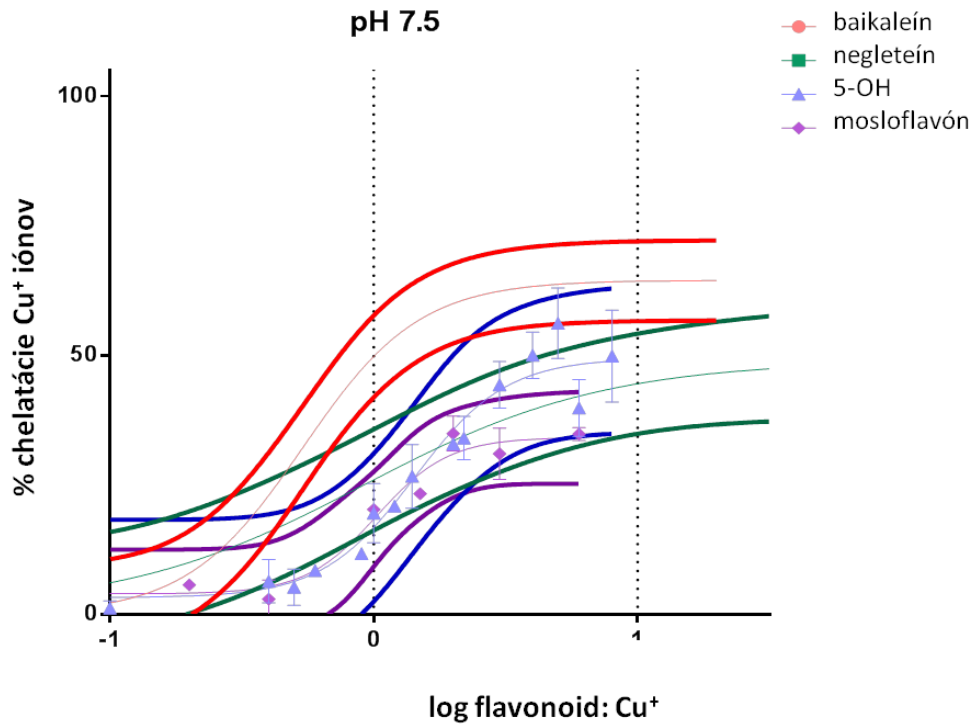
Obr.45: Porovnanie chelátácie Cu²⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 6.8 so znázornením konfidenčných intervalov.



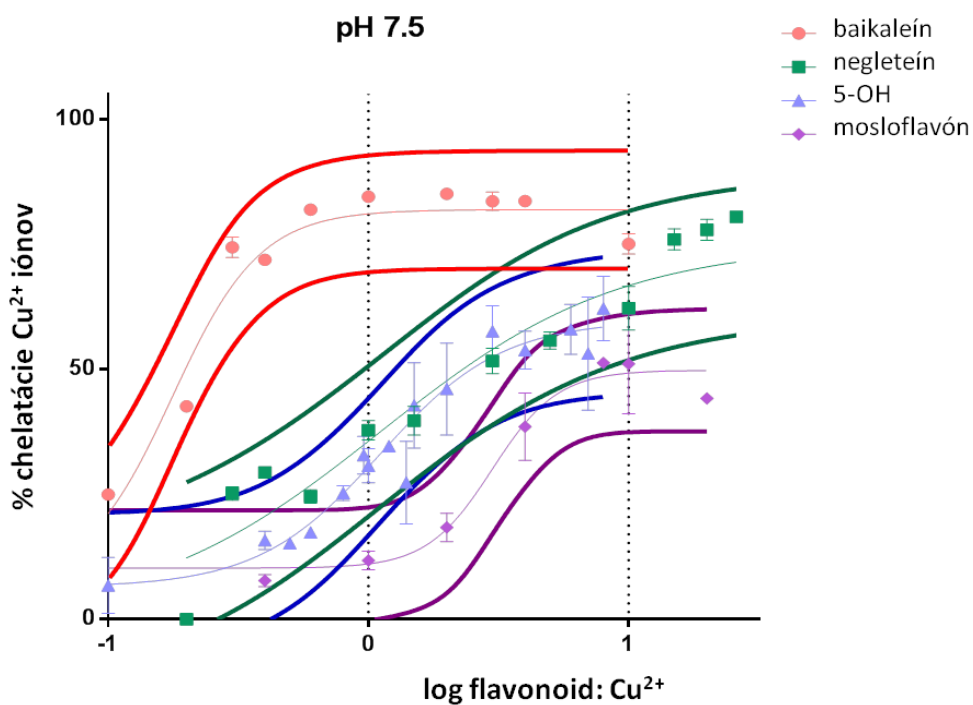
Obr.46: Porovnanie chelátácie Cu⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 6.8 so znázornením konfidenčných intervalov.



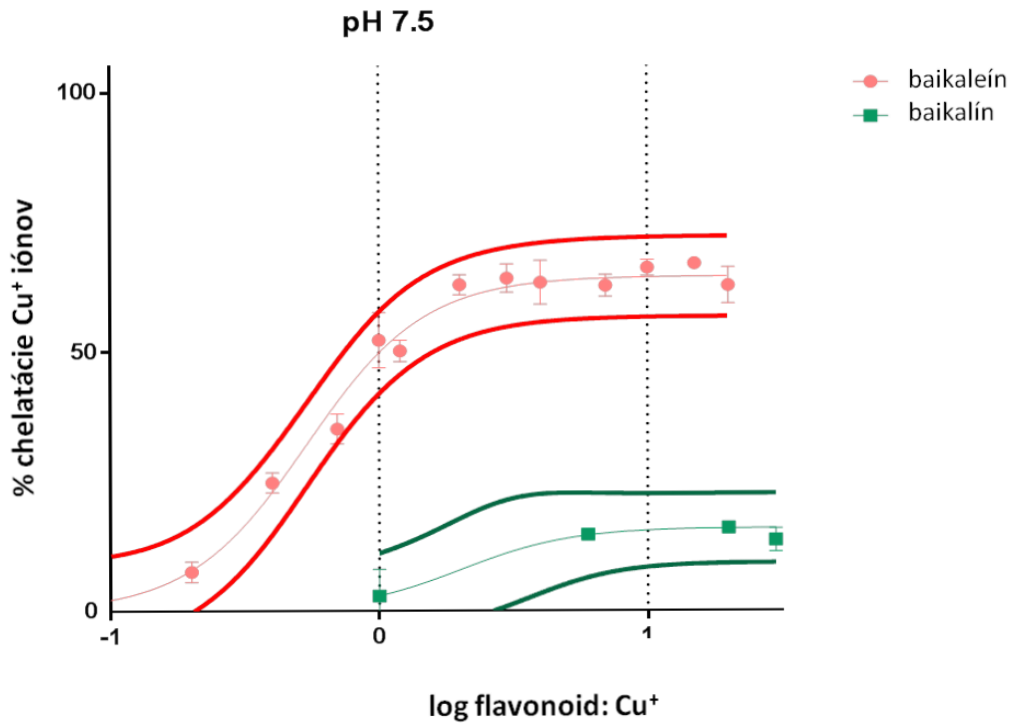
Obr.47: Porovnanie chelátácie Cu²⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 6.8 so znázornením konfidenčných intervalov.



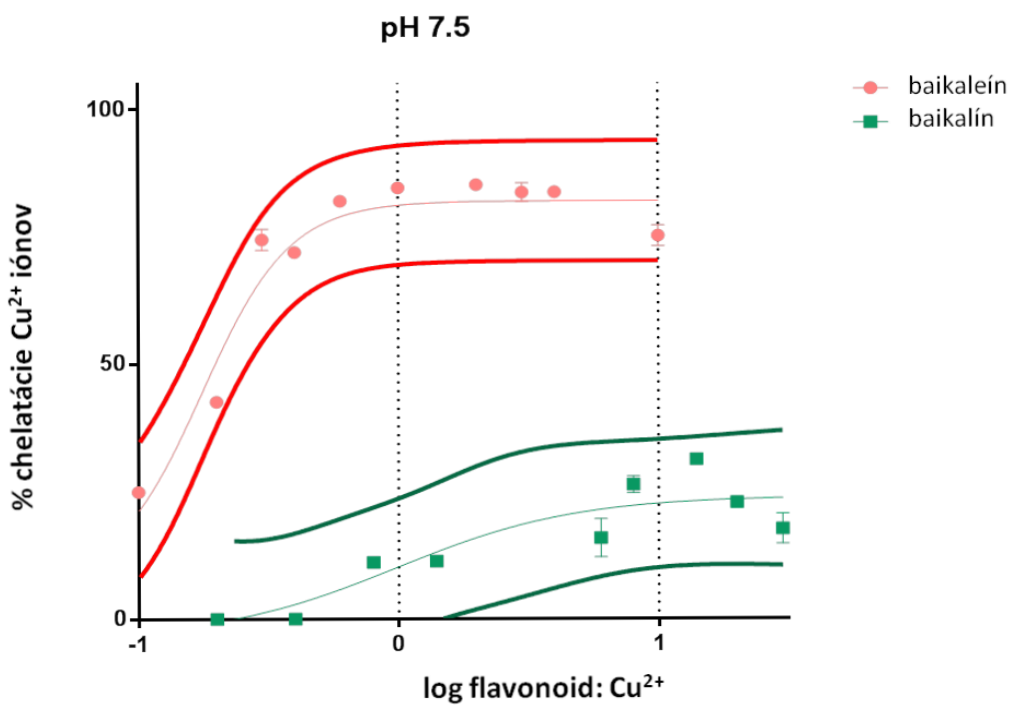
Obr.48: Porovnanie chelátacie Cu⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 7.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



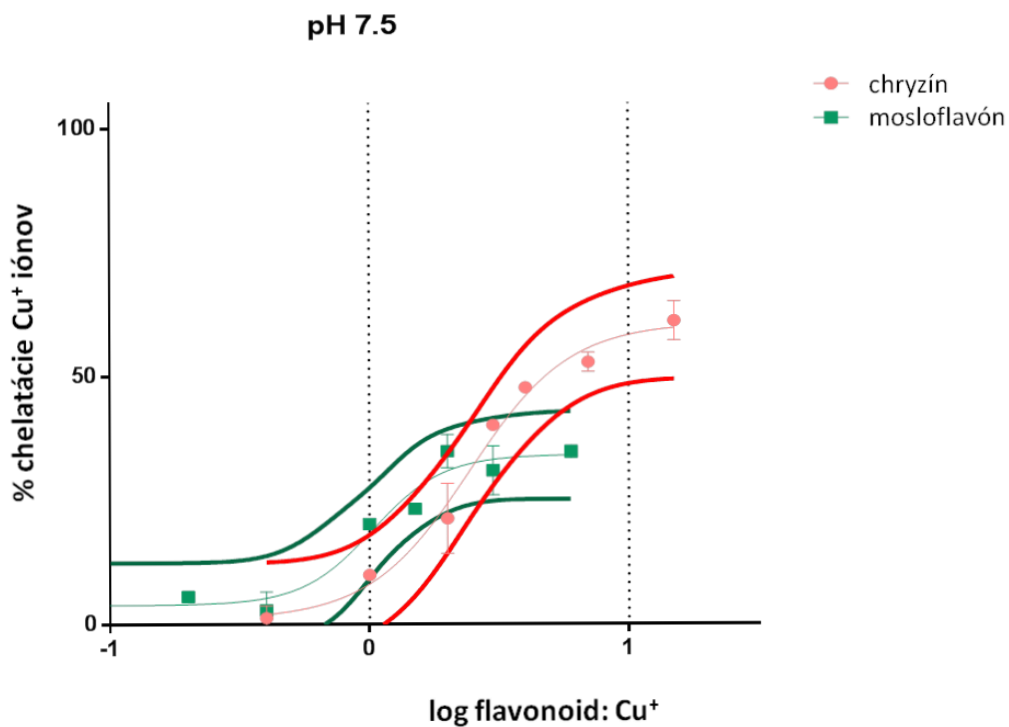
Obr.49: Porovnanie chelátacie Cu²⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 7.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



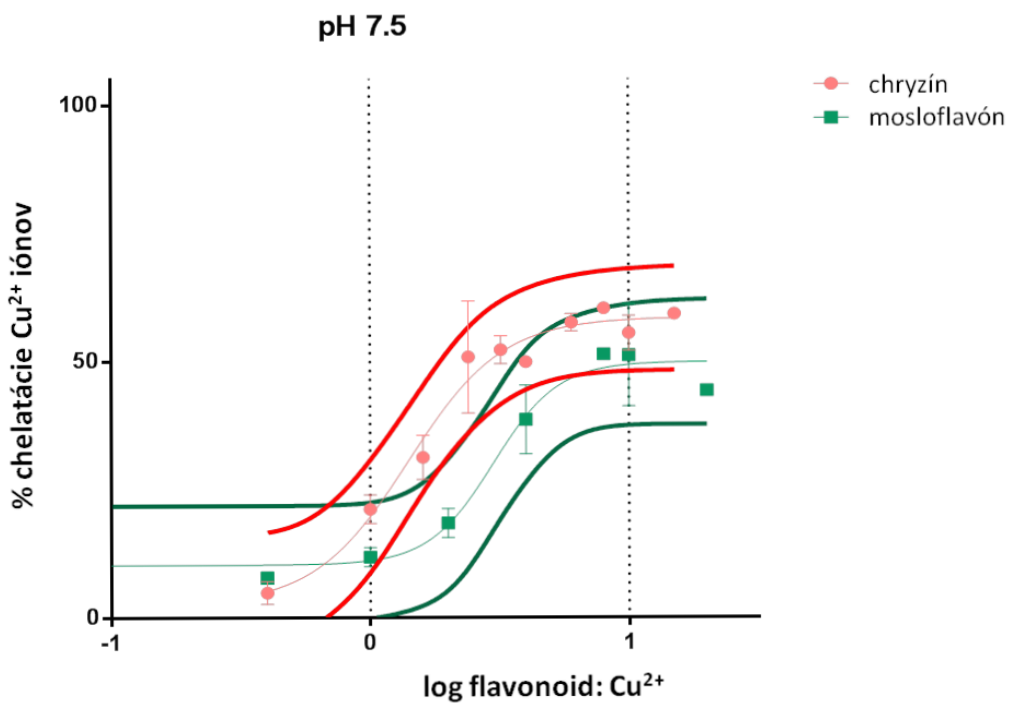
Obr.50: Porovnanie chelátácie Cu⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 7.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



Obr.51: Porovnanie chelátácie Cu²⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 7.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



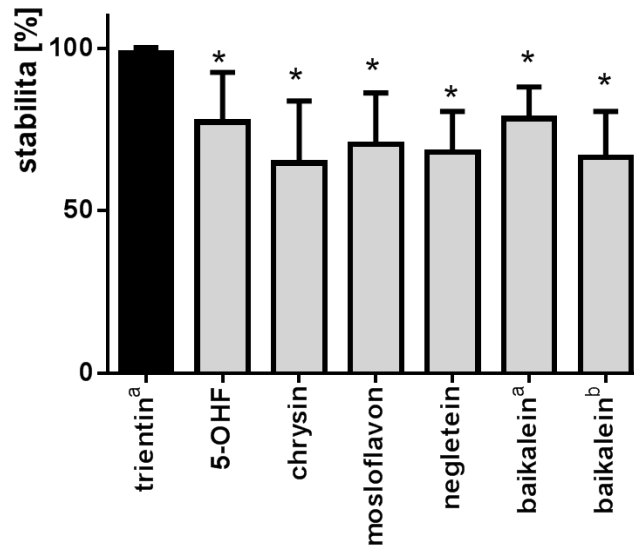
Obr.52: Porovnanie chelatácie Cu⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 7.5 so znázornením konfidenčných intervalov.



Obr.53: Porovnanie chelatácie Cu²⁺ iónov u vybraných flavónov pri pH 7.5 so znázornením konfidenčných intervalov.

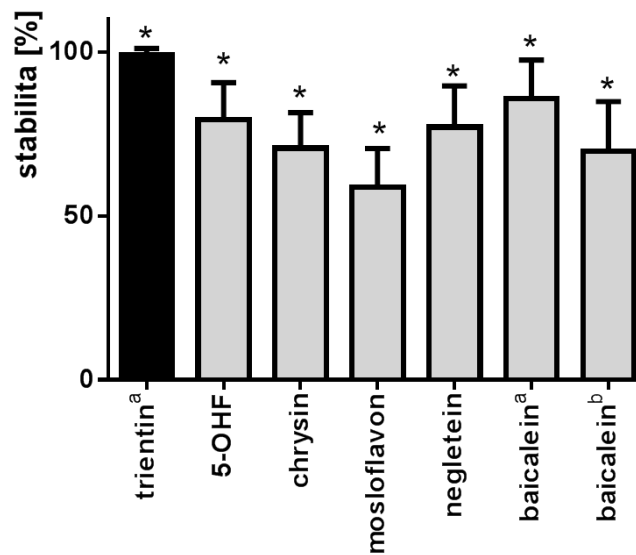
5.4. STABILITA KOMPLEXOV S MEĎNÝMI A MEĎNATÝMI IÓNNMI

5.4.1. Meďné ióny



Obr.54 Porovnanie stability komplexov flavonoid-meďné ióny so štandardom trietinóm.

5.4.2. Meďnaté ióny

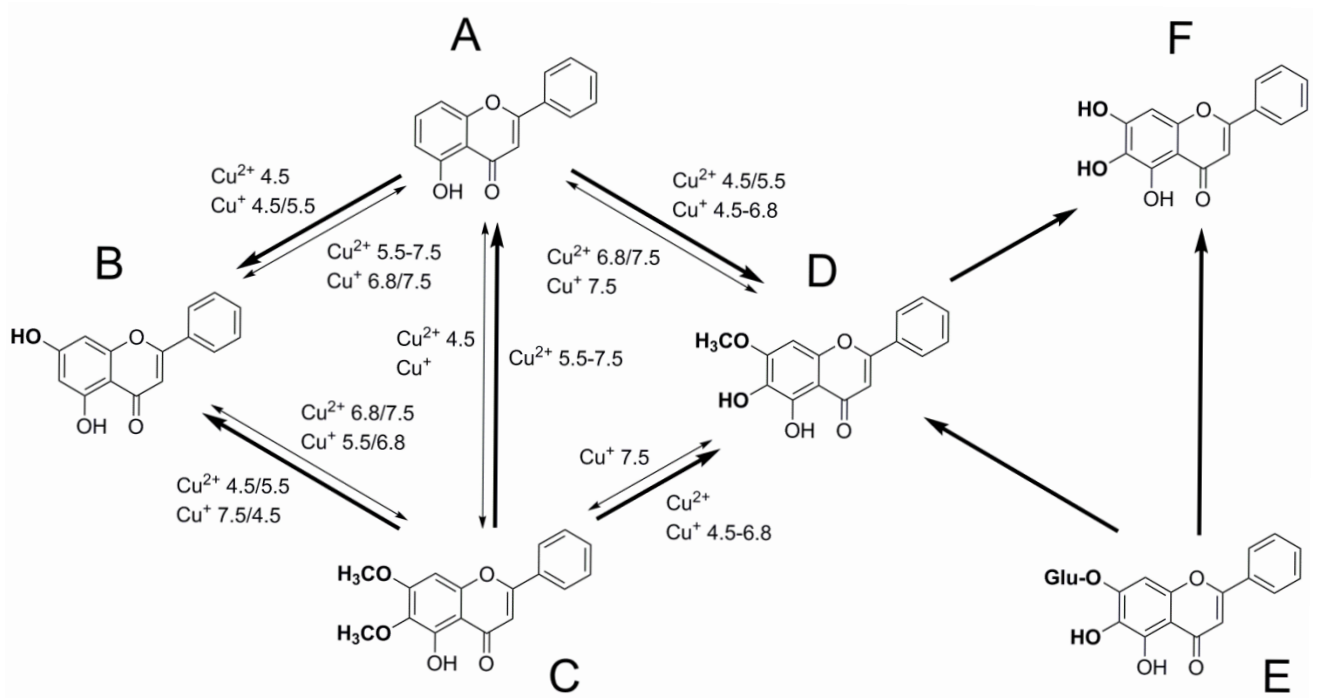


Obr.55: Porovnanie stability komplexov flavonoid-meďnaté ióny so štandardom trietinóm.

^a pH 6.8, 7.5

^b pH 4.5, 5.5

5.5. POROVNANIE CHELATAČNEJ AKTIVITY JEDNOTLIVÝCH FLAVÓNOV



Obr.56: Efekt substitúcie na kruhu A. (A) 5-hydroxyflavón, (B) chryzín, (C) mosloflavón, (D) negleteín, (E) baikalín, (F) baikaleín. Smer šípky udáva vzťah medzi zlúčeninami – hrubá jednosmerná šípka znamená významný rozdiel v aktivite ($p < 0,05$), obojsmerná šípka zas rovnakú aktivitu. (Glu – glukuronová kyselina)

6. DISKUSIA A ZÁVER

Spektrofotometrické stanovenie je vďaka časovej a finančnej nenáročnosti jednou z najpoužívanejších metód na stanovenie medi *in vitro*. Niektoré spektrofotometrické metódy môžu byť limitované nízkou citlivosťou alebo úzkym rozsahom pH. Disodná soľ bathocuproindisulfónovej kyseliny (BCS) však predstavuje vďaka svojim vlastnostiam vhodný spektrofotometrický indikátor. K jej výhodám patrí vysoká afinita k meďným iónom a tvorba chelatačných komplexov v širokom rozsahu pH a so stabilnou absorbanciou. Bathocuproinová metóda je pri použití vhodného redukčného činidla aplikovateľná aj na stanovenie chelatacie meďnatých iónov. Vzhľadom na vysokú afinitu BCS k medi je tiež možné stanoviť relatívnu afinitu testovanej látky a v prípade silných chelátorov je možné určiť stechiometriu. I keď má BCS čiastočnú afinitu aj k meďnatým iónom, nepredpokladá sa výrazné ovplyvnenie interakcie BCS s meďnými iónmi. Navyše má BCS oproti ostatným indikátorom výhodu špecifity k meďným iónom[57].

Chelatačnej aktivite medi bola doteraz na rozdiel od železa venovaná omnoho menšia pozornosť vedeckej obce. Táto práca dokazuje schopnosť niektorých flavónov vytvárať s iónmi medi chelatačné komplexy, aj keď je táto ich schopnosť v závislosti na štruktúre flavónu veľmi variabilná.

Chelatačnú aktivitu štruktúrne najviac ovplyvňuje prítomnosť 3-hydroxy-4-keto, 5-hydroxy-4-keto a 3',4'-dihydroxyl skupiny na kruhu B a (5),6,7-(tri)dihydroxylová substitúcia na kruhu A. Izolované keto, hydroxylové a methoxylové skupiny neovplyvňujú chelataciu kovových iónov.

Náhrada hydroxylovej skupiny v kruhu A za methoxylovú spôsobila pokles chelatačnej aktivity, čo dokazuje klesajúca aktivita flavónov v sérii baikaleín > negleteín > mosloflavón. Na druhej strane bol však mosloflavón s dvomi methoxylovými skupinami za určitých podmienok ešte slabší chelátor ako základný flavón 5-hydroxyflavón. Tento jav by sa dal vysvetliť stericným bránením mosloflavónu methoxylovými skupinami. Túto teóriu podporuje aj fakt, že baikalín s naviazanou časťou glukózy (glukurnová kyselina) v polohe 7 bol v porovnaní s baikaleínom aj negleteínom slabší chelátor. Hydroxylová skupina v polohe 7 u chryzínu napomáha chelatacii v kyslom prostredí a v porovnaní s 5-hydroxyflavónom alebo mosloflavónom je chryzín pri kyslom pH silnejším chelátorom (obr.56).

Zo šiestich vybraných flavónov vykazoval najvyššiu chelatačnú aktivitu s meďnými aj meďnatými iónmi baikaleín (obr.20 a 21) s tromi hydroxylovými skupinami na kruhu A.

Negleteín (obr.28 a 29) a chryzín (obr.24 a 25) vykazovali vyššiu chelatačnú aktivitu s meďnatými iónmi, 5-hydroxyflavón (obr.18 a 19) vykazoval miernu chelatačnú aktivitu len pri vyšších hodnotách pH (6.8 a 7.5). Mosloflavón (obr.26 a 27) vykazoval výrazne vyššiu chelatačnú aktivitu s meďnatými iónmi, pri pH 4.5 nechelatoval však s meďnými ani meďnatými iónmi takmer vôbec. Najnižšia chelatačná aktivita bola nameraná u baikalínu (obr.22 a 23).

Hoci môžu byť tieto zistenia veľmi nápomocné či už v oblasti farmakológie alebo fyziológie, pre detailné určenie vplyvu flavonoidov na farmakokinetiku medi v ľudskom organizme sú potrebné ďalšie podrobné štúdie.

Žiaden z testovaných flavónov nebol selektívny k jednému alebo druhému oxidačnému stavu medi (Cu^+ / Cu^{2+}), ale vyššiu afinitu vykazovali vo všeobecnosti k oxidovanej forme medi (Cu^{2+}). Podobné výsledky boli zistené aj v štúdiách zameraných na chelataciu železa. No na rozdiel od železa, ktorého osud v organizme je už dobre preštudovaný, farmakokinetika medi a hlavne význam jednotlivých oxidačných stavov ostáva stále predmetom diskusie. Zdá sa, že transportér medi CTR1 rozoznáva meďné ióny, no nie je vylúčená ani možná absorpcia medi vo forme meďnatých iónov.

Flavonoidy so slabším chelatačným účinkom by teoreticky mohli spolu s vhodným redukčným činidlom meďnaté ióny redukovať na meďné a ovplyvňovať tak ich vstrebávanie v organizme. Štúdie zaoberajúce sa touto teóriou sú v procese testovania na laboratórnych potkanoch. Doterajšie výsledky sú veľmi nejednoznačné. Na jednej strane podávanie čaju s obsahom polyfenolov, rutínu alebo katechínu zvieratám neovplyvnilo vstrebávanie medi, na druhej strane však niektoré testy dokazujú, že po podaní rutínu došlo k zníženiu obsahu medi v pečeni.

Ďalším zaujímavým faktorom je anti/pro-oxidačná aktivita komplexu flavonoid-meď. Podľa nedávnych štúdií tieto komplexy vykazovali vyššiu antioxidačnú aktivitu než samotné flavonoidy. Tieto výsledky momentálne nie sú v súlade so žiadnou doteraz publikovanou literatúrou a budú predmetom výskumu.

Táto práca dokazuje veľkú variabilitu chelatačnej schopnosti medi medzi jednotlivými flavónmi. Aj keď väčšina z nich vykazovala schopnosť chelatovať ióny medi, v prítomnosti kompetitívneho indikátora, BCS, bola vo väčšine prípadov ich chelatačná schopnosť značne

potlačená. Dôležitým faktorom bola najmä ich chemická štruktúra a substitúcia na jednotlivých kruhoch základného skeletu. Niektoré z nich sa vďaka vhodnej substitúcii dokázali uplatniť aj vo vysoko kompetitívnom prostredí. Ako príklad môžeme uviesť baikaleín s tromi hydroxylovými skupinami na kruhu A. Ďalším dôležitým faktorom, ovplyvňujúcim chelatačnú aktivitu, bolo pH prostredia. Pri nižších hodnotách pH (pH = 4.5) vykazoval napríklad baikaleín dokonca vyššiu chelatačnú aktivitu ako klinicky používaný trientín[58].

Všetky testované flavóny vykazovali v komplexoch s meďnými i meďnatými iónmi stabilitu. V komplexoch flavonoid-meďnaté ióny bola ich stabilita nevýrazne vyššia. Výnimku tvorili len mosloflavón v komplexe s meďnými iónmi a chryzín v komplexe s meďnatými iónmi, u ktorých bola stabilita o niečo vyššia.

Stabilita komplexov testovaných flavónov s iónmi medi bola porovnaná s trientínom.

7. LITERATÚRA

1. Brewer, G.J., *Copper in medicine*. Curr Opin Chem Biol, 2003. **7**(2): p. 207-12.
2. Pavlovicova, R., *Fundamental aspects of secondary metabolism and its expression in fungal metabolism*. Chemicke Listy, 1998. **92**(5): p. 406-414.
3. Crozier, A., M.N. Clifford, et al., *Plant secondary metabolites : occurrence, structure and role in the human diet*. 2006, Oxford ; Ames, Iowa: Blackwell Pub. xii, 372 p.
4. Jablonska, E., J. Gromadzinska, et al., *Selenium, zinc and copper in the Polish diet*. Journal of Food Composition and Analysis, 2013. **31**(2): p. 259-265.
5. Reilly, C., *The nutritional trace metals*. 2004, Oxford, OX, UK ; Ames, IA, USA: Blackwell Pub. xiv, 238 p.
6. Schwartz, J.A., K.T. Olarte, et al., *Regulation of copper toxicity by Candida albicans GPA2*. Eukaryot Cell, 2013. **12**(7): p. 954-61.
7. Emsley, J., *Nature's building blocks : an A-Z guide to the elements*. Reprinted as TSP paperback 2001. ed. 2001, Oxford ; New York: Oxford University Press. viii, 538 p.
8. Wiley-VCH, *Ullmann's Agrochemicals*. 2007: Wiley.
9. Tumer, Z. and L.B. Moller, *Menkes disease*. Eur J Hum Genet, 2010. **18**(5): p. 511-8.
10. Kodama, H., C. Fujisawa, et al., *Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment*. Curr Drug Metab, 2012. **13**(3): p. 237-50.
11. Behari, M. and V. Pardasani, *Genetics of Wilsons disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2010. **16**(10): p. 639-44.
12. Schrag, A. and J.M. Schott, *Images in clinical medicine. Kayser-Fleischer rings in Wilson's disease*. N Engl J Med, 2012. **366**(12): p. e18.
13. Kim, Y.H., R. Lee, et al., *Identification of a novel mutation in the ATP7A gene in a Korean patient with Menkes disease*. J Korean Med Sci, 2011. **26**(7): p. 951-3.
14. Squitti, R., M. Siotto, et al., *Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2014. **35S2**: p. S40-S50.
15. Zlokovic, B.V., *Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration*. Trends Neurosci, 2005. **28**(4): p. 202-8.
16. Iqbal, K., F. Liu, et al., *Alzheimer disease therapeutics: Focus on the disease and not just plaques and tangles*. Biochem Pharmacol, 2014.
17. Castellani, R.J., R.K. Rolston, et al., *Alzheimer disease*. Dis Mon, 2010. **56**(9): p. 484-546.
18. Riha, M., J. Karlickova, et al., *Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines*. J Inorg Biochem, 2013. **123**: p. 80-7.
19. Suhartono, E., E. Viani, et al., *Total flavonoid and Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in South Kalimantan of Indonesian*. 2nd International Conference on Asia Agriculture and Animal (Icaaa 2012), 2012. **4**: p. 235-239.
20. Tanaka, T. and R. Takahashi, *Flavonoids and asthma*. Nutrients, 2013. **5**(6): p. 2128-43.

21. Kumar, S. and A.K. Pandey, *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 162750.
22. Cheng, A.X., X.J. Han, et al., *The function and catalysis of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases involved in plant flavonoid biosynthesis*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(1): p. 1080-95.
23. Winkel-Shirley, B., *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology*. Plant Physiology, 2001. **126**(2): p. 485-493.
24. Di Carlo, G., N. Mascolo, et al., *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. Life Sci, 1999. **65**(4): p. 337-53.
25. Manach, C. and J.L. Donovan, *Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans*. Free Radic Res, 2004. **38**(8): p. 771-85.
26. Lago, J.H., A.C. Toledo-Arruda, et al., *Structure-activity association of flavonoids in lung diseases*. Molecules, 2014. **19**(3): p. 3570-95.
27. Singh, M., M. Kaur, et al., *Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry*. Eur J Med Chem, 2014. **84C**: p. 206-239.
28. Majewska-Wierzbicka, M. and H. Czczot, [*Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases*]. Pol Merkur Lekarski, 2012. **32**(187): p. 50-4.
29. Romagnolo, D.F. and O.I. Selmin, *Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence*. J Nutr Gerontol Geriatr, 2012. **31**(3): p. 206-38.
30. Nazreen, S., G. Kaur, et al., *New flavones with antidiabetic activity from Callistemon lanceolatus DC*. Fitoterapia, 2012. **83**(8): p. 1623-7.
31. Gálvez, J., *Bioactive Natural Products (Part F)*. Studies in Natural Products Chemistry, ed. Atta-ur-Rahman. 2007. 1035.
32. Orhan, D.D., B. Ozcelik, et al., *Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids*. Microbiol Res, 2010. **165**(6): p. 496-504.
33. Savi, L.A., T. Caon, et al., *Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids*. Fitoterapia, 2010. **81**(8): p. 1142-6.
34. Yao, L.H., Y.M. Jiang, et al., *Flavonoids in food and their health benefits*. Plant Foods Hum Nutr, 2004. **59**(3): p. 113-22.
35. Nebo, L., R.M. Varela, et al., *Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families*. Phytochemistry Letters, 2014. **8**: p. 226-232.
36. Jiang, P., F. Burczynski, et al., *Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species Fagopyrum esculentum, F-tataricum, and F-homotropicum and their protective effects against lipid peroxidation*. Food Research International, 2007. **40**(3): p. 356-364.
37. Wang, Y., S. Chen, et al., *Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **91**(4): p. 949-56.
38. Park, S.R., J.A. Yoon, et al., *Engineering of plant-specific phenylpropanoids biosynthesis in Streptomyces venezuelae*. J Biotechnol, 2009. **141**(3-4): p. 181-8.

39. Du, F.C., F.K. Zhang, et al., *Advances in microbial heterologous production of flavonoids*. African Journal of Microbiology Research, 2011. **5**(18): p. 2566-2574.
40. Verma, A.K. and R. Pratap, *Chemistry of biologically important flavones*. Tetrahedron, 2012. **68**(41): p. 8523-8538.
41. Venkatachalam, H., Y. Nayak, et al., *Synthesis, Characterization and Antioxidant Activities of Synthetic Chalcones and Flavones*. 2nd International Conference on Chemistry and Chemical Process (Icccp 2012), 2012. **3**: p. 209-213.
42. Uivarosi, V., M. Badea, et al., *Synthesis and characterization of some new complexes of magnesium (II) and zinc (II) with the natural flavonoid primuletin*. Molecules, 2013. **18**(7): p. 7631-45.
43. Wang, Z., C. Jiang, et al., *Baicalein Induces Apoptosis and Autophagy via Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatocellular Carcinoma Cells*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 732516.
44. Deschamps, J.D., V.A. Kenyon, et al., *Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipoxygenases*. Bioorg Med Chem, 2006. **14**(12): p. 4295-301.
45. Hsieh, Y.C., S.J. Hsieh, et al., *The lipoxygenase inhibitor, baicalein, modulates cell adhesion and migration by up-regulation of integrins and vinculin in rat heart endothelial cells*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(8): p. 1235-45.
46. Perez, C.A., Y. Wei, et al., *Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin*. J Inorg Biochem, 2009. **103**(3): p. 326-32.
47. Takahashi, H., M.C. Chen, et al., *Baicalein, a component of Scutellaria baicalensis, induces apoptosis by Mcl-1 down-regulation in human pancreatic cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(8): p. 1465-74.
48. Walle, T., Y. Otake, et al., *Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **51**(2): p. 143-6.
49. Woo, K.J., Y.J. Jeong, et al., *Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity*. FEBS Lett, 2005. **579**(3): p. 705-11.
50. Wolfman, C., H. Viola, et al., *Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from Passiflora coerulea*. Pharmacol Biochem Behav, 1994. **47**(1): p. 1-4.
51. Brown, E., N.S. Hurd, et al., *Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a Passiflora incarnata extract, in the laboratory rat*. AANA J, 2007. **75**(5): p. 333-7.
52. Righi, G., R. Antonioletti, et al., *Convergent synthesis of mosloflavone, negletein and baicalein from chrysin*. Tetrahedron, 2010. **66**(6): p. 1294-1298.
53. Singh, B., T. Sidiq, et al., *Anti-inflammatory and immunomodulatory flavones from Actinocarya tibetica Benth*. Nat Prod Res, 2013. **27**(23): p. 2227-30.
54. Lombardo, E., C. Sabellico, et al., *Protection of cells against oxidative stress by nanomolar levels of hydroxyflavones indicates a new type of intracellular antioxidant mechanism*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60796.

55. Hu, H.W., X.M. Xie, et al., *[Study on the flavonoids from Mosla chinensis 'jiangxiangru']*. Zhong Yao Cai, 2010. **33**(2): p. 218-9.
56. Yadava, R.N. and P. Tripathi, *A novel flavone glycoside from the stem of Bauhinia purpurea*. Fitoterapia, 2000. **71**(1): p. 88-90.
57. Riha, K., J. Masek, et al., *Novel method for localization of common carotid artery transverse section in ultrasound images using modified Viola-Jones detector*. Ultrasound Med Biol, 2013. **39**(10): p. 1887-902.
58. Riha, M., J. Karlickova, et al., *In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids*. Rsc Advances, 2014. **4**(62): p. 32628-32638.

8. ABSTRAKT

Michalicová A., Stanovenie chelatácie iónov medi u flavónov bathocuproinovou metódou, Rigorózna práca 2013/2014, Univerzita Karlova v Prahe, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, s.62.

Meď je v ľudskom tele tretím najrozšírenejším stopovým prvkom. Zodpovedá za správne fungovanie rôznych enzýmov, zúčastňujúcich sa dôležitých metabolických procesov. Udržanie homeostázy medi je pre človeka nevyhnutné a jej poruchy vedú k rôznym patologickým zmenám a ochoreniam.

Rastliny produkujú veľké množstvo metabolitov, ktoré vo všeobecnosti rozdeľujeme na primárne a sekundárne. Sekundárny metabolizmus, nadväzujúci na metabolizmus primárny síce nie je pre život rastlín nevyhnutný, jeho produkty však ponúkajú širokú paletu biologických účinkov, využívaných v súčasnej medicíne i farmácii. Niektoré sekundárne metabolity zo skupiny flavónov vykazujú napríklad chelatačnú aktivitu a sú schopné tvoriť chelatačné komplexy s prechodnými prvkami, ako napríklad meď, železo, atď. Vďaka svojim vlastnostiam by mohli tieto látky predstavovať potenciálne terapeutické riešenia porúch homeostázy medi.

Táto práca sa zaoberá chelatačnou aktivitou šiestich flavónov so substitúciou na kruhu A – 5-hydroxyflavón, baikaleín, baikalín, chryzín, mosloflavón a negleteín. Najvyššiu chelatačnú aktivitu vykazuje baikaleín, naopak najnižšia chelatačná aktivita bola nameraná u baikalínu. Meď-chelatačná aktivita flavónov je do veľkej miery ovplyvnená ich štruktúrou.

Kľúčové slová – sekundárny metabolizmus, flavóny, meď, chelatácia, bathocuproinová metóda

9. ABSTRACT

Michalicová A., Assessment of copper chelation of flavones by bathocuproine method, Rigorous thesis 2013/2014, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, pp.62.

In the human body, copper is the third most widespread trace element. It is responsible for the proper function of various enzymes, which are involved in many important metabolic processes. The maintenance of copper homeostasis is essential for human and its disorders lead to different diseases and pathological changes.

Plants produce a large number of metabolites, which are generally divided into primary and secondary. Secondary metabolism, built on primary metabolism, is not necessary for plant life, but offers a wide range of biological effects, used in medicine and pharmacy. Some secondary metabolites from the group of flavones also show chelating activity and are capable of forming chelating complexes with transition elements, such as copper, iron, etc. Thanks to their properties, they could introduce potential therapeutic solutions for copper homeostasis disorders.

This thesis deals with the chelating activity of six flavones with the substitution on the ring A – 5-hydroxyflavone, baicalein, baicalin, chrysin, mosloflavone and negletein.

Baicalein exhibited the highest chelating activity, while the baicalin chelating activity was the lowest one. The chelating activity of flavones is, to a high degree, affected by their structure.

Key words – secondary metabolism, flavones, copper, chelation, bathocuproine method