

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Inhibice α -glukosidáz přírodními látkami jako možná strategie k vývoji nových antidiabetik

Samuel Šinkovský

Hradec Králové 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

**Inhibice α -glukosidáz přírodními látkami jako
možná strategie k vývoji nových antidiabetik**

**Inhibition of α -glucosidases by natural substances
as a possible strategy for the development of new
antidiabetic drugs**

Autoři: Samuel Šinkovský

Škola: Gymnázium J. K. Tyla, Tylovo nábřeží 682, 500 02 Hradec
Králové

Kraj: Královéhradecký kraj

Konzultant: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Hradci Králové dne 30.04.2025.....

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval panu prof. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za jeho vedení, vstřícnost, cenné rady a znalosti, které mi pomohly při zpracování tématu. Také bych rád poděkoval paní PharmDr. Zuzaně Lomozové, Ph.D. a Mgr. Patřicii Harčárové za trpělivost a odbornou pomoc při praktické části mé práce. Nemalý dík patří i mé rodině a blízkým, kteří mě po celou dobu práce bezmezně podporovali.

Anotace

Má práce se zabývá hledáním nových léčiv na onemocnění diabetes mellitus 2. typu. Za cíl jsem si zvolil nalézt léčivo/a inhibující enzym α -glukosidázu. Tento enzym je důležitý při trávení sacharidů a vyskytuje se v trávicím traktu. Potlačením funkce tohoto enzymu se dá snížit postprandiální glykemie, která je problémem právě pro pacienty s diabetem mellitem. Práce se soustředí na látky ze skupiny flavonoidů a sleduje jejich schopnost inhibice na savčím enzymu, konkrétně potkaní intestinální glukosidázy. Testuji v ní několik skupin flavonoidů a následně porovnávám jejich inhibiční vlastnosti. Důležitou úlohou práce je přiřazení inhibičních schopností daným strukturám a objasnění toho, proč jsou některé flavonoidy lepšími inhibitory. Tato práce zároveň slouží jako navázání na výzkum testující inhibici kvasinkové α -glukosidázy.

Klíčová slova

Diabetes mellitus; flavonoidy; α -glukosidáza; inhibice; postprandiální glykémie

Annotation

My work deals with the search for new drugs suitable in type 2 diabetes mellitus treatment. The area of medication I am researching in are drugs based on the principle of inhibiting the enzyme α -glucosidase, which breaks down polysaccharides in the digestive tract. By suppressing the function of this enzyme, postprandial glycemia can be reduced, which is a problem of patients with diabetes mellitus. The work focuses on substances from the flavonoid group and monitors their potential ability to inhibit intestinal glucosidase in rats. I tested several groups of flavonoids and then compare their inhibitory properties. An important task of the work is to assign inhibitory abilities to given structural characteristics and to clarify why some flavonoids are better inhibitors. This work also serves as a follow-up to a research testing inhibition of yeast α -glucosidase.

Keywords

Diabetes mellitus; flavonoids; α -glucosidase; inhibition; postprandial glycemia

Seznam zkratek

ČR – Česká republika

ČSÚ – český statistický úřad

DM – diabetes mellitus

DM1 – diabetes mellitus 1. typu (insulin-dependentní)

DM2 – diabetes mellitus 2. typu (non-insulin-dependentní)

DMSO – dimethylsulfoxid

EC – Enzyme Commission

ES – enzym-substrát

IDF – International Diabetes Federation

LADA – latent autoimmune diabetes of adults

PAD – perorální antidiabetika

pNAG – p-nitrofenyl α -D-glukopiranosid

Obsah

Úvod	8
1 Teoretická část	9
1.1 Diabetes mellitus.....	9
1.1.1 Diabetes mellitus 1. typu (DM1)	9
1.1.2 Diabetes mellitus 2. typu (DM2)	9
1.1.3 Patofyziologie DM2	10
1.1.4 Příčiny a komplikace DM2.....	10
1.1.5 Léčba a farmaka užívaná při léčbě DM2	10
1.2 Enzymy a jejich inhibice.....	12
1.2.1 α -glukosidáza	12
1.2.2 Inhibitory α -glukosidáz	12
1.2.3 Akarbóza.....	13
1.3 Flavonoidy	14
1.3.1 Zástupci flavonoidů	15
2 Praktická část	16
2.1 Materiál	16
2.2 Přístroje	16
2.3 Chemikálie	16
2.4 Testované látky	17
2.5 Využité počítačové programy	18
2.6 Metodika	18
2.6.1 Příprava látek.....	18
2.6.2 Metodický postup experimentu	19
2.7 Výpočty.....	21
3 Výsledky	22
3.1 Flavanony.....	22

3.2	Flavanoly a flavanonoly.....	23
3.3	Flavony	24
3.4	Flavonoly	25
3.5	Grafické porovnání účinnosti flavonoidů	27
4	Diskuze	30
	Závěr.....	34
	Použité zdroje	35
	Seznam obrázků.....	38
	Seznam tabulek.....	39

Úvod

V této práci bych se chtěl zabývat hledáním nových léčiv na diabetes mellitus (DM). Veškeré detaily tohoto onemocnění budou dále popsány v teoretické části práce, úvodem však musím zmínit, že se jedná o onemocnění s vysokou morbiditou a mortalitou, a to i přes významné recentní pokroky v terapii této choroby. DM trpí celosvětově přes 540 milionů lidí a v Česku bylo k roku 2021 diagnostikováno přes 900 tisíc dospělých s tímto onemocněním. V mnoha publikacích se mluví o tomto onemocnění jako o pandemii [1; 2; 4;]

Léčba diabetu představuje pro lidstvo enormní výzvu, a to i když dnes již máme poměrně vysoký počet antidiabetik, terapií a postupů, které při takto velkém počtu mohou být specializovány na daného pacienta. Jednou z možností je léčba pomocí inhibice enzymů α -glukosidáz, štěpících poly/disacharidy. Toto štěpení má za následek uvolnění glukózy z řady větších sacharidů, a tak i zvýšení glykémie v krvi a na tu tělo musí reagovat sekrecí inzulínu, což je u diabetiků obou typů významným problémem. [1; 2]

Tato práce se bude soustředit právě na inhibitory enzymů α -glukosidáz. Momentálně je z řady inhibitorů v České republice klinicky používána pouze akarbóza, jejíž užívání však následují gastrointestinální potíže, a tak není léčivo příliš oblíbeno. [1; 2; 7]

Cílem mojí práce bude najít alternativu tohoto léčiva z řady látek flavonoidů. Budu se snažit najít látku, která by vykazovala stejné, nebo i lepší inhibiční vlastnosti s minimem vedlejších potíží a potenciálně by mohla být použita jako nové doplňkové léčivo na diabetes mellitus. Je nutno zmínit, že se jedná o přírodní látky a řada pacientů je přesvědčena, i když mylně, že přírodní léčiva jsou bezpečnější než syntetická. Proto by tyto látky mohly být alternativou speciálně pro pacienty preferující přírodní terapii.

1 Teoretická část

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, česky úplavice cukrová, zkráceně cukrovka, je chronické metabolické onemocnění s vysokou mortalitou i morbiditou. Jedná se o patologický jev, při kterém se pacientovo tělo není schopno dobře vyrovnat se zvýšením glykémie, tj. hladiny glukózy v krvi. Další problémy, které jsou s tímto onemocněním spojeny, a to zejména pokud je neléčené, jsou například: zvracení, bolesti břicha, zamlžené vidění, hyperglykemické stavy s poruchou vědomí, náchylnost k infekcím a především kardiovaskulární potíže vedoucí k mnohdy smrtelným infarktům myokardu.

Pro pochopení vážnosti problému, který představuje DM pro lidstvo, se stačí podívat na statistiku. V Česku bylo k roku 2016 Českým statistickým úřadem (ČSÚ) evidováno více jak 900 tisíc nemocných. Průměrný nárůst je odhadován na 60 tisíc nových pacientů každý rok. DM je v Česku čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí a její léčba přijde stát ročně na 20 mld. korun, což představuje 10 % veškerých zdravotních výdajů. [5] Celosvětově se poté jedná o více jak 540 milionů nemocných a podle odhadu International Diabetes Federation (IDF) bude v roce 2045 trpět DM zhruba 783 milionů dospělých osob. [2; 3; 5; 6] DM se dělí na dva typy, a to podle toho, zda jde o absolutní nedostatek inzulínu nebo jeho snížené účinky.

1.1.1 Diabetes mellitus 1. typu (DM1)

Diabetes mellitus prvního typu je relativně vzácné onemocnění. Trpí jím ze všech diabetiků pouze 7 %. Největším problémem tohoto typu je absolutní nedostatek hormonu inzulínu. Ten je způsoben zánětem Langerhansových ostrůvků v pankreatu, při němž dojde ke zničení zde umístěných β -buněk, které jsou za produkci inzulínu zodpovědné. Zánět bývá výsledkem špatné reakce imunitního systému na virovou infekci v mladém věku pacienta, tj. mezi 2-4 rokem jeho života. Výjimkou je pozvolná progresse onemocnění v pozdějším věku. V tomto případě se jedná o tzv. latentní autoimunní diabetes dospělých neboli LADA. V obou případech DM1 je nenávratně poškozena tvorba a sekrece inzulínu, a tak se DM1 také nazývá inzulín-dependentním typem DM. Léčba DM1 momentálně spočívá především v substituci inzulínem, a to v kombinaci se speciální diabetickou dietou a složitým monitoringem, který zahrnuje kontinuální pozorování glykémie. [2] V současné době nejsou při léčbě DM1 využívána léčiva cílící na inhibici α -glukosidáz, i když by principiálně mohla být používána jako doplňková léčiva. Má práce se tudíž bude zaměřovat spíše na potenciál těchto léčiv při léčbě DM2.

1.1.2 Diabetes mellitus 2. typu (DM2)

Diabetes mellitus druhého typu představuje pro lidstvo největší výzvu ze všech typů diabetu vůbec. Jedná se o komplexní metabolickou poruchu, při které si tělo vyvine inzulínovou rezistenci a následně, i když po dlouhé době, dochází i k poškození inzulínové tvorby a sekrece. [7; 16] DM2 je onemocnění, které se rozvíjí pomaleji, než např. DM1, a k jeho

manifestaci dochází až v dospělosti. [7]. Jedná se o jeden z nejrozšířenějších zdravotních problémů dnešní generace, protože jeho hlavní příčinou je špatný životní styl. Kolem 90 % všech diabetických pacientů trpí právě DM2 a kvůli tomuto typu se o diabetu mellitu mluví v poslední době jako o pandemii. [6; 7]

1.1.3 Patofyziologie DM2

Onemocnění je charakterizováno relativním nedostatkem inzulínu. Ten vzniká kombinací inzulínové rezistence na receptorech a později i neschopností slinivky břišní produkovat inzulín. Ze začátku organismus reaguje na inzulínovou rezistenci zvýšenou sekrecí inzulínu. Očekávaný výsledek se ale v těle, kvůli snížené reakci tkání na inzulín, nedostaví, a tak inzulínová kompenzační sekrece selhává. Poté v organismu nastává hyperglykémie a inzulínová sekrece se navíc i postupně snižuje [1; 7]

1.1.4 Příčiny a komplikace DM2

Jak jsem již zmiňoval výše, hlavní příčinou vzniku DM2 je pomalý, energeticky nenáročný a nezdravý životní styl. Tento život jde ruku v ruce se vznikem dyslipidémie, a tudíž i zvýšením hladiny triglyceridů a případně i cholesterolu v krvi, [2] nižší kvalitou spánku a vyšší mírou stresu. [2; 7] Všechny tyto faktory výrazně přispívají k vývoji prediabetu a následně k vytvoření inzulínové rezistence. Je však potřeba zmínit faktory, které pacient ovlivnit nemůže. Mezi ně patří věk pacienta nad 40 let, pohlaví, neboť ženy jsou statisticky náchylnější k onemocnění, a především genetická výbava. [7] Výzkumem bylo zjištěno že až 36 genů se podílí na zvýšení rizika vzniku DM2, a to u některých alel až 1,5krát. [13; 14] Většina genů, které ovlivňují vznik diabetu, se podílí na funkci β -buněk ve slinivce.

Finální komplikací, která je pro pacienta často smrtelná, je až čtyřikrát vyšší riziko kardiovaskulárních chorob, včetně ischemické choroby srdeční a cévní mozkové příhody. [2] K pozdějším komplikacím patří dále neuropatie, syndrom diabetické nohy s výrazně vyšší pravděpodobností amputace končetin, selhání ledvin, netraumatická slepota, zvýšení rizika ohrožení kognitivních funkcí a zvýšení pravděpodobnosti demence, vyvolanou nemocí jako je Alzheimerova choroba a vaskulární demence. [8; 9; 10]

1.1.5 Léčba a farmaka užívaná při léčbě DM2

Důležitým krokem v boji proti DM2 je spojení několika typů léčby. V první řadě je potřeba zlepšit životní styl pacienta. Aerobní sportovní činnost minimálně 4krát týdně nejen přispívá ke kompenzaci diabetu, ale studie i prokázaly, že snížení tělesné hmotnosti o 5-10 % vede k výraznému snížení kardiovaskulárních komplikací. [2] Dalším krokem je úprava jídelníčku nemocného. Pacienti s DM2 mají často velmi špatné stravovací návyky, a proto je prvním krokem snaha omezit nezdravé složky v jídle. Následně je pacientům často doporučena nízkenergetická, tzv. redukční dieta. [2]

Vedle výše zmíněných kroků se u pacientů s DM2 aplikují různé kombinace antidiabetik. Pokud nejsou přítomny kontraindikace, začíná se terapie léčivem ze skupiny biguanidů [2],

kterým je nejen v Česku metformin. Jak bylo zmíněno výše, dnešní léčba DM2 se vyznačuje kombinací různých skupin antidiabetik. Těmito specifikovanými terapiemi lze dosáhnout přesnějšího a lepšího přístupu při léčbě DM2. V následující tabulce je přehled skupin antidiabetik a jejich zástupců (viz Tabulka 1). [15]

Tabulka 1: Přehled lékových skupin a jejich zástupců

LÉKOVÁ SKUPINA	ZÁSTUPCI*
Biguanidy	metformin
Deriváty sulfonylurey	glimepirid, gliklazid, gliquidon, glipizid
Analoga GLP-1	exenatid, liraglutid, lixisenatid, semaglutid, dulaglutid
Inhitory DPP-4 (gliptiny)	sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, linagliptin, alogliptin
Inhibitory SGLT-2 (glifloziny)	empagliflozin, dapagliflozin, ertugliflozin, kanagliflozin
Thiazolidindiony	pioglitazon
Inhibitory α-glukosidasy	akarbose
Glinidy	repaglinid
Inzulíny	rychle působící: inzulín lidský, aspart, glulisin, lispro; středně působící: lidský-NPH; inzulín detemir, dlouze působící: glargin a degludek

1.2 Enzymy a jejich inhibice

1.2.1 α -glukosidáza

Enzymem, na který se v této práci soustředím je α -1,4-glukosidáza (EC 3.2.1.20; α -glukosidáza; maltáza). [28] Tento enzym se řadí do enzymové třídy hydrolázy, podtřídy glykosylázy a skupiny glykosidázy. [1; 23; 24] Skládá se z pěti strukturálních domén a aktivního místa, ve kterém probíhá štěpení sacharidů. [31] α -glukosidáza se dělí na kyselou lysozomální α -glukosidázu (GAA) a intestinální α -glukosidázu. [1; 32; 33] Právě s intestinální α -glukosidázou odebranou z potkaních střev budu v praktické části práce provádět experimenty. V lidském těle se tento membránově vázaný enzym nachází po celé délce tenkého střeva. Zde je odpovědný za poslední krok štěpení oligosacharidů, polysacharidů a glykokonjugátů (glykolipidy, glykoproteiny) obsahující koncovou glukózu. Výsledkem štěpení je α -D-glukóza, což je monosacharid, který je dále využíván v metabolismu celého těla.

V procesu štěpení sacharidů však není α -glukosidáza sama. Trávení škrobu zahajují slinná a pankreatická α -amylasa. Ta štěpí intramolekulární α -(1,4) a α -(1,6) vazby ve škrobu na krátké lineární či rozvětvené dextrinové řetězce a až ty jsou poté štěpeny enzymatickými komplexy, ve kterých je α -glukosidáza zakomponovaná. Jedná se o dva enzymatické komplexy: SI (sacharáza-isomaltáza) a MGAM (maltáza-glukoamyláza). Jak říká ve své práci Mgr. Kašpárková (Kašpárková, 2023): „*Přestože komplex glukosidas SI je ve střevě více hojný než komplex MGAM a zajišťuje také štěpení rozvětvených dextrinů svou α -(1,6) aktivitou, jeho hydrolytická aktivita je pomalá. MGAM oproti tomu disponuje vysokou hydrolytickou aktivitou. Enzymy SI jsou tedy spíše důležité pro udržení stabilní glykémie, zvláště po konzumaci vysoce glykemických potravin. MGAM se svou vysokou aktivitou zajišťují tělu rychlý přísun glukosy, což má vliv na náhlý nárůst postprandiální glykémie.*“ Enzymový komplex MGAM se mimo jiné skládá z α -glukosidázy (maltázy) a glukon-1,4- α -glukosidázy (glukoamylázy) a tudíž inhibicí těchto enzymů nejlépe předejdeme rychlému vzrůstu postprandiální glykémie. [1]

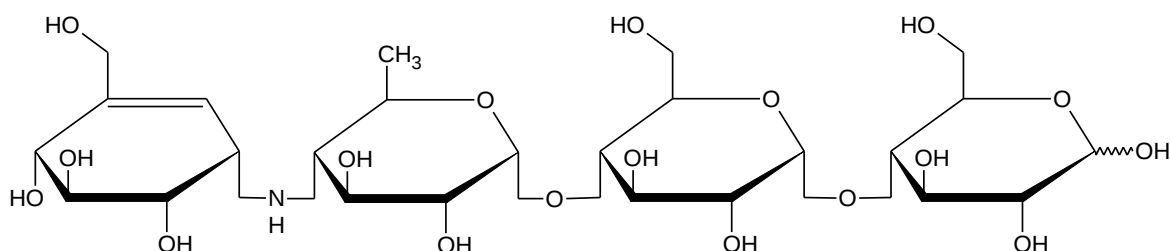
1.2.2 Inhibitory α -glukosidáz

Látky blokující tento enzym jsou využívány jako typ léčiv u DM2. Používají se především za účelem snížení postprandiální hyperglykémie. Léčiva jako akarboza nebo miglitol inhibují činnost enzymů, které v tenkém střevě štěpí polysacharidy a oligosacharidy na glukózové jednotky a zpomalují tak vstřebávání sacharidů. Tím pomáhají držet hladinu krevního cukru po jídle v normálu. [18, 19] Tento mechanismus však bohužel přináší značné množství nepříjemných vedlejších účinků. Kvůli působení mikrobiální střevní flóry na nenatrávené složené sacharidy dochází u pacientů ke gastrointestinálním bolestem, borborygmu, abdominální distenzi apod. [1, 16] Kvůli těmto potížím a nízké úhradě akarbozy pojišťovnou, není tento typ léčiv u pacientů příliš oblíben. [1; 16; 18]

1.2.3 Akarbóza

Akarbóza je pseudotetrasacharid mikrobiálního původu, který působí v tenkém střevě. Účinkem akarbózy se glukóza uvolňuje z tráveniny pomaleji. Postprandiální vzestup glykémie je tak nižší a pomalejší. Tento účinek je závislý na dávce podané akarbózy. Ta se po perorálním podání nevstřebává, pouze plní svou funkci inhibice enzymů a je následně vyloučena. [17; 21] Strukturu akarbózy tvoří dvě části: akarviosinová struktura a maltosa, která je navázaná na jejím redukčním konci [1; 20] (viz Obrázek 1).

Akarbóza byla v této práci použita jako standard. Srovnávám tudíž její inhibiční vlastnosti s látkami, které testuji. Je to jediné léčivo ze skupiny inhibitorů α -glukosidáz, které je v ČR používáno v klinické praxi. Pokud se používá, tak často v kombinované terapii, např. s deriváty sulfonylurey, a to především u pacientů s DM2. Akarbózu lze použít i u pacientů s diabetem 1. typu, pokud mají velké postprandiální výkyvy glykémie. [18]



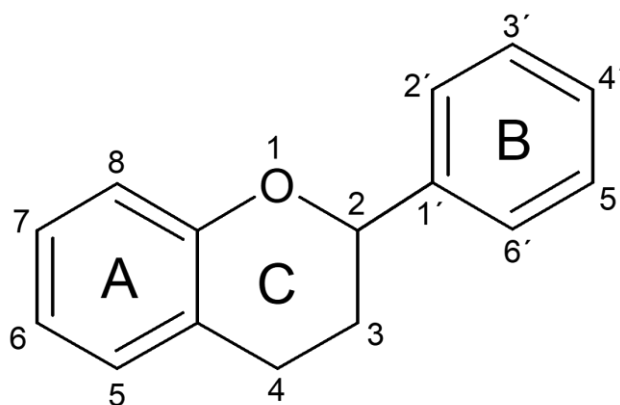
Obrázek 1. Chemická struktura akarbózy.

1.3 Flavonoidy

Látky, jejichž potenciál při inhibici α -glukosidázy v této práci sleduji, jsou flavonoidy. Jedná se o látky, které se v přírodě vyskytují jako sekundární rostlinné metabolity. Především je nacházíme v ovoci, zelenině, ořechách atd. Jejich vysoká koncentrace byla zaznamenána také v různých ovocných výrobcích či čokoládě. [33; 35]

Pro farmakologické využití jsou flavonoidy široce uplatňovány jako venofarmaka, antioxidanty a mají také určité antibakteriální a antivirové účinky. Dále je zkoumán i jejich potenciál inhibovat určité enzymy. [33; 34] Této schopnosti flavonoidů si začínají vědci všímat relativně nově a již na toto téma vycházejí články v předních vědeckých časopisech, jako je například periodikum Foods.

Strukturálně se jedná o skupinu polyfenolických látek, kterou spojuje základní struktura. Tato základní jednotka je tvořena dvěma benzenovými jádry, která jsou spojena přes pyranový kruh (viz Obrázek 2). Flavonoidy jsou velmi zajímavé tím, že dokáží na toto své jádro pojmout různé funkční skupiny a tím měnit své inhibiční vlastnosti. Flavonoidy sice obecně inhibují α -glukosidázy procesem, při kterém dochází v molekulách enzymu ke strukturálním změnám a přenosu energie, což by napovídalo tzv. nekompetitivní inhibici. Jiní zástupci, jako například myricetin se však váží přímo na aktivní místo enzymu. Vysoká variabilita inhibice a možnost uplatnění flavonoidů nabádá k dalšímu prozkoumání jejich inhibičního potenciálu. [1; 27; 31]

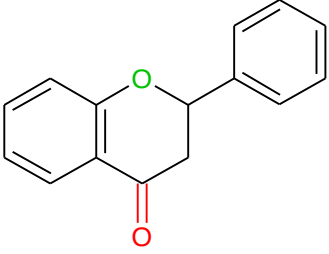
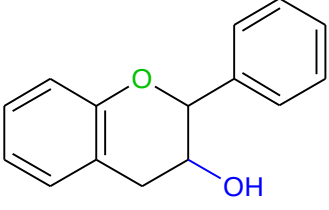
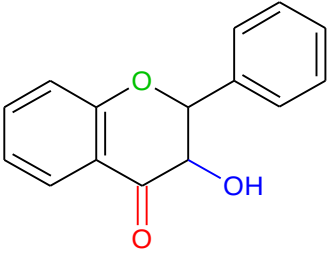
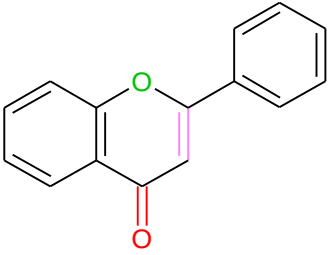
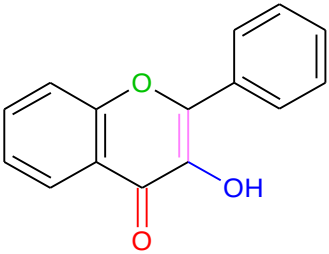


Obrázek 2. Flavan, základní struktura většiny flavonoidů.

1.3.1 Zástupci flavonoidů

Flavonoidy dělíme na různé skupiny podle polohy a typu substituentů na pyranovém okruhu. Rozdělení testovaných flavonoidů na skupiny je znázorněno v Tabulce č.2. [33; 34; 35]

Tabulka 2. Dělení flavonoidů na podskupiny

	SKUPINY	ZÁSTUPCI
flavanony		naringenin, naringin, hesperetin, hesperidin
flavanoly		katechin, epikatechin
flavanonoly		taxifolin
flavony		flavon, 5-hydroxyflavon, 7-hydroxyflavon, luteolin, baikalein, baikalin, diosmin, chrysin
flavonoly		3-hydroxyflavon, kvercetin, kempferol, rutin, morin, hyperosid, isokvercitrin, myricetin a také semisyntetický troxerutin

2 Praktická část

2.1 Materiál

- mikrotitrační destičky – 96 jamek (firma: Brand, Wertheim, Německo)
- mikrozkuhavky: 1,5 ml; 5,0 ml (firma: Eppendorf, Hamburg, Německo)
- automatické jednokanálové pipety: 10 – 100 μ l, 20 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l (Brand)
- vícekanálová pipeta: 30 – 300 μ l (firma: Biohit, Helsinky, Finsko)
- špičky k pipetám o objemu 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l (Eppendorf)

2.2 Přístroje

- spektrofotometr pro mikrotitrační destičku Hidex Sense (HIDEX, Turku, Finsko)
- analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- vortex mixér IKA[®] Vortex Genius 3 (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- třepačka pro mikrotitrační destičky IKA[®] MS 3 digital (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG)
- ultrazvuková vana Bandelin Sonorex (BANDELIN electronic GmbH, Berlin, Německo)
- pH metr WTW 538 (WTW, měřicí a analytická technika, s.r.o., Praha, ČR)

2.3 Chemikálie

- α -glukosidáza získaná ze střev *Rattus norvegicus* – Sigma (St. Louis, MO, USA)
- akarbóza – Sigma
- *p*-nitrofenyl α -D-glukopyranosid (pNPAG) – Sigma
- Na₂HPO₄·2H₂O – Sigma
- NaH₂PO₄·H₂O – Penta (Praha, ČR)
- rozpouštědla
 - dimethylsulfoxid (DMSO) – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
 - superčistá voda připravena pomocí přístroje Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

2.4 Testované látky

Testované látky byly zakoupeny od firmy Sigma.

Flavanony

- naringenin
- naringin
- hesperetin
- hesperidin

Flavanoly

- katechin
- epikatechin

Flavanonoly

- taxifolin

Flavony

- flavon
- 5-hydroxyflavon
- 7-hydroxyflavon
- luteolin
- baikalein
- baikalin
- diosmin
- chrysin

Flavonoly

- 3-hydroxyflavon
- kempferol
- kvercetin
- hyperosid
- rutin
- isokvercitrin
- morin
- myricetin
- troxerutin

2.5 Využité počítačové programy

- Pro spektrofotometrické hodnocení vzorků byl využit program Hidex Sence (HIDEX).
- Ke zhodnocení výsledků pomocí statistické analýzy a vytvoření orientačních grafů byl použit Microsoft Excel.
- Pro konečné zhodnocení aktivity zkoumaných látek pomocí zanesení jejich inhibičních výsledků do grafů byl využit program GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA).
- K vytvoření veškerých chemických struktur jsem v této práci použil program ChemSketch (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Ontario, Kanada)

2.6 Metodika

2.6.1 Příprava látek

- Příprava roztoku fosfátového pufru o pH 6,9
 - Příprava roztoku A: 3,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve 100 ml superčisté vody
 - Příprava roztoku B: 2,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve 100 ml superčisté vody
 - Smísení roztoku A a roztoku B: pro přípravu finálního fosfátového pufru o pH 6,9 bylo smíšeno 24,5 ml roztoku A a 25,5 ml roztoku B. Hodnota pH byla následně ověřena pH metrem a případně upravena NaOH nebo HCl
- Příprava roztoku substrátu – pNAG
 - Na analytických vahách bylo naváženo do označené mikrozkušavky přibližně 1,8 mg substrátu, který byl následně naředěn pomocí ultračisté vody na koncentraci 1,25 mM
 - Vzniklá směs se zhomogenizovala pomocí ultrazvukové vany a vortexu
- Příprava roztoku enzymu α -glukosidázy
 - Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství preparátu z potkaních jater, který je skladován v práškové formě.
 - Dané množství bylo v mikrozkušavkách smícháno s ultračistou vodou, aby výsledná koncentrace byla 50 mg/ml
 - Následně byly zkumavky vloženy do centrifugy, kde se oddělila pevná složka roztoku. Tento proces trval 30 minut při teplotě 4°C a rychlosti 16000 otáček za minutu.
 - Následně byla pipetou odebrána tekutá složka, která byla dále skladována při teplotě -80°C
- Příprava roztoků testovaných látek – flavonoidů

- Do mikrozkušavky bylo na analytických vahách naváženo adekvátní množství testované látky
- Navážená látka byla poté naředěna na požadovanou koncentraci pomocí DMSO a zhomogenizována pomocí vortex mixéru.
- Takto připravený roztok o vysoké koncentraci byl následně pomocí DMSO dále ředěn nižší požadované koncentrace (0,0001 – 10 mM)
- Příprava roztoku standardu – akarbózy
 - Postup přípravy roztoku akarbózy byl stejný jako u testovaných látek.
 - Koncentrace tohoto roztoku se měnila každé měření, a to v rozsahu 0,025 mM až 5 mM.

2.6.2 Metodický postup experimentu

- Do mikrotitrační destičky bylo multikanálovou pipetou napipetováno dané množství pufru:
 - sloupce 1, 2, 3 – 165 μ l
 - sloupec 4 – 210 μ l
- Následně bylo do sloupců 1, 2, 3 napipetováno 50 μ l enzymu α -glukosidázy
- Ve čtvrtém sloupci byly tzv. slepé vzorky. Objemový rozdíl, který vznikl kvůli absenci α -glukosidázy byl v předchozím kroku předem doplněn pufrům.
- Do řádků A-F bylo poté napipetováno 10 μ l testované látky, jejíž koncentrace se postupně snižovala
- Do řádku G bylo napipetováno 10 μ l akarbózy
- Do posledního řádku bylo napipetováno 10 μ l DMSO. Tento řádek sloužil, jako kontrolní vzorky.
- Těsně před samotným měřením, bylo multikanálovou pipetou přidáno 25 μ l substrátu pNAG, který odstartoval reakci.
- Následně byla spektrofotometrem v jednotlivých jamkách destičky měřena absorbance při vlnové délce 405 nm.
- Grafický model destičky je zobrazen v Tabulce 3.

Tabulka 3: Schéma metodického postupu

	Sloupec č. 1	Sloupec č. 2	Sloupec č. 3	Sloupec č. 4
Řádek A				
Řádek B				
Řádek C				
Řádek D				
Řádek E				
Řádek F				
Řádek G				
Řádek H				

	Testovaná látka (snižující se koncentrace)
	Akarbosa
	DMSO
	Přítomnost α -glukosidázy

2.7 Výpočty

Data získaná z programu Hides Sence byla následně zpracována v programu Microsoft Excel.

Test inhibice enzymatické aktivity probíhal v časovém úseku 6 minut, což minimalizovalo možné zkreslení způsobené absorbancí testovaných látek. Kinetika enzymatické reakce byla hodnocena jako lineární proces. Pomocí lineární regrese byla stanovena směrnice přímky, která popisuje vztah mezi absorbancí a časem. Na základě těchto směrnic bylo podle Rovnice č. 1 vypočítáno procento inhibice enzymu u jednotlivých vzorků.

$$x[\%] = 1 - \frac{k_V - k_{Vs}}{k_K - k_{Ks}}$$

Rovnice č. 1

x – % inhibované aktivity enzymu

k_V – směrnice pro rychlost enzymatické reakce testovaného vzorku stanovená podle změny absorbance vzorku v čase

k_{Vs} – směrnice pro nárůst absorbance daného vzorku bez přítomnosti enzymu (slepý vzorek)

k_K – směrnice maximální rychlosti enzymatické reakce (enzym + rozpouštědlo)

k_{Ks} – směrnice pro nárůst absorbance kontrolního vzorku bez přítomnosti enzymu (slepý vzorek)

Výsledky jsou prezentovány jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka (SD) vypočítaná podle Rovnice č. 2. Inhibiční křivky byly vytvořeny v programu GraphPad. Pro porovnání účinných látek byly ve stejném programu vytvořeny 95% konfidenční intervaly inhibičních křivek.

$$\text{směrodatná odchylka (SD)} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Rovnice č. 2

x – % inhibované aktivity enzymu

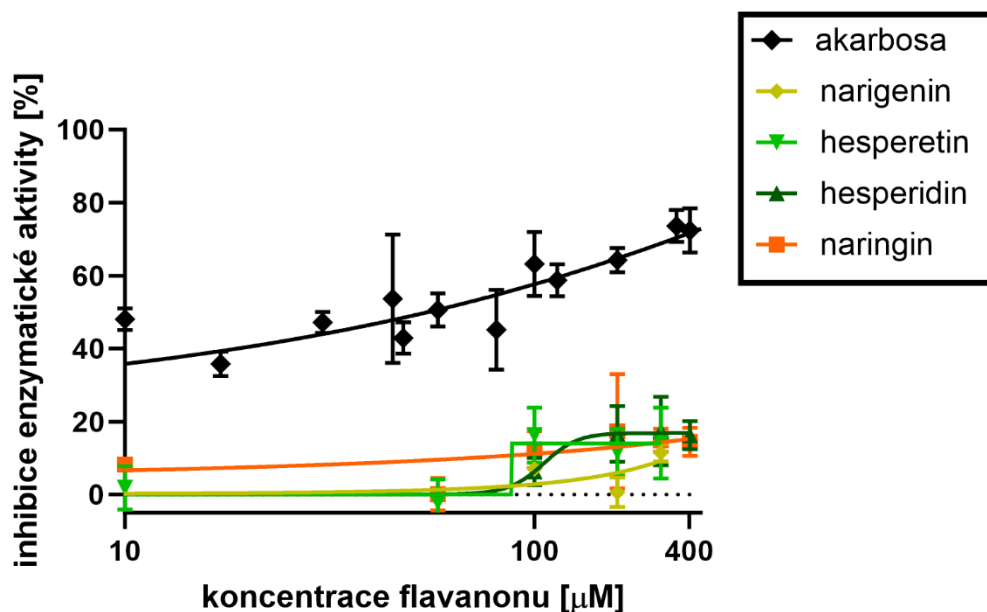
$\bar{x}$ – průměr % inhibované aktivity enzymu z jednotlivých měření

n – počet hodnot

3 Výsledky

Celkem byl v rámci této práce zhodnocen vliv 24 flavonoidů na potkaní α -glukosidázu. Výsledky byly porovnány se standardním inhibitorem akarbózou. Pro větší přehlednost a umožnění následné analýzy struktura-účinek jsou výsledky řazeny podle strukturních podskupin flavonoidů.

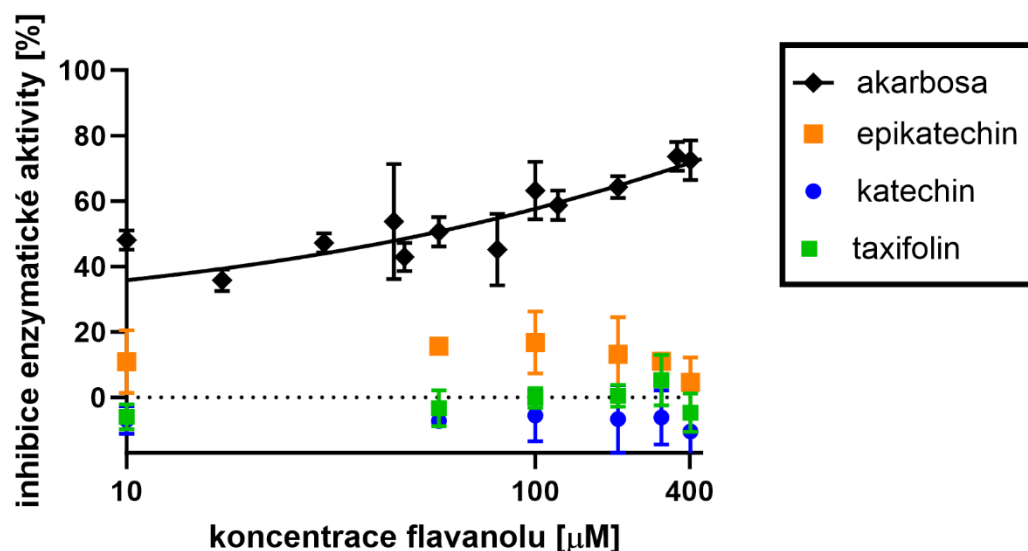
3.1 Flavanony



Obrázek 3: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavanonů

Flavanony jsou skupinou poměrně různorodou v oblasti chemické stavby látek. Znak, který mají všechny stejný, je přítomnost ketoskupiny v poloze C4 a absence dvojné vazby mezi uhlíky C2 a C3. Dále je podle přítomnosti cukerné složky na struktuře dělíme na tzv. aglykony a glykosidy. [1] Látky jako hesperetin či narigenin jsou aglykony. To znamená, že nemají na základní struktuře žádnou cukernou část. Oproti tomu hesperidin a naringin řadíme mezi glykosidy, tj. látky s cukerným zbytkem. Z grafu na Obr. 3 vidíme, že flavanony patří k méně účinné skupině látek. Jejich aktivita ani u nejvyšších koncentrací nedosáhla více jak 20% inhibice. Lze tedy uzavřít, že žádný z testovaných flavanonů se nejeví jako účinný inhibitor α -glukosidáz. Jejich inhibiční aktivita byla velmi podobná a nemá smysl v tomto případě tak ani stanovit vztah mezi strukturou a účinkem.

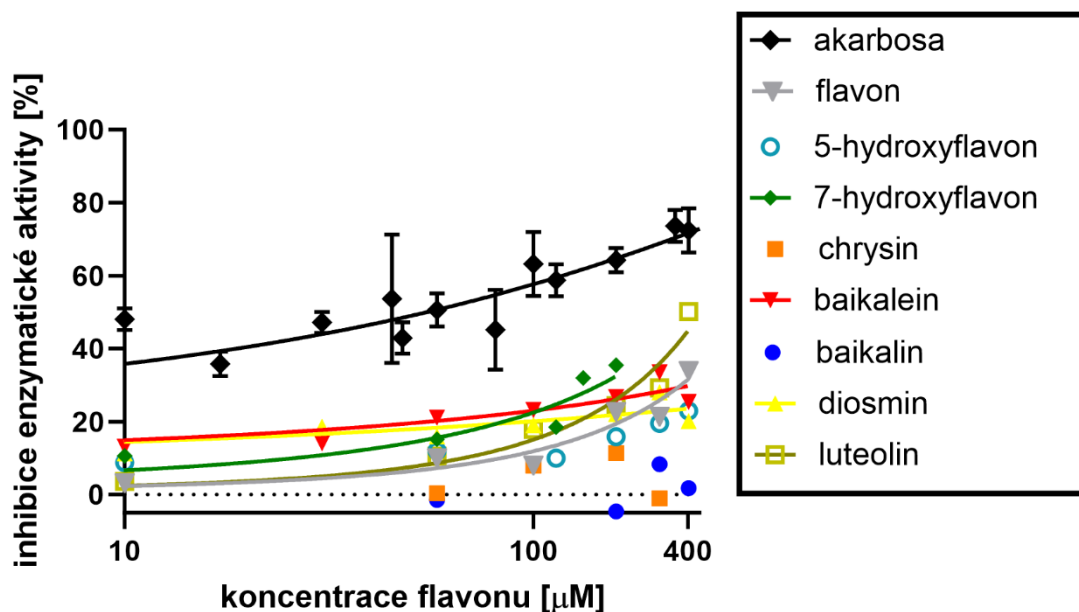
3.2 Flavanoly a flavanonoly



Obrázek 4: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavanolů a flavanonolů

Struktura flavanolů obsahuje hydroxylovou skupiny v poloze C3, také je charakterizována absencí dvojné vazby mezi uhlíky C2 a C3 a nepřítomností ketoskupiny v poloze C4. Flavanonoly představují skupinu sdílící vlastnosti flavanolů a flavanonů, tj. mají kromě OH skupiny v poloze C3 i ketoskupinu v poloze C4. Pro mou práci se jedná o dvě skupiny s minimálním účinkem (Obr. 4) Všechny testované látky byly ve formě aglykonu. V případě epikatechinu a katechinu se dokonce jedná o optické izomery. Vzhledem k absenci nebo minimálnímu účinku můžeme pouze odvodit, že dané struktury nejsou vhodné pro inhibici testovaného enzymu.

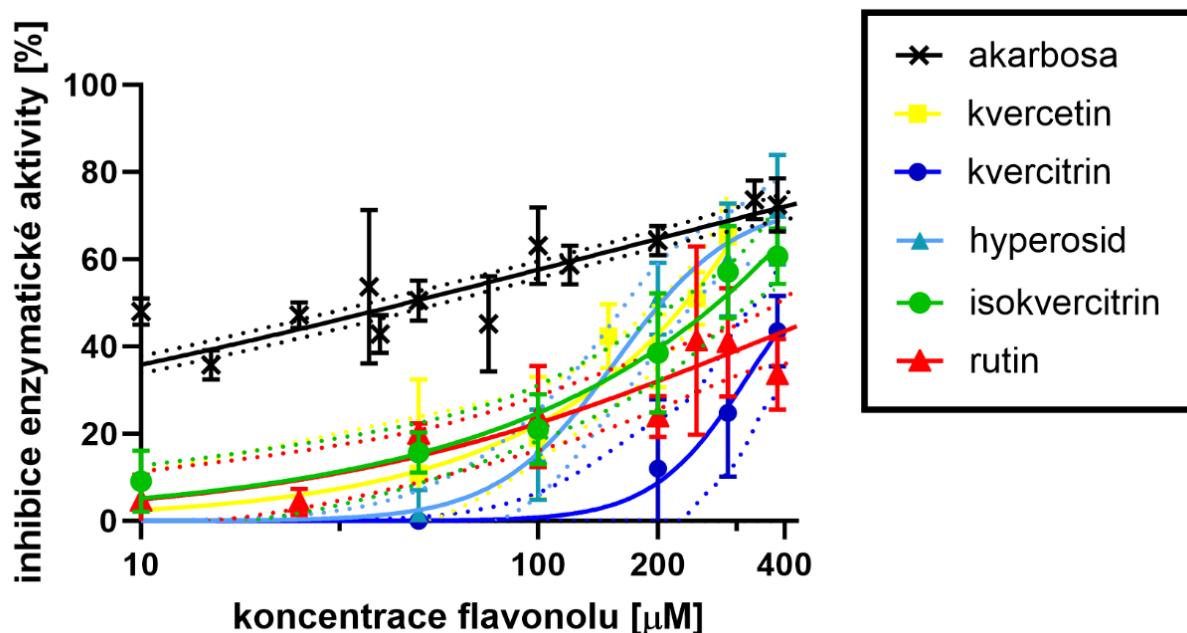
3.3 Flavony



Obrázek 5: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavonů

První skupinou vykazující vyšší inhibici než 20 % jsou flavony (Obr. 5). Jejich základní strukturní jednotka je výjimečná dvojnou vazbou mezi druhým a třetím uhlíkem kruhu C a ketoskupinou v poloze C4. Z numerického hlediska byl nejlepším flavonovým inhibitorem baikalein. Jedná se o aglykon, který má na 3 OH skupiny v polohách C5, C6 a C7. Jeho glykosid baikalin byl naopak neúčinný. Naopak nejjednodušší látka této skupiny flavon, který nemá oproti základní struktuře flavonů žádné další substituenty, byl ale schopen v nejvyšší testované koncentraci dosáhnout téměř 30 % inhibice. Numericky nejvyššího procenta inhibice dosáhl luteolin. Látka, která se vyskytuje ve formě aglykonu má čtyři hydroxylové skupiny v polohách C5, C7, C3' a C4. Zaznamenáváme u ní plynulý nárůst inhibice, který sahá až ke 40 % ve vyšších koncentracích. Látky ze skupiny flavonů se sice nedostávají na inhibiční aktivitu akarbózy, ale již se jedná o aktivní skupinu [1]. Vzhledem k malým rozdílům mezi inhibiční aktivitou, se ale testované flavony jeví ze statistického hlediska jako stejně účinné. Výjimkou je výše zmíněný neaktivní baikalin, což naznačuje, že cukerná složka může bránit v interakci s enzymem.

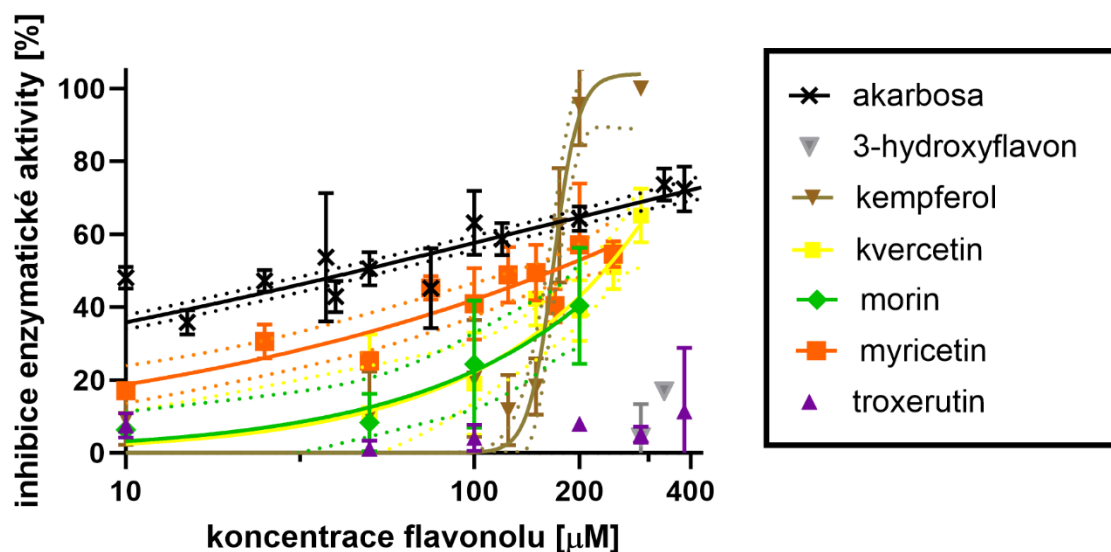
3.4 Flavonoly



Obrázek 6: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavonolů 1 – kvercetin a jeho glykosidy.

Poslední měřenou skupinou jsou flavonoly. U této skupiny jsem zaznamenal největší účinnost, co se týče jejich inhibiční aktivity. Jedná se o skupinu, jejichž základní struktura má na rozdíl od základního skeletu flavonoidů dvojnou vazbu mezi C2 a C3, hydroxylovou skupinu v poloze C3 a ketoskupinu v poloze C4. Jedná se o nejpočetnější skupinu v mém měření, která je zároveň velmi různorodá. Zajímavostí je to, že látky, které se ukázaly jako nejvíce aktivní, jsou jak glykosidy, tak aglykony. Popírají tím tedy fakt pozorovaný mezi flavonem baikaleinem a jeho aglykonem baikalinem.

Můžeme vidět, že konfidenční intervaly hyperosidu, isokvercitrinu a kvercetrinu isokvercitrinu se částečně prolínají, ale jejich aktivita je opět evidentně slabší než u akarbózy (Obr. 6). Hyperosid je glykosid, který má hydroxylové skupiny v pozicích C5, C7, C3' a C4'. Isokvercitrin je také glukosid, který se od hyperosidu liší pouze tím, že čtvrtou hydroxylovou skupinu má v poloze C5' místo C4'. Kvercetin je na rozdíl od nich aglykon s OH substituenty v polohách C5, C7, C4' a C5'. Zajímavým nálezem byl významně slabší účinek kvercitrinu v nižších koncentracích, který se liší od dalších zde testovaných glykosidů.



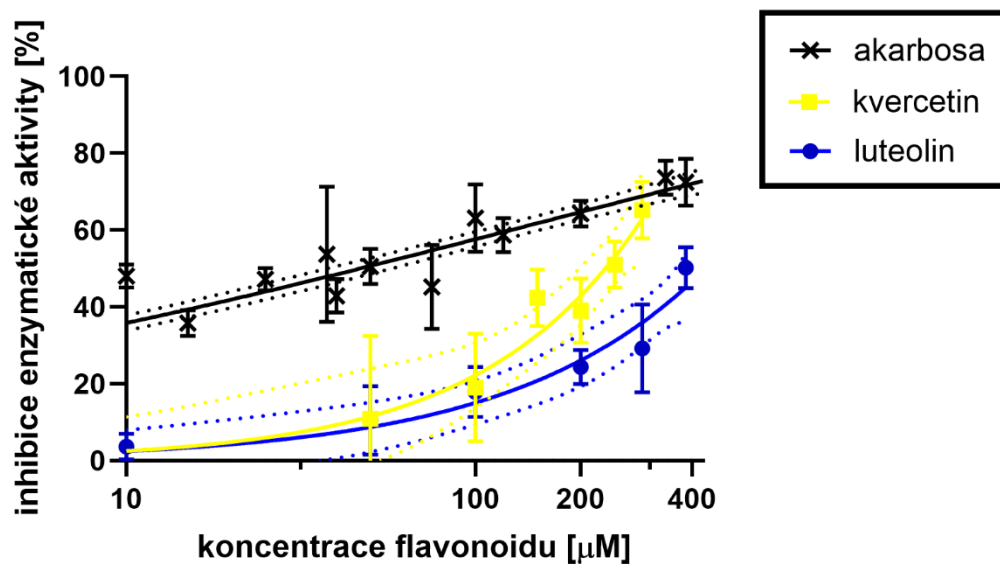
Obrázek 7: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavonolů 2 - aglykonů.

Na Obr. 7 jsou z důvodu přehlednosti zobrazeny účinky flavonolových aglykonů. V tomto případě jsem našel látky, které se účinnosti blíží akarbóze nebo v případě kempferolu se dokonce jedná i o látku, která je ve vyšších koncentracích i účinnější než akarbóza. Kempferol je aglykonem s OH skupinami v polohách C5, C7 a C4' je do koncentrace cca 100 μM neaktivní. V koncentracích mezi 100 a 200 μM jeho aktivita prudce stoupne a jeho účinek dosahuje kompletní (100 %) inhibici enzymu. Za zmínku jistě stojí i myricetin. Ten je aglykonem s OH skupinami v polohách C5, C7, C3', C4' a C5'. Zdá se být velmi dobrým inhibitorem především v nižších koncentracích. Aktivita v nižších koncentracích s sebou nese jisté výhody a to například při dávkování léku. Díky myricetinu vidíme, že flavonoidy jsou schopny dobré inhibice i v nízkých koncentracích. Myricetin byl účinnější než kvercetin a morin, které mají o 1 hydroxylovou skupinu na kruhu B méně. Obě posledně jmenované látky mají stejnou účinnost, není tedy rozhodující, zda je k hydroxyskupině v poloze 4' druhá hydroxyskupina na kruhu B v poloze 2' nebo 3'. Na druhé straně tato druhá hydroxyskupina nebo tři hydroxyskupiny (myricetin) snižují účinnost, protože kempferol s jedinou hydroxyskupinou v poloze 4' na B-kruhu byl nejvíce účinný. Přítomnost jen 3-hydroxylové skupiny je nedostatečná, protože 3-hydroxyflavon není v podstatě vůbec účinný. Navázání hydroxyethylových skupin na volné hydroxyskupiny se také jeví jako nevýhodné, protože vede k neúčinnosti (troxerutin).

3.5 Grafické porovnání účinnosti flavonoidů

Zde bych blíže podívat na strukturní rozdíly mezi jednotlivými flavonoidy. Věřím, že díky tomu budu schopen lépe určit jaké substituenty jsou pro inhibici α -glukosidázy pozitivní a které negativní.

Srovnáním všech strukturních vlastností se ukázalo, že pro aktivitu je klíčová přítomnost dvojné vazby v poloze C2-C3. Přítomnost 4-ketoskupiny bude asi také významná. Vliv samotné 3-hydroxyskupiny nebude příliš velký. 3-hydroxyflavon, který má 4-ketoskupinu i zmíněnou dvojnou vazbu není prakticky vůbec účinný a při porovnání analogických struktur s a bez této hydroxyskupiny (luteolin vs. kvercetin) byla nalezena jen lehce vyšší inhibice u kvercetinu (Obr.8). Jako optimální struktura se ukazuje přítomnost jedné hydroxyskupiny v poloze 4' (kempferol). Isolované hydroxyskupiny na kruhu A nejsou příliš důležité, jak je vidět na příkladu chrysinu s 5- a 7-hydroxyskupinami, který je jen málo aktivní. Zajímavé je, že samotná 7-hydroxyskupina (7-hydroxyflavon) se jeví jako výhodnější než obě zmíněné skupiny (porovnání s chrysinem). Současná přítomnost tří hydroxyskupin na kruhu A v polohách 5,6,7 je spojena s určitou aktivitou, což je potvrzeno i tím, že pokud je hydroxyskupina v poloze 7 zablokována kyselinou glukuronovou (baikalín), tak se aktivita ztrácí. Zajímavým a z ekonomického hlediska výhodným nálezem jsou většinou malé rozdíly mezi glykosidy kvercetinu a samotným kvercetinem. V tomto případě cukerná složka tedy většinou nesnížila účinek a to je výhodné, protože přírodní flavonoly se většinou vyskytují jako glykosidy. Na druhé straně je nutno zdůraznit, že záleží i na poloze a povaze cukru, protože rutin a kvercitrin byly méně účinné než kvercetin a jeho dva glykosidy hyperosid a isokvercitrin. Pro lepší pochopení jsou strukturní rozdíly shrnuty v tabulce č.4. Z daných struktur vyplývá, že přítomnost rhamnózy snižuje aktivitu.



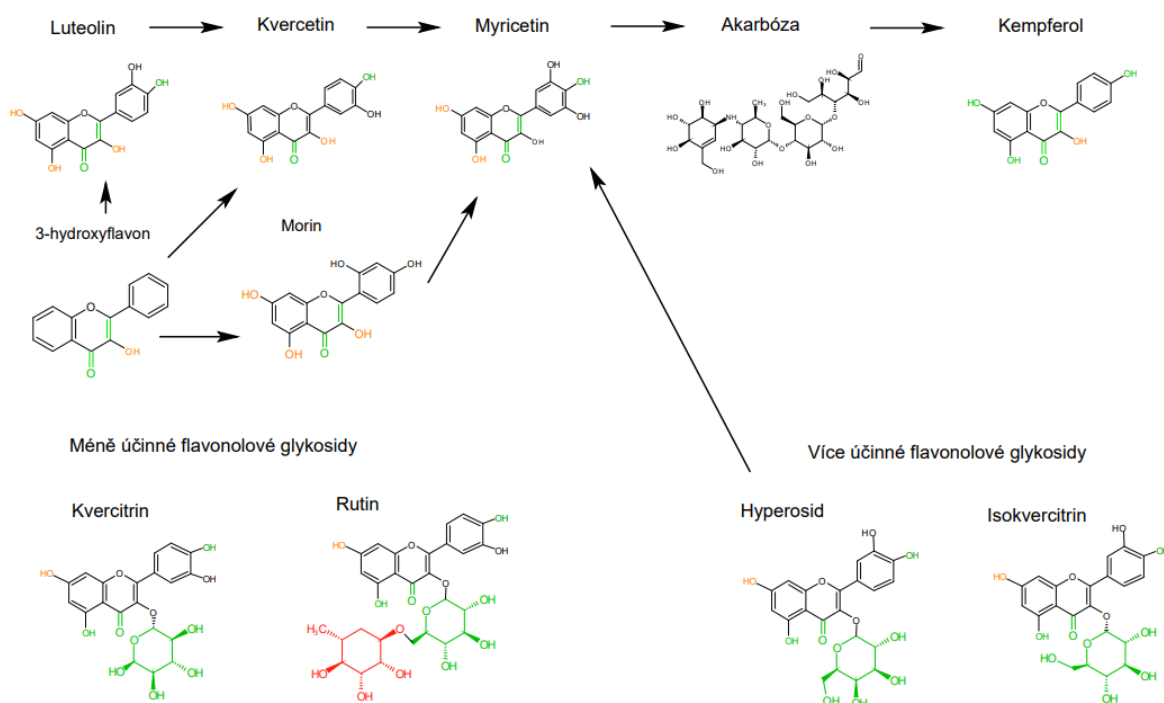
Obrázek 8: Porovnání kvercetinu a luteolinu

Tabulka 4: Strukturní rozdíly mezi testovanými glykosidy kvercetinu

Název látky	Substituent v poloze 3
Kvercetin	-OH
Kvercitrin	-O-ramnosid
Isokvercitrin	-O-glukosid
Hyperosid	-O-galaktosid
rutin	-O-rutinosid*

*rutinosid je složen ze rhamnózy a glukózy

Nyní bych se chtěl zaměřit na porovnání struktur flavonoidů a zároveň uvést srozumitelný přehled ideálních struktur pro nejvyšší míru inhibice. Na obrázku 9. jsou ukázány jednotlivé látky. Jedná se především o skupinu flavonolů, protože u nich byla zjištěna nejlepší inhibice. V první části obrázku jsou srovnané flavonoly zleva doprava, podle stoupající míry inhibice. Pod nimi jsou zobrazeny další dva flavonoly, přičemž to, že jsou dvě látky nad sebou značí stejné inhibiční schopnosti a šipka vždy směřuje od horšího inhibitoru k lepšímu. V dolní části obrázku jsou ještě uvedeny struktury glykosidů, pro doložení, že dobrými inhibitory nejsou pouze aglykony. Šipka opět směřuje od horšího inhibitoru k lepšímu a od hyperosidu je ukázáno, kam se zhruba nejlepší glykosid řadí mezi aglykonové inhibitory. Zároveň jsou na flavonoidech barevně vyznačené struktury, které podporují či zhoršují inhibiční schopnosti. Bylo vypořádováno, že zeleně vyznačené struktury jsou předpokladem dobrých inhibitorů, zatímco oranžové na dobrou inhibici nemají zásadní vliv. Červenou jsou označeny skupiny, které inhibiční schopnosti u látek snižují.



Obrázek 9: Srovnání struktur flavonoidů podle účinnosti.

4 Diskuze

V této části práce bych chtěl shrnout přínosy a výsledky provedeného výzkumu. Tyto výsledky zároveň porovnám s poznatky zjištěnými v jiných studiích a poukážu na to v čem se má práce lišila či shodovala.

Enzym α -glukosidáza je součástí enzymového komplexu, který rozkládá v našem trávicím traktu polysacharidy. α -glukosidáza je především zodpovědná za hydrolytické štěpení terminálních, neredukujících zbytků α -D-glukózy. Na rozdíl od poly- nebo oligosacharidů, se D-glukóza přechází střevní sliznicí a dostává se tak do krevního řečiště. Tento enzym je vhodným terapeutickým cílem, protože pokud se bude uvolňovat méně D-glukózy, nebo se bude uvolňovat pomaleji, tak dojde k nižšímu nárůstu postprandiální glykémie. [33]

Nárůst postprandiální glykémie je jedna z komplikací pro pacienty, kteří trpí onemocněním diabetes mellitus. Z tohoto důvodu se začala vyvíjet léčiva snižující postprandiální glykémii. Jedním z vhodných cílů je právě inhibice α -glukosidázy. Když dojde k inhibici aktivity tohoto enzymu, tak se zároveň sníží potřeba organismu snižovat glykémii, a tím dojde ke snížení zátěže na β -buňky ve slinivce, které jsou za sekreci inzulínu zodpovědné. To je u diabetiků velká výhoda, protože u téměř všech typů DM je sekrece inzulínu problémem. Momentálně jsou klinicky používána celosvětově pouze tři léčiva, přičemž v Česku se používá pouze akarbóza. U pacientů není ale příliš oblíbená, mj. kvůli řadě nežádoucích účinků. [1, 34, 35]

Mezi látky schopné inhibovat α -glukosidázu se řadí i flavonoidy. Tyto polyfenolické látky se vyskytují v mnoha složkách naší stravy (ovoce, ořechy, obiloviny a výrobky z nich). Jsou často používány jako doplňky stravy nejen pro své antioxidační schopnosti a své místo mají i v čínské medicíně. Kvůli jejich možnému širokému využití se pořád více stávají předmětem zkoumání vědců z celého světa. [35, 36]

Má práce se zabývá výzkumem 24 flavonoidů a sleduje jejich schopnost inhibovat enzym α -glukosidázu. Pro snazší interpretaci výsledků jsem si zároveň flavonoidy rozdělil do pěti podskupin, podle toho, jakou měli společnou základní jednotku. Bylo zjištěno, že pouze dvě skupiny (flavony a flavonoly) byly schopny inhibovat enzym v biologicky relevantní míře. Z těchto dvou skupin se poté ukázala skupina flavonolů jako ta aktivnější. Z ní jsou také čtyři látky, které se ukázaly být srovnatelnými nebo lepšími inhibitory než léčivo akarbóza. Tyto látky jsou hyperosid, kvercetin, myricetin a kempferol. [36]

Nejlépeším inhibítorem se při spektrofotometrickém měření úrovně inhibice ukázal kempferol. Ten jako jediný svou inhibiční aktivitou předčil akarbózu. I když je jeho maximální inhibice zajímavá a při koncentraci 200 μ M dosahoval kompletní inhibice enzymu (Obr. č. 7.), je potřeba se zaměřit i na křivku jeho aktivity. Je vidět, že do koncentrace 100 μ M neinhibuje kempferol α -glukosidázu vůbec a až při vyšších koncentracích je zaznamenám významný skok. Při nízkých koncentracích se však lepšími inhibitory ukazují všechny tři výše zmíněné látky. [35, 36]

Druhým nejúčinnějším flavonolem je hyperosid. Tento glykosid sice nepřekonává akarbózu, ale ve od koncentrací 200 μM se jeho konfidenční intervaly již překrývají s akarbózou. Od kemferolu se jeho inhibiční křivka liší především tím, že hyperosid začíná inhibovat už při nižších koncentracích. Na Obrázku č. 9. můžeme vidět, že při koncentraci 100 μM dosahuje cca 18% inhibice.

Podobný typ inhibice jako hyperosid vykazuje i kvercetin. Ten začíná inhibovat enzym již při nízkých koncentracích, a i přesto, že jeho inhibiční aktivita stoupá mírněji než u kemferolu a hyperosidu se tato látka nakonec dostane také na hodnoty inhibice, které se překrývají s akarbózou. Poslední významněji účinnou látkou je myricetin. U něho je sice nejvyšší zaznamenaná míra inhibice cca 50%, ale jedná se o nejlépe inhibující látku při nízkých koncentracích. Tato schopnost inhibice při nízkých koncentracích dělá z myricetinu velmi zajímavou látku, i když dosahuje maximálně 55% inhibice α -glukosidázy.

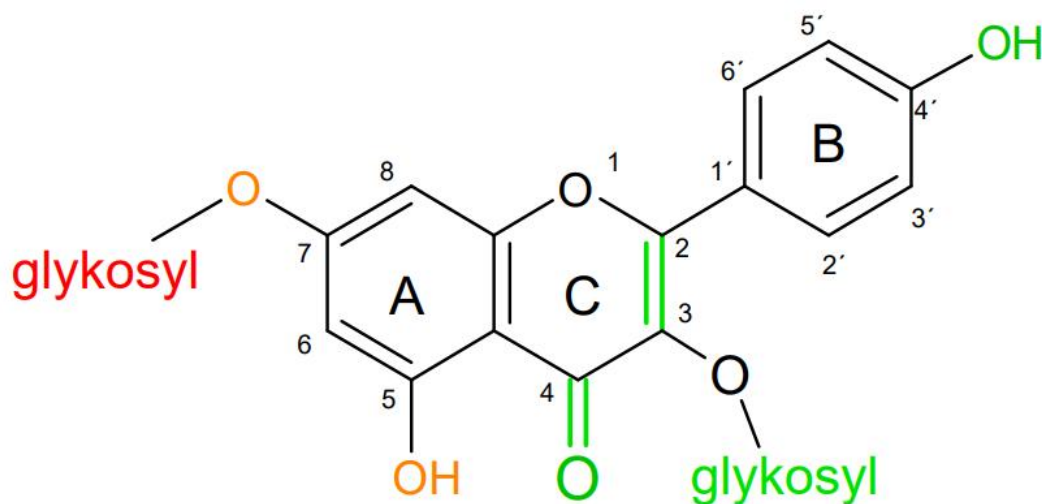
V předchozí kapitole a na Obrázku č. 9. jsem porovnával flavonoidy podle míry jejich inhibice v závislosti na jejich struktuře. Závěry, které z pozorování vyplývají bych chtěl nyní popsat. Co se týče negativních struktur flavonoidů, tak se dá říci, že absence dvojné vazby v poloze C2-C3 významně snižuje inhibiční účinky flavonoidu. Téměř všechny látky ze skupin flavanonů, flavanolů, flavanonolů a flavonů nevykazovaly výraznou míru inhibice. Pro látky z účinné skupiny flavanolů dále platí, že za vyložení negativní by se daly považovat pouze glykosidové substituenty ve větším počtu jako to je u rutinu (Obr. č. 9).

Dále bylo vyhodnoceno, že i když hydroxylace kruhů A a C může být pozitivní, jako u kempferolu, záleží hodně na dalších substituentech. Například u aglykonů bylo zjištěno, že hydroxylace kruhu A v polohách C5 a C7 není výrazně pozitivní, pokud mají aglykony zároveň vysoký počet OH skupin na kruhu B. Co se týče právě kruhu B, tak na něm byla 3-hydroxyskupina vyhodnocena spíše jako negativní na základě porovnání 3-hydroxyflavonu s dalšími flavonoly. 3-hydroxyflavon totiž není prakticky vůbec účinný a při porovnání analogických struktur s a bez této hydroxyskupiny (luteolin vs. kvercetin) nebyla naměřen žádný výrazný rozdíl.

Nyní bych se chtěl přesunout ke hodnocení pozitivních substituentů. Jak jsem již zmiňoval, tak dvojná vazba v poloze C2 a C3 je nezbytnou pro dobré inhibiční schopnosti flavonoidu. Dále bylo zjištěno, že velmi výhodným substituentem je ketoskupina v poloze C4. Co se týče hydroxylových skupin, tak jediná, která byla vyhodnocena, jako vyložení pozitivní je v poloze C4'. Ostatní OH skupiny, jako například C5 a C7 se ukazují jako pozitivní pouze, pokud má látka na své struktuře zároveň glykosyl nebo výjimečně u kempferolu, který je aglykon.

Při hodnocení výsledků nemohu však vynechat ani glykosidy. Míry inhibice, které u nich byly naměřeny totiž ukazují, že substituent, jako glykosyl v poloze C3, vůbec nedeterminuje látku jako špatně inhibující. Právě flavonoly, jako hyperosid a izokvercitrin ukazují, že látky mohou být dobrými inhibitory i jako glykosidy. Zároveň bylo zjištěno, že v kombinaci s glykosylovým substituentem na C3 mohou být brány nějaké hydroxylové skupiny, jako pozitivní (například 5-hydroxyl).

Všechny výše zmíněné poznatky o vlivu substituentů na míru inhibice flavonoidů jsou shrnuty v Obrázku 10.



Obrázek 10: Vyznačení substituentů na molekule flavonoidu. (zelená značí inhibičně výhodné, oranžová méně výhodné a červená nevýhodné substituenty)

Některé z mých výsledků podporují i jiné práce zaměřující se na výzkum inhibičního potenciálu flavonoidů. Michaela Kašpárková ve své diplomové práci zmiňuje, že ketoskupina na uhlíku C4 a dvojná vazba mezi uhlíky C2 a C3 inhibiční potenciál prokazatelně zvyšují. Ve své práci zároveň ukazuje pozitivní vliv hydroxylace v různých polohách. Jmenovitě v ní zmiňuje OH skupiny v polohách C3, C5, C7, C8, C3' a C4'. Po otestování téměř stejných látek jako slečna Kašpárková však musím konstatovat, že se naše výsledky shodují pouze co se týče pozitivního vlivu C4' skupiny. Hydroxylace v jiných polohách podle mých výsledků nepřináší flavonoidům nijak významné inhibiční schopnosti a u OH skupin v poloze C3, C8 a C3' se může jednat o substituenty negativní. Tyto odlišnosti ve výsledcích byly pravděpodobně způsobeny rozdílností použitého enzymu α -glukosidázy. Práce slečny Kašpárkové studovala vliv flavonoidů na kvasinkovou α -glukosidázu, zatímco má sledovala glukosidázu savčí, která je blíže té lidské. Mezi další rozdílnosti výsledků patří například glykosylace flavonoidů. Po testech *in vitro* se savčí glukosidázou bylo zjištěno, že glykosylace v poloze C3 není negativním faktorem pro inhibici flavonoidů. Látky, jako hyperosid či isokvercitrin dokazují, že velmi dobrými inhibitory mohou být i glykosidy, které práce Michaely Kašpárkové řadí mezi inhibičně neaktivní. [1]

Práce autorů Zhu, Chen, Zhang a Huang, která byla publikována v časopise Food Science and Nutrition, také podporuje má zjištění. Tato práce se zabývá především popsáním inhibičních efektů flavonoidů na enzymy α -glukosidázu a α -amylázu. Po otestování široké škály flavonoidů dochází ke zjištění, že na kvasinkové α -glukosidáze se velká řada flavonoidů jeví jako lepší inhibitory než výše zmíněná akarbóza. Ve své práci docházejí ke zjištění, že dvojná vazba v poloze C2=C3, ketoskupina v poloze C4 a hydroxylace kruhu B, jsou klíčové pro dobrou inhibici. I když byl tento výzkum prováděn na kvasinkové α -glukosidáze, jedná se o cenné potvrzení mých výsledků. [37]

I další práce vydaná vědci z univerzity Monash v Melbourne podporuje mé výsledky. Práce sepsaná skupinou Barber, Houghton a Williams uvedená v prestižním časopise Foods posouvá z naše znalosti o inhibičních vlastnostech flavonoidů na vysokou úroveň tím, že při výzkumu používá lidskou α -glukosidázu. Mezi látkami, které práce sledovala se objevily například kvercetin a kempferol, což jsou látky, které jsem i já identifikoval jako velmi dobré inhibitory. Výsledky této práce ukazují na to, že vlivy flavonoidů na α -glukosidázu se velmi různí podle toho, z jakého organismu je enzym použit. Autoři v ní zmiňují, že i když velké množství flavonoidů vychází jako lepší inhibitory než akarbóza na kvasinkové α -glukosidáze, tento počet se snižuje, pokud testujeme savčí enzym, a ještě více se sníží u lidského enzymu. Nicméně, co se týče závislosti aktivity flavonoidů na jejich struktuře, výzkumný tým ukazuje podobný trend, který je zmíněn v mé práci. A to, že flavonoidy s přítomnou dvojnou vazbou C2=C3 a ketoskupinou C4 jsou výrazně lepšími inhibitory než ty flavonoidy, které těmito atributy nedisponují. [38]

V mé i všech zmíněných pracích bylo zjištěno, že flavonoidy díky své dobré inhibiční aktivitě můžeme považovat za potenciální léčiva pro pacienty s diabetem mellitem. Další výhodou pro diabetiky by mohlo být to, že flavonoidy mají kromě inhibičních schopností řadu dalších, pro tělo prospěšných vlastností. Jedná se o antioxidanty a kardioprotektivní látky, což z nich dělá ještě lepší doplňkové léčivo pro pacienty trpící DM. V otázce flavonoidů jakožto inhibitorů α -glukosidázy je jistě potřeba dalšího výzkumu, který by rozšířil naše dosavadní znalosti. Věřím však, že tato práce ukázala, že studovat flavonoidy, jako potenciální léčiva na DM má smysl.

Závěr

V této práci jsem sledoval inhibiční aktivitu látek flavonoidů a jejich potenciál stát se novými antidiabetiky fungující na principu inhibice enzymu α -glukosidázy. Po otestování dvaceti čtyř flavonoidů mohu konstatovat tyto výsledky. Čtyři látky se v daných koncentracích blížily svou inhibiční schopností klinicky užívanému léčivu akarboze. Tyto flavonoidy jsou hyperosid, kvercetin, isokvercitrin a myricetin. Flavonoid kempferol prokázal dokonce vyšší inhibiční schopnosti než akarboza a to až 100 %.

Po analýze struktur flavonoidů jsem díky získaným výsledkům schopen určit strukturní složky, které mají na inhibiční schopnosti flavonoidů vliv. Ukázalo se, že nejlepšími inhibitory byla skupina flavanolů. Všechny flavonoly na své základní struktuře mají ketoskupinu v poloze C4, dvojnou vazbu mezi C2 a C3 a hydroxylovou skupinu v poloze C3. Tyto substituce, s výjimkou té poslední, se ukázaly jako vhodné pro inhibici enzymu. V rámci flavanolů se potom jako velmi účinná ukázala přítomnost hydroxylových skupin, a to v polohách C5, C7, a především v poloze C4'. Absence všech zmíněných skupin a substituentů se ukázala neúčinná, což dokazují látky ze skupin flavanonů, flavanolů a flavanonolů.

Závěrem bych chtěl říci, že se mi povedlo naplnit stanovené cíle. Látky, které jsem zkoumal ukázaly slibné výsledky a potvrdily předpoklady. Zároveň se mi povedlo podpořit výsledky prací, které pracovaly s kvasinkovou glukosidázou a tím i posunout výzkum zabývající se uplatněním flavonoidů jako nových antidiabetik.

Seznam použitých zdrojů

1. KAŠPÁRKOVÁ, Michaela. Hledání nových přírodních inhibitorů alfa-glukosidas. Diplomová práce, vedoucí Karličková, Jana. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, 2023.
2. ČEŠKA, Richard, TESAŘ, Vladimír; DÍTĚ, Petr a ŠTULC, Tomáš (ed.). *Interna*. Praha: Triton, 2010. ISBN 978-80-7387-423-0. Dostupné také z: http://toc.nkp.cz/NKC/201103/contents/nkc20112169151_1.pdf.
3. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. *Zdravotnická ročenka České republiky 2019* [online].- vydání. 2020. 203 s. s. 37. Dostupné také z <<https://www.uzis.cz/res/f/008381/zdrroccz2019.pdf>>
4. OTTŮV slovník naučný. Sv. 5. Praha: J. Otto, 1892, s. 761. Dostupné také z: <https://www.digitalniknihovna.cz/mzk/view/uuid:58d88d80-cb5a-11de-97c0-000d606f5dc6?page=761>
5. Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro VPL. *Diabetes Mellitus*. Praha : Centrum doporučených postupů pro PL. 2020. Novelizace 2020. s. 12-14. Dostupné také z URL <<https://www.svl.cz/doporucene-postupy/diabetes-mellitus-100006>>.
6. ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD. *Český statistický úřad*. [online]. Dostupné z: <https://www.czso.cz> [citováno 4. 04. 2024].
7. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>
8. GARDNER, David G. a SHOBACK, Dolores M. (ed.). *Greenspan's basic & clinical endocrinology*. 9th ed. Lange medical book. New York: McGraw-Hill Medical, c2011. ISBN 978-0-07-162243-1. Dostupné také z: <http://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookid=380>.
9. Tao Z, Shi A, Zhao J. Epidemiological perspectives of diabetes. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015, 73: 181-185.
10. Ripsin CM, Kang H, Urban RJ. Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician*. 2009;79(1):29-36.
11. Pasquier F. Diabetes and cognitive impairment: how to evaluate the cognitive status? *Diabetes Metab*. 2010;36 Suppl 3: S100-5.
12. Touma C, Pannain S. Does lack of sleep cause diabetes? *Cleve Clin J Med*. 2011;78(8):549-58.
13. Riserus U, Willett WC, Hu FB. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res*. 2009;48(1):44-51.
14. SHOBACK, D.G. (ed.) (2011) *Greenspan's basic & clinical endocrinology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical, p. Chapter 17.
15. Herder C, Roden M. Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(6):679-92.
16. Karen I a Svačina Š. Diabetes mellitus a komorbidita: doporučený diagnostický a terapeutický postup pro všeobecné praktické lékaře. Druhé, aktualizované vydání. Praha: Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, Společnost všeobecného lékařství. 2021. Doporučené postupy pro všeobecné praktické lékaře. ISBN 978-80-88280-26-2.

17. LINCOVÁ, Dagmar a FARGHALI, Hassan. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha : Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
18. Sechser T. NOVÁ PERORÁLNÍ ANTIDIABETIKA. Online. Interní medicína pro praxi. 2003, 2003 (3): 115-119. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2003/03/04.pdf>. [cit. 2024-02-23].
19. Krentz, A.J. (ed.) (2000) *Drug treatment of type 2 diabetes*. Adis International Limited, p. 101.
20. Scheen AJ, Lefebvre PJ. Oral antidiabetic Agents. A guide to selection. *Drugs* 1998; 55: 225–236.
21. Laube H. Acarbose. *Clinical Drug Investigation*. 2002, 22(3), 141-156.
22. Szabó M. Akarbóza v ordinaci praktického lékaře. Online. *Medicína pro praxi*. 2013, 2013 (8): 277-278. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/med/2013/08/03.pdf>. [cit. 2024-02-23].
23. Novák, J., Svoboda, P. a Novotná, M. (2005) *Lékařský slovník*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing.
24. Borges de Mello E, Da Silveira Gomes A, a Carvalho I. A – and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*. 2006; 62(44): 10277-10302.
25. EGG BRITE: Enzymes [online]. Kanehisa Laboratories. 2023. [cit. 2023-01 27]
26. Lin AHM, Lee BH a Chang WJ. Small intestine mucosal α -glucosidase: A missing feature of in vitro starch digestibility. *Food Hydrocolloids*. 2016; 53: 163-171..
27. Diaz-Sotomayor M, Quezada-Calvillo R, Avery SE, et al. Maltase – Glucoamylase Modulates Gluconeogenesis and Sucrase-Isomaltase Dominates Starch Digestion Glucogenesis. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 2013; 57(6): 704-712.
28. Příspěvatelé WikiSkript, Enzymy [online], c2022, Datum poslední revize 8. 12. 2022, 07:55 UTC, [citováno 14. 03. 2024] <https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Enzymy&oldid=458982>
29. Kodíček M. hydrolasy. From Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2008-09-22]
30. Chiba S. Molecular Mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1997, 61(8), 1233-1239, DOI: [10.1271/bbb.61.1233](https://doi.org/10.1271/bbb.61.1233)
31. He C, Liu X, Jiang Z, Geng S, Ma H, Liu B. Interaction Mechanism of Flavonoids and α -Glucosidase: Experimental and Molecular Modelling Studies. *Foods* 2019; 8: 355. <https://doi.org/10.3390/foods8090355>
32. Jiang J Ghosh S. Glucosidase. RCSB Protein Data Bank. ISSN 1234432X.
33. Sim L, Quezada-Calvillo R, Sterchi EE, et al. Human Intestinal Maltase– Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity. *Journal of Molecular Biology*. 2008; 375(3): 782–792.
34. Spiková J. *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum. 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
35. Říhová H. Flavonoidy - stručný přehled a biologický význam. 2008. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Kvasničková, Eva.
36. Volf K, Andrs F. Flavonoidy a jejich biologické působení – aktualizovaná verze 2019 – dostupné online, Archivováno 9. 6. 2020 na Wayback Machine.

37. Zhu J, Chen C, Zhang B, Huang Q. The inhibitory effects of flavonoids on α -amylase and α -glucosidase. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020;60(4):695-708. doi: 10.1080/10408398.2018.1548428
38. Barber E, Houghton MJ, Williamson G. Flavonoids as Human Intestinal α -Glucosidase Inhibitors. *Foods.* 2021;10(8):1939. doi: 10.3390/foods10081939.

Seznam obrázků

Obrázek 1. Chemická struktura akarbózy <i>vytvořeno autorem v (ChemSketch).</i>	13
Obrázek 2. Flavan, základní struktura většiny flavonoidů <i>vytvořeno autorem v (ChemSketch).</i>	14
Obrázek 3: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavanonů <i>vytvořeno (v GraphPad Prism 9)</i>	22
Obrázek 4: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavanolů a flavanonolů <i>vytvořeno v (GraphPad Prism 9)</i>	23
Obrázek 5: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavonů <i>vytvořeno v (GraphPad Prism 9)</i>	24
Obrázek 6: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavonolů 1 – kvercetin a jeho glykosidy <i>vytvořeno v (GraphPad Prism 9).</i>	25
Obrázek 7: Závislost inhibice enzymatické aktivity na koncentraci flavonolů 2 - aglykony. <i>vytvořeno v (GraphPad Prism 9)</i>	26
Obrázek 8: Porovnání kvercetinu a luteolinu <i>vytvořeno v (GraphPad Prism 9)</i>	28
Obrázek 9: Srovnání struktur flavonoidů podle účinnosti <i>vytvořeno autorem v (ChemSketch).</i>	29
Obrázek 10: Vyznačení substituentů na molekule flavonoidu. <i>vytvořeno autorem v (ChemSketch).</i>	32

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled lékových skupin a jejich zástupců.....	11
Tabulka 2. Dělení flavonoidů na podskupiny	15
Tabulka 3: Schéma metodického postupu	20
Tabulka 4: Strukturní rozdíly mezi testovanými glykosidy kvercetinu	28