

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE
INTERAKCE ALKALOIDŮ S PŘECHODNÝMI KOVY IV.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2020

Bc. Lenka Loskotová

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



DIPLOMA THESIS
INTERACTIONS OF ALKALOIDS WITH TRANSITION
METALS IV.

Supervisor: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Head of Department: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2020

Bc. Lenka Loskotová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce doc. Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za odborný dohled a rady při experimentálním měření v laboratoři, za připomínky a vstřícný přístup během celé tvorby této diplomové práce a také za tvorbu grafů.

Dále bych chtěla poděkovat členům skupiny ADINACO za poskytnutí látek pro experimentální měření a celé Katedře farmaceutické botaniky za poskytnutí laboratoře a potřebného vybavení k měření výsledků.

Na závěr bych chtěla nejvíce poděkovat svým rodičům za zázemí při studiu, bratrovi Petrovi, svému příteli a všem svým blízkým za podporu.

Tato práce byla vytvořena za využití přístrojů v rámci projektu OPV VV 02_16_017: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682: Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu (MOLABI), MŠMT ČR/Univerzita Karlova v Praze.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ:

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

Hradec Králové, 2020

Bc. Lenka Loskotová

OBSAH DIPLOMOVÉ PRÁCE

1	ÚVOD.....	8
2	CÍL PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1	MĚĎ	10
3.1.1	Měď jako chemický prvek.....	10
3.1.2	Měď jako esenciální stopový prvek	10
3.1.3	Kuproenzymy.....	12
3.1.3.1	Ceruloplazmin.....	13
3.1.3.2	Cytochrom c oxidáza.....	14
3.1.3.3	Metalothioneiny	14
3.1.3.4	Lysyloxidáza	14
3.1.3.5	Superoxiddismutáza	14
3.1.4	Metabolismus mědi	15
3.1.5	Patofyziologie mědi v lidském organismu	16
3.1.5.1	Alzheimerova choroba	16
3.1.5.2	Aceruloplazminémie	17
3.1.5.3	Menkesovo onemocnění	18
3.1.5.4	Parkinsonova choroba	19
3.1.5.5	Wilsonova choroba.....	20
3.1.6	Deficit mědi	20
3.1.7	Toxicita mědi	21
3.1.8	Chelatace mědi.....	21
3.1.9	Redukce mědi.....	22
3.2	ALKALOIDY	24
3.2.1	Korypalmin	25
3.2.2	Thaliktrikavin.....	25

3.2.3	8-oxoberberin.....	26
3.2.4	Fumarilin.....	27
3.2.5	Norisokorydin	28
3.2.6	(+)-Laurotetanin	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1	Pomůcky	30
4.1.1	Používaný materiál.....	30
4.1.2	Používané chemikálie.....	30
4.1.3	Testované látky	30
4.1.4	Přístrojové vybavení.....	31
4.2	Příprava roztoků.....	31
4.2.1	Příprava základních roztoků	31
4.2.2	Příprava pracovních roztoků.....	32
4.3	Standardní operační postupy.....	32
4.3.1	Kontrola připravených základních roztoků mědi.....	32
4.3.2	Kalibrační křivka.....	33
4.3.3	Stanovení chelatace iontů mědi <i>hematoxylinem</i>	34
4.3.4	Chelatace měďnatých iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5).....	35
4.3.5	Chelatace měďných iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5).....	36
4.3.6	Chelatace měďnatých iontů v DMSO	38
4.3.7	Chelatace měďných iontů v DMSO	39
4.3.8	Redukce měďnatých iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5).....	40
4.3.9	Redukce měďnatých iontů v DMSO	41
5	VÝSLEDKY	43
5.1	Kalibrační křivka.....	43
5.2	Chelatační účinky alkaloidů.....	43
5.2.1	Stanovení chelatace mědi pomocí hematoxylinu.....	44

5.2.2	Stanovení chelatace mědi pomocí BCS.....	44
5.3	Měď-redukující účinky alkaloidů.....	44
5.3.1	Alkaloidy protoberberinového typu	45
5.3.2	Alkaloid spirobenzylisochinolinového typu.....	46
5.3.3	Alkaloidy aporfinového typu	47
6	DISKUSE.....	48
6.1	Chelatační aktivita.....	48
6.2	Redukce měďnatých iontů	49
6.2.1	Alkaloidy protoberberinového typu	50
6.2.2	Alkaloidy spirobenzylisochinolinového typu	52
6.2.3	Alkaloidy aporfinového typu	56
7	ZÁVĚR.....	59
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	60
9	POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE	61
10	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	68
11	SEZNAM TABULEK.....	70
12	SEZNAM ROVNIC.....	71
	ABSTRAKT.....	72
	ABSTRACT	73

1 ÚVOD

Měď je základním stopovým prvkem lidského organismu. Společně se zinkem a železem se řadí mezi tři nejdůležitější mikroprvky [1]. Ačkoliv je v těle člověka ve velmi malém množství (mg), má nezastupitelnou roli pro správné fungování všech fyziologických a biochemických procesů lidského těla. Je součástí mnoha kuproenzymů, např. ceruloplazminu, cytochrom c oxidázy, superoxiddismutázy a dalších. Tyto enzymy se účastní antioxidační ochrany, buněčného dýchání, síťování pojivových tkání, syntézy neurotransmiterů, srážení krve a jiných důležitých funkcí [2].

Měď by měla být přijímána v potravě v dostatečném množství. Její hladina je přísně regulována, neboť při jejím nadbytku či deficitu v organismu může docházet k různým patologickým stavům. Menkesovo onemocnění je dědičná choroba s vrozeným nedostatkem mědi [3]. Naopak Wilsonova choroba je charakterizována nadměrným hromaděním mědi v těle [4]. Zvýšená koncentrace mědi je pro organismus toxický. Nadměrná tvorba vysoce reaktivních forem kyslíku narušuje antioxidační ochranu těla. Tento oxidativní stres může přispívat k dalším onemocněním, jako jsou onkologická onemocnění, kardiovaskulární choroby, onemocnění nervové soustavy, diabetes a další [5].

V rámci této diplomové práce byla zkoumána měď-chelatační a měď-redukční aktivita vybraných isochinolinových alkaloidů, které by mohly být potenciálně prospěšné v léčbě některých onemocnění.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo změřit chelataci měďných a měďnatých iontů a měď-redukující účinky u vybraných alkaloidů. Konkrétně se jednalo o isochinolinové alkaloidy tří podskupin: protoberberinové (korypalmin, thaliktikavin, 8-oxoberberin), spirobenzylisochinolinový (fumarilin) a aporfinové (norisokorydin, (+)-laurotetanin). Tyto alkaloidy byly proměřovány v prostředí o různých pH (4,5; 5,5; 6,5 a 7,5). Na základě zjištěných výsledků bylo cílem odvodit vztahy mezi jejich strukturou a měď-chelatační a měď-redukční aktivitou.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 MĚĎ

3.1.1 Měď jako chemický prvek

Měď, kovový prvek s latinským názvem *Cuprum* a chemickou značkou Cu, má hnědočervenou barvu a spolu se zlatem a stříbrem je řazena mezi ušlechtilé kovy. S protonovým číslem 29 zaujímá v periodické soustavě prvků místo ve 4. periodě a I.B skupině. Její elektronová konfigurace je $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$. V přírodě ji lze nalézt v podobě dvou izotopů, a to izotop ^{63}Cu a izotop ^{65}Cu , dále existuje dalších 22 radioaktivních izotopů s nukleonovými čísly 57 až 80, ty byly vytvořeny uměle [6]. Měď se nejčastěji vyskytuje ve třech oxidačních stavech, a to jako ryzí kov (Cu^0), Cu^I a Cu^{II} [7]. Vlivem vlhkého vzduchu se na jejím povrchu vytváří vrstva zelené barvy, tato vrstva zásaditých uhličitánů ji chrání před korozí [6]. Měď se běžně vyskytuje v rudách, jako jsou například chalkopyrit (CuFeS_2), kuprit (Cu_2O) či malachit ($\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$) [7].

Mezi její chemické vlastnosti patří měkkost, tažnost, kujnost, tepelná i elektrická vodivost a odolnost proti korozi. Využívá se zejména v elektrotechnice, stavebnictví, k výrobě zařízení v potravinářském průmyslu (pivovary) či v průmyslových strojích. Tradičně se měď využívala k výrobě mincí (spolu se zlatem a stříbrem) [8, 9]. V průmyslu jsou významné i slitiny mědi: mosaz ($\text{Cu} + \text{Zn}$), bronz ($\text{Cu} + \text{Sn}$) či alpaka ($\text{Cu} + \text{Ni}$) [9]. Využití mědi spadá také do oblasti gynekologie, kdy je měď obsažena v nitroděložních tělíscích, která se používají k zabránění neplánovaného otěhotnění [10].

3.1.2 Měď jako esenciální stopový prvek

Pro organismus člověka je měď esenciálním prvkem, který si neumí sám vytvořit. Na rozdíl od ostatních složek potravin není měď spolu s vitamíny nositelkou energie, ale i přesto je nutné měď do organismu přijímat [1]. Tento mikroelement je obsažen v potravinách jako jsou maso a vnitřnosti, korýši, luštěniny, ořechy a semena [2]. Další potraviny, ve kterých lze měď nalézt jsou uvedeny v následující tabulce (viz Tabulka 1).

Tabulka 1 Obsah mědi ve vybraných potravinách, převzato [11]

Potravina	Obsah Cu (mg/kg)
Mléko a mléčné produkty	
mléko	0,1–0,88
čerstvý sýr	0,03
zpracovaný sýr	0,025
Maso a droby	
játra, hovězí	157
ledviny, hovězí	2,1–4,3
svalové maso, hovězí	0,1–1,8
svalové maso, vepřové	0,1–9,1
Obilné výrobky	
kukuřičné výrobky	0,6–16,6
pšeničný chléb	2,9
celozrnný pšeničný chléb	3,4
celozrnné těstoviny	0,08–0,52
Zelenina	
brambory	0,48–16,0
mrkev	0,37–0,62
brokolice	0,68–0,87
hrášek	1,9–2,4
hlávkový salát	0,1–2,9
rajče	0,1–3,4
zelí	0,1–7,7
Mořské plody	
ústřice	0,3–16,0
tuňák	0,1–1,2
losos	0,5–0,8
krevety	2,0–2,9
Ovoce	
jablka	0,1–2,3
banány	0,7–3,0
pomeranče	0,8–0,9

Měď je nezbytná pro funkci všech buněk organismu. Je nedílnou součástí mnoha enzymů a bílkovin, které budou popsány v následujících kapitolách. Tento prvek zasahuje do metabolismu železa, syntézy neurotransmiterů, hraje roli při tvorbě pojivové tkáně, energetickém metabolismu či při antioxidační ochraně. Dále je měď zapojena zřejmě do role v imunitním systému, při srážení krve či při tvorbě myelinu v centrální nervové soustavě (CNS) [2].

Lidský organismus obsahuje přibližně 80–100 mg mědi [12]. Mezi ostatními stopovými prvky zaujímá svým množstvím v těle třetí místo hned po železu (4–7 g) a zinku (2–4 g) [1]. Sérová koncentrace u muže se pohybuje v rozmezí 0,614–0,970 mg/l, u žen je to 0,694–1,030 mg/l [13]. Ženy, které užívají kontraceptiva na bázi estrogenů, mají hladinu mědi v séru zvýšenou a u žen v pozdním stádiu těhotenství se koncentrace zvyšuje nejvíce (až na trojnásobek) [14]. Nejvyšší koncentrace mědi ve tkáních se vyskytuje v játrech, mozku, krvi, kostře a kosterním svalu [15].

V biologických systémech je měď převážně přítomna v oxidačním stavu Cu^{II} . Její schopnost reverzibilně přijímat a darovat elektrony hraje hlavní roli při odstraňování volných radikálů z organismu [13].

3.1.3 Kuproenzymy

Součástí aktivních center mnoha enzymů bývají měďnaté ionty, tyto enzymy jsou souhrnně nazývány kuproenzymy. Pár vybraných enzymů spolu s funkcí a důsledkem deficitu jsou uvedeny v následující tabulce (viz Tabulka 2).

Tabulka 2 Funkce enzymů závislých na mědi, převzato [16]

Enzym	Funkce	Důsledek deficitu
ceruloplazmin	transport železa a mědi	snížená hladina cirkulující mědi, nedostatek železa
cytochrom c oxidáza	mitochondriální dýchání	hypotermie, svalová slabost
dopamin β-hydroxyláza	produkce katecholaminu	hypotermie, neurologické defekty
lysoxidáza	tvorba pojivové tkáně	dráždivost kůže a kloubů
peptidylglycine α-amidující monooxygenáza	amidace peptidů	neuroendokrinní defekty
superoxiddismutáza	antioxidační ochrana	snížená ochrana proti oxidačnímu stresu
tyrozináza	tvorba pigmentu	hypopigmentace vlasů a kůže

3.1.3.1 Ceruloplazmin

Ceruloplazmin jinak nazývaný ferroxidáza je plazmatický alfa-2-glykoprotein s molekulovou hmotností okolo 132 kD. Jedna molekula ceruloplazminu váže 6–7 atomů mědi, proto bývá nazýván jako modrý protein [17]. V ceruloplazminu je vázáno 90 % plazmatické mědi [18].

Je nezbytný pro oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} , tím brání vzniku nebezpečného hydroxylového radikálu (viz Rovnice 1), působí tedy antioxidačně [18].

Rovnice 1 Fentonova reakce se železem [19]



Ceruloplazmin je také protein akutní fáze, tzv. pozitivní reaktant akutní fáze. Tyto proteiny se v těle člověka zvyšují při celé řadě negativních vlivů na organismus jako jsou bakteriální či virové infekce, traumata, chirurgické zákroky, nádorové onemocnění a jiné [19]. Zvýšení lze pozorovat i během těhotenství a při užívání perorálních kontraceptiv. Snížená koncentrace ceruloplazminu se vyskytuje u osob postižených Wilsonovou chorobou [17].

3.1.3.2 Cytochrom c oxidáza

Cytochrom c oxidáza je enzym, jenž se nachází na vnitřní straně mitochondriální membrány. Je součástí mitochondriálního dýchacího řetězce, tím se podílí na produkci energie [20]. Její hlavní funkcí je přenášet elektrony na kyslík a vytvářet vodu [21].

Tento enzym u savců obsahuje 13 podjednotek, z nichž 3 jsou kódovány mitochondriálními geny. Další důležitou složkou jsou dva hemy (a, a₃) a dvě měďnatá centra (Cu²⁺ A, Cu²⁺ B). Cytochrom a a atom mědi Cu²⁺ A slouží k přenosu elektronů a jsou i součástí vazebného místa pro cytochrom c. Cytochrom a₃ a atom mědi Cu²⁺ B mezi sebe připoutají molekulu kyslíku a přenesou na ni 4 elektrony. Vznikne nestálý anion kyslíku O²⁻, který okamžitě s okolními protony vytváří vodu [21, 22]. Studie ukázaly, že aktivita tohoto enzymu byla snížena v reakci s vyčerpáním mědi [20].

3.1.3.3 Metalothioneiny

Metalothioneiny jsou nízkomolekulární, na cystein bohaté, proteiny vážící kovy. Mezi jejich biologické role patří detoxikace kovových iontů či skladování esenciálních mikroelementů. Metalothioneiny váží ionty zinku, kadmia a mědi. Právě měď je vázána nejpevněji a může ostatní ionty vytlačit. Tyto enzymy jsou indukovány při deficitu mědi, aby se udržela aktivita intracelulárních kuproenzymů (např. cytochrom c oxidáza) [20].

3.1.3.4 Lysyloxidáza

Lysyloxidáza je klíčový enzym při cross-linking (síťování) pojivových tkání. Tento extracelulární enzym katalyzuje oxidaci lysylových a hydroxylysylových řetězců elastinu a kolagenu. Kondenzací vzniklých aldolových skupin vznikají konfigurace, které přemostňují polypeptidické řetězce. Lysyloxidáza má tedy význam pro pevnost, pružnost a ohebnost pojivové tkáně [14].

3.1.3.5 Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza (SOD) též známá jako erytrokuperin či hemokuperin je enzym, jehož významnost pro lidský organismus tkví v schopnosti katalyzovat přeměnu superoxidových radikálů na méně toxický peroxid vodíku a vodu (viz Rovnice 2). Tím působí jako antioxidant [23]. Škodlivost superoxidů spočívá v tom, že se mohou přeměňovat na

nebezpečnější a reaktivnější formy kyslíků jako jsou např. hydroxylové radikály, peroxyinitridy či kyselinu chlornou [24].

Rovnice 2 Mechanismus působení superoxiddismutázy



Existují 3 typy tohoto enzymu lišící se kofaktorem:

- $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD je dimerická forma enzymu, která se skládá ze dvou podjednotek, z toho jedna obsahuje atom mědi a druhá atom zinku. Molekulová hmotnost činí 32 kDa. Nachází se ve všech buňkách organismu [25].
- Mn^{2+} SOD je dimerická nebo tetramerická forma enzymu, jejíž molekulová hmotnost má hodnotu 23 kDa. Každá podjednotka na sebe váže jeden atom kovu [26].
- Fe^{2+} SOD se vyskytuje v dimerické formě a stejně jako Mn^{2+} má molekulovou hmotnost 23 kDa, má i podobnou strukturu. Také u této formy se na každou podjednotku váže jeden atom kovu [26].

3.1.4 Metabolismus mědi

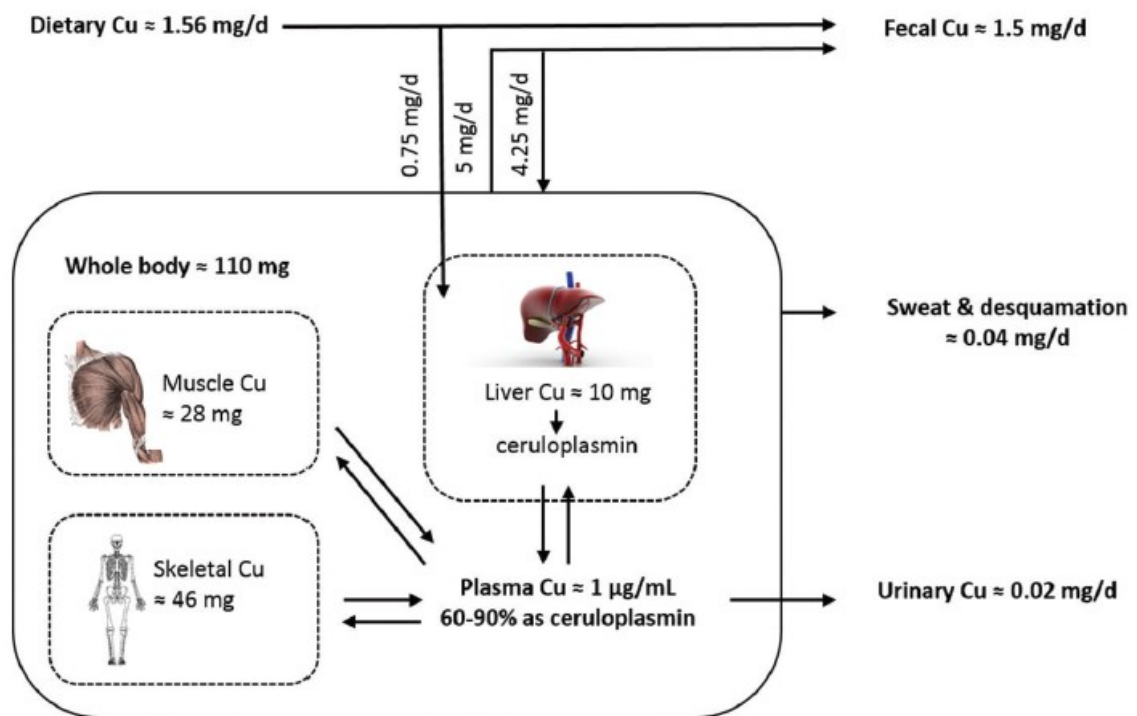
Denně je přijato přibližně 2–5 mg mědi, z tohoto množství je vstřebáno 40–60 % [27]. Absorpce mědi je výrazně ovlivněna množstvím mědi ve stravě. Absorbované množství se zvyšuje se zvyšujícím se množstvím ve stravě, ale vstřebávání je mnohem účinnější, pokud je příjem mědi nízký [28]. Z potravy se absorbuje v tenkém střevě [4]. Pro transport mědi apikální membránou enterocyty je třeba, aby byla redukována na formu Cu^+ . Po redukci je přenesena do enterocyty transportérem CTR1. Poté putuje do intersticiální tekutiny a dále se dostává do krve [29]. V portální cirkulaci, kde se váže na nosné proteiny (především albumin), peptidy a aminokyseliny, je transportována do jater, s menším množstvím vstupujícím do ledvin [29, 30].

Jakmile se měď dostane do hepatocytu, cytoplazmatické chaperony mědi (např. chaperon mědi pro cytochrom c oxidázu COX17, antioxidační chaperon ATOX1, chaperon mědi pro superoxiddismutázu CCS) distribuují kov do specifických buněčných kompartmentů pro jeho začlenění do proteinů vázajících měď [30].

Vylučování endogenní mědi je výrazně ovlivněno příjmem mědi v potravě. Pokud je příjem mědi z potravy nízký, vylučuje se málo endogenní mědi. Se zvyšujícím se množstvím ve stravě se zvyšuje endogenní vylučování mědi. Obrat mědi v organismu je pomalý, pokud je

příjem z potravy nízký a rychlý, když je příjem vysoký. Regulace absorpce a endogenní exkrece řídí množství mědi zadržené v těle a chrání před nedostatkem a toxicitou mědi [28].

Měď se vylučuje do GIT buď žlučí nebo jako neabsorbovaná měď. Pouze 10–15 % mědi ve žluči je reabsorbováno. Přebytek mědi se vylučuje ve stolici, a to jak ve formě absorbovaných, tak neabsorbovaných kovových iontů. V průměru je denní exkrece mědi žlučí 0,5–1,3 mg. Malé množství je vyloučeno také v moči, slinách a potu [20]. Metabolismus mědi je shrnut na obrázku (viz Obrázek 1).



Obrázek 1 Metabolismus mědi, převzato [13]

3.1.5 Patofyziologie mědi v lidském organismu

3.1.5.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, které se projevuje syndromem demence. Je nejčastější ze všech demencí. Představuje asi 50–75 % všech demencí a dalších 10–20 % demencí smíšené formy. AD patří mezi 5 nejčastějších příčin smrti [31, 32]. Nemoc se dělí na 2 formy:

- s časným začátkem – příznaky se objevují do 65 let věku jedince a je poměrně vzácná, např. familiární formy
- s pozdním začátkem – tzv. senilní, příznaky se objevují ve věku 65 a výše [33]

Hlavním neovlivnitelným rizikovým faktorem vzniku choroby je tedy právě věk. Míra prevalence AD roste s věkem exponenciálně a po 65 letech se výrazně zvyšuje [34]. Po věku je dalším důležitým rizikovým faktorem je přítomnost apolipoproteinu E4 a dále i výskyt AD nebo výskyt Downova syndromu v rodině [32]. Se zvýšeným rizikem AD je spojováno velké množství faktorů jako např. diabetes, hypertenze, kouření, obezita, dislipidémie či úrazy hlavy. Naopak mezi tzv. ochranné faktory, které snižují riziko AD patří vyšší vzdělání, které poskytuje kognitivní rezervu, intelektuální volnočasové aktivity, „středomořská strava“ nebo fyzická aktivita [34].

Patogeneze vzniku choroby není zatím zcela objasněna. U tohoto onemocnění dochází k degeneraci určitých mozkových proteinů a ke vzniku proteinů, které jsou patologické. Zřejmě stěžejním mechanismem je tvorba a ukládání beta-amyloidu, který tvoří základ ložisek neurodegenerace, tzv. plaku [32, 33]. V placích pacientů s AD se vyskytuje ve vysokých koncentracích právě měď, dále i zinek a železo. Tyto kovy interagují s beta-amyloidem a tím dochází ke tvorbě volných radikálů, které se podílejí na poškozování neuronů [35].

Beta-amyloid vzniká z transmembránového amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který se vyskytuje přirozeně. Tento protein je za fyziologických podmínek štěpen enzymem alfa-sekretázou na krátké fragmenty dlouhé 40 aminokyselin. Tyto fragmenty mají své fyziologické role (zajišťují neuronovou plasticitu a pravděpodobně působí i neuroprotektivně). Při AD se ale uplatňují i enzymy beta- a gama-sekretázy, které štěpí APP jinde než alfa-sekretázy a vznikají tak delší fragmenty aminokyselin. Beta-peptid oligomeruje (vzniklé molekuly jsou neurotoxické), tvoří se patologický beta-amyloid a z něho potom již zmíněný plak. Další patologickou změnou v mozkové tkáni je nadměrná forforylace tau-proteinu [31–33].

3.1.5.2 Aceruloplazminémie

Aceruloplazminémie je autosomálně recesivně dědičné onemocnění [36]. Je řazena do neurodegenerativních poruch s akumulací železa v mozku, dále potom i v játrech a pankreatu. Choroba je způsobena v důsledku zděděné mutace v genu ceruloplazminu. Ceruloplazmin váže měď, ale působí i jako ferroxidáza. Ztráta ferroxidázové aktivity vede ke hromadění železa v již zmíněných orgánech [37].

Klinicky se u pacientů aceruloplazminémie projevuje charakteristickou triádou, a to degenerací sítnice, diabetem mellitem a neurologickými příznaky (ataxie, nedobrovolné pohyby, chorea, třes, kognitivní disfunkce) [30]. Diagnóza je stanovována geneticky, ale dá se

prokázat i nepřítomností celuroplazminu a nižšími hladinami mědi a železa v krvi a dále vyšší hladinou ferritinu [36].

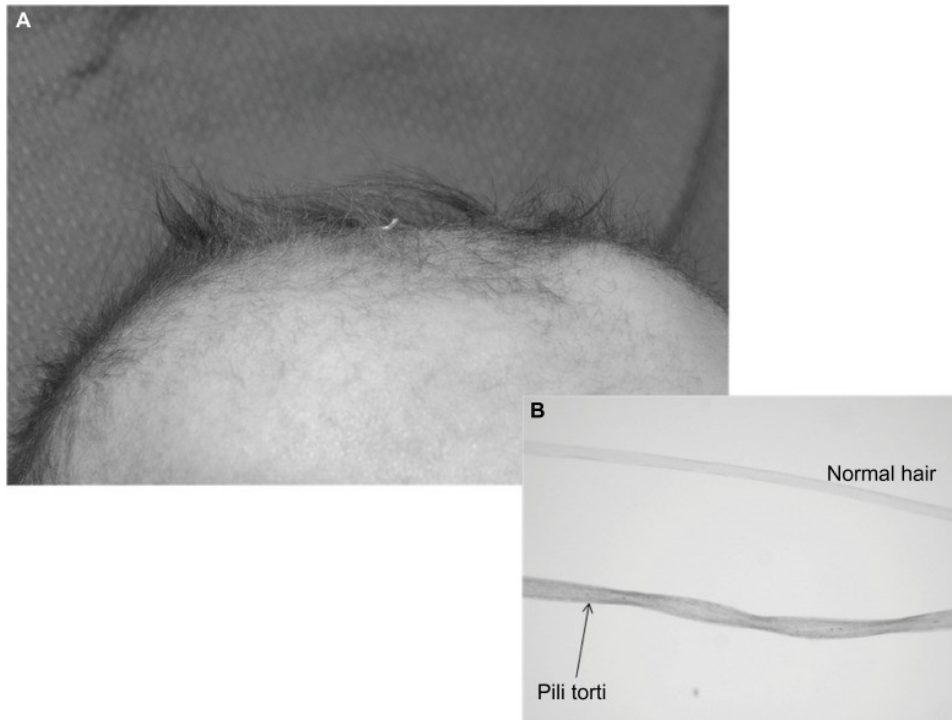
3.1.5.3 Menkesovo onemocnění

Menkesovo onemocnění (MD), jinak zvané „kinky hair syndrom“, je dědičné onemocnění vázané na X chromozom, které se projevuje již v počátcích života u mužského pohlaví a tito postižení jedinci většinou do 3 let od narození umírají [4].

Tato choroba je charakterizována poruchou resorpce, transportu a utilizace mědi [3]. Onemocnění je způsobeno mutacemi genu ATP7A. Převážná část mutací je intragenní mutace nebo částečné genové delece. Ztráta aktivity ATP7A má za následek nedostatek mědi v periferních orgánech z důvodu neschopnosti mědi opustit enterocyty. Pacienti mívají obvykle nízké plazmatické koncentrace ceruloplazminu a snížené koncentrace mědi v játrech a mozku. Postižení jedinci mají neobvyklou texturu vlasů (viz Obrázek 2) [7, 38]. Vlasy vypadají řídké bez lesku s rotačními zákruty „pili torti“, texturou podobné křehké vlně ovcí. Frekvence onemocnění je asi 1 ze 100 000–250 000 narozených, ale např. v Austrálii je výskyt mnohem vyšší než kdekoliv jinde (1:50 000–100 000) [39].

Existují 2 formy onemocnění:

- klasická – Je nejzávažnější formou, mezi charakteristické znaky patří progresivní neurodegenerace a výrazná dysfunkce pojivové tkáně. Při narození se mohou objevit cefalohematomy a spontánní zlomeniny. Novorozenec může mít žloutenku, hypoglykémii, hypotermii a také problémy s příjmem potravy. Do 2.–4. měsíce věku se dítě vyvíjí normálně, kolem 6. měsíce se však celkový psychomotorický vývoj zpomalí. Mezi další projevy patří zvracení, průjem, snížený svalový tonus, ospalost, letargie [40].
- syndrom occipital horn – Je mírnější formou nemoci, která má podobné klinické příznaky jako klasická forma, ale nejsou tolik závažné. Při narození se může zdát kůže pomačkaná, mohou být přítomny pupeční nebo tříselné kýly. Během několika dnů se může vyvinout podchlazení, žloutenka, hypotonie a problémy s krmením. Motorický vývoj je zpožděn z důvodu svalové hypotonie a je spojen s neobvyklou nemotorností. Diagnóza OHS je často zpožděna až do 5.–10. věku dítěte v důsledku mírnějších a jemnějších symptomů. Pacienti mohou zůstat naživu až do dospělosti [39].



Obrázek 2 Abnormální vzhled vlasů u pacienta s MD, převzato [39]

3.1.5.4 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD) je progresivní neurologická porucha definovaná charakteristickým klinickým syndromem bradykineze, třesu, rigidity a posturální nestability [41]. Je to druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění (po Alzheimerově chorobě) [42].

Jedná se o nemoc převážně starších lidí (kolem 60-ti let), může se ale vyvinout i v mladším věku. Rozdíly mezi muži a ženami související s výskytem PD se projevují v poměru 3:2 (muži:ženy), u žen s opožděným nástupem díky neuroprotektivním účinkům estrogenu na nigrostriální dopaminergní systém. PD je spojeno s množstvím rizikových faktorů a genetických mutací. Mezi rizikové faktory onemocnění patří oxidační stres, tvorba volných radikálů a řada toxinů prostředí [43]. Dalším rizikovým faktorem je expozice přechodným kovům, zejména železu a mědi [39].

Onemocnění je způsobeno degenerací nigrostriálního dopaminergního systému se ztrátou neuronů a reaktivní gliózou v substantia nigra nalezené při pitvě. Při PD jsou přítomny neuronální inkluze, složené z α -synukleinu, tzv. Lewyho tělíska [41].

I přes důležitost železa pro fyziologické procesy v mozku, byla řadou studií dokázána jeho role v patofyziologii PD, kdy byly hlášeny jeho neurotoxické účinky. Obsah železa v mozku při PD je vyšší, než se očekávalo při normálním stárnutí. Železnaté ionty mohou vést k poškození neuronů v důsledku oxidačního stresu prostřednictvím Fentonovy reakce

s peroxidem vodíku. Měďnaté ionty mohou mít jak toxický, tak ochranný účinek. Ochranný účinek byl pozorován na poškozených neuronech, zatímco toxický účinek na periferních tkáních. Pacienti s PD mají v substantia nigra hladinu mědi sníženou a naopak zvýšenou v retikulární formaci [44].

3.1.5.5 Wilsonova choroba

Wilsonova choroba (WD) neboli hepatolentikulární degenerace je dědičné autosomálně recesivní onemocnění, charakterizováno nadměrným hromaděním mědi v játrech, rohovce, bazálních gangliích CNS či renálních tubulech, které způsobuje jejich poškození (cirhóza, neurologické poruchy, Kayserův-Fleischerův prsteneček na rohovce) [4, 45]. Příčina nemoci tkví v mutaci genu ATP7B, který je lokalizován na chromozomu 13q14. Gen kóduje ATPázu P-typu transportující měď. Bylo identifikováno více než 500 mutací genu ATP7B, z nichž bylo nalezeno více než 300 mutací asociovaných s WD. Nejběžnější formou mutace ATP7B je missense mutace. K mutacím může dojít v kterékoliv poloze genu, včetně exonů, intronů i promotorové oblasti genu [46].

U lidí postižených chorobou nalzáme typicky výrazně snížené až nulové hodnoty ceruloplazminu. Sérová koncentrace mědi je většinou také snižena, pokud je ovšem zjištěna hodnota normální či zvýšená, jedná se o tzv. volnou, na ceruloplazmin nevázanou měď, která je toxická. V moči bývá obsah mědi zvýšený a ve stolici je naopak snížený, neboť je snížena její exkrece žlučí [19].

Hlavní léčbou WD je chelatační terapie mědi penicilaminem, trientinem nebo solemi zinku. Pacienti by měli dodržovat dietu, kdy by měli přijímat potraviny s nízkým obsahem mědi [47].

3.1.6 Deficit mědi

Nutričně podmíněný deficit mědi je spíše vzácný, neboť je měď obsažena v běžně konzumovaných potravinách. Zdroje mědi jsem již uvedla v tabulce v jiné kapitole (viz Tabulka 1). Nedostatek mědi se ale může objevit u kojenců s umělou výživou, u osob s realimentací malnutričních stavů s nedostatečným přívodem stopových prvků či v průběhu dlouhodobé nedostatečně balancované parenterální výživy.

Častěji se nedostatek mědi vyskytuje v rámci enteropatií a malabsorpce nejružnějšího původu. Existuje i onemocnění spojené s poruchou metabolismu mědi, a to Menkesovo

onemocnění, které je blíže rozebráno v kapitole 3.1.5.3. [19]. Deficit může vzniknout i nadbytečným přívodem zinku, kdy je zinek dlouhodobě přijímán prostřednictvím doplňků stravy [48].

Mezi příznaky deficitu mědi patří mikrocytární hypochromní anémie, leukopenie, kostní změny a osteoporóza. Anémie nereaguje na přívod železa. Ve vlasech je snížený obsah mědi, klesá vylučování mědi močí. V dětství je zpomalen mentální vývoj, zpožďuje se růst i růst kostí a vyvíjí se osteoporóza. Klesá tvorba katecholaminů a myelinu a nervové tkáni [3].

3.1.7 Toxicita mědi

Akutní intoxikace mědí může být způsobena jednorázovým nebo vícenásobným požitím pitné vody se zvýšeným obsahem mědi (3–6 mg/l). Mezi projevy patří nauzea, zvracení, průjemy, bolest v nadbřišku, jako vážnější projevy mohou vzniknout tachykardie, hemolytická anémie, hematurie, masivní krvácení do gastrointestinálního traktu. To může vést k šoku organismu, dále pak k selhání jater a ledvin (při požití vysokých koncentracích solí mědi) [13, 18]. Další příčinou akutní intoxikace může být vdechování mědi ve formě aerosolu nebo jemného prachu, jedná o tzv. „horečku z kovů“. Projevuje se kašlem, třesavkou, teplotou, malátností a bolestí hlavy [3].

Rizikovými skupinami pro vývoj chronické intoxikace mědí jsou dialyzační pacienti, u kterých jsou použita zařízení s hadičkami z mědi, pracovníci používající pesticidy obsahující měď či kojenci během dlouhodobé intravenózní totální parenterální výživy. Chronická toxicita se projevuje především na játrech (cirhóza) s epizodami hemolýzy a poruchami imunitního systému. Mohou se objevit doprovodné příznaky jako jsou poškození ledvinových kanálků, mozku a nekróza jater [13].

3.1.8 Chelatace mědi

Termín chelatace má svůj původ v řeckém slově chele, které znamená klepeto humra. Chelatační činidla jsou organické nebo anorganické sloučeniny schopné vázat kovové ionty za vzniku komplexní prstencové struktury zvané „cheláty“. Tyto komplexy činí toxické kovy fyziologicky neaktivní a zvyšuje se jejich vylučování močí. Tato činidla jsou využívána k chelatační terapii při otravě těžkými kovy [49, 50].

Ideální chelátor by měl mít vysokou rozpustnost ve vodě, odolnost vůči biotransformaci, schopnost dosáhnout místa ukládání kovu, udržet chelatační schopnost při pH tělesných tekutin a schopnost vytvářet kovové komplexy, které jsou méně toxické než iont volného kovu [49].

Měď je stopový prvek, jehož funkce v organismu je založena především na schopnosti oxidovat či redukovat se. Je potřeba regulovat homeostázu mědi, neboť se volné ionty mědi podílejí na tvorbě ROS, které způsobují poškození různých biologických struktur [51]. I přes intenzivní výzkum v této oblasti je klinické použití chelátorů mědi omezeno hlavně na Wilsonovu chorobu. Současným přístupem k léčbě tohoto onemocnění je celoživotní farmakologická terapie chelátory mědi D-penicilaminem, trientinem (triethylenetetraminem) nebo tetrathiomolybdenanem. D-penicilamin byl poprvé použit k léčbě WD v roce 1957. Jeho užívání ovšem vytváří významné vedlejší účinky týkající se zejména imunitního systému, pojivové tkáně a ledvin a dále i relativně vysoké riziko počátečního zhoršení neurologických příznaků u pacientů s neurologickým poškozením. Trientin, další měď-chelatační činidlo, byl představen v roce 1982 jako alternativa pro pacienty, kteří mají intoleranci na D-penicilamin [52]. S ohledem na různé patofyziologie by výzkum nových chelátorů mědi měl zdůraznit jejich různé vlastnosti, a to např.:

- a) afinitu chelátorů k měďným nebo měďnatým iontům a také redukcí měďnatých iontů
- b) stabilitu komplexu s možnou účastí na produkci ROS
- c) chelataci za různých podmínek pH
- d) specifickou k chelataci dalších iontů (zejména železa a zinku)
- e) lipofilitu, která ovlivňuje pronikání do buněk a CNS [53].

3.1.9 Redukce mědi

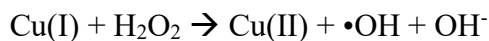
Redoxní neboli oxidačně-redukční reakce jsou reakce, při kterých se mění oxidační čísla atomů. Každou redoxní reakci tvoří dvě navzájem provázané reakce, a to oxidace a redukce. Tyto dva děje probíhají vždy současně, kdy se jeden prvek oxiduje a druhý redukuje. Redukce je chemická reakce, při které dochází ke snížování oxidačního čísla prvku a k získání elektronů. Naopak oxidace je chemická reakce, při které dochází ke zvyšování oxidačního čísla prvku a ke ztrátě elektronů.

Volnou měď, vyskytující se v organismu, lze nalézt ve dvou oxidačních stavech, a to Cu^{2+} a Cu^+ . V biologických systémech se měď nachází zejména ve stavu Cu^{2+} , protože se Cu^+ v přítomnosti kyslíku nebo jiných elektronových akceptorů snadno oxiduje na Cu^{2+} . Oxidace

mědi je reverzibilní, protože Cu^{2+} může přijímat elektrony od silných redukčních činidel (např. askorbát a redukovaný glutathion) [54].

Prostřednictvím Fentonovy reakce reagují měďné ionty mědi (Cu^+) (viz Rovnice 3) nebo železnaté ionty (Fe^{2+}) (viz Rovnice 1) s jinak stabilním peroxidem vodíku za vzniku velmi reaktivního hydroxylového radikálu. Hydroxylový radikál se považuje za faktor, který startuje oxidační poškození biomolekul organismu [54, 55].

Rovnice 3 Fentonova reakce s mědí [56]



3.2 ALKALOIDY

Alkaloidy jsou bezpochyby nejúčinnějšími terapeutickými sloučeninami přírodního původu, které často mají významné farmakologické účinky na lidi a zvířata [57]. Jsou to zásadité látky, které ve své molekule obsahují dusík zpravidla vázaný v heterocyklické struktuře. Existuje mnoho strukturních typů alkaloidů, např. pyrolidinové, tropanové, chinolinové, piperidinové, indolové, isochinolinové, kterými se zabývá tato práce a mnoho dalších. Mezi nejznámější čeledi alkaloidů jsou řazeny Papaveraceae (makovité), Solanaceae (lilkovité), Liliaceae (liliovité) a Ranunculaceae (pryskyřníkovité).

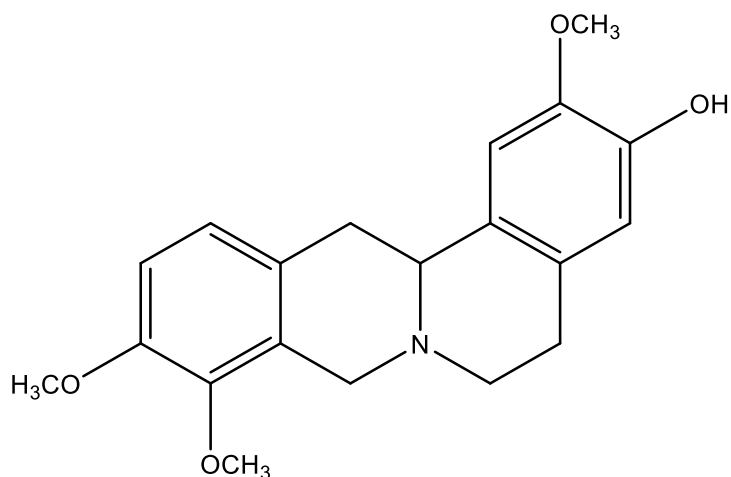
Isochinolinové alkaloidy patří do velké skupiny dusíkatých sloučenin. Jejich biologické účinky zahrnují antimalariální, anti-HIV, protinádorové a antimikrobiální aktivity [57]. Tyto alkaloidy jsou odvozeny od tyrosinu (kromě naftylisochinolinů) [58]. Isochinolinové alkaloidy jsou rozděleny do několika různých strukturních tříd, např. protopinové, ftalidizochinolinové, morfinanové, pavinanové a další.

Moje diplomová práce se zabývá protoberberinovými, spirobenzylisochinolinovými a aporfinovými alkaloidy, které rovněž patří do skupiny isochinolinových alkaloidů. Mezi hlavní čeledi s obsahem těchto alkaloidů patří Papaveraceae (mákovité), Berberidaceae (dřišťálovité), Menispermaceae (lunoplodovité), Amaryllidaceae (amarylkovité) a Ranunculaceae (pryskyřníkovité) [59].

PROTOBERBERINOVÉ ALKALOIDY

Většina alkaloidů protoberberinového typu existuje v přírodě buď jako tetrahydroprotoberberiny nebo jako kvarterní protoberberinové soli. Dále se v malém množství vyskytují i jako dihydroberberiny. Protoberberinové alkaloidy se vyskytují v mnoha rostlinných čeledích, např. Papaveraceae, Berberidaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Annonaceae [60]. Základ tvoří benzylisochinolinový skelet, kde mezi dusíkem a uhlíkem C 8 je přítomen berberinový most [61]. Tyto alkaloidy vykazují mnoho biologických a farmakologických účinků, mezi které patří inhibice syntézy DNA, biosyntéza proteinů či inhibice propustnosti membrány. Dále mohou fungovat jako odpojovače oxidace od fosforylace v dýchacím řetězci. Tyto procesy pravděpodobně přispívají k toxickým účinkům pozorovaným proti bakteriím, houbám, rostlinám, hmyzu a obratlovcům. Za inhibici fágů a dalších virů je zodpovědná interakce s DNA a inhibice reverzní transkripce [60].

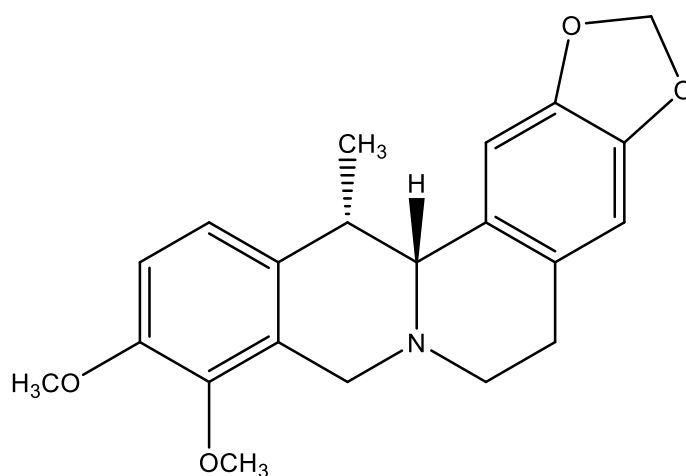
3.2.1 Korypalmin



Obrázek 3 Vzorec korypalminu

Korypalmin (viz Obrázek 3) byl izolován z dymnivky duté (*Corydalis cava*), dále i z *Corydalis chaerophylla*, čeleď Papaveraceae. Je řazen do skupiny protoberberinových alkaloidů [62]. Může inhibovat prolyl oligopeptidázu, enzym, který hydrolyzuje proliny obsahující peptidy na karboxylovém konci prolinových zbytků. To bylo spojeno se schizofrenií, bipolární afektivní poruchou a souvisejícími neuropsychiatrickými poruchami [63]. Korypalmin vykazuje inhibiční aktivitu na klíčení spór některých patogenních a saprofytických hub (např. *Alternaria solani*, *Curvularia pallescens*, *Curvularia sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Helminthosporium speciferum*, *Heterosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Ustilago cynodontis* a jiné) [64].

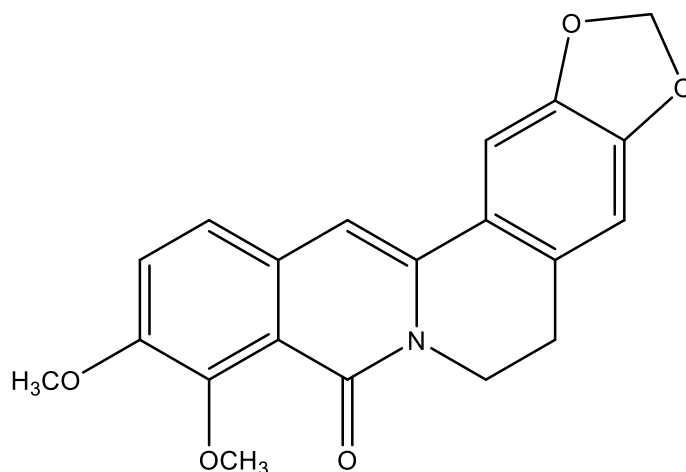
3.2.2 Thaliktrikavin



Obrázek 4 Vzorec thaliktrikavinu

Thaliktikavin (viz Obrázek 4) byl izolován z nadzemních částí dymnivky duté (*Corydalis cava* (L.), čeleď Papaveraceae. Byla studována schopnost tohoto protoberberinového alkaloidu inhibovat aktivitu lidské acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy. Ve studii bylo zjištěno, že thaliktikavin má slibnou a selektivní inhibici lidské acetylcholinesterázy. Dále byla analyzována prostupnost thaliktikavinu přes hematoencefalickou bariéru, přičemž se zjistilo, že pasivní prostupnost je omezená. Nicméně i přes tuto skutečnost se tento alkaloid jeví jako potenciální droga pro léčbu Alzheimerovy choroby [65].

3.2.3 8-oxoberberin



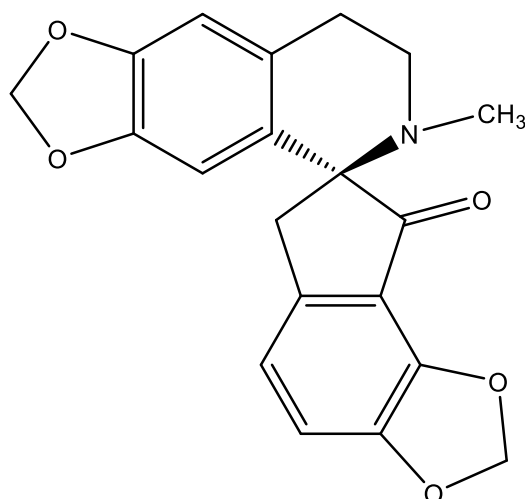
Obrázek 5 Vzorec 8-oxoberberinu

8-oxoberberin (viz Obrázek 5) byl izolován z dřšťálu obecného (*Berberis vulgaris* L.), čeleď Berberidaceae Juss.. Tento protoberberinový alkaloid, byl testován na antidiabetickou aktivitu proti PTP 1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B), kdy byl významně aktivní. Dále byla zkoumána antimikrobiální aktivita proti čtyřem mikrobiálním kmenům, a to *Mycobacterium marinum*, MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), EMRSA (Epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) a *Escherichia coli*. Tento alkaloid vykazoval vysokou selektivitu a dobrou aktivitu proti *M. marinum*, naopak proti ostatním zmiňovaným kmenům byl neúčinný [66]. Dále 8-oxoberberin inhibuje cholinesterasy [67].

SPIROBENZYLISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY

Spirobenzylisochinolinové alkaloidy jsou charakteristické zvláště pro rody *Fumaria* a *Corydalis*. V rostlinách vznikají z protoberberinových alkaloidů. Skelet, který je společný pro celou skupinu, se může být nazýván jako ochotensinový systém. [61, 68, 69].

3.2.4 Fumarilin



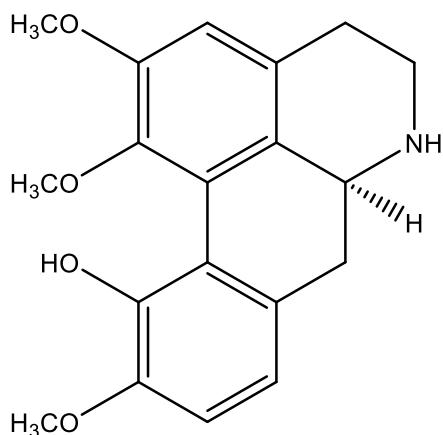
Obrázek 6 Vzorec fumarilinu

Fumarilin (viz Obrázek 6) byl izolován ze zemědělného léčivého (*Fumaria officinalis* L.). Jedná se o spirobenzylisochinolinový alkaloid [70]. U tohoto alkaloidu byla testována inhibiční aktivita vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze a lidské sérové butyrylcholinesteráze, ale významná inhibiční aktivita zjištěna nebyla [69].

APORFINOVÉ ALKALOIDY

Aporfinové alkaloidy tvoří velkou skupinu izochinolinových alkaloidů, které obsahují více než 700 sloučenin [71]. Jsou druhou největší skupinou po benzyloisochinolinových alkaloidech [69]. Lze je nalézt v rostlinných čeledích Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, a Rhamnaceae [72]. Jejich struktura je odvozena od struktury aporfinu. Tato struktura vzniká párováním aromatických jader benzyloisochinolinů [61]. Mnoho výzkumů ukázalo, že aporfinové alkaloidy a jejich deriváty měly cytotoxické účinky, anthelmintické aktivity, antibakteriální účinky, antioxidační funkce, antiprotozoální aktivity [72].

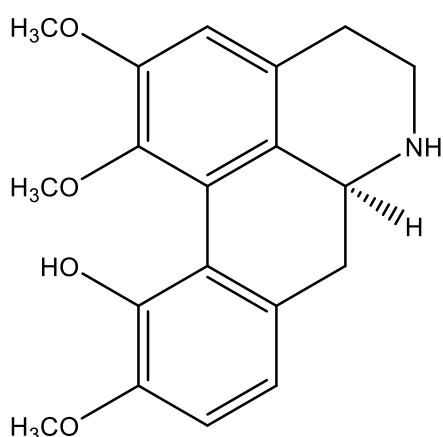
3.2.5 Norisokorydin



Obrázek 7 Vzorec norisokorydinu

Norisokorydin (viz Obrázek 7) byl izolován z boldovníku vonného (*Peumus boldus* Mol., čeleď Monimiaceae) [67], dále z *Retanilla ephedra* (čeleď Rhamnaceae) a *Discaria serratifolia* (čeleď Rhamnaceae) [72]. Je řazen do skupiny aporfinových alkaloidů [73]. Alkaloid při zkoumání vykazoval antiplasmodiální aktivitu proti *Plasmodium falciparum*. Antioxidační vlastnosti testovaného norisokorydinu odhalily, že kromě antiplasmodiální aktivity může také zabránit oxidačnímu poškození hostitele způsobené *P. falciparum*. Uvedené vlastnosti jsou tedy výhodné při zlepšování potlačení infekce malárií [74]. Dále norisokorydin vykazuje antinociceptivní a antioxidační účinky [67].

3.2.6 (+)-Laurotetanin



Obrázek 8 Vzorec (+)-laurotetaninu

(+)-Laurotetanin (viz Obrázek 8) byl izolován z boldovníku vonného (*Peumus boldus* Mol., čeleď Monimiaceae) [67]. Náleží do skupiny aporfinových alkaloidů [70]. Byla uskutečněna studie, ve které se zkoumaly antiastmatické vlastnosti a mechanismus účinku

laurotetaninu u alergických astmatických krys vyvolaných ovalbuminem. V této studii laurotetanin potlačil IgE a histamin v séru astmatických potkanů, což naznačuje, že laurotetanin má potenciální antiastmatickou vlastnost. Tato zjištění tedy podporují další vývoj laurotetaninu jako kandidátního léčiva pro léčbu alergického astmatu [75]. Je inhibitorem acetylcholinesterázy a vykazuje antioxidační aktivitu [67].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Pomůcky

4.1.1 Používaný materiál

- Mikrotitrační destičky (Brand)
- Automatické pipety různých objemů (Brand)
- Vícekanálové pipety různých objemů (Biohit)

4.1.2 Používané chemikálie

Pokud není uvedeno jinak, všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich.

- Dimethylsulfoxid (DMSO) Lachner $\geq 99,5\%$
- Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) čistota neuvedena
- Hematoxylin (HEM) certifikováno Biological Stain Commission
- HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina) $\geq 99,5\%$
- HEPES sodná sůl $\geq 99,5\%$
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) $\geq 99,5\%$
- Chlorid měďný (CuCl) $\geq 99\%$
- Chlorid sodný (NaCl) $\geq 99,5\%$
- Kyselina chlorovodíková (HCl) $\geq 32\%$
- Kyselina octová (CH₃COOH) Penta $\geq 99\%$
- Octan sodný (CH₃COO-H⁺) $\geq 99\%$
- Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄.5H₂O) $\geq 99\%$

4.1.3 Testované látky

Čistota všech testovaných látek byla $\geq 98\%$.

- Korypalmin byl izolován z *Corydalis cava* [76].
- Thaliktrikavin byl izolován z nadzemních částí *Corydalis cava* [57].
- 8-oxoberberin byl izolován z *Berberis vulgaris* L. [67].
- Fumarilin byl izolován z *Fumaria officinalis* L. [77].
- Norisokorydin a (+)-laurotetanin byly izolovány z *Peumus boldus* Mol. [67].

4.1.4 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy KERN ABT120-5DM
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HIT MultiDetection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky NEO2MALPHA Synergy 02 (BioTech, Praha)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA®MS 3 digital
- Třepačka pro zkumavky IKA®VORTEX GENIUS 3
- Ultrazvuková lázeň KRAINTEK

4.2 Příprava roztoků

4.2.1 Příprava základních roztoků

- **Roztok měďnatých iontů o koncentraci 5 mM**

5 mM roztok měďnatých iontů byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 249,69 \text{ g/mol}$) v potřebném množství destilované vody. Tento roztok byl stabilní při uchování v lednici.

- **Roztok hematoxylinu (HEM) o koncentraci 5 mM**

Roztok hematoxylinu byl zhotoven jeho rozpuštěním v DMSO na požadovanou koncentraci 5 mM ($M_w = 302,28 \text{ g/mol}$). Protože tento roztok není stabilní, dá použít po dobu cca 5 hodin.

- **Roztok chloridu měďného (CuCl) (měďných iontů Cu^+) o koncentraci 5 mM**

Tento roztok byl nachystán rozpuštěním CuCl ve vodném roztoku 0,1M HCl a 1M NaCl ($M_w(\text{CuCl}) = 98,99 \text{ g/mol}$). Nejprve bylo nutno připravit rozpouštědlo. Prvním krokem při přípravě rozpouštědla byla příprava 0,1M roztoku HCl (bylo napipetováno 442 μl 32% HCl do 44558 μl destilované vody) ($M_w = 36,46 \text{ g/mol}$, 1 l \approx 1,16 kg). Druhým krokem bylo v 0,1M roztoku HCl rozpustit NaCl na 1M roztok ($M_w = 58,44 \text{ g/mol}$). V posledním kroku byl rozpuštěn CuCl v ultrazvukové lázni.

- **Roztok hydroxylaminu hydrochloridu (HA) o koncentraci 100 mM**

Roztok byl připraven rozpuštěním hydroxylaminu ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) v destilované vodě na požadovanou koncentraci 100 mM a poté byl roztok naředěn na koncentraci 10 mM anebo na koncentraci 1 mM.

- **Roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) o koncentraci 5 mM**

Roztok BCS byl zhotoven rozpuštěním disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny ($M_w = 564,54 \text{ g/mol}$) v destilované vodě.

4.2.2 Příprava pracovních roztoků

- **Roztok testovaných látek**

Roztoky zkoumaných alkaloidů byly nachystány jejich rozpuštěním v DMSO. Výchozí koncentrace byla obvykle 10 mM. Další potřebné ředění bylo provedeno pomocí DMSO.

- **Roztok měďnatých iontů o koncentraci 250 μM**

Tento roztok byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 249,69 \text{ g/mol}$) v potřebném množství vody.

- **Roztok hematoxylinu o koncentraci 250 μM**

Roztok byl zhotoven naředěním základního 5mM roztoku v DMSO. Po 90 minutách bylo nutné jej znovu naředit.

- **Roztoky měďných (Cu^+) a měďnatých (Cu^{2+}) iontů o koncentraci 250 μM v DMSO**

Roztoky byly nachystány rozpuštěním daných iontů v DMSO.

4.3 Standardní operační postupy

4.3.1 Kontrola připravených základních roztoků mědi

Tato kontrola byla provedena po přípravě základních, tj. 5mM roztoků Cu^{2+} a Cu^+ . Zkouška se provádí před jejich prvním použitím. Roztoky jsou stabilní, uchovávají se v lednici, před jejich dalším použitím není třeba kontrolu znovu provádět.

- Nejdříve byla připravena mikrotitrační destička. Bylo pipetováno pod sebe do dvou jamek mikrotitrační destičky.
- Bylo napipetováno 150 μl pufru o pH 7,5.
- Poté bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku HA.
- V dalším kroku bylo přidáno 50 μl 0,25mM roztoku iontů mědi. Tento roztok byl zhotoven smícháním 950 μl superčisté vody s 50 μl základního roztoku.
- Mikrotitrační destička byla vložena na třepačku a nechána třepat po dobu jedné minuty.
- Dále bylo připipetováno 50 μl 5mM roztoku BCS.




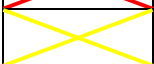
- g) Bylo vyčkáno alespoň jednu minutu.
- h) V posledním kroku byla změřena absorbance při 484 nm. Správně připravený roztok by měl mít absorbanci okolo 0,50–0,55.

4.3.2 Kalibrační křivka

- a) Nejprve byly připraveny základní reagenční roztoky:
- 5mM roztok BCS v destilované vodě
 - 5mM roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) v destilované vodě
 - 10mM roztok HA v destilované vodě
- b) Dále byly přichystány vodné roztoky měďnatých solí o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 μM .
- c) V dalším kroku již započal vlastní experiment, a to tak, že bylo nejprve do všech určených jamek mikrotitrační destičky napipetováno 150 μl pufru o pH 6,8.
- d) Poté bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku HA.
- e) Dále bylo přidáno 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů žádané koncentrace do **testovacích jamek** nebo 50 μl destilované vody do **jamek kontrolních** (viz Obrázek 9).
- f) Bylo mícháno po dobu jedné minuty.
- g) Následně bylo přidáno 50 μl roztoku BCS do poloviny jamek (x) a do druhé poloviny 50 μl destilované vody (x) (viz Obrázek 9).
- h) Pak byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 484 nm. Poté v čase 5 minut (resp. 4:30).

	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 0 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 50 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 100 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 150 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 200 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 250 μM
Jamky s indikátorem	x	x	x	x	x	x
Slepé vzorky	x	x	x	x	x	x

Obrázek 9 Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci měďnatých iontů

	Jamky testovací s rozdílnými koncentracemi Cu^{2+} iontů
	Jamky kontrolní bez Cu^{2+} iontů (destilovaná H_2O)
	Jamky s indikátorem (BCS)
	Slepé vzorky (destilovaná H_2O)

4.3.3 Stanovení chelatace iontů mědi *hematoxylinem*

- a) Nejprve byly připraveny základní reagenční roztoky:
 - 5mM roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) v destilované vodě
 - 5mM roztok *hematoxylinu* v DMSO
- b) Dále byly přichystány tyto pracovní roztoky a roztoky testovaných látek:
 - Obvykle 10mM základní roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno podle potřeby
 - 250 μM roztok Cu^{2+} iontů ve vodě
 - 250 μM roztok *hematoxylinu* v DMSO
- c) V dalším kroku již započal vlastní experiment, a to tak, že bylo nejprve do všech určených jamek mikrotitrační destičky napipetováno 150 μl pufru o pH 5,5 nebo 6,8 nebo 7,5.
- d) Poté bylo přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů do všech jamek.
- e) Dále bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace do **testovacích jamek** nebo rozpouštědla do **jamek kontrolních** (viz Obrázek 10).
- f) Bylo mícháno po dobu 2 minut.
- g) Následně bylo přidáno 50 μl 250 μM roztoku *hematoxylinu* do poloviny jamek (tj. do prvních dvou řad) (x) nebo DMSO do druhé poloviny jamek (x) (viz Obrázek 10). DMSO pipetováno nejdříve.
- h) Poté bylo necháno míchat 3 minuty.
- i) Pak byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 595 nm (pH 5,5), 590 nm (pH 6,8), 610 nm (pH 7,5) (tzn. v čase 3 minuty) a po dalších 4 minutách (tzn. v čase 7 minut).

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_3	Roztok testované látky c_x	Kontrolní jamky ($c = 0$)
Jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

Obrázek 10 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem

	Jamky s testovanou látkou
	Jamky kontrolní bez testované látky (DMSO)
X	Jamky s indikátorem (roztok <i>hematoxylinu</i>)
X	Slepé vzorky (DMSO)

Konečný obsah jamky v mikrotitrační destičce:

- 150 μ l pufru
- 50 μ l roztoku Cu^{2+}
- 50 μ l roztoku testované látky nebo rozpouštědla
- 50 μ l roztoku HEM nebo DMSO

4.3.4 Chelatace měďnatých iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5)

- a) Nejprve byly připraveny základní reagenční roztoky:
 - 1mM a 10mM roztok HA
 - 5mM roztok BCS
- b) Dále byly přichystány tyto pracovní roztoky a roztoky testovaných látek:
 - Obvykle 10mM základní roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno podle potřeby
 - 250 μ M roztok Cu^{2+} v DMSO
- c) V dalším kroku bylo napipetováno 100 μ l příslušného pufru.
- d) Poté bylo přidáno 50 μ l roztoku testované látky příslušné koncentrace do **testovacích jamek** nebo rozpouštědla do **jamek kontrolních** (viz Obrázek 11).
- e) Dále bylo přidáno 50 μ l 250 μ M roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO do všech jamek.
- f) Bylo mícháno po dobu 2 minut.
- g) Následně bylo přidáno 50 μ l 1mM (pH 6,8; 7,5) nebo 10mM (pH 4,5; 5,5) roztoku HA.

- h) Poté bylo mícháno jednu minutu.
- i) Dále bylo napipetováno 50 μl 5mM roztoku BCS (x) nebo vody do druhé poloviny jamek (x) (viz Obrázek 11).
- j) Pak byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 484 nm a dále po 5 minutách (v čase 4:30 bylo měření započato).

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_3	Roztok testované látky c_x	Kontrolní jamky ($c = 0$)
Jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

Obrázek 11 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^{2+} iontů v pufru

	Jamky s testovanou látkou
	Jamky kontrolní bez testované látky obsahující rozpouštědlo (DMSO)
X	Jamky s indikátorem (BCS)
X	Slepé vzorky (destilovaná H_2O)

Konečný obsah jamky v mikrotitrační destičce:

- 100 μl pufru
- 50 μl roztoku testované látky nebo rozpouštědla
- 50 μl roztoku Cu^{2+}
- 50 μl roztoku HA
- 50 μl roztoku BCS nebo vody

4.3.5 Chelatace měďných iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5)

- a) Nejprve byly připraveny základní reagenční roztoky:
- 1mM a 10mM roztok HA
 - 5mM roztok BCS
- b) Dále byly přichystány tyto pracovní roztoky a roztoky testovaných látek:
- Obvykle 10mM základní roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno podle potřeby

- 250 μ M roztok Cu⁺ v DMSO
- c) V dalším kroku bylo napipetováno 100 μ l příslušného pufru.
- d) Následně bylo přidáno 50 μ l 1mM (pH 6,8; 7,5) nebo 10 mM (pH 4,5; 5,5) roztoku HA.
- e) Dále bylo přidáno 50 μ l 250 μ M roztoku Cu⁺ iontů v DMSO do všech jamek.
- f) Mícháno po dobu jedné minuty.
- g) Poté bylo přidáno 50 μ l roztoku testované látky příslušné koncentrace do **testovacích jamek** nebo rozpouštědla do **jamek kontrolních** (viz Obrázek 12).
- h) Mícháno 2 minuty.
- i) Dále bylo napipetováno 50 μ l 5mM roztoku BCS (x) nebo vody do druhé poloviny jamek (x) (viz Obrázek 12).
- j) Pak jsme ihned změřili absorbanci při vlnové délce 484 nm a dále po 5 minutách (v čase 4:30 bylo měření započato).

	Roztok testované látky c ₁	Roztok testované látky c ₂	Roztok testované látky c ₃	Roztok testované látky c _x	Kontrolní jamky (c = 0)
Jamky s indikátorem	x	x	x	x	x
Slepé vzorky	x	x	x	x	x

Obrázek 12 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu⁺ iontů v pufru

	Jamky s testovanou látkou
	Jamky kontrolní bez testované látky obsahující rozpouštědlo (DMSO)
x	Jamky s indikátorem (BCS)
x	Slepé vzorky (destilovaná H ₂ O)

Konečný obsah jamky v mikrotitrační destičce:

- 100 μ l pufru
- 50 μ l roztoku HA
- 50 μ l roztoku Cu⁺
- 50 μ l roztoku testované látky nebo rozpouštědla
- 50 μ l roztoku BCS nebo vody

4.3.6 Chelatace měďnatých iontů v DMSO

- a) Nejprve byly připraveny základní reagenční roztoky:
 - 1mM roztok HA
 - 5mM roztok BCS
- b) Dále byly přichystány tyto pracovní roztoky a roztoky testovaných látek:
 - Obvykle 10mM základní roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno podle potřeby
 - 250 μ M roztok Cu²⁺ v DMSO
- c) Bylo pipetováno 100 μ l roztoku testované látky příslušné koncentrace v DMSO do **testovacích jamek** nebo rozpouštědla do **jamek kontrolních**.
- d) Poté bylo přidáno 50 μ l 250 μ M roztoku Cu²⁺ iontů v DMSO do všech jamek.
- e) Mícháno po dobu 2 minut.
- f) Potom bylo přidáno 50 μ l 1mM roztoku HA.
- g) Opět mícháno, ale pouze 1 minutu.
- h) Dále bylo přidáno 50 μ l 5mM roztoku BCS (x) nebo vody (x) (viz Obrázek 13).
- i) Pak byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 484 nm a dále po 5 minutách (v čase 4:30 bylo měření započato).

	Roztok testované látky c ₁	Roztok testované látky c ₂	Roztok testované látky c ₃	Roztok testované látky c _x	Kontrolní jamky (c = 0)
Jamky s indikátorem	x	x	x	x	x
Slepé vzorky	x	x	x	x	x

Obrázek 13 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu²⁺ iontů v DMSO

	Jamky s testovanou látkou
	Jamky kontrolní bez testované látky obsahující rozpouštědlo (DMSO)
x	Jamky s indikátorem (BCS)
x	Slepé vzorky (destilovaná H ₂ O)

Konečný obsah jamky v mikrotitrační destičce:

- 100 μ l roztoku testované látky v DMSO nebo DMSO
- 50 μ l roztoku Cu²⁺

- 50 μl roztoku HA
- 50 μl roztoku BCS nebo vody

4.3.7 Chelatace měďných iontů v DMSO

- Nejprve byly připraveny základní reagenční roztoky:
 - 1mM roztok HA
 - 5mM roztok BCS
- Dále byly přichystány tyto pracovní roztoky a roztoky testovaných látek:
 - Obvykle 10mM základní roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno podle potřeby
 - 250 μM roztok Cu^+
- Bylo pipetováno 100 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace v DMSO do **testovacích jamek** nebo rozpouštědla do **jamek kontrolních**.
- Potom bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku HA.
- Poté bylo přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^+ iontů do všech jamek.
- Destička byla míchána po dobu 2 minut.
- Dále bylo přidáno 50 μl 5mM roztoku BCS (x) nebo vody (x) (viz Obrázek 14).
- Pak byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 484 nm a dále po 5 minutách (v čase 4:30 bylo měření započato).

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_3	Roztok testované látky c_x	Kontrolní jamky ($c = 0$)
Jamky s indikátorem	x	x	x	x	x
Slepé vzorky	x	x	x	x	x

Obrázek 14 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^+ iontů v DMSO

	Jamky s testovanou látkou
	Jamky kontrolní bez testované látky obsahující rozpouštědlo (DMSO)
x	Jamky s indikátorem (BCS)
x	Slepé vzorky (destilovaná H_2O)

Konečný obsah jamky v mikrotitrační destičce:

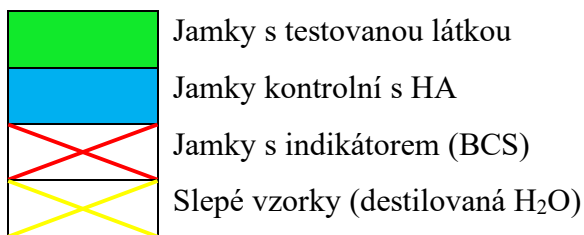
- 100 μl roztoku testované látky v DMSO nebo DMSO
- 50 μl roztoku HA
- 50 μl roztoku Cu^+
- 50 μl roztoku BCS nebo vody

4.3.8 Redukce měďnatých iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5)

- Nejprve byly připraveny základní reagenční roztoky:
 - 1mM a 10mM roztok HA
 - 5mM roztok BCS
- Dále byly přichystány tyto pracovní roztoky a roztoky testovaných látek:
 - Obvykle 10mM základní roztok testované látky, další ředění bylo provedeno podle potřeby
 - 250 μM roztok Cu^{2+}
- V dalším kroku bylo pipetováno 100 μl příslušného pufru.
- Poté bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace/rozpouštědla do **testovacích jamek** nebo 50 μl 1mM (pH 6,8; 7,5)/10mM (pH 4,5; 5,5) roztoku HA do **jamek kontrolních** (viz Obrázek 15).
- Dále bylo přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů do všech jamek.
- Necháno míchat po dobu 2 minut.
- Následně bylo přidáno 50 μl 5mM roztoku BCS (x) nebo vody do druhé poloviny jamek (x) (viz Obrázek 15).
- Pak byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 484 nm a dále po 5 minutách (v čase 4:30 bylo měření započato).

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_3	Rozpouštědlo (DMSO)	Kontrolní jamky (HA)
Jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

Obrázek 15 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Cu^{2+} iontů v pufru



Konečný obsah jamky v mikrotitrační destičce:

- 100 μ l pufru
- 50 μ l roztoku testované látky/rozpouštědla nebo roztoku HA
- 50 μ l roztoku Cu²⁺
- 50 μ l roztoku BCS nebo vody

4.3.9 Redukce měďnatých iontů v DMSO

- a) Nejprve byly připraveny základní reagenční roztoky:
 - 1mM roztok HA
 - 5mM roztok BCS
- b) Dále byly přichystány tyto pracovní roztoky a roztoky testovaných látek:
 - Obvykle 10mM základní roztok testované látky, další ředění bylo provedeno podle potřeby
 - 250 μ M roztok Cu²⁺ v DMSO
- c) Nejprve bylo napipetováno 100 μ l příslušného roztoku testované látky příslušné koncentrace v DMSO/DMSO do **testovacích jamek** nebo 100 μ l 1mM roztoku HA do **jamek kontrolních** (viz Obrázek 16).
- d) Poté bylo přidáno 50 μ l 250 μ M roztoku Cu²⁺ iontů v DMSO do všech jamek.
- e) Mícháno po dobu 2 minut.
- f) Následně bylo přidáno 50 μ l 5mM roztoku BCS (x) nebo vody do druhé poloviny jamek (x) (viz Obrázek 16).
- g) Pak byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 484 nm a dále po 5 minutách (v čase 4:30 započato měření).

	Roztok testované látky c ₁	Roztok testované látky c ₂	Roztok testované látky c ₃	Rozpouštědlo (DMSO)	Kontrolní jamky (HA)
Jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

Obrázek 16 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Cu²⁺ iontů v DMSO

	Jamky s testovanou látkou
	Jamky kontrolní s HA
X	Jamky s indikátorem (BCS)
X	Slepé vzorky (destilovaná H ₂ O)

Konečný obsah jamky v mikrotitrační destičce:

- 100 µl roztoku testované látky v DMSO/DMSO nebo roztoku HA
- 50 µl roztoku Cu²⁺
- 50 µl roztoku BCS nebo vody

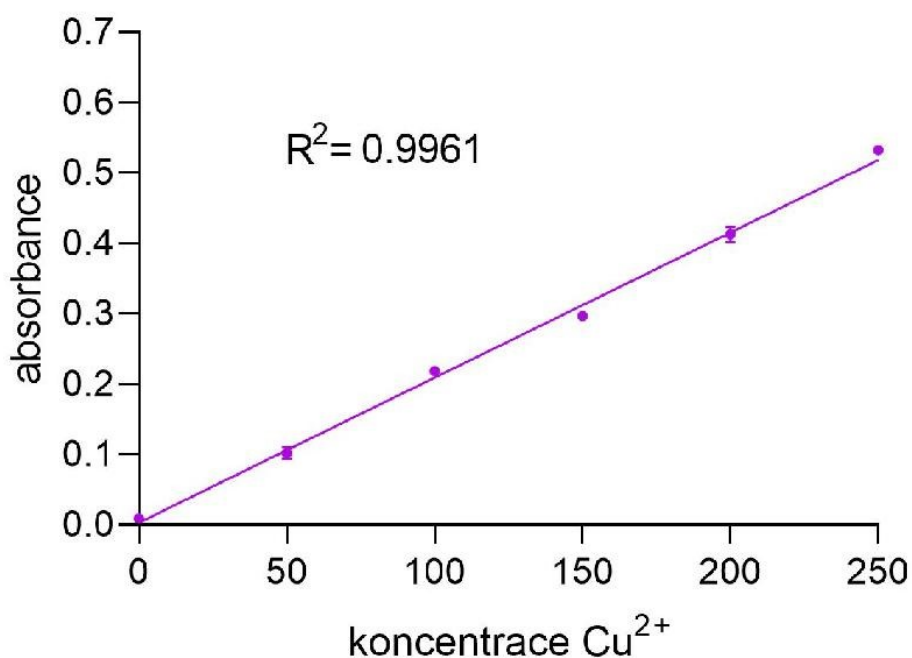
5 VÝSLEDKY

5.1 Kalibrační křivka

Z hodnot naměřených absorbancí (viz Tabulka 3) byl sestaven graf kalibrační křivky (Obrázek 17). Pro sestavení grafu byly použity tyto základní koncentrace měďnatých iontů: 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M. Při zvyšující se koncentraci měďnatých iontů se zvyšovala také hodnota naměřené absorbance. Sestavená kalibrační křivka tedy vykazuje lineární závislost absorbance na koncentraci měďnatých iontů.

Tabulka 3 Naměřené hodnoty absorbancí potřebné pro sestavení kalibrační křivky

Koncentrace Cu ²⁺ (μ M)	0	50	100	150	200	250
Průměrná absorbance	0,009	0,1014	0,2174	0,295	0,411	0,5314



Obrázek 17 Kalibrační křivka

5.2 Chelatační účinky alkaloidů

Chelatační účinky alkaloidů byly stanoveny pomocí dvou metod s indikátory hematoxylinem a disodnou solí kyseliny bathocuproindisulfonové.

5.2.1 Stanovení chelatace mědi pomocí hematoxylinu

Touto metodou byly změřeny všechny testované látky. Měření probíhalo v prostředích pufrů o pH 5,5; 6,8; 7,5. Ze všech proměřených alkaloidů protoberberinového, spirobenzylisochinolonového a aporfínového typu žádná látka nevykázala chelatační aktivitu měďnatých Cu^{2+} iontů.

5.2.2 Stanovení chelatace mědi pomocí BCS

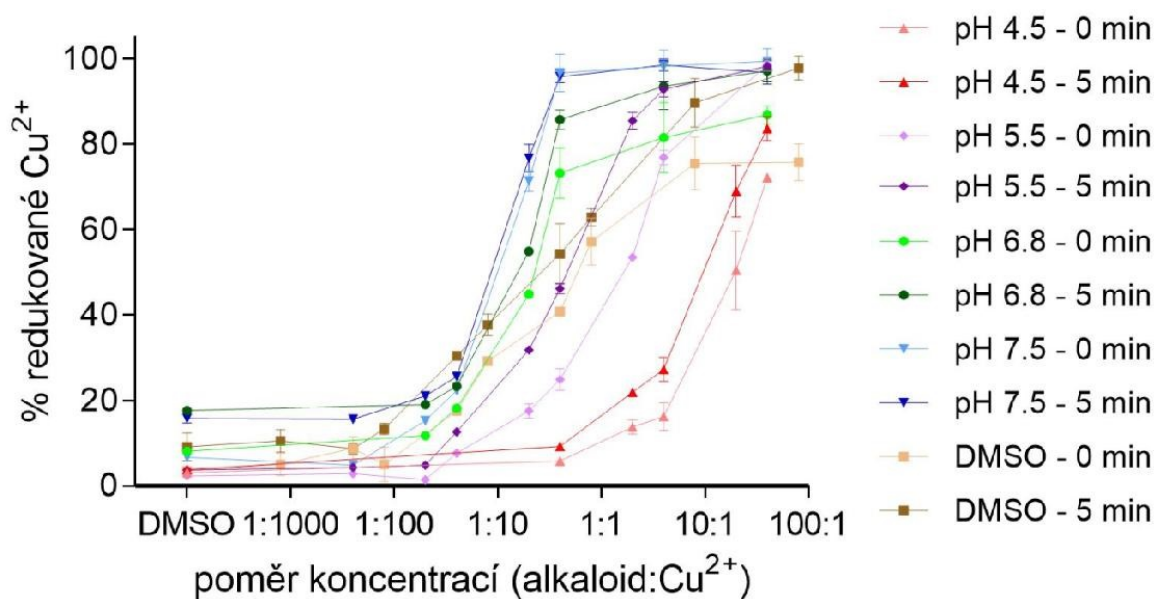
Pomocí této metody byly změřeny všechny testované látky. Měření s BCS probíhalo v prostředích pufrů o pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5 a v prostředí DMSO. Žádná z testovaných látek alkaloidů protoberberinového, spirobenzylisochinolonového a aporfínového typu v těchto prostředích chelatační aktivitu měďných Cu^+ ani měďnatých Cu^{2+} iontů nevykázala.

5.3 Měď-redukující účinky alkaloidů

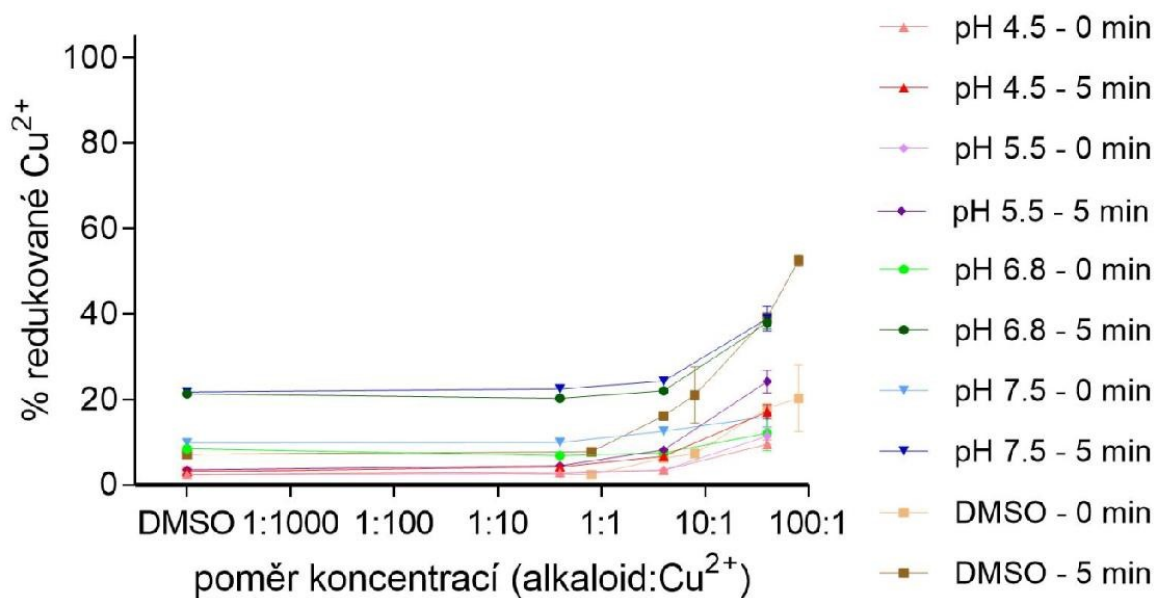
Měď-redukující účinky alkaloidů byly stanoveny pomocí metody využívající indikátor disodnou sůl kyseliny bathocuproindisulfonové. Měď-redukující účinky námi testovaných látek jsou znázorněny na obrázcích níže (viz Obrázek 18–Obrázek 23). V grafu jsou zaneseny aktivity alkaloidů při rozdílných hodnotách pH a v prostředí DMSO vždy v časech 0 min a 5 min.

Alkaloid protoberberinového typu 8-oxoberberin tvořil při dvou nejvyšších koncentracích sraženinu, a proto graf není kompletní.

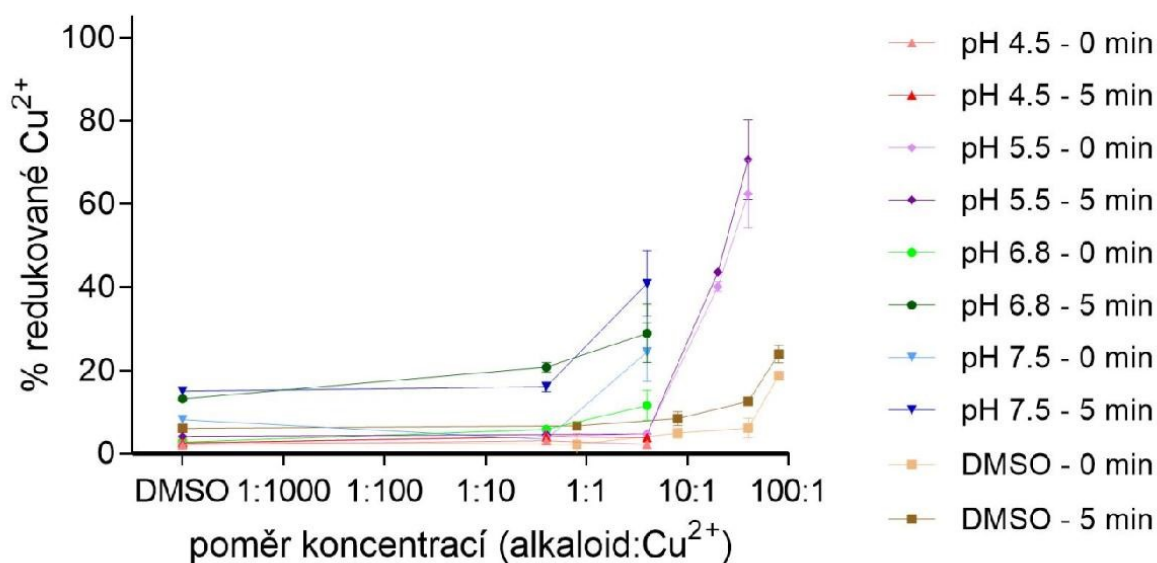
5.3.1 Alkaloidy protoberberinového typu



Obrázek 18 Měď-redukující účinky korypalminu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

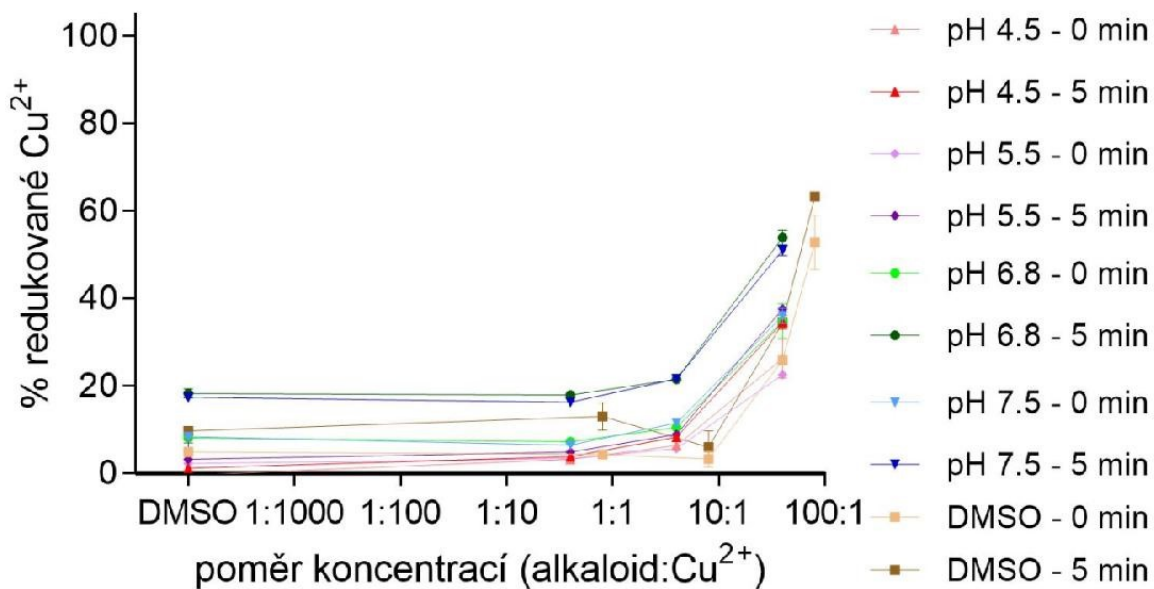


Obrázek 19 Měď-redukující účinky thaliktrikavinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



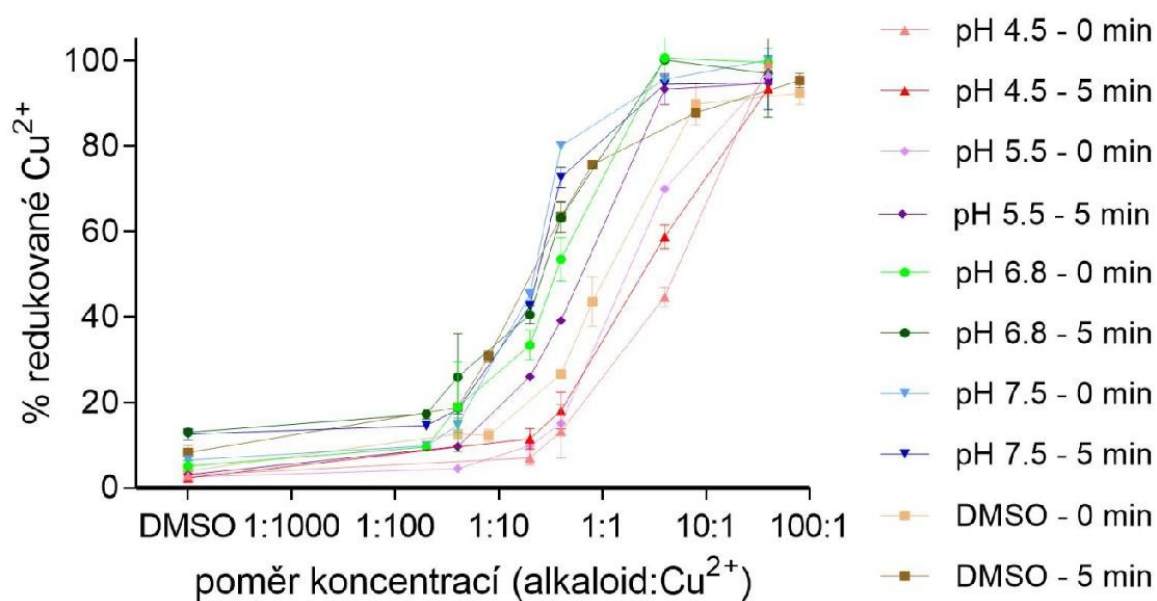
Obrázek 20 Měď-redukující účinky 8-oxoberberinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

5.3.2 Alkaloid spirobenzylisochinolinového typu

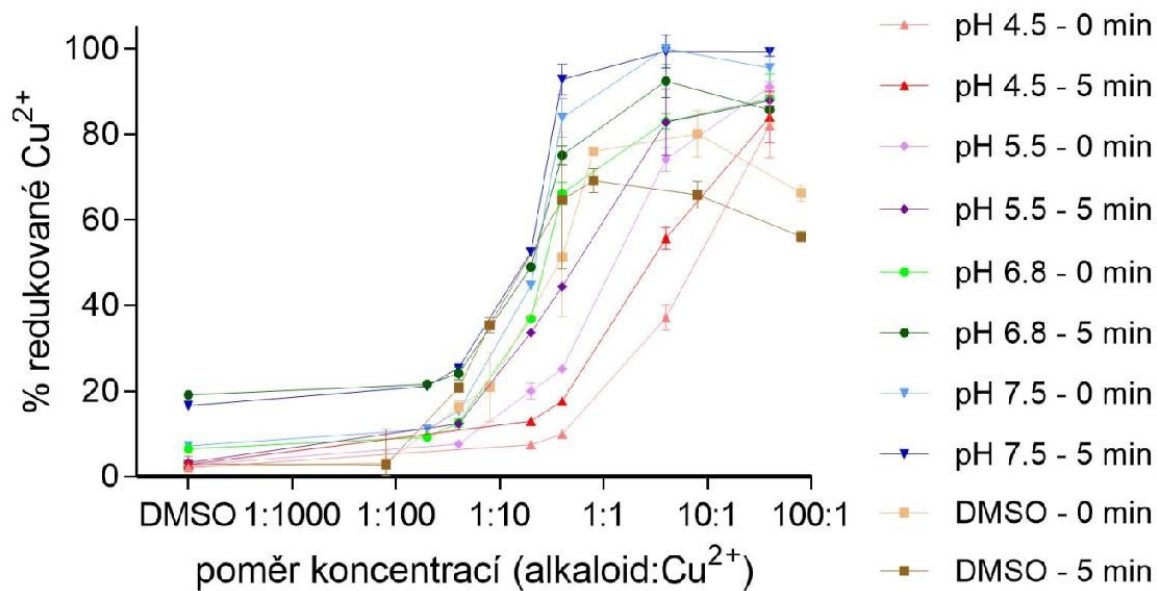


Obrázek 21 Měď-redukující účinky fumarilinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

5.3.3 Alkaloidy aporfinového typu



Obrázek 22 Měď-redukující účinky norisokorydinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



Obrázek 23 Měď-redukující účinky laurotetaninu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

6 DISKUSE

V této diplomové práci byly zkoumány alkaloidy protoberberinových, spirobenzylisochinolinového a aporfínových strukturních typů. Všechny tyto strukturní typy řadíme do skupiny alkaloidů isochinolinových.

Isochinolinové alkaloidy jsou druhou největší skupinou alkaloidů (po alkaloidech indolových), které nalezneme ve vyšších rostlinách. Tato skupina je velmi významná a mnoho alkaloidů je biologicky aktivních [78]. Isochinolinové alkaloidy jsou již řadu let testovány na katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Výzkum se zaměřuje zejména na ty, které by mohly přispět v terapii různých onemocnění.

Měď je pro lidský organismus nepostradatelná, ale při její zvýšené koncentraci v těle může docházet k neurodegenerativním poruchám jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, dále potom nádorová onemocnění či ateroskleróza [79]. Pro úspěšnou léčbu některých z těchto onemocnění je důležité studovat vlastnosti potenciálně prospěšných látek. Může se jednat například o stanovení chelatačních a měď-redukujících účinků.

Do mé diplomové práce bylo vybráno těchto 6 alkaloidů: korypalmin, thaliktikavin, 8-oxoberberin, fumarilin, norisokorydin a (+)-laurotetanin. K měření byl využit spektrofotometr, který poskytuje relativně levné, snadné a rychlé měření. Ke zjištění chelatačních účinků alkaloidů byly použity dvě kompetitivní metody s indikátory, a to hematoxylin a BCS. Oba indikátory vytváří s mědí stabilní komplexy, ovšem při jejich porovnání jsou komplexy s BCS stabilnější, lze tedy říci, že BCS je silně kompetitivní indikátor. BCS byl také aplikován ke stanovení měď-redukujících účinků alkaloidů.

6.1 Chelatační aktivita

K měření chelatační aktivity byly použity dvě metody: hematoxylinová a bathocuproinová.

V prostředích pufrů o pH 5,5; 6,8 a 7,5 reaguje hematoxylin s měďnatými ionty Cu^{2+} za vzniku modrých komplexů, které lze prokázat spektrofotometricky. U námi testovaných alkaloidů však chelatační aktivitu nevykázal žádný z nich. Vzhledem k tomu, že je hematoxylin slabě kompetitivní indikátor, lze očekávat, že by alkaloidy nevykázaly měřitelnou chelatační aktivitu ani při použití BCS jako indikátoru. Na základě předchozích prací, které se zabývaly měřením železo-chelatační aktivity alkaloidů však vyplývá, že alkaloidy, které nevykazují žádnou chelatační aktivitu v prostředích pufrů, mohou chelatační aktivitu vykazovat v prostředí

DMSO [59, 80]. Z důvodu, že nelze hematoxylin za těchto podmínek využít, byla k měření chelatačních účinků alkaloidů použita také druhá metoda: bathocuproinová.

Tato metoda využívá BCS jako vysoce specifického indikátoru, který tvoří s měďnými Cu^+ ionty komplexy při pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5. Proto může být použit pro stanovení měď-chelatační aktivity měďných Cu^+ a měďnatých Cu^{2+} iontů. Tyto Cu^{2+} ionty však musí být před vlastním stanovením redukovány pomocí HA, neboť BCS chelatuje pouze měďné Cu^+ ionty. Žádný z námi testovaných alkaloidů nevykazoval schopnost chelatace měďných ani měďnatých iontů.

Výsledky našeho měření můžeme porovnat s předchozími pracemi, které se také zabývaly měď-chelatační aktivitou alkaloidů. Alkaloidy strukturních typů protoberberinových, aporfinových, morfinanových, pavinanových a spirobenzylisochinolinových, které byly studované v těchto pracích, měď-chelatační aktivitu nevykázaly. Slabou chelatační aktivitu vůči měďnatým iontům v prostředí DMSO vykazaly pouze některé protopinové alkaloidy [58, 81].

6.2 Redukce měďnatých iontů

Volná měď se v biologických systémech nachází zejména ve formě měďnatých iontů Cu^{2+} . Tyto ionty mohou přijímat elektrony od silných redukčních činidel a redukovat se tak na měďné ionty Cu^+ . Touto redukcí tak může docházet ke vzniku reaktivního hydroxylového radikálu, který je pro organismus člověka velmi nebezpečný [54, 55]. Z tohoto důvodu bylo dalším úkolem mé diplomové práce zjistit, které alkaloidy mají schopnost redukovat měďnaté ionty Cu^{2+} na ionty měďné Cu^+ . Měď-redukující účinky alkaloidů byly měřeny *in vitro* při různých hodnotách pH (4,5; 5,5; 6,5 a 7,5) a při různých koncentracích.

Ze získaných hodnot redukčních aktivit jednotlivých alkaloidů byly sestrojeny grafy (viz Obrázek 18–Obrázek 23). Na těchto obrázcích je znázorněna měď-redukující aktivita alkaloidů při rozdílných hodnotách pH a v prostředí DMSO. Z grafů je zřejmé, že redukce mědi je závislá na čase (0 min vs. 5 min). Pro porovnání aktivity jednotlivých alkaloidů určitého strukturního typu (alkaloidy protoberberinové, spirobenzylisochinolinové a aporfinové), byly sestrojeny přímky lineární regrese s 95% konfidenčními intervaly (viz Obrázek 24–Obrázek 38). Na grafech jsou zaneseny alkaloidy, kterými se zabývá tato diplomová při jednotlivých prostředích pH (4,5; 5,5; 6,5 a 7,5) a v prostředí DMSO [58, 81].

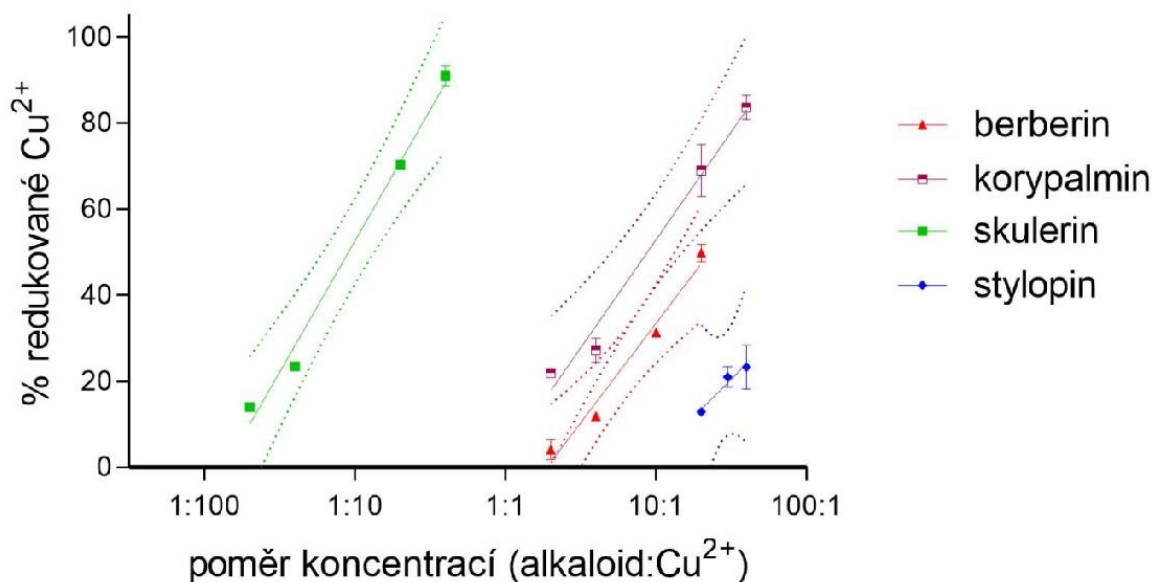
6.2.1 Alkaloidy protoberberinového typu

Přímka lineární regrese pro 8-oxoberberin nebyla vytvořena, neboť tento alkaloid tvořil při dvou nejvyšších koncentracích sraženinu. Kromě námi testovaných alkaloidů jsou na grafech zaneseny i protoberberinové alkaloidy studované v rámci jiné diplomové práce pro porovnání jejich aktivit (jedná se o berberin, skulerin, stylopin, kanadin, sinaktin a tetrahydropalmin [58]).

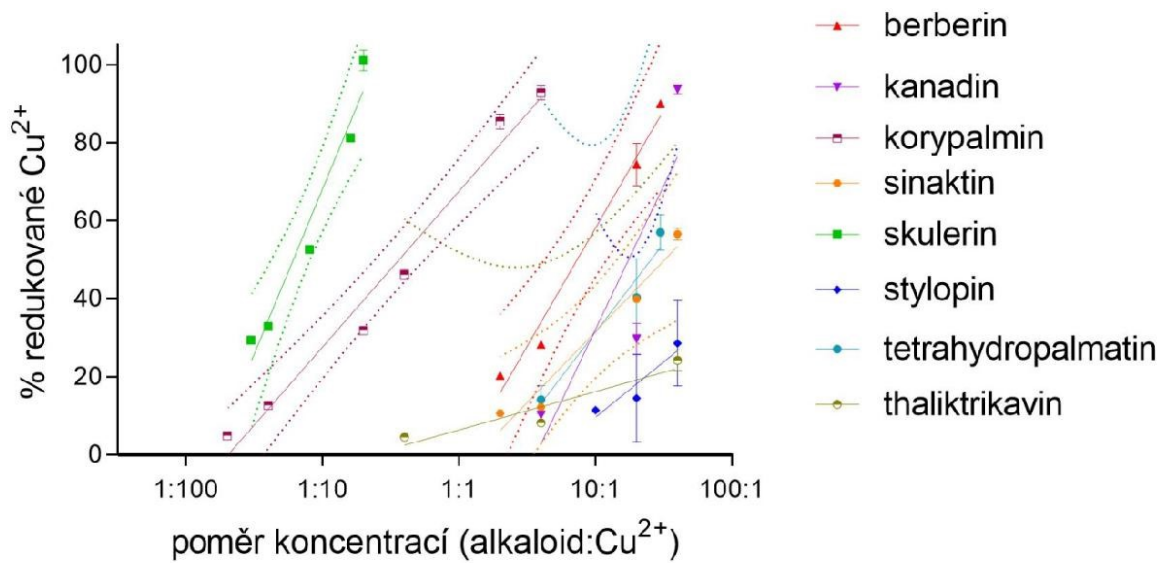
Při pH 4,5 vykázal měřitelnou aktivitu z našich alkaloidů pouze korypalmin (viz Obrázek 18). V prostředích o pH 5,5; 6,8 a 7,5 a v DMSO vykázaly aktivitu oba alkaloidy kromě již zmíněného 8-oxoberberinu (viz Obrázek 18–Obrázek 20).

Porovnáme-li aktivitu našich a dříve studovaných alkaloidů, je patrné, že je zde velký vliv počtu hydroxylových skupin ve struktuře. Jediný skulerin, který obsahuje ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny, má výrazně vyšší aktivitu než ostatní protoberberinové alkaloidy [58]. Další alkaloid, jenž má ve své struktuře hydroxylovou skupinu, je korypalmin.

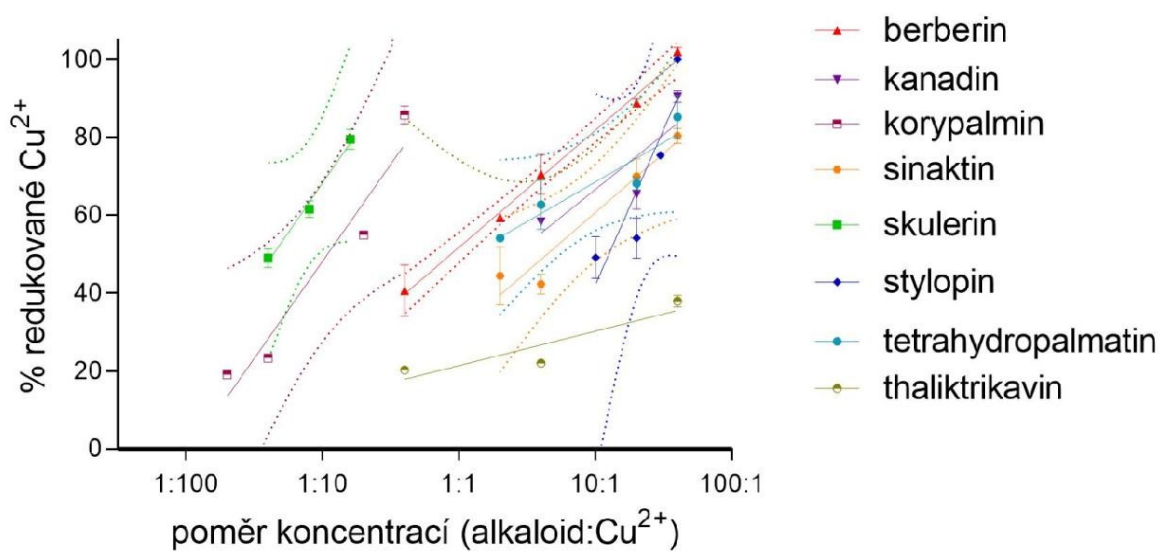
Při pH 4,5 je jeho aktivita srovnatelná s berberinem (viz Obrázek 24), při pH 5,5 a v prostředí DMSO vykazoval nižší aktivitu než skulerin, ale vyšší než ostatní alkaloidy (viz Obrázek 25 a Obrázek 28), při pH 6,8 a 7,5 je jeho aktivita srovnatelná se skulerinem (viz Obrázek 26 a Obrázek 27). Z důvodu výše uvedeného lze tedy říci, že u alkaloidů protoberberinového typu má na aktivitu vliv počet hydroxylových skupin.



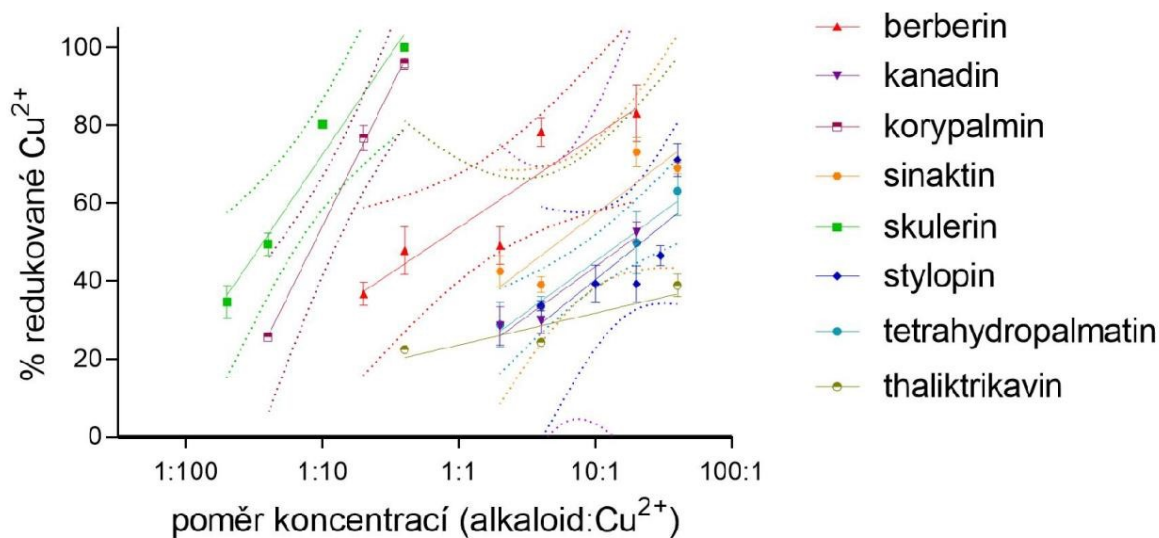
Obrázek 24 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů při pH 4,5



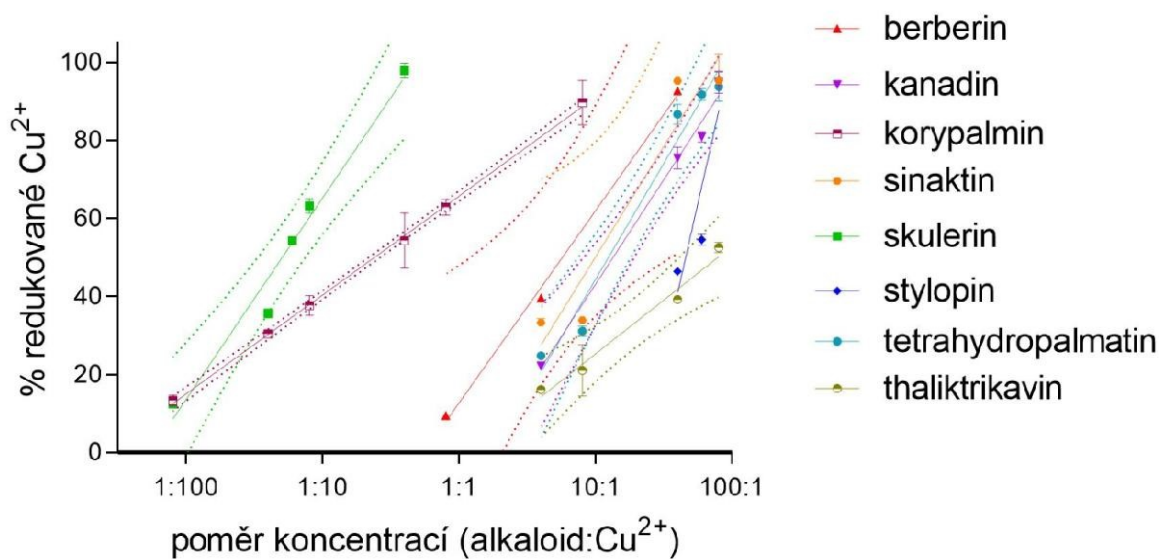
Obrázek 25 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů při pH 5,5



Obrázek 26 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů při pH 6,8



Obrázek 27 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů při pH 7,5

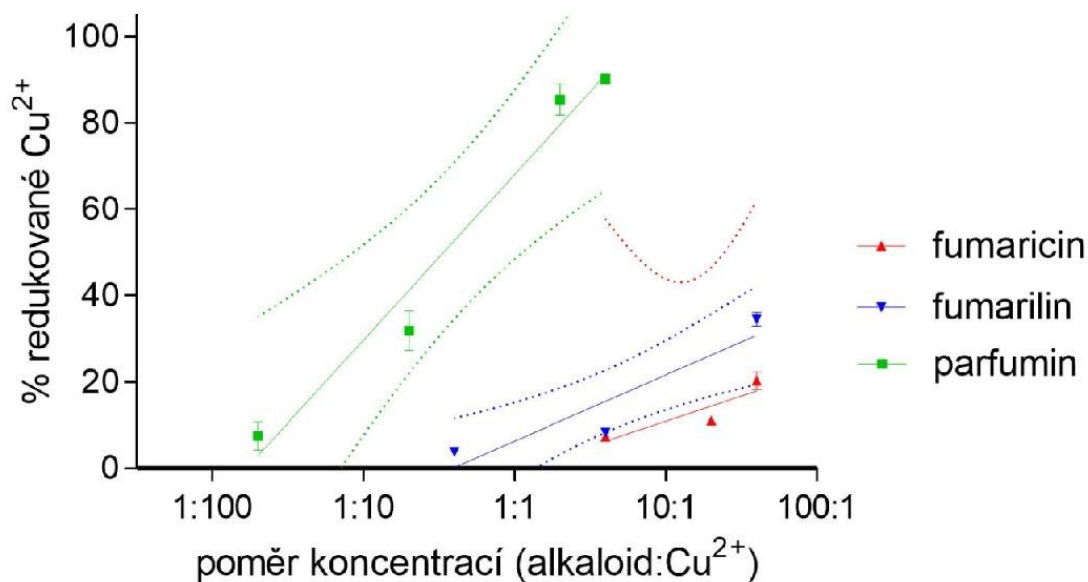


Obrázek 28 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů v prostředí DMSO

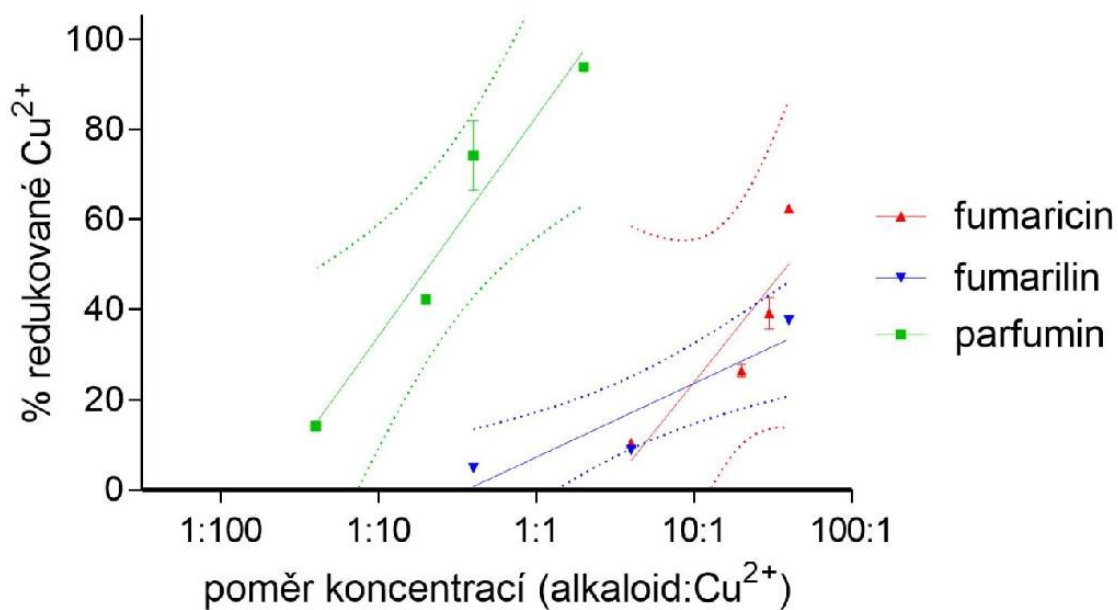
6.2.2 Alkaloidy spirobenzylisochinolinového typu

Skupina alkaloidů spirobenzylisochinolinového typu měla v našem měření pouze jednoho zástupce, a to fumarilin. Ten vykázal měřitelnou aktivitu ve všech prostředích (viz Obrázek 21). Fumarilin v porovnání se dvěma alkaloidy z předešlých prací – fumaricinem a parfuminem [81] neobsahuje ve své struktuře hydroxylovou skupinu a jeho měď-redukující

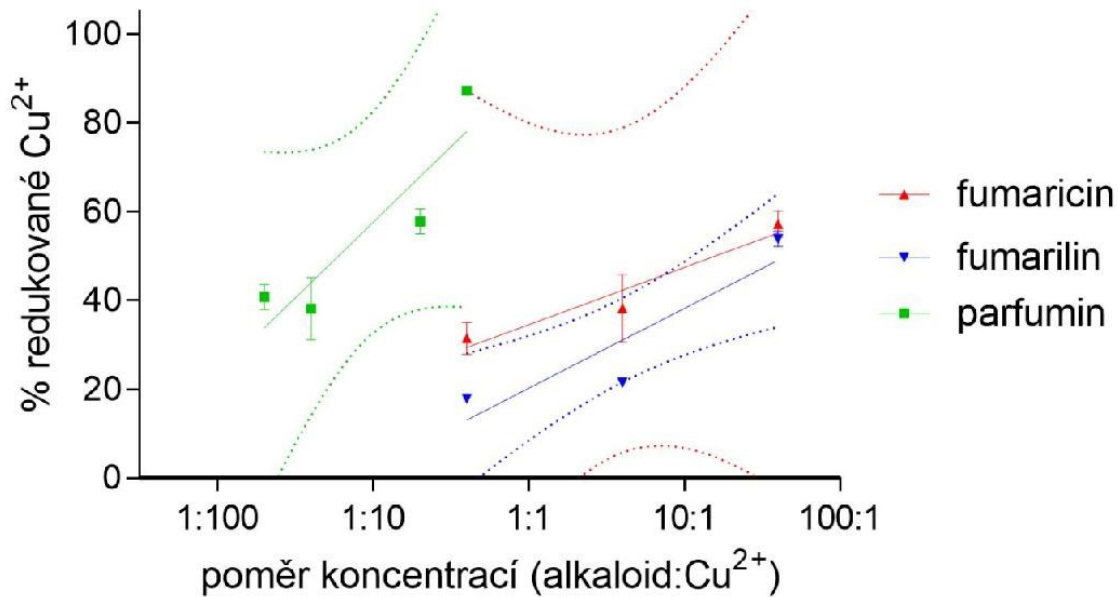
aktivita je srovnatelná s fumaricinem (viz Obrázek 29–Obrázek 33). Fumaricin i parfumin mají ve své struktuře jednu hydroxylovou skupinu, ale každý v jiné poloze. Parfumin vykázal vyšší aktivitu ve všech prostředích v porovnání s fumaricinem. Je tedy zřejmé, že na měď-redukující aktivitu látek spirobenzylisochinolinové skupiny má vliv také poloha hydroxylové skupiny [81]. Tato skutečnost byla prokázána i u jiných typů látek [82]. U parfuminu je hydroxylová skupina navázána přímo na isochinolinový skelet. U fumaricinu je hydroxylová skupina navázána na cyklopentanovém kruhu, který je na isochinolinový skelet připojen. Z výše uvedeného je tedy patrné, že alkaloidy bez hydroxylové skupiny vykazují nižší aktivitu než ty, které ji obsahují. Dále potom alkaloidy s hydroxylovou skupinou na isochinolinovém skeletu vykazují větší měřitelnou měď-redukující aktivitu v porovnání s alkaloidy, které hydroxylovou skupinu mají navázanou na jiné části molekuly [81].



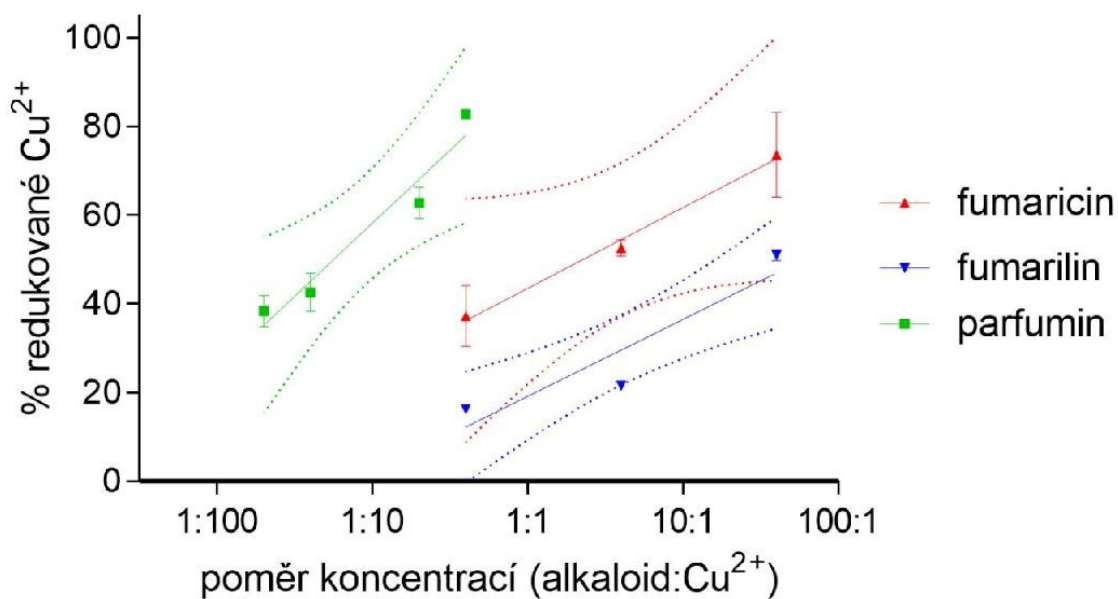
Obrázek 29 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 4,5



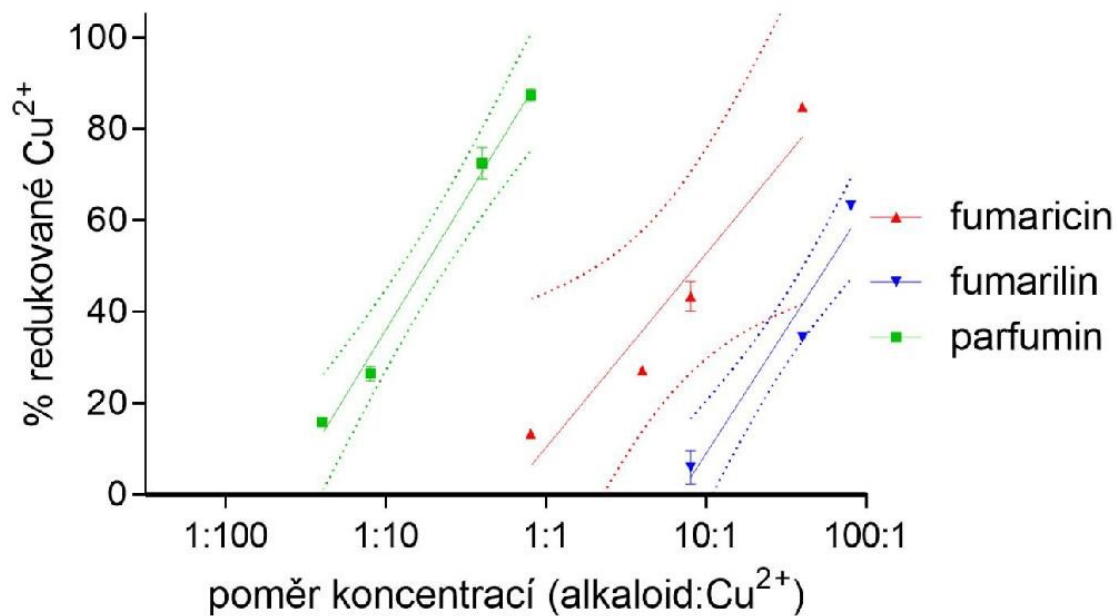
Obrázek 30 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 5,5



Obrázek 31 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 6,8



Obrázek 32 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 7,5



Obrázek 33 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů v prostředí DMSO

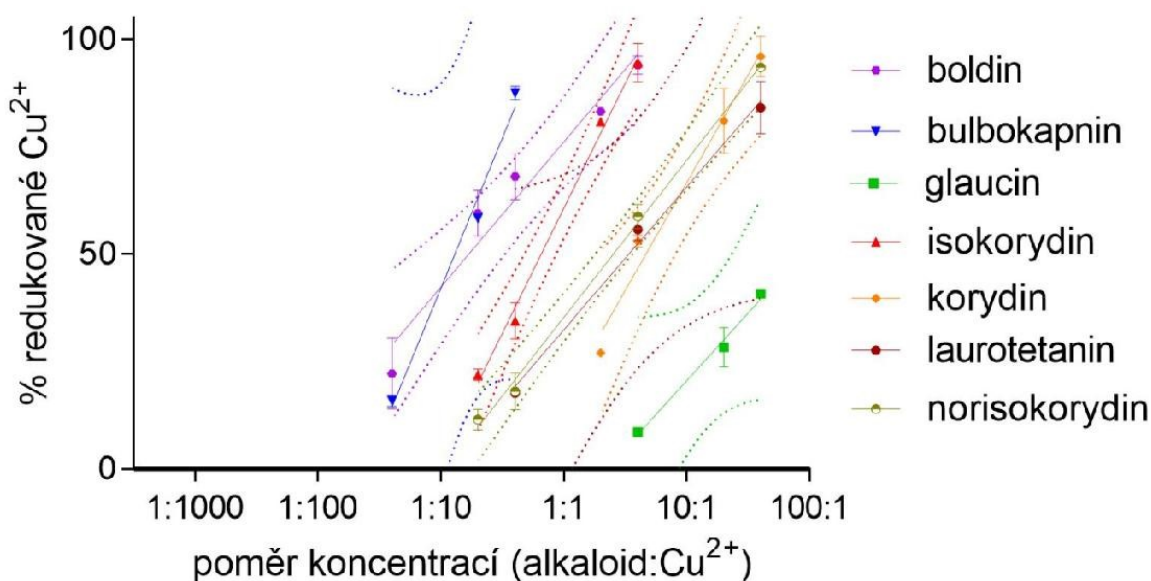
6.2.3 Alkaloidy aporfinového typu

Oba námi testované alkaloidy norisokorydin a laurotetatin vykázaly měřitelnou redukční aktivitu ve všech prostředích (viz Obrázek 22 a Obrázek 23). Jejich aktivity jsou porovnatelné, pouze v prostředí DMSO vykazoval laurotetatin o něco málo nižší aktivitu než norisokorydin.

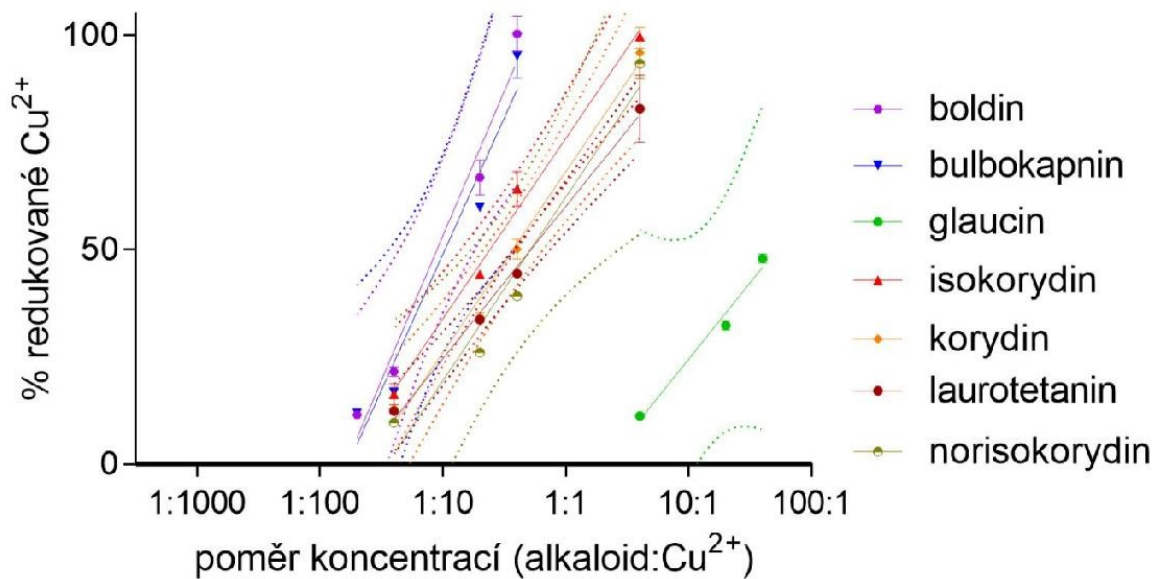
Při porovnání s ostatními alkaloidy stejného typu z předchozí studie [81] je zřejmé, že na redukující aktivitu má vliv počet hydroxylových skupin ve struktuře (viz Obrázek 34–Obrázek 38). Boldin se dvěma hydroxylovými skupinami vykázal nejvyšší aktivitu v prostředích o pH 6,8 a 7,5 (viz Obrázek 36 a Obrázek 37). V prostředích o pH 4,5 a 5,5 (viz Obrázek 34 a Obrázek 35) a v prostředí DMSO (viz Obrázek 38) vykázal měř-redukující aktivitu srovnatelnou s ostatními alkaloidy (bulbokapnin, isokorydin, korydin, laurotetatin a norisokorydin). To, že boldin vykázal nejvyšší aktivitu je nejspíše z důvodu přítomnosti dvou hydroxylových skupin v jeho struktuře.

Alkaloidy, které mají jednu hydroxylovou skupinu, vykázaly navzájem podobnou redukční aktivitu. Naopak glaucin vykázal nejnižší měřitelnou aktivitu ve všech prostředích. Tato skutečnost může být vysvětlena absencí hydroxylové skupiny v jeho struktuře [81].

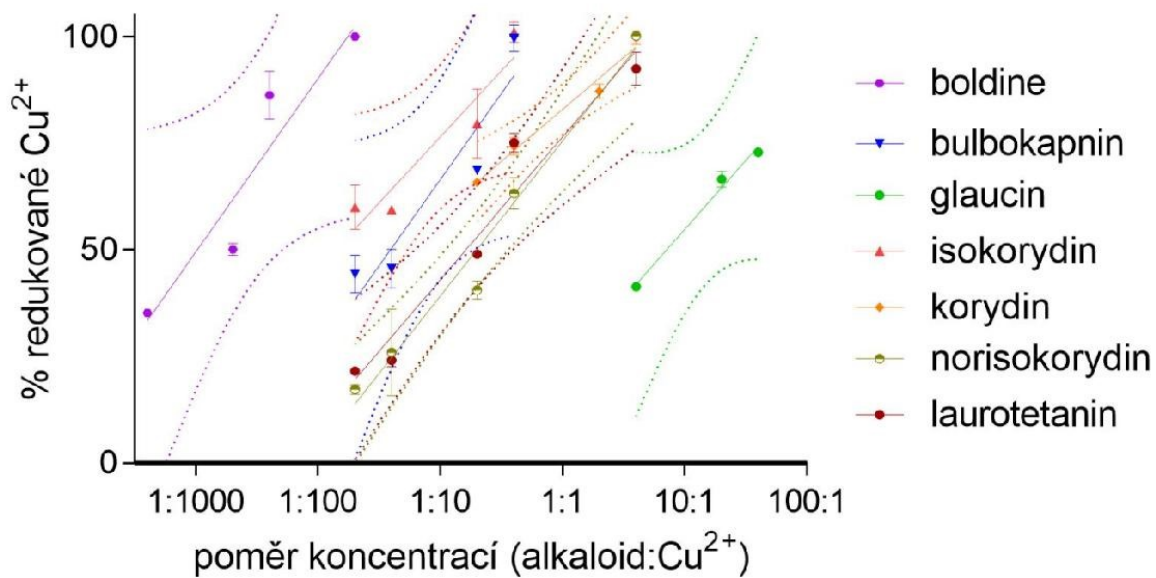
I když některé studie prokázaly, že nejen počet, ale i zároveň poloha hydroxylových skupin může mít vliv na redukční účinky látek [82], tak v tomto případě u námi porovnávaných alkaloidů aporfinového typu se zdá, že poloha hydroxylových skupin vliv na jejich redukční účinky nemá.



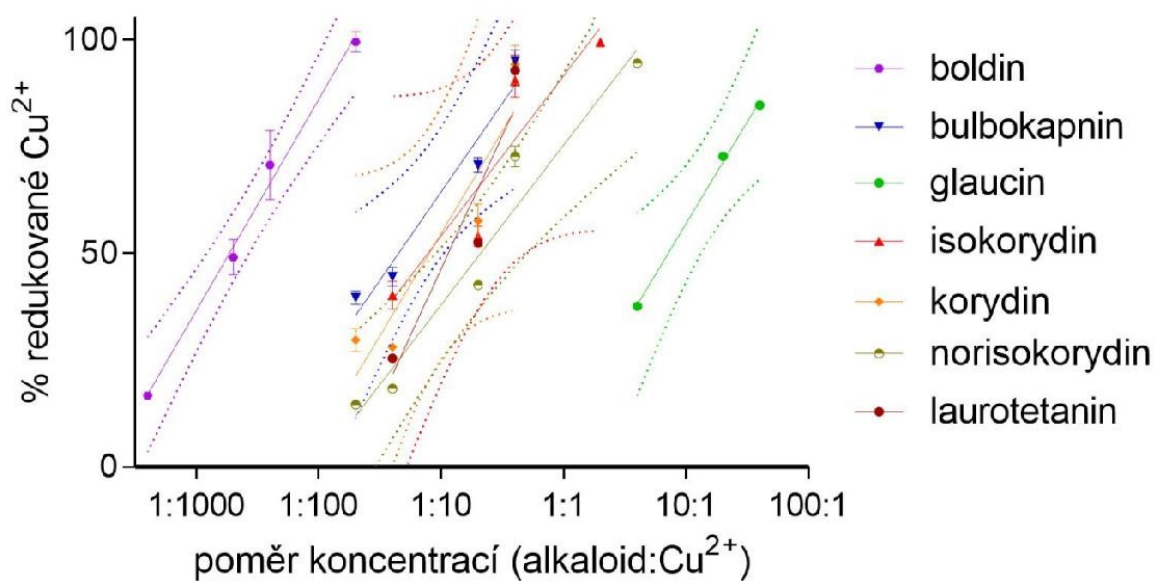
Obrázek 34 Porovnání měř-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 4,5



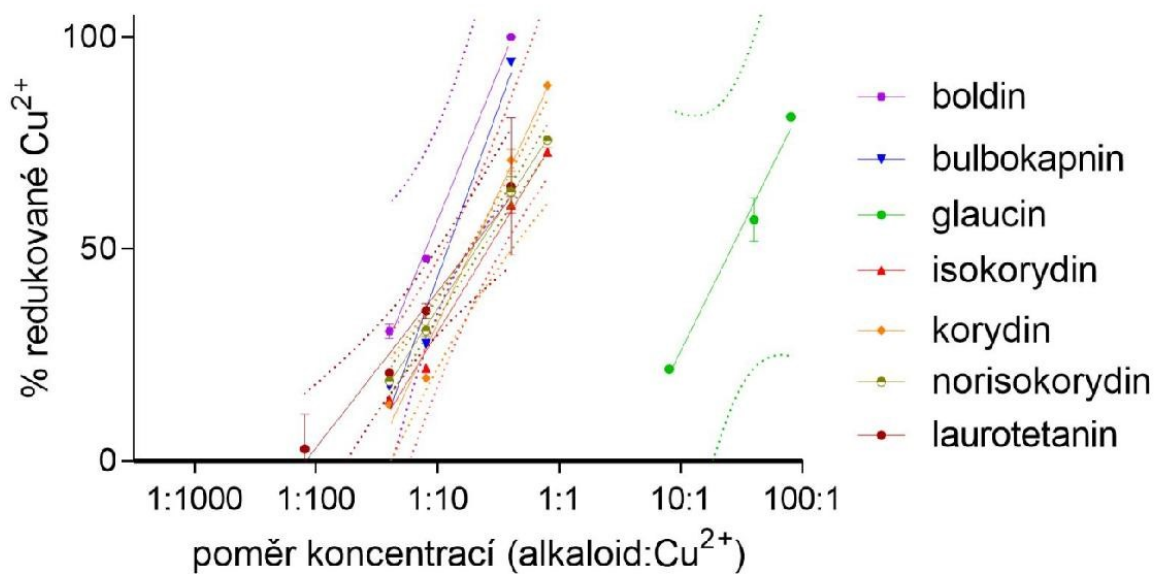
Obrázek 35 Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 5,5



Obrázek 36 Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 6,8



Obrázek 37 Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 7,5



Obrázek 38 Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů v prostředí DMSO

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo změřit chelataci měďných a měďnatých iontů a měď-redukující účinky u vybraných protoberberinových (korypalmin, thaliktikavin, 8-oxoberberin), spirobenzylisochinolinového (fumarilin) a aporfínových (norisokorydin, (+)-laurotetanin) alkaloidů při různých pH (4,5; 5,5; 6,5 a 7,5) a poté porovnat tuto aktivitu s jejich strukturou. Dále byly naše výsledky porovnány s jinými pracemi zabývající se stejným tématem a alkaloidy stejných strukturních typů.

Chelatační aktivitu nevykazoval ani jeden z námi testovaných alkaloidů. Redukční aktivita byla prokázána u všech testovaných alkaloidů. Nejnižší aktivitu vykazovaly alkaloidy, které ve své struktuře neobsahovaly žádnou hydroxylovou skupinu. Vyšší aktivita byla naměřena u alkaloidů s jednou hydroxylovou skupinou v jejich molekule. Dva alkaloidy z předešlých prací (boldin a skulerin) obsahovaly ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny a jejich měď-redukující účinky byla ze všech studovaných alkaloidů nejvyšší.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba (z angl. Alzheimer's disease)
APP	amyloidový prekurzorový protein (z angl. Amyloid Precursor Protein)
ATP7A	Gen kódující adenosintrifosfatázu typu A u Menkesovy choroby
ATP7B	Gen kódující adenosintrifosfatázu typu B u Menkesovy choroby
ATOX1	antioxidační chaperon mědi (z angl. Antioxidant 1 Copper Chaperone)
BCS	disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
CCS	chaperon mědi pro superoxid dismutázu (z angl. human Copper Chaperone for Superoxid dismutase)
CNS	centrální nervový systém (z angl. Central Nervous System)
COX17	chaperon mědi pro cytochrom c-oxidázu COX17 (z angl. Cytochrome c Oxidase copper chaperone COX17)
CTR1	transportní protein (z angl. Copper Transporter 1)
DMSO	dimethylsulfoxid
GIT	gastrointestinální trakt
HA	hydroxylamin hydrochlorid
HEM	hematoxylin
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina)
MD	Menkesovo onemocnění (z angl. Menkes disease)
OHS	syndrom occipital horn
PD	Parkinsonova choroba (z angl. Parkinson's disease)
pH	potential of hydrogen (potenciál vodíku)
PTP 1B	Protein Tyrosine Phosphatase 1B
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SOD	superoxiddismutáza
WD	Wilsonova choroba (z angl. Wilson's disease)

9 POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

- [1] Trojan S.: *Lékařská fyziologie*, str. 398–399. Grada, Praha 2003.
- [2] Sharma S., Pospíšilová H., Česká asociace sester: *Klinická výživa a dietologie v kostce*, str. 52. Grada, Praha 2018.
- [3] Zima T.: *Laboratorní diagnostika*, str. 407. Galén, Praha 2013.
- [4] Masopust J., Průša R.: *Patobiochemie metabolických drah*, str. 178. Univerzita Karlova, Praha 1999.
- [5] Gaetke L. M., Chow-Johnson H. S., Chow C. K.: Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Archives of toxicology* 88(11), 1929–1938. (2014)
- [6] Prvky.com: <http://www.prvky.com/29.html>, staženo 8. 10. 2019
- [7] Committee on copper in drinking water, National Research Council: *Copper in drinking water*. str. 11. The National Academies Press, Washington, DC 2000.
- [8] Royal Society of Chemistry: <https://www.rsc.org/periodic-table/element/29/copper>, staženo 9.10.2019
- [9] Šrámek V.: *Obecná a anorganická chemie*, str. 183–184. Nakladatelství Olomouc, Olomouc 2000.
- [10] Kaneshiro B., Aeby T.: Long-term safety, efficacy, and patient acceptability of the intrauterine Copper T-380A contraceptive device. *International Journal of Women's Health* 2, 211–220 (2010).
- [11] Bost M., Houdart S., Oberli M., Kalonji E., Huneau J. F., Margaritis I.: Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 35, 107–115 (2016).
- [12] Tomandl J.: *Základy lékařské chemie a biochemie*, str. 88. Masarykova univerzita, Brno 2014.
- [13] Vetchý D., Pavelková M., Vysloužil J., Kubová K.: Biological role of copper as an essential trace element in the human organism. *Česká a slovenská Farmacie: časopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti* 67(4), 143–153 (2018).

- [14] Univerzita Karlova: <https://elius.lfp.cuni.cz>, staženo 9. 10. 2019
- [15] Linder M. C., Wooten L., Cerveza P., Cotton S., Shulze R., Lomeli N.: Copper transport. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67(5), 965S–971S (1998).
- [16] De Bie P., Muller P., Wijmenga C. Klomp L. W. J.: Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *Journal of Medical Genetics* 44(11), 673–688 (2007).
- [17] Novák F.: *Úvod do klinické biochemie*, str. 128. Karolinum, Praha 2002.
- [18] Racek J.: *Klinická biochemie*, str. 70, 137. Galén, Praha 2006.
- [19] Dastyh M., Breinek P.: *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*, str. 119, 121, 129, 175. Masarykova Univerzita, Brno 2015.
- [20] Hordyjewska A., Popiolek L., Kocot J.: The many “faces” of copper in medicine and treatment. *Biometals* 27(4), 611–621 (2014).
- [21] Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.: *Biochemie pro studující medicíny 1. díl*, str. 75. Karolinum, Praha 2009.
- [22] Srinivasan S., Avadhani N.: Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 53(6), 1252–1263 (2012).
- [23] Perry J. J. P., Shin D. S., Getzoff E. D., Tainer J. A.: The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et biophysica acta* 1804(2), 245–262 (2010).
- [24] Miller A. F.: Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS letters* 586(5), 585–595 (2012).
- [25] Mondola P., Damiano S., Sasso A., Santillo M.: The Cu, Zn superoxide dismutase: Not only a dismutase enzyme. *Frontiers in Physiology* 7, (2019).
- [26] Racek J., Holeček V.: Enzymy a volné radikály. *Chemické listy* 93(12), 774–780 (1999).
- [27] Silbernagl S., Lang F.: *Atlas patofyziologie*, str. 272. Grada, Praha 2012.
- [28] Turnlund J. R.: Human whole-body copper metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67(5 Suppl), 960S–964S (1998).
- [29] Collins J. F., Prohaska J. R., Knutson M. D.: Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition reviews* 68(3), 133–147 (2010).

- [30] Human pathology: <https://www.humpath.com/spip.php?article410>, staženo 2. 11. 2019
- [31] Fišar Z.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*, str. 299–302. Grada, Praha 2009.
- [32] Zvěřová M.: *Alzheimerova demence*, str. 16, 23, 28. Grada, Praha 2017.
- [33] Jirák R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi* 9(4), 240–244 (2008).
- [34] Mayeux R., Stern Y.: Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(8), a006239 (2012).
- [35] Bagheri S., Squitti R., Haertlé T., Siotto M., Saboury A. A.: Role of copper in the onset of Alzheimer’s disease compared to other metals. *Frontiers in Aging Neuroscience* 9, 1–18 (2018).
- [36] Bártová P.: Parkinsonský syndrom a extrapyramidové projevy u neurodegenerativních onemocnění vázaných na poruchy metabolismu železa. *Neurologie pro praxi* 13(3), 140–145 (2012).
- [37] Bandmann O., Weiss K. H., Kaler S. G.: Wilson’s disease and other neurological copper disorders. *The Lancet Neurology* 14(1), 103–113 (2015).
- [38] Bertini I., Rosato A.: Menkes disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(1), 89 (2007).
- [39] Ojha R., Prasad A. N.: Menkes disease: What a multidisciplinary approach can do. *Journal of Multidisciplinary Healthcare* 9, 371–385 (2016).
- [40] Tümer Z., Möller L. B.: Menkes disease. *European Journal of Human Genetics* 18(5), 511–518 (2010).
- [41] Dickson D. W.: Parkinson’s disease and parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(8), a009258 (2012).
- [42] Kouli A., Torsney K. M., Kuan W.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536722/>, staženo 22. 10. 2019
- [43] Demaagd G., Philip A.: Parkinson’s disease and its management. *Pharmacy and Therapeutics* 40(8), 504–532 (2015).

- [44] Rivera-Mancía S., Pérez-Neri I., Ríos C., Tristán-López L., Rivera-Espinosa L., Montes S.: The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions* 186(2), 184–199 (2010).
- [45] Beránek M., Tichý M.: *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika*, str. 77. Karolinum, Praha 2013.
- [46] Wu F., Wang J., Pu Ch., Qiao L., Jiang Ch.: Wilson's disease: A comprehensive review of the molecular mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 16(3), 6419–6431 (2015).
- [47] Chaudhry H. S., Anilkumar A. C.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441990/>, staženo 17. 10. 2019
- [48] Bureš J., Horáček J.: *Základy vnitřního lékařství, 2. díl*, str. 980. Galén, Karolinum, Praha 2003.
- [49] Flora S. J. S., Pachauri V.: Chelation in metal intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7(7), 2745–2788 (2010).
- [50] Chelation therapy - medical clinical policy bulletins Aetna: http://www.aetna.com/cpb/medical/data/200_299/0234.html, staženo 1. 11. 2019
- [51] Říha M., Karličková J., Filipický T., Macáková K., Rocha L., Bovicelli P., Proietti Silvestri I., Saso L., Jahodář L., Hrdina R., Mladěnka P.: In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advances* 4(62), 32628–32638 (2014).
- [52] Lawson M. K., Valko M., Cronin M. T. D., Jomová K.: Chelators in iron and copper toxicity. *Current Pharmacology Reports* 2(6), 271–280 (2016).
- [53] Říha M., Karličková J., Filipický T., Macáková K., Hrdina R., Mladěnka P.: Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 123, 80–87 (2013).
- [54] Arredondo M., Núñez M. T.: Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* 26(4), 313–327 (2005).
- [55] Pláteník J.: Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi* 11(1), 30–33 (2009).

- [56] Pham A. N., Xing G., Miller Ch. J., Waite T. D.: Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of Catalysis* 301, 54–64 (2013).
- [57] Cahlíková L., Hulová L., Hrabínová M., Chlebek J., Hošťálková A., Adamcová M., Šafratová M., Jun D., Opletal L., Ločárek M., Macáková K.: Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia* 103, 192–196 (2015).
- [58] Šilhová M.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2019
- [59] Rudolfová T.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2013
- [60] Grycová L., Dostál J., Marek R.: Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry* 68(2), 150–175 (2007).
- [61] Kostelník J.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2014
- [62] Cordell G. A.: <https://www.elsevier.com/books/the-alkaloids/cordell/978-0-12-469562-7>, staženo 18. 12. 2019
- [63] NCATS Inxight: <https://drugs.ncats.io/drug/28R31624GX>, staženo 27. 11. 2019
- [64] Maurya S., Srivastava J. S., Jha R. N., Pandey V. B., Singh U. P.: Efficacy of alkaloid (–)-corypalmine against spore germination of some fungi. *Folia Microbiologica* 47(3), 287–290 (2002).
- [65] Chlebek J., Korábečný J., Doležal R., Štěpánková Š., Pérez D. I., Hošťálková A., Opletal L., Cahlíková L., Macáková K., Kučera T., Hrabínová M., Jun D.: In vitro and in silico acetylcholinesterase inhibitory activity of thalictricavine and canadine and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *Molecules* 24(7), E1340 (2019).
- [66] Ali S., Igoli J. O., Clements C., Semaan D., Almazeb M., Rashid M. U., Shah S. Q., Ferro V. A., Gray A. I., Khan M. R.: Antidiabetic and antimicrobial activities of fractions and compounds isolated from *Berberis brevissima* Jafri and *Berberis parkeriana* Schneid. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 8, 336–342 (2013).
- [67] Hošťálková A.: Disertační práce. Univerzita Karlova, Praha, 2015
- [68] Malý L.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2014.
- [69] Šafratová M.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2013

- [70] Manske R. H. F., Rodrigo R. G. A., Brossi A., Cordell G. A.: <https://books.google.cz/books?id=BkDyhc-RrKkC>, staženo 16. 12. 2019
- [71] Azimova S. S., Yunusov M. S.: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-1-4614-0560-3_1458, staženo 11. 2. 2020
- [72] Ge Y., Wang K. W.: New analogues of aporphine alkaloids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 18, 1590–1602 (2018).
- [73] Bentley K. W.: β -Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports* 20(3), 342–365 (2003).
- [74] Zahari A., Ablat A., Omer N., Nafiah M., Sivasothy Y., Mohamad J., Khan M. N., Awang K.: Ultraviolet-visible study on acid-base equilibria of aporphine alkaloids with antiplasmodial and antioxidant activities from *Alseodaphne corneri* and *Dehaasia longipedicellata*. *Scientific Reports* 6, 21517 (2016).
- [75] Xinxin X., Wang H.: Anti-asthmatic effect of laurotetanine extracted from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. root on ovalbumin-induced allergic asthma rats, and elucidation of its mechanism of action. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 18(6), 1277–1283 (2019).
- [76] Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis Cava* (Fumariaceae). *Natural product communications* 6, 607–10 (2011).
- [77] Chlebek J., Novák Z., Kassemová D., Šafratová M., Kostelník J., Malý L., Ločárek M., Opletal L., Hošťálková A., Hrabínová M., Kuneš J., Novotná P., Urbanová M., Nováková L., Macáková K., Hulcová D., Solich P., Perez C., Jun D., Cahlíková L.: Isoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and their biological activities related to Alzheimer's disease. *Chemistry & Biodiversity* 13, 91–99 (2016).
- [78] Hošťálková A., Siatka T., Chlebek J., Opletal L., Drašar P., Cahlíková L.: Boldine alkaloids and prospects of their utilization. *Chemické Listy* 109, 846–855 (2015).
- [79] Abiodun O. O., Adewale A., Olubukola S. O.: Free radicals as mediators of oxidative damage and disease. *Journal Of Pharmacy And Biological Sciences* 14(2), 57–64 (2019).

- [80] Dočekalová L.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2016
- [81] Rzepecká R.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2019
- [82] Karlíčková J., Macáková K. Říha M., Pinheiro L. M. T., Filipický T., Horňasová V., Hrdina R., Mladěnka P.: Isoflavones reduce copper with minimal impact on iron in vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015, 437381 (2015).

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Metabolismus mědi, převzato [13]	16
Obrázek 2 Abnormální vzhled vlasů u pacienta s MD, převzato [39]	19
Obrázek 3 Vzorec korypalminu	25
Obrázek 4 Vzorec thaliktrikavinu	25
Obrázek 5 Vzorec 8-oxoberberinu	26
Obrázek 6 Vzorec fumarilinu.....	27
Obrázek 7 Vzorec norisokorydinu	28
Obrázek 8 Vzorec (+)-laurotetaninu.....	28
Obrázek 9 Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci měďnatých iontů	33
Obrázek 10 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem	35
Obrázek 11 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^{2+} iontů v pufru.....	36
Obrázek 12 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^{+} iontů v pufru.....	37
Obrázek 13 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^{2+} iontů v DMSO	38
Obrázek 14 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^{+} iontů v DMSO	39
Obrázek 15 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Cu^{2+} iontů v pufru.....	40
Obrázek 16 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Cu^{2+} iontů v DMSO	42
Obrázek 17 Kalibrační křivka	43
Obrázek 18 Měď-redukující účinky korypalminu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	45
Obrázek 19 Měď-redukující účinky thaliktrikavinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	45
Obrázek 20 Měď-redukující účinky 8-oxoberberinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	46
Obrázek 21 Měď-redukující účinky fumarilinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	46
Obrázek 22 Měď-redukující účinky norisokorydinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	47
Obrázek 23 Měď-redukující účinky laurotetaninu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	47
Obrázek 24 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů při pH 4,5	50
Obrázek 25 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů při pH 5,5	51

Obrázek 26 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů při pH 6,8	51
Obrázek 27 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů při pH 7,5	52
Obrázek 28 Porovnání měď-redukující aktivity protoberberinových alkaloidů v prostředí DMSO.....	52
Obrázek 29 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 4,5	53
Obrázek 30 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 5,5	54
Obrázek 31 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 6,8	54
Obrázek 32 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 7,5	55
Obrázek 33 Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů v prostředí DMSO	55
Obrázek 34 Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 4,5	56
Obrázek 35 Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 5,5	57
Obrázek 36 Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 6,8	57
Obrázek 37 Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 7,5	58
Obrázek 38 Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů v prostředí DMSO ..	58

11 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Obsah mědi ve vybraných potravinách, převzato [11]	11
Tabulka 2 Funkce enzymů závislých na mědi, převzato [16].....	13
Tabulka 3 Naměřené hodnoty absorbancí potřebné pro sestavení kalibrační křivky.....	43

12 SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Fentonova reakce se železem [19].....	13
Rovnice 2 Mechanismus působení superoxiddismutázy	15
Rovnice 3 Fentonova reakce s mědí [56]	23

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Bc. Lenka Loskotová

Školitel: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce alkaloidů s přechodnými kovy IV.

Měď je biogenní stopový prvek, který se podílí na správné funkci organismu. Je součástí řady enzymů a podílí se na metabolických procesech v lidském těle. Hladina mědi v organismu by měla být regulována, aby nedocházelo jejímu nadbytku či deficitu, neboť by mohlo docházet ke vzniku patologických stavů.

Alkaloidy jsou přírodní dusíkaté látky zásaditého charakteru. Nalézáme u nich mnohé biologické aktivity. Cílem této diplomové práce bylo proměřit měď-chelatační a měď-redukující aktivitu isochinolinových alkaloidů: korypalminu, thaliktikavinu, 8-oxoberberinu, fumarilinu, norisokorydinu a laurotetaninu. Aktivita alkaloidů byla měřena při různých pH prostředí (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) a v prostředí DMSO spektrofotometrickou metodou za použití hematoxylinu a disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Na základě výsledků byly odvozeny vztahy mezi strukturou a účinkem.

Při experimentálním měření bylo zjištěno, že žádný z námi testovaných alkaloidů nevykázal chelatační aktivitu. Redukční aktivita byla prokázána u všech testovaných látek. Nejnižší aktivita byla prokázána u alkaloidů, které ve své struktuře neobsahovaly žádnou hydroxylovou skupinu (thaliktikavin, 8-oxoberberin a fumarilin). Alkaloidy s jednou hydroxylovou skupinou vykazovaly aktivitu vyšší (korypalmin, norisokorydin a laurotetanin). Ze vztahu mezi strukturou a aktivitou vyplývá, že měď-redukující aktivita roste se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin ve struktuře alkaloidu.

Klíčová slova: měď, chelatace, redukce, isochinolinové alkaloidy

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Bc. Lenka Loskotová

Supervisor: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Title of Thesis: Interactions of alkaloids with transition metals IV.

Copper is a biogenic trace element that participates in the proper function of an organism. It is part of a number of enzymes and participates in metabolic processes in the human body. The level of copper in the organism should be regulated to avoid its excess or deficit, as pathologies could occur.

Alkaloids are natural nitrogenous substances of alkaline nature. We find many biological activities in them. The aim of this thesis was to measure copper-chelating and copper-reducing activity of isoquinoline alkaloids: corypalmine, thalictricavine, 8-oxoberberine, fumarilin, norisocorydine and laurotetanine. Alkaloid activity was measured at different pH environments (4.5; 5.5; 6.8 and 7.5) and in the DMSO environment by a spectrophotometric method using hematoxyline and acid disodium salt bathocuproindisulfonic. Based on the results, structure-effect relationships were derived.

In experimental measurement, it was found that none of us tested alkaloids showed chelating activity. Reduction activity has been demonstrated in all test substances. The lowest activity was demonstrated in alkaloids, which contained no hydroxyl group in their structure (thalictricavine, 8-oxoberberine, and fumariline). Alkaloids with one hydroxyl group showed activity higher (corypalmine, norisocorydine, and laurotetanine). It follows from the structure-activity relationship that copper-reducing activity increases with increasing number of hydroxyl groups in the alkaloid structure.

Keywords: copper, chelation, reduction, isoquinoline alkaloids