

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

MOHOU BÝT ESENCIÁLNÍ AMINOKYSELINY POVAŽOVÁNY ZA CHELÁTORY MĚDI?

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

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

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



DIPLOMA THESIS

**CAN ESSENTIAL AMINO ACIDS BE CONSIDERED
AS COPPER CHELATORS?**

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.
Head of Department: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

PODĚKOVÁNÍ

Velké poděkování patří mé školitelce PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D., a to jak za odborné vedení diplomové práce, tak za cenné rady a materiály, které mi při zpracování této práce poskytla, a především za pomoc a čas, který mi věnovala.

Taktéž děkuji Katedře farmaceutické botaniky za poskytnutí laboratoře a laboratorního vybavení potřebného pro experimentální měření. Dále bych chtěla poděkovat prof. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za cenné rady a Mgr. Václavu Tvrdému, který se podílel na zpracování výsledků měření.

Tato diplomová práce byla vytvořena za využití přístrojů v rámci projektu OPVVV 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.

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.“

V Hradci Králové, 12. května 2021

.....
Nikola Holotíková

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1 ÚVOD.....	9
2 CÍL PRÁCE	10
3 TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 MĚĎ.....	11
3.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti mědi	11
3.1.2 Fyziologická funkce mědi	11
3.1.3 Zdroje a příjem mědi.....	12
3.1.4 Homeostáza mědi a její regulace.....	13
3.1.5 Vrozené poruchy homeostázy mědi	15
3.1.6 Důsledky narušení homeostázy mědi	19
3.2 CHELATAČE MĚDI	21
3.2.1 Principy chelatace	21
3.2.2 Chelátory mědi.....	22
3.3 REDUKCE MĚDI.....	23
3.3.1 Fentonova reakce	23
3.4 AMINOKYSELINY.....	23
3.4.1 Chemické a fyzikální vlastnosti aminokyselin	24
3.4.2 Rozdělení základních aminokyselin	26
3.4.3 Fyziologická funkce aminokyselin.....	30
3.4.4 Aminokyselinový pool.....	31
3.4.5 Vztah aminokyselin k mědi	33
3.4.6 Testované látky	34
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
4.1 MATERIÁL.....	36
4.2 VYUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE	36
4.3 POUŽÍVANÉ CHEMIKÁLIE	36
4.3.1 Chemikálie používané pro měření s ionty mědi	36

4.3.2	Chemikálie používané pro přípravu pufrů	36
4.4	TESTOVANÉ LÁTKY	37
4.5	POUŽÍVANÉ PROGRAMY A STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	37
4.6	METODIKA PRO MĚŘENÍ S IONTY MĚDI	38
4.6.1	Příprava základních a pracovních roztoků	38
4.6.2	Kontrolní zkouška základních roztoků iontů mědi.....	39
4.6.3	Kalibrace měďnatých iontů.....	39
4.6.4	Stanovení chelatace měďnatých iontů hematoxylinem	41
4.6.5	Stanovení chelatace měďnatých iontů pomocí BCS	42
4.6.6	Stanovení chelatace měďných iontů pomocí BCS	43
4.6.7	Stanovení redukce měďnatých iontů pomocí BCS.....	44
5	VÝSLEDKY	45
5.1	KALIBRAČNÍ KŘIVKA MĚĎNATÝCH IONTŮ.....	45
5.2	CHELATAČNÍ AKTIVITA TESTOVANÝCH LÁTEK	46
5.2.1	Chelatace měďnatých iontů – metoda s hematoxylinem.....	46
5.2.2	Chelatace měďnatých a měďných iontů – metoda s BCS.....	53
5.3	REDUKČNÍ AKTIVITA TESTOVANÝCH LÁTEK	56
5.3.1	Redukce měďnatých iontů – metoda s BCS.....	56
6	DISKUZE.....	65
7	ZÁVĚR.....	69
8	LITERATURA	70
9	ABSTRAKT.....	74
10	ABSTRACT.....	75

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
AMK	Aminokyseliny
ATOX1	Antioxidant 1 Copper Chaperone, antioxidační chaperon mědi
ATP7A	ATPasa transportující měď 1
ATP7B	ATPasa transportující měď 2
BCS	Disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny
CCS	Chaperon mědi pro SOD
COX	Cytochrom c oxidasa
COX17	Chaperon mědi pro COX
CP	Ceruloplazmin
CTR1	Copper Transporter 1, transportér mědi 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	Divalent Metal Transporter, transportér dvojmocných kovů
DOPA	Dihydroxyfenylalanin
D-PEN	D-penicilamin
DβH	Dopamin β-hydroxylasa
GABA	γ-aminomáselná kyselina
GSH/GSSG	Glutathion v redukované/oxidované formě
HA	Hydroxylamin hydrochlorid
HEM	Hematoxylin
IL-2	Interleukin 2
LOX	Lysyloxidasa
MAO	Monoaminoxidasa
MD	Menkesova choroba
mRNA	Mediátorová ribonukleotidová kyselina
MT	Metalothioneiny
NAC	N-acetylcystein
OHS	Occipital Horn Syndrome, syndrom týlního rohu

PAM	Peptidyl-glycin α -amidující monooxygenasa
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SAM	S-adenosylmethionin
SOD	Superoxiddismutasa
TYR	Tyrosinasa
WD	Wilsonova choroba

1 ÚVOD

Měď patří mezi stopové prvky. Je nepostradatelná pro embryogenezi a buněčnou proliferaci všech eukaryot. Její funkce spočívá především ve schopnosti přeměňovat se mezi dvěma oxidačními stavy, měďným a měďnatým.

Na druhou stranu, nadbytek nebo dysregulace mědi v organismu může vést ke katalýze Fentonovy reakce za vzniku volných radikálů, které způsobují poškození různých buněčných struktur. Kromě vrozených poruch, jako je Wilsonova a Menkesova choroba, narušení homeostázy mědi pravděpodobně hraje roli u patologických stavů, mezi které patří neurodegenerativní onemocnění, nádory, záněty a akutní infarkt myokardu. Proto je udržování buněčné homeostázy mědi životně důležité.

Chelatace mědi je potenciálním terapeutickým nástrojem u patologických stavů spojených s přebytkem nebo dysregulací mědi. V současnosti se klinicky chelátory mědi používají pouze k léčbě Wilsonovy choroby. V tomto případě chelátory vytváří komplexy s nahromaděnými ionty mědi a zvyšují jejich vylučování z organismu. U Menkesovy choroby je třeba, aby chelátory podporovaly dodávání mědi do deficitních tkání, obzvláště do mozku.

Chelátory mědi určené pro léčbu by měly ideálně napodobovat chelátory, které se v organismu přirozeně vyskytují. Jejich funkce spočívá ve schopnosti měď chelatovat a transportovat, čímž se podílí na regulaci homeostázy mědi. Patří mezi ně metalothioneiny, chaperony, glutathion a jiné transportéry mědi, jejichž strukturu tvoří aminokyseliny propojené peptidovými vazbami. Z tohoto důvodu je tato diplomová práce zaměřena na schopnost vybraných aminokyselin chelatovat ionty mědi. Zároveň bylo třeba zjistit i jejich měď-redukující aktivitu spojenou s prooxidačními účinky.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda mohou být esenciální aminokyseliny považovány za chelátory mědi. Za pomoci spektrofotometru bylo provedeno *in vitro* stanovení měď-chelatační a měď-redukující aktivity vybraných aminokyselin (L-histidinu, L-methioninu, L-cysteinu, L-cystinu, L-asparagové kyseliny a L-glutamové kyseliny,) a látky odvozené od L-cysteinu (N-acetylcysteinu) v pufrch o pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5, které odpovídají (pato)fyzilogickému prostředí v lidském organismu. Poté byly naměřené hodnoty aktivit zpracovány do grafů. Následně se zhodnotilo, zda některá z uvedených látek vykazuje významnou aktivitu a jak tato aktivita může souviset s chemickou strukturou látky. Nakonec byly hodnoty aktivit mezi sebou porovnány.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 MĚĎ

Měď (Cu) patří mezi nezbytné stopové prvky, jelikož se účastní mnoha redoxních reakcí v živých organismech. Nicméně, volné ionty mědi způsobují poškození různých biomolekul nadměrným vytvářením reaktivního kyslíku.¹

3.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti mědi

V periodické soustavě prvků je měď zařazována do skupiny přechodných kovů. Náleží jí protonové číslo 29 a atomová hmotnost 63,546. Vyskytuje se ve 2 stabilních a 9 radioaktivních izotopech.^{2,3}

Měď obvykle disponuje oxidačními stavy 0 (měď elementární, Cu^0), I (měďný ion, Cu^+) a II (měďnatý ion, Cu^{2+}). Měďné ionty se při neutrálním pH vyznačují nestabilitou, a proto na vzduchu oxidují na stabilnější ionty měďnaté, nejdůležitější oxidační stavy mědi. Měďnaté ionty se objevují ve vodných roztocích, kde jsou koordinovány se 6 molekulami vody. Schopnost mědi cyklovat mezi oxidačními stavy I a II má pro biologické systémy velký význam. Měď zde funguje jako akceptor nebo donor elektronů. Vzácně se lze setkat i s mědí v oxidačním stavu III.^{2,4}

V průmyslu je měď díky její tvárnosti, nízké korozi, legovací schopnosti, vysoké tepelné vodivosti a vysoké elektrické vodivosti jedním z nejvíce využívaných kovů. Používá se ve formě slitin včetně bronzu, mosazi a bílého zlata. Z důvodu vysokého jaderného náboje, malé velikosti a vysokého ionizačního potenciálu je mědi přisuzována nízká reaktivita.⁴

3.1.2 Fyziologická funkce mědi

Zdravé dospělé tělo obsahuje přibližně 110 mg mědi uložené především v játrech a ledvinách, dále v mozku, krvi a kostní tkáni.⁵ Koncentrace mědi v krvi se u jednotlivých pohlaví liší. U mužů obvykle dosahuje 0,614–0,970 mg/l a u žen 0,694–1,030 mg/l. Zatímco u zdravých mužů se koncentrace mědi s věkem zvyšuje, u žen k tomuto jevu nedochází.⁶

Jedná se o mikroživinu nepostradatelnou pro embryogenezi a buněčnou proliferaci všech eukaryot.⁷ Jak již bylo zmíněno, funkce tohoto esenciálního stopového prvku je hlavně založena na schopnosti přeměňovat se mezi dvěma oxidačními stavy, měďným a měďnatým.¹ Na druhou stranu, stejná schopnost může být příčinou uvolňování volných radikálů,

kteřé působí na buněčné komponenty nepříznivě. Proto je udržování buněčné homeostázy životně důležité.⁵

Existují různé enzymy, tzv. kuproenzymy, jež pro svou funkci vyžadují měď (Tabulka 1). Účastní se mnoha životně důležitých procesů, jako je buněčné dýchání, eliminace reaktivních forem kyslíku (ROS) a biosyntéza neurotransmiterů nebo pojivových tkání.^{1, 5}

Tabulka 1: Příklady kuproenzymů a jejich funkce v lidském organismu^{2, 7, 8}

Kuproenzym	Fyziologická funkce
Aminooxidasa	Deaminace primárních aminů
Askorbát oxidasa	Produkce dehydroaskorbátu
Ceramid galaktosyltransferasa	Syntéza myelinu
Ceruloplazmin (CP)	Transport mědi, feroxidasa I
Cytochrom c oxidasa (COX)	Buněčné dýchání – terminální oxidasa v elektronovém transportním řetězci
Dopamin β-hydroxylasa (DβH)	Katalýza konverze dopaminu na norepinefrin
Lysyloxidasa (LOX)	Zesíťení kolagenu a elastinu
Monoaminoxidasa (MAO)	Syntéza neurotransmiterů
Peptidyl-glycin α-amidující monooxygenasa (PAM)	Zpracovávání neuropeptidů
Sulfhydryloxidasa	Zesíťení keratinu
Superoxiddismutasa (SOD)	Vychytávání volných radikálů
Tyrosinasa (TYR)	Syntéza melaninu v kůži

Dále je měď v organismu využívána jako důležitá strukturní složka některých makromolekul. Tato molekulární role mědi se projevuje především při vývoji a růstu plodu a dítěte. Měď má velký význam pro správnou funkci imunitního systému, pevnost kostí, metabolismus cholesterolu a glukózy a pro kontraktilitu myokardu. Také se účastní udržování dobrého stavu vlasů a pokožky a tvorby pigmentů.²

3.1.3 Zdroje a příjem mědi

Měď je nedílnou součástí životního prostředí, zejména vody, půdy a prachu. V závislosti na konkrétních podmínkách se obsah mědi na různých místech liší. Jejimi antropogenními zdroji jsou hutě, elektrárny, komunální spalovny a pesticidy.²

V živých organismech měď nemůže být metabolickými procesy vytvořena ani zničena, a tak musí být přijímána z externích zdrojů. U savců je získávána zejména prostřednictvím potravy.⁷ Asi 20–25 % z přijímaného množství mědi pochází z pitné vody.²

Mezi potravní zdroje mědi patří houby, brambory, fazole a hrách. Obzvláště bohaté na měď jsou arašídové ořechy a pekanové ořechy. Významné množství se také nachází v pšenici, žitě, citronech a rozinkách. Někteří měkkýši mohou výjimečně obsahovat až 5 mg mědi na kilogram mokré váhy, zvláště ti, co mají v těle hemocyanin jako respirační pigment. Významným zdrojem jsou i vnitřnosti, zejména játra.²

Běžná strava obsahuje 1–5 mg mědi, což je dostačující pro prevenci jejího nedostatku a zároveň nestačí k vyvolání toxicity.³ Za normálních podmínek gastrointestinální trakt člověka oplývá schopností absorbovat přibližně 30–40 % požití mědi.⁵ Ve Spojených státech byl stanoven denní doporučený příjem mědi pro dospělé obou pohlaví ve věku 19–70 let na 0,9 mg. Přípustná horní hranice příjmu ve stejné věkové skupině je 10 mg za den.⁴ Potřeba mědi se v období těhotenství (1 mg/den) a při laktaci (1,3 mg/den) zvyšuje.³

3.1.4 Homeostáza mědi a její regulace

V lidském organismu je homeostáza mědi vysoce koordinovaným procesem. Probíhá zde na intracelulární i intercelulární úrovni. Zahrnuje procesy, jako je intestinální absorpce, buněčný eflux, distribuce a biliární exkrece.⁶

3.1.4.1 Absorpce

K absorpci mědi dochází ve dvou fázích. V té první je měď absorbována enterocyty tenkého střeva a následně reabsorbována do portálního oběhu, kudy je prostřednictvím proteinů transportována do jater a ledvin. V druhé fázi je absorbována hepatocyty a odtud se transportuje do ostatních orgánů včetně mozku, srdce a kostních tkání.⁵

Absorpce mědi závisí především na její chemické formě. Pro transport buněčnou membránou je nezbytná forma redukována. K absorpci dochází zejména prostřednictvím difuze nebo využitím některého z transportních proteinů, DMT1 nebo CTR1.⁶

DMT1 váže kromě mědi i ostatní dvojmocné kovy, jako je železo a mangan. Měď má však k tomuto proteinu poměrně nízkou afinitu. Oproti DMT1 je CTR1 pro měď vysoce afinitní. Současné znalosti mu tak připisují klíčovou roli v absorpci mědi. Tvoří kanál, který transportuje měď v její redukováné formě. Jeho extracelulární doména je bohatá na aminokyselinu (AMK)

methionin, zatímco intracelulární doménu tvoří zejména histidin a cystein. Kromě plazmatické membrány se CTR1 nachází v intracelulárních vezikulách. ^{6, 9, 10}

Intracelulární proteiny metalothioneiny (MT) a měď-specifické chaperony spolu s tripeptidem glutathionem (GSH) hrají důležitou roli v regulaci homeostázy mědi. MT sekvstrují v buňkách nadbytek mědi a ostatních těžkých kovů. Exprese MT je totiž těžkými kovy indukována, z čehož vyplývá jejich regulační funkce. Jsou známy 3 typy měď-specifických chaperonů: ATOX1, COX17 a CCS. ATOX1 pomáhá mědi dostat se z cytosolu do Golgiho aparátu, aby se zde začlenila do měď-transportujících ATPas ATP7A nebo ATP7B, které také umožňují buněčný eflux mědi. Díky COX17 se měď dostává do mitochondrií, kde se vyskytují ostatní proteiny vázající měď. Za pomoci CCS měď směřuje k superoxiddismutase (SOD) vyskytující se v cytosolu nebo mitochondriích. GSH se rychle váže na ionty mědi a následně je přenáší k MT nebo ostatním proteinům, které sekvstrují měď. ^{2, 5}

Faktory, které inhibují absorpci mědi ze střevního lumen, zároveň snižují její celkovou biologickou dostupnost. Buď způsobují pokles intraluminální rozpustnosti mědi nebo vyvolávají kompetitivní interakce s transportérem mědi přes mukózu. Příkladem je velmi vysoký příjem vlákniny, fyátů, vitamínu C, fruktosy a ostatních cukrů, které významně snižují biologickou dostupnost mědi. Zinek a kadmium se zdají být nejsilnějšími inhibitory absorpce mědi. S největší pravděpodobností proto, že soutěží s mědí o transport a/nebo zvyšují koncentraci intestinálního MT. Naopak vysoký příjem bílkovin může biologickou dostupnost zvyšovat. Bylo zjištěno, že živočišné bílkoviny ve stravě absorpci mědi podporují. Oproti tomu rostlinné proteiny mohou absorpci mědi z důvodu obsažených flavonoidů inhibovat. Absorpce může být urychlována komplexy mědi s citrátem, fosfátem a glutamátem. ^{2, 6}

3.1.4.2 Distribuce

Měď uvolněná z intestinálních buněk se přesouvá do kapilár, kde se v portální krvi váže na albumin, GSH a AMK. Také existuje malý protein transkuprein mající specifickou roli v transportu mědi v plazmě. ² Přibližně 95 % plazmatické mědi se nachází v ceruloplazminu (CP), což je oxidasa, která usnadňuje export buněčného železa tím, že oxiduje železnaté ionty na železité při výstupu z ferroportinu. Bylo zjištěno, že aceruloplazmatické myši a lidé nevykazují nedostatek mědi, z čehož lze usuzovat, že CP nemá zásadní význam pro příjem mědi *in vivo*. Spíše se za hlavní zdroje plazmatické mědi považují menší frakce mědi vázané na AMK. ⁷

Měď je z portálního oběhu primárně přijímána játry. Ta provádí homeostatickou kontrolu nad extrahepatální mědí tím, že regulují její uvolňování. Jakmile se měď ocitne v játrech, je buď zabudována do měď-vyžadujících proteinů, které jsou následně vylučovány do krve a transportovány do extrahepatálních tkání pomocí albuminu, AMK a CP, nebo je vyloučena žlučí. Specifické receptory pro CP byly identifikovány v srdci, mozku, játrech, ledvinách a lymfocytech.² Většina mědi, která se dostává do jater a ledvin, se vrací do plazmy vázaná na CP, z čehož vyplývá, že oba orgány mohou být důležitým zdrojem cirkulující formy mědi vázané na proteiny.⁵

3.1.4.3 Buněčný eflux

ATP7A a ATP7B jsou důležitými ATPasami, jejichž funkce spočívá v řízeném buněčném efluxu mědi.⁵ Zatímco exprese genu pro ATP7A probíhá v mnoha tkáních kromě jater, gen pro ATP7B exprimují především játra.⁶

3.1.4.4 Exkrece

Aby se zabránilo přetížení těla mědí, je s pomocí ATP7B přebytečná měď z hepatocytů exkretována do žluči. Protože žluč slouží jako hlavní cesta exkrece mědi, lze ji použít pro kontrolu hladin mědi v játrech. Měď ve žluči je vázána jak s nízkomolekulárními, tak s makromolekulárními látkami. K resorpci biliární mědi dochází jen velmi omezeně. Většina mědi ve stolici pochází právě z biliární exkrece. Zbytek je produktem deskvamace slizničních buněk, nebo se jedná o měď neabsorbovanou. Vylučování močí je zanedbatelné.^{2, 6}

3.1.5 Vrozené poruchy homeostázy mědi

Osud mědi v lidském těle je složitý a dosud nebyl plně pochopen. Živý organismus však vyžaduje pečlivou regulaci homeostázy mědi, protože nevázané ionty mědi se podílejí na tvorbě ROS v důsledku katalýzy Fentonovy reakce (viz kap. 3.3.1), což následně způsobuje poškození různých biologických struktur. Typickým příkladem je Wilsonova choroba (WD).¹

Zděděné mutace narušují transport mědi nebo její nitrobuněčný metabolismus, čímž způsobují několik onemocnění projevujících se u člověka. Některé poruchy jsou důsledkem nedostatečné funkce cytochrom c oxidasy (COX), která je způsobena mutacemi v mitochondriálních metalochaperonech. Další onemocnění vznikají z mutací, které ovlivňují absorpci a distribuci mědi v lidském těle.⁷ Mezi závažné poruchy homeostázy mědi patří Menkesova choroba (MD) a již zmíněná WD. Zatímco u první z jmenovaných dochází zejména

k nedostatečnému zásobení mědi, druhá je charakteristická měďnou akumulací a z ní vyplývající toxicitou.⁴

3.1.5.1 Menkesova choroba

MD je dědičné onemocnění, které je způsobeno mutacemi vedoucími ke ztrátě funkce ATP7A.⁷ Protože se ATP7A exprimuje téměř v každém orgánu kromě jater, jedná se o onemocnění systémové.⁵ Ačkoli je množství mědi v těle dostatečné, sekundárně dochází k nedostatku mědi z důvodu špatného zásobení enzymů, které ke své funkci měď vyžadují. Měď se akumuluje v nehepatálních tkáních, ale kromě jater dochází k jejímu nedostatku zejména v krvi a mozku.¹¹

Kvůli vazbě na chromozom X se primárně projevuje u chlapců, zatímco jejich biologické matky jsou heterozygoti a nositeli této poruchy.^{5, 7} Celkový výskyt MD je uváděn jako 1 ze 100 000 – 250 000 porodů. Nicméně byly zjištěny geografické rozdíly. Údajně je nejvyšší výskyt MD v Austrálii, v poměru 1 : 50 000 – 100 000. V Evropě byl za pomoci velké observační studie zjištěn výskyt v poměru 1 : 300 000.⁵

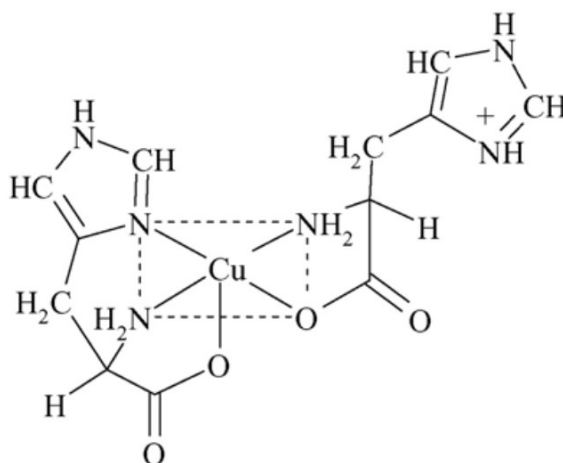
Nedostatek mědi, který je důsledkem MD, má dopad zejména na nervový systém člověka. V mozku dochází k ovlivnění katecholaminových drah, což vede k abnormálním hladinám metabolitů katecholaminů v krvi a tělesných tekutinách. Zatímco u sledovaných kojenců byly zjištěny normální hladiny norepinefrinu, poměry metabolitů dopaminu, kyseliny dihydroxyfenyloctové a katecholaminového prekurzoru dihydroxyfenylalaninu, k neuronálnímu metabolitu norepinefrinu, dihydroxyfenylglykolu, byly zvýšeny nad kontrolní meze, což naznačuje částečný nedostatek funkce dopamin β -hydroxylasy (D β H). Zjištění těchto hodnot tvoří základ screeningového testu u kojenců. Navíc významné snížení aktivity COX v mozku vede k intracerebrální laktátové acidóze a dalším mitochondriálním abnormalitám, což také k neuronální dysfunkci přispívá.⁵

Klinické projevy MD jsou výsledkem nedostatečné funkce různých kuproenzymů. Deficience tyrosinasy (TYR) způsobuje hypopigmentaci vlasů a bledost kůže. Nedostatek lisyloxidasy (LOX) vede k roztržené a rozdělené arteriální intimě z důvodu vadného zesílení elastinu a kolagenu. Snížená funkce COX je příčinou hypotermie a při nedostatku askorbát oxidasy dochází k demineralizaci kostí. Snížená syntéza katecholaminů je přisuzována nedostatečné funkci D β H.⁸

MD je velmi často příčinou předčasného porodu. Vlasy kojenců s MD jsou šedé a křehké, připomínají ocelovou vlnu. Tento jev se nazývá pili torti a lze jej odhalit mikroskopickým vyšetřením. Kojenci mají také zavalité tváře a změny na skeletu. Vzhled a růst novorozenců může být normální, ale u většiny se asi ve věku 3 měsíců začínají objevovat příznaky vývojového opoždění a záchvaty. V klinickém obrazu poté dominuje mozková degenerace s vaskulárními komplikacemi, zejména subdurálními hematomy.⁸

Závažnost MD se u různých pacientů liší.⁸ Může se vyskytnout i mírnější varianta defektu ATP7A, tzv. syndrom týlního rohu (Occipital Horn Syndrome, OHS).¹² OHS je vzácná porucha, při níž dominují výrazné abnormality pojivové tkáně včetně okcipitálních exostóz. Kromě toho mohou pacienti s OHS vykazovat mentální postižení.¹³

Léčba MD je velmi složitá. Závisí především na množství funkčních ATP7A a na včasném zahájení léčby. Komplex měď-histidin (Obrázek 1), který je nutno podávat parenterálně, představuje jedinou klinicky dostupnou možnost léčby. Jeho mechanismus účinku spočívá ve výměně mědi s dalšími sloučeninami obsahujícími ve své struktuře imidazol, čímž dochází ke zvýšení hladiny mědi v krvi. Využití komplexu měď-histidin je založeno na zjištění, že se tento komplex přirozeně v lidské krvi vyskytuje. Tento komplex však není schopen překonat hematoencefalickou bariéru. Pouze transportuje měď k povrchům buněk, což nemusí být dostačující pro zajištění potřeb mozku. Úspěšný výsledek léčby je pozorován jen u přibližně 20 % pacientů s MD.¹¹



Obrázek 1: Struktura komplexu mědi s histidinem¹⁴

3.1.5.2 Wilsonova choroba

Oproti MD je WD způsobena mutacemi v ATP7B, což vede k defektu ve vylučování mědi žlučí. Následně se měď hromadí v játrech. Pokud není WD léčena, dochází k jaternímu selhání.⁷ Na rozdíl od ATP7A je gen pro ATP7B exprimován především hepatocyty, tudíž se primárně jedná o jaterní onemocnění, které je spojováno s některými neurologickými a oftalmologickými problémy.⁵

WD se řadí mezi autozomálně recesivní dědičná onemocnění.¹⁵ Celosvětová prevalence této choroby je přibližně 1 : 30 000.¹⁶ Bylo popsáno více než 700 mutací ATP7B, které se mezi sebou liší klinickou závažností.¹⁷

Diagnostika WD zahrnuje stanovení aktivity CP a koncentrace mědi v séru. Při WD je aktivita CP redukována a sérová koncentrace volné mědi zvýšena. Dalším znakem může být vysoké množství mědi v moči nebo tzv. Kayserův-Fleischerův prstenec v rohovce.⁷

Zvýšená intracelulární hladina mědi způsobuje oxidační stres a tvorbu volných radikálů. Taktéž narušuje funkci mitochondrií. Kombinace těchto účinků je zodpovědná za buněčnou smrt jak v jaterní a mozkové tkáni, tak i v dalších orgánech.¹⁵

Prvním klinickým projevem WD je často jaterní onemocnění, od asymptomatických morfologických změn přes hepatitidu, žloutenku a cirhózu až po akutní jaterní selhání. Jaterní poruchy často doprovází neurologické příznaky. Ty nastupují průměrně ve věku 20–30 let. Převládá třes, parkinsonismus a dystonie, které jsou většinou spjaty s dysartrií, poruchou chůze a vadným držením těla. Může se objevit i hypersalivace nebo dysfagie. Mnoho pacientů s WD trpí nějakým psychiatrickým onemocněním, nejčastěji depresí. Oftalmologické příznaky jsou také poměrně časté a jsou způsobeny nahromaděním mědi v rohovce. Kromě Kayserova-Fleischerova prstence zahrnují i kataraktu.¹⁷

U symptomatických pacientů jsou jako léky první volby používány chelátory mědi.⁷ První se intramuskulárně podával dimerkaprol, avšak brzy bylo zjištěno, že není vhodný k dlouhodobé léčbě kvůli navození lékové tolerance a slábnoucímu klinickému přínosu. V současnosti patří mezi léky první volby D-penicilamin (D-PEN) a trientin. Pro pacienty, kteří mají život ohrožující jaterní selhání nebo netolerují farmakologickou léčbu, je alternativou transplantace jater. Asymptomatictí pacienti většinou užívají zinek v perorální lékové formě, jehož mechanismus účinku spočívá ve snižování absorpce mědi přijímané potravou.^{7, 18}

3.1.6 Důsledky narušení homeostázy mědi

Nedostatek, stejně tak i nadbytek mědi mohou být příčinou nepříznivých účinků na zdraví člověka. Křivka závislosti odpovědi na dávce tak bude mít pravděpodobně tvar písmene U.² Kromě vrozených poruch, narušení homeostázy mědi pravděpodobně hraje roli u různých patologických stavů, včetně neurodegenerativních onemocnění, nádorů a akutního infarktu myokardu.¹

3.1.6.1 Nedostatek mědi v lidském organismu

Jak již bylo zmíněno, běžná strava člověka obsahuje dostatečné množství mědi, tudíž je deficit způsobený nedostatečným příjmem mědi v potravě spíše neobvyklý. Nedostatek mědi byl však nejvíce pozorován u kojenců na úplné parenterální výživě s neadekvátním složením minerálů nebo u pacientů s perzistujícím nefritickým syndromem spojeným se zvýšenými ztrátami mědi.¹⁹ Je zajímavé, že nižší hladina mědi byla také zjištěna u kuřáků mužského pohlaví.⁶

Deficience mědi mění úlohu dalších buněčných složek podílejících se na antioxidačních aktivitách, jako je železo, selen a GSH. Hraje tak důležitou roli u onemocnění způsobených oxidačním stresem. Důsledkem deficitu mědi je narušení funkce hematopoetického systému a krve, dále kardiovaskulárního, nervového a imunitního systému a také pojivových tkání a kostí.²

Srdce a srdeční cévy reagují na nedostatek mědi velmi citlivě. Bylo prokázáno, že nedostatek mědi navozený v rámci experimentů významně zvyšuje náchylnost lipoproteinů a kardiovaskulárních tkání k peroxidaci lipidů, což podporuje vznik kardiovaskulárních onemocnění. Jsou pozorovány zvětšené kardiomyocyty, porucha myofibril, elektrokardiografické abnormality a zhoršené kontraktilní a mitochondriální respirační funkce. Nedostatek mědi vede také k anémii, jelikož při tvorbě krevních buněk je důležitá COX. Při experimentech s deplecí mědi se rovněž vyskytly aortální stenózy a abnormality krevního tlaku.¹⁹

Mozek je na oxidační stres velmi citlivý, což může být nedostatkem mědi ještě podpořeno. Dochází ke snížení aktivity COX, které vede ke zvýšené produkci superoxidu dýchacím řetězcem a/nebo narušení funkce SOD a následnému oslabení už tak nízké antioxidační obrany mozku.²⁰

Měď je pro imunitní reakce v organismu důležitá. V průběhu zánětu její hladina v séru stoupá. Deficit mědi narušuje funkci aktivovaných T-lymfocytů, které produkují interleukin 2 (IL-2). Dochází tak ke snížení aktivity a účinnosti buněčné i humorální složky nespecifické imunity.¹⁹

V tkáních, které obsahují elastin a kolagen, jako jsou krevní cévy, šlachy a kosti, dochází při nedostatku mědi ke snížení mechanické pevnosti. Příčinou je nedostatečná aktivita LOX a z toho vyplývající nedostatečné zesílení elastinu a kolagenu.²¹

3.1.6.2 Nadbytek mědi v lidském organismu a její toxicita

Expozice člověka vysokými hladinami mědi může vyústit v řadu nepříznivých účinků na jeho zdraví. Kromě kancerogenních účinků je nadbytek mědi také nepřímo spojován s řadou neurologických a prionových onemocnění.²

Role mědi v růstu a progresi zhoubných novotvarů je předmětem intenzivních výzkumů již od té doby, kdy bylo zjištěno, že volné ionty mědi generují ROS. Ty právě mohou aktivovat signální dráhy pro buněčnou proliferaci. Nádorové buňky obecně potřebují pro svůj růst a metabolismus více mědi než buňky normální. Vysoké hladiny mědi v séru a tkáních byly nalezeny při různých nádorových onemocněních, včetně Hodgkinova lymfomu, leukémie, sarkomu, nádoru mozku, děložního čípku, prsu, plic a jater.¹⁹

Narušení homeostázy mědi, stejně tak i zinku, manganu a železa, hraje důležitou roli v patogenezi neurodegenerativních onemocnění, zejména Alzheimerovy choroby (AD). Je známo, že hladina mědi v krvi se se stárnutím organismu zvyšuje. U pacientů s AD dochází ke zvýšení hladiny mědi zejména v mozku. Bylo prokázáno, že nadměrné množství volné mědi v krvi těchto pacientů koreluje s mírou narušení jejich kognitivních funkcí. Další studie naznačují, že měď může podporovat agregaci amyloidu β . Taktéž u senilních plaků byla pozorována neobvykle vysoká koncentrace mědi. K neurodegenerativním procesům vede pravděpodobně i oxidační stres. Nadbytek mědi se může také podílet na vzniku Parkinsonovy choroby nebo roztroušené sklerózy.^{19, 22}

Prionový protein PrPC je glykoprotein vázající měď, který byl nalezen převážně na synapsích v mozku, míše a periferních tkáních. Způsobuje prionová onemocnění včetně Creutzfeldtovy–Jacobovy choroby, Gerstmannovy–Sträusslerovy–Scheinkerovy choroby a fatální familiární insomnie. Uvádí se, že PrPC má aktivitu podobnou SOD. Na konci 90. let

bylo zjištěno, že měď stimuluje endocytózu PrPC. Stimulace endocytózy PrPC vyžaduje vysoce konzervativní opakující se vazbu Cu^{2+} iontů k tomuto proteinu.¹⁹

Intoxikace mědí je vzácná, zato velmi závažná. K akutní otravě dochází nejčastěji náhodným požitím kontaminovaného jídla nebo vody. Byly však zaznamenány případy, kdy k intoxikaci vedla cesta intravenózní, rektální, kožním poraněním, a dokonce i cesta nitroděložní. Během intoxikace se zvyšuje hladina volné mědi v krvi, což má za následek tvorbu ROS a inhibici některých enzymů včetně glukóza-6-fosfát-dehydrogenasy. Důsledkem je buněčné poškození. Bylo zaznamenáno selhání jater, srdce a ledvin. Mezi časté symptomy otravy mědí patří nevolnost, zvracení, průjem, bolesti břicha a hlavy, dýchací potíže, tachykardie a hemolytická anémie.^{19, 23}

3.2 CHELATAČE MĚDI

Chelatace kovů je slibným procesem u patologických stavů spojených s nadbytkem nebo dysregulací přechodných kovů. V současnosti je klinické použití chelátorů mědi omezeno pouze na léčbu WD, která jinak bez léčby končí fatálně. Výzkum chelátorů pro ostatní zmíněné poruchy, zejména centrální nervové soustavy, stále probíhá, ale většina sloučenin je doposud ve fázi experimentálního testování.¹

3.2.1 Principy chelatace

V případě nadbytku by měl chelátor mědi odstranit kov akumulovaný v těle. Aby k tomu mohlo dojít, musí být tato látka schopna dosáhnout cílového místa, chelatovat kov a následně být z organismu eliminována. Avšak může se stát, že vhodný kandidát na chelátor *in vitro* bude špatnou volbou pro použití *in vivo*. Důvodem mohou být endogenní látky, jako jsou cytochromy a hemoglobin, které s chelátory kompetují.²⁴

Při chelataci se kovové ionty váží k ligandům za vzniku chelátových komplexů. V tomto případě je atom ligandu donorem 1 nebo více elektronových párů (Lewisova báze), zatímco kovový iont funguje jako jejich akceptor (Lewisova kyselina). Mezi nimi vzniká koordinačně kovalentní vazba. To, jaký atom bude donorem, může záviset na přítomném kovovém iontu nebo hodnotě pH.²⁴

Pro tzv. tvrdou Lewisovu kyselinu (např. Fe^{3+} ion) je charakteristická malá velikost, vysoký náboj a slabá polarizovatelnost. Naopak tzv. měkká Lewisova kyselina, jako je Cu^+ ion, mívá větší velikost, nízký náboj a vysokou polarizovatelnost.²⁴ Cu^{2+} ion nelze jednoznačně

zařadit.²⁵ U tzv. tvrdé Lewisovy báze plní funkci donorů atomy kyslíku nebo dusíku. Oproti tomu funkční skupiny obsahující atom síry nebo selenu patří k donorům, které jsou součástí tzv. měkkých Lewisových bází. Ke vzniku stabilního chelátu je zapotřebí reakce mezi tvrdou Lewisovou kyselinou a tvrdou Lewisovou bází nebo mezi měkkou Lewisovou kyselinou a měkkou Lewisovou bází.²⁴

3.2.2 Chelátory mědi

V lidském těle je přirozeně přítomno několik chelátorů mědi včetně měď-specifických chaperonů a přenašečů. Chelátory určené pro léčbu by měly ideálně tyto endogenní sloučeniny napodobovat a používat například jejich výměnné transportéry pro buněčný influx a eflux. Chelátory mědi pro léčbu WD podporují vylučování mědi stolicí nebo močí. U MD je třeba, aby chelátory fungovaly jako tzv. ionofory a podporovaly tak dodávání mědi přes plazmatické membrány nebo hematoencefalickou bariéru do deficitních tkání, obzvláště do mozku.¹¹

S ohledem na různé patofyziologie je třeba se při screeningu nových chelátorů mědi zaměřit na několik faktorů, zejména na afinitu k měďnatým nebo měďným iontům, stejně tak i redukci měďnatých iontů. Dále je třeba se zaměřit na stabilitu komplexů s kovy a případnou účast při tvorbě ROS a vyvolání toxického účinku. Taktéž je nutné zjistit jakou roli v procesu chelatace hrají (pato)fyziologické hodnoty pH. Nižší než fyziologická hodnota pH je typická pro podmínky absorpce mědi v duodenu a pro některé patologické stavy, jako je akutní infarkt myokardu, zánět a nádor. Pokud je v buňkách nadbytek mědi, dochází zřejmě k její akumulaci v lysozomech (pH 4–5). Mezi důležité faktory také patří zjištění, zda zkoumané chelátory chelatují i ostatní ionty, především ionty železa a zinku. V neposlední řadě je důležitá lipofilita samotného chelátoru i vzniklého komplexu, protože ovlivňuje penetraci do buněk a centrálního nervového systému.^{1, 26}

Standardně používaným chelátorem mědi v léčbě WD je D-PEN, ačkoli jeho účinnost není tak vysoká jako u později objeveného trientinu. Navíc vykazuje významné vedlejší účinky, které se týkají zejména imunitního systému, ledvin a pojivové tkáně. Kromě toho je zde riziko počátečního zhoršení neurologických symptomů. Trientin je alternativou pro pacienty, kteří D-PEN netolerují. Má lepší profil bezpečnosti. Mezi další účinné chelátory mědi patří tetrathiomolybdát.^{1, 26}

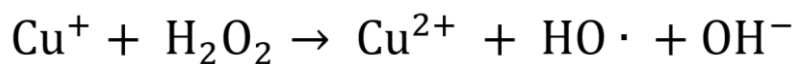
3.3 REDUKCE MĚDI

Chelátory mědi mohou po své absorpci v lidském organismu chelatovat Cu^+ a Cu^{2+} ionty a tím podpořit jejich exkreci nebo také mohou Cu^{2+} ionty redukovat na Cu^+ a zvýšit tak produkci hydroxylových radikálů, nejreaktivnějších ROS, které jsou známy.⁹

Jak chelataci, tak i redukcí lze považovat za potenciální terapeutické nástroje. Redukce volných iontů mědi může vést ke katalýze Fentonovy reakce (viz kap. 3.3.1), která může být například při infarktu myokardu škodlivá, ale na druhou stranu v případě nádorového onemocnění užitečná.²⁷

3.3.1 Fentonova reakce

Fentonova reakce představuje reakci peroxidu vodíku (H_2O_2) s ionty přechodných kovů, jako je měď nebo železo. V případě mědi, H_2O_2 oxiduje Cu^+ ionty na Cu^{2+} za vzniku vysoce reaktivního hydroxylového radikálu (Obrázek 2).²⁸



Obrázek 2: Fentonova reakce s měďnými ionty²⁶

3.4 AMINOKYSELINY

Aminokyseliny (AMK) jsou základní stavební jednotky životně důležitých makromolekul, proteinů. Tvoří enzymy a hormony, které řídí a regulují metabolismus. Dále jsou součástí kontraktilních proteinů ve svazech. V kostech obsažený kolagen tvoří podklad pro krystaly fosforečnanu vápenatého. V krevním řečišti se nachází proteiny, jako je hemoglobin a plazmatický albumin, které přenáší životně důležité molekuly, zatímco imunoglobuliny se podílí na imunitě. Navíc mnoho důležitých metabolitů, například puriny, pyrimidiny a neurotransmitery, jsou právě produkty buněčného metabolismu AMK.^{29, 30}

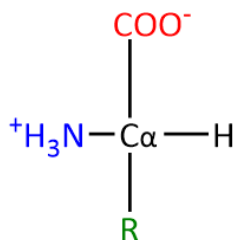
Díky svým výživným a terapeutickým vlastnostem jsou AMK široce používány v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.³¹ Některé AMK mohou vyvolávat chuťový vjem, čehož se využívá při aromatizaci potravin.³² Pro jejich vysokou rozpustnost a snášenlivost s pokožkou se z nich vyrábí kosmetické přípravky. Výhodou je, že nemají negativní vliv na životní prostředí. V poslední době jsou zkoumány pro výrobu biodegradabilních plastů.³³

V terapii mají AMK své nezastupitelné místo. Příkladem je glycin, který lze vnitřně užívat při svalové dystrofii nebo může být součástí přípravků používaných k ošetření poranění. Arginin pomáhá při otravách přeměňovat amoniak na močovinu. Kyselina glutamová slouží jako roborans a okyselující látka. Cystein, cystin a methionin vykazují příznivé účinky při intoxikacích a poškození jater.³⁴ Zejména methionin a cystin jsou také často součástí přípravků a doplňků stravy určených proti vypadávání vlasů.³⁵ AMK lze použít i pro diagnostiku a ke stanovení prognózy různých onemocnění, především nádorových, kdy se měří jejich hladina v krvi.³⁶ Při hodnocení rozsahu tumoru mozku pomocí metody, která kombinuje pozitronovou emisní tomografii a počítačovou tomografii, je vhodným radiofarmakem ¹¹C-methionin.³⁷

3.4.1 Chemické a fyzikální vlastnosti aminokyselin

Přirozeně se vyskytuje přes 300 AMK. Pouze 22 z nich tvoří monomerní jednotky proteinů. Savčí proteiny jsou nejčastěji tvořeny 20 AMK. Zbylé 2 AMK, selenocystein a pyrrolysin, které byly objeveny později, se nachází jen u některých organismů.^{30, 38}

Téměř všechny proteinogenní AMK obsahují ve své struktuře karboxylovou skupinu, primární aminoskupinu a charakteristický postranní řetězec, které jsou vázány na α -uhlík (Obrázek 3). Výjimkou je prolin, jehož struktura se skládá z aminoskupiny sekundární.³⁸



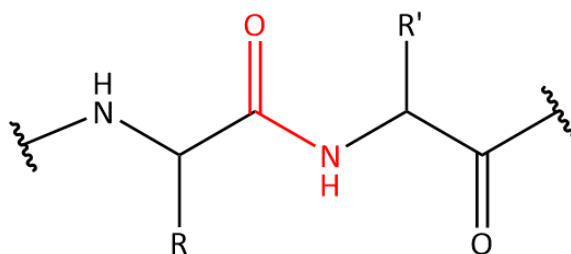
Obrázek 3: Obecná struktura aminokyselin

Pokud jsou na α -uhlík navázány 4 různé substituenty, jedná se o uhlík chirální. AMK pak vykazují optickou aktivitu. Avšak u glycinu jsou na α -uhlíku navázány 2 atomy vodíku, tudíž má rovinu symetrie a optickou aktivitu nevykazuje. Opticky aktivní AMK mohou existovat ve 2 formách, označovaných jako L a D, které jsou svými zrcadlovými obrazy. Nazývají se enantiomery.³⁰ Proteinogenní AMK se vyskytují ve formě L- α -AMK, jsou odvozeny od L-glyceraldehydu. Mohou být levotočivé (většina) nebo pravotočivé (L-cystein).³¹ D- α -AMK

byly dlouhou dobu považovány za nefunkční nebo dokonce nepřítomné v živých organismech. Avšak bylo uznáno, že také hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech.³²

Při fyziologickém pH se AMK obvykle vyskytují ve formě zwitteriontů.³⁸ Důvodem je disociace karboxylové skupiny, která vytváří záporně nabitý karboxylátový anion ($-\text{COO}^-$), zatímco aminoskupina je protonizována ($-\text{NH}_3^+$).³⁰

Aby AMK mohly tvořit primární strukturu proteinů, je nutné jejich propojení pomocí peptidových vazeb (Obrázek 4).³⁸ Jedná se o amidové spojení mezi α -karboxylovou skupinou jedné AMK a α -aminoskupinou druhé AMK. Tyto skupiny se poté nemohou účastnit chemických reakcí kromě tvorby vodíkových vazeb. Roli, kterou AMK hrají v proteinech, určuje právě povaha jejich postranních řetězců.³⁰



Obrázek 4: Propojení aminokyselin pomocí peptidové vazby (červeně)

Co se týče acidobazických vlastností, AMK obsahují ve vodném roztoku slabě kyselou α -karboxylovou skupinu a slabě zásaditou α -aminoskupinu. U kyselých nebo bazických AMK jsou navíc přítomny ionizovatelné skupiny postranních řetězců, které stabilizují strukturu proteinů prostřednictvím iontových interakcí nebo solných můstků.³¹ Jak volné AMK, tak některé AMK tvořící proteiny mohou fungovat jako pufrů.³⁰

Některé AMK podléhají posttranslační modifikaci. Příkladem je přeměna peptidylprolinu na 4-hydroxyprolin. Dále může docházet k methylaci, formylaci, acetylaci, prenylaci a fosforylaci určitých aminoacylů. Význam těchto modifikací spočívá ve změně proteinových vlastností, které zahrnují rozpustnost, stabilitu, katalytickou aktivitu a schopnost interagovat s jinými proteiny.³¹

AMK jsou snadno rozpustné v polárních rozpouštědlech, jako je voda a ethanol, ale nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech, jako je benzen, ether nebo hexan.³¹

Protože AMK neabsorbují viditelné světlo, jsou bezbarvé. Avšak tyrosin, fenylalanin a zejména tryptofan absorbují ultrafialové záření o vysoké vlnové délce.³¹

3.4.2 Rozdělení základních aminokyselin

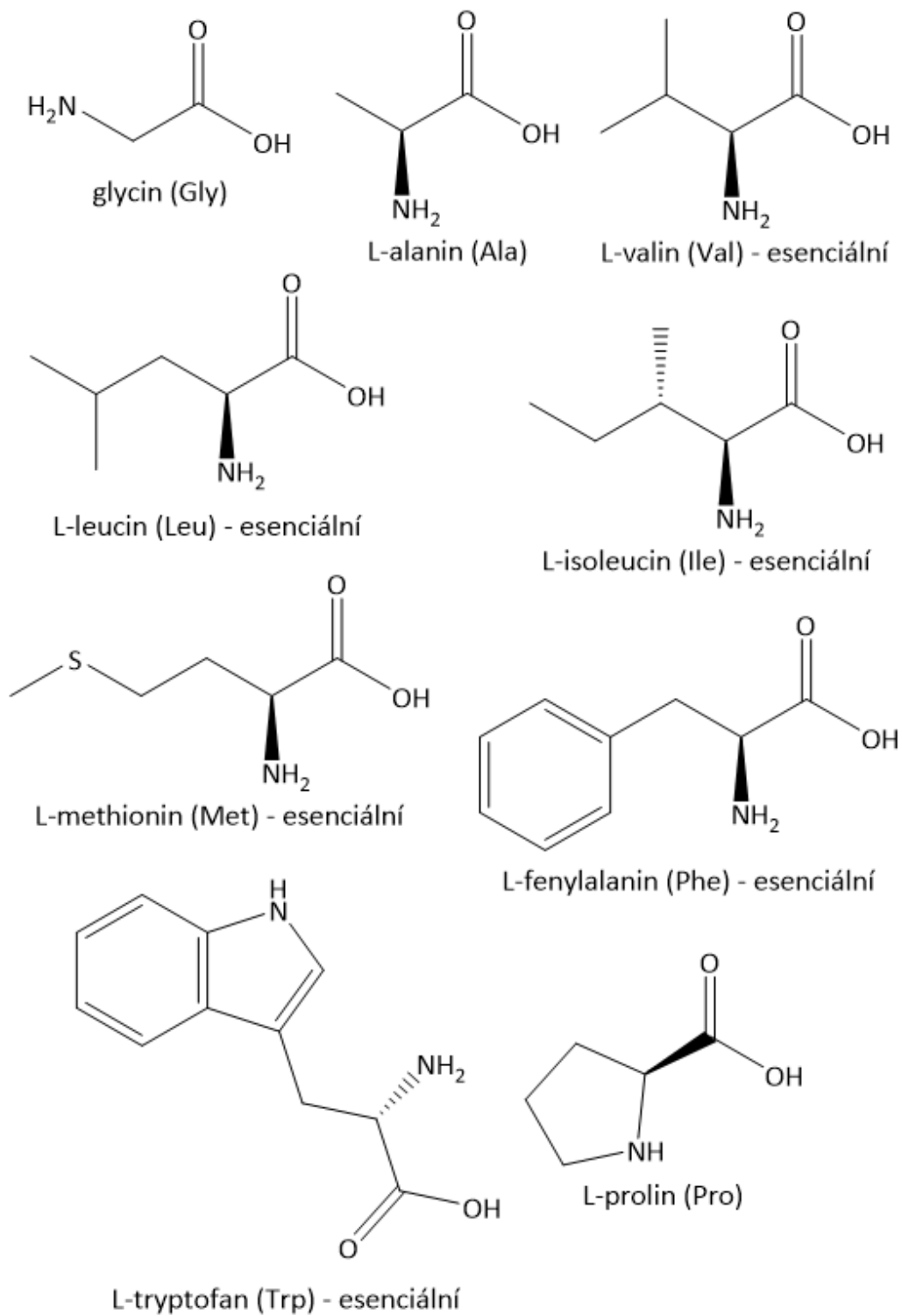
Dvacet základních AMK lze rozdělit na esenciální, semiesenciální a neesenciální. Jako **esenciální** (nezbytné) jsou označovány ty, které si tělo dospělého člověka nedokáže syntetizovat *de novo*, a tak je nutný jejich příjem potravou. Patří mezi ně leucin, valin, isoleucin, histidin, lysin, methionin, threonin, tryptofan a fenylalanin. Arginin je syntetizován, ale ne vždy v dostatečném množství, zejména u novorozenců, v průběhu těhotenství nebo při spermatogenezi. Proto se řadí mezi AMK **semiesenciální**. Zbylé AMK, nazývané **neesenciální** (zbytné), si tělo dokáže vytvořit v dostatečném množství. Zahrnují glycin, alanin, asparagin, glutamin, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, prolin, serin, cystein a tyrosin.^{39, 40}

Aminokyseliny se dále rozdělují dle charakteru postranního řetězce na **nepolární** (mají rovnoměrné rozložení elektronů) a **polární** (mají nerovnoměrné rozložení elektronů), viz dále.³⁰

3.4.2.1 AMK obsahující nepolární postranní řetězec

Do této skupiny AMK jsou zařazovány **glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, tryptofan, methionin** a **prolin** (Obrázek 5).³¹ Každá z těchto AMK se skládá z nepolárního postranního řetězce, u kterého nedochází k přijímání nebo odevzdávání protonů vodíku. Netvoří tedy vodíkové ani iontové vazby. Postranní řetězce jsou hydrofobního charakteru, podporují tedy hydrofobní interakce.³⁰

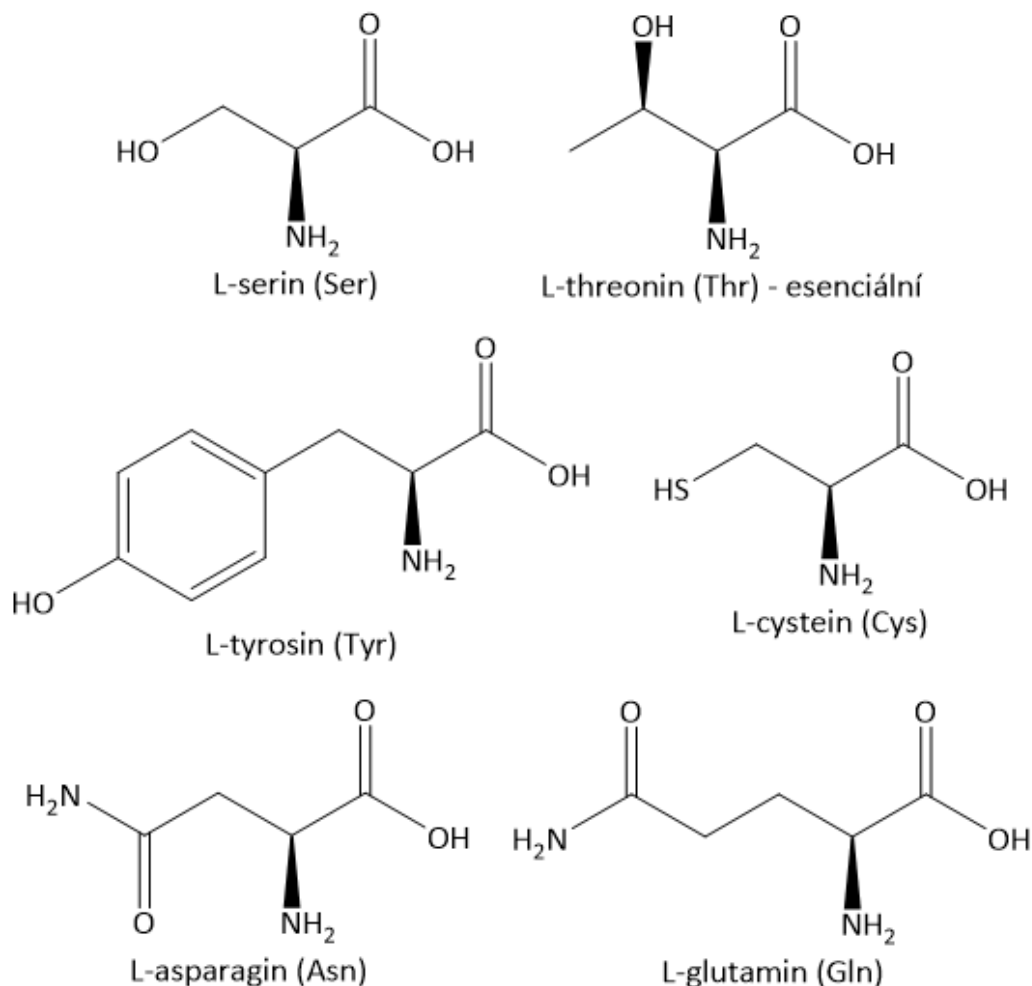
Glycin se může díky své malé velikosti vyskytovat v organismu i na místech, která jsou pro ostatní AMK nedostupná. Tryptofan a fenylalanin se odlišují aromatickými postranními řetězci.³¹ Prolin obsahuje sekundární aminoskupinu, která je součástí pětičlenného cyklu. Proto je často označován jako iminokyselina. Tato unikátní struktura prolinu přispívá k tvorbě kolagenních vláken a často přerušuje α -helixy globulárních proteinů.³⁰



Obrázek 5: Aminokyseliny s nepolárním postranním řetězcem

3.4.2.2 AMK obsahující polární neutrální postranní řetězec

Mezi tyto AMK patří **serin, threonin, tyrosin, cystein, asparagin** a **glutamin** (Obrázek 6). Jejich postranní řetězce se skládají z polárních funkčních skupin, jako je hydroxylová, amidová nebo thiolová skupina. Všechny mají při neutrálním pH nulový náboj, ačkoli cystein a tyrosin mohou v alkalickém prostředí poskytovat proton vodíku.³⁰

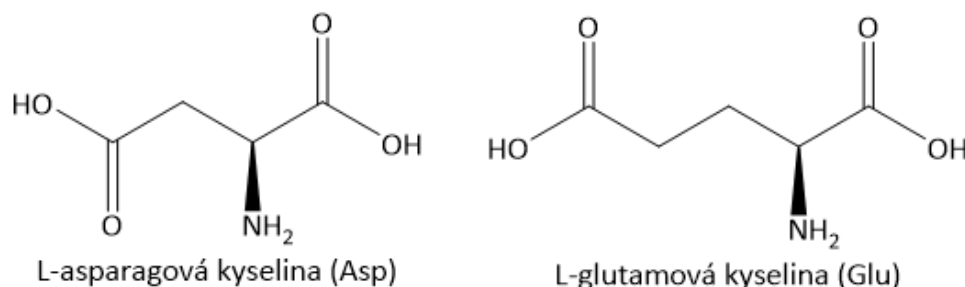


Obrázek 6: Aminokyseliny s polárním neutrálním postranním řetězcem

Serin, threonin a tyrosin obsahují hydroxylovou skupinu, která se může podílet na tvorbě vodíkových vazeb nebo může vázat fosfátovou skupinu. Postranní řetězec tyrosinu se odlišuje svým aromatickým charakterem. Thiolová skupina cysteinu je především důležitou složkou aktivního místa mnoha enzymů. Dvě molekuly cysteinu se k sobě mohou vázat za vzniku dimeru cystinu (viz kap. 3.4.6.1).³⁰ Strukturu postranního řetězce asparaginu a glutaminu tvoří amidová skupina, která se rovněž může podílet na tvorbě vodíkových vazeb.^{30, 31}

3.4.2.3 AMK obsahující polární kyselý postranní řetězec

Kyselými AMK, které jsou schopny poskytovat protony vodíku, jsou **kyselina asparagová** a **kyselina glutamová** (Obrázek 7). V postranních řetězcích obsahují karboxylovou skupinu.³⁰

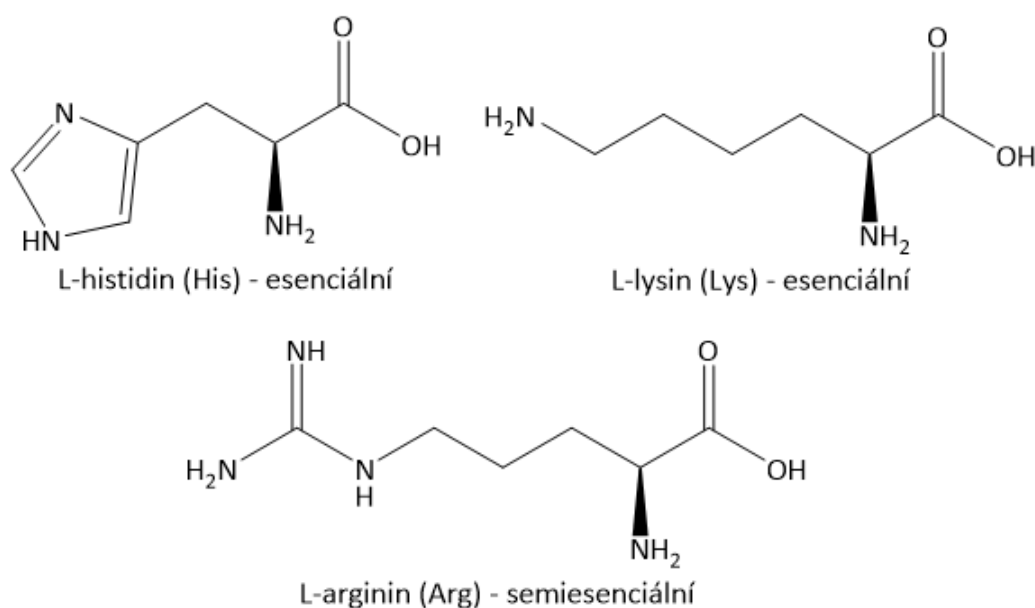


Obrázek 7: Aminokyseliny s polárním kyselým postranním řetězcem

Při fyziologickém pH jsou jejich postranní řetězce plně ionizovány, a tak zde vzniká záporně nabitá karboxylátová skupina. Poté jsou označovány jako aspartát a glutamát.³⁰ Reakce typické pro tyto AMK zahrnují tvorbu esterů, amidů a anhydridů.³¹

3.4.2.4 AMK obsahující polární zásaditý postranní řetězec

Zásadité AMK, jako je **lysin**, **arginin** a **histidin** (Obrázek 8), obsahují postranní řetězce, které mohou přijímat vodíkové protony. Zatímco u lysinu je v postranním řetězci přítomna primární aminoskupina, arginin je tvořen guanidinovou skupinou a histidin imidazolovou skupinou.³⁰



Obrázek 8: Aminokyseliny s polárním zásaditým postranním řetězcem

Lysin a arginin podléhají při fyziologickém pH plné ionizaci, a tak nesou kladný náboj. Histidin je ve své volné formě z větší části nenabitý, proto se jedná o slabou zásadu. Avšak pokud je zabudován do proteinu, postranní řetězec histidinu může být pozitivně nabitý nebo neutrální v závislosti na prostředí, které poskytuje polypeptidový řetězec. Tato vlastnost je důležitá pro funkci některých proteinů, například hemoglobinu.³⁰ Jeho imidazolová skupina hraje jedinečnou roli taktéž při enzymatické katalýze.³¹

3.4.3 Fyziologická funkce aminokyselin

AMK poskytují uhlovodíkové řetězce, dusík a síru, které patří k základním složkám organismů. Nelze je nahradit jinými živinami. Jsou velmi důležité pro zdraví, růst, vývoj, reprodukci, laktaci a přežití organismu.⁴¹ V těle jsou využívány zejména při proteosyntéze, konverzi na specifické nízkomolekulární dusíkaté látky a při přeměně na glukosu, glykogen, mastné kyseliny, ketolátky nebo oxid uhličitý a vodu.³⁰ AMK mohou také vykazovat biologickou regulační funkci. Například leucin podporuje anabolismus svalových proteinů. Pro arginin je zase typický vasodilatační účinek a posílení imunitních reakcí.³²

Proteosyntéza je označována jako translace, protože se jedná o překlad nukleotidové sekvence mRNA do sekvence AMK v proteinu. Proces translace vyžaduje genetický kód, jehož prostřednictvím jsou informace obsažené v sekvenci nukleové kyseliny exprimovány za vzniku specifické sekvence AMK.⁴² Jak již bylo zmíněno, proteiny se syntetizují téměř výhradně ze sady 20 L- α -aminokyselin. Nukleotidové triplety, které kódují určité AMK, se nazývají kodony.³¹

AMK jsou prekurzory mnoha sloučenin obsahujících dusík, které mají důležité fyziologické funkce. Patří mezi ně porfyriny, neurotransmitery, hormony, enzymy, receptory, protilátky, signální molekuly, puriny, pyrimidiny a mnoho dalších struktur, viz dále.^{32, 42}

3.4.3.1 Konverze L- α -aminokyselin na specifické produkty

Glutamin ve volné formě se vyskytuje nejhojněji ze všech AMK. Přeměňuje se na glutamát, který slouží spolu s cysteinem a glycinem k intracelulární syntéze GSH.⁴³ Dekarboxylací glutamátu vzniká inhibiční neurotransmitter γ -aminomáselná kyselina (GABA).³¹

Arginin poskytuje guanidinovou skupinu kreatinu a atom dusíku oxidu dusnatému. Kreatin ve formě kreatinfosfátu slouží jako energetická rezerva ve svalové a mozkové tkáni. Po konverzi argininu na ornitin se jeho uhlíkatý řetězec stává základem struktury polyaminů, jako je putrescin, spermin a spermidin.³¹

Dekarboxylovaný cystein je součástí koenzymu A. Po konverzi na taurin se cystein stává součástí žlučové kyseliny taurocholové.³¹

Glycin se podílí na biosyntéze hemu, purinů, kreatinu a sarkosinu (N-methylglycinu). Mnoho léčiv a jejich metabolitů tvoří konjugáty s glycinem, čímž je zvýšena jejich rozpustnost ve vodě a usnadněno vylučování prostřednictvím moči. Jak již bylo zmíněno, glycin je jednou ze složek GSH. Pokud je doplňován formou potravy, je předpokládána stimulace biosyntézy GSH. To je výhodné u organismů, které jsou více vystaveny oxidačnímu stresu. Chrání zejména před endoteliální a vaskulární dysfunkcí.⁴³

Dekarboxylací histidinu vzniká neurotransmitter histamin. Mezi deriváty histidinu patří například ergothionein, anserin a karnosin.³¹

Derivát methioninu, S-adenosylmethionin (SAM), je důležitým methylačním činidlem. SAM přispívá k biosyntéze polyaminů, jako je spermin a spermidin.³¹

Klíčovými metabolity tryptofanu jsou serotonin (5-hydroxytryptamin) a melatonin. Jaterní a ledvinová tkáň, stejně jako střevní bakterie, přeměňuje tryptofan na tryptamin a následně na indol-3-acetát. Indol-3-acetát společně s 5-hydroxyindolacetátem představují hlavní katabolity tryptofanu, které jsou vylučovány močí.³¹

Tyrosin a fenylalanin slouží jako prekurzory neurotransmiterů norepinefrinu, epinefrinu a dihydroxyfenylalaninu (DOPA). Jodací tyrosinu vznikají hormony štítné žlázy tyroxin a trijodtyronin.³¹ Z tyrosinu je také syntetizován pigment mnoha tkání, melanin. Syntéza melaninu probíhá v epidermis za pomoci melanocytů.⁴²

Enzymaticky katalyzovaná interkonverze mezi fosforylovanou a defosforylovanou formou peptidicky vázaného serinu, threoninu a tyrosinu hraje důležitou roli v metabolické regulaci, včetně signální transdukce. Serin kromě své role v biosyntéze fosfolipidů a sfingosinu, poskytuje uhlíkaté atomy purinům a methylovou skupinu thyminu.³¹

3.4.4 Aminokyselinový pool

Volné AMK jsou přítomny v celém těle, včetně buněk, krve a extracelulárních tekutin. Na rozdíl od tuků a sacharidů nejsou v těle ukládány, ale tvoří tzv. aminokyselinový pool (vnitřní hotovost), ze kterého organismus v případě potřeby čerpá. K jeho doplnění je nutný příjem AMK potravou, syntéza AMK *de novo* a degradace proteinů v těle.³⁰

3.4.4.1 Zdroje a příjem aminokyselin

Mezi hlavní zdroje AMK patří potraviny s vysokým obsahem proteinů, především maso, vejce, mléčné výrobky, luštěniny a obiloviny. Obecně je množství proteinů a jejich kvalita vyšší u živočišných produktů oproti rostlinným. Vaječný protein je považován za kompletní, a proto většinou slouží ke srovnání s profily AMK jiných potravin.⁴⁰

Co se týče rostlin, zde se významné množství AMK nachází v mnoha druzích patřících do čeledi bobovitých (Fabaceae). Tato čeleď zahrnuje luštěniny, pro které je však typický nedostatek methioninu. Příkladem je fazol obecný (*Phaseolus vulgaris* L.), v jehož semenech byly prokázány především AMK arginin, asparagin, fenylalanin a tryptofan. V obilovinách je sice methioninu dostatek, nicméně obsahují nízké množství lysinu a tryptofanu.^{34, 40, 44} Vysoký obsah methioninu byl nalezen v albuminu izolovaném ze semen slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.).⁴⁵ Ve zralých plodech rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) se nachází významné množství kyseliny L-glutamové, která jim dodává charakteristickou chuť „umami“.⁴⁶ Mezi další rostliny s významným obsahem AMK patří chaluha bublinatá (*Fucus vesiculosus* L.) a chaluha pilovitá (*Fucus serratus* L.) z čeledi chaluhovitých (Fucaceae).³⁴

Během trávení se proteiny hydrolyzují pomocí proteas a peptidas za vzniku AMK, dipeptidů a tripeptidů, které jsou využívány bakteriemi tenkého střeva nebo absorbovány enterocyty.⁴¹ Pouze volné AMK mohou být uvolněny z enterocytů do portální oběhu prostřednictvím usnadněné difuze. Následně jsou metabolizovány játry nebo uvolněny do krevního oběhu k zajištění potřeb organismu.³⁰ AMK, které se vyskytují v přebytku, se rychle odbourávají. První fáze jejich katabolismu spočívá v odstranění α -aminoskupiny za vzniku amoniaku a odpovídající α -ketokyseliny. Malé množství amoniaku je vyloučeno močí. Většina amoniaku slouží k syntéze močoviny v játrech, která se následně také vylučuje močí. Ve druhé fázi katabolismu je odpovídající α -ketokyselina přeměněna na běžné meziprodukty energetického metabolismu, mezi které patří oxalacetát, pyruvát, α -ketoglutarát, fumarát, sukcinylkoenzym A, acetylkoenzym A a acetoacetát. V závislosti na tom, na který z těchto meziproduktů jsou přeměňovány, se označují jako glukogenní a/nebo ketogenní. Meziprodukty se následně mohou metabolizovat na oxid uhličitý a vodu, glukosu, mastné kyseliny nebo ketolátky.³⁰

Volné AMK mohou být produkovány prostřednictvím 3 technologických procesů, a to extrakcí z proteinových hydrolyzátů, chemickou syntézou nebo mikrobiálními procesy

(fermentací a enzymatickou syntézou). Díky novým nástrojům genetického inženýrství se nejslibnějším procesem stává fermentace.⁴²

Denní doporučená dávka pro dospělé je 0,8 g proteinů na 1 kg hmotnosti. U těhotných, kojících, dětí a u některých patologických stavů se doporučuje dávku zvýšit. Podvýživa má za následek nedostatečný vývoj, anémii, fyzickou slabost, vaskulární dysfunkci, otoky a sníženou imunitu. Dlouhodobá konzumace proteinů v množství vyšším než 2 g na 1 kg hmotnosti může rovněž vést k vaskulární dysfunkci, dále k poruchám funkce gastrointestinálního traktu a ledvin.⁴¹

3.4.4.2 Biosyntéza aminokyselin

Jak již bylo zmíněno, neesenciální AMK mohou být v lidském těle syntetizovány, zatímco esenciální AMK je třeba přijímat v potravě. Esenciální AMK jsou syntetizovány pouze rostlinami a bakteriemi.^{31, 47}

Kromě tyrosinu, jsou neesenciální AMK syntetizovány z meziproductů metabolismu glukosy, jako je pyruvát, oxalacetát, 2-oxoglutarát nebo 3-fosfoglycerát, a vhodných zdrojů dusíku. Další možností je syntéza z esenciálních AMK. Tento případ se právě týká tyrosinu syntetizovaného z fenylalaninu. Také cystein může být syntetizován z esenciální AMK methioninu.^{30, 40}

3.4.4.3 Degradace proteinů

U všech živých organismů dochází k neustálé degradaci a syntéze proteinů. U člověka se každý den přemění 1–2 % celkového tělesného proteinu, zejména svalového. Degradace nejrychleji probíhá v tkáních, které prochází strukturální přestavbou, například tkáň dělohy během těhotenství nebo tkáň kosterního svalstva při hladovění. Přibližně 75 % AMK uvolněných proteinovou degradací je znovu využito. AMK, které nejsou okamžitě zabudovány do nového proteinu, se rychle odbourávají.³¹

3.4.5 Vztah aminokyselin k mědi

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1, měď je přirozeně vázána na proteiny, peptidy a jiné makromolekuly v lidském organismu. Avšak hraje zde dvojí roli. Buď plní funkci nepostradatelné složky enzymů a dalších struktur nebo v nevázané formě způsobuje oxidační poškození tkání. Právě tomuto poškození zabraňují tělu vlastní proteiny nebo peptidy, které se na regulaci mědi podílí tím, že ji chelatují a transportují.

Ačkoli se poznatky o přirozených procesech regulace mědi neustále prohlubují, klinicky používanými chelátory mědi zůstávají jednoduché molekuly neproteinové povahy. Ty sice nemají takovou účinnost jako přirozené regulační mechanismy, avšak představují nezbytnou složku terapie onemocnění spjatých s nedostatkem nebo nadbytkem mědi. Nicméně mohou vykazovat nežádoucí účinky. Přirozeně se vyskytující chelátory a jejich syntetické alternativy jsou stále předmětem výzkumu.²⁴

V kapitole 3.2.1 jsou uvedeny principy chelatace, pomocí nichž lze předpovědět jakými částmi k jakému iontu mědi se mohou AMK vázat. Jsou však založeny pouze na termodynamice a informace o reakční rychlosti chelatace neposkytují.²⁴

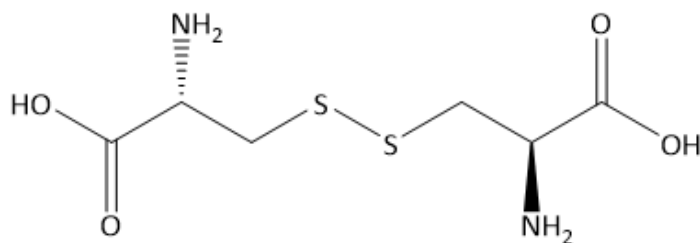
Z výše uvedených principů vyplývá, že Cu^{2+} ion se bude nejspíše vázat na atom kyslíku v karboxylové skupině kyseliny asparagové a glutamové nebo na atom dusíku v imidazolové skupině histidinu. Oproti tomu Cu^+ ion bude pravděpodobně preferovat atom síry v thiolové skupině cysteinu nebo v sulfidové skupině methioninu.²⁴

3.4.6 Testované látky

Struktura a základní informace týkající se **L-histidinu**, **L-methioninu**, **L-cysteinu**, **L-asparagové kyseliny** a **L-glutamové kyseliny** byly podány v předešlých kapitolách. Následující kapitoly budou věnovány zbylým testovaným látkám, **L-cystinu** a **N-acetylcysteinu**.

3.4.6.1 L-cystin

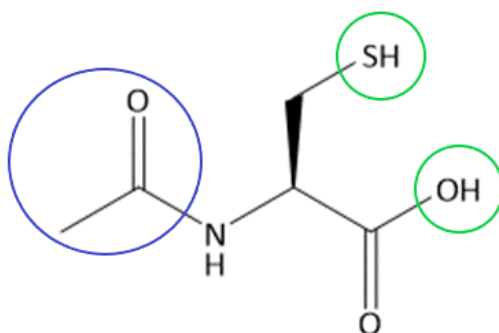
L-cystin (Obrázek 9) je dimer tvořený kovalentní disulfidovou vazbou. Může vznikat oxidací 2 thiolových skupin, které patří cysteinům zabudovaných do proteinu. Tím je struktura proteinu stabilizována.³⁰ Jelikož tato oxidační reakce vyžaduje kyslík a katalýzu za pomoci iontů mědi, dochází k ní snadno v buněčném prostředí.⁴⁸



Obrázek 9: Vzorec molekuly L-cystinu

3.4.6.2 N-acetylcystein

N-acetylcystein (Obrázek 10) je známý jako antidotum používané při otravách paracetamolem. Běžně také tvoří hlavní složku léčivých přípravků vykazujících mukolytický účinek.⁴⁹ Má antioxidační účinek, jenž spočívá v jeho schopnosti stimulovat syntézu GSH a vychytávat ROS. Jedná se o derivát cysteinu, u kterého je aminoskupina acetylována. Ve své struktuře obsahuje thiolovou skupinu, která slouží jak k redukci ROS, tak k chelataci. Při perorálním podání se snadno vstřebává v gastrointestinálním traktu a následně je v játrech metabolizován na cystein, který je potřebný pro syntézu GSH. Suplementace N-acetylcysteinem prospívá pacientům s nízkými hladinami GSH.^{43, 50} Navíc bylo prokázáno, že tento analog podporuje buněčnou produktivitu.⁴⁸



Obrázek 10: Vzorec molekuly N-acetylcysteinu se zeleně naznačenými místy chelatace (thiolová a hydroxylová skupina) a modře naznačeným místem deacetylace⁵⁰

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL

- Automatické pipety o různém objemu (Brand, Německo)
- Vícekanálové pipety o různém objemu (Biohit, Německo)
- Mikrotitrační destičky (Brand, Německo)

4.2 VYUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE

- Analytické váhy KERN ABT 120-5DM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Třepačka pro zkumavky IKA VORTEX GENIUS 3 (IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Německo)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA MS 3 digital (IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Německo)
- Laboratorní ultrazvuková vana K-2L (Kraintek, s. r. o., Podhájska, Slovensko)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

4.3 POUŽÍVANÉ CHEMIKÁLIE

Všechny používané chemikálie byly v čistotě p.a.

4.3.1 Chemikálie používané pro měření s ionty mědi

- Chlorid měďný (CuCl) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄.5H₂O) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny (BCS) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner, Česká republika)
- Hematoxylin (HEM) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

4.3.2 Chemikálie používané pro přípravu pufřů

4.3.2.1 15mM acetátové pufřy o pH 4,5 a 5,5

- Kyselina octová (CH₃COOH) (Penta, Česká republika)

- Octan sodný bezvodý (CH₃COONa) (Penta, Česká republika)
- Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Acetátové pufrý o pH 4,5 a 5,5 obsahovaly vždy 15 mM octanu sodného a 27,3 mM kyseliny octové (pH 4,5), respektive 2,7 mM kyseliny octové (pH 5,5).

4.3.2.2 15mM HEPES pufrý o pH 6,8 a 7,5

- HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) (Sigma-Aldrich, Německo)
- NaHEPES (sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonové) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

HEPES pufrý o pH 6,8 a 7,5 konkrétně obsahovaly 15 mM NaHEPES a 71,7 mM HEPES (pH 6,8), respektive 14,3 mM HEPES (pH 7,5).

4.4 TESTOVANÉ LÁTKY

Všechny testované látky byly zakoupeny od Sigma-Aldrich, Německo.

- L-asparagová kyselina ≥98% (HPLC)
- L-glutamová kyselina ≥99% (HPLC)
- L-cystein ≥97% FG
- L-cystin ≥98% (TLC)
- L-histidin ≥99% (TLC)
- L-methionin ≥98% (HPLC)
- N-acetylcystein ≥99% (TLC)

4.5 POUŽÍVANÉ PROGRAMY A STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Veškeré vzorce molekul byly vytvořeny v programu ChemDraw Professional 20.0. Naměřené výsledky byly zpracovány do grafů pomocí programu Microsoft Excel nebo GraphPad verze 9 (GraphPad Software, USA).

Množství nezchelatané nebo redukované mědi bylo vypočteno z rozdílů absorbancí mezi testovanou látkou (s indikátorem HEM/BCS) a jeho kontrolou (bez indikátoru HEM/BCS) dělených rozdílem kontrolního vzorku a jeho kontroly.

Naměřené výsledky byly zpracovány jako průměr \pm směrodatná odchylka vypočítaná

podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$. U stanovení chelatační aktivity metodou HEM byly porovnány rozdíly mezi testovanými látkami za pomoci 95% konfidenčních (predikčních) intervalů. Všechny křivky byly sestaveny z nejméně pěti bodů (první bod 0 % chelatace až poslední bod 100 % chelatace).

Výsledky a statistické zpracování redukčních výsledků proběhlo za pomoci programu MS Excel. Statistická analýza byla provedena T-testem, kdy byly porovnány hodnoty vs. negativní kontrola (spontánní redukce).

Všechny hodnoty byly změřeny alespoň jako duplikáty.

4.6 METODIKA PRO MĚŘENÍ S IONTY MĚDI

4.6.1 Příprava základních a pracovních roztoků

4.6.1.1 Roztoky měďných iontů (Cu⁺)

Základní roztok měďných iontů o koncentraci 5 mM byl připraven rozpuštěním chloridu měďného (CuCl, M = 98,99 g/mol) nebo bromidu měďného (CuBr, M = 143,45 g/mol) ve vodném roztoku 0,1M kyseliny chlorovodíkové (HCl, M = 36,46 g/mol) a 1M chloridu sodného (NaCl, M = 58,44 g/mol). K rozpuštění CuCl nebo CuBr došlo až v ultrazvukové lázni. Tento roztok je stabilní při uchovávání v chladničce.

Pro další měření bylo potřeba 5mM roztok měďných iontů naředit pomocí DMSO na 250 μ M pracovní roztok.

4.6.1.2 Roztoky měďnatých iontů (Cu²⁺)

Základní roztok měďnatých iontů o koncentraci 5 mM byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého (CuSO₄.5H₂O, M = 249,69 g/mol) v ultračisté vodě. Tento roztok je stabilní při uchovávání v chladničce

V závislosti na použité metodě bylo potřeba 5mM roztok měďnatých iontů naředit pomocí DMSO nebo ultračisté vody na požadovanou koncentraci.

4.6.1.3 Roztoky hematoxylinu (HEM)

Základní 5mM roztok HEM (M = 302,28 g/mol), který lze použít po dobu cca 5 hodin, byl připraven rozpuštěním HEM v DMSO.

Pracovní roztok bylo potřeba připravit dalším naředěním pomocí DMSO na koncentraci 250 μM . Tento roztok bylo možné použít po dobu 90 minut.

4.6.1.4 Roztok disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny (BCS)

Roztok BCS ($M = 564,54 \text{ g/mol}$) o koncentraci 5 mM byl připraven jeho rozpuštěním v ultračisté vodě. Tento roztok je stabilní při uchovávání v chladničce.

4.6.1.5 Roztoky hydroxylaminu hydrochloridu (HA)

Základní 100mM roztok HA ($M = 69,49 \text{ g/mol}$) byl připraven jeho rozpuštěním v ultračisté vodě. Tento roztok je stabilní při uchovávání v chladničce.

Pro měření při různých hodnotách pH bylo potřeba 100mM roztok dále naředit na pracovní roztok o koncentraci 10 mM nebo 1 mM.

4.6.1.6 Příprava roztoků testovaných látek

Roztoky testovaných látek o požadovaných koncentracích byly připraveny rozpuštěním daných látek v ultračisté vodě.

4.6.2 Kontrolní zkouška základních roztoků iontů mědi

Kontrolní zkouška byla vždy provedena před prvním použitím základních 5mM roztoků měďných i měďnatých iontů. Před jejich dalším použitím nebylo nutné kontrolu znovu provádět.

- Nejprve bylo pod sebe do 2 jamek mikrotitrační destičky pipetováno:
 - 150 μl pufru o pH 7,5
 - 50 μl 1mM roztoku HA
 - 50 μl 250 μM roztoku Cu^+ nebo Cu^{2+} iontů
- Následně byla mikrotitrační destička vložena do třepačky a její obsah byl míchán po dobu 1 minuty.
- Dále bylo pipetováno:
 - 50 μl 250 μM roztoku BCS
- Po uplynutí 1 minuty byla změřena absorpance při vlnové délce 484 nm.
- Absorpance správně připraveného roztoku by měla být přibližně 0,50–0,55.

4.6.3 Kalibrace měďnatých iontů

Pro interpretaci výsledků bylo potřeba sestavit kalibrační křivku, která představuje závislost absorpance na koncentraci Cu^{2+} iontů.

- Ze základního 5mM roztoku Cu^{2+} iontů byly pomocí ultračisté vody naředěny pracovní roztoky o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 μM .
- Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno:
 - 150 μl pufru o pH 6,8
 - 50 μl 1mM roztoku HA
 - 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů žádané koncentrace do **testovacích jamek** nebo 50 μl ultračisté vody do **kontrolních jamek**
- Následně byl obsah mikrotitrační destičky míchán v třepačce po dobu 1 minuty.
- Dále bylo pipetováno:
 - 50 μl 5mM roztoku BCS do horní poloviny jamek (×)
 - 50 μl ultračisté vody do dolní poloviny jamek (×)
- Absorbance při vlnové délce 484 nm byla změřena ihned a v čase 5 minut.
- Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka.

	$c(\text{Cu}^{2+}) = 0 \mu\text{M}$	$c(\text{Cu}^{2+}) = 50 \mu\text{M}$	$c(\text{Cu}^{2+}) = 100 \mu\text{M}$	$c(\text{Cu}^{2+}) = 150 \mu\text{M}$	$c(\text{Cu}^{2+}) = 200 \mu\text{M}$	$c(\text{Cu}^{2+}) = 250 \mu\text{M}$
jamky s indikátorem	×	×	×	×	×	×
slepé vzorky	×	×	×	×	×	×

	kontrolní jamky (ultračistá voda)
	testovací jamky (roztoky Cu^{2+} iontů)
×	jamky s indikátorem (BCS)
×	slepé vzorky (ultračistá voda)

Konečný obsah jamky:
• 150 μl pufru o pH 6,8
• 50 μl roztoku HA
• 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů nebo ultračisté vody
• 50 μl roztoku BCS nebo ultračisté vody

Obrázek 11: Schématické zobrazení mikrotitrační destičky při kalibraci měďnatých iontů

4.6.4 Stanovení chelatace měďnatých iontů hematoxylinem

- Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno:
 - 150 μl příslušného pufru (o pH 5,5; 6,8 nebo 7,5)
 - 50 μl 250 μM vodného roztoku Cu^{2+} iontů
 - 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace do **testovacích jamek** nebo 50 μl rozpouštědla (ultračisté vody) do **kontrolních jamek**
- Následně byl obsah mikrotitrační destičky míchán v třepačce po dobu 2 minut.
- Dále bylo pipetováno:
 - nejdříve 50 μl DMSO do dolní poloviny jamek (✕)
 - poté 50 μl 250 μM roztoku HEM do horní poloviny jamek (✕)
- Následně byl obsah mikrotitrační destičky míchán v třepačce po dobu 3 minut.
- Absorbance byla změřena ihned (tzn. v čase 3 minut) a v čase 7 minut při vlnové délce 595 nm pro pH 5,5, 590 nm pro pH 6,8 nebo 610 nm pro pH 7,5.

	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	✕	✕	✕	✕	✕
slepé vzorky	✕	✕	✕	✕	✕

	kontrolní jamky (ultračistá voda)
	testovací jamky (roztok testované látky)
✕	jamky s indikátorem (HEM)
✕	slepé vzorky (DMSO)

Konečný obsah jamky:
• 150 μl pufru
• 50 μl vodného roztoku Cu^{2+} iontů
• 50 μl roztoku testované látky nebo ultračisté vody
• 50 μl roztoku HEM nebo DMSO

Obrázek 12: Schématické zobrazení mikrotitrační destičky při stanovení chelatace měďnatých iontů hematoxylinem

4.6.5 Stanovení chelatace měďnatých iontů pomocí BCS

- Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno:
 - 100 μl příslušného pufru (o pH 4,5; 5,5; 6,8 nebo 7,5)
 - 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace do **testovacích jamek** nebo 50 μl rozpouštědla (ultračisté vody) do **kontrolních jamek**
 - 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO
- Následně byl obsah mikrotitrační destičky míchán v třepačce po dobu 2 minut.
- Poté bylo do všech jamek pipetováno:
 - 50 μl 10mM (pro pH 4,5 a 5,5) nebo 1mM (pro pH 6,8 a 7,5) roztoku HA
- Následně byl obsah mikrotitrační destičky míchán v třepačce po dobu 1 minuty.
- Dále bylo pipetováno:
 - 50 μl 5mM roztoku BCS do horní poloviny jamek (✕)
 - 50 μl ultračisté vody do dolní poloviny jamek (✕)
- Absorbance při vlnové délce 484 nm byla změřena ihned a v čase 5 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	✕	✕	✕	✕	✕
slepé vzorky	✕	✕	✕	✕	✕

	kontrolní jamky (ultračistá voda)
	testovací jamky (roztok testované látky)
✕	jamky s indikátorem (BCS)
✕	slepé vzorky (ultračistá voda)

Konečný obsah jamky:
• 100 μl pufru
• 50 μl roztoku testované látky nebo ultračisté vody
• 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO
• 50 μl roztoku HA
• 50 μl roztoku BCS nebo ultračisté vody

Obrázek 13: Schématické zobrazení mikrotitrační destičky při stanovení chelatace měďnatých iontů pomocí BCS

4.6.6 Stanovení chelatace mědných iontů pomocí BCS

- Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno:
 - 100 μl příslušného pufru (o pH 4,5; 5,5; 6,8 nebo 7,5)
 - 50 μl 10mM (pro pH 4,5 a 5,5) nebo 1mM (pro pH 6,8 a 7,5) roztoku HA
 - 50 μl 250 μM roztoku Cu^+ iontů v DMSO
- Následně byl obsah mikrotitrační destičky míchán v třepačce po dobu 1 minuty.
- Dále bylo pipetováno
 - 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace do **testovacích jamek**
 - 50 μl rozpouštědla (ultračisté vody) do **kontrolních jamek**
- Následně byl obsah mikrotitrační destičky míchán v třepačce po dobu 2 minut.
- Dále bylo pipetováno:
 - 50 μl 5mM roztoku BCS do horní poloviny jamek (✕)
 - 50 μl ultračisté vody do dolní poloviny jamek (✕)
- Absorbance při vlnové délce 484 nm byla změřena ihned a v čase 5 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	✕	✕	✕	✕	✕
slepé vzorky	✕	✕	✕	✕	✕

	kontrolní jamky (ultračistá voda)
	testovací jamky (roztok testované látky)
✕	jamky s indikátorem (BCS)
✕	slepé vzorky (ultračistá voda)

Konečný obsah jamky:
• 100 μl pufru
• 50 μl roztoku HA
• 50 μl roztoku Cu^+ iontů v DMSO
• 50 μl roztoku testované látky nebo ultračisté vody
• 50 μl roztoku BCS nebo ultračisté vody

Obrázek 14: Schématické zobrazení mikrotitrační destičky při stanovení chelatace mědných iontů pomocí BCS

4.6.7 Stanovení redukce měďnatých iontů pomocí BCS

- Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno:
 - 100 μl příslušného pufru (o pH 4,5; 5,5; 6,8 nebo 7,5)
 - 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace/rozpuštědla (ultračisté vody) do **testovacích jamek** nebo 50 μl 10mM (pro pH 4,5 a 5,5)/1mM (pro pH 6,8 a 7,5) roztoku HA do **kontrolních jamek**
 - 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO
- Následně byl obsah mikrotitrační destičky míchán v třepačce po dobu 2 minut.
- Dále bylo pipetováno:
 - 50 μl 5mM roztoku BCS do horní poloviny jamek (✕)
 - 50 μl ultračisté vody do dolní poloviny jamek (✕)
- Absorbance při vlnové délce 484 nm byla změřena ihned a v čase 5 minut.

	roztok testované látky c_1	roztok testované látky c_2	roztok testované látky c_x	rozpuštědlo (ultračistá voda)	kontrolní jamky (HA)
jamky s indikátorem	✕	✕	✕	✕	✕
slepé vzorky	✕	✕	✕	✕	✕

	kontrolní jamky (HA)
	testovací jamky (roztok testované látky nebo ultračistá voda)
✕	jamky s indikátorem (BCS)
✕	slepé vzorky (ultračistá voda)

Konečný obsah jamky:
• 100 μl pufru
• 50 μl roztoku testované látky/ultračisté vody nebo roztoku HA
• 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO
• 50 μl roztoku BCS nebo ultračisté vody

Obrázek 15: Schématické zobrazení mikrotitrační destičky při stanovení redukce měďnatých iontů pomocí BCS

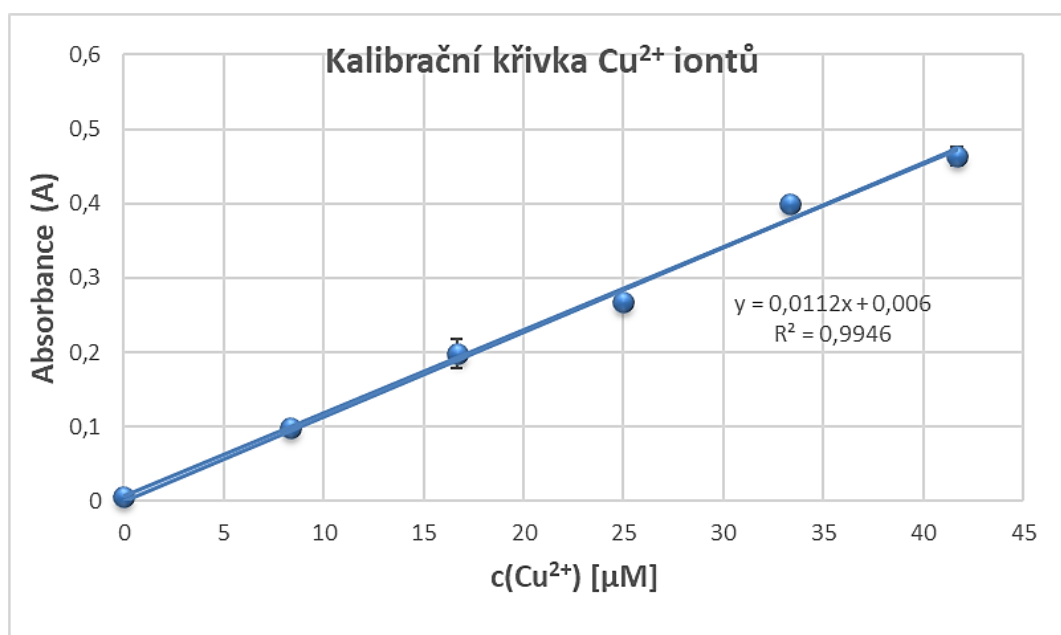
5 VÝSLEDKY

5.1 KALIBRAČNÍ KŘIVKA MĚDNATÝCH IONTŮ

Dle metodiky pro kalibraci Cu^{2+} iontů (viz kap. 4.6.3) byly naměřeny hodnoty absorpance pro jednotlivé roztoky Cu^{2+} iontů o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 μM (Tabulka 2). Pomocí těchto hodnot byl sestrojen graf kalibrační křivky (Obrázek 15). Hodnota absorpance je lineárně závislá na koncentraci Cu^{2+} iontů.

Tabulka 2: Naměřené hodnoty A pro jednotlivé roztoky Cu^{2+} iontů

Základní $c(\text{Cu}^{2+})$ [μM]	0	50	100	150	200	250
Finální $c(\text{Cu}^{2+})$ [μM]	0	8,3333	16,6667	25,0000	33,3333	41,6667
Průměr absorpance (A)	0,0055	0,0990	0,1980	0,2685	0,3995	0,4635



Obrázek 16: Kalibrační křivka Cu^{2+} iontů

5.2 CHELATAČNÍ AKTIVITA TESTOVANÝCH LÁTEK

U všech testovaných látek byla stanovena chelatační aktivita za pomoci metod založených na indikátoru HEM nebo BCS. Ke kontrole bylo použito rozpouštědlo ultračistá voda.

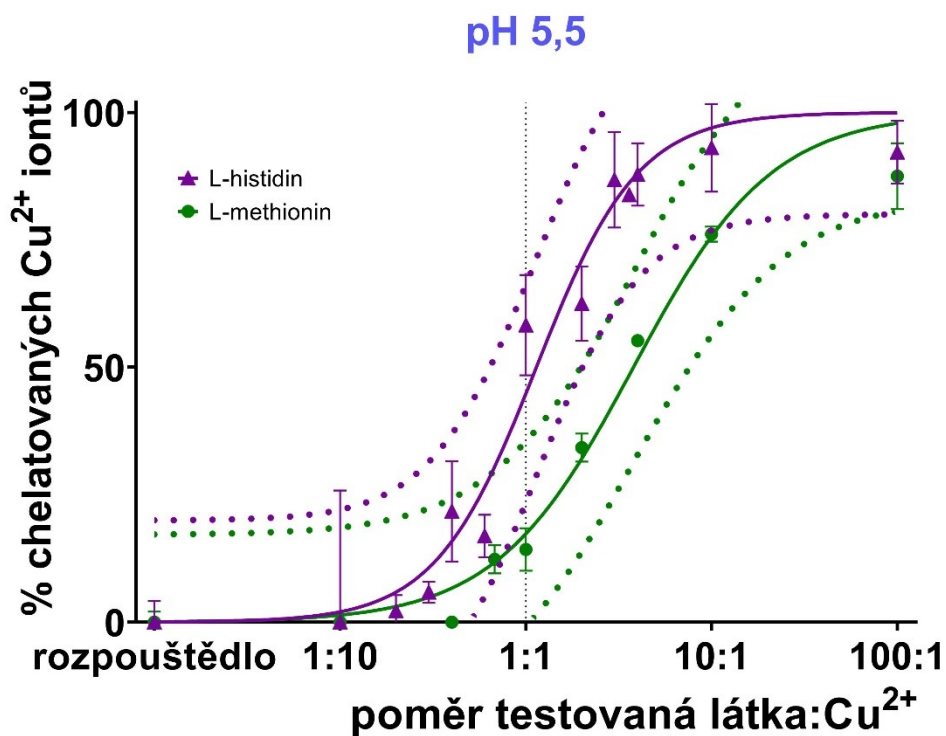
Metoda založená na HEM slouží především k odhalení méně účinných chelátorů Cu^{2+} iontů, protože je méně kompetitivní v porovnání s metodou využívající BCS. Důvodem je poměrně nízká stabilita komplexu HEM s Cu^{2+} ionty. Afinita HEM k Cu^{2+} iontům se se zvyšující aciditou prostředí snižuje, tudíž je použití této metody v prostředí o pH 4,5 nevhodné. Při pH 5,5 ji lze použít, ale je třeba vzít v úvahu, že afinita HEM k Cu^{2+} iontům je za těchto podmínek nízká. Naopak při pH 7,5 je afinita HEM vysoká, a proto jen velmi aktivní chelátory tvoří při tomto pH stabilní komplexy s Cu^{2+} ionty. Kvůli zmíněné nestabilitě se používá nejnížší možná koncentrace HEM. Tato koncentrace se rovná koncentraci roztoku Cu^{2+} iontů.^{1, 26}

Metoda s indikátorem BCS je díky vysoké selektivitě BCS k Cu^+ iontům mnohem více kompetitivní. Používá se roztok BCS o 20× větší koncentraci, než je koncentrace roztoku iontů mědi.⁵¹ Tuto metodu lze použít i při pH 4,5. Navíc umožňuje stanovení chelatace jak Cu^+ , tak Cu^{2+} iontů. Významnou roli v této metodě hraje redukční činidlo HA. V případě testování chelatace Cu^+ iontů udržuje tyto ionty v redukovaném stavu. Při zjišťování chelatace Cu^{2+} iontů se roztok HA pipetuje k roztoku testované látky a Cu^{2+} iontů později, aby došlo k redukcí nezchelatovaných Cu^{2+} iontů na ionty Cu^+ .²⁶

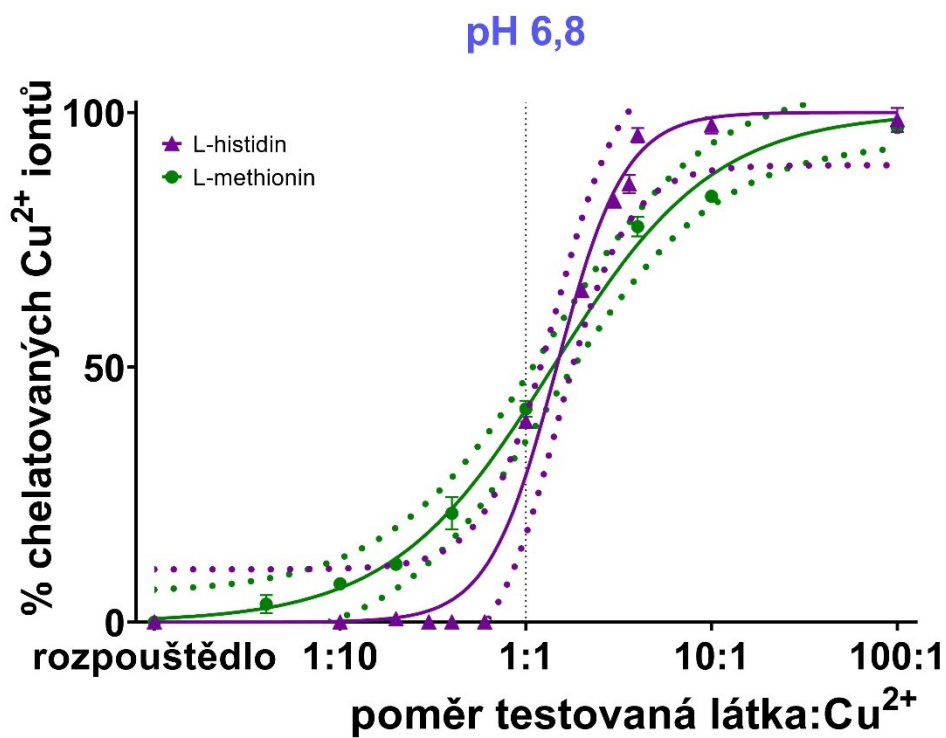
5.2.1 Chelatace měďnatých iontů – metoda s hematoxylinem

Měření chelatační aktivity testovaných látek o různé koncentraci probíhalo *in vitro* při pH 5,5; 6,8 a 7,5 v čase 3 (výsledky nezobrazeny) a 7 minut.

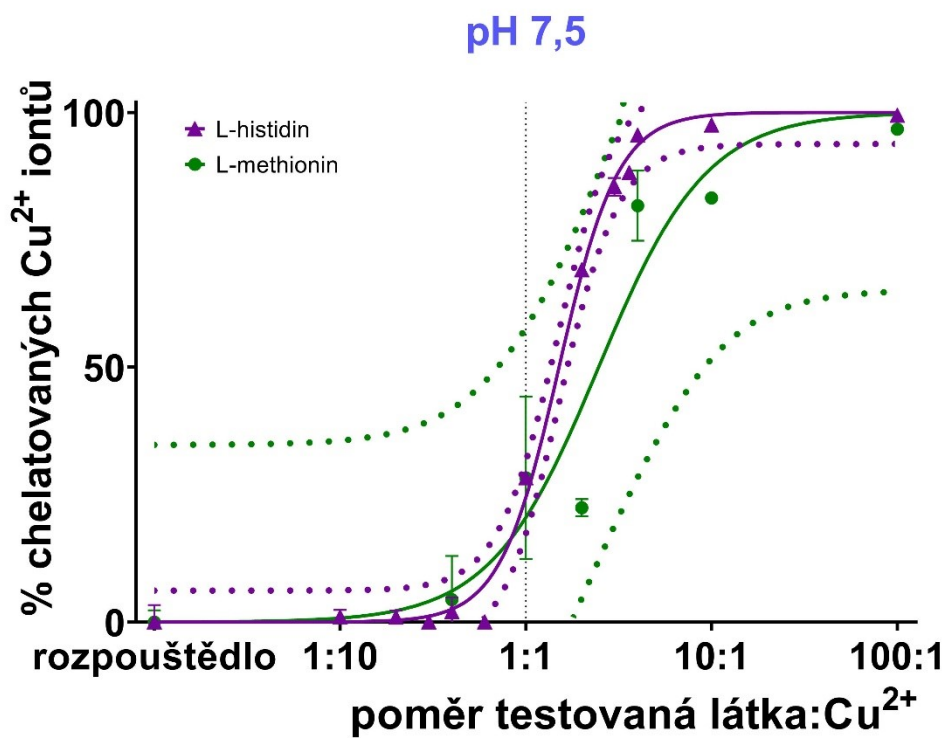
Naměřené hodnoty byly přeneseny do následujících grafů (Obrázky 17–25). Osa X představuje poměr koncentrací testované látky a roztoku Cu^{2+} iontů, zatímco osa Y vyjadřuje % chelatovaných Cu^{2+} iontů. Tečkované křivky znázorňují 95% predikční intervaly, pomocí nichž byla porovnána chelatační aktivita různých testovaných látek při zvolených hodnotách pH. Výsledky měření pro různé testované látky jsou barevně odlišeny.



Obrázek 17: Predikční intervaly pro porovnání schopnosti L-histidinu a L-methioninu chelatovat Cu²⁺ ionty při pH 5,5 v čase 5 minut – metoda s HEM

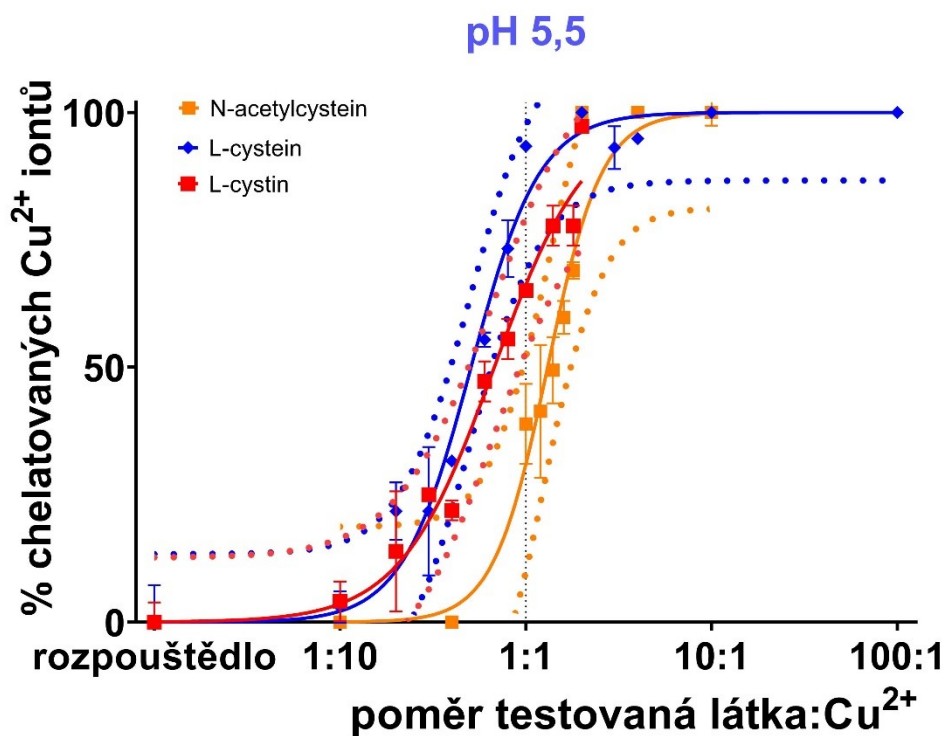


Obrázek 18: Predikční intervaly pro porovnání schopnosti L-histidinu a L-methioninu chelatovat Cu²⁺ ionty při pH 6,8 v čase 5 minut – metoda s HEM

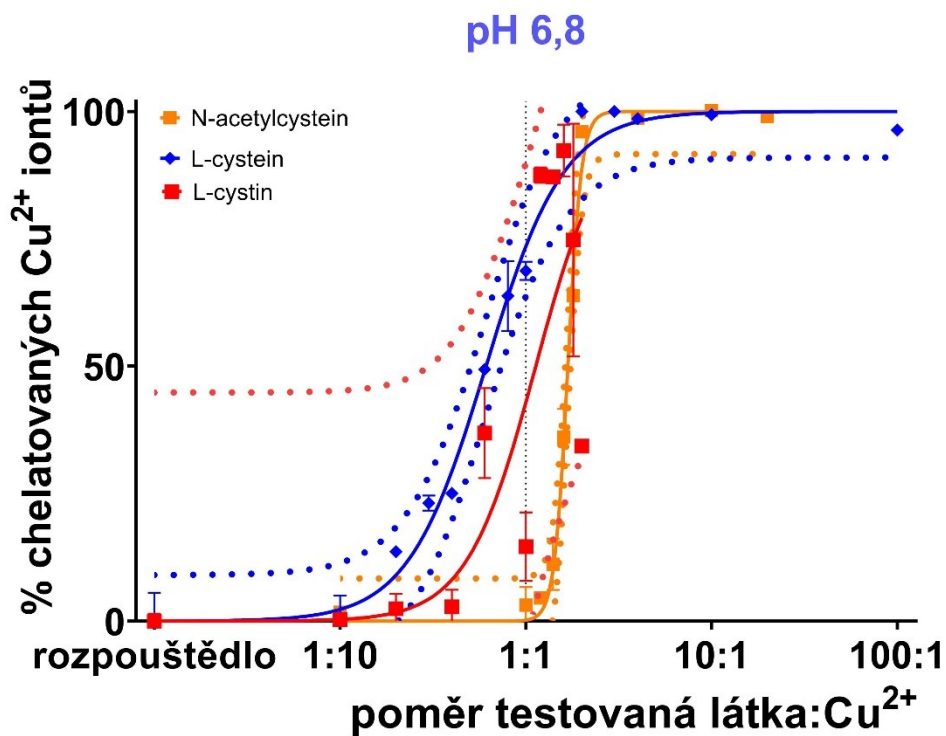


Obrázek 19: Predikční intervaly pro porovnání schopnosti L-histidinu a L-methioninu chelatovat Cu²⁺ ionty při pH 7,5 v čase 5 minut – metoda s HEM

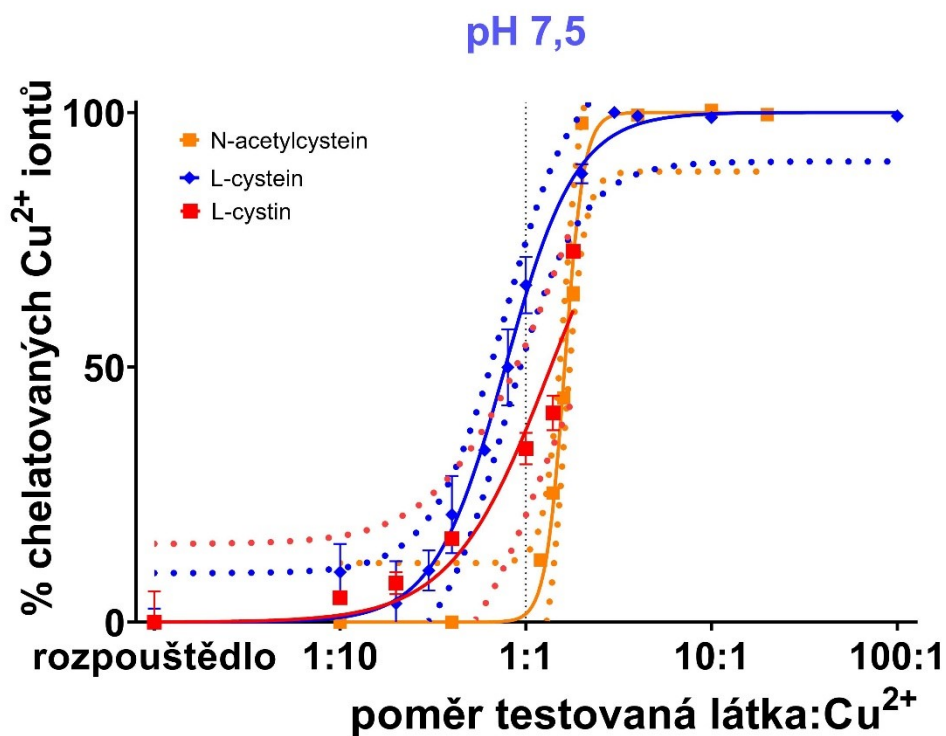
Z 95% predikčních intervalů lze vyhodnotit, že při pH 7,5 jsou křivky L-methioninu a L-histidinu nejpodobnější (Obrázek 19). Také je patrné, že L-histidin při všech použitých pH chelatoval Cu²⁺ ionty více než L-methionin (Obrázky 17–19).



Obrázek 20: Predikční intervaly pro porovnání schopnosti N-acetylcysteinu, L-cysteinu a L-cystinu chelatovat Cu^{2+} ionty při pH 5,5 v čase 5 minut – metoda s HEM

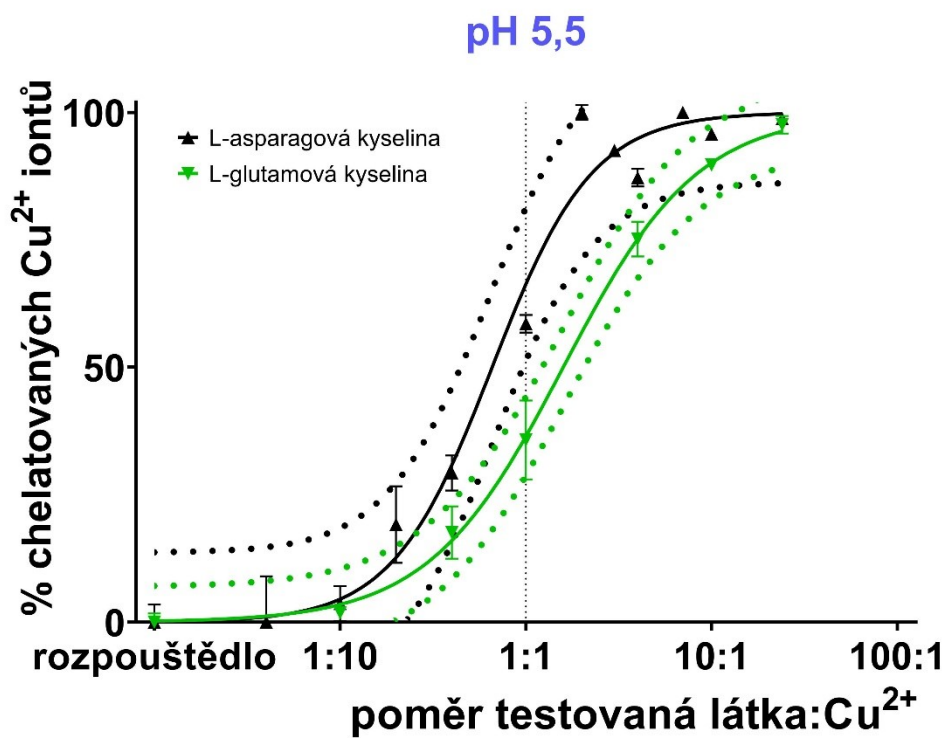


Obrázek 21: Predikční intervaly pro porovnání schopnosti N-acetylcysteinu, L-cysteinu a L-cystinu chelatovat Cu^{2+} ionty při pH 6,8 v čase 5 minut – metoda s HEM

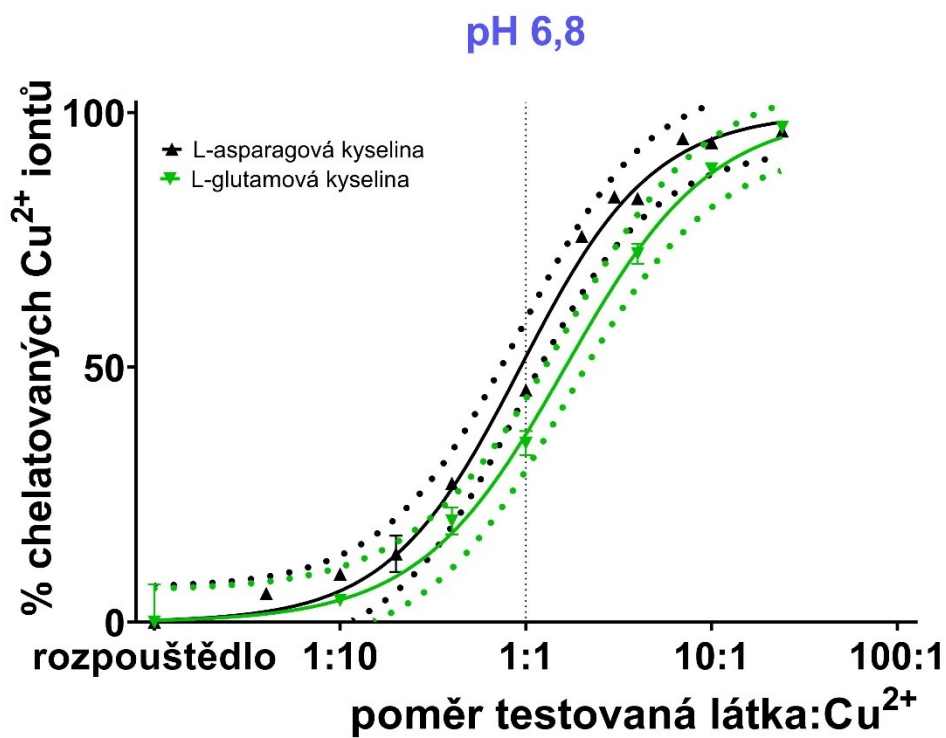


Obrázek 22: Predikční intervaly pro porovnání schopnosti N-acetylcysteinu, L-cysteinu a L-cystinu chelatovat Cu^{2+} ionty při pH 7,5 v čase 5 minut – metoda s HEM

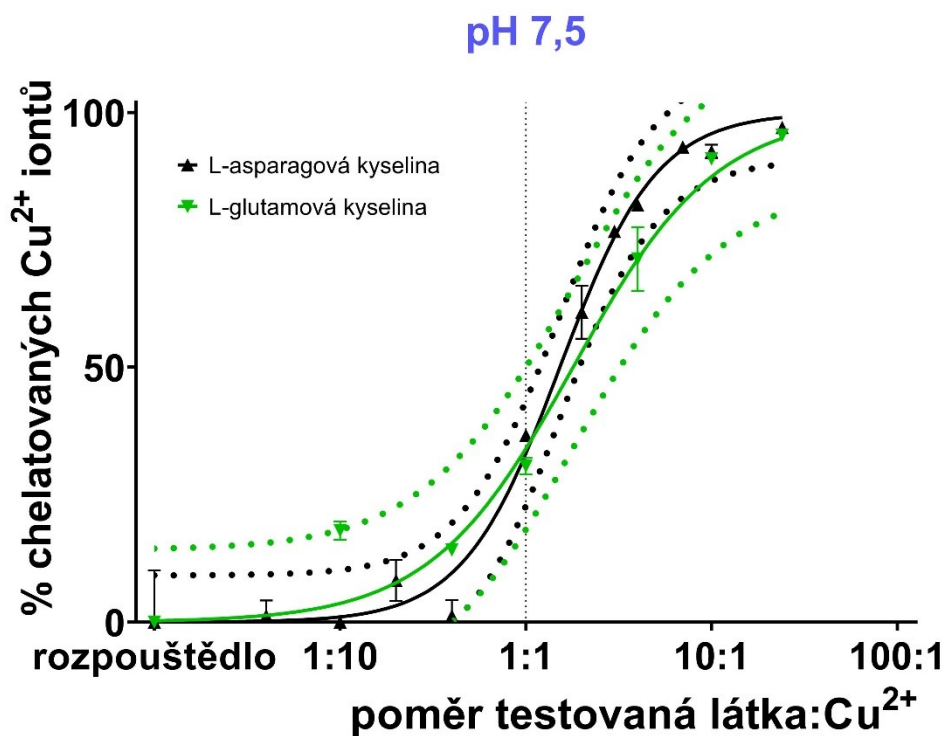
Porovnáním křivek 95% predikčních intervalů N-acetylcysteinu, L-cysteinu a L-cystinu lze zjistit, že nejspíše chelatovaly Cu^{2+} ionty N-acetylcystein a L-cystein při pH 5,5 (Obrázek 20). Dále je patrné, že L-cystein chelatoval Cu^{2+} ionty z těchto látek nejvíce při všech použitých pH, obzvláště při pH 5,5. U N-acetylcysteinu se chelatační aktivita projevila až při vyšším koncentračním poměru za všech použitých pH (Obrázky 20–22).



Obrázek 23: Predikční intervaly pro porovnání schopnosti L-asparagové a L-glutamové kyseliny chelátovat Cu^{2+} ionty při pH 5,5 v čase 5 minut – metoda s HEM



Obrázek 24: Predikční intervaly pro porovnání schopnosti L-asparagové a L-glutamové kyseliny chelátovat Cu^{2+} ionty při pH 6,8 v čase 5 minut – metoda s HEM



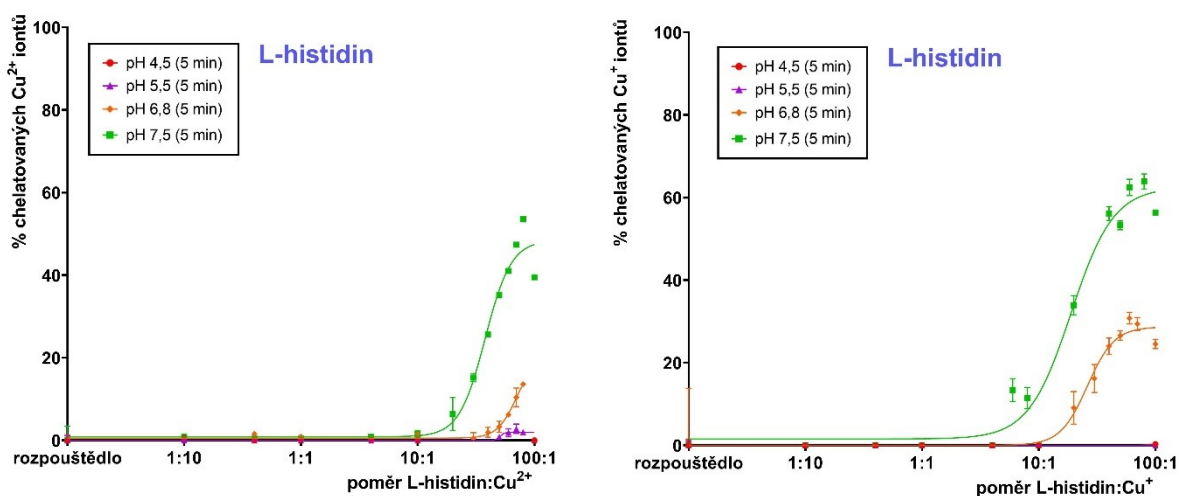
Obrázek 25: Predikční intervaly pro porovnání schopnosti L-asparagové a L-glutamové kyseliny cheltovat Cu^{2+} ionty při pH 7,5 v čase 5 minut – metoda s HEM

Z těchto 95% predikčních intervalů lze vyčíst, že chelatační aktivita kyselin L-asparagové a L-glutamové se nejvíce shoduje při pH 7,5 (Obrázek 25). Také je patrné, že schopnost cheltovat Cu^{2+} ionty je u kyseliny L-asparagové mírně lepší než u kyseliny L-glutamové, a to při všech použitých pH (Obrázky 23–25).

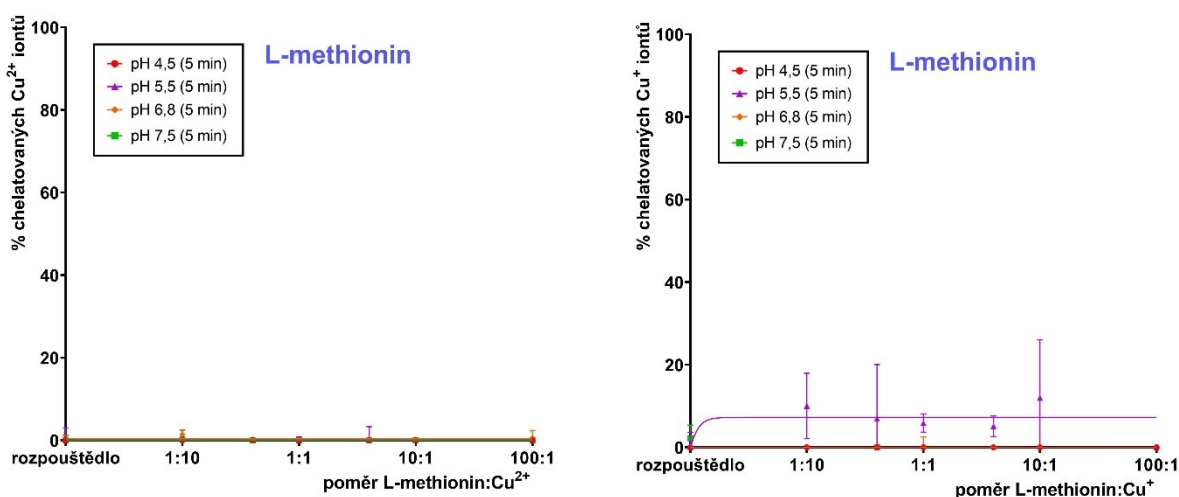
5.2.2 Chelatace měďnatých a měďných iontů – metoda s BCS

Měření chelatační aktivity testovaných látek o různé koncentraci probíhalo *in vitro* při pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5 v čase 0 (výsledky nezobrazeny) a 5 minut.

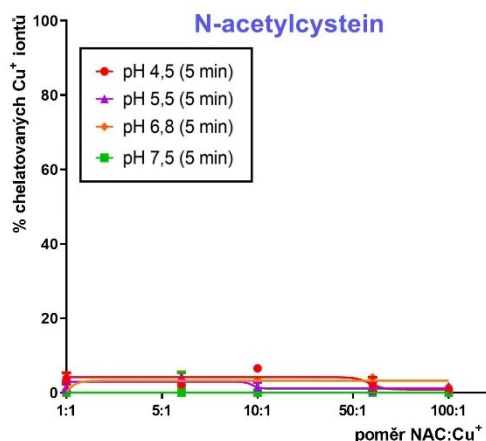
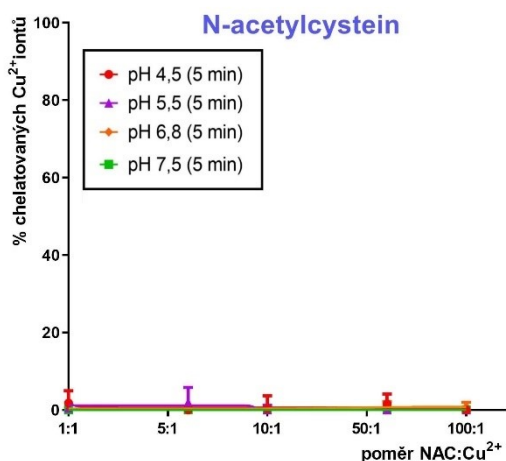
Naměřené hodnoty byly přeneseny do grafů (Obrázky 26–32). Osa X představuje poměr koncentrací testované látky a roztoku Cu^{2+} nebo Cu^+ iontů, zatímco osa Y vyjadřuje % chelatovaných Cu^{2+} nebo Cu^+ iontů. Výsledky měření při různých hodnotách pH jsou barevně odlišeny.



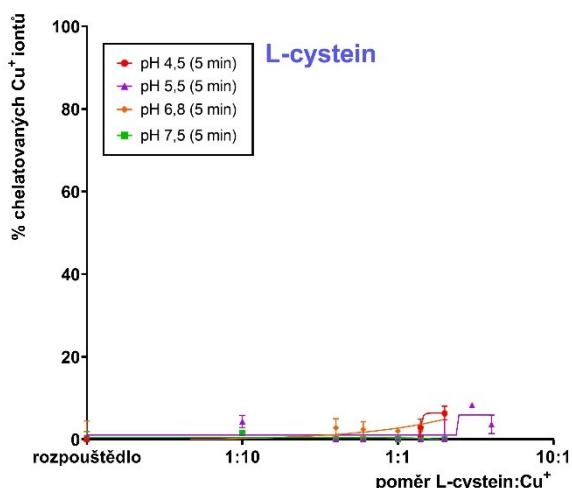
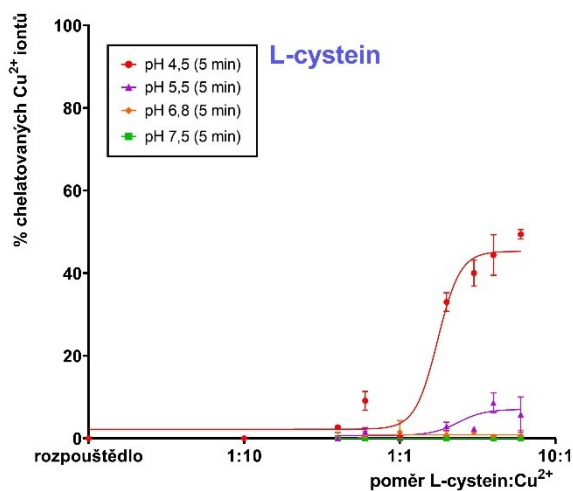
Obrázek 26: Grafické zobrazení schopnosti L-histidinu chelatovat Cu^{2+} a Cu^+ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



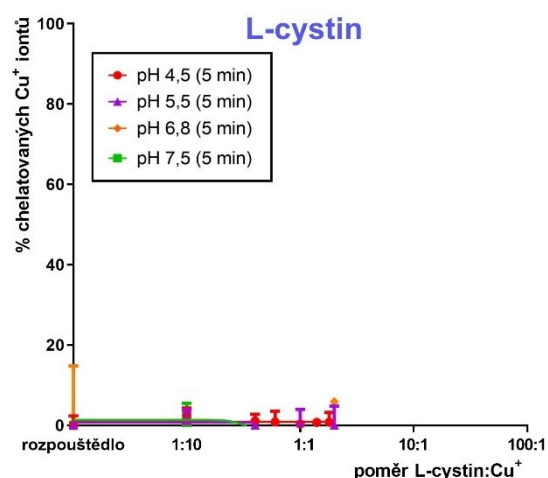
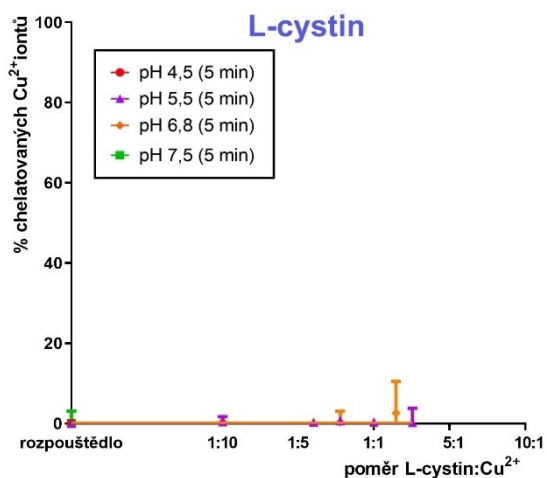
Obrázek 27: Grafické zobrazení schopnosti L-methioninu chelatovat Cu^{2+} a Cu^+ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



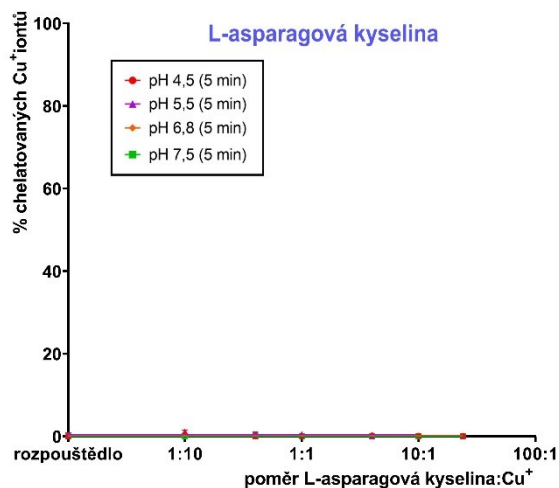
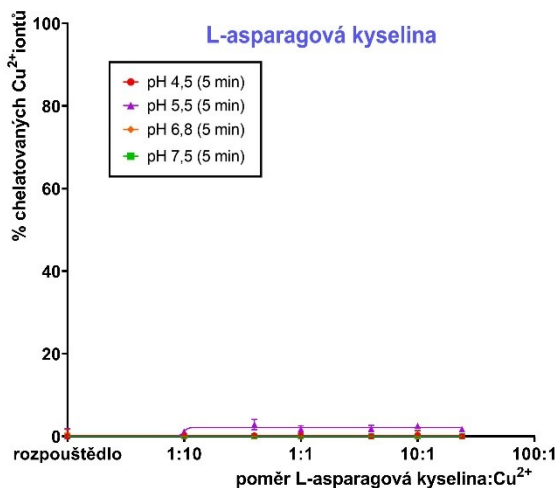
Obrázek 28: Grafické zobrazení schopnosti N-acetylcysteinu chelatovat Cu²⁺ a Cu⁺ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



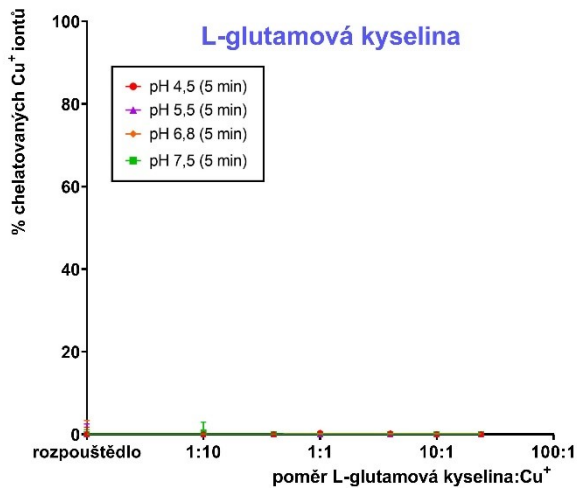
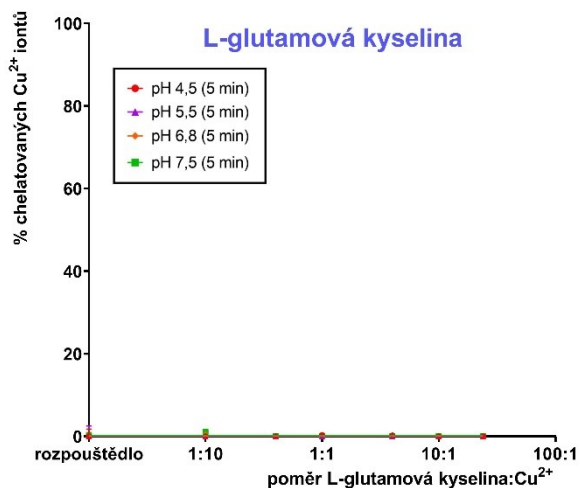
Obrázek 29: Grafické zobrazení schopnosti L-cysteinu chelatovat Cu²⁺ a Cu⁺ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



Obrázek 30: Grafické zobrazení schopnosti L-cystinu chelatovat Cu²⁺ a Cu⁺ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



Obrázek 31: Grafické zobrazení schopnosti L-asparagové kyseliny chelatovat Cu^{2+} a Cu^+ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



Obrázek 32: Grafické zobrazení schopnosti L-glutamové kyseliny chelatovat Cu^{2+} a Cu^+ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS

Z grafů lze vyčíst, že mírná chelatační aktivita byla zaznamenána pouze u L-histidinu při pH 6,8 a 7,5 (Obrázek 26) a u L-cysteinu při pH 4,5 (Obrázek 29).

5.3 REDUKČNÍ AKTIVITA TESTOVANÝCH LÁTEK

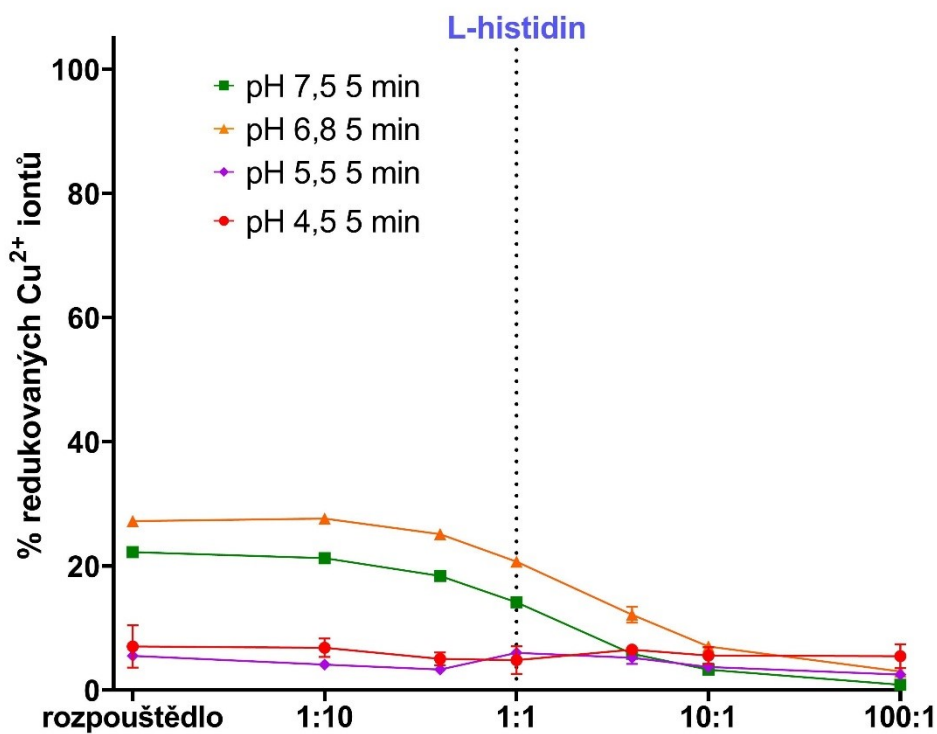
Ke stanovení redukce Cu^{2+} iontů testovanými látkami byla použita metoda využívající indikátor BCS.

Princip této metody spočívá v tom, že Cu^{2+} ionty (oxidovaná forma) nejsou BCS chelatovány. Pokud je však testovaná látka schopna redukovat Cu^{2+} ionty na Cu^+ , dochází ihned ke vzniku komplexu BCS s Cu^+ ionty, což lze změřit spektrofotometricky.⁹ Roztok HA se zde používá pouze k pozitivní kontrole. Způsobuje 100% redukci Cu^{2+} iontů.⁵¹

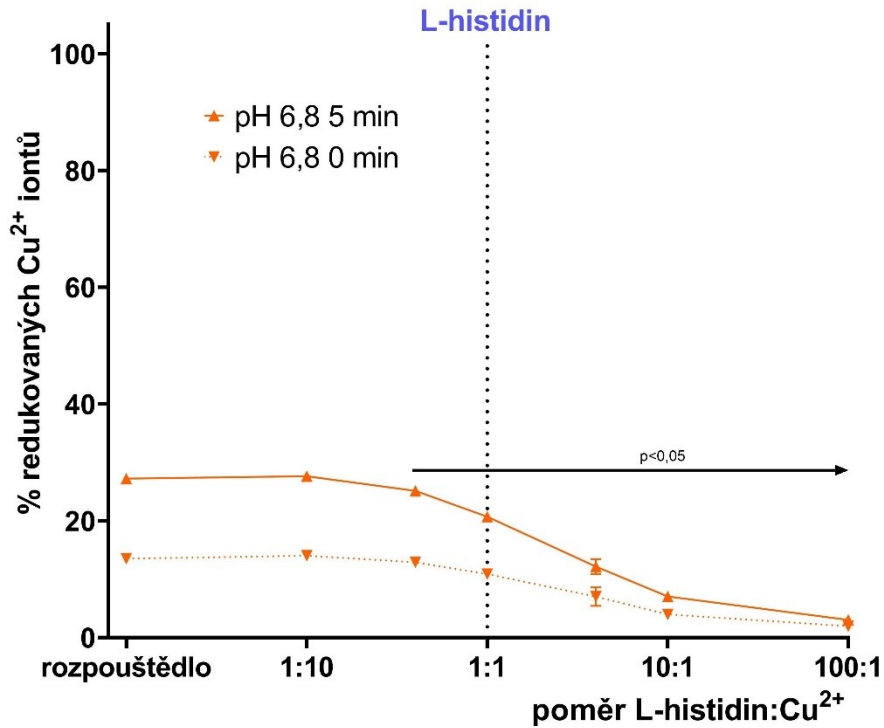
5.3.1 Redukce měďnatých iontů – metoda s BCS

Měření redukční aktivity testovaných látek o různé koncentraci probíhalo *in vitro* při pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5 v čase 0 (zobrazeny jen některé výsledky) a 5 minut.

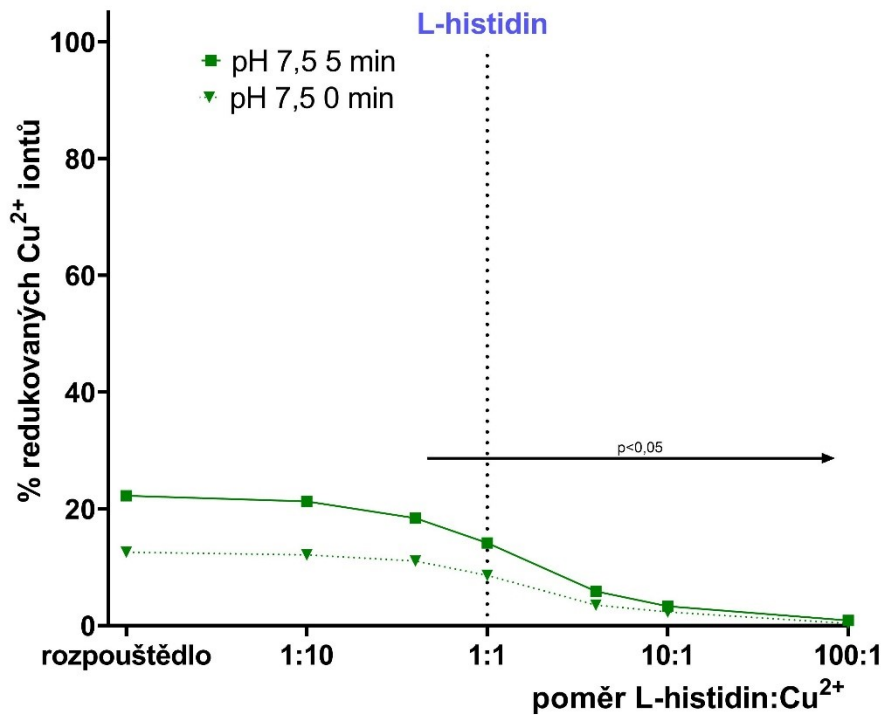
Naměřené hodnoty byly přeneseny do grafů (Obrázky 33–47). Osa X představuje poměr koncentrací testované látky a roztoku Cu^{2+} iontů, zatímco osa Y vyjadřuje % redukováných Cu^{2+} iontů. Černé šipky znamenají statisticky odlišné hodnoty v porovnání s rozpouštědlem (doplněné o p-hodnotu). Černá šipka u N-acetylcysteinu a L-cysteinu platí pro všechny použité hodnoty pH. Výsledky měření při různých hodnotách pH jsou barevně odlišeny.



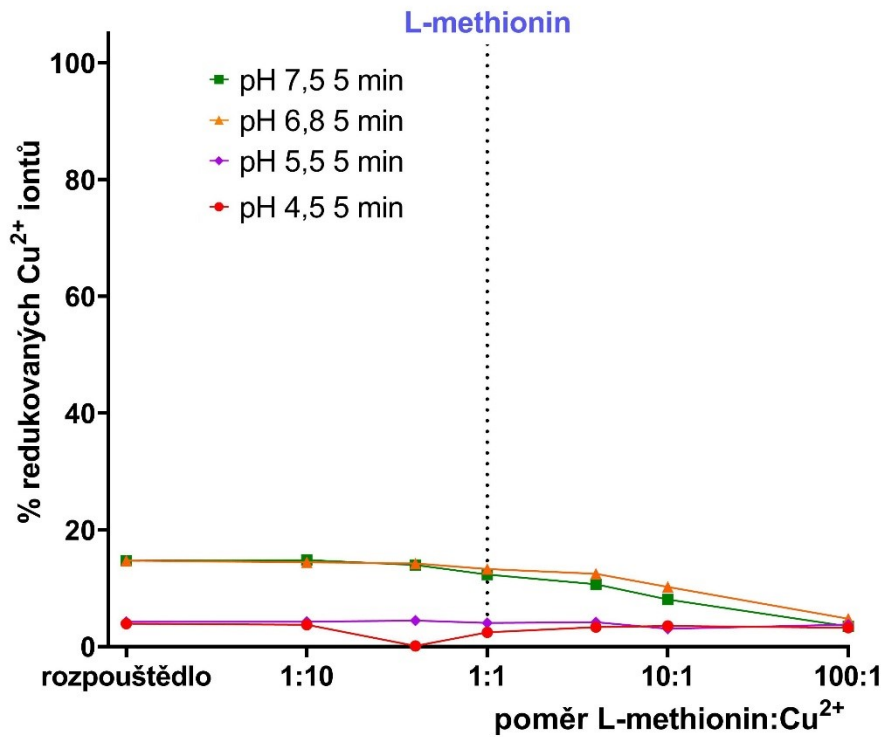
Obrázek 33: Grafické zobrazení schopnosti L-histidinu redukovat Cu^{2+} ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



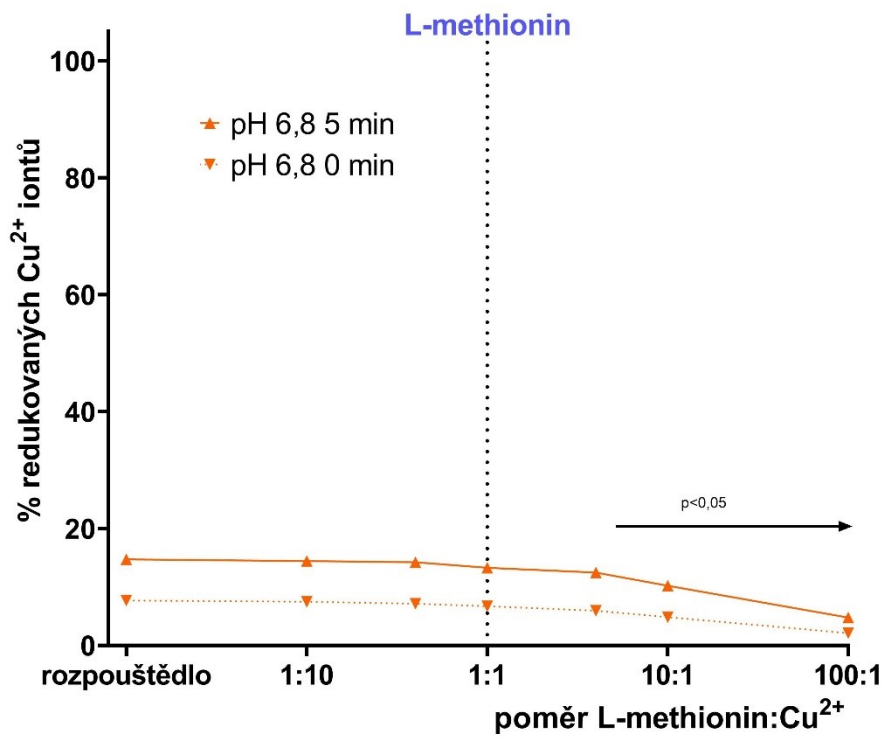
Obrázek 34: Grafické zobrazení schopnosti L-histidinu redukovat Cu^{2+} ionty při pH 6,8 v čase 0 a 5 minut – metoda s BCS



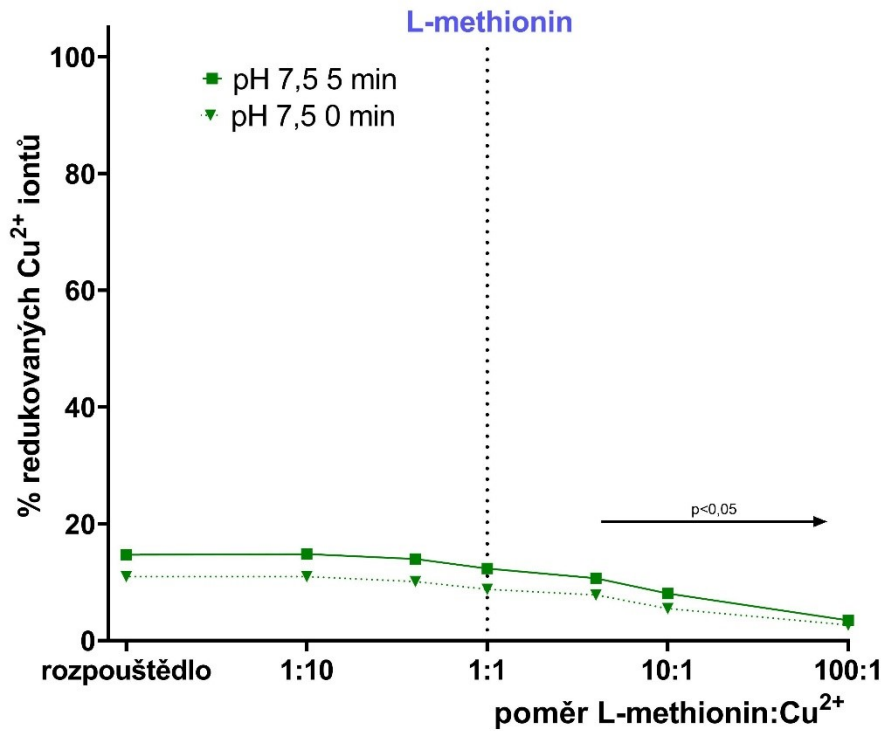
Obrázek 35: Grafické zobrazení schopnosti L-histidinu redukovat Cu^{2+} ionty při pH 7,5 v čase 0 a 5 minut – metoda s BCS



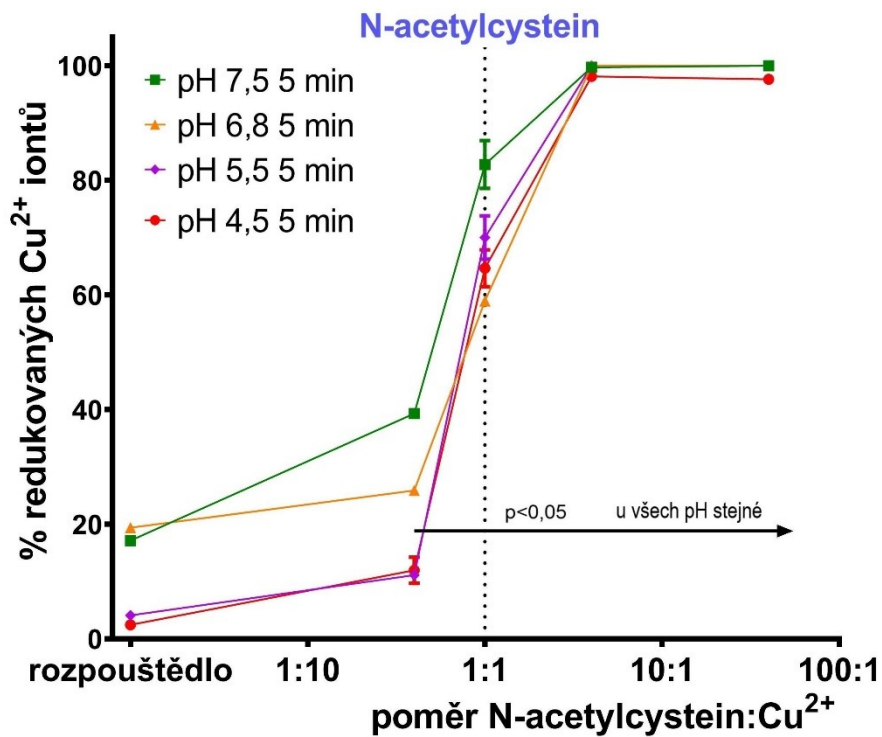
Obrázek 36: Grafické zobrazení schopnosti L-methioninu redukovat Cu²⁺ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



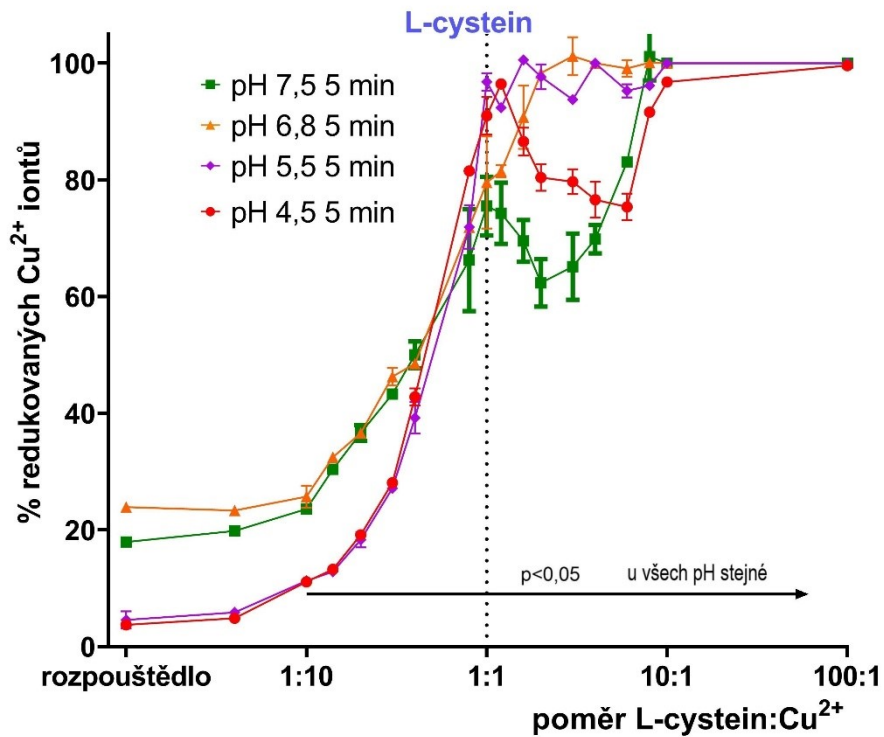
Obrázek 37: Grafické zobrazení schopnosti L-methioninu redukovat Cu²⁺ ionty při pH 6,8 v čase 0 a 5 minut – metoda s BCS



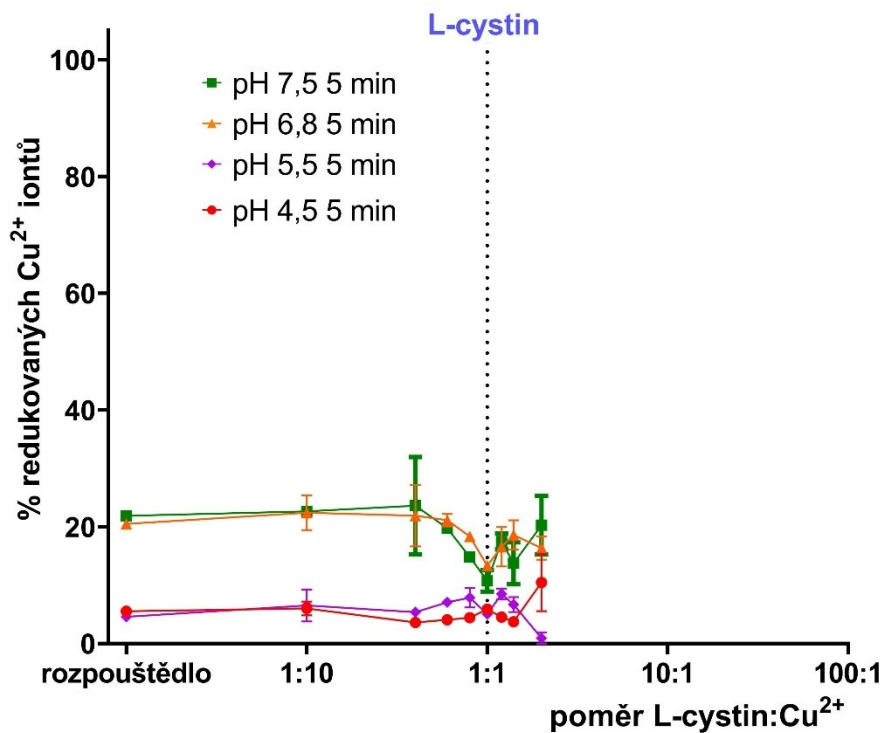
Obrázek 38: Grafické zobrazení schopnosti L-methioninu redukovat Cu²⁺ ionty při pH 7,5 v čase 0 a 5 minut – metoda s BCS



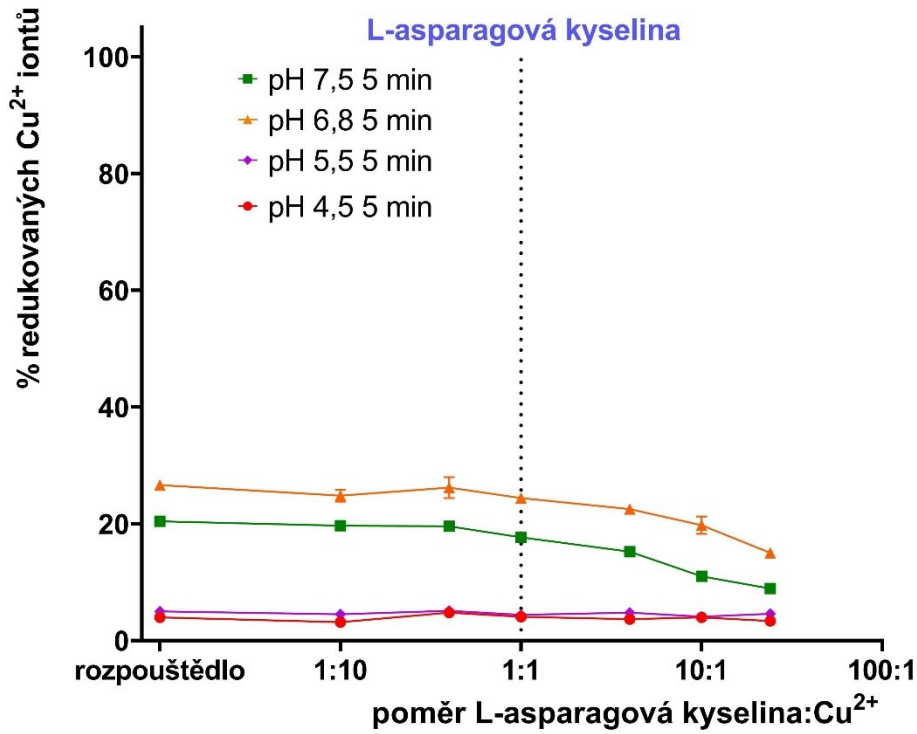
Obrázek 39: Grafické zobrazení schopnosti N-acetylcysteinu redukovat Cu²⁺ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



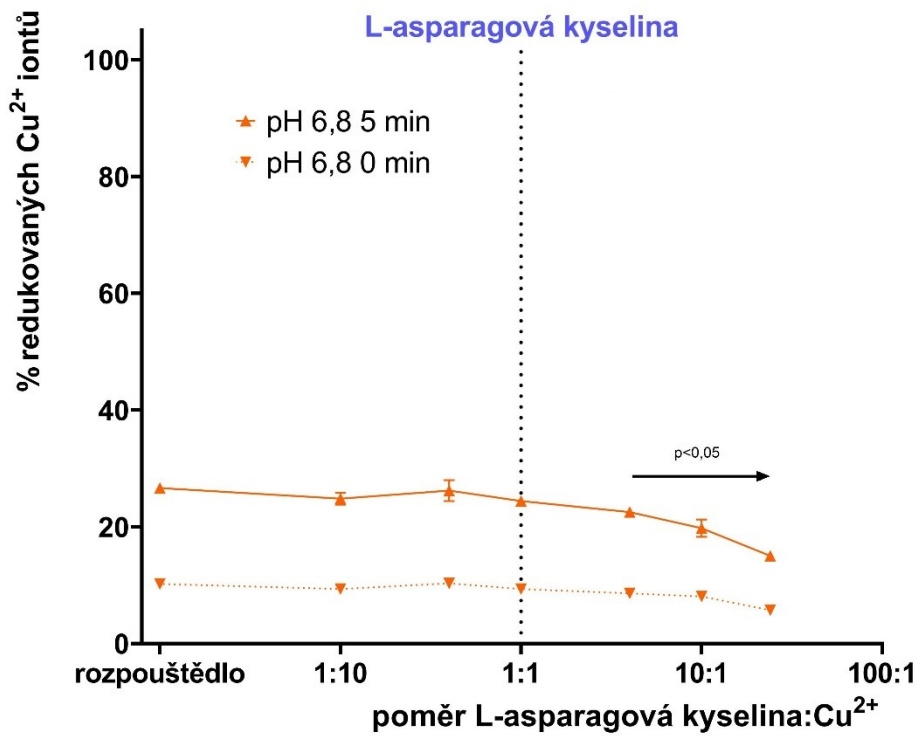
Obrázek 40: Grafické zobrazení schopnosti L-cysteinu redukovat Cu^{2+} ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



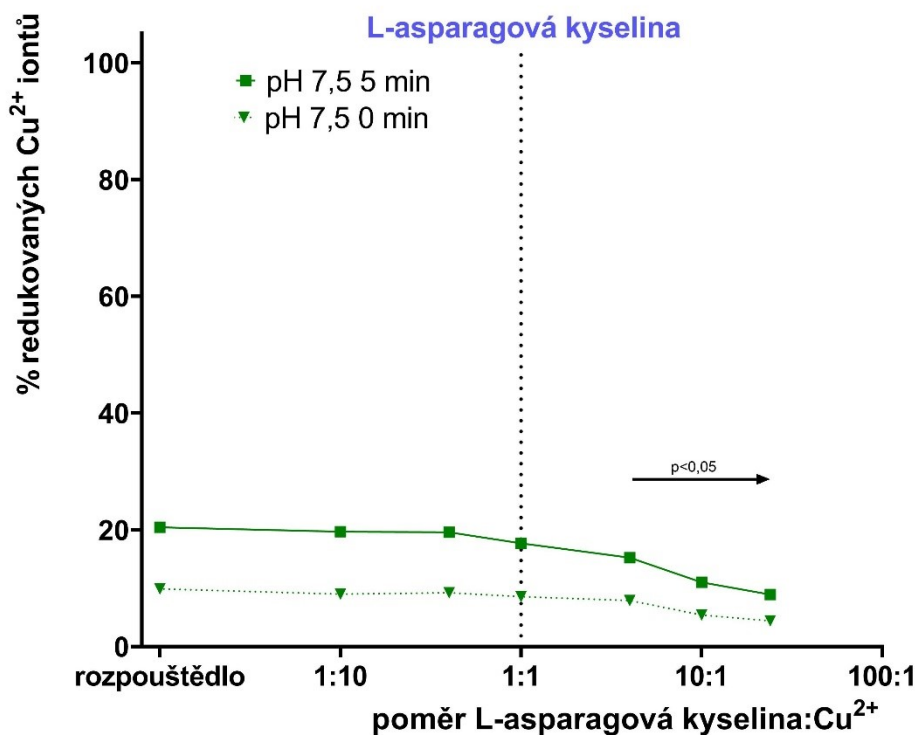
Obrázek 41: Grafické zobrazení schopnosti L-cystinu redukovat Cu^{2+} ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



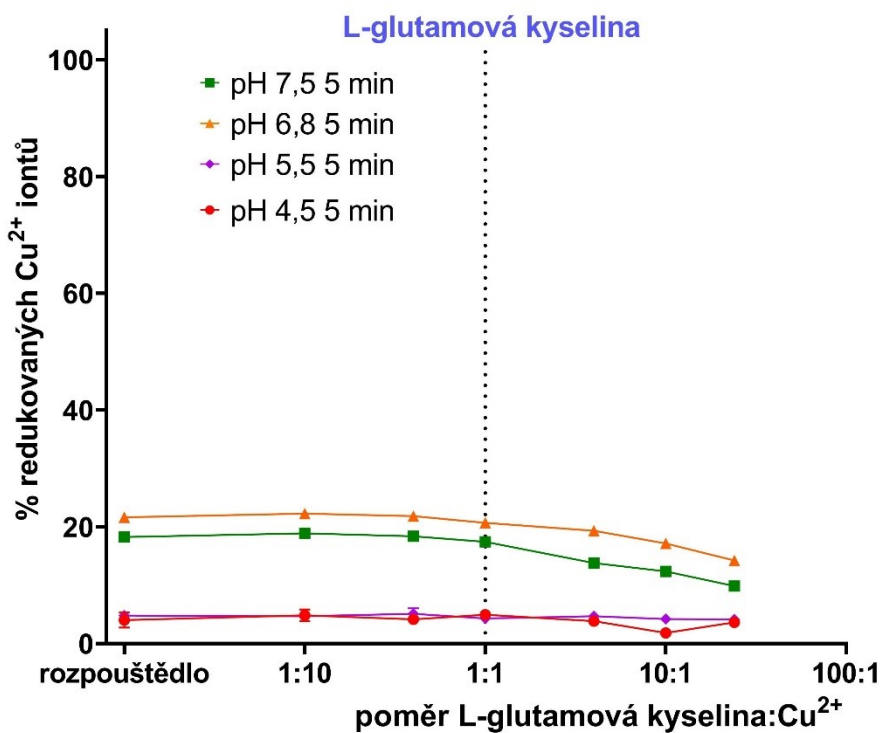
Obrázek 42: Grafické zobrazení schopnosti L-asparagové kyseliny redukovat Cu²⁺ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



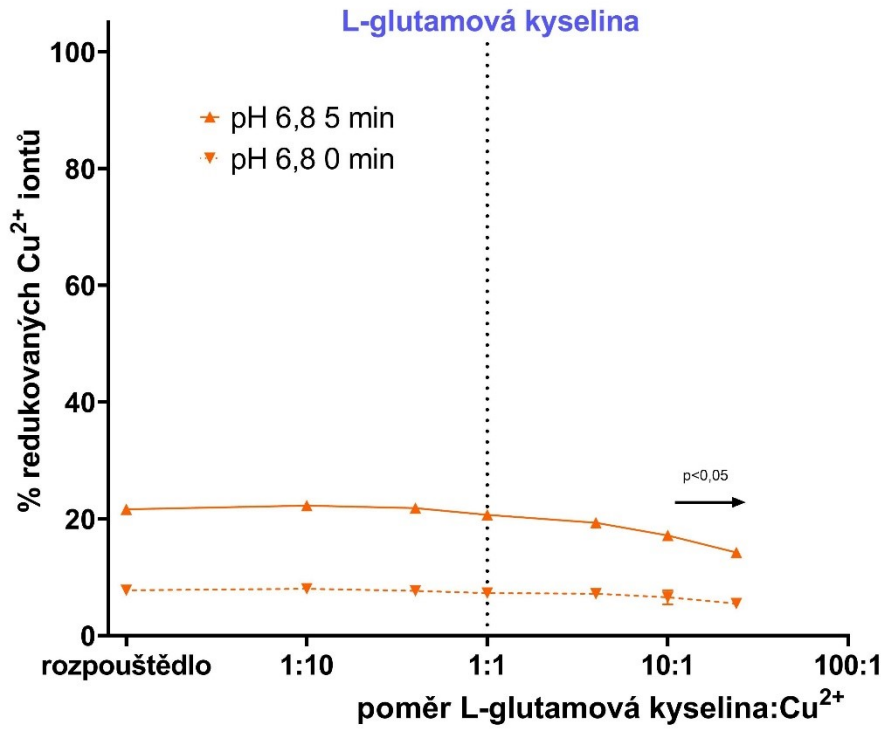
Obrázek 43: Grafické zobrazení schopnosti L-asparagové kyseliny redukovat Cu²⁺ ionty při pH 6,8 v čase 0 a 5 minut – metoda s BCS



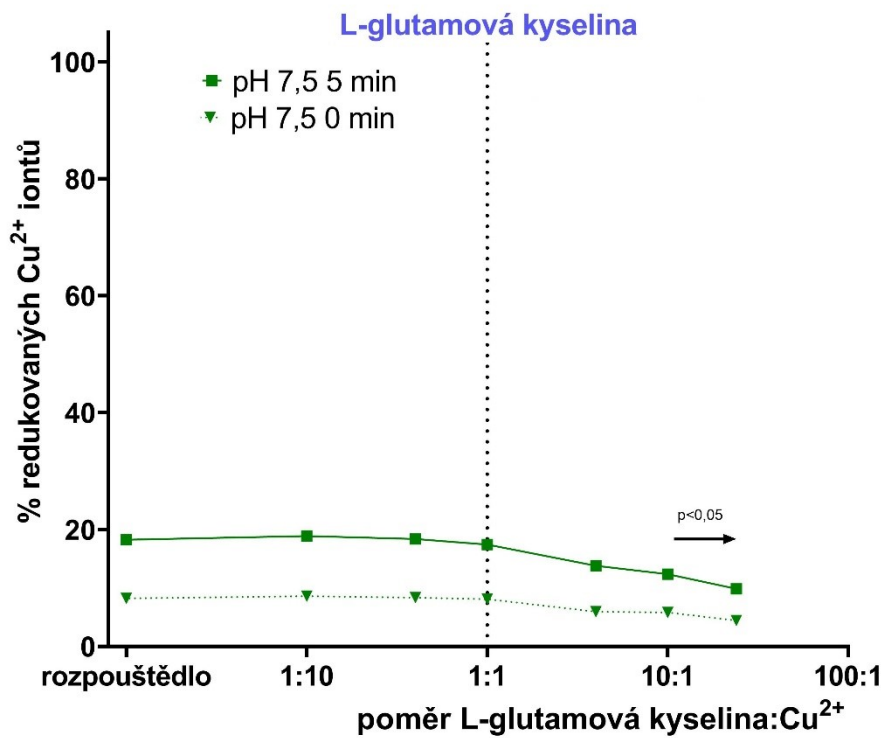
Obrázek 44: Grafické zobrazení schopnosti L-asparagové kyseliny redukovat Cu²⁺ ionty při pH 7,5 v čase 0 a 5 minut – metoda s BCS



Obrázek 45: Grafické zobrazení schopnosti L-glutamové kyseliny redukovat Cu²⁺ ionty při různém pH v čase 5 minut – metoda s BCS



Obrázek 46: Grafické zobrazení schopnosti L-glutamové kyseliny redukovat Cu²⁺ ionty při pH 6,8 v čase 0 a 5 minut – metoda s BCS



Obrázek 47: Grafické zobrazení schopnosti L-glutamové kyseliny redukovat Cu²⁺ ionty při pH 7,5 v čase 0 a 5 minut – metoda s BCS

Z předešlých grafů je patrné, že významnou redukci Cu^{2+} iontů vykázaly N-acetylcystein (Obrázek 39) a L-cystein (Obrázek 40) při všech použitých pH. Redukce dosáhla 100 %. U ostatních testovaných látek nebyla redukční aktivita zaznamenána (Obrázky 33, 36, 41, 42 a 45).

6 DISKUZE

Měď patří mezi nezbytné stopové prvky, jelikož se účastní mnoha redoxních reakcí v živých organismech. Je zde součástí kuproenzymů, jež pro svou funkci vyžadují měď. Podílí se na mnoha životně důležitých procesech, jako je buněčné dýchání, eliminace reaktivních forem kyslíku a biosyntéza neurotransmiterů nebo pojivových tkání. Na druhou stranu, v případě nadbytku nebo dysregulace mědi, její schopnost cyklovat mezi oxidačními stavy může být příčinou uvolňování volných radikálů. Ty mohou způsobit poškození buněčných komponent, a tak se podílet na vzniku různých patologických stavů. Proto je udržování buněčné homeostázy životně důležité.^{1,5}

Chelatace mědi spočívá v navázání iontů mědi k ligandům za vzniku chelátových komplexů. Jedná se o potenciální terapeutický nástroj u patologických stavů spojených s přebytkem nebo dysregulací mědi.

U Menkesovy choroby je třeba, aby chelátory fungovaly jako tzv. ionofory a podporovaly tak dodávání mědi do deficitních tkání, obzvláště do mozku. V současnosti je však klinické použití chelátorů mědi omezeno pouze na léčbu Wilsonovy choroby. V tomto případě chelátory vytváří komplexy s nahromaděnými ionty mědi a zvyšují jejich vylučování z organismu. Jako léčiva první volby jsou používány D-penicilamin a trientin. Bylo však zjištěno, že D-penicilamin je poměrně slabým chelátorem mědi v porovnání s trientinem. V prvních týdnech terapie D-penicilaminem je zvýšené riziko vzniku nežádoucích účinků, zejména neurologických. Navíc byly zjištěny jeho měď-redukující účinky, které mohou vést k oxidačnímu stresu. Trientin je sice bezpečnější alternativou pro pacienty netolerující D-penicilamin, avšak při pH 4,5 a 5,5 tvoří nestabilní komplexy s mědí.^{1, 11, 24, 26} Z toho vyplývá význam screeningu nových účinných chelátorů mědi, při kterém je potřeba se zaměřit mimo jiné na vliv pH.

Chelátory určené pro léčbu by měly ideálně napodobovat funkci chelatačních látek, které se v organismu přirozeně vyskytují.¹¹ Jak již bylo zmíněno, struktura těchto endogenních chelátorů je tvořena AMK propojenými peptidovými vazbami. Z tohoto důvodu se tato diplomová práce zaměřuje na schopnost vybraných AMK chelatovat ionty mědi. Zároveň bylo třeba zjistit i jejich měď-redukující aktivitu, která by v praxi mohla být příčinou prooxidačního účinku.

V rámci této diplomové práce byly testovány esenciální AMK L-histidin a L-methionin, dále neesenciální AMK L-cystein, jeho dimer L-cystin a látka od L-cysteinu odvozená, N-acetylcystein. Taktéž byly zkoumány neesenciální AMK L-asparagová a L-glutamová kyselina. Všechny testované látky ve své struktuře obsahují alespoň 1 atom kyslíku, dusíku nebo síry, které by mohly fungovat jako ligandy, a tedy poskytovat elektronové páry iontům mědi za vzniku chelátových komplexů.

Ke stanovení měď-chelatační a měď-redukující aktivity byly použity 2 spektrofotometrické metody, které jsou založeny na indikátoru HEM nebo BCS. Zatímco metoda založená na HEM slouží především k odhalení méně účinných chelátorů Cu^{2+} iontů, metoda využívající BCS je vhodná k objevení účinnějších chelátorů Cu^{2+} iontů, stejně tak Cu^+ iontů. Navíc slouží i ke zjištění redukce Cu^{2+} iontů. Mezi nevýhody metody s HEM patří nemožnost jejího použití při pH 4,5 a také riziko falešně pozitivního výsledku u redukujících látek. Proto by měla být vždy použita i metoda s BCS, u níž se tyto nedostatky nevyskytují, protože funguje na jiném principu.^{1, 26, 51} *In vitro* měření probíhala v pufrch o pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5, které odpovídají (pato)fyziologickému prostředí v lidském organismu. Pufr s pH 4,5 představuje prostředí, které se vyskytuje ve tkáni, kde se tvoří karcinom, nebo při probíhajícím infarktu myokardu. Pufr s pH 5,5 má podobné pH jako je v lysozomech. Pufr s pH 6,8 se blíží prostředí v duodenu a pufr s pH 7,5 lidské plazmě.

Z grafů při použití metody s HEM lze vyčíst, že všechny testované látky byly schopny chelatovat Cu^{2+} ionty při všech použitých pH (Obrázky 17–25). Je patrné, že se jedná o rostoucí funkci. Chelatace Cu^{2+} iontů se téměř u všech testovaných látek nejvíce projevila při koncentračním poměru 10:1 (poměr testované látky a iontů mědi), kdy dosahovala maxima 100 %. Výjimkami jsou L-methionin (Obrázky 17–19) a kyselina L-glutamová (Obrázky 23–25), kdy 100% chelatace Cu^{2+} iontů probíhala až při vyšších koncentračních poměrech u všech použitých pH. Nejvyšší schopnost chelatace byla zjištěna u L-cysteinu při pH 5,5. V koncentračním poměru 1:1 dosahovala již 80 % (Obrázek 20).

Porovnáním chelatační aktivity za pomoci 95% predikčních intervalů u metody s HEM bylo zjištěno, že při chelataci Cu^{2+} iontů esenciálními AMK L-histidinem a L-methioninem se vyskytovala největší shoda při pH 7,5 (Obrázek 19). Pokud se zaměříme na koncentrační poměr 1:1, L-histidin chelatoval nejvíce při pH 5,5 (Obrázek 17), kdy chelatační aktivita dosáhla 50 %. Se zvyšujícím pH při tomto koncentračním poměru však schopnost chelatace klesala

(Obrázky 17–19). U L-methioninu byla při poměru 1:1 zjištěna nejvyšší aktivita při pH 6,8, kdy bylo zchelatováno přibližně 45 % Cu^{2+} iontů (Obrázek 18).

Z křivek 95% predikčních intervalů, které znázorňují chelatační aktivitu N-acetylcysteinu, L-cysteinu a L-cystinu (Obrázky 20–22) je patrné, že se chelatace Cu^{2+} iontů nejvíce shoduje u N-acetylcysteinu a L-cysteinu, a to při pH 5,5 (Obrázek 20). L-cystein chelatoval Cu^{2+} ionty z těchto látek nejvíce při všech použitých pH, obzvláště při pH 5,5, jak již bylo zmíněno. Pokud se dále zaměříme na koncentrační poměr 1:1, jeho chelatační schopnost se se zvyšujícím pH snižovala a při pH 7,5 dosahovala přibližně 60 % (Obrázek 22). Podobný jev lze pozorovat u L-cystinu, který ale chelatoval méně než L-cystein. U L-cystinu se chelatační aktivita projevila až při vyšším koncentračním poměru u všech použitých pH oproti N-acetylcysteinu a L-cysteinu.

U metody s HEM byly také mezi sebou porovnány chelatační schopnosti L-asparagové a L-glutamové kyseliny (Obrázky 23–25). Z 95% predikčních intervalů lze vyčíst, že chelatační aktivita kyselin L-asparagové a L-glutamové se nejvíce shoduje při pH 7,5 (Obrázek 25). Také je patrné, že kyselina L-asparagová má lepší schopnost chelatovat Cu^{2+} ionty než kyselina L-glutamová, a to při všech použitých pH. Při pH 5,5 za koncentračního poměru 1:1 kyselina L-asparagová chelatovala přibližně 70 % Cu^{2+} iontů, zatímco kyselina L-glutamová jen kolem 40 % (Obrázek 23). Se zvyšujícím pH se chelatační schopnost kyseliny L-asparagové snižovala.

V případě metody s BCS byla zjištěna mírná chelatační aktivita pouze u L-histidinu (Obrázek 26) a L-cysteinu (Obrázek 29). L-histidin chelatoval Cu^{2+} i Cu^+ ionty při pH 6,8 a 7,5, kdy u něj maximum aktivity bylo pozorováno až při koncentračním poměru 100:1. Chelatace Cu^{2+} iontů dosáhla maxima přibližně při 50 % u pH 6,8. Při pH 7,5 za stejného koncentračního poměru dosáhla kolem 20 %. Chelatace Cu^+ iontů byla významnější. Při pH 7,5 L-histidin chelatoval přibližně 60 % těchto iontů, zatímco při pH 6,8 jen 30 %. U L-cysteinu byla aktivita pozorována při pH 4,5, kdy došlo k chelataci kolem 45 % Cu^{2+} iontů za koncentračního poměru 7:1.

Metodou s BCS byla také zkoumána schopnost testovaných látek redukovat Cu^{2+} ionty na ionty Cu^+ . U látek, kde se redukce lišila oproti rozpouštědлу (ultračistá voda), byly vloženy grafy také v čase 0 (Obrázky 34, 35, 37, 38, 43, 44, 46 a 47). Redukční schopnost rozpouštědla měřených látek byla vyšší při pH 6,8 a 7,5, kdy se pohybovala okolo 20 %, ale u vyššího poměru testované látky ku Cu^{2+} iontům klesala. Při nižších pH (4,5 a 5,5) byla téměř nulová. Významnou redukci v porovnání s rozpouštědlem vykázal pouze N-acetylcystein (Obrázek 39) a L-cystein

(Obrázek 40) při všech použitých pH. Redukce u obou látek dosáhla 100 % při koncentračním poměru 10:1. V případě N-acetylcysteinu byla statisticky významná redukční aktivita pozorována od koncentračního poměru 1:5. U L-cysteinu se projevila již při poměru 1:10. Redukční aktivita se u ostatních testovaných látek neprojevila. U L-histidinu, L-methioninu, L-asparagové kyseliny a L-glutamové kyseliny došlo při pH 6,8 a 7,5 za vyššího koncentračního poměru testované látky ke snížení spontánní redukce, což bylo pravděpodobně způsobeno chelatací Cu^{2+} iontů. Tento jev se nejvýrazněji projevila u L-histidinu.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.4.6.2, N-acetylcystein slouží jako prekurzor cysteinu, čímž při perorálním podání podporuje syntézu důležitého endogenního antioxidantu s chelatačními schopnostmi, glutathionu. Strukturu tohoto tripeptidu kromě cysteinu tvoří glutamát a glycin. Glutathion existuje v redukovaném (GSH) a oxidovaném stavu (GSSG). Ve formě GSH je schopen pomocí thiolové skupiny cysteinu poskytovat redukční ekvivalent ostatním molekulám za vzniku svého dimeru, GSSG. Studie zabývající se měď-redukující i měď-chelatační aktivitou u GSH a GSSG pomocí stejných spektrofotometrických metod byly již provedeny. U GSH byla potvrzena silná redukční aktivita, zatímco GSSG vynikal chelatační schopností a redukce nebyl schopen.^{51, 52} Z těchto informací a výsledků měření lze usoudit, že se na redukční aktivitě, která byla v rámci experimentů této diplomové práce u L-cysteinu a N-acetylcysteinu zjištěna, pravděpodobně podílejí thiolové skupiny obsažené ve struktuře těchto látek. Nízkou redukční aktivitu u L-cysteinu lze zase přisuzovat podobnosti se strukturou GSSG, ve které jsou obsaženy cysteiny propojené disulfidovou vazbou.

Z testovaných látek byl již v jiné studii testován N-acetylcystein, u kterého se také zkoumala měď-chelatační a měď-redukující aktivita stejnými spektrofotometrickými metodami. Mnou získané výsledky během experimentálního měření s výsledky této studie korespondují.⁵³

7 ZÁVĚR

Všechny testované látky prokázaly dobrou chelatační schopnost při použití metody s HEM, avšak při metodě s BCS, kdy je vytvářeno kompetitivnější prostředí, většina tuto schopnost neměla. Testované esenciální i neesenciální aminokyseliny spolu s N-acetylcysteinem lze tedy spíše považovat za slabé chelátory mědi.

Pouze u esenciální aminokyseliny L-histidinu byla metodou s BCS zjištěna chelatace Cu^{2+} a Cu^+ iontů. Chelatace však probíhala až při vyšší koncentraci této látky a za vyššího pH (6,8 a 7,5). U L-histidinu nebyla zaznamenána redukční aktivita, z čehož je možné usoudit, že ze všech *in vitro* testovaných látek se zdá být nejvhodnějším kandidátem na chelátor mědi, a proto je třeba jej dále zkoumat. Zvláštní chování vykázal L-cystein, u kterého byla touto metodou zjištěna mírná chelatace Cu^{2+} iontů při pH 4,5. Tato látka však vykazovala vysokou redukční aktivitu při všech pH, proto nebude pravděpodobně využitelná jako chelátor mědi v praxi.

U N-acetylcysteinu lze předpokládat při použití metody s HEM falešně pozitivní výsledek, protože pomocí metody s BCS chelatační aktivita nebyla zaznamenána, zato redukční aktivita byla při všech pH velmi vysoká. Další zkoumání, které by mohlo tuto hypotézu vyvrátit, však nebylo vzhledem k časové náročnosti provedeno.

Z výsledků měření vyplývá, že testované látky jsou schopny interagovat s ionty mědi, avšak s různou intenzitou. V plánu je provést testování s dalšími přechodnými kovy, jako je železo, zinek a kobalt.

8 LITERATURA

1. Říha M., Karlíčková J., Filipický T., Macáková K., Rocha L., Bovicelli P., Silvestri I. P., Saso L., Jahodář L., Hrdina R., Mladěnka P.: In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Adv.* 4 (62), 32628–32638 (2014).
2. Stern B. R., Solioz M., Krewski D., Aggett P., Aw T. C., Baker S., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C., Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., Starr T.: Copper and human health: Biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 10 (3), 157–222 (2007).
3. Collins J. F., Klevay L. M.: Copper. *Adv. Nutr.* 2(6), 520–522 (2011).
4. Gaetke L. M., Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Arch. Toxicol.* 88(11), 1929–1938 (2014).
5. Ojha R., Prasad A. N.: Menkes disease: What a multidisciplinary approach can do. *J. Multidiscip. Healthc.* 9, 371–385 (2016).
6. Pavelková M., Vysloužil J., Kubová K., Vetchý D.: Biological role of copper as an essential trace element in the human organism. *Čes. slov. farm.* 67(4), 143–153 (2018).
7. Shanbhag V. C., Gudekar N., Jasmer K., Papageorgiou C., Singh K., Petris M. J.: Copper metabolism as a unique vulnerability in cancer. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1868 (2), 118893 (2020).
8. Ferreira, C. R., Gahl W. A.: Disorders of metal metabolism. *Transl. Sci. Rare Dis.* 2(3-4), 101–139 (2017).
9. 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. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 437381 (2015).
10. Bossak K., Drew S. C., Stefaniak E., Płonka D., Bonna A., Bal W.: The Cu(II) affinity of the N-terminus of human copper transporter CTR1: Comparison of human and mouse sequences. *J. Inorg. Biochem.* 182, 230–237 (2018).
11. Horn N., Møller L. B., Nurchi V. M., Aaseth, J.: Chelating principles in Menkes and Wilson diseases: Choosing the right compounds in the right combinations at the right time. *J. Inorg. Biochem.* 190, 98–112 (2019).

12. Hermann W.: Classification and differential diagnosis of Wilson's disease. *Ann. Transl. Med.* 7 (2), 1–14 (2019).
13. Beyens, A., Van Meensel, K., Pottie, L., De Rycke, R., De Bruyne, M., Baeke, F., Hoebeke, P., Plasschaert, F., Loeys, B., De Schepper, S., Symoens, S., & Callewaert, B.: Defining the Clinical, Molecular and Ultrastructural Characteristics in Occipital Horn Syndrome: Two New Cases and Review of the Literature. *Genes* 10(7), 1–15 (2019).
14. Deschamps P., Kulkarni P. P., Gautam-Basak M., Sarkar B.: The saga of copper(II)–L-histidine. *Coord. Chem. Rev.* 249(9–10), 895–909 (2005).
15. Bandmann O, Weiss K. H., Kaler S. G.: Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol.* 14 (1), 103–113 (2015).
16. Chang, I. J., Hahn S. H.: The genetics of Wilson disease. *Handb. Clin. Neurol.* 142, 19–34 (2017).
17. Członkowska A., Litwin T., Dusek P., Ferenci P., Lutsenko S., Medici V., Rybakowski J. K., Weiss K. H., Schilsky M.L.: Wilson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4(1), 1–44 (2018).
18. Aggarwal A., Bhatt M.: Advances in Treatment of Wilson Disease. *Tremor other hyperkinet. mov.* 8, 1–13 (2018).
19. Hordyjewska A., Popiołek Ł., Kocot J.: The many "faces" of copper in medicine and treatment. *Biometals* 27(4), 611–621 (2014).
20. Scheiber I. F., Mercer J. F., Dringen, R.: Metabolism and functions of copper in brain. *Prog. Neurobiol.* 116, 33–57 (2014).
21. Medeiros D. M.: Copper, iron, and selenium dietary deficiencies negatively impact skeletal integrity: A review. *Exp. Biol. Med. (Maywood, N. J.)* 241(12), 1316–1322 (2016).
22. Mezzaroba L., Alfieri D. F., Colado Simão A. N., Vissoci Reiche E. M.: The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology* 74, 230–241 (2019).
23. Moussiegt A., Ferreira L., Aboab J., Silva D.: She Has The Blues: An Unusual Case of Copper Sulphate Intoxication. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.* 7(2), 1–5 (2020).
24. Lawson M. K., Valko M., Cronin M. T. D., Jomová K.: Chelators in Iron and Copper Toxicity. *Curr. Pharmacol. Rep.* 2, 271–280 (2016).
25. Hamisu A. M., Ariffin A., Wibowo A. C.: Cation exchange in metal-organic frameworks (MOFs): The hard-soft acid-base (HSAB) principle appraisal. *Inorganica Chim. Acta* 511, 119801 (2020).

26. Říha M., Karlíčková J., Filipský 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. *J. Inorg. Biochem.* 123, 80–87 (2013).
27. Migkos T., Applová L., Horký P., Tvrký V., Karlíčková J., Macáková K., Hrubša M., Catapano C. M., Tomanek M., Pour M., Mladěnka P.: The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper. *Phytomedicine* 62, 152974 (2019).
28. Wang F., Jiao P., Qi M., Frezza M., Dou, Q. P., Yan B.: Turning Tumor-Promoting Copper into an Anti-Cancer Weapon via High-Throughput Chemistry. *Curr. Med. Chem.* 17, 2685–2698 (2010).
29. Rose A. J.: Amino Acid Nutrition and Metabolism in Health and Disease. *Nutrients* 11(11), 2623 (2019).
30. Harvey R. A., Ferrier D.: *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2011. ISBN 978-1-60913-998-8.
31. Rodwell V. W., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J., Weil P. A.: *Harper's illustrated biochemistry*. 30th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2018. ISBN 978-0071825344.
32. Kamei Y., Hatazawa Y., Uchitomi R., Yoshimura R., Miura S.: Regulation of Skeletal Muscle Function by Amino Acids. *Nutrients* 12(1), 261 (2020).
33. Jhamb S. V., Liang X., Gani R., Hukkerikar A. S.: Estimation of physical properties of amino acids by group-contribution method. *Chem. Eng. Sci.* 175, 148–161 (2018).
34. Spilková J. a kolektiv. *Farmakognozie*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
35. Martinásková J.: Farmaceutická péče o pacienty s vypadáváním vlasů. *Prakt. Lékáren.* 11(6), 219–221 (2015).
36. Bröer S., Bröer A.: Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem. J.* 474(12), 1935–1963 (2017).
37. Vašina J., Svoboda M., Lakomý R., Kazda T., Adam J., Řehák Z.: Využití ¹¹C-methioninu pro PET/CT vyšetření pacientů s tumory mozku – soubor 16 pacientů. *Nukl. Med.* 7(4), 62–67 (2018).
38. Bischoff R., Schlüter H.: Amino acids: Chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *J. Proteomics* 75 (8), 2275–2296 (2012).
39. Hoffer L. J.: Parenteral Nutrition: Amino Acids. *Nutrients* 9(3), 257 (2017).

40. Watford M., Wu G.: Protein. *Adv. Nutr.* 9(5), 651–653 (2018).
41. Wu G.: Dietary protein intake and human health. *Food Funct.* 7(3), 1251–1265 (2016).
42. D'Este M., Alvarado-Morales M., Angelidaki I.: Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review. *Biotechnol. Adv.* 36(1), 14–25 (2018).
43. Gould R. L., Pazdro, R.: Impact of Supplementary Amino Acids, Micronutrients, and Overall Diet on Glutathione Homeostasis. *Nutrients* 11(5), 1056 (2019).
44. Motta C., Matos A. S., Soares A., Gonzales G. B., Castanheira I., Cabral I., Tavares N., Nicolai M.: Amino acid profile of foods from the Portuguese Total Diet Pilot Study. *J. Food. Compost. Anal.* 92, 103545 (2020).
45. Kortt A. A., Caldwell J. B.: Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine-rich albumin. *Phytochemistry* 29(9), 2805–2810 (1990).
46. Sorrequieta A., Ferraro G., Boggio S. B., Valle E. M.: Free amino acid production during tomato fruit ripening: a focus on L-glutamate. *Amino Acids* 38(5), 1523–1532 (2010).
47. Kumar V., Sharma A., Kohli S. K., Yadav P., Bali S., Bakshi P., Parihar R. P., Yuan H., Yan D., He Y., Wang J., Yang Y., Bhardwaj R., Thukral A. K., Zheng B.: Amino acids distribution in economical important plants: a review. *Biotechnol. Res. Innov.* 3(2), 197–207 (2019).
48. Chevallier V., Zoller M., Kochanowski N., Andersen M.R., Workman Ch. T., Malphettes L.: Use of novel cystine analogs to decrease oxidative stress and control product quality. *J. Biotechnol.* 327, 1–8 (2021).
49. Adil M., Amin S. S., Mohtashim M.: N-acetylcysteine in dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 84(6), 652–659 (2018).
50. Flora S. J.: Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2(4), 191–206 (2009).
51. Macáková K., Catapano M. C., Tvrdý V., Klimková K., Karlíčková J., Mladěnka P.: Hematoxylin assay of cupric chelation can give false positive results. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 52, 29–36 (2019).
52. Salanciová I.: *Diplomová práce*. Interakcie redukovaného a oxidovaného glutathionu s meďou, železom a zinkom. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2020.
53. Kladivová A.: *Diplomová práce*. Chelatce iontů mědi chelátory obsahujícími thiolovou skupinu. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2020.

9 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Nikola Holotíková

Školitel: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Název diplomové práce: Mohou být esenciální aminokyseliny považovány za chelátory mědi?

Měď je stopovým prvkem, který hraje důležitou roli v lidském organismu. Hladiny mědi v těle musí být pečlivě kontrolovány, protože narušení homeostázy mědi může způsobit oxidační poškození, která mohou vést k různým patologickým stavům. Chelataci mědi lze považovat za potenciální terapeutický nástroj.

Chelátory určené pro léčbu by měly ideálně napodobovat chelatační látky, zejména peptidy a proteiny, jež jsou důležité pro regulaci homeostázy mědi. Jejich struktura je tvořena aminokyselinami propojenými peptidovými vazbami, proto je tato práce zaměřena na některé z nich. Proteinogenní aminokyseliny lze rozdělit na esenciální a neesenciální. Esenciální je nutno přijímat potravou.

Cílem této práce bylo porovnat měď-chelatační a měď-redukující aktivitu esenciálních aminokyselin L-histidinu a L-methioninu, a neesenciálních aminokyselin L-cysteinu, jeho dimeru L-cystinu, L-asparagové a L-glutamové kyseliny. Také byla zkoumána látka odvozená od L-cysteinu, N-acetylcystein. Všechny látky byly testovány pomocí spektrofotometrických metod při pH, která odpovídají (pato)fyziologickému prostředí v lidském těle.

Všechny testované látky prokázaly dobrou chelatační schopnost při použití metody s hematoxylinem. Při metodě s bathokuproinem, kdy je vytvářeno kompetitivnější prostředí, většina tuto schopnost neměla. Testované látky lze tedy spíše považovat za slabé chelátory mědi. Nejvyšší chelatační aktivita byla zjištěna u esenciální aminokyseliny L-histidinu. Schopnost redukovat ionty mědi byla zaznamenána pouze u N-acetylcysteinu a L-cysteinu.

Touto studií bylo zjištěno, že všechny vybrané aminokyseliny mohou interagovat s mědí, avšak s různou intenzitou.

Klíčová slova: esenciální aminokyseliny, chelatace, redukce, měď

10 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Nikola Holotíková

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of Thesis: Can essential amino acids be considered as copper chelators?

Copper is a trace element playing an important role in the human organism. Copper levels in the body have to be carefully controlled because disruption of copper homeostasis can cause oxidative damage which may lead to various pathologies. Chelation of copper can potentially be used as a therapeutic tool.

Medical chelators should ideally mimic chelators, especially peptides and proteins which are important for regulation of copper homeostasis. Their structure is formed by amino acids linked by peptide bonds. For this reason, the study is focused on selected amino acids. Proteinogenic amino acids are classified into essential and nonessential. Essential amino acids must be obtained from the diet.

The aim of this study was to compare the copper chelation and reduction activity of essential amino acids *L*-histidine and *L*-methionine, and nonessential amino acids *L*-cysteine, its dimer *L*-cystine, *L*-aspartic acid and *L*-glutamic acid. Also a *L*-cysteine-derived compound, *N*-acetylcysteine, was tested. All of them were tested using spectrophotometric methods at pHs which correspond to (patho)physiological environment of the human body.

All tested compounds showed good chelating ability in hematoxylin assay. However, with bathocuproine method, when more competitive conditions are created, most of them lost this ability. Therefore, tested amino acids can rather be considered as weak chelators of copper. The highest chelating activity was found in essential amino acid *L*-histidine. The ability to reduce copper ions was observed only in *N*-acetylcysteine and *L*-cysteine.

This study showed that all selected amino acids can interact with copper, but with different intensity.

Key words: essential amino acids, chelation, reduction, copper