

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie



MĚĎ REDUKUJÍCÍ ÚČINKY ISOFLAVONOIDŮ

COPPER REDUCING ACTIVITY OF ISOFLAVONOIDS

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2015

Kamila Ambrožová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za vedení diplomové práce, odborný dohled a cenné informace při experimentálním měření v laboratoři.

Také bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za tvorbu grafů a poskytnutí materiálů k dané problematice.

Mé poděkování také patří Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za poskytnutí laboratoře pro naměření mých výsledků. Tato diplomová práce vznikla za podpory grantů: GAUK 1220314B a FRVŠ 664/2011/A a výzkumného programu PRVOUK P-40.

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	7
1. Použité zkratky	8
2. Úvod	9
3. Cíl práce	10
4. Teoretická část	11
4.1. Význam mědi nejen v lidském těle	11
4.2. Fyziologické funkce mědi v těle	13
4.2.1. Kuproenzymy	14
Cytochromoxidáza	14
Ceruloplasmin	14
Superoxiddismutáza	15
Lysyloxidáza	17
4.3 Farmakokinetika mědi	17
4.3.1. Absorpce	17
4.3.2. Distribuce	17
4.3.3. Eliminace	19
4.4. Patofyziologie mědi	20
4.4.1 Nadbytek mědi v těle	21
Wilsonova choroba (WD)	21
4.4.2 Nedostatek mědi	26
Menkesova choroba (MD)	26
4.4.3 Alzheimerova choroba	27
4.4.4 Ateroskleróza	28
4.4.5 Rakovina	28
4.5 Redukce mědi	29
4.6 Isoflavonoidy	30
4.6.1 Chemická struktura	31
4.6.2 Význam a vlastnosti isoflavonoidů	31
4.6.3 Vybraní zástupci isoflavonoidů	32
Daidzein	33

Genistein.....	33
Biochanin A.....	34
Genistin.....	35
Glycitein.....	35
Formononetin.....	36
Prunetin.....	36
5. Experimentální část.....	37
5.1. Materiál.....	37
5.2. Chemikálie.....	37
5.3. Testované látky.....	37
5.4. Používané přístroje.....	38
5.5. Příprava výchozích roztoků.....	38
5.6. Kalibrace měďnatých iontů.....	39
5.7. Metodický postup redukce měďnatých (Cu ²⁺) iontů v pufru.....	40
5.8. Statistická analýza.....	43
6. Výsledky.....	44
6.1. Kalibrační křivka.....	44
6.2 Redukující účinky isoflavonoidů.....	45
6.2.1 Měď redukující aktivita daidzeinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5.....	46
6.2.2 Měď redukující aktivita genisteinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5.....	49
6.2.3 Měď redukující aktivita biochaninu A při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5.....	52
6.2.4 Měď redukující aktivita genistinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5.....	55
6.2.5 Měď redukující aktivita glyciteinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5.....	58
6.2.6 Měď redukující aktivita formononetinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5.....	61
6.2.7 Měď redukující aktivita prunetinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5.....	64
6.2.8. Redukční aktivita zadaných isoflavonoidů při pH 4.5.....	67
6.2.9. Redukční aktivita zadaných isoflavonoidů při pH 5.5.....	69
6.2.10. Redukční aktivita zadaných isoflavonoidů při pH 6.8.....	71
6.2.11. Redukční aktivita zadaných isoflavonoidů při pH 7.5.....	73
7. Diskuze.....	75
8. Závěr.....	78
9. Použitá literatura.....	79
9.1. Odborné časopisy:.....	79
9.2. Knihy.....	82

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Kamila Ambrožová

Školitel: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Název diplomové práce: Měď redukující účinky isoflavonoidů

Měď se v našem těle objevuje pouze ve stopovém množství. I přes tento fakt je důležitou složkou mnoha enzymů ovlivňujících správný chod celého organismu. Mezi nejdůležitější patří antioxidační aktivita, syntéza kolagenu a pojiv, účast při pigmentaci a buněčném dýchání.

Snahou organismu je udržení homeostázy mědi, protože nadbytek i nedostatek prvku může působit patologicky. Zvýšené množství mědi může být příčinou mnoha civilizačních onemocnění.

Isoflavonoidy patří mezi rostlinné metabolity polyfenolového charakteru pozitivně ovlivňující rozdílné pochody v našem těle. Výzkum je věnován protizánětlivým a estrogením účinkům, antioxidační aktivitě, protirakovinnému působení.

K eliminaci a inaktivaci radikálových částic dochází schopností isoflavonoidů redukovat atomy přechodných prvků nebo je chelatovat.

Cílem této práce bylo zjistit redukční aktivitu sedmi isoflavonoidů - daidzeinu, genisteinu, biochaninu A, genistinu, glyciteinu, formononetinu a prunetinu.

Nejvyšší schopnosti redukce dosahoval daidzein, v jehož struktuře nacházíme volnou 4'-hydroxylovou skupinu pozitivně ovlivňující redukci měďnatých iontů. Nejnižší redukční aktivita byla naměřena u biochaninu A, vysvětlením může být vysoký potenciál pro chelataci přechodných kovů, a z tohoto důvodu je redukční aktivita nízká.

Redukční aktivita isoflavonoidů je ovlivňována chemickou strukturou a pH prostředím.

Klíčová slova: měď, homeostáza, isoflavonoidy, antioxidační aktivita, redukční aktivita

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Kamila Ambrožová

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of Thesis: Copper reducing activity of isoflavonoids

Copper in our body appears only in trace amounts. Despite this fact is an important component of many enzymes, which are responsible for right function of the whole organism. The most important are antioxidant activity, collagen and connective tissue synthesis, formation of pigmentation and cell respiration.

Control of copper homeostasis is main target of the organism because excess and deficiency of the element could be pathological. Increase level of copper can cause many of civilization diseases.

Isoflavones are the plant metabolites of polyphenolic structure which can positively affect different processes in our body. Research is dedicated to anti-inflammatory and estrogenic effects, antioxidant and anticancer activity.

The elimination and inactivation of radical elements is performed because of ability of isoflavones to reduce transition elements or chelate them.

The aim of this thesis was to determine the reducing activity of seven isoflavonoids - daidzein, genistein, biochanin A, genistin, glycitein, formononetin and prunetin.

The highest reduction activity reached daidzein containing free 4'-hydroxyl group in its structure which has positive effect to reduce cupric ions. The lowest reduction activity was measured in biochanin A. The explanation may be high potential for chelation of transition metals therefore the reducing activity is low.

The reducing activity of isoflavonoids depends on chemical structure and pH conditions.

Key words: copper, homeostasis, isoflavonoids, antioxidant activity, reducing activity

1. Použité zkratky

A β	beta-amyloid
AD	Alzheimerova choroba (z angl. Alzheimer's disease)
ATOX 1	chaperon mědi (z angl. Antioxidant 1 Copper Chaperone)
ATP	adenosin trifosfát
ATP7A	gen kódující adenosin trifosfátázu typ A u Menkesovy choroby
ATP7B	gen kódující adenosin trifosfátázu typ B u Wilsonovy choroby
BCS	Sodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
CCS	chaperon mědi pro superoxiddismutázu (z angl. Copper Chaperone for Superoxid dismutase)
COX 17	chaperony mědi pro cytochrom-c-oxidázu (z angl. Cytochrome c Oxidase copper chaperone)
CP	Ceruloplasmin
CTR 1	Selektivní transportér pro měď (z angl. Copper Transporter 1)
DDD	Doporučená denní dávka
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)
D - PEN	D - Penicilamin
HA	Hydroxylamin hydrochlorid
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. Low density lipoprotein)
MD	Menkesova choroba (z angl. Menkes disease)
PŘ. N. L.	Před naším letopočtem
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
SOD	Superoxiddismutáza
WD	Wilsonova choroba (z angl. Wilson's disease)

2. Úvod

I přesto, že měď patří mezi ušlechtilé kovové prvky a vyskytuje se především ve formě různých sloučenin a slitin, lze ji nalézt i v lidském těle. Velká část lidské populace zná tento kov díky využití zejména v průmyslové výrobě, kde se hojně využívá především kvůli fyzikálně-chemickým vlastnostem. Mezi nejvýznamnější a nejvyužívanější se řadí schopnost vést teplo a elektrický proud, chemická nereaktivita, tažnost a kujnost.

Méně známý je fakt, že se měď nachází v našem těle, avšak pouze ve stopovém množství, které není pro organismus toxické a neškodí mu. Spolu se železem a zinkem se řadí mezi tři nejdůležitější esenciální mikroprvky nezbytné pro správnou funkci lidského organismu.

Zde je nenahraditelnou součástí struktury mnoha metaloenzymů, například cytochrom-c-oxidázy, superoxid-dismutázy, urikázy, ceruloplasminu, tyrosinázy, lisyloxydáz.

Funkce, které vykonávají jmenované kuproenzymy, jsou rozličného charakteru. Mezi nejvýznamnější patří antioxidační aktivita, účast při buněčném dýchání, při syntéze stavebních kamenů pojivových tkání, při transportu a efektivním využití železa, udržení správné pigmentace a syntéze melaninu.

Aby byla funkce enzymů efektivní a bezchybná, je pro organismus důležitý optimální a pravidelný přísun mědi vyváženou stravou.

Patologicky může působit dlouhodobý nedostatek, ale i nadbytek mědi. Příčinou těchto stavů bývá buď nepřiměřená konzumace stravy obsahující měď, nebo genetická mutace.

Deficit se projevuje sníženou aktivitou kuproenzymů, což může způsobovat degeneraci cévních stěn, nižší obranyschopnost nebo mikrocytární anemii.

Při dlouhodobě zvýšené koncentraci mědi v těle dochází k ukládání do tkání a toxicitě.

3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo změřit měď-redukující aktivitu vybraných isoflavonoidů (daidzein, genistein, genistin, biochanin A, formononetin, prunetin, glycitin) při různých pH a odvodit vztahy mezi strukturou těchto látek a jejich měď-redukující aktivitou.

4. Teoretická část

4.1. Význam mědi nejen v lidském těle

Měď je spolu se zlatem a stříbrem řazena mezi ušlechtilé kovy, v periodické tabulce chemických prvků zaujímá postavení v I. B skupině.

Literatura uvádí, že se jedná o kov, který byl objeven historicky jako první. Prvotní zmínky pocházejí z devátého tisíciletí před naším letopočtem z Iráku, objev v Evropě byl zřejmě 1500 let př.n.l.. V prvopočátcích se hojně využívala měděná ruda, která se zpracovávala tavením jednak samotné rudy, nebo se míchala s jinými kovy (Mudra 2006).

Po tepelné úpravě byla využita k výrobě zbraní, nástrojů pro domácnosti nebo mincí.

I přesto, že byly objeveny i jiné kovy, byla a stále je měď hojně využívána a v některých případech bývá nenahraditelná. Ve stavebnictví se využívá ke tvorbě konstrukcí, pokryvu střech a vedení tepla při vytápění. Schopnosti vést elektrický proud se využívá u veškeré elektroniky. Slitiny tohoto kovu se zinkem nebo niklem se využívají ve stomatologii k tvorbě zubních korunek a plomb. Aplikací mědi do nitroděložní antikoncepce dochází k jejímu pozvolnému uvolňování a následné zábraně početí (Barceloux 1999).

Ačkoliv měď patří mezi kovové prvky a nejčastěji se vyskytuje v různorodých sloučeninách, lze ji nalézt i v lidském těle. Po železe a zinku se řadí mezi nejvíce zastoupené stopové prvky lidského těla (Wijmenga a Klomp 2004).

Pro organismus je měď esenciální složkou, a proto ji do těla musíme dodávat ve formě potravy. V tabulce 1 jsem uvedla množství mikroelementu ve vybraných potravinách.

Potravina	obsah Cu ($\mu\text{g/g}$)
Maso - hovězí, vepřové	1,5
Ryby sladkovodní, mořské	0,3-3/ 2-3
Vešce	0,3
Obiloviny - mouka	2-6
Ovesné vločky	7
Luštěniny	3-10
Zelenina	0,3-3
Ovoce	0,4- 1,5
Ořechy	6-37

Tabulka 1: Přibližný obsah mědi ($\mu\text{g/g}$) ve vybraných složkách potravy.

Upraveno dle: Barceloux 1999.

Průměrná denní spotřeba tohoto mikroelementu není vysoká, dle vyhlášky č. 450/ 2004 Sb., vydané ministerstvem zdravotnictví, je doporučená denní dávka mědi 1 mg. U těhotných a kojících žen je dávka 1,2-2 mg, hodnota souvisí s distribucí mědi do plodu, u kterého měď pozitivně ovlivňuje formování mozku a centrální nervové soustavy (Wijmenga a Klomp 2004).

Lidské tělo obsahuje přibližně 100-180 mg mědi, rozmístění do jednotlivých tkání není rovnoměrné, například v krevní plazmě je obsaženo mnohem méně mědi než ve tkáních (Collins et al. 2010).

Mezi orgány, ve kterých lze naměřit nejvyšší koncentraci tohoto prvku, patří játra, myokard, kosterní svalstvo, mozek, ledviny, slezina, krev a vlasy. Přesné množství mědi ve vybraných orgánech je uvedeno v tabulce 2.

Orgán	Obsah Cu (mg/kg)
Játra	5,10
Vlasy	3,6-177
Srdce	3,4
Ledviny	2,4
Mozek	1,4-5,3
Pankreas	1,3-1,7
Svalovina	1,3-2,7
Plíce	1,1-3,0
Kostní dřev	1,0-1,4

Tabulka 2: Množství mědi v jednotlivých orgánech lidského těla.

Převzato: Sobotka et al. 1965

4.2. Fyziologické funkce mědi v těle

Lidský organismus je velmi složitý kompartment, skládající se z tkání tvořících orgány a orgánové soustavy, jež jsou propojeny v celek a jednotně fungují. Správná funkce je částečně podmíněna konzumací vyvážené stravy, která tělu dodá potřebnou energii, ale i vitamíny a minerály. Nepostradatelné mikroelementy a stopové prvky, jako Fe, Cu, Zn, Mn, Cr, Mo, V, Se, B, Si, I, Br a F, jsou do těla transportovány z přijaté potravy (Ledvina et al. 2009).

Ionty mědi rozmístěné v tkáních našeho těla bývají nejčastěji ve dvou oxidačních stavech: Cu (II) nebo Cu (I) (Wijmenga a Klomp 2004).

Veškerý obsah tohoto prvku se v těle nevyskytuje volně, 90 % je nerovnoměrně rozloženo do jednotlivých orgánů. Zde je součástí enzymů, proteinových struktur s katalytickou aktivitou, podílejících se na metabolických pochodech v buňkách a tkáních (Ledvina et al. 2009). Enzymy obsahující ve struktuře měď, jsou nazývány

kuproenzymy; mezi nejdůležitější se řadí cytochrom-c-oxidázy, superoxiddismutitázy, lysyloxidázy (Valko et al. 2005).

Jmenované enzymy se účastní při oxidoredukčních dějích, zužitkování železa červenými krvinkami. Dále má účast při zesíťování kolagenu, stimuluje imunitní systém a neutralizuje volné radikály.

4.2.1. Kuproenzymy

Cytochromoxidáza

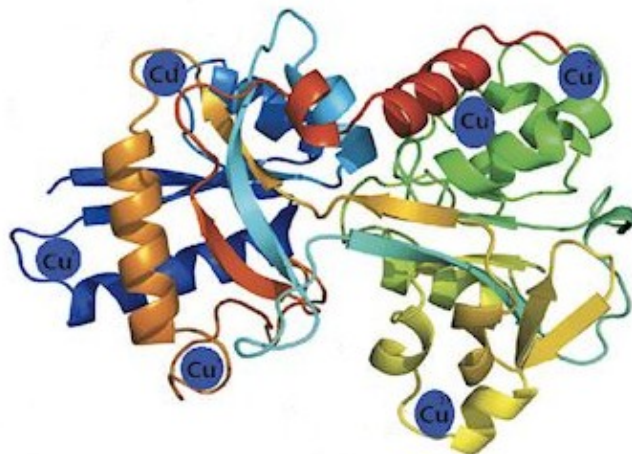
Aby byly organismy schopny přežít a fungovat, potřebují k tomu energii, kterou nejčastěji vytěží z oxidoredukčních reakcí. Pochody katalyzují enzymy zvané oxidázy, které zprostředkovávají přesun elektronů na příjemce, molekulu kyslíku (Koolman et al. 2012).

Poslední článek dýchacího řetězce obsahuje enzym, cytochrom-c-oxidázu, v jehož struktuře se nachází 2 molekuly hemu a 2 molekuly mědi. Společně s cytochromem a cytochromem a_3 tvoří v dýchacím řetězci komplex IV, jehož úloha je přenést elektrony na kyslík za vzniku vody (Ledvina et al. 2009).

Ceruloplasmin

Hlavním uložištěm mědi v těle jsou játra, odkud je dále roznášena do ostatních tkání, aby nedocházelo k porušení homeostázy. Transport je zprostředkováván ceruloplasminem, globulinovým proteinem, obsahujícím 1046 aminokyselin, které tvoří tři identické jednotky (Leone et al. 1999).

Každá molekula dokáže navázat a přepravit 6 atomů mědi (viz obrázek 1). V našem těle se tento protein nachází ve dvou isoformách. Jedna je vázána v buněčné membráně a podílí se na metabolismu železa a krvetvorbě. Druhá forma není vázána a působí jako transportní systém pro měď, především z jater do okolních orgánů (Leone et al. 1999).



Obrázek 1: Struktura ceruloplasminu, který přenáší šest atomů mědi (modré kuličky).
Převzato: Zhang et al. 2013

Superoxiddismutáza

Dalším významným metaloenzymem s měďí ve své struktuře je superoxiddismutáza. Jedinečnost tohoto enzymu spočívá v ochraně organismu před působením oxidačního stresu. Využívá schopnosti dismutovat volné radikály, například superoxid za vzniku H_2O_2 a O_2 (McCords et al. 1969).



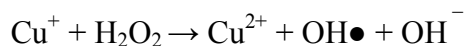
Rovnice 1: Mechanismus působení superoxiddismutázy.

Velmi nebezpečné jsou reaktivní formy kyslíku. Tento termín zahrnuje částice obsahující ve své struktuře volný nepárový elektron. Tyto reaktivní částice vznikají v organismu běžně při aerobním metabolismu, nejvíce jich vzniká v dýchacím řetězci a při zánětlivých reakcích (Pláteník 2011).

Druhou skupinou jsou kyslíkaté sloučeniny, které ještě nejsou radikály, ale chemickou reakcí mohou vzniknout (Coolman et al. 2012).

Nejznámější radikály se řadí ke skupinám reaktivního kyslíku nebo dusíku (superoxid, peroxy, ozon, peroxid vodíku nebo kyselina chlorná).

Měď je přítomna ve struktuře enzymu, který likviduje volné radikály, ale paradoxem je účast redukované mědi (Cu^+) při vzniku reaktivních částic. Peroxid vodíku H_2O_2 vzniká ze dvou molekul superoxidu díky antioxidačnímu působení superoxiddismutázy. V přítomnosti redukované formy mědi nebo železa dochází k reakci se stabilním peroxidem vodíku (Fentonova reakce), jejímž produktem je velice reaktivní hydroxylový radikál (Pláteník 2011).



Rovnice 2: Fentonova reakce

Dlouhodobý kontakt tkáně s volnými radikály může mít za následek poškození nenasycených mastných kyselin, proteinů, ale i DNA. Působením na membránové lipidy dochází k lipoperoxidaci, projevující se změnami propustnosti membrán. Poškozením enzymů dochází ke snížení nebo naopak zvýšení jejich aktivity (Ledvina et al. 2009).

Snahou našeho organismu je ochránit tkáně před působením volných radikálů. Superoxiddismutázy, glutathionperoxidáza, myeloperoxidáza, kataláza jsou enzymy, které dokáží rozdílnými mechanismy odstraňovat radikály z těla.

V současné době jsou zkoumány neenzymatické látky nazývané antioxidanty, které inaktivují radikály a zároveň snižují jejich množství. Tato aktivita je popisována u řady vitamínů - tokoferoly (vitaminy E), askorbát (vitamin C), β -karoten. Velká naděje se vkládá v sekundární metabolity vybraných rostlin, flavonoidy (Ledvina et al. 2009).

Enzymové	Neenzymové
<i>superoxiddismutázy</i> (SOD)	vitaminy
<i>glutathionperoxidáza</i>	koenzym Q ₁₀
<i>myeloperoxidáza</i>	flavonoidy rostlin
<i>kataláza</i>	kyselina močová
<i>peroxidázy</i>	mannitol
	nenasycené mastné kyseliny
	ceruloplasmin
	chemické antioxidanty

Tabulka 3: Enzymové a neenzymové nástroje působící proti vlivu volných radikálů.

Převzato: Ledvina et al. 2009

Lysyloxidáza

Při syntéze a síťování kolagenu hraje důležitou roli enzym lysyloxidáza, která katalyzuje oxidaci hydroxylyzylových a lyzylových řetězců elastinu a kolagenu (Ledvina et al. 2009).

Je tudíž zodpovědná za pevnost a pružnost pojivové tkáně.

4.3 Farmakokinetika mědi

4.3.1. Absorpce

Vyváženou pestrou stravou se do trávicího traktu denně dostane 2-5 mg mědi, z níž 65-70 % je vstřebáno (Roberts and Schilsky 2008). K absorpci dochází v největší míře v tenkém střevě, především v duodenu, ileu a zčásti také v žaludku. Množství vstřebaného prvku se může zvyšovat při konzumaci potravy s nízkou koncentrací mědi, při hladovění nebo při nedostatku ve tkáních. Naopak vyskytuje-li se v potravě vyšší množství vitamínu C, zinku nebo železa, dochází ke kompetici mezi těmito prvky a následné inhibici vstřebání mědi (Troost et al. 2003).

Aby mohla měď přestoupit přes apikální membránu enterocyty, musí být redukována na Cu^+ formu. Po vstupu do cytosolu chaperony přenesou prvek k basolaterální membráně enterocyty, kde ATP7A přenašeč dopraví měď do krevního řečiště (Collins et al. 2010).

Zde je z 95 % navázána na přenašeče - albumin a alfa2-makroglobuliny, pomocí kterých je dopravena do jater a tam dále zpracována (Zadák 2011).

4.3.2. Distribuce

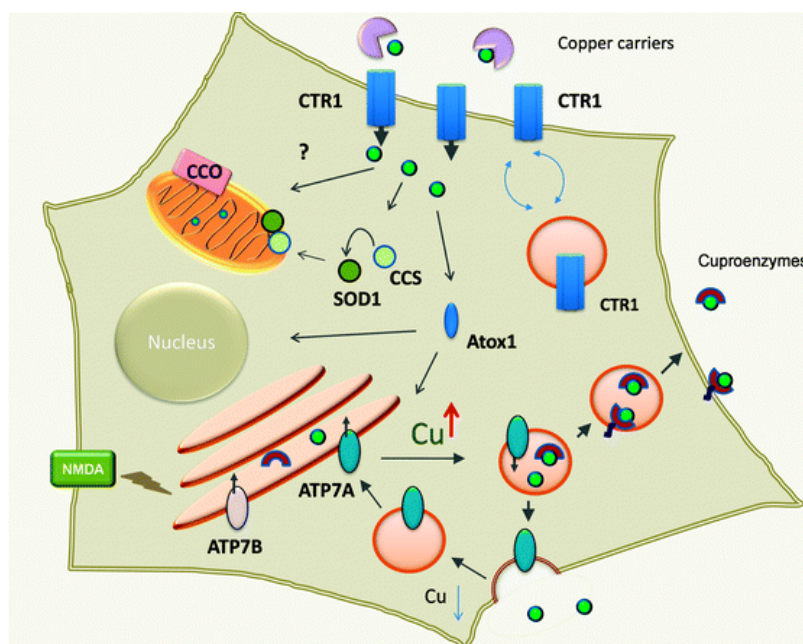
Při přestupu do krevního řečiště je měď vázána ve formě měďnatého kationtu na proteiny krevní plazmy - albumin a transkuprein, díky kterým je dopravena do jater (Sarkar 1999).

Před vstupem do hepatocytu je měď uvolněna z vazby na přenašeč, následně dochází k vazbě na selektivní membránový transporter CTR1 (Copper transport protein) a k influxu do buňky. Pro prostup membránou hepatocytu není zapotřebí energie, nutností ale je, aby měď měla charakter mědného kationtu (Wijmenga and Klomp 2004).

Následuje kontrola množství mědi v organismu a podle toho je s ní nakládáno. Mohou nastat dvě situace: Buď je mědi v těle nedostatek a tím pádem dochází k zabudování do enzymů obsahujících měď, nebo naopak je v těle nadbytek prvku a je vydán pokyn k vyloučení z buňky a následně z celého těla.

Vniknutím do hepatocytu je měď předána speciálním proteinům - chaperonům, mezi nejznámější patří Atox 1, CCS, COX 17. Funkcí chaperonů je dopravit měď do buněčných organel, kde je s nimi naloženo dle aktuálních potřeb organismu (Ehrmann, Hůlek et al. 2014).

Nejčastěji dochází k zabudování do enzymů a proteinů nebo k vyloučení z těla. Chaperon Atox 1 dopravuje měď do Golgiho aparátu, kde pomocí ATP7B přenašeče, následuje zabudování šesti atomů mědi do struktury ceruloplasminu. Ten poté slouží jako zásobovač orgánů celého těla. CCS chaperon zprostředkovává zabudování mědi do struktury SOD, další typ chaperonu, COX 17, umožňuje začlenění do cytochrom-c-oxiázy (Wijmenga and Klomp 2004).



Obrázek 2: Znázornění osudu mědi v buňce (zelené kroužky) - dopravení prvku k membránovému transporteru (CTR1), následuje vazba na chaperony, které měď dopravují do mitochondrií a Golgiho aparátu a zde jsou zpracovány podle potřeb organismu.

Převzato: Lutsenko et al. 2010

4.3.3. Eliminace

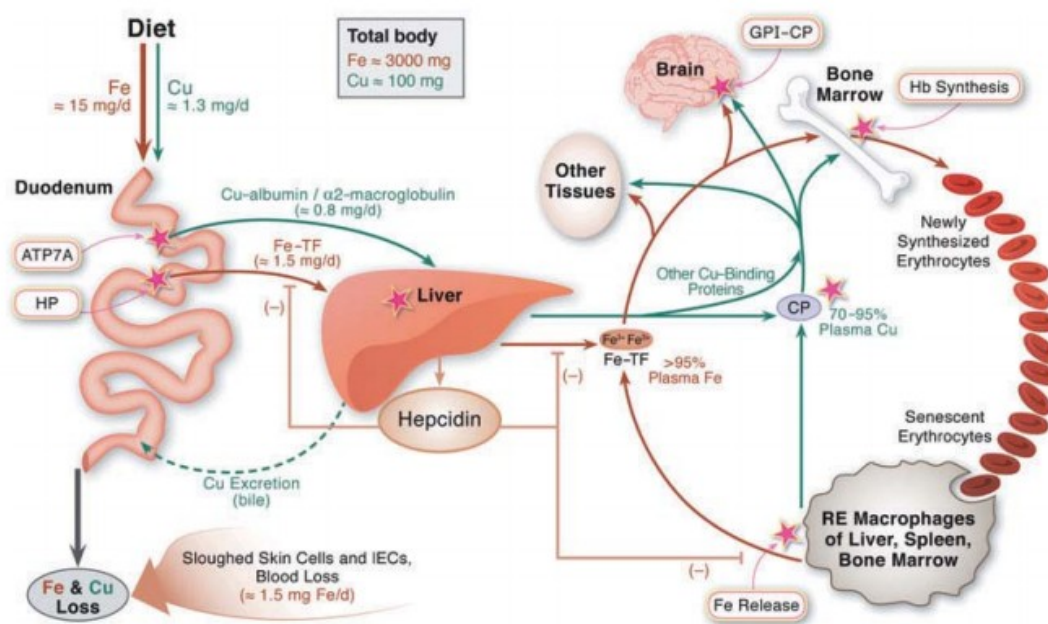
Snahou našeho organismu je udržení homeostázy tak, aby ve všech tkáních nedocházelo k výrazným výkyvům koncentrace mědi. Je-li regulačními mechanismy zjištěn vysoký obsah mědi, je vydán pokyn k vyloučení z buňky do žluči a následně ven z těla stolicí. Bylo objeveno, že denně je eliminováno až 85 % absorbované mědi (Wijmenga and Klomp 2004). Vzroste-li koncentrace mědi, je vydána informace pro její vyloučení z těla. Protein ATP7B zprostředkovává tvorbu odpadních vezikul, které jsou dopraveny do žluči a vyloučeny.

Za exkreci z buňky hepatocytu zodpovídají ATPásové systémy, proteiny, schopné přijmout měď nesenou chaperony a zajistit její eliminaci. K regulaci slouží především ATP7A a ATP7B, oba zcela závislé na dodání energie formou ATP (Collins et al. 2010).

Význam ATP7A spočívá v regulaci vstřebání mědi již na úrovni ze střevní buňky do krve.

Druhý protein s názvem APT7B bychom našli v nejvyšším množství v játrech, mozku, plicích a ledvinách, kde se stará o vyloučení mědi ven z těla do žluči.

Oba tyto ATPásové systémy mohou být poškozeny genetickou mutací, jejímž důsledkem je nulová aktivita, což má za následek buď nedostatek mědi v těle, nebo naopak inhibici vylučování a následnou kumulaci v těle (Sarkar 1999).



Obrázek 3: Shrnutí metabolismu mědi a s ním úzce související vstřebávání železa. Schéma zahrnuje udržování homeostázy v těle, která zahrnuje: příjem potravou, vstřebávání v tenkém střevě, transport do jater, zabudování do proteinů, zásobení orgánů a exkreci.

Převzato: Collins et al. 2010

4.4. Patofyziologie mědi

Množství mědi potřebné pro korektní fungování organismu je velmi malé, problémem je větší příjem prvku, který působí toxicky. Dle doby působení na organismus lze toxicitu dělit na akutní a chronickou.

Akutní intoxikaci může způsobit příjem jednoho gramu mědi, projevující se narušením mukózy žaludku, zvracením, hemolytickou anémií nebo renálním selháním. Požije-li dospělý jedinec 10-20 gramů mědi dochází k masivní hemolýze, selhání ledvin a jater a následkem toho k úmrtí (Barceloux 1999).

Za chronickou toxicitu lze považovat dlouhodobě zvýšený příjem mědi, manifestující se jednak nevolností, zvracením, ale i ukládáním do depotů.

Za příčinu chronické intoxikace je považována také genetická mutace, působící kumulaci mědi ve tkáních, toto onemocnění se nazývá Wilsonova choroba.

Jejím opakem je Menkesova choroba, při níž nedochází ke vstřebání mědi ze střeva a v těle vzniká deficit.

4.4.1 Nadbytek mědi v těle

Wilsonova choroba (WD)

Definice

Odborné články definují toto onemocnění jako dědičnou autozomálně recesivní poruchu metabolismu mědi doprovázenou jejím ukládáním do orgánů a tkání (Ferenci 2004). Mutace genu kódovaného na dlouhém raménku 13. chromozomu, je příčinou vzniku defektního typu ATPázy, zprostředkovávající transport a vyloučení mědi (Wiggelinkhuizen et al. 2009).

Výskyt nemoci

Jelikož onemocnění patří mezi recesivní, projeví se nemoc pouze u homozygotních jedinců, to činí 1 nemocného na 30 000 obyvatel. U heterozygotních jedinců nedochází k projevům nemoci, ale pouze k přenosu defektního genu na další generaci (Merle, Schaefer, Ferenci et al. 2006). V současné době je známo okolo 380 druhů mutace genu pro protein ATP7B, nejlépe prozkoumanou je H10069Q, jejíž prevalence je nejvyšší v Evropě. Naopak v Asii se s nejvyšší četností objevuje mutace R778L (Burkhead et al. 2011).

Klinický obraz

Symptomy Wilsonovy choroby úzce souvisí s ukládáním mědi nejčastěji do tkání jater a mozku. Z toho důvodu lze příznaky onemocnění rozdělit na tři druhy - hepatické, neurologické a psychiatrické. Každá forma se projevuje jiným způsobem a odhalit ji hned na začátku je velmi obtížné a častokrát nemožné.

Hepatická forma nemoci se projevuje na počátku bolestivostí a zvětšením jater, později dochází k akutní hepatitidě, cirhóze a nakonec k úplnému selhání jater, kde je jediným možným východiskem transplantace.

U neurologické formy jsou příznaky zpočátku nepozorovatelné: bolest hlavy, zhoršení paměti, soustředění a nespavost. Později se však podobají parkinsonismu - třes, samovolné záškuby končetin, poruchy chůze, poškození řeči a snížení intelektu.

U psychiatrické formy můžeme pozorovat deprese, psychózy, změny nálad až změny osobnosti.

Mezi další orgány, kde lze nalézt uloženou měď, patří ledviny; akumulací dochází ke snížení filtrace až selhání, nebo se můžou vytvořit ledvinné kameny.

Příčinou Kayser-Fleischerova prstence bývá depozitum mědi v oblasti rohovky.

Forma WD	Projevy
Hepatická forma:	Hepatomegalie
	Steatóza
	Akutní hepatitida
	Cirhóza
Neurologická:	Selhání jater
	Třes
	Migréna
	Bolest hlavy
	Nespavost
Psychiatrická:	Nesoustředěnost
	Deprese
	Změny osobnosti
	Náladovost
Oční:	Psychózy
	Kayser-Fleischerův prsteneček
	Zákal

Forma WD	Projevy
Ledvinné:	Snížení filtrace Ledvinné kameny
Srdeční:	Arytmie

Tabulka 4: Shrnující formy Wilsonovy choroby a její nejčastější projevy.

Převzato: Roberts and Schilsky 2008

Diagnostika

Ke stanovení diagnózy dochází mezi 15.–25. rokem, nejpozději však do 40 let věku (Roberts and Schilsky 2008). Ačkoli není diagnostika Wilsonovy choroby obtížná, často dochází ke zjištění onemocnění až v jejím pokročilejším stádiu. Je tomu tak z důvodu asymptomatického průběhu nebo díky ne zcela jednoznačným příznakům nemoci. Někdy je nemoc odhalena při selhání jater nebo až po smrti pacienta.

Diagnóza je založena na výsledcích klinických a biochemických testů. Ty se skládají z testování oční rohovky a duhovky na přítomnost Kayser-Fleischerova prstence, jež bývá typickým znakem onemocnění. Vyšetření provádí zkušený oftalmolog šterbinovou lampou, protože pouhým okem je patrný jen u malého počtu nemocných (Merle, Schaefer, Ferenci et al. 2006). K dalšímu potvrzení diagnózy patří stanovení množství ceruloplasminu v séru, které bývá snižené oproti normálním hodnotám. Fyziologická koncentrace ceruloplasminu se pohybuje od 0,2 do 0,5 g/l (Ehrmann, Hůlek et al. 2014). Hodnoty nižší než 0,2 g/l, byly zjištěny u 88,2 % pacientů (Merle, Schaefer, Ferenci et al. 2006). Užitečným zákrokem při podezření na Wilsonovu chorobu je biopsie jaterní tkáně, která je podrobena histologickému vyšetření, a měření koncentrace mědi. Lze využít i měření množství mědi v moči, kterou pacient celý den sbírá (Merle, Schaefer, Ferenci et al. 2006).

Cenné informace lze získat pátráním po výskytu nemoci u rodinných příslušníků a jejich testováním. Je možné provést i genetické testy, jejich nevýhodou je vysoká cena a náročnost, ztížením je výskyt 380 typů mutací genu pro ATP7B přenašeč (Ferenci 2013).

Léčba

Cílem léčby je snížit nadbytečné zásoby mědi na normální hladinu a zabránit jejímu dalšímu ukládání a poškození orgánů. Léčba by měla zahrnovat celoživotní kontrolu stavu jater, oční duhovky a míst, kde se měď nejčastěji ukládá.

Mezi nefarmakologickou léčbu patří striktní dodržování diety s nízkým obsahem mědi.

Dimerkaprol

Prvním lékem užitým k léčbě Wilsonovy choroby byla chelatující látka 2,3-dimerkapto-1-propanol, který působil zvýšené vylučování mědi do moči. Intramuskulární aplikací vznikalo depo s pozvolným uvolňováním. Přípravek se přestal užívat kvůli složité a bolestivé aplikaci, tachykardiím a špatné snášenlivosti (Schilsky 2001).

Penicilamin

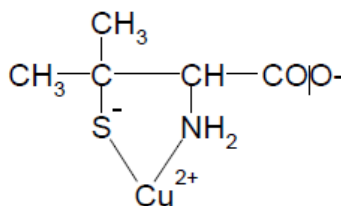
Lékem první volby a zlatým standardem při léčbě je použití látky zvané penicilamin (beta, beta-dimetylcystein). Jedná se o první perorálně užívanou chelatující sloučeninu se schopností vázat kovy přes volné elektronové páry na dusíku a na síře viz obrázek 4. Vazbou chelátu a mědi vzniká komplex, který je z těla vylučován močí (Ferenci 2013).

Počáteční dávka penicilaminu je 2g denně obvykle rozdělená do několika částí. Po zlepšení stavu nemocného se dávka redukuje na 0,5-1g na den (Schilsky 2001).

Během léčby se můžou vyskytnout nežádoucí účinky a toxicita související s velikostí dávky a délkou užívání, jsou však reverzibilní a vymizí po ukončení léčby. Nejčastějšími projevy bývají trávicí obtíže, kopřivka, alergie, deficit pyridoxinu a pokles imunity. Důvodem k přerušení léčby mohou být nežádoucí účinky a alergické reakce závažného charakteru (Roberts and Schilsky 2008).

Zlepšení stavu nemocného lze pozorovat až po 4-6 měsících užívání přípravku. Po dobu léčby je v organismu zvýšená spotřeba pyridoxinu, proto je nutná suplementace tímto vitamínem 40-60 mg denně (Ehrmann, Hůlek et al. 2014).

U některých jedinců se může objevit intolerance na penicilamin, řešením je použití jiného přípravku, například tetrathiomolybdenanu, trientinu nebo zinku.

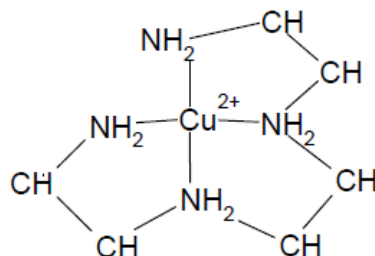


Obrázek 4: Molekula penicilaminu s navázanou mědí.

Převzato: Schilsky 2001

Trientin

Velmi účinnou náhradou při intoleranci penicilaminu je další chelatátor mědi, trientin. Jedná se o látku odlišné chemické struktury, jejímž benefitem je nižší výskyt nežádoucích účinků a lepší snášenlivost (Schilsky 2001). Dobrých výsledků bylo dosaženo jak u pacientů s neurologickou formou nemoci, tak u hepatické formy. Na počátku léčby je v několika denních dávkách užíváno 750-1500 mg přípravku, udržovací dávka se pohybuje mezi 750-1000 mg na den (Schilsky 2001).



Obrázek 5: Molekula trientinu vázající měď.

Převzato: Schilsky 2001

Zinek

Před dvaceti lety byla na trh uvedena další látka, která se stala součástí léčby Wilsonovy choroby. Jednalo se o sloučeniny zinku, jejichž mechanismus účinku spočívá v inhibici vstřebání mědi z přijaté potravy a také stimulaci syntézy metalothioneinu v enterocytech, čímž dochází k tvorbě slizničního bloku pro vstřebávání mědi (Ferenci 2004). Doporučená terapeutická dávka je 3x denně 50 mg zinku. Použití této

alternativy léčby má velké výhody díky minimálnímu výskytu nežádoucích účinků a tím dobré snášenlivosti. Nejlépe snášenými sloučeninami se zdá být síran zinečnatý a octan zinečnatý (Schilsky 2001). Nevýhodou je nepoužitelnost u pacientů, kteří mají depozita mědi v játrech, jelikož zinek působí pouze v místě enterocyty (Marek et al. 2010).

Tetrathiomolybdenan amonný

Tato látka patří mezi novinky užívané k terapii Wilsonovy choroby, využívá se její schopnosti tvořit nevstřebatelné komplexy s mědí. Látka je schopna vázat mikroelement obsažený v potravě, ale zároveň tvoří komplexy i s mědí obsaženou v krevním séru (Sarkar 1999).

Kombinační terapie

Velkou nadějí léčby je použití dvou látek s odlišnými mechanismy účinku, například trientinu a zinku nebo tetrathiomolybdenanu amonného a zinku. Výsledky kombinační léčby se ukázaly jako velice uspokojivé, u některých pacientů byla odvrácena hrozba transplantace jater (Schilsky 2001).

4.4.2 Nedostatek mědi

Nízká koncentrace může být způsobena získaným nebo vrozeným deficitem tohoto mikroelementu. Získaný nedostatek je často přičítán nedostatečné konzumaci potravin obsahující měď nebo hladovění (Collins et al. 2010). Následkem nízké koncentrace prvku dochází k anémii, poruchám imunity a zhoršené kvalitě vlasů.

Získaným deficitem bývá označován nedostatek mědi zapříčiněný genetickou mutací.

Menkesova choroba (MD)

Definice

Vrozený nedostatek způsobuje onemocnění nazývané Menkesova choroba, jinak také trichopoliodystrophia či „kinky-hair“ syndrom.

Jedná se o dědičné recesivní onemocnění, vázané na chromozom X, způsobené mutací genu pro přenašeč mědi typu ATP7A, který se nachází ve střevní stěně a umožňuje vstup mědi do krevního oběhu (Shula et al. 2005).

Výskyt onemocnění

Incidence Menkesovy choroby je vyšší u mužů, u žen se onemocnění projevuje minimálně, dochází pouze k přenosu mutované genetické informace (Schaefer et al. 1999). Výskyt je odhadován mezi 1 : 40 000 až 1 : 350 000 (Bie, Muller et al. 2007).

Příznaky a diagnóza

Již u malých dětí lze pozorovat příznaky, které jsou zapříčiněné nedostatkem mědi. Dochází k opožděnému tělesnému i mentálnímu vývoji, nesprávnému a zpomalenému růstu vlasů a kostí, poruchám imunitního systému (Sarkar 1999).

Diagnózu lze stanovit několika způsoby, nejběžnější je stanovení množství mědi a ceruloplasminu v krevním vzorku. V některých případech je možné vycházet ze specifických symptomů, například vývoje dítěte, vzhledu vlasů, stavby a vývoje kostí. Pro úplné potvrzení diagnózy slouží biopsie kůže nebo genetické testování (Tümer, Horn 1997).

Mutace ATP7A genu má za následek kumulaci mědi pouze ve stěně tenkého střeva, odkud nemůže být přenesena do ostatních částí organismu. Nízká koncentrace se objevuje v mozku a játrech. Pokud není onemocnění diagnostikováno včas, dochází k úmrtí již v raném dětství (Tümer, Møller 2010).

Léčba

Léčba Menkesovy choroby je velmi obtížná, v mnoha experimentech bylo zkoušeno podání mědi ve formě tablet, ale nebylo dosaženo efektivního vstřebání, protože měď zůstávala ve střevě (Tümer, Møller 2010). Jako nejefektivnější způsob terapie se ukázalo subkutánní podávání komplexu mědi (ve formě Cu^{2+}) a L-histidinu (Sarkar 1999). Podmínkou je včasná a dostatečná suplementace Cu-histidinem, čímž částečně dochází ke zmírnění neurologických symptomů a snížení úmrtnosti. Ačkoli podání komplexu prodlužuje život nemocných, je považováno pouze za symptomatickou léčbu (Tümer, Møller 2010).

4.4.3 Alzheimerova choroba

Vědeckými studiemi byl potvrzen fakt, že Alzheimerova nemoc (AD) úzce souvisí s narušením homeostázy mědi v mozku. AD je definována jako progresivní neurodegenerativní onemocnění spojené se stárnutím mozku, projevující se zhoršením a následně ztrátou paměti, zhoršením kognitivních funkcí a demencí. Na

neurodegeneraci neexistuje efektivní léčba, která by zpomalila nebo zastavila průběh (Schafer et al. 2007).

V mozkové tkáni postižené AD dochází k patologickým změnám, například ke ztrátě neuronů, tvorbě amyloidních plaků, zvýšené fosforylaci tau-proteinů a změnám koncentrací kovových mikroelementů (Squitti and Zito 2009).

U pacientů s AD byla v mozku naměřena zvýšená hladina mědi, která se vázala na protein beta-amyloid a urychlovala jeho formování. Navíc vazba mědi a beta-amyloidu umožňuje redukci atomů kovu a tím i vznik volných radikálů. Tyto vysoce reaktivní částice napadají lipidy, DNA, proteiny, ale také cholesterol, který oxidují na neurotoxické látky (Price et al. 2007). Na zvířatech byly zkoušeny látky schopné obnovit homeostázu mědi v mozku. Testované sloučeniny vykazovaly chelatační aktivitu a navíc zvyšovaly solubilizaci beta-amyloidu (Price et al. 2007).

4.4.4 Ateroskleróza

Již bylo řečeno, že měď je pro organismus nepostradatelná, ale pouze ve velmi omezeném množství. Experimenty bylo potvrzeno, že příliš vysoké množství volné mědi organismu škodí. Negativní vlastností tohoto prvku je schopnost katalyzovat vznik volných radikálů, které atakují různé buněčné kompartmenty (Mira et al. 2002). V kardiovaskulární soustavě se volné radikály podílí především na vzniku a progresi aterosklerózy. Při ní dochází ke vzniku chronického zánětu v cévním endotelu velkých arterií. Organismus na zánět místně reaguje zvýšenou tvorbou cytokinů, makrofágů, ale také zvýšenou propustností a adhezí postižené cévy. Následkem propustnosti dochází v cévní stěně k ukládání především low density lipoproteins (LDL), které jsou velmi častým terčem volných radikálů (Žák et al. 2011).

Tyto reaktivní částice působí oxidaci tukových plátů v cévě, čímž dochází k progresi onemocnění.

4.4.5 Rakovina

Nekontrolovatelné a nezastavitelné dělení tělních buněk bývá nejčastější příčinou rakovinného onemocnění. Bylo dokázáno, že měď může přispívat ke vzniku tumorů i k jeho šíření v organismu ve formě metastáz (Preedy 2013).

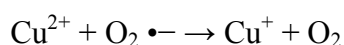
Příčinou takového množení buněk může být spuštěno nadbytkem volné frakce nevázané mědi v krvi a tkáních. Měď se podílí na vzniku volných radikálů, které napadají a poškozují DNA, což může zapříčinit vznik mutací a chyb.

Nedávno studie prokázaly účast mědi při angiogenezi nádorových buněk, kde přispívá k dostatečnému přívodu kyslíku a živin k buňkám. Při vzniku nových cév je měď důležitým kofaktorem angiogenních růstových faktorů (Goodman et al. 2005).

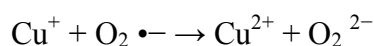
4.5 Redukce mědi

Redukce (z latinského *re-duco*, vedu zpět) představuje proces, při kterém dochází u látky ke snížení oxidačního čísla. Tento druh reakce neprobíhá nikdy samostatně, nýbrž společně s oxidací. Vždy se jedná o přenos elektronů mezi dvěma látkami podle velikosti jejich vzájemného oxidačně-redukčního potenciálu (Volf, Andrs 2013). Hodnota standardního redukčního potenciálu mědi ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$) je +0,15 V, tudíž mnohem nižší než u železa, proto flavonoidy vykazují vyšší redukční potenciál u mědi než u železa (Mira et al. 2002).

Většina mědi v organismu se z devadesáti procent vyskytuje jako vázaná v rozličných strukturách (ceruloplazmin, albumin, histidin), v kyselém prostředí, například u zánětu, může dojít k uvolnění prvku (Mira et al. 2002). Volnou měď lze v organismu obvykle najít v jednom ze dvou oxidačních stavů: Cu^+ a Cu^{2+} , přičemž měďné ionty jsou nestabilní a dochází k jejich oxidaci. V závislosti na prostředí dochází k přechodům mezi těmito oxidačními stavy – viz rovnice 3 a 4 (Arredondo et al. 2005).



Rovnice 3: Redukce mědi



Rovnice 4: Oxidace mědi

Výzkumy byla potvrzena účast redukované mědi (Cu^+) při Fentonově reakci, během níž vzniká velmi reaktivní hydroxylový radikál $\bullet\text{OH}$. Cu^+ v reakci působí jako katalyzátor měnící peroxid vodíku na $\bullet\text{OH}$ radikál, popsany v rovnici 5 (Arredondo et al. 2005).



Rovnice 5: Fentonova reakce

Hydroxylový radikál se řadí mezi vysoce reaktivní částice, schopné reagovat se všemi buněčnými kompartmenty a tím se podílet na patogenezi stárnutí, vzniku kardiovaskulárních chorob, diabetu a nádorového bujení (Kolečkář et al. 2012).

Mezi jednu z pozitivních vlastností isoflavonoidů patří antioxidační aktivita. Antioxidační působení probíhá různými mechanismy: neutralizace volných radikálů, chelatace přechodných prvků, inhibice prooxidačních enzymů.

Neutralizace volných radikálů je uskutečňována díky schopnosti antioxidantu (popř. jeho hydroxylové skupiny) darovat atom vodíku radikálu, ze kterého se stane stabilní a nereaktivní částice (Moran et al. 1997).

Dalším antioxidačním mechanismem je schopnost isoflavonoidů chelatovat prvky přechodných kovů v našem těle. Reakcí dochází ke vzniku chelátu hydroxylových skupin s kovem (Cu, Fe) a tím i prevenci vzniku radikálových částic (Sugihara et al. 1999).

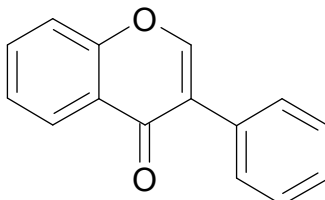
Na druhou stranu mají isoflavonoidy schopnost redukovat přechodné kovy a tím zvýšit produkci hydroxylového radikálu a působit prooxidačně (Macáková et al., 2012).

4.6 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy patří mezi široce zastoupenou skupinu polyfenolických látek, jež čítá 10 000 sloučenin (Kolečkář et al. 2012). Tyto sekundární metabolity se nejvíce vyskytují u čeledi bobovitých (Fabaceae) a v současné době je známo asi 164 různých látek z této skupiny (Macková et al. 2006). Studium a objevování nových isoflavonoidů je v dnešní době zapříčiněno hlavně kvůli jejich vlastnostem, jako je například netoxické působení, protizánětlivé a estrogenní účinky, antioxidační aktivita, protirakovinný a neuroprotektivní účinek. Hlavním zdrojem těchto tělu prospěšných isoflavonoidů jsou sójové boby, výrobky z nich (tofu, tempeh, sójové maso), cizrna (*Cicer*, Fabaceae) a vojtěška (*Medicago sativa*, Fabaceae). Do našeho těla se tyto látky dostávají výhradně z přijaté stravy, jsou vstřebány a dopraveny k cílovým strukturám - buněčné receptory, signální molekuly, enzymy.

4.6.1 Chemická struktura

Jedná se o polyfenolické sloučeniny ze skupiny flavonoidů, složené ze dvou benzenových kruhů propojených heterocyklickým kruhem. Od flavonoidů se odlišují migrací aromatického kruhu z polohy C₂ na C₃. Zjednodušeně lze říci, že základní kostru isoflavonoidů tvoří 3-fenylchromen-4-on (isoflavon).



Obrázek 6: Základní struktura isoflavonoidů.

Tento skelet podléhá chemickým obměnám, např. hydroxylaci, methylaci, připojení aromatického kruhu. Jednotlivé isoflavonoidy jsou podle struktury tříděny do podskupin: isoflavony, isoflavany, isoflavanchinony, isoflavanony, isoflav-3-eny, rotenoidy, dehydrorotenoidy, 12a-hydroxyrotenoidy, pterokarpany, pterokarpeny, 6-hydroxypterokarpany, kumestany, kumaronochromony, 3-arylkumariny, 2-arylbenzofurany a isoflavanoly (Veitch 2007).

V rostlině můžeme isoflavonoidy objevit ve formě aglykonů nebo ve formě glykosidů, kde dochází ke spojení s molekulou cukru (glukosou a rhamnosou) nejčastěji v poloze C₇ (Reynaud et al. 2005).

4.6.2 Význam a vlastnosti isoflavonoidů

Tyto sekundární metabolity se pyšní nepostradatelným významem nejen pro rostlinu jako celek, ale v současné době byl zjištěn prospěch i pro lidský organismus.

Studiemi bylo zjištěno protirakovinné působení, zejména snížená incidence rakoviny prsu a prostaty (Yao et al. 2004). Velká naděje se vkládá v antioxidantní aktivitu těchto sloučenin, díky níž jsou schopné snižovat množství volných radikálů v lidském těle a tím předcházet nádorovému bujení, ateroskleróze a zánětu. Vychytávání radikálů se uskutečňuje díky velké reaktivitě hydroxylového substituentu, který předá radikálu volný elektron a tím se stane neaktivní (Heim et al. 2002). Antioxidanty zhašejí aktivní radikály a potlačují jejich množství, aby neatakovaly další molekuly a netvořily z nich

další radikály. Přechodné prvky jsou v těle odpovědné za katalýzu vzniku radikálů, isoflavonoidy jsou schopné chelátovat prvky a tím snížit jejich riziko pro organismus (Sugihara et al. 1999).

Přímý antioxidační efekt, tj. zhášení volných radikálů, je navíc doplněn nepřímým ovlivněním enzymů účastnících se při vzniku volných radikálů, např. při metabolismu purinů nebo inhibice metabolitů arachidonové kyseliny u zánětu (Mira et al. 2002, Sugihara et al. 1999). Důsledkem nižší koncentrace radikálů je inhibice oxidace lipidů a bílkovin, které hrají hlavní roli v rozvoji aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění.

Za zmínku stojí též estrogenní aktivita, diskutovaná a zkoumána především u žen v době menopauzy, kdy dochází k poklesu estrogenů. Isoflavonoidy vykazují strukturní podobnost estradiolu, a proto mají schopnost interagovat s receptory, kde působí jako agonisté či antagonisté (Preedy 2013). Vazbou na estrogenní receptor dochází k jeho aktivaci nebo inhibici, což má za následek zvýšení nebo snížení exprese genů. Na estrogenní receptor se jednotlivé fytoestrogeny vážou s různou afinitou odvíjející se od struktury látky.

Pokud ženy v době klimakteria přijímají dostatečné množství těchto látek, dochází ke zmírnění návalů a snížení úbytku kostní hmoty (Cornwell et al. 2004).

V kardiovaskulární soustavě působí isoflavonoidy snížením koncentrace lipoproteinových částic v krvi, čímž snižují cholesterol, brání ateroskleróze a infarktu.

Experimentální výzkumy nevylučují ochrannou aktivitu proti některým nádorům zejména díky ovlivnění proliferace nádorových buněk, inhibice růstu a růstových faktorů nebo antiangiogenní aktivitě (Suthar et al. 2001).

Mezi další příznivé vlastnosti isoflavonoidů patří prevence nádorovému bujení, protialergické a protizánětlivé působení. V tradiční medicíně jsou účinky těchto látek využívány k léčbě hepatitidy a odstraňování kamínek v ledvinách a játrech (Reynaud et al. 2005).

4.6.3 Vybraní zástupci isoflavonoidů

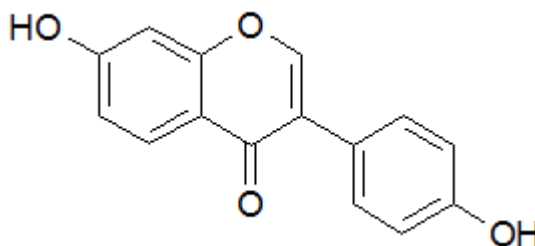
Daidzein, genistein, biochanin A, genistin, glycitein, formononetin, prunetin.

Daidzein

Nejaktivnější sloučeninou vyskytující se především v bobovitých rostlinách, např. sóje (*Glycine max*, Fabaceae) nebo jeteli lučním (*Trifolium pratense*, Fabaceae) (Kašparová 2013).

Mezi přednosti patří vazodilatační efekt, zejména na velké cévy, po němž následuje snížení krevního tlaku. Díky struktuře podobné steroidním hormonům dokáže působit na receptory, interagovat s nimi a tím zlepšovat průběh menopauzy. (Yong-Xiao Cao et al. 2006)

Pokud se daidzein vyskytuje v těle ve formě aglykonu, dochází ke vstřebání již v žaludku. Jiná situace nastává u glykosidované formy, která musí nejdříve podlehnout hydrolyze za pomoci enzymů střevní mikroflóry, glykosidáz. Střevní bakterie metabolizují daidzein na dva metabolity: equol a *O*-desmethylangolensin (*O*-DMA), které vykazují nejvyšší antioxidační a estrogenní aktivitu ze všech isoflavonoidů (Cassidy et al. 2006).



Obrázek 7: Daidzein

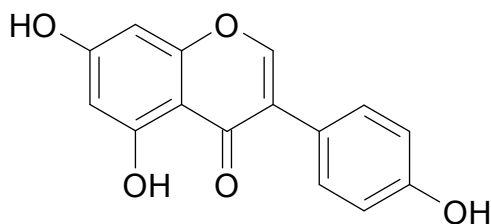
Genistein

Trihydroxy derivát isoflavonu, vyskytující se spolu s daidzeinem v sójových bobech (*Glycine max*, Fabaceae), nicméně obsah genisteinu je v sóje vyšší než daidzeinu.

Obě látky jsou v rostlinách ve formě glykosidu genistinu a daidzinu (Suthar et al. 2001). V těle se genistin metabolizuje na genistein nejprve v žaludku pomocí hydrolyzy a poté v tlustém střevě za účasti enzymů střevních bakterií. Genistein vykazuje silnou estrogenní aktivitu, čímž zmírňuje symptomy menopauzy a osteoporózy. Za benefit se

považuje antioxidantní aktivita, redukce syntézy cholesterolu, zábrana oxidace LDL cholesterolu a tím předcházení ateroskleróze.

V první fázi klinického zkoušení byl zjištěn inhibiční účinek na šíření metastáz zejména u rakoviny prostaty. Také dochází k regulaci dělení buněk a tím inhibici růstu nádoru nebo zábrany angiogeneze nádoru. Velký zájem vzbuzuje působení na imunitní systém, zejména schopnost inhibovat tyrosinkinázu, která se účastní aktivace buněk při zánětu (Suthar et al. 2001).



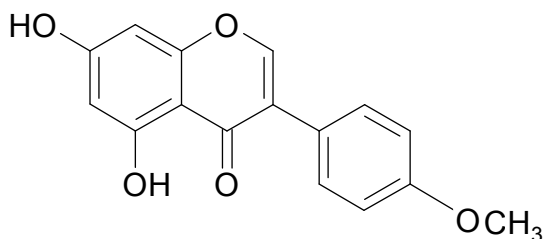
Obrázek 8: Genistein

Biochanin A

4'-methoxy derivát genisteinu, vyskytující se hojně v kořenech, stoncích a listech jetele lučního (*Trifolium pratense*, Fabacea), v sóje (*Glycine max*, Fabaceae) a vojtěšce (*Medicago sativa*, Fabaceae).

V těchto luštěninách se biochanin A nevyskytuje samostatně, ale je doprovázen dalšími isoflavonoidy: genisteinem, daidzeinem a formononetinem (Kašparová 2013). Jako přírodní rostlinný estrogen je schopný interakce s receptorem, na kterém působí jako agonista.

Za benefit se považuje protizánětlivé a protirakovinné působení, preventivní vliv u osteoporózy. Jako antioxidant dokáže eliminovat radikálové částice a podílet se tak na prevenci a snížení rizika výskytu srdečních onemocnění a rakoviny (Moon et al. 2006).

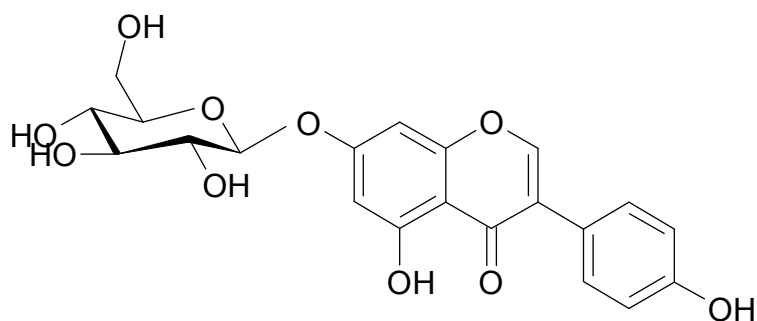


Obrázek 9: Biochanin A

Genistin

7-*O*-beta glykosid, v poloze 7 je kovalentní vazbou navázána molekula glukózy.

V lidském těle dochází k hydrolyze vazby a uvolňuje se aglykon genistein a glukóza (Walter 1941). Díky střevní mikroflóře vzniká efektivní sloučenina s estrogení a protirakovinnou aktivitou. Za zmínku stojí snížení infekčnosti některých virů a pozitivní vliv na kostní metabolismus, především kvůli zvýšení vstřebávání vápníku a inhibici jeho vylučování (Suthar et al. 2001).

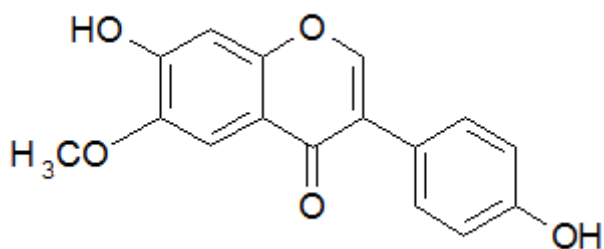


Obrázek 10: Genistin

Glycitein

Isoflavonoid, jehož základní kostra je obměněna *O*-methyloací v poloze 7.

Jako u většiny látek z této skupiny lze u glyciteinu také nalézt estrogení aktivitu, která je v porovnání s ostatními fytoestrogeny mnohem slabší, dokonce zanedbatelná (Song et al. 1999). Předností je antioxidační aktivita, jež částečně zabraňuje aterosklerotickým změnám cévního epitelu a tím snižuje hrozbu vysokého krevního tlaku.

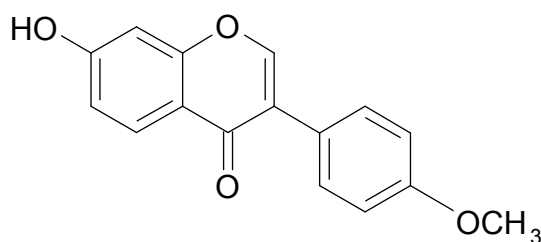


Obrázek 11: Glycitein

Formononetin

O-methylovaný rostlinný fytoestrogen obsažený v jeteli lučním (*Trifolium pratense*, Fabaceae), ale i v ostatních rostlinách z čeledi bobovitých (Fabaceae) (Kašparová 2013).

Velký zájem vzbuzují především antihypertenzní potenciál a vasodilatační vlastnosti. Navíc antioxidační aktivita formononetinu přispívá k prevenci aterosklerózy, remodelaci cév a srdce (Sun et al. 2011).

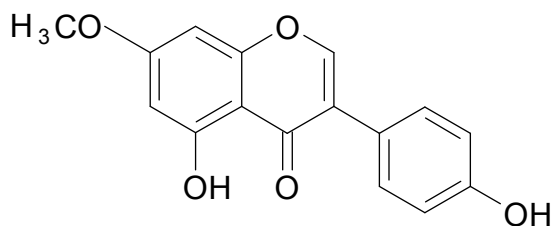


Obrázek 12: Formononetin

Prunetin

O-methylovaný derivát vyskytující se v rostlinách *Prunus emarginata* (Amygdalaceae) a *Prunus yedoensis* (Amygdalaceae).

Antioxidační a fytoestrogení aktivita je navíc doplněna o protizánětlivé působení, při kterém je inhibována syntéza zánětlivých cytokinů a zároveň stimulována tvorba makrofágů (Yang et al. 2013).



Obrázek 13: Prunetin

5. Experimentální část

5.1. Materiál

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

5.2. Chemikálie

- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner)
- Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) (Sigma)
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) (Sigma)
- Pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)
- Pufr pH 7.5, 6.8, 5.5, 4.5

5.3. Testované látky

- Daidzein (Sigma - Aldrich)
- Genistein (Sigma - Aldrich)
- Biochanin A (Extrasynthese)
- Genistin (Extrasynthese)
- Glycitein (Extrasynthese)
- Formononetin (Extrasynthese)
- Prunetin (Extrasynthese)

5.4. Používané přístroje

- Analytické váhy KERN ABT120-5DM
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Třepačka pro zkumavky IKA® VORTEX GENIUS 3
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA® MS 3 digital
- Ultrazvuková lázeň KRAINTEK

5.5. Příprava výchozích roztoků

- **Roztok hydroxylaminu 10mM**

Roztok byl zhotoven rozpuštěním hydroxylaminu v destilované vodě ($M_w=69,49\text{g/mol}$)

- **Roztok hydroxylaminu 1mM**

Roztok byl připraven naředěním připraveného roztoku hydroxylaminu 10 mM, v poměru 1:10.

- **Roztok měďnatých iontů 5mM**

Rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ vodě ($M_w = 249,69\text{ g/mol}$) v destilované vodě vzniká roztok o požadované koncentraci.

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

Výchozí roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny ($M_w = 564,54\text{ g/mol}$) nachystáme jejím rozpuštěním v destilované vodě.

- **Roztok zkoumané látky**

Roztoky zkoumaných isoflavonoidů byly zhotoveny rozpuštěním v dimethylsulfoxidu (DMSO). Výchozí koncentrace byla nejčastěji 20 nebo 10 mM. Při vlastním měření byla výchozí koncentrace dále ředěna pomocí DMSO na žádanou koncentraci.

5.6. Kalibrace měďnatých iontů

Abychom mohli vytvořit kalibrační křivku závislosti absorbance na koncentraci iontů Cu^{2+} , musíme si nejdříve připravit zásobní roztoky o požadovaných koncentracích. Výsledky měření slouží k sestavení grafu a konstrukci přímky.

Příprava základních a pracovních roztoků:

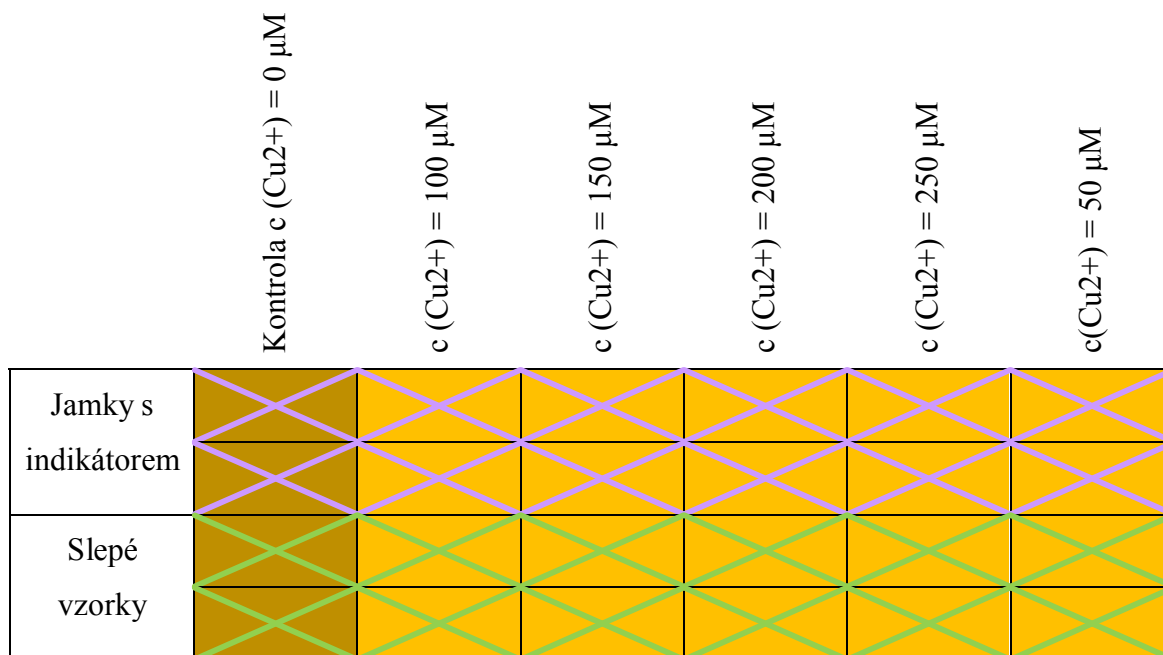
1mM HA

roztoky Cu^{2+} iontů o koncentraci 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 250 μM





5mM BCS

Vlastní postup:

1. Pipetujeme 150 μl pufru o pH 6.8 do všech jamek mikrotitrační destičky (Obr. č. 6)
2. Do všech jamek vložíme 50 μl 1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu.
3. Přidáme 50 μl roztoku dopředu připravených měďnatých iontů o požadované koncentraci do testovacích jamek nebo 50 μl destilované vody do kontrolních jamek (Obr. č. 6)
4. Umístíme mikrotitrační destičku na třepačku a promícháváme 1 minutu.
5. Na konec přidáme 50 μl roztoku disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) do horní poloviny jamek, do spodní poloviny přidáme 50 μl destilované vody.
6. Za pomoci spektrofotometru ihned měříme absorbanci při vlnové délce (λ) 484 nm.
7. Po uplynutí 4:30 minut změříme opět absorbanci při vlnové délce (λ) 484 nm.
8. Naměřené hodnoty absorbance zaneseme do tabulky a následně sestrojíme graf kalibrační křivky.



Obrázek 14: Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci Cu^{2+} iontů

-  Jamky s BCS
-  Slepé vzorky- obsahují destilovanou vodu
-  Kontrolní jamky- bez přítomnosti Cu^{2+} iontů
-  Testované jamky- použita příslušná koncentrace Cu^{2+} iontů

5.7. Metodický postup redukce měďnatých (Cu^{2+}) iontů v pufru

Při redukci se mísil roztok pufru s roztokem testované látky v testovacích jamkách a v kontrolních jamkách s roztokem hydroxylaminu. Následně byl přidán roztok měďnatých iontů a po dvou minutách míchání roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) nebo vody do jamek se slepými vzorky. Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm v čase nula a za 4.30 minuty.

1. Nejdříve si připravíme a naředíme roztoky, které použijeme při vlastním experimentu:
 - roztok iontů Cu^{2+} naředěné vodou na koncentraci 250 μM
 - roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) 5mM
 - roztok hydroxylaminu 10 mM, ze kterého naředíme 1 mM roztok hydroxylaminu

- testované sloučeniny ředěny v DMSO na požadovanou koncentraci
2. Do testovací destičky pipetujeme do každé jamky 100 μl příslušného pufru (pH 4.5, 5.5, 6.8 a 7.5).
 3. Přidáme 50 μl roztoku testované sloučeniny naředěné na požadovanou koncentraci nebo rozpouštědla do testovacích jamek.
 4. Do kontrolních jamek pipetujeme 50 μl roztoku hydroxylamin hydrochloridu (HA), jehož koncentrace se odvíjí od použitého pH: 1mM HA pro pH 6.8 a 7.5 a pro pH 4.5 a 5.5 použijeme 10mM roztok HA.
 5. Do všech jamek přidáme 50 μl 250 μM roztoků iontů Cu^{2+}
 6. Mícháme 2 minuty.
 7. Do horní poloviny jamek přidáme 50 μl 5 mM roztoku disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) a do spodní poloviny pipetujeme vodu.
 8. Ihned měříme absorbanci při 484 nm a znovu v čase 4:30 minut.

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

Obrázek 15: Znárodnění mikrotitrační destičky při stanovení redukce měďnatých iontů.

	testovací jamky
	kontrolní jamky
X	jamky s indikátorem
X	slepé vzorky

Závěrečný obsah jamky:

100 μ l pufr (pH 4.5, 5.5, 6.8 a 7.5)

50 μ l roztok zkoušené látky, rozpouštědla nebo roztok HA

50 μ l roztok měďnatých iontů (Cu^{2+})

50 μ l roztok BCS nebo voda

5.8. Statistická analýza

Konečné množství mědi bylo spočteno z rozdílů absorbance mezi zkoušenou látkou (vzorek s indikátorem) a jejím blankem (vzorek bez indikátoru) poděleného rozdílem kontrolního vzorku (známé množství mědi bez testované látky) a jeho blanku.

Statistická analýza byla provedena pomocí programu Microsoft Excel a GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, USA). Při srovnání účinnosti jednotlivých redukčních schopností byl použit test ANOVA s Bonferroniho post testem. Výsledky byly zpracovány jako průměr ± směrodatná odchylka vypočítaná podle vzorce

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

x- střední hodnota vzorku

n- velikost vzorku

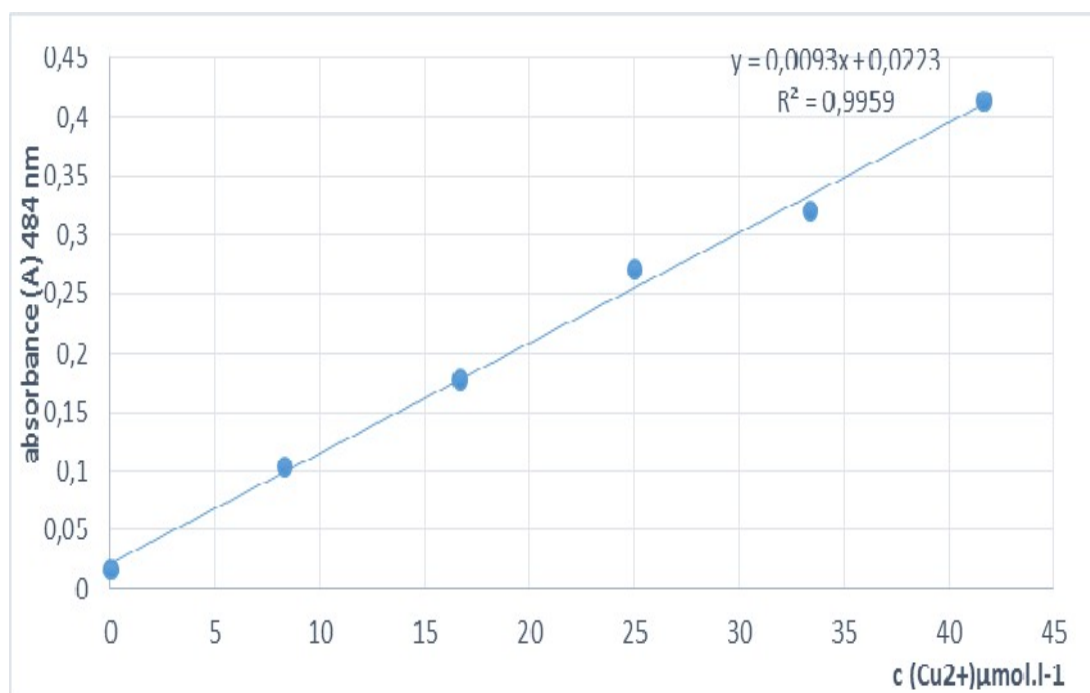
6. Výsledky

6.1. Kalibrační křivka

Graf kalibrační křivky (Obr. 8) je sestaven z hodnot absorbancí, které jsme naměřili. Použité koncentrace měďnatých iontů: 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 250 μM

pH 6,8						
základní c (μM)	0	50	100	150	200	250
finální c (μM)	0	8,333333	16,66667	25	33,33333	41,66667
průměr A	0,015	0,1	0,168	0,251	0,292	0,3835

Tabulka 5: Naměřené hodnoty potřebné pro sestavení kalibrační křivky (závislost absorbance na koncentraci).



Obrázek 16: Kalibrační křivka měďnatých iontů (Cu^{2+}).

6.2 Redukující účinky isoflavonoidů

Měření redukční aktivity bylo provedeno *in vitro* při odlišných hodnotách pH a rozdílných koncentracích isoflavonoidů. Naměřené hodnoty redukční aktivity daidzeinu (Obr. 17-20), genisteinu (Obr. 23-26), biochaninu A (Obr. 29-32), genistinu (Obr. 35-38), glyciteinu (Obr. 41-44), formononetinu (Obr. 47-50) a prunetinu (Obr. 53-56) byly zaneseny do grafů.

Kde je vynesena hodnota redukční aktivity v závislosti na koncentračním poměru měďnatých iontů ku isoflavonoidům. Modré šipky znázorňují statistickou odlišnost od hodnoty rozpouštědla (DMSO). Červené šipky prezentují statisticky rozdílné hodnoty ve srovnání s hodnotou redukčního maxima.

Obrázky 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57 zachycuje získaná redukční maxima isoflavonoidů při zadaných hodnotách pH.

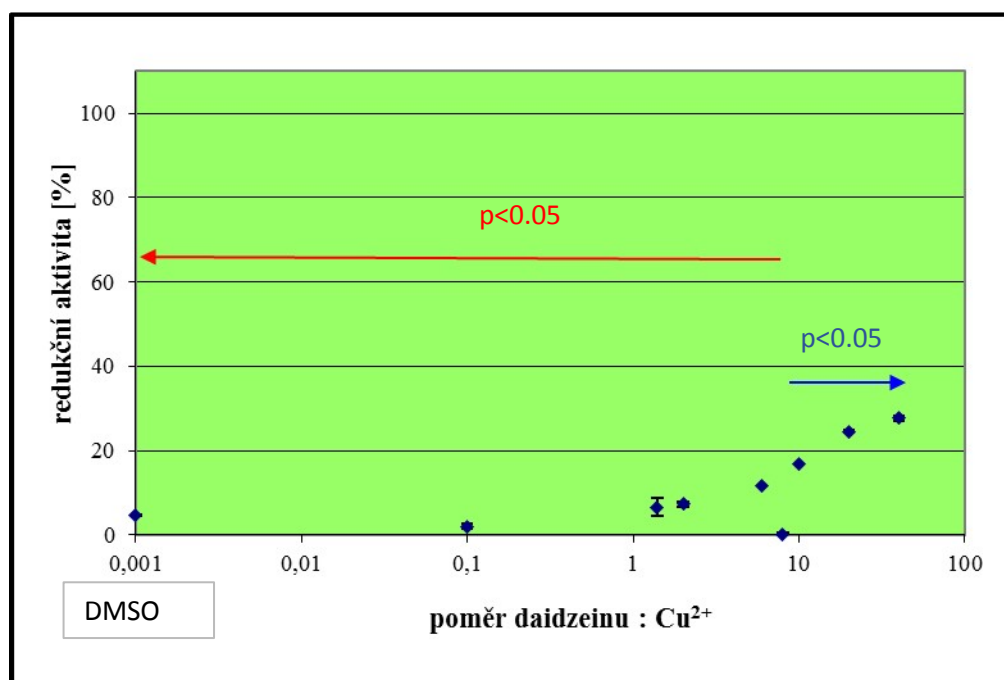
Poměr koncentrace isoflavonoidu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity jednotlivých pH je zachycen na obrázcích 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58.

Černé úsečky představují poměry, jež se ze statistického hlediska neodlišují od maximální hodnoty redukce. Šedé tečky odpovídají maximální hodnotě redukční aktivity.

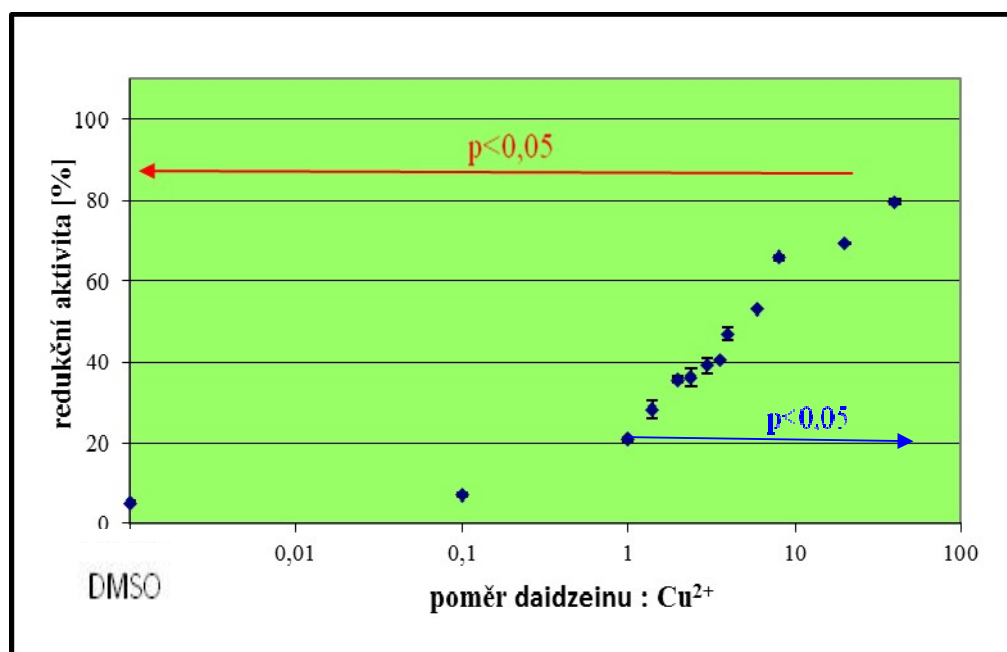
Obrázky 59, 61, 63 a 65 tvoří přehled maximální redukční schopnosti jednotlivých isoflavonoidů napříč všemi pH.

Poměry koncentrací zkoumaných isoflavonoidů, které v určitém pH projevují redukční aktivitu, shrnují obrázky 60, 62, 64 a 66.

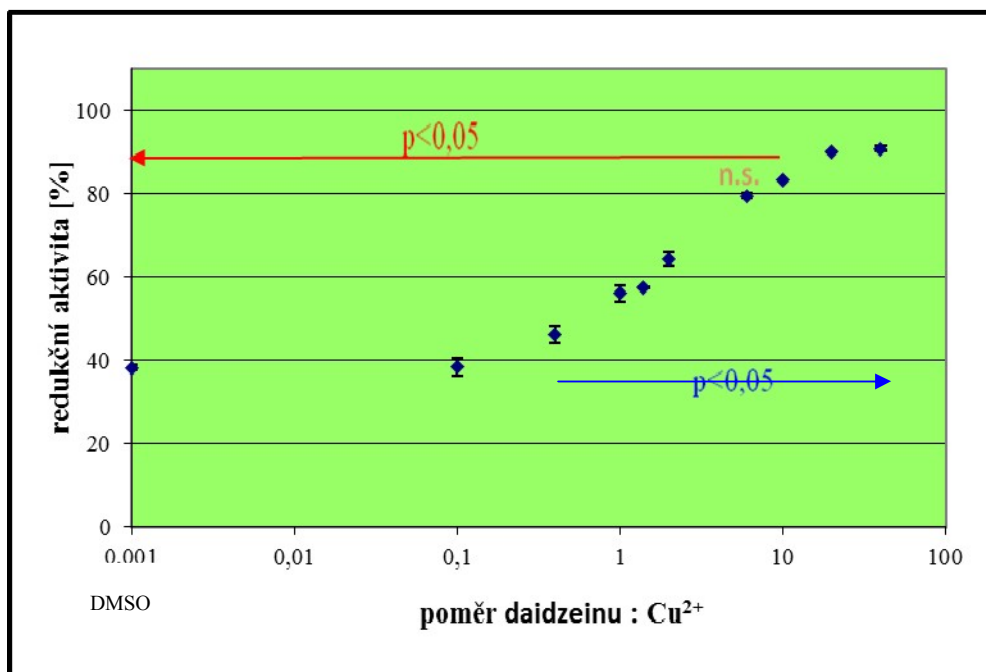
6.2.1 Měď redukující aktivita daidzeinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5



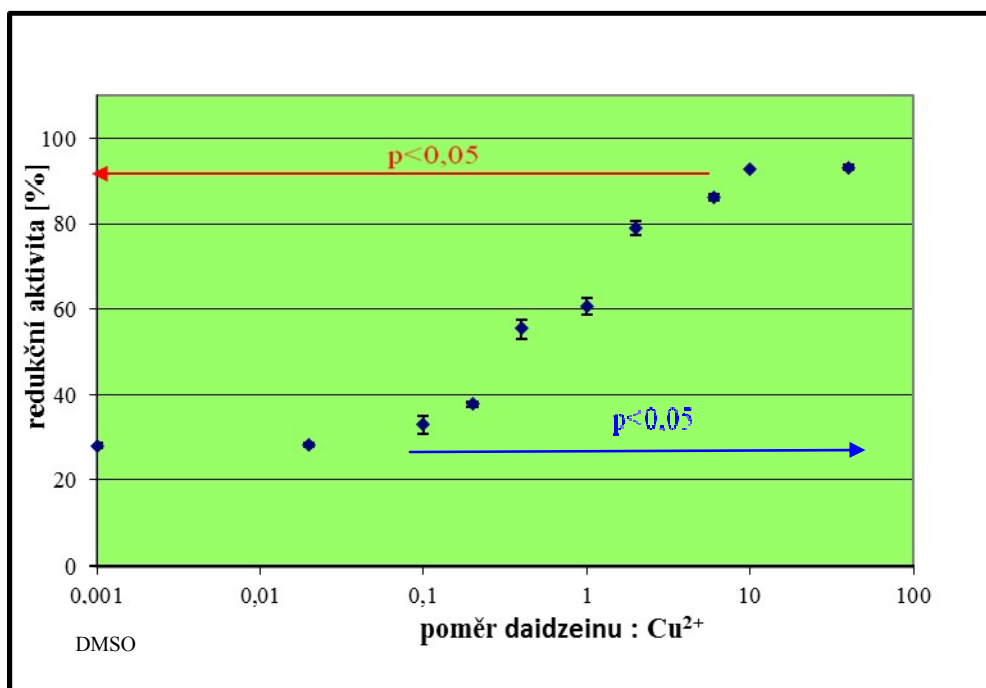
Obrázek 17: Redukční aktivita daidzeinu při pH 4.5 v čase 5 minut.



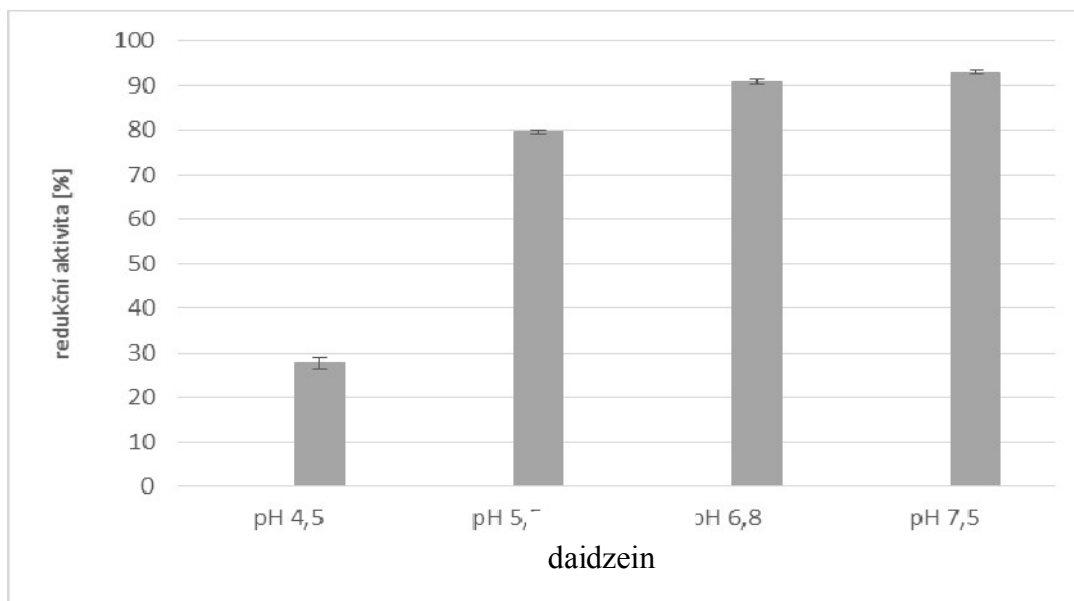
Obrázek 18: Redukční aktivita daidzeinu při pH 5.5 v čase 5 minut.



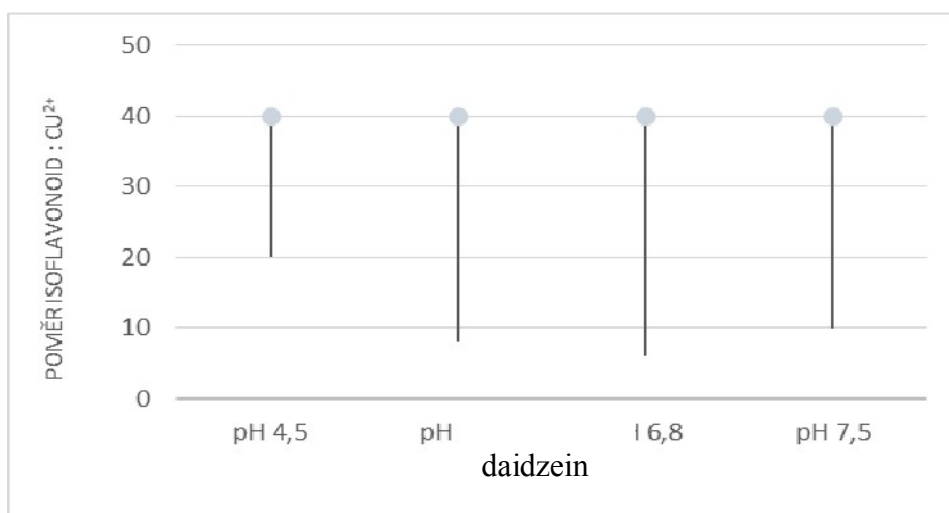
Obrázek 19: Redukční aktivita daidzeinu při pH 6.8 v čase 5 minut.



Obrázek 20: Redukční aktivita daidzeinu při pH 7.5 v čase 5 minut.

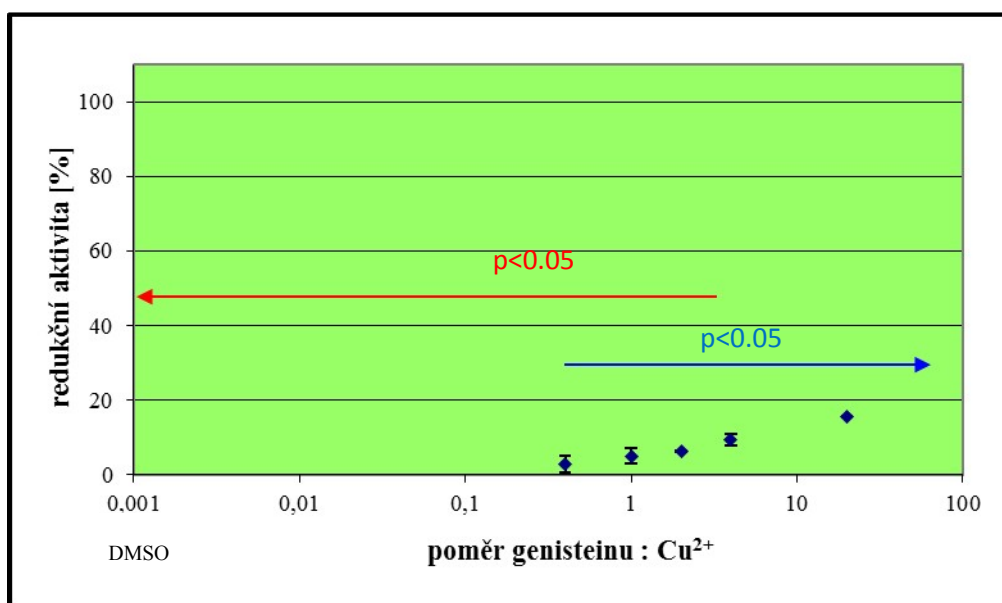


Obrázek 21: Hodnoty redukčních maxim daidzeinu při zkoušených pH.

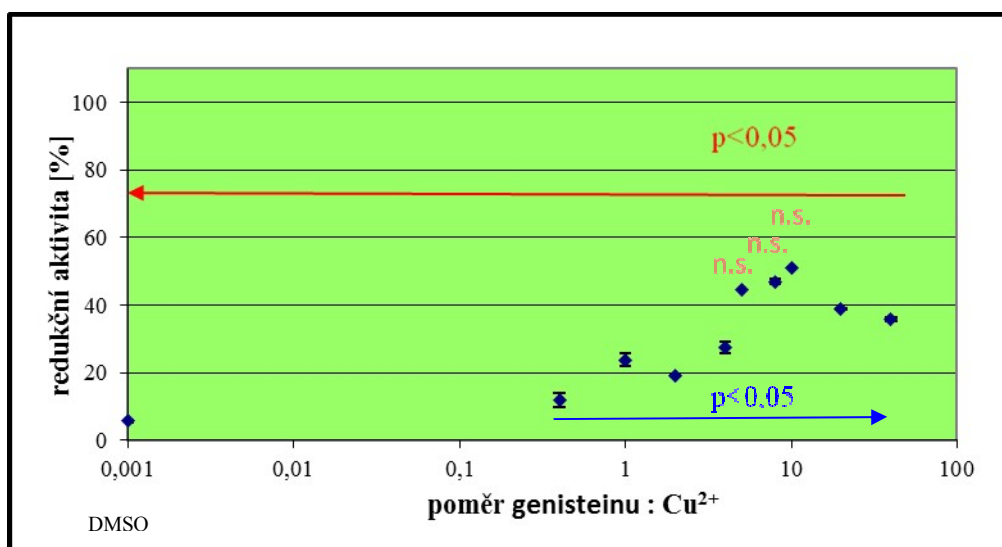


Obrázek 22: Poměr koncentrace daidzeinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity zkoušených pH.

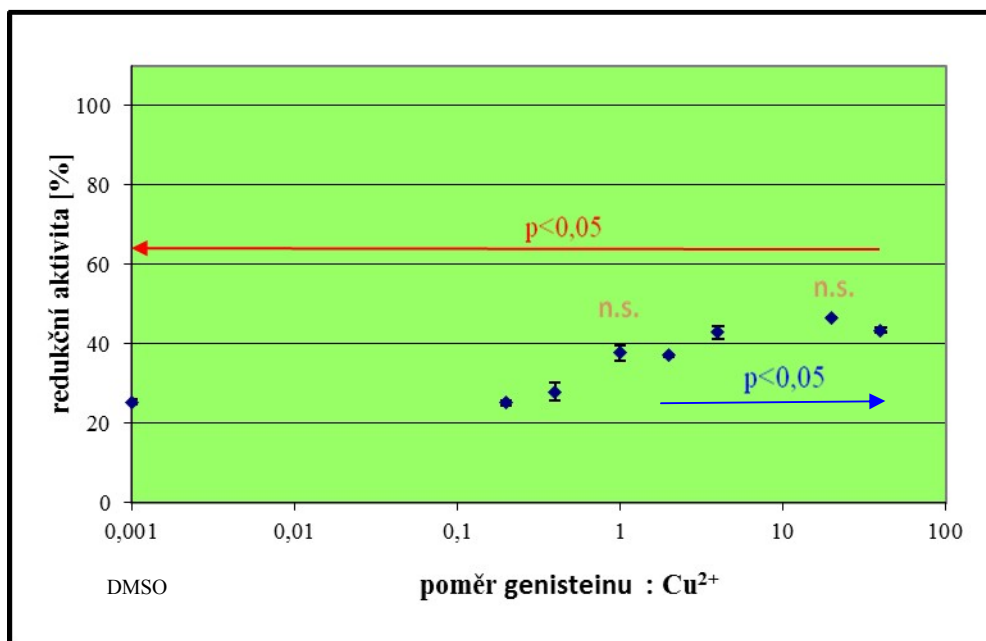
6.2.2 Měď redukující aktivita genisteinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5



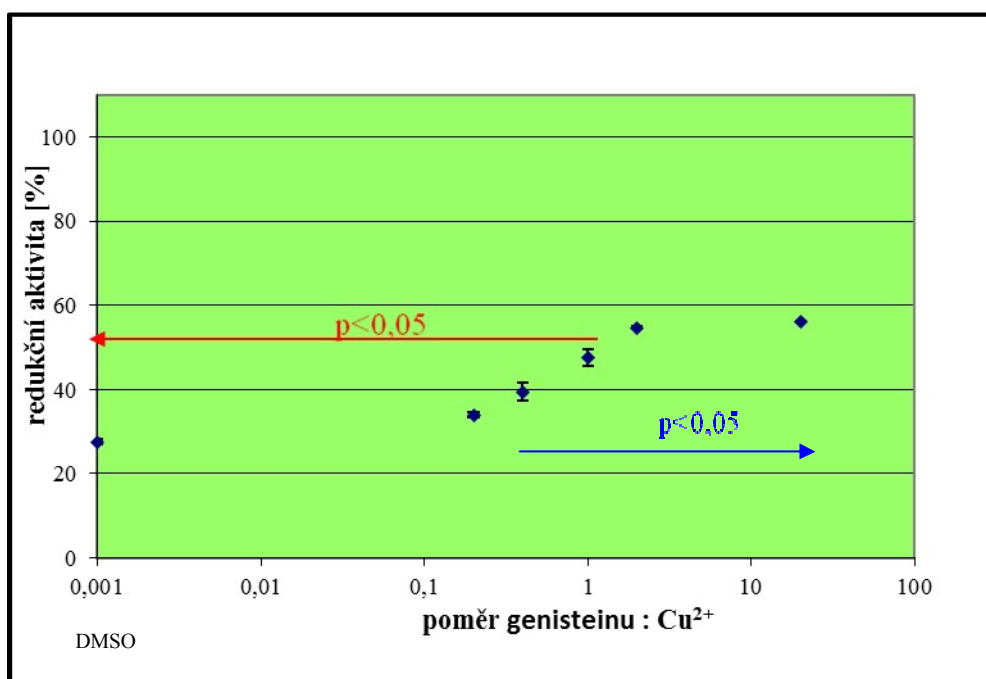
Obrázek 23: Redukční aktivita genisteinu při pH 4.5 v čase 5 minut.



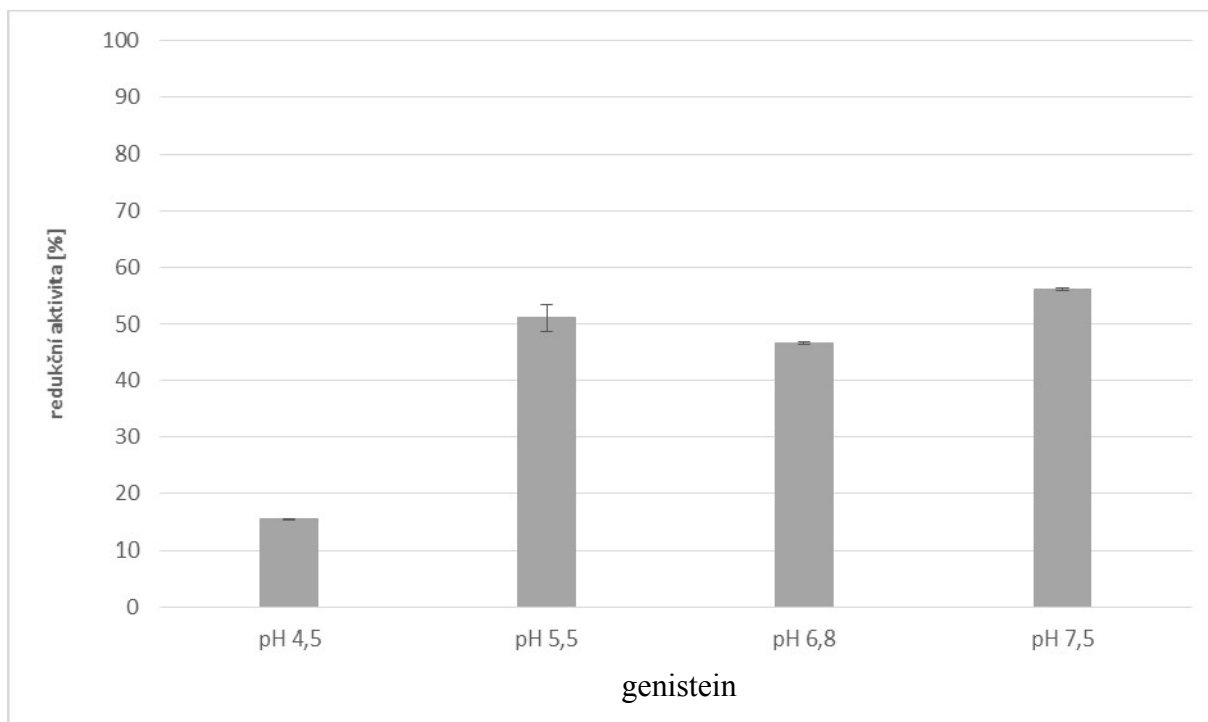
Obrázek 24: Redukční aktivita genisteinu při pH 5.5 v čase 5 minut.



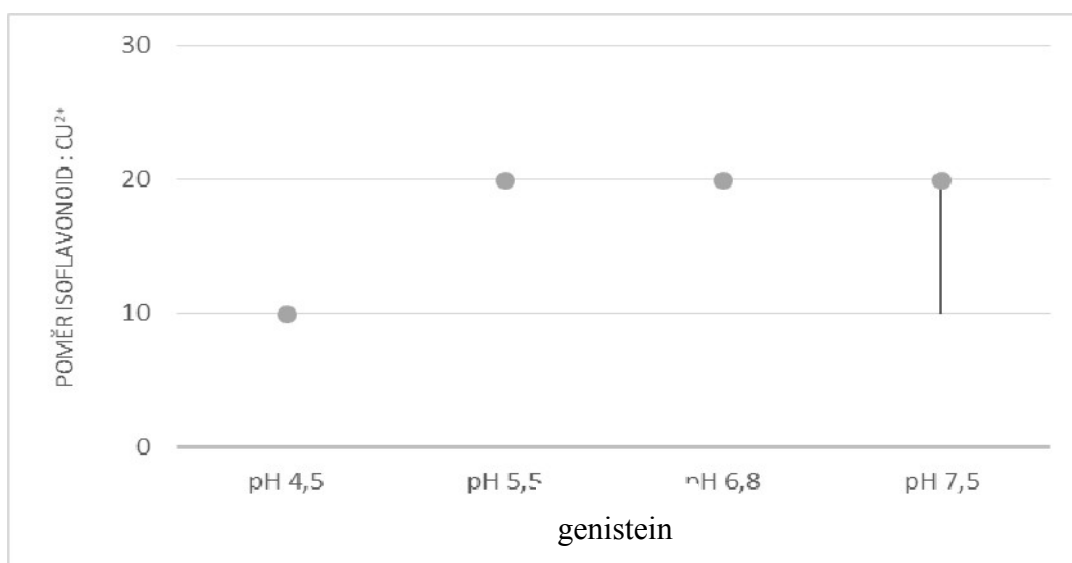
Obrázek 25: Redukční aktivita genisteinu při pH 6.8 v čase 5 minut.



Obrázek 26: Redukční aktivita genisteinu při pH 7.5 v čase 5 minut.

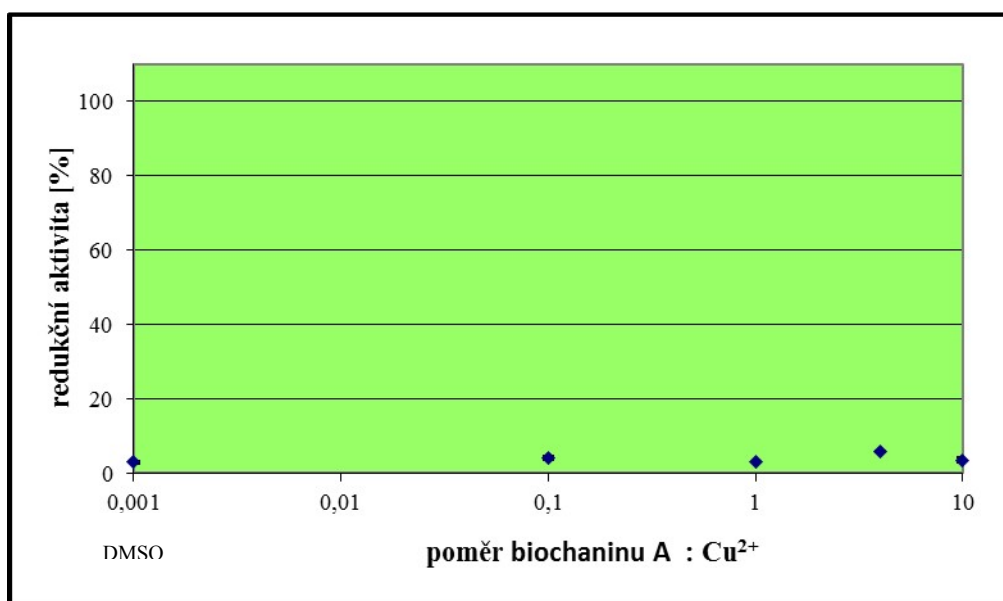


Obrázek 27: Hodnoty redukčních maxim genisteinu při zkoušených pH.

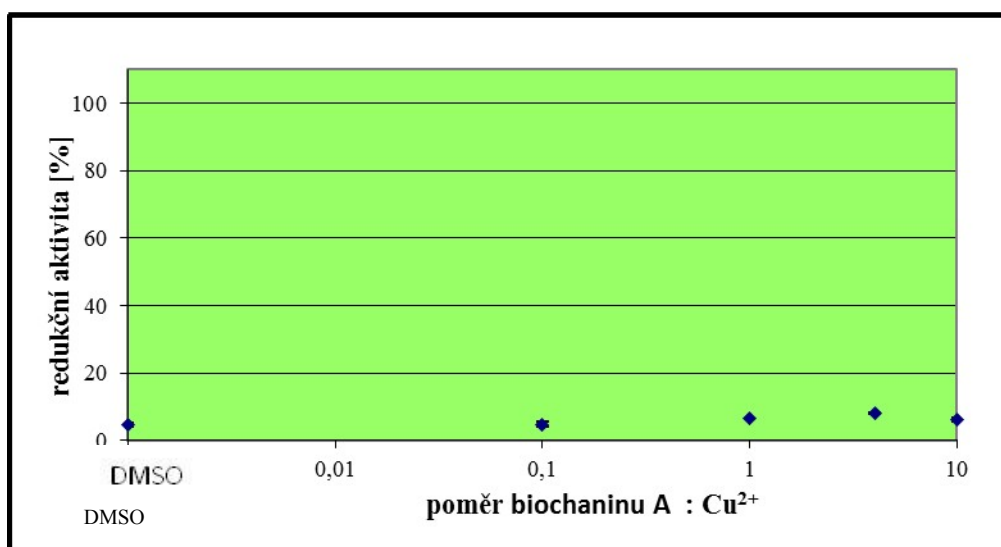


Obrázek 28: Poměr koncentrace genisteinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity zkoušených pH.

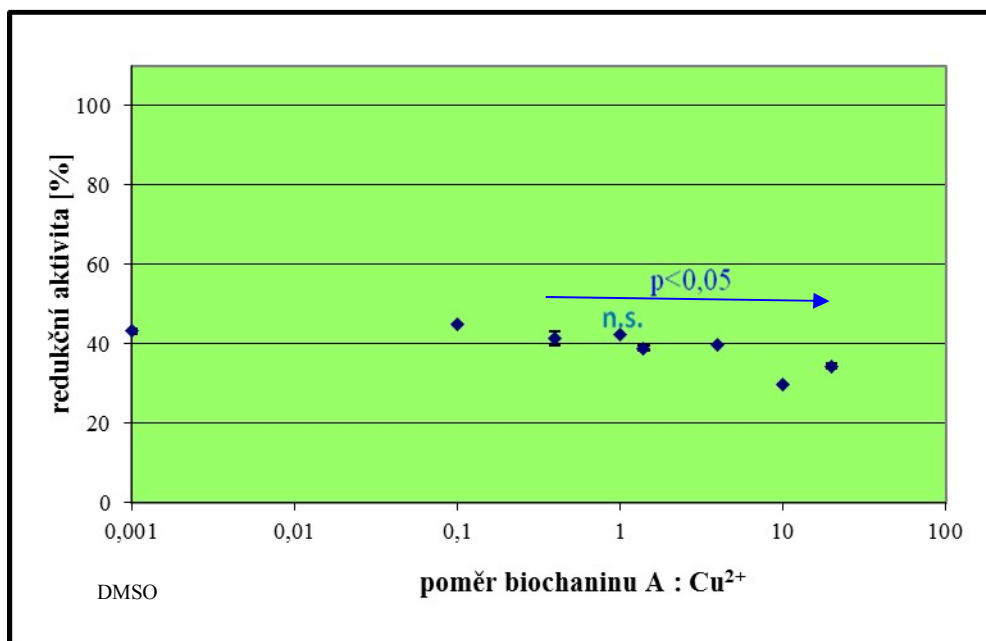
6.2.3 Měď redukující aktivita biochaninu A při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5



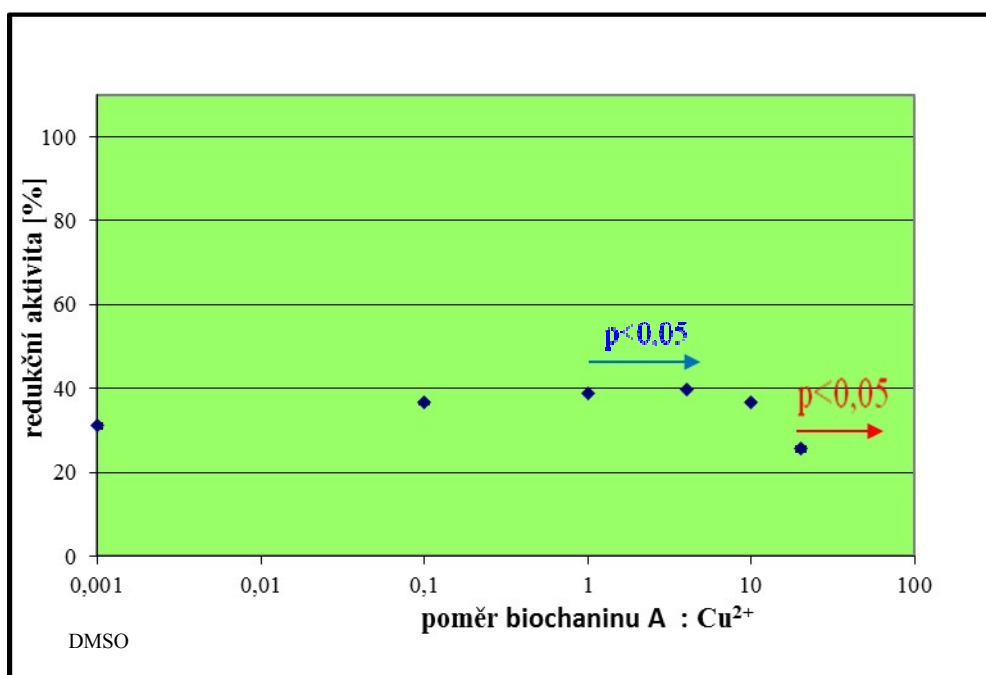
Obrázek 29: Redukční aktivita biochaninu A při pH 4.5 v čase 5 minut.



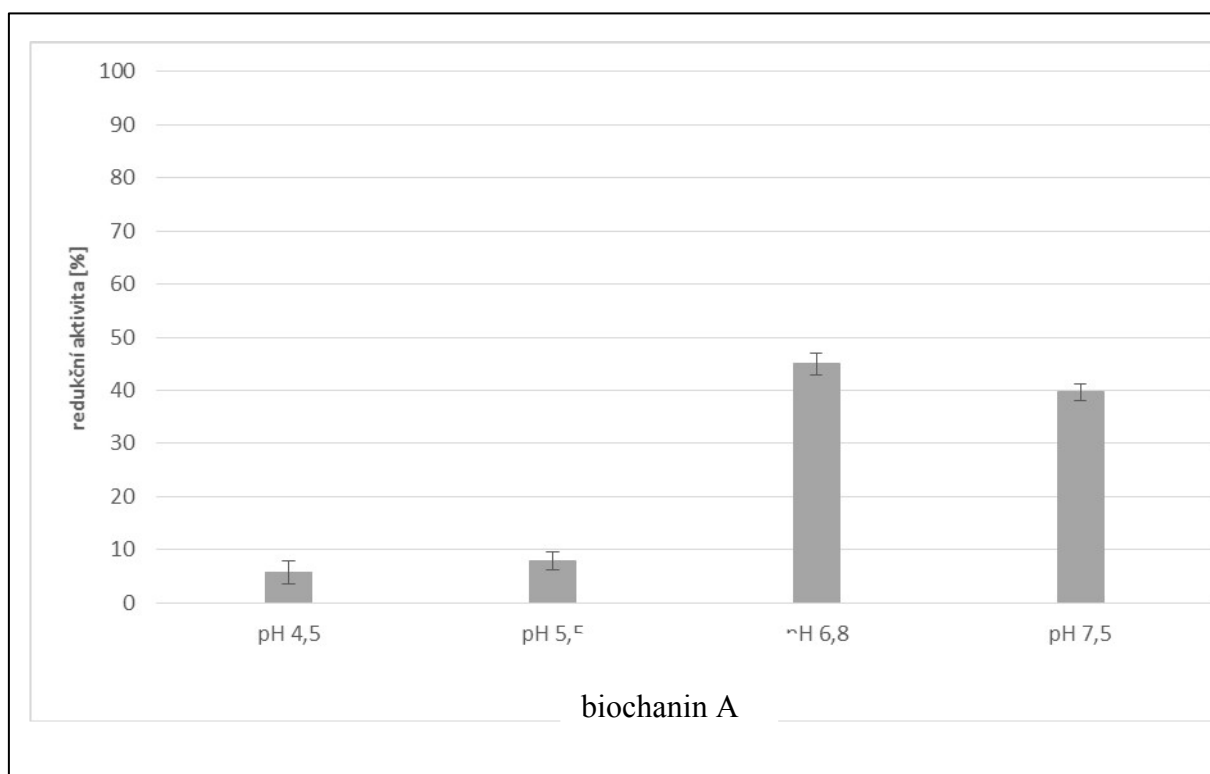
Obrázek 30: Redukční aktivita biochaninu A při pH 5.5 v čase 5 minut.



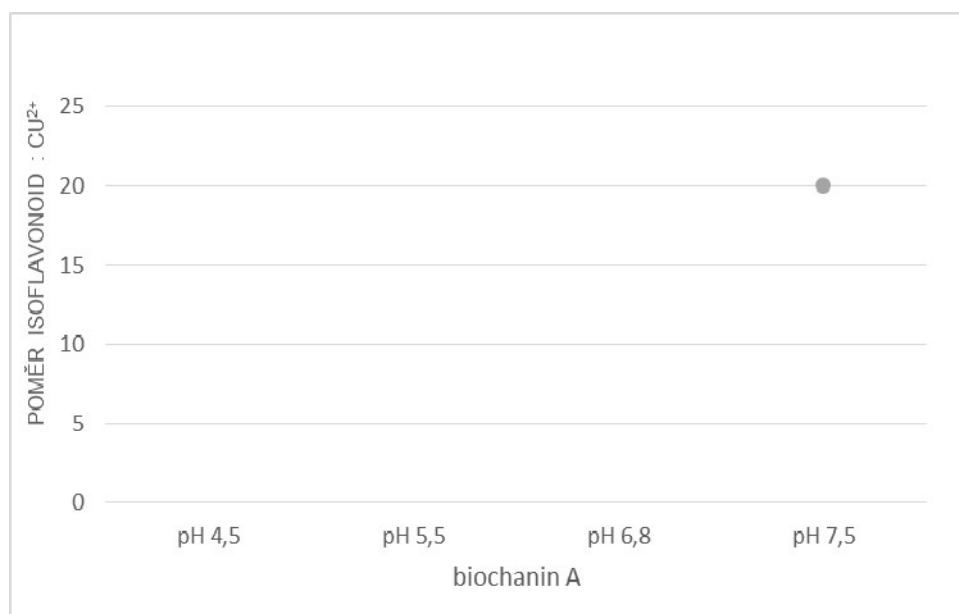
Obrázek 31: Redukční aktivita biochaninu A při pH 6.8 v čase 5 minut.



Obrázek 32: Redukční aktivita biochaninu A při pH 7.5 v čase 5 minut.

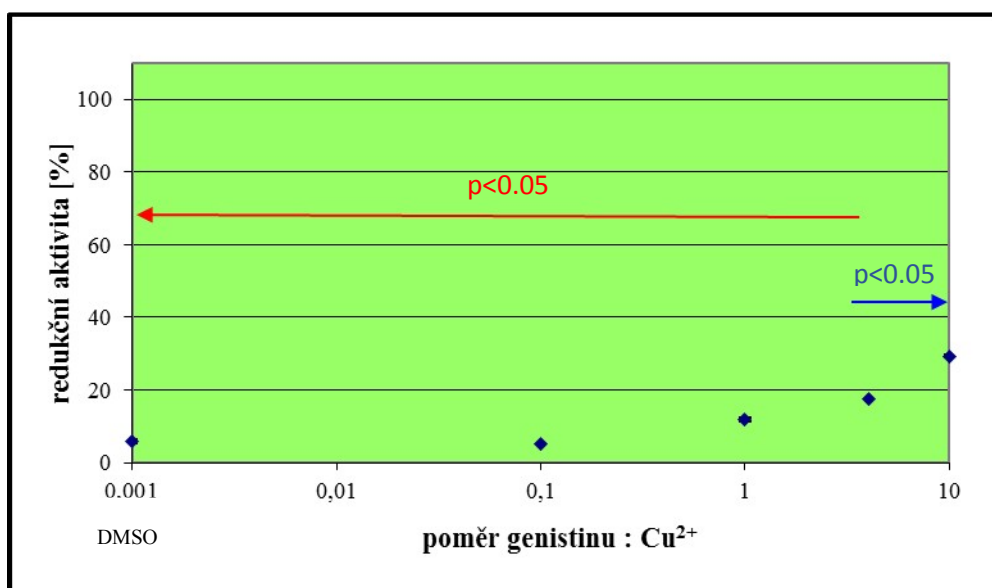


Obrázek 33: Hodnoty redukčních maxim biochaninu A při zkoušených pH.

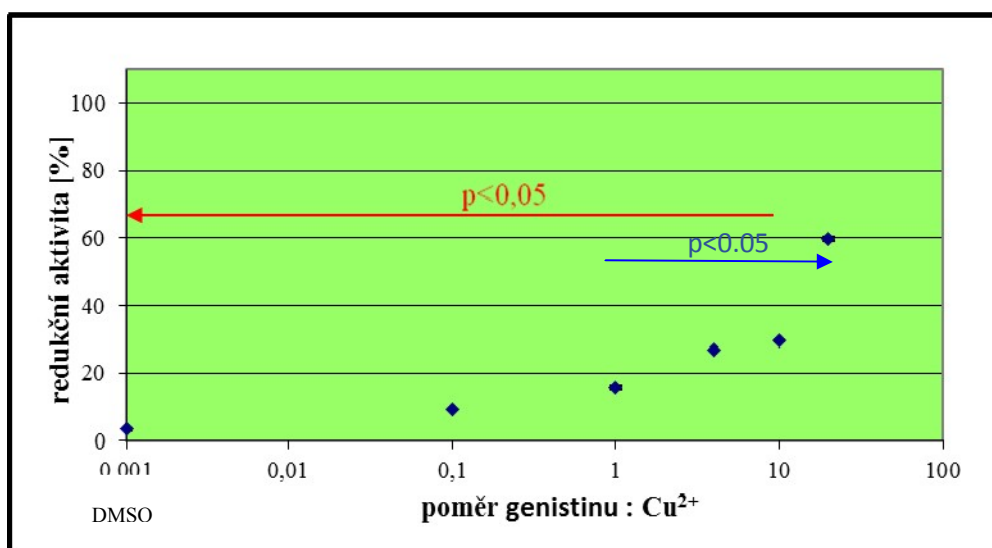


Obrázek 34: Poměr koncentrace biochaninu A a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity zkoušených pH.

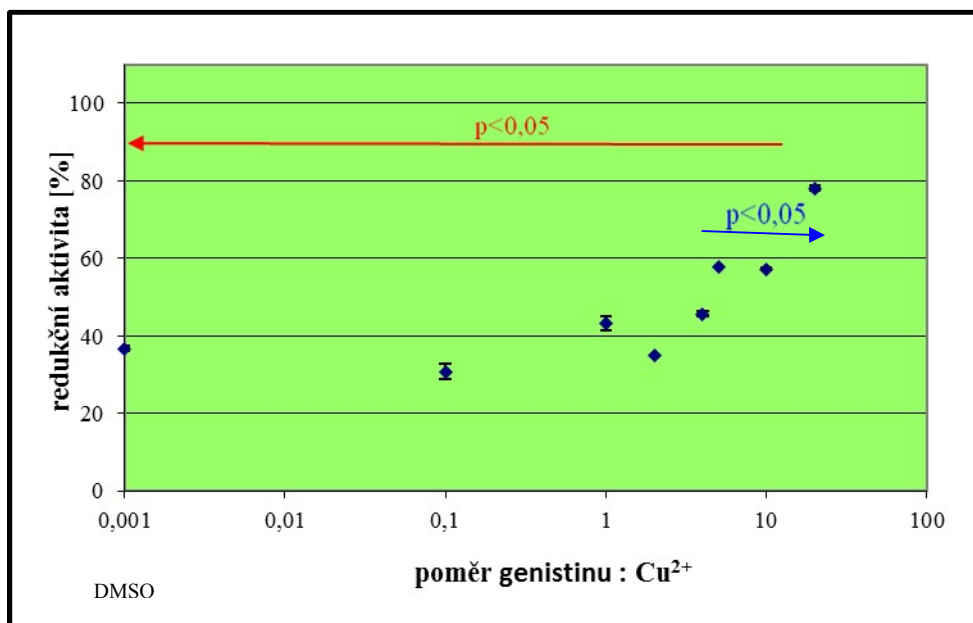
6.2.4 Měď redukující aktivita genistinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5



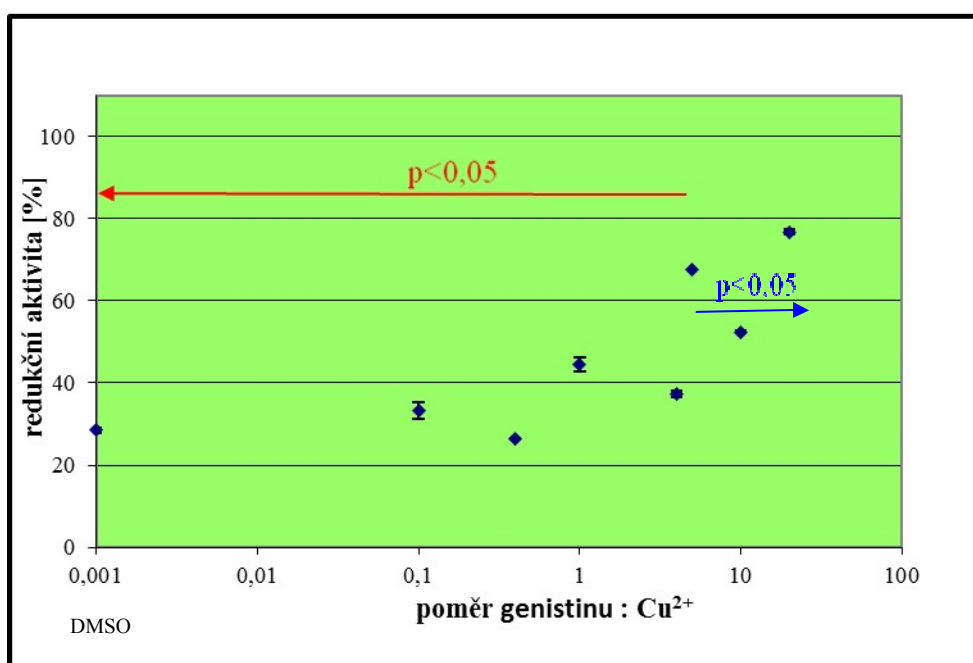
Obrázek 35: Redukční aktivita genistinu při pH 4.5 v čase 5 minut.



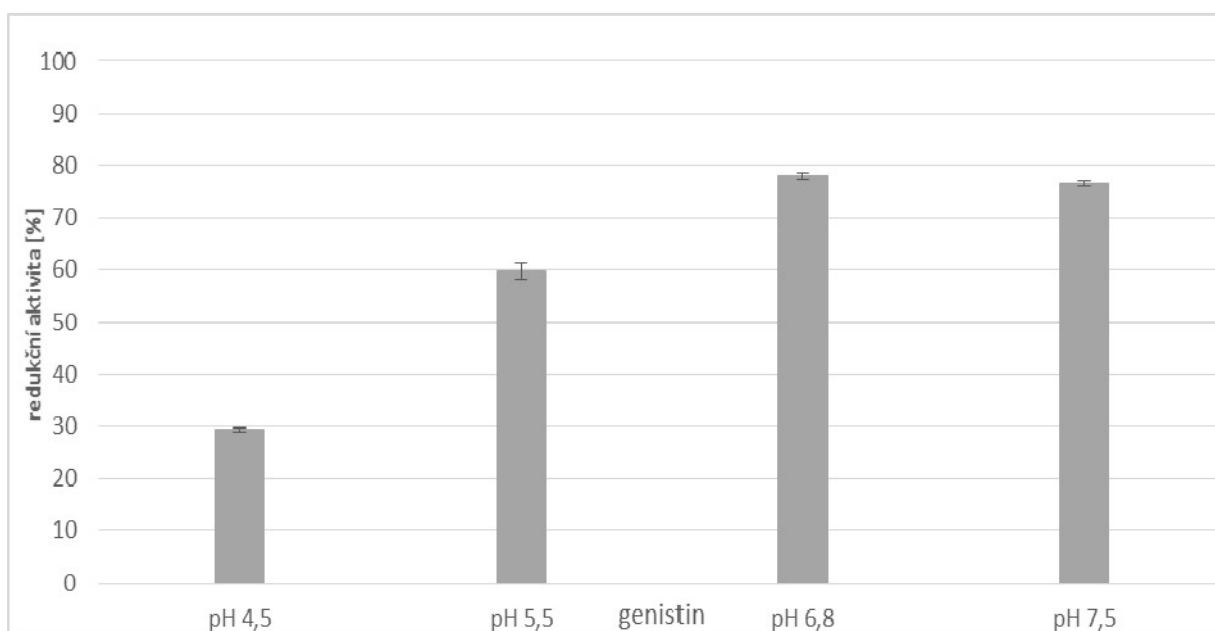
Obrázek 36: Redukční aktivita genistinu při pH 5.5 v čase 5 minut.



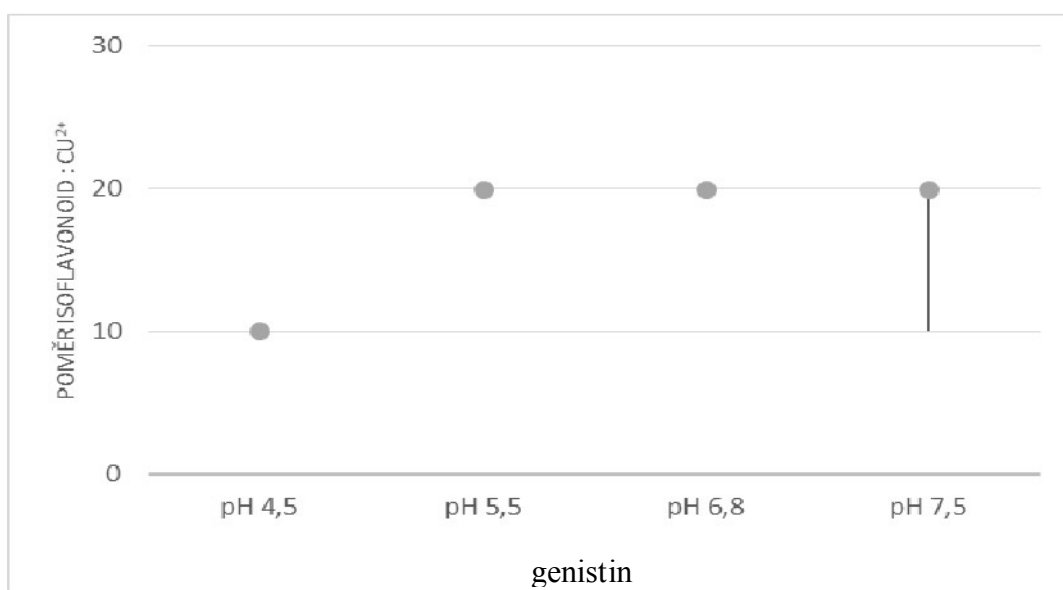
Obrázek 37: Redukční aktivita genistinu při pH 6.8 v čase 5 minut.



Obrázek 38: Redukční aktivita genistinu při pH 7.5 v čase 5 minut.

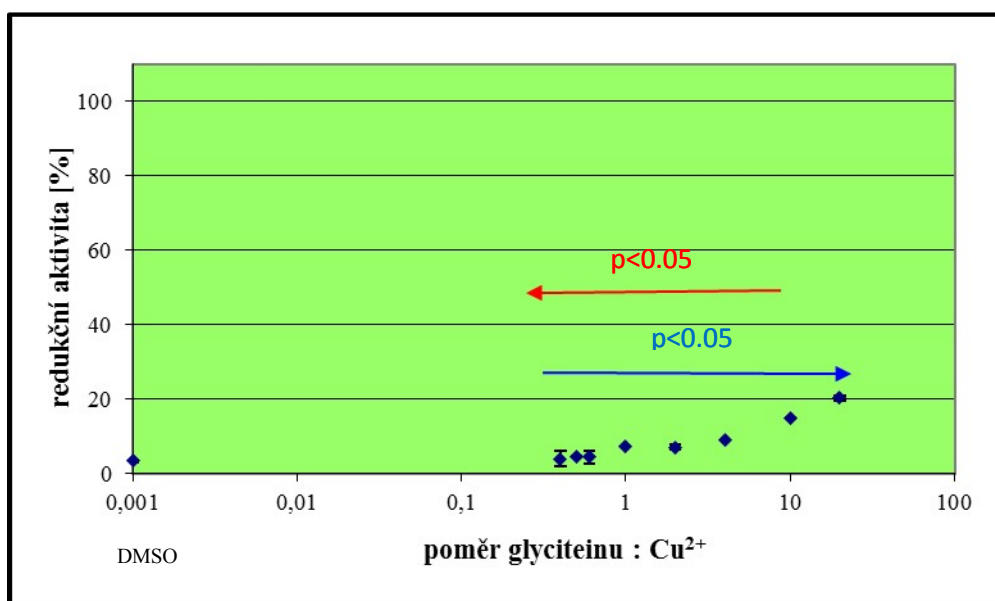


Obrázek 39: Hodnoty redukčních maxim genistinu při zkoušených pH.

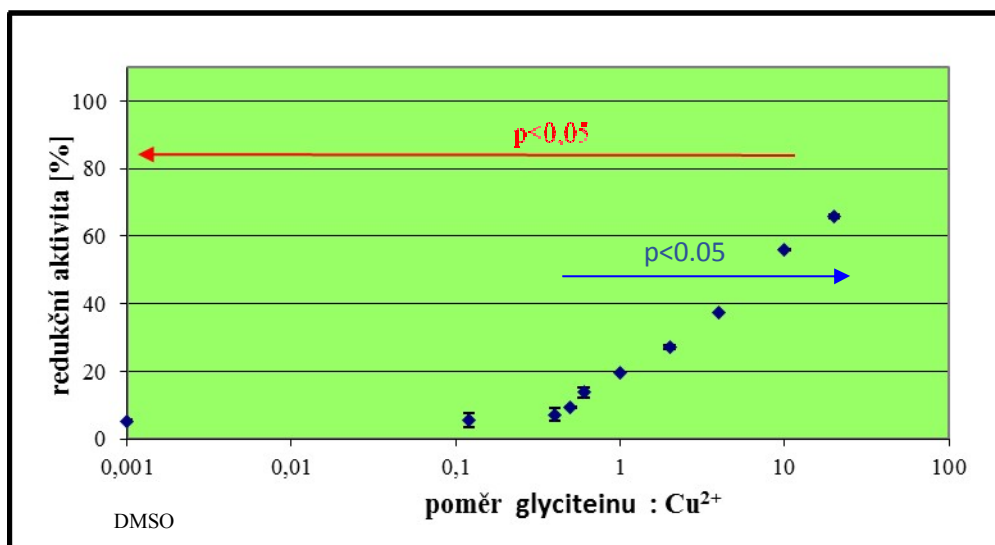


Obrázek 40: Poměr koncentrace genistinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity zkoušených pH.

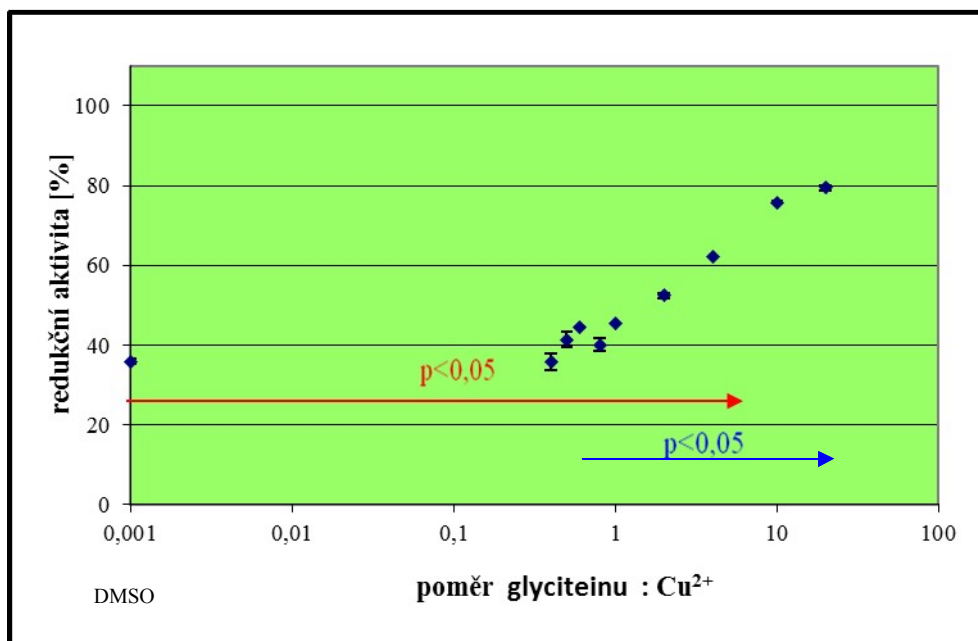
6.2.5 Měď redukující aktivita glyciteinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5



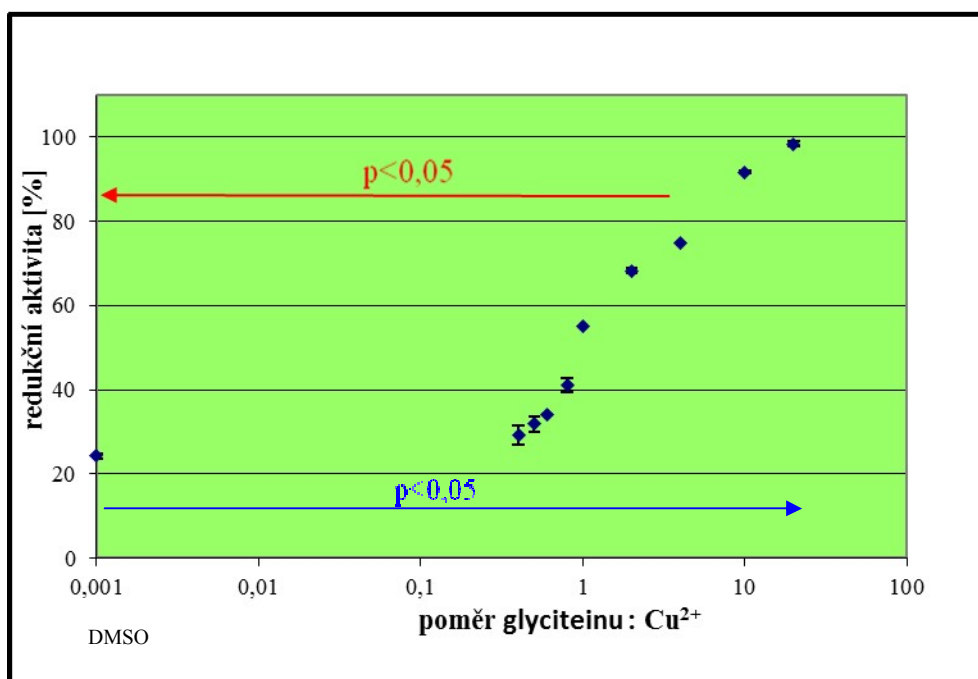
Obrázek 41: Redukční aktivita glyciteinu při pH 4.5 v čase 5 minut.



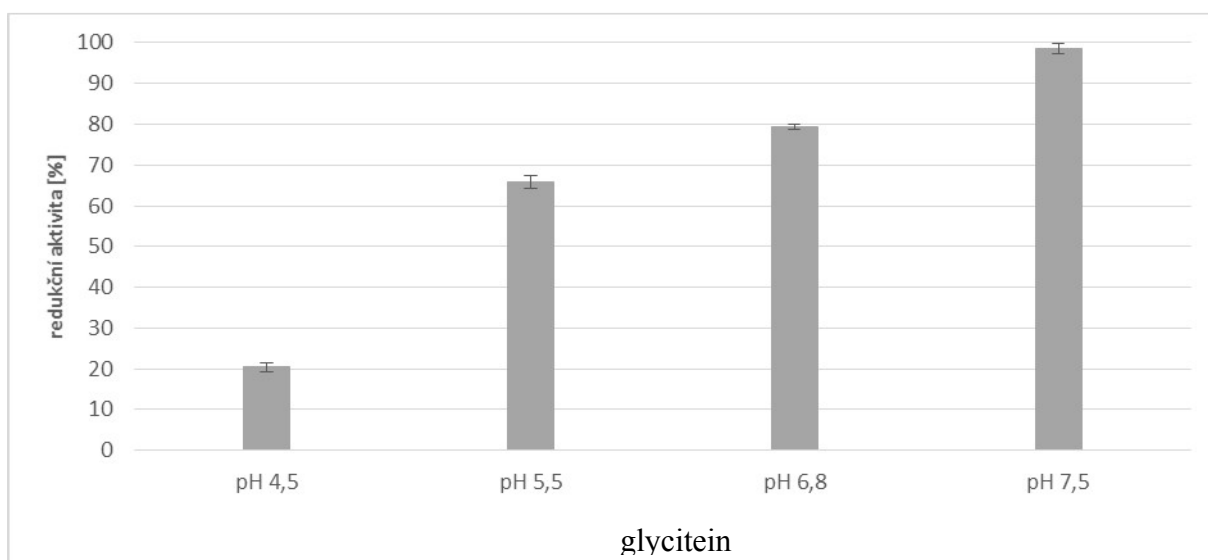
Obrázek 42: Redukční aktivita glyciteinu při pH 5.5 v čase 5 minut.



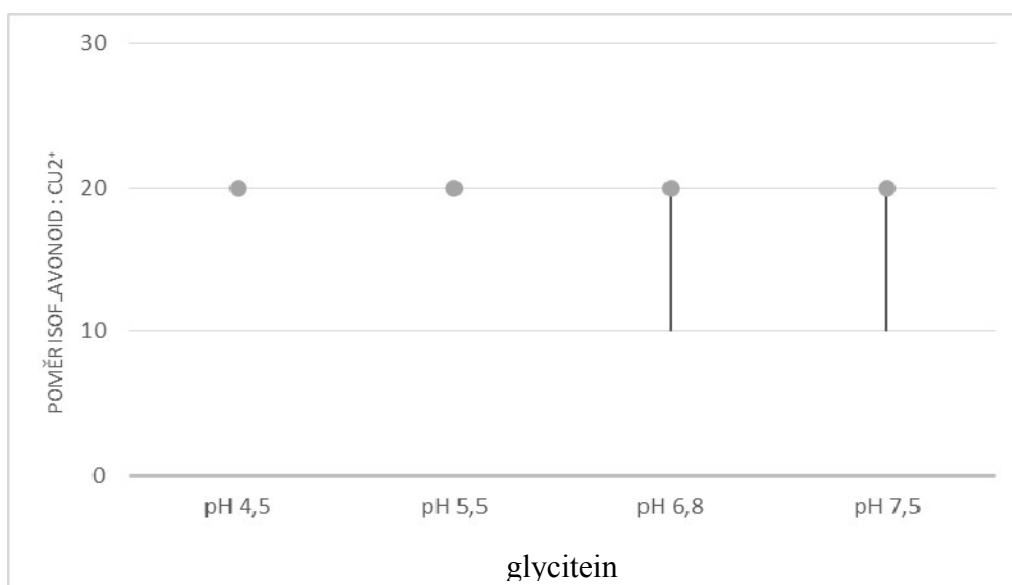
Obrázek 43: Redukční aktivita glycylglycine při pH 6.8 v čase 5 minut.



Obrázek 44: Redukční aktivita glycylglycine při pH 7.5 v čase 5 minut.

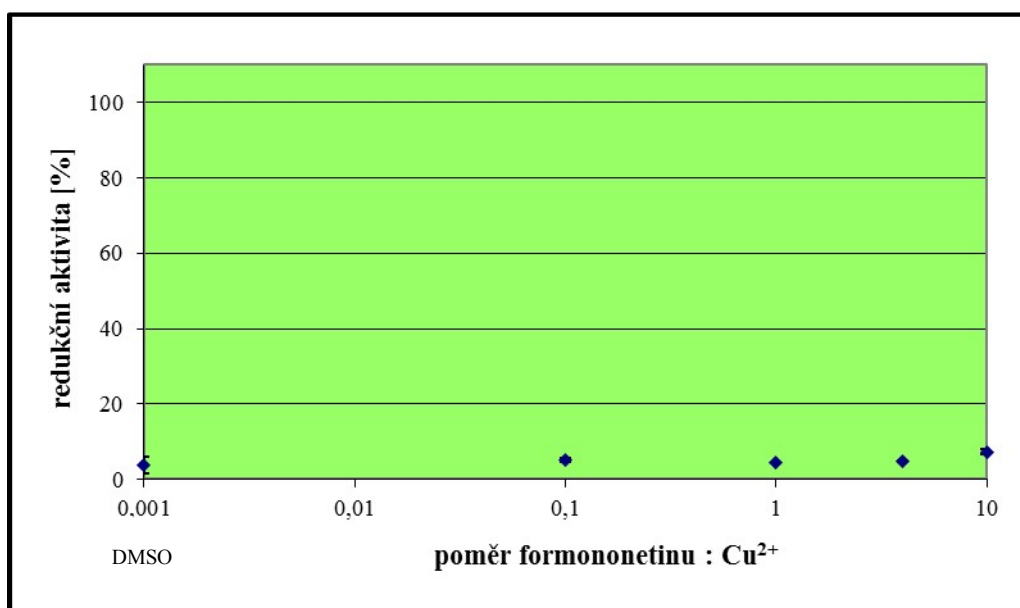


Obrázek 45: Hodnoty redukčních maxim glyciteinu při zkoušených pH.

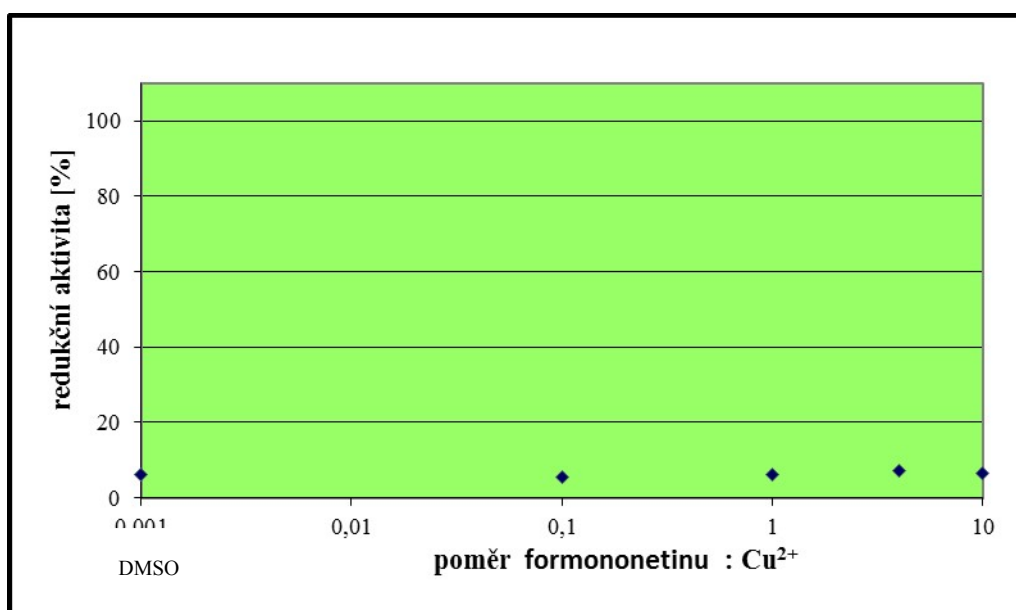


Obrázek 46: Poměr koncentrace glyciteinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity zkoušených pH.

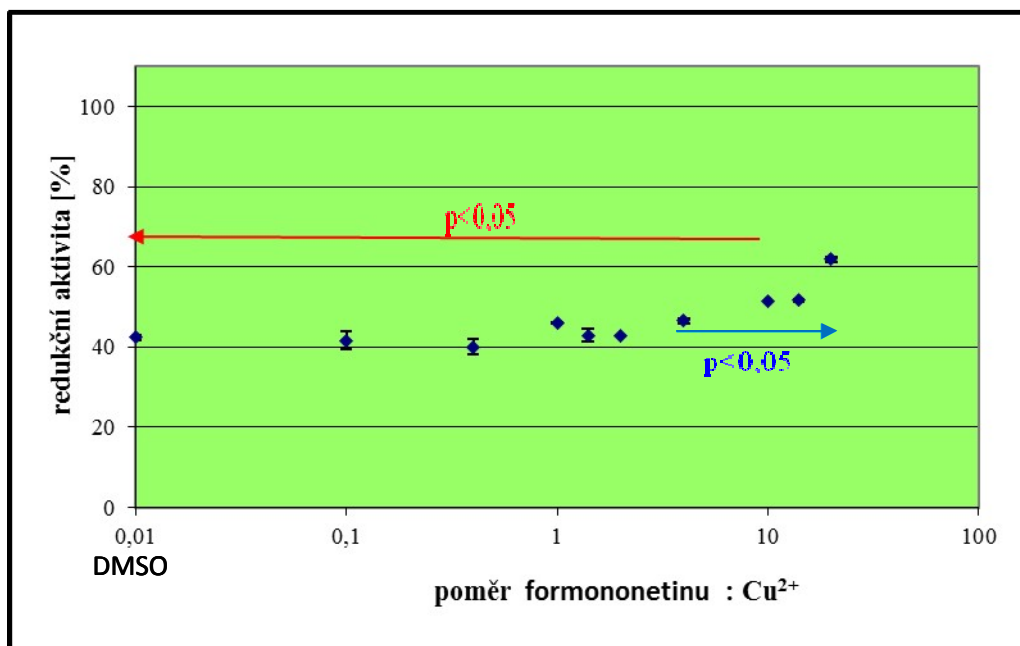
6.2.6 Měď redukující aktivita formononetinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5



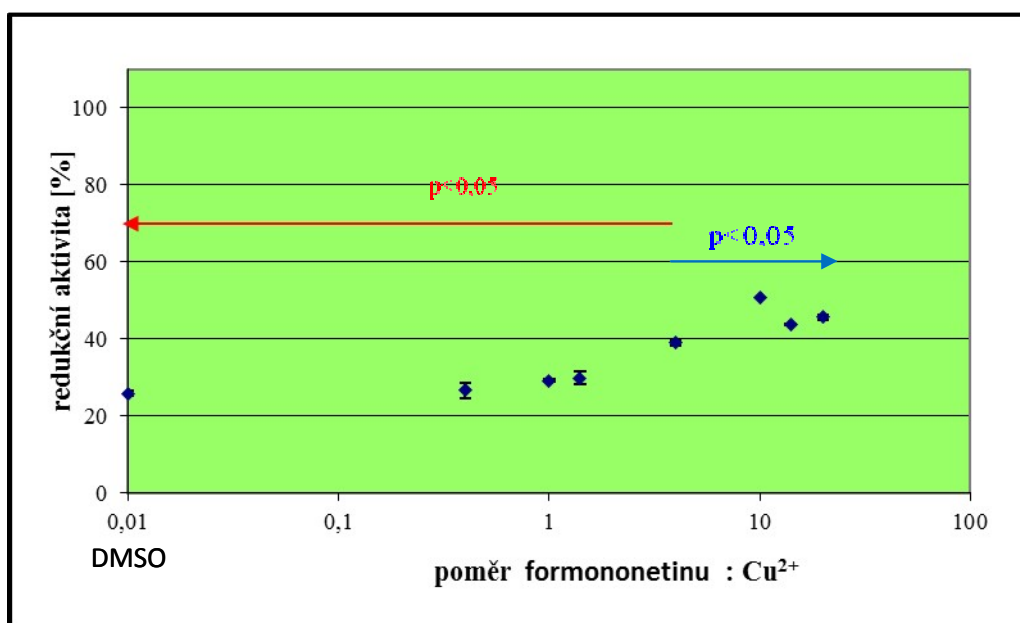
Obrázek 47: Redukční aktivita formononetinu při pH 4.5 v čase 5 minut.



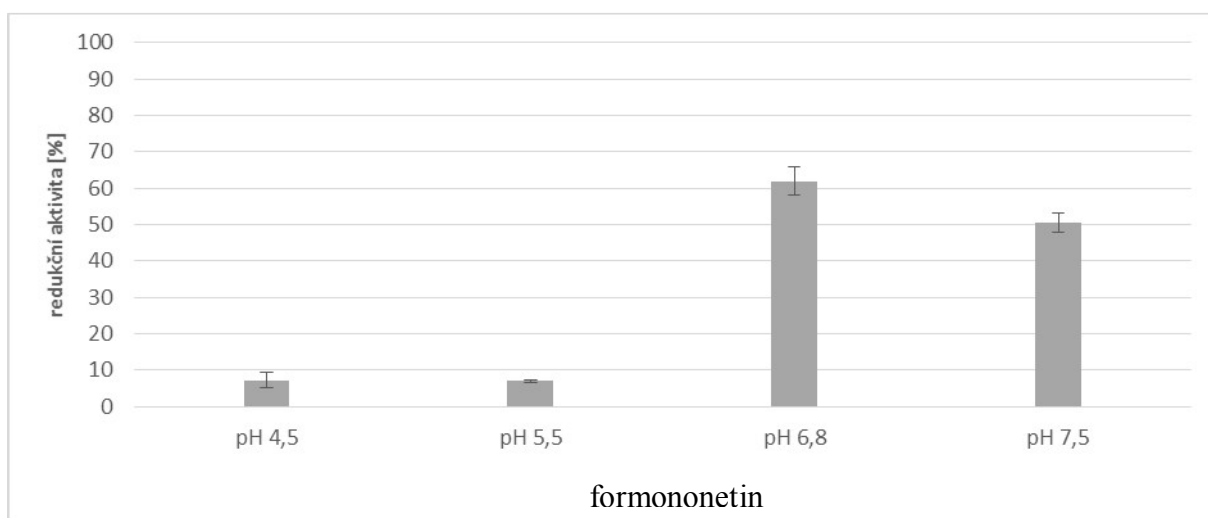
Obrázek 48: Redukční aktivita formononetinu při pH 5.5 v čase 5 minut.



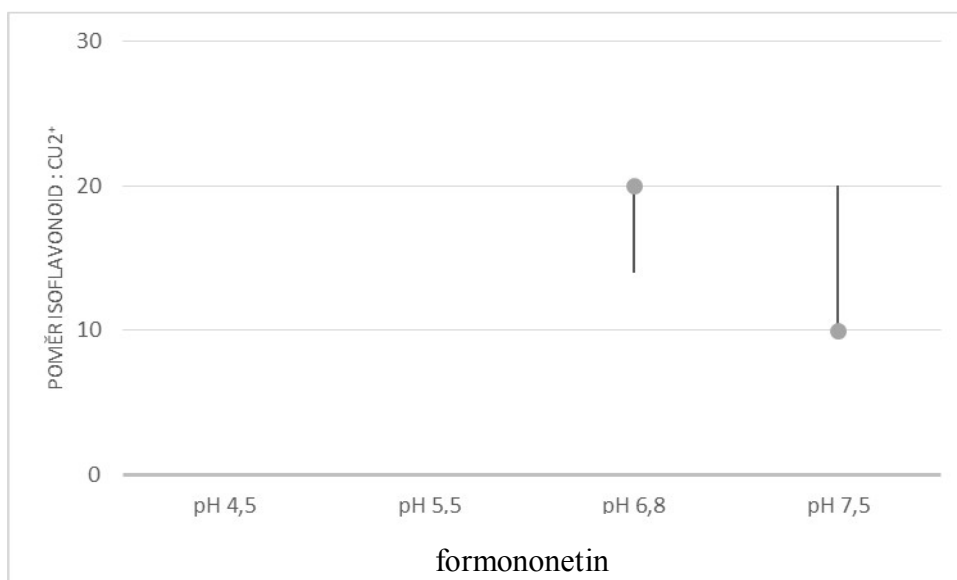
Obrázek 49: Redukční aktivita formononetinu při pH 6.8 v čase 5 minut.



Obrázek 50: Redukční aktivita formononetinu při pH 7.5 v čase 5 minut.

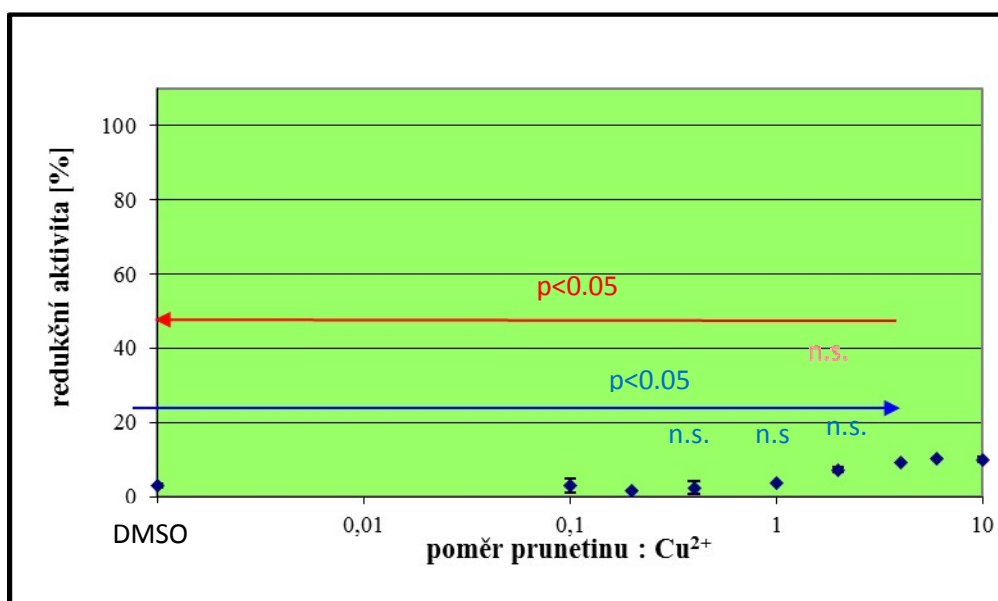


Obrázek 51: Hodnoty redukčních maxim formononetinu při zkoušených pH.

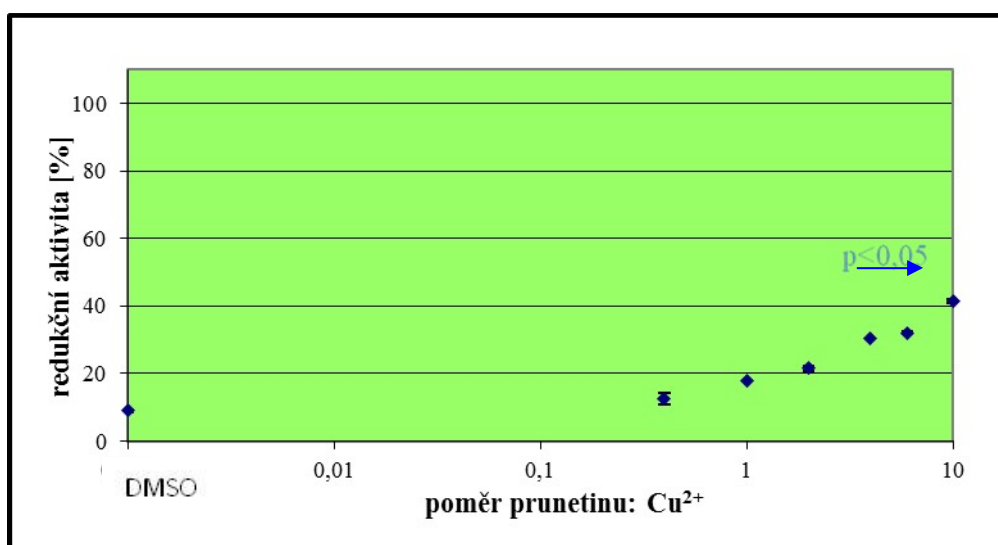


Obrázek 52: Poměr koncentrace formononetinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity zkoušených pH.

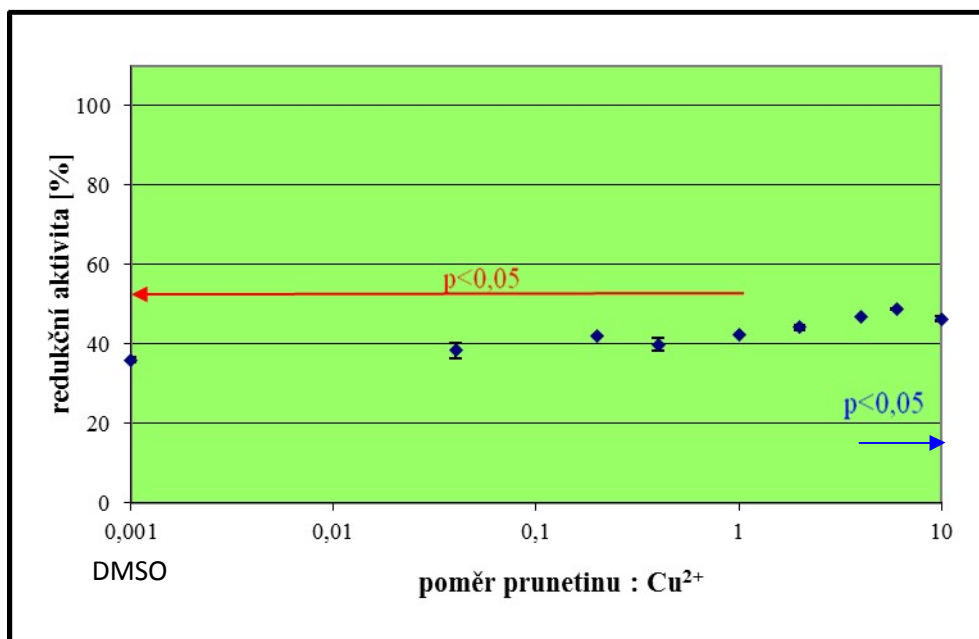
6.2.7 Měď redukující aktivita prunetinu při pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5



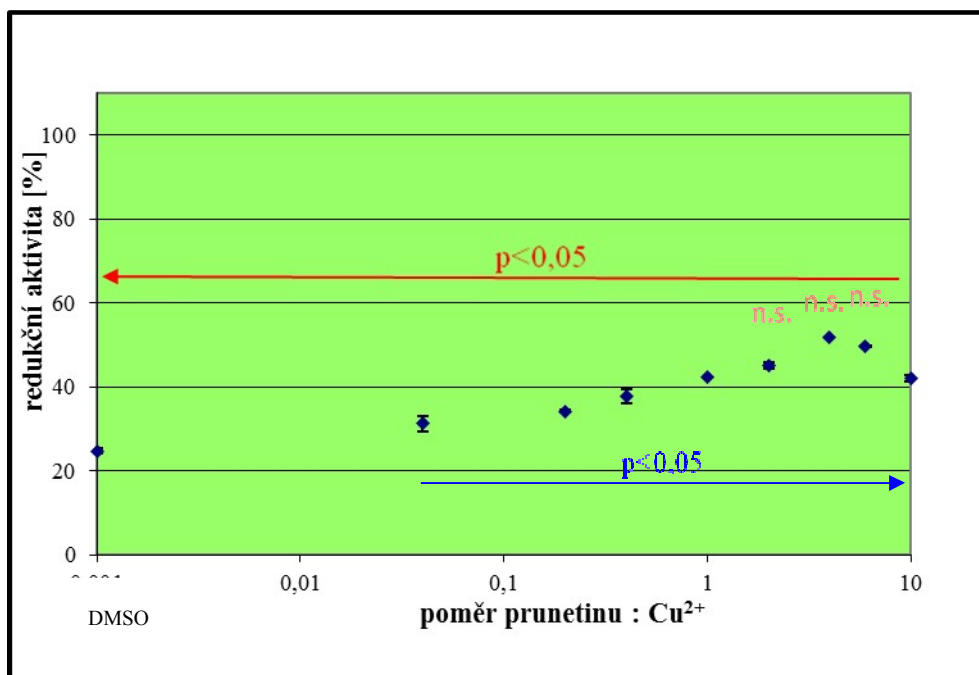
Obrázek 53: Redukční aktivita prunetinu při pH 4.5 v čase 5 minut.



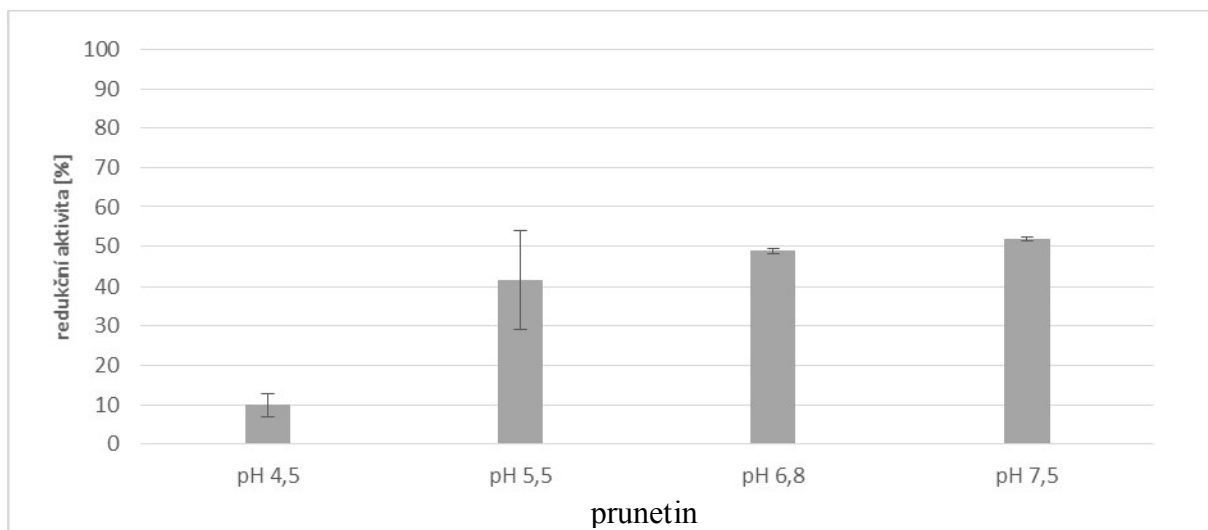
Obrázek 54: Redukční aktivita prunetinu při pH 5.5 v čase 5 minut.



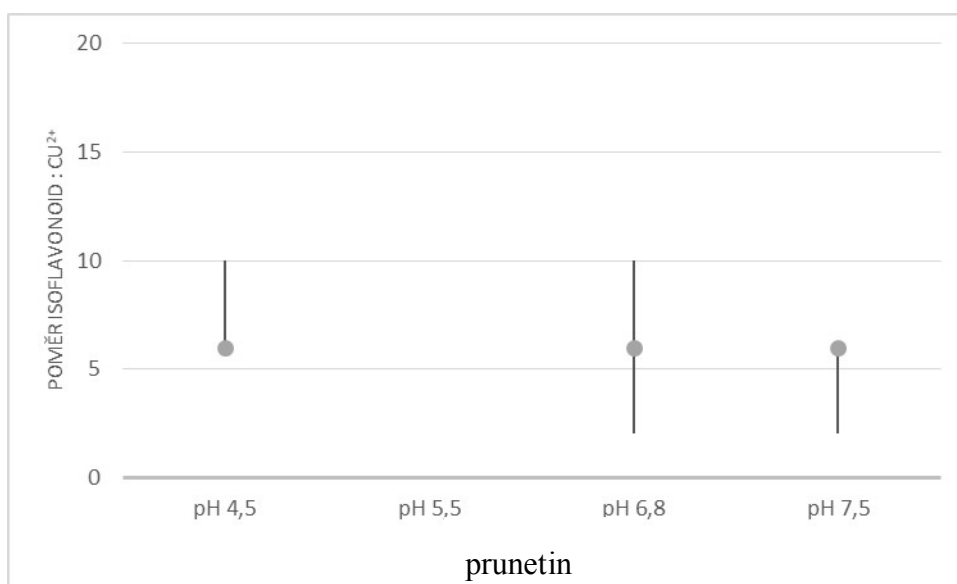
Obrázek 55: Redukční aktivita prunetinu při pH 6.8 v čase 5 minut.



Obrázek 56: Redukční aktivita prunetinu při pH 7.5 v čase 5 minut.

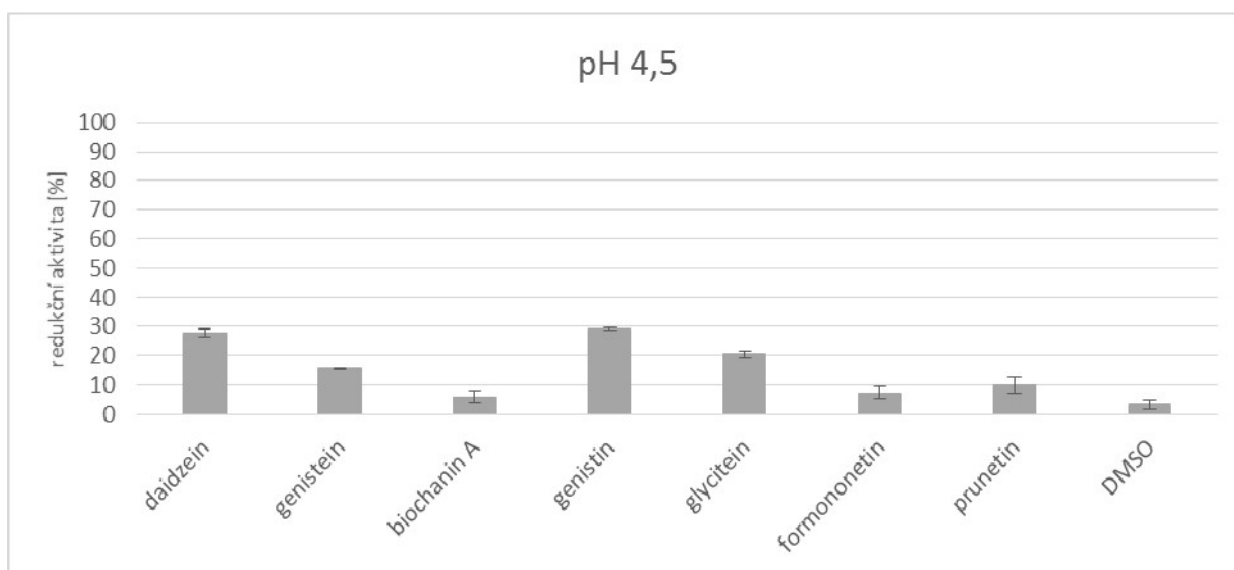


Obrázek 57: Hodnoty redukčních maxim prunetinu při zkoušených pH.

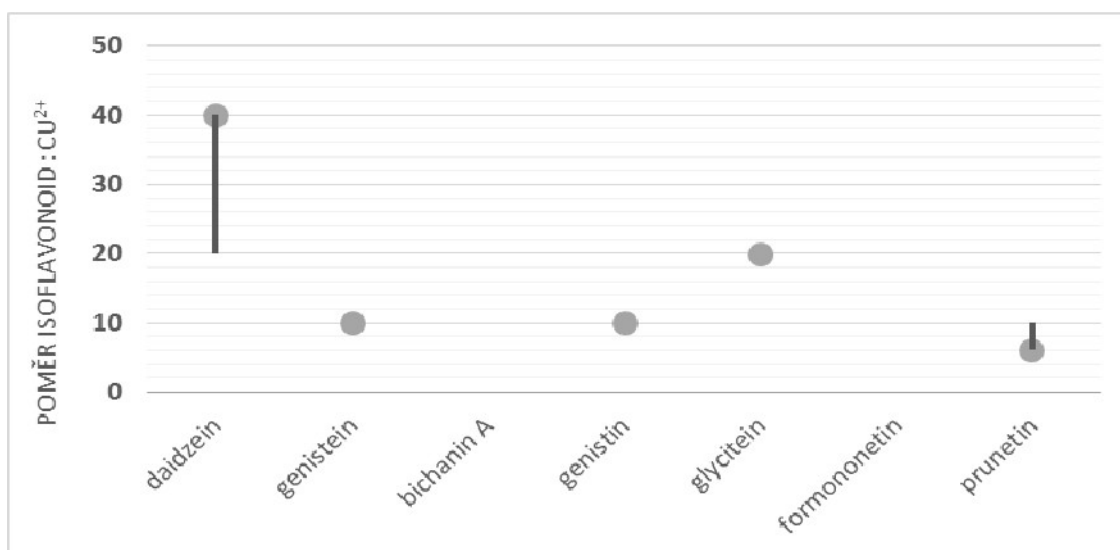


Obrázek 58: Poměr koncentrace prunetinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity zkoušených pH.

6.2.8. Redukční aktivita zadaných isoflavonoidů při pH 4.5



Obrázek 59: Redukční maxima jednotlivých isoflavonoidů při pH 4.5 v čase 5 minut.

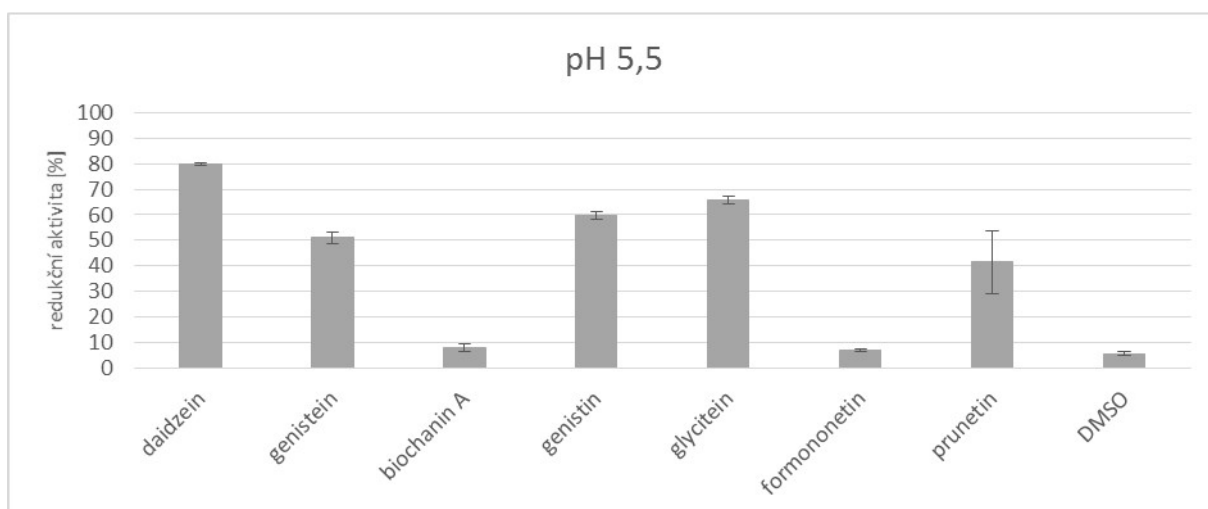


Obrázek 60: Koncentrační poměr isoflavonoidů a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity při pH 4.5 v čase 5 minut.

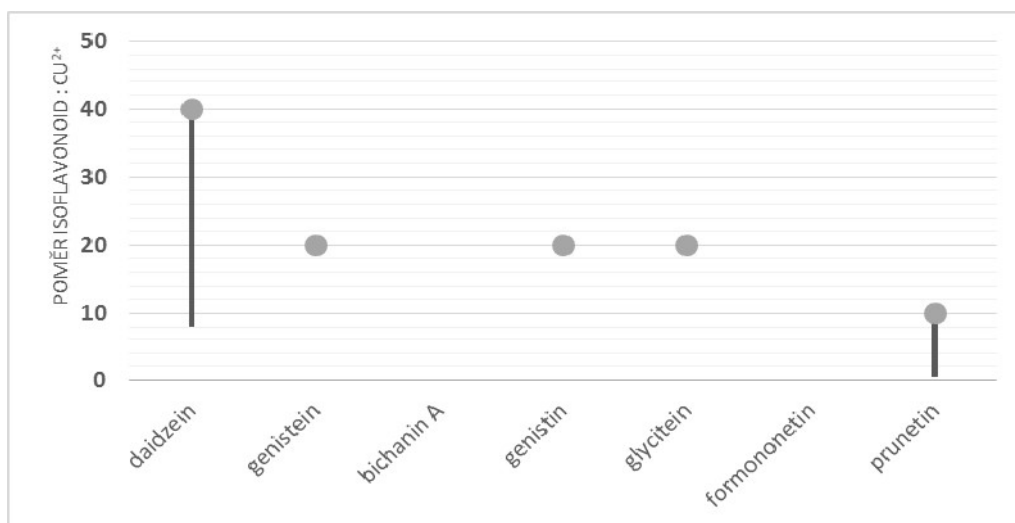
Tukeyův test mnohonásobného porovnávání	pH 4.5
daidzein vs. genistein	p < 0.001
daidzein vs. biochanin A	p < 0.001
daidzein vs. genistin	ns
daidzein vs. glycitein	p < 0.05
daidzein vs. formononetin	p < 0.001
daidzein vs. prunetin	p < 0.001
genistein vs. biochanin A	p < 0.001
genistein vs. genistin	p < 0.001
genistein vs. glycitein	ns
genistein vs. formononetin	p < 0.01
genistein vs. prunetin	ns
biochanin A vs. genistin	p < 0.001
biochanin A vs. glycitein	p < 0.001
biochanin A vs. formononetin	ns
biochanin A vs. prunetin	ns
genistin vs. glycitein	p < 0.01
genistin vs. formononetin	p < 0.001
genistin vs. prunetin	p < 0.001
glycitein vs. formononetin	p < 0.001
glycitein vs. prunetin	p < 0.001
formononetin vs. prunetin	ns

Tabulka 6: Statistické porovnání maximálních redukčních potenciálů testovaných látek při pH 4.5.

6.2.9. Redukční aktivita zadaných isoflavonoidů při pH 5.5



Obrázek 61: Redukční maxima jednotlivých isoflavonoidů při pH 5.5 v čase 5 minut.

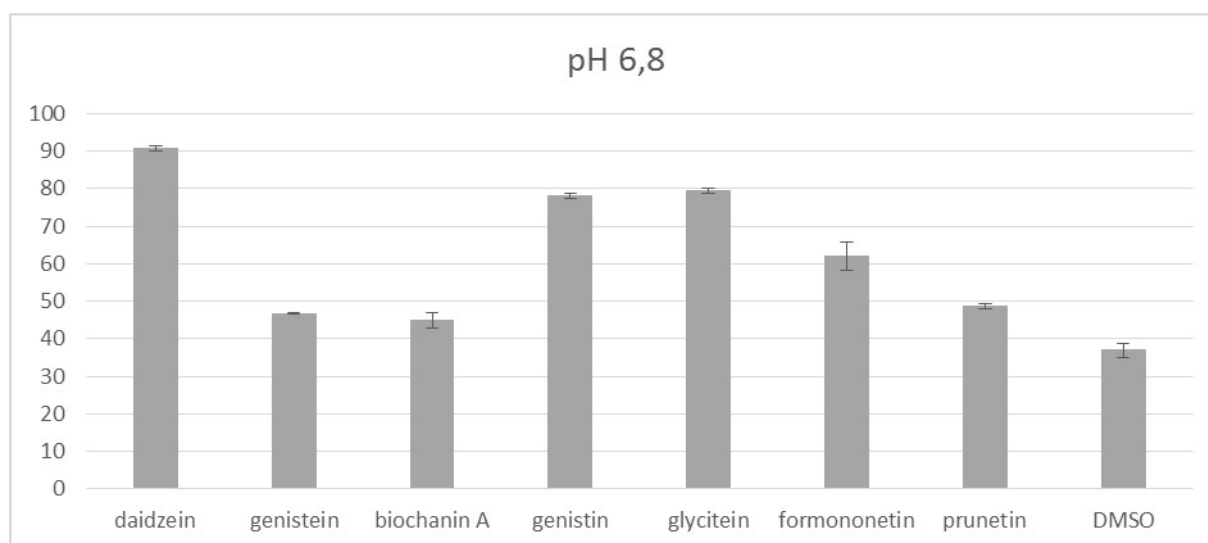


Obrázek 62: Koncentrační poměr isoflavonoidů a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity při pH 5.5 v čase 5 minut.

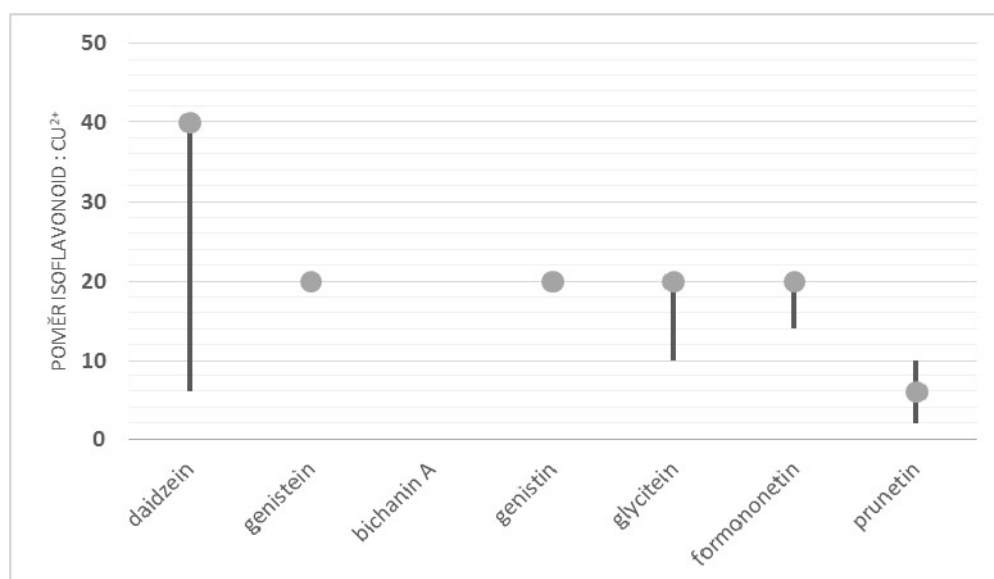
Tukeyův test mnohonásobného porovnávání	pH 5.5
daidzein vs. genistein	p < 0.001
daidzein vs. biochanin A	p < 0.001
daidzein vs. genistin	p < 0.01
daidzein vs. glycitein	p < 0.05
daidzein vs. formononetin	p < 0.001
daidzein vs. prunetin	p < 0.001
genistein vs. biochanin A	p < 0.001
genistein vs. genistin	ns
genistein vs. glycitein	p < 0.05
genistein vs. formononetin	p < 0.001
genistein vs. prunetin	ns
biochanin A vs. genistin	p < 0.001
biochanin A vs. glycitein	p < 0.001
biochanin A vs. formononetin	ns
biochanin A vs. prunetin	p < 0.001
genistin vs. glycitein	ns
genistin vs. formononetin	p < 0.001
genistin vs. prunetin	p < 0.01
glycitein vs. formononetin	p < 0.001
glycitein vs. prunetin	p < 0.001
formononetin vs. prunetin	p < 0.001

Tabulka 7: Statistické porovnání maximálních redukčních potenciálů testovaných látek při pH 5.5.

6.2.10. Redukční aktivita zadaných isoflavonoidů při pH 6.8



Obrázek 63: Redukční maxima jednotlivých isoflavonoidů při pH 6.8 v čase 5 minut.

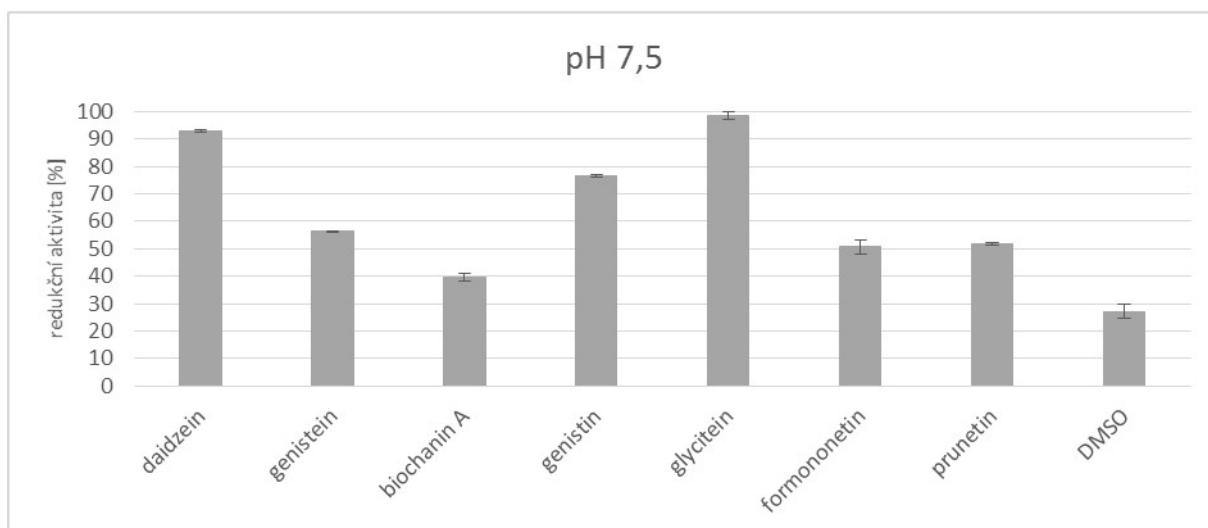


Obrázek 64: Koncentrační poměr isoflavonoidů a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity při pH 6.8 v čase 5 minut.

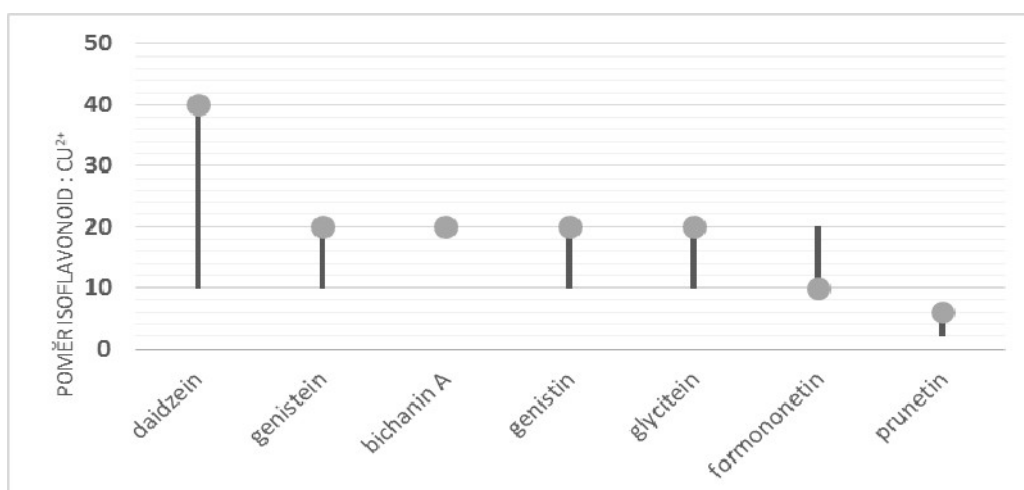
Tukeyův test mnohonásobného porovnávání	pH 6.8
daidzein vs. genistein	p < 0.001
daidzein vs. biochanin A	p < 0.001
daidzein vs. genistin	p < 0.001
daidzein vs. glycitein	p < 0.001
daidzein vs. formononetin	p < 0.001
daidzein vs. prunetin	p < 0.001
genistein vs. biochanin A	ns
genistein vs. genistin	p < 0.001
genistein vs. glycitein	p < 0.001
genistein vs. formononetin	p < 0.001
genistein vs. prunetin	ns
biochanin A vs. genistin	p < 0.001
biochanin A vs. glycitein	p < 0.001
biochanin A vs. formononetin	p < 0.001
biochanin A vs. prunetin	ns
genistin vs. glycitein	ns
genistin vs. formononetin	p < 0.001
genistin vs. prunetin	p < 0.001
glycitein vs. formononetin	p < 0.001
glycitein vs. prunetin	p < 0.001
formononetin vs. prunetin	p < 0.001

Tabulka 8: Statistické porovnání maximálních redukčních potenciálů testovaných látek při pH 6.8.

6.2.11. Redukční aktivita zadaných isoflavonoidů při pH 7.5



Obrázek 65: Redukční maxima jednotlivých isoflavonoidů při pH 7.5 v čase 5 minut.



Obrázek 66: Koncentrační poměr isoflavonoidů a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity při pH 7.5 v čase 5 minut.

Tukeyův test mnohonásobného porovnávání	pH 7.5
daidzein vs. genistein	p < 0.001
daidzein vs. biochanin A	p < 0.001
daidzein vs. genistin	p < 0.001
daidzein vs. glycitein	ns
daidzein vs. formononetin	p < 0.001
daidzein vs. prunetin	p < 0.001
genistein vs. biochanin A	p < 0.001
genistein vs. genistin	p < 0.001
genistein vs. glycitein	p < 0.001
genistein vs. formononetin	ns
genistein vs. prunetin	ns
biochanin A vs. genistin	p < 0.001
biochanin A vs. glycitein	p < 0.001
biochanin A vs. formononetin	p < 0.01
biochanin A vs. prunetin	p < 0.001
genistin vs. glycitein	p < 0.001
genistin vs. formononetin	p < 0.001
genistin vs. prunetin	p < 0.001
glycitein vs. formononetin	p < 0.001
glycitein vs. prunetin	p < 0.001
formononetin vs. prunetin	ns

Tabulka 9: Statistické porovnání maximálních redukčních potenciálů testovaných látek při pH 7.5.

7. Diskuze

Vznik volných radikálů představuje pro lidský organismus hrozbu v podobě poškození nenasycených mastných kyselin, proteinů, ale i DNA. Fyziologicky dochází k neutralizaci reaktivních částic za účasti ochranných mechanismů organismu: glutathion, kyselina močová, koenzym Q. U některých složek naší potravy, především rostlinného původu byla objevena antioxidační aktivita, jež brání vzniku volných radikálů. Velká naděje je vkládána ve vitamin C, E, karotenoidy a polyfenolické látky (Paulová et al. 2004). Na druhé straně je nutno zmínit, že některé z těchto látek mohou redukcí přechodných kovů zvýšit produkci hydroxylového radikálu a působit prooxidačně (Macáková et al. 2012).

Proto i cílem této diplomové práce bylo zjistit, do jaké míry jsou isoflavonoidy (daidzein, genistein, biochanin A, genistin, glycitein, formononetin, prunetin) schopny redukovat ionty Cu^{2+} a mít tedy předpoklady k potenciaci produkce volných radikálů. K určení redukující aktivity byla využita metoda mikrotitrace, při níž se využívá schopnosti BCS tvořit komplexy pouze s ionty Cu^+ . Principem je přidání iontů Cu^{2+} k indikátoru BCS, které s nimi normálně nereaguje nebo je jen omezeně redukuje zejména při vyšších pH. Pokud dojde k jejich redukcí na Cu^+ , tak se vytvoří komplex s indikátorem, který je následně spektrofotometricky změřen.

Zdá se, že hodnota redukční aktivity je úzce spjata s výskytem a počtem hydroxylových skupin v molekule flavonoidů. Je dokázáno, že látky se čtyřmi hydroxylovými substituenty vykazovaly vyšší redukční aktivitu než látky se třemi substituenty. Podmínkou redukční aktivity je katecholové uspořádání u kruhu B a hydroxylová skupina na kruhu C v poloze 3 (Mira et al. 2002). V naší studii s isoflavonoidy toto nemohlo být plně prověřeno, protože přírodní isoflavonoidy v této studii obsahují maximálně 3 volné hydroxyskupiny. Bylo ale jasně ukázáno, že přítomnost volné 4'-hydroxylové skupiny byla pro redukcí měďnatých iontů nejvýznamnější.

Všechny látky vykazovaly vyšší redukční aktivitu při pH 6.8 a 7.5, při pH 4.5 a 5.5 byla u většiny látek redukce velmi nízká.

Genistein ve své struktuře obsahuje tři hydroxylové skupiny v poloze 5,7,4' - maximální redukční aktivita byla 16 % při pH 4.5, 51 % při pH 5.5, 47 % při pH 6.8 a 56 % při pH 7.5. Genistein chelatuje přechodné kovy, jak bylo ukázáno v naší nedávné studii a to díky přítomnosti 5-hydroxy-4-keto skupiny (Mladěnka et al. 2011). Proto je redukční aktivita nižší než v případě daidzeinu, který toto chelatační uspořádání nemá.

Glykosidická forma genisteinu, genistin, tj. s navázaným cukrem v poloze 7, dosahoval vyšší redukční aktivity, při vyšších koncentracích. Už při pH 4.5 byla maximální redukční aktivita 30 %, 60 % při pH 5.5, 78 % při pH 6.8 a 77 % při pH 7.5. U flavonoidů v poloze 7 navázána molekula cukru, dochází ke snížení schopnosti chelatovat měď (Říha et al. 2014). Proto redukční aktivita genistin dosahuje vysokých hodnot.

Daidzein je substituován v poloze 7 a 4' hydroxylovými skupinami, toto uspořádání vykazuje již při nízkém pH (4.5) výraznější redukční schopnost 28 %, při pH 5.5 80 % a při pH 6.8 a 7.5 přes 90 %. Jak bylo zmíněno, daidzein nechelatuje přechodné kovy, protože k tomu nemá vhodnou chelatační skupinu (Mladěnka et al. 2011). Redukční aktivita je u něj z tohoto důvodu jedna z nejvyšších z námi testovaných látek.

Biochanin A a formononetin jsou v poloze 4' substituovány methoxy skupinou, z naměřených hodnot lze vyvodit, že při pH 4.5 a 5.5 nejsou látky schopné redukční aktivity. Redukce při pH 6.8 je u biochaninu A 45 % a 62 % u formononetinu. Při pH 7.5 docházelo opět k poklesu aktivity na 40 % a 52 %. Je nutné zmínit, že biochanin A má významný chelatační potenciál díky přítomnosti 5- hydroxy-4-keto skupiny, která tvoří chelát s přechodnými kovy.

Látka obsahující dvě hydroxy skupiny (4', 5) a jednu methoxy skupinu (7), prunetin redukovala měďnaté ionty při pH 4.5 z 10 %, při pH 5.5 41 %, 49 % při pH 6.8 a 52 % při pH 7.5. Poměrně nízká redukční aktivita je zapříčiněna uspořádáním 5- hydroxy-4-keto skupiny, které vykazuje vysoký potenciál chelatovat měď.

Další látka se dvěma hydroxylovými skupinami v poloze 4'a7 a methoxy substituentem v poloze 5- glycitein dosahovala jako jediná při pH 7.5 téměř stoprocentní redukční aktivitu. V ostatních prostředích aktivita klesala, pH 4.5 20 %, pH 5.5 66 % a pH 6.8 80 %. Nepřítomnost uspořádání hydroxylových skupin účastnících se tvorby chelátů je příčinou vysokých hodnot redukční aktivity glyciteinu. Tato aktivita je vystupňována přítomností hydroxy skupiny v poloze 4'.

Nejmenší redukční aktivitu vykázal biochanin A, tato skutečnost je podmíněna chelatačním potenciálem 5-hydroxy-4- keto uspořádáním. Nejeftivnější chelataci mědi vykazuje strukturální uspořádání: 3-hydroxy-4- keto, 5-hydroxy-4- keto, 3', 4'dihydroxy a 6,7 dihydroxy skupiny (Říha et al. 2014).

Naopak nejvyšší redukční aktivita byla prokázána u daidzeinu. Uspořádání hydroxylových skupin v molekule nevykazuje potenciál chelatovat prvky kovu, proto je hodnota redukce tak

vysoká. Přítomnost volné 4'-hydroxylové skupiny přispívá pozitivně k redukci měďnatých iontů.

8. Závěr

Měď se řadí mezi stopové prvky běžně se vyskytující v našem organismu. Množství v jednotlivých tkáních není konstantní. Játra, mozek a ledviny patří mezi orgány s nejvyšší koncentrací tohoto prvku. V jednotlivých orgánech je měď zabudována do struktury kuproenzymů nebo proteinů, které se účastní fyziologických funkcí.

Pokud není přísun mědi dlouhodobě optimální, může docházet k jejímu nedostatku nebo nadbytku. V některých případech je tento patologický stav způsoben genetickou mutací, jež má za následek neschopnost vstřebat nebo vyloučit měď.

Zvýšená koncentrace tohoto prvku byla objevena u některých onemocnění (Alzheimerova choroba, diabetes mellitus, některé kardiovaskulární choroby, zánět a rakovina) a je tudíž spojována s jejich příčinou. Uvolnění jinak vázané mědi může mít za následek tvorbu volných radikálů poškozující buněčné struktury.

Isoflavonoidy patří mezi sekundární rostlinné metabolity vyzdvihované především kvůli estogenní aktivitě, protirakovinnému, protizánětlivému a antioxidačnímu působení. Díky antioxidační aktivitě dochází různými mechanismy ke snižování množství volných radikálů.

Mezi negativní vlastnosti isoflavonoidů se řadí schopnost redukovat přechodné kovy a tím potenciovat vznik hydroxylového radikálu.

Cílem této diplomové práce bylo změřit redukční aktivitu určených isoflavonoidů (daidzein, genistein, biochanin A, genistin, glycitein, formononetin, prunetin) při různých hodnotách pH. A dále se pokusit odvodit vztahy mezi strukturou látek a jejich schopností redukovat měďnaté ionty. Redukční aktivita je spojena s výskytem a množstvím hydroxylových skupin v molekule flavonoidů. V mé práci obsahovaly isoflavonoidy nejvíce 3 hydroxyskupiny, tudíž nemohlo dojít k úplnému porovnání.

Nejvyšší schopnosti redukce dosahoval daidzein, jehož uspořádání substituentů nevykazuje chelatační aktivitu a navíc je ve struktuře přítomna volná 4'-hydroxylová skupina ovlivňující pozitivně redukci měďnatých iontů. Nižší redukční aktivitu měl glycitein, genistin, genistein, prunetin a formononetin. Nejnižší redukční aktivita byla naměřena u biochaninu A, vysvětlením může být vysoký potenciál chelatovat přechodné kovy, a proto je redukční aktivita nízká.

9. Použitá literatura

9.1. Odborné časopisy:

1. Arredondo, M.; Núñez, M. T. Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med* 2005. 26(4-5): 313-327.
2. Barceloux DG. Copper. *Clin Toxicol* 1999; 37(2):217-230.
3. Bie de P, Muller P, Klomp LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: Correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet* 2007; 44 (11);673-688.
4. Brewer GJ, Terry CA, Aisen AM, Hill GM. Worsening of Neurologic Syndrome in Patients with Wilson's Disease With Initial Penicillamine Therapy. *Arch Neurol* 1987;44:490-493.
5. Burkhead JL, Gray LW, Lutsenko S. Systems biology approach to Wilson's disease. *Biometals* 2011;24:455-466.
6. Cassidy A, Brown JE, Hawdon A, Faughnan MS, King LJ, Millward J, Wolfe B, Setchell KDR. Factors Affecting the Bioavailability of Soy Isoflavones in Humans after Ingestion of Physiologically Relevant Levels from Different Soy Foods. *J Nutr* 2006; 136: 45-51.
7. Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr Rev* 2010;68(3):133-147.
8. Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65 (2004); 995-1016.
9. Ding X, Xie H, Kang YJ. The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *J Nutr of Biochem* 2011;22:301-310.
10. Ferenci P. Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:157-165.
11. Goodman VL, Brewer GJ, Mejavner SD. Control of Copper Status for cancer
12. Therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5:543-549.
13. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13(10): 572-584.
14. Kaler SG. Diagnosis and therapy of menkes syndrom, genetic form of copper deficiency. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:10295-34S.
15. Kašparová M. Fytoestrogeny z jetele lučního. *Prakt lékařství* 2013; 9 (4-5): 201-203.

16. Kolečkář V, Řeháková Z, Brojerová E, Kuča K, Jun D, Macáková K, Opletal L, Drašar P, Jahodář L, Chlebek J, Cahlíková K. Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita. *Chem Listy* 2012;106, 113-121.
17. Lutsenko S, Bhattacharjee A, Hubbard AL. Copper handling machinery of the brain. *Metallomics* 2010; 2, 596-608.
18. Macáková K, Mladěnka P, Filipický T, Říha M, Jahodář L, Trejtnar F, Bovicelli P, Silvestri IP, Hrdina R, Saso L. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chem.* 2012. 135, 2584-2592 .
19. Macková Z, Koblovská R, Lapcik O. Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa. *Phytochemistry* 2006; 849–855.
20. McCords JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase- An enzymic function for erythrocuprein. *J Biol Chem* 1969; 6049-6055.
21. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long- term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut* 2007; 56:115-120.
22. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity. *Free Radic Res* 2002;36(11):1199-1208.
23. Mladěnka P, Macáková K, Filipický T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, Proietti Silvestri I, Hrdina R, Saso L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem* 2011;105:693-701.
24. Moon YJ, Sagawa K, Frederick K, Zhang S, Morris ME. Pharmacokinetics and Bioavailability of the Isoflavone Biochanin A in Rats. *AAPS J* 2006; 8 (3)
25. Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic Biol and Med* 1997. 22, 5: 861-870.
26. Paulová H, Bochořáková E, Táborská E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chem Listy* 2004. 98, 174 – 179.
27. Pláteník J. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi* 2009; 11(1).
28. Price KA, Crouch PJ, White AR. Therapeutic Treatment of Alzheimer's Disease Using Metal Complexing Agents. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2007;2:180-187.
29. Reynaud J, Guilet D, Terreux R, Lussignol M, Walchshofer N. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Nat Prod Rep* 2005;22(4):504-15.
30. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and Treatment of Wilson Disease: An Update. *Hepatology* June 2008.
31. Ryan MT. Free radicals attacking the divalent coppers to form the monovalent coppers in a ceruloplasmin molecule. *HPSSC* 2013.

32. Říha M, Karličková J, Filipský T, Macáková K, Rocha L, Bovicelli P, Silvestri IP, Saso L, Jahodář L, Hrdina R, Mladěnka P. In vitro evaluation of copper- chelating properties of flavonoids. *R Soc Chem Adv* 2014, 4, 32628-32638.
33. Sarkar B. Treatment of Wilson and Menkes Diseases. *Chem Rew* 1999; 99:2535-2544.
34. Schaefer M, Gitlin JD. Wilson's disease and Menkes disease. *Am J Physiol* 1999; G 311-G 314.
35. Schäfer S, Pajonk FG, Multhaup G, Bayer TA. Copper and clioquinol treatment in young APP transgenic and wild-type mice: effects on life expectancy, body weight, and metal-ion levels. *J Mol Med* 2007; 85:405-413.
36. Schilsky ML, Treatment of Wilson's Disease: What Are the Relative Roles of Penicillamine, Trientine, and Zinc Supplementation. *Curr Gastroenterol Rep* 2001; 3:54-59.
37. Shula SR, Latha M, Liu P, Lem K and Kaler SG. Copper replacement treatment for symptomatic Menkes disease- ethical Considerations. *Clin Genet* 2005; 68:278-283.
38. Song TT, Hendrich S, Murphy PA. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *Food Chem* 1999; 47(4): 1607-1610.
39. Squitti R, Zito G. Anti-Copper Therapies in Alzheimer's Disease: New Concepts. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2009; 4:209-219.
40. Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K. Anti- and Pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with linolenic acid. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 11/12: 1313-1323.
41. Sun T, Liu R, Cao Yong-xiao. Vasorelaxant and antihypertensive effects of formononetin through endothelium-dependent and independent mechanisms. *Acta Pharmacol Sin* 2011.32; 1009-1018.
42. Suthar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Pharmacological activities of Genistein, an isoflavone from soy- Part II. *J Exp Biol* 2001; 39:520-525.
43. Troost FJ, Brummer RJ, Dainty JR, Hoogewerff JA, Bull VJ, Saris WH. Iron supplements inhibit zinc but not copper absorption in vivo in ileostomy subjects. *Am J Clin Nutr* 2003; 78(5):1018-23.
44. Tümer Z, Horn N. Menkes disease: recent advances and new aspects. *J Med Genet* 1997; 34:265-274.
45. Tümer Z, Möller LB. Menkes disease. *Eur J Hum Genet* 2010; 18:511-518.
46. Veitch N. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat Prod Rep* 2007; 24; 417-464.
47. Walter ED. Genistin an isoflavone glucoside and its aglucone, genistein, from soybeans. *J Am Chem Soc* 1941 62 (12): 3273-3276.

48. Wiggelinkhuizen M, Tilanus MEC, Bollen CW, Houwen RHJ. Systematic review: Clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 947-958.
49. Wijnenga C, Klomp LWJ. Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proc Nutr Soc* 2004; 63:31-39.
50. Yang G, Ham I, Choi Ho-Young. Anti-inflammatory effect of prunetin via the suppression of NF. *Food Chem Toxicol* 2013. 58;124-132.
51. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Barberán FAT, Datta N, Chien SS. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr* 2004; 59:113-122.
52. Yong-Xiao Cao, Xiao- Jing Yang, Jing Liu, Ke-Xi Li. Effects of Daidzein Sulfates on Blood Pressure and Artery of Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 99: 425-430.
53. Zhang Xiao-hong and colleagues. Free radicals attacking the divalent coppers to form the monovalent coppers in a ceruloplasmin molecule. *Health Phys Soc J* 2013; 4:105.

9.2. *Knihy*

54. Ehrmann J, Hůlek P a kolektiv. *Hepatologie*, 2. vydání 2014. Grada 2014. 496 s. ISBN 859-404-924-027-2.
55. Koolman J, Röhm KH. *Barevný atlas biochemie - překlad 4. vydání*. Grada 2012. 120-130 s. ISBN 978-80-247-2977-0.
56. Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. *Biochemie pro studující medicíny I. díl. 2. vydání*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2009. 76, 81-84, 463 s. ISBN 978-80-246-1416-8.
57. Leone A, Mercer JFB *Copper Transport and Its Disorders: Molecular and Cellular Aspects*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. 7-13 s. ISBN 0-306-46045-9.
58. Marek J a kolektiv. *Farmakoterapie vnitřních nemocí - 4. zcela přepracované a doplněné vydání*. Grada Publishing a.s. 2010. 231-232s. ISBN 978-80-247-2639-7.
59. Mudra M. *Platněřství*. Grada 2006. 73-74s. ISBN 978-80-247-1186-7.
60. Preedy VR. *Isoflavones. Food and Nutritional Components in Focus No. 5*. The Royal Society of Chemistry 2013. 598-606s. ISBN 978-1-184973-419-6.
61. Sobotka H, Stewart CP. *Advances in clinical chemistry, Svazek 8*. Academic Press 1965. 44s. ISBN 58-12341.
62. Zadák Z. *Výživa v intenzivní péči 2., rozšířené a aktualizované vydání*. Grada Publishing, a.s. 2011. 183-185s. ISBN 978-80-247-7029-1.
63. Žák A a kolektiv. *Ateroskleróza*. Grada Publishing, a.s. 2011. 18s. ISBN 978-80-247-3052-3.