

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE**



**CHELATACE MĚDI S FLAVONOLY**  
**COPPER CHELATING ACTIVITY OF FLAVONOLS**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Hradec Králové, 2014

Markéta Jeřábková

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.“

V Hradci Králové

Markéta Jeřábková

## PODĚKOVÁNÍ

Především bych ráda poděkovala PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za vedení diplomové práce, pomoc při experimentálním měření v laboratoři, za trpělivost a cenné rady při zpracovávání mé diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za poskytnuté materiály, grafy a za konzultaci dané problematiky.

Mé poděkování také patří Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za poskytnutí laboratoře pro naměření mých výsledků. Práce vznikla za podpory grantů: GAUK 605712C a FRVŠ 664/2011/A a výzkumného programu PRVOUK P-40.

## OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Cíl práce</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Teoretická část</b> .....	<b>8</b>
3.1. Měď v lidském organismu.....	8
3.1.1. Farmakokinetika mědi .....	9
3.2. Fyziologická funkce mědi .....	10
3.3. Nedostatek mědi .....	12
3.3.1. Menkesova choroba.....	12
3.4. Nadbytek mědi.....	13
3.4.1. Wilsonova choroba .....	13
3.4.2. Cirhóza indických dětí.....	16
3.4.3. Alzheimerova choroba.....	16
3.4.4. Karcinogenita.....	17
3.5. Chelatace mědi .....	18
3.6. Flavonoidy .....	19
3.6.1. Rozdělení flavonoidů.....	19
3.6.2. Účinky flavonoidů .....	21
3.7. Flavonoly .....	22
3.7.1. 3-hydroxyflavon .....	23
3.7.2. Kempferol .....	23
3.7.3. Kvercetin .....	24
3.7.4. Morin .....	24
3.7.5. Myricetin .....	25
3.7.6. Rutin .....	26
3.7.7. Troxerutin .....	27
<b>4. Experimentální část</b> .....	<b>28</b>
4.1. Materiál.....	28
4.2. Chemikálie.....	28
4.3. Testované látky.....	28
4.4. Přístrojové vybavení .....	29

4.5. Příprava zásobních roztoků .....	29
4.6. Kalibrace měďnatých iontů .....	30
4.7. Metodický postup stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem .....	32
4.8. Statistická analýza .....	34
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>35</b>
5.1. Kalibrační křivka .....	35
5.2. Chelatační aktivita jednotlivých flavonolů .....	36
<b>6. Diskuze.....</b>	<b>40</b>
<b>7. Závěr .....</b>	<b>42</b>
<b>8. Seznam použitých zkratek .....</b>	<b>43</b>
<b>9. Použitá literatura.....</b>	<b>44</b>
9.1. Odborné časopisy .....	44
9.2. Knihy .....	47
<b>10. Abstrakt.....</b>	<b>49</b>
<b>11. Abstract .....</b>	<b>50</b>

## 1. Úvod

Měď se ve stopovém množství nachází v našem organismu a je jeho nezbytnou součástí. Je pro organismus esenciální, i přes to je jeho denní příjem malý. V organismu se vyskytuje nejčastěji ve formě různých proteinů s enzymatickou aktivitou. Měď je součástí enzymů oxidas, které se účastní mnoha oxidoredukčních procesů.

Měď plní v organismu důležité funkce, je nezbytná pro krvetvorbu, katalyzuje vstup železa do hemoglobinu. Je nutná pro tvorbu pigmentů, kostí a vlasů. Měď se uplatňuje také jako ochrana před volnými radikály jako antioxidant.

Nicméně dlouhodobý nadbytek nebo nedostatek mědi může za určitých podmínek vést k patologickým stavům, proto je nutné zajistit optimální nutriční příjem a udržet tak jeho homeostázu.

## **2. Cíl práce**

Cílem této diplomové práce je změřit měď-chelatační aktivitu vybraných flavonolů (3-hydroxyflavon, kempferol, kvercetin, morin, myricetin, rutin, troxerutin) při různých pH a odvodit vztahy mezi strukturou těchto látek a jejich měď-chelatační aktivitou.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. *Měď v lidském organismu*

Prvky nezbytné pro stavbu a funkci lidského organismu se nazývají biogenní, někdy též esenciální. Podle jejich obsahu v organismu se dělí na makrobiogenní a mikrobiogenní neboli stopové. Ze stopových prvků se v nejvyšších koncentracích v organismu vyskytují železo, měď a zinek (Racek et al. 2006).

Výskyt mědi v těle člověka je nejvyšší v játrech, mozku, svalech a kostech. V krvi je měď obsažena jak v červených krvinkách, tak především v krevní plazmě. V červených krvinkách se vyskytuje v podobě sloučeniny zvané erytrokuperin. V plazmě je měď vázána a přenášena ceruloplazminem (Hejda 1985). Jeho prostřednictvím se měď dostává do buněk a tkání, kde je využívána pro tvorbu kuproenzymů (Racek et al. 2006). Měď zabudovaná do ceruloplazminu je vázána pevnou vazbou, ale i přes to ji některé patologické faktory jako je oxidační stres mohou uvolnit z této vazby (Říha et al. 2013).

V mozku je homeostáza mědi přísně regulována mnoha influxy a efluxními transporty. Je nutné udržovat patřičnou regulaci transportu jak mědi, tak železa, aby nedošlo k zlomovým neurologickým poruchám, které jsou způsobeny nerovnováhou těchto dvou kovů. Mezi tyto poruchy patří Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba a onemocnění spojené s dysbalancí mědi, jako je Menkesova a Wilsonova choroba (Collins et al. 2010).

Měď se nachází kromě trávicího ústrojí a stopových koncentrací v séru a tkáních, také v různě stabilních komplexech a chelátech s organickými molekulami. Proteiny, u nichž je měď integrální a nezbytnou součástí molekulové struktury, označujeme jako metaloproteiny mědi. Převážnou část metaloproteinů tvoří proteiny s enzymatickou aktivitou účastníci se přenosu elektronů a transportu kyslíku (Mareček 1996). Mezi hlavní metaloproteiny patří cytochrom c oxidasa (transport elektronů v buněčném dýchání), superoxiddismutasa (odstraňování volných radikálů), metalothionein (skladování nadbytku mědi a jiných kovů), ceruloplazmin

(metabolismus železa, transport mědi). Ceruloplazmin je polypeptidový řetězec, který hraje roli v transportu a exkreci mědi z těla. Tento protein je syntetizován v játrech (Tapiero et al. 2003). Dalšími metaloenzymy jsou monoaminoxidasa, diaminoxidasa, tyrosinasa, lisyloxidasa nebo dopamin- $\beta$ -hydroxylasa (Masopust a Průša 1999).

Jídlo a pití vody patří mezi hlavní zdroje mědi, nicméně tento příjem většinou nenese žádné zdravotní riziko díky různým kontrolním mechanismům v organismu (López de Romaña et al. 2011). Průměrný denní příjem mědi potravou u dospělého člověka je v rozmezí 0,6 až 1,6 mg/den. Hlavním zdrojem mědi v potravě jsou mořské ryby, ořechy, vnitřnosti a obilniny (Bertinato a Abbé 2004). Obsah mědi v těle je přibližně 1,2-1,9 mmol, což odpovídá 80-120 mg (Masopust a Průša 1999).

### ***3.1.1. Farmakokinetika mědi***

Místem resorpce mědi je žaludek a horní část tenkého střeva. Kyselina askorbová a některé stopové prvky jako zinek interferují s resorpcí mědi a brání vstřebávání mědi. Vstřebávání mědi brání také látky, které vytvářejí s mědí nerozpustné komplexy. Jsou jimi polyfenoly, fytáty, železo-sodná sůl EDTA (NaFeEDTA). Naopak proteiny, prebiotika jako fruktooligosacharidy, dále inulin zvyšují absorpci mědi. U lidí je resorbováno 12 až 60 % podané dávky v závislosti na příjmu mědi (López de Romaña et al. 2011). Měď resorbovaná ze střeva je transportována portální krví vázaná jako dvojmocná měď na albumin a transkuprein a posléze vychytána jaterními buňkami, které uvolní měď z vazby měď-albumin, a je inkorporována do ceruloplazminu. Jenom malé množství mědi zůstane vázáno na bílkovinu albumin a tento komplex poté hraje roli v toxicitě mědi (Barceloux 1999).

Metabolismus mědi probíhá v játrech. Úlohou jater je skladování mědi, inkorporace mědi do ceruloplazminu a příprava mědi na exkreci do žluči (Mareček 1996).

Většina mědi v játrech je zabudována do ceruloplazminu a v této formě uvolňována do cirkulace (Masopust a Průša 1999). Hladina mědi v játrech nepřímo souvisí s hladinou železa. Při absenci ceruloplazminu může dojít k akumulaci železa ve slinivce, sítnici a v mozku. Z jater jsou měď a železo transportovány do buněk, tkání, orgánů, kde jsou potřebné k buněčnému metabolismu (Collins et al. 2010).

Mezi hlavní exkreční cestu mědi z organismu patří vylučování mědi do žluči. Jiné možnosti eliminace mědi jsou inhibice vstřebávání, vylučování mědi potem nebo močí (López de Romaña et al. 2011).

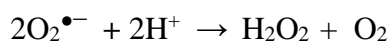
Mírné výkyvy v homeostáze mědi nejsou zatím dobře popsány, kvůli nedostatku specifických senzitivních indikátorů, které by detekovaly menší rozsah poškození. Hlavními známými indikátory patologických stavů jsou koncentrace hladiny mědi a ceruloplazminu v séru. Jsou pozorovány spíše až při větších změnách nebo hrají úlohu při diagnostikování nemocí (López de Romaña et al. 2011).

### **3.2. Fyziologická funkce mědi**

Výskyt mědi v organismu je v různých oxidačních stavech Cu(I) a Cu(II) využíván v mnoha důležitých katalytických reakcích (Bertinato a Abbé 2004).

Měď se především uplatňuje jako nedílná součást některých enzymů: superoxiddismutasy, cytochromoxidasy nebo ascorbátoxidasy, působících u mnohých dějů látkové přeměny a v energetickém metabolismu buňky (Jomova a Valko 2011).

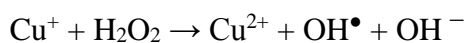
Měď je součástí extracelulární a plazmatické superoxiddismutasy (SOD), která hraje významnou roli v antioxidační ochraně organismu (Racek et al. 2006). Superoxidový radikál (Rovnice 1) se vyskytuje hlavně ve formě aniontu a je odstraňován pomocí SOD (Jomova a Valko 2011). Ceruloplazmin je rovněž významným antioxidačním proteinem (Štípek et al. 2000).



Rovnice 1. Působení superoxiddismutasy

Naproti tomu volná měď po redukci na Cu<sup>I</sup> je schopna stejně jako železo katalyzovat Fentonovu reakci (Rovnice 2) a tím i vznik nebezpečného, extrémně reaktivního, hydroxylového radikálu (Racek et al. 2006). Ten se může, stejně jako superoxidový radikál nebo jiné reaktivní formy kyslíku (ROS), zapojit do nepříznivých

reakcí, jako je modifikace proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Za normálních podmínek se volná měď nevyskytuje. Tvoří se v případě kumulace mědi a může vést k oxidačnímu stresu a poškození buňky (Bertinato a Abbé 2004).



#### Rovnice 2. Fentonova reakce

Druhým mechanismem působení mědi, přispívajícím ke vzniku oxidačního stresu, je snižování hladiny glutathionu (GSH). Glutathion je přítomen v buňkách v milimolárních koncentracích, kde je využíván pro své silné antioxidační účinky a slouží jako substrát pro důležité enzymy, které odstraňují ROS. Glutathion má mnoho funkcí v buněčném metabolismu mědi a její detoxikaci. Příkladem je potlačení toxicity mědi díky její chelataci a tím udržuje redoxní stav nedostupný pro odstartování další nové reakce. Narušení homeostázy mědi může přispět ke změně redoxní rovnováhy a může vést k vyčerpání glutathionu (Jomova a Valko 2011).

Mechanismus utváření volných radikálů je ovlivněn působením endogenních nízkomolekulárních antioxidantů, mezi které patří askorbová kyselina, alfa tokoferol, glutathion, karotenoidy, flavonoidy a spousta dalších, které jsou schopny vychytávání ROS (Jomova a Valko 2011). Ochrana organismu proti oxidačnímu poškození je systém, ve kterém antioxidanty a celá jejich uskupení vzájemně spolupracují. Funkce jednoho antioxidantu velmi často podmiňuje účinek jiného článku soustavy (Štípek et al. 2000).

Další uplatnění má měď v metabolismu železa. Sloučenina mědi ceruloplazmin (neboli ferroxidasa) je nutná k přeměně dvojmocného železa na trojmocné, a tak je měď nepostradatelná při tvorbě červeného krevního barviva hemoglobinu (Hejda 1985).

Měď dále ovlivňuje vývoj kostí, udržování myelinových pochev v nervovém systému, uplatňuje se při tvorbě pigmentu (Hejda 1985).

### **3.3. Nedostatek mědi**

U našeho obyvatelstva dochází k nedostatku mědi jenom vzácně (Hejda 1985). Přesto byl nedostatek mědi zaznamenán u malnutrice a těžkých průjmů (Racek et al. 2006). U předčasně narozených a nedonošených dětí se taktéž vyskytuje snížená hladina mědi kvůli zvýšené potřebě tohoto mikroelementu při rychlém růstu (López de Romaña et al. 2011). Nedostatek mědi je charakterizován nízkými hladinami mědi a ceruloplazminu v plazmě. Dalším projevem deficitu mědi a zejména jeho zásob v játrech v akutním stavu je vzestup proteinů akutní fáze, zejména C-reaktivního proteinu (Zadák 2008).

S nedostatkem mědi jsou spojovány různé chorobné stavy, které odpovídají na suplementaci mědi. Jsou to především anémie, porucha tvorby kostí, pigmentace, keratinizace, poruchy nervové soustavy, poruchy fertility. Objevují se i kardiovaskulární poruchy způsobené porušenou tvorbou elastinu (Mareček 1996). Rovněž může mít za následek nízký počet bílých krvinek, průjem a edémy (Jordán a Hemzalová 2001).

#### **3.3.1. Menkesova choroba**

S deficitem mědi je spojena Menkesova choroba. Je to progresivní neurodegenerativní porucha, která je vázána na chromozom X. Tato dědičná porucha je způsobená mutací genu ATP7A (Tümer a Møller 2010).

Menkesova choroba začíná jako porucha absorpce mědi střevní sliznicí, pokračuje neúspěšným transportem a zužitkováním mědi v buňkách (Gandhi et al. 2012) a zvýšením jeho exkrece (Zadák 2008). Hladina mědi v séru je snižena, je snížena i hladina ceruloplazminu. I obsah mědi v mozku a játrech je nízký (Mareček 1999). Projevuje se těžce opožděným mentálním vývojem, růstem, poruchou pojivových tkání, změnami skeletu, změnami vlasů, které jsou depigmentované a zvláště zkroucené (Tümer a Møller 2010).

Diagnóza je obtížná. Projevy tohoto onemocnění se většinou vyskytují u dětí ve věku okolo tří až čtyř měsíců. Končí většinou smrtí na respirační selhání (Gandhi et al. 2012). Při této chorobě není účinné ani podávání mědi parenterálně, protože měď není účinně vychytávána v játrech (Zadák 2008).

### **3.4. Nadbytek mědi**

Nadbytek mědi může být vysoce toxický z hlediska schopnosti volné mědi utvářet reaktivní formy kyslíku (ROS) a tím podporovat oxidační stres a poškození buňky. Při poruchách v homeostáze tak může měď způsobit místní poruchy, které vedou k patologickým stavům, jako jsou neurodegenerativní choroby, tumory, zánětlivá onemocnění a srdeční infarkt (Říha et al. 2013).

Zvýšená hladina mědi v krvi byla pozorována při jaterní cirhóze, při některých infekčních chorobách jako je tuberkulóza, při zápalu plic, také u žen v těhotenství, u různých typů anemií, u leukémie (Hejda 1985).

Toxická koncentrace mědi nastává po požití více než 1 g mědi. Odhadovaná letální dávka mědi u dospělého člověka při neléčení je okolo 10-20 g mědi (Barceloux 1999).

#### **3.4.1. Wilsonova choroba**

Toxicita mědi se projevuje u dědičného onemocnění nazývané Wilsonova choroba neboli hepatolentikulární degenerace. Vzniká porucha při zabudování mědi do ceruloplazminu. Měď se hromadí v hepatocytech. Její koncentrace v séru je snižena, vyšší je však volná frakce, která proniká do různých orgánů a působí jejich poškození (Racek et al. 2006). Wilsonova choroba je tedy definována jako metabolická porucha, kdy se hromadí měď v játrech a v mozku (Sarkar 1999). Na základě výzkumu bylo zjištěno, že primárním defektem chronické toxicity mědi je porucha v exkreci (Goodman et al. 2005).

Wilsonova choroba je onemocnění způsobené mutací genu ATP7B kódující měď transportující ATPázy. U zdravých jedinců se ATP7B vyskytuje v různých tkáních: játra, centrální nervový systém, ledviny, prsní žlázy a další. Hlavní role ATP7B je v játrech, které jsou klíčovým orgánem metabolismu mědi. V hepatocytech je díky ATP7B měď transportována z cytosolu do Golgiho aparátu, kde je měď zabudována do metaloenzymů jako je ceruloplazmin. Tato funkce je však narušována mutacemi a může působit hromadění mědi (Burkhead et al. 2011).

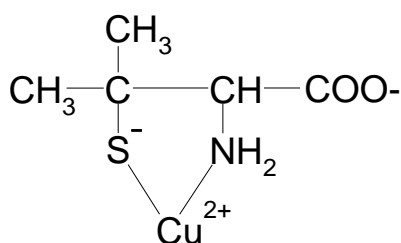
Mezi příčiny poškození tkání u Wilsonovy choroby patří kumulace a toxický efekt mědi. V orgánech nemocných lidí je ji nahromaděno extrémní množství. Nadbytek mědi způsobuje poškození, zánět a zánik buněk vedoucí ke tkáňovému poškození a orgánovým změnám. Nepříznivý efekt mědi je prokazován především na mitochondriích, peroxizómech, ale patologické změny jsou přítomny i na mikrotubulech, příčných vazbách v DNA a na plazmatické membráně. Měď účinkuje mechanismem oxidativního poškození, kdy nadbytek mědi vede k nadprodukcí oxidačních radikálů, především superoxidu a k tvorbě peroxidů. Pro přežití buňky je mimořádně významná přítomnost buněčných proteinů, které jsou schopny vázat a detoxikovat měď. Takovým proteinem je například metalothionein (Mareček 1996).

Mezi základní příznaky tohoto onemocnění patří modro-zelený prstenec na rohovce, jaterní cirhóza, neurologické symptomy a nízká hladina ceruloplazminu (Ferenci 2004). Dalšími projevy nemoci jsou tremor, ataxie, dystonie, rigidita, hyperkineze, řeč je zpomalená, objevují se poruchy chování, deprese a emoční labilita (Goodman et al. 2005). Pacienti trpící Wilsonovou chorobou jsou vystaveny různým projevům: jaterní symptomy, někteří mají neurologické symptomy a u jiných se vyskytují obě formy (Sarkar 1999).

Terapie Wilsonovy choroby je účinná, daří se zlepšit i pokročilé případy. Dominující léčebné postupy jsou podávání zinku a penicilaminu (Mareček 1996). Pokud choroba není léčena, je velmi progresivní a nakonec smrtelná (Goodman et al. 2005).

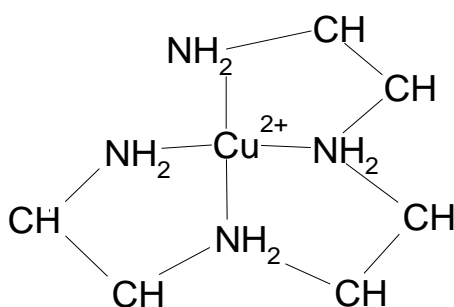
Dříve se k terapii této choroby používala sloučenina 2,3-dimerkapto-1-propanol (BAL). Léčba byla založena na principu chelatace. BAL jako lipofilní molekula musela být aplikována intramuskulárně. Dnes se již této terapii nevyužívá (Schilsky 2001).

D-penicilamin je  $\beta$ - $\beta$ -dimethylcystein. Jedná se o aminokyselinu, která vytváří cheláty s některými těžkými kovy jako je měď (Obr. 1). Při dlouhodobém podávání vede ke zvýšenému vylučování mědi (Lüllman et al. 2004). Zvyšuje se exkrece močí, klesá plazmatická hladina mědi, tkáňová depozita mědi jsou uvolňována do oběhu až do opětovného dosažení rovnovážného stavu (Mareček 1996). Největším problémem této léčby je vysoký výskyt nežádoucích účinků. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří hematologické poruchy, poškození funkce ledvin a kůže (Ferenci 2004).



Obrázek 1. Měď vázaná na penicilamin. Převzato: Schilsky 2001

Při intoleranci D-penicilaminu se do léčby zavádí triethylentetraamin dihydrochlorid. Triethylentetraamin (Obr. 2) je chelátor mědi působící zvýšené vylučování mědi močí. Tato terapie má bezpečnější profil než penicilamin (Schilsky 2001).



Obrázek 2. Měď vázaná na triethylentetraamin. Převzato: Schilsky 2001

Další terapií je zavedení zinku, který působí dvěma mechanismy. Indukuje v intestinálních buňkách syntézu metalothioneinu, který váže vysokou afinitou měď a zadržuje ji po celou dobu života buňky. Díky tomu se blokuje absorpce. To způsobuje, že měď nemůže být resorbována do krevního oběhu a zvýší se intestinální exkrece mědi (Sarkar 1999). Dalším účinkem je blokáce transportního přenašeče pro měď (Ferenci 2004). Předností této terapie je velmi nízký výskyt nežádoucích účinků. Na druhou stranu tato terapie neúčinkuje dostatečně rychle (Sarkar 1999).

Jinou léčbou je tetrathiomolybdenát (TTM). Jeho reakcí se tvoří komplex s mědí a tím se zabraňuje resorpci mědi v intestinálním traktu. TTM také vytváří komplex mědi s albuminem a znesnadňuje buněčné vychytávání (Ferenci 2004).

#### ***3.4.2. Cirhóza indických dětí***

Dalším onemocněním, v jehož patogenezi má měď dominující úlohu, je cirhóza indických dětí. Jedná se o onemocnění z chronického hromadění mědi v organismu, jehož příčinou je genetická predispozice a vyšší příjem mědi potravou (Barceloux 1999). Za nejčastější příčinu je považováno uchovávání a vaření potravy v měděných nádobách (López de Romaña et al. 2011). U tohoto onemocnění, na rozdíl od Wilsonovy choroby, jde o přímou hepatotoxicitu nahromaděné mědi. Projevuje se hepatomegalií, splenomegalií, polyurií. Později se přidávají koagulační poruchy (Mareček 1996).

#### ***3.4.3. Alzheimerova choroba***

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění. Vlastní příčinou je snížená cholinergní aktivita v kůře mozkové způsobená ukládáním proteinu beta-amyloidu do cholinergních neuronů (Slíva a Votava 2010). Postiženy jsou zejména paměťové a kognitivní funkce. U této choroby se vyskytují patologické změny, jako je ztráta neuronů, oxidativní stres, porušení homeostázy mědi, železa a zinku. U pacientů trpících touto chorobou bylo zjištěno větší množství mědi nevázané na ceruloplazmin (Squitti a Zito 2009). Měď může mít významnou roli vedoucí ke zvýšení tvorby volných radikálů a oxidativní neurotoxicitě charakteristické u Alzheimerovy choroby. Tato choroba je nejčastější příčinou senilní demence ve stáří (Price et al. 2007).

V posledních letech tak proběhlo několik klinických studií, které se zabývaly udržením homeostázy mědi, které by vedlo k potlačení progresu Alzheimerovy choroby. Pracuje se s hlavní hypotézou, že protein beta-amyloid ( $A\beta$ ) je spojen s homeostázou mědi v mozku (Schäfer et al. 2007). Tento protein beta-amyloid má vysokou afinitu ke kovům jako je měď a zinek a právě tato patologická interakce mezi mědí a  $A\beta$  může způsobit agregaci beta-amyloidu. Tato vazba umožní produkci  $H_2O_2$  a může způsobit vznik hydroxylového radikálu ( $OH^\bullet$ ). Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) může způsobit ireverzibilní poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin a může přispívat k neuropatologickým změnám vedoucím ke vzniku Alzheimerovy choroby (Price et al. 2007).

#### **3.4.4. Karcinogenita**

Porucha metabolismu mědi hraje roli také při zánětu, infekci nebo rakovině (Tapiero et al. 2003). Epidemiologické studie zatím nestanovily pozitivní korelaci mezi výskytem mědi a zvýšenou incidencí rakoviny (Barceloux 1999). Nejvíce je však patrné zvýšení hladiny mědi u rakoviny prsu, děložního čípku, vaječníku, plic, prostaty, žaludku a leukémie. Zvýšená hladina je spojena s progresí tohoto onemocnění. Měď hraje roli v angiogenezi, procesu, který zajišťuje proliferaci endoteliálních buněk a tím růst nádoru (Jomova a Valko 2011). Měď v tomto procesu může působit mechanismem indukce exprese angiogenního růstového faktoru, kterým je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Dalším mechanismem může být vazba mědi na angiogenní růstový faktor angiogenin (Goodman et al. 2005). Různé chelátory mědi by zde tedy mohli být uplatněny jako inhibitory angiogeneze (Jomova a Valko 2011).

### 3.5. *Chelatace mědi*

Měď hraje důležitou roli v organismu, protože je nedílnou součástí některých enzymů, zrovna jako může být příčinou vzniku nebezpečných reaktivních radikálů a oxidačního stresu a vést k poškození lipidů, proteinů a DNA (Ding et al. 2011).

Je přirozené, že volné radikály se v malém množství neustále vytvářejí v našem organismu. Mnoho z nich má nezastupitelnou úlohu. Uplatňují se v mnoha fyziologických dějích v lidském těle. Pokud se volných radikálů nahromadí velké množství, může docházet k poškození důležitých biomolekul a mohou vznikat vážné chorobné stavy a může se urychlovat stárnutí organismu (Mira et al. 2002). Proto mohou být chelátory mědi nadějný terapeutický nástroj (Říha et al. 2013).

Chelatace se využívá k terapii intoxikací těžkými kovy. Chelátory jsou podávány intravenózně, intramuskulárně nebo perorálně. Naváží kov, který je nahromaděn a je vylučován z těla převážně močí. Tím je udržována normální hladina mědi (Jomova a Valko 2011). Chelatační terapie se dále využívá v léčbě Wilsonovy choroby. Další potencionální využití je v terapii Alzheimerovy choroby, v léčbě nádorů nebo kardiovaskulárních chorob (Ding et al. 2011).

Mezi nejznámější chelátory mědi patří D-penicilamin, kliočinol, tetrathiomolybdenát (TTM), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), triethyltetraamin (TETA) a bathocuproin (Ding et al. 2011).

Tyto syntetické chelátory mají dvojí funkci: protizánětlivou aktivitu, která je zprostředkovaná koordinační vazbou se škodlivými ionty těžkých kovů a antioxidační aktivitu (Fisher a Naughton 2005). Některé vzniklé cheláty inhibují formování ROS, jiné pouze potlačují jejich vznik usměrňováním redoxního potenciálu mědi (Ding et al. 2011).

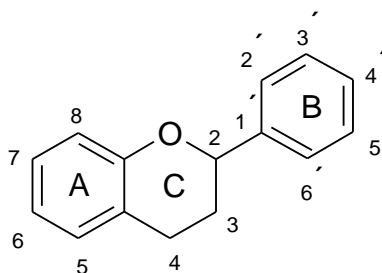
Mechanismus účinku chelátoru spočívá v odstranění mědi z vazby měď-protein a tím dochází k její eliminaci exkrecí nebo může nastat změna v transportním systému a redistribuci mědi v organismu (Ding et al. 2011).

### 3.6. Flavonoidy

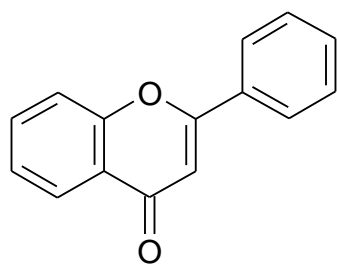
Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin. Tvoří běžnou součást potravy lidí. Průměrný denní příjem je okolo 3 až 70 mg v závislosti na druhu a složení stravy (Manach et al. 1997). Flavonoidy (z latiny *flavus*=žlutý) se vyskytují u vyšších rostlin. Hojně se nacházejí v ovoci: jablka, brusinky, švestky, jahody, citrusy a pomeranče. I v zelenině: cibuli, brokolici, kapustě, hlávkovém salátu, rajčatech. Mezi další zdroj patří i červené víno, černý a zelený čaj, hořká čokoláda (Andersen a Markham 2006).

#### 3.6.1. Rozdělení flavonoidů

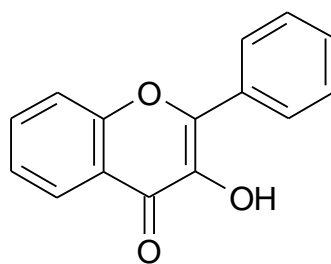
Jsou to důležité polyfenolové sloučeniny, jejichž základem je fenylochroman (Obr. 3). Tento skelet vytváří mnoho substitucí (Pěkal et al. 2011). Flavonoidy jsou rozděleny podle chemických struktur do různých kategorií, např. podle nasycenosti kruhu a přítomnosti hydroxylové skupiny na flavony (Obr. 4), flavonoly (Obr. 5), flavanoly (Obr. 7), flavanony (Obr. 6) a isoflavonoidy (Obr. 8, Mladěnka et al. 2010).



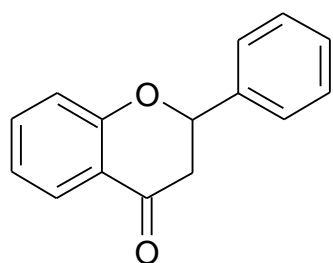
Obrázek 3. Základní struktura flavonoidů



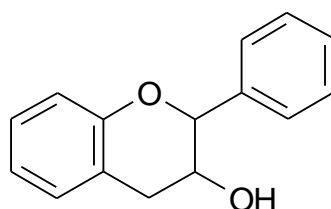
Obrázek 4. Flavon



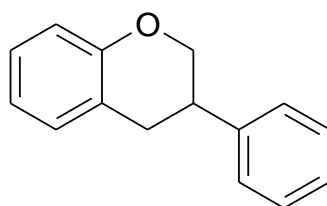
Obrázek 5. Flavonol



Obrázek 6. Flavanon



Obrázek 7. Flavanol

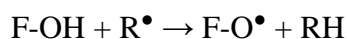


Obrázek 8. Isoflavonoid

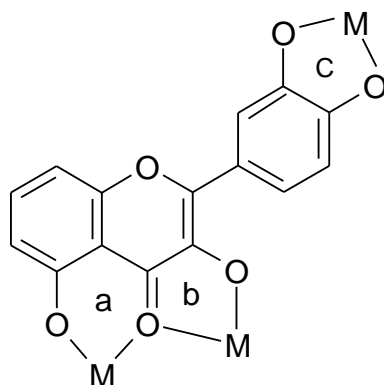
### 3.6.2. Účinky flavonoidů

Flavonoidy snižují oxidační stres pomocí mechanismů: vylučováním volných radikálů a reakcí kovu se sloučeninou, která umožňuje chelataci kovu. Snižují expresi molekul signalizující zánět a snižují agregaci krevních destiček (Mladěnka et al. 2010).

Mají antioxidační a chelatační vlastnosti a tím schopnost vylučovat volné radikály. Vylučování volných radikálů je připisováno vysoce reaktivnímu hydroxylovému substituentu účastnícímu se reakce podle rovnice 3 (Heim et al. 2002). Díky jejich antioxidační aktivitě se ukončuje opakující se řetězec vznikajících radikálů. Jsou také efektivními chelátory redoxně aktivních kovů (Jomova a Valko 2011). Chelatace iontu kovu závisí na struktuře flavonoidu a pH prostředí. Díky vzniklým komplexům (Obr. 9) se snižuje množství aktivního kovu podílejícího se na tvorbě hydroxylového radikálu a jiných ROS (Mira et al. 2002). Mohou se zde uskutečňovat tři možné způsoby chelatace kovu. První možností je tvorba chelátu mezi 5-hydroxyskupinou a 4-karboxylovou skupinou, dále mezi 3-hydroxyskupinou a karboxylovou skupinou v poloze 4 nebo může k navázání mědi dojít mezi 3',4'-hydroxyskupinou v kruhu B (Mladěnka et al. 2010).



Rovnice 3. Hydroxylový substituent účastnící se vylučování radikálů



Obrázek 9. Schopnost flavonoidu chelatovat kov (M). Převzato: Mladěnka et al. 2010

Flavonoidy a jejich antiagregační vlastnosti spočívají v inhibici cyklooxygenasy (COX), thromboxansynthasy nebo tyrosinkinasy. Vykazují také vasodilatační aktivitu (Mladěnka et al. 2010).

K dalším účinkům patří protizánětlivý, antiaterogenní, antialergický, antiosteoporotický, protinádorový a hepatoprotektivní účinek (Silva et al. 2002).

Potraviny, které obsahují hodně flavonoidů, mohou mít vliv na kognitivní funkce a paměť. Požíváním potravin s obsahem flavonoidů se může inhibovat rozvoj nebo zpomalit průběh Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních a kardiovaskulárních chorob, také se může snižovat riziko výskytu rakoviny (Williams a Spencer 2012).

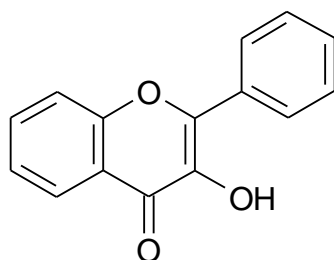
Zatímco mají antioxidační vlastnosti flavonoidů pozitivní efekt, někteří zmiňují i prooxidační aktivitu těchto sloučenin. Prooxidační aktivita může být dána výskytem velkého množství hydroxylových skupin. Tato aktivita je odpovědná za cytotoxický a proapoptický efekt. Toho se někdy také využívá v terapii (Heim et al. 2002).

### **3.7. Flavonoly**

Flavonoly jsou žluté rostlinné pigmenty. Jejich základní strukturou je 3-hydroxy-2-fenylchromen-4-on (tj. flavonol) (Obr. 5, Steglich 2000). Flavonoly se vyskytují především v čeledi Asteraceae, Rutaceae, Fabaceae (Andersen a Markham 2006).

### 3.7.1. 3-hydroxyflavon

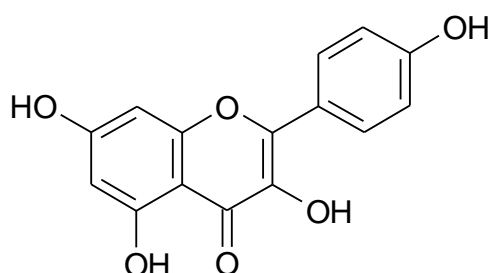
3-hydroxyflavon (3HF) je základní syntetický flavonol s hydroxylovou skupinou pouze v poloze 3 (Obr. 10). Má slabší antioxidační vlastnosti než ostatní flavonoly (Heijnen et al. 2001).



Obrázek 10. 3-hydroxyflavon

### 3.7.2. Kempferol

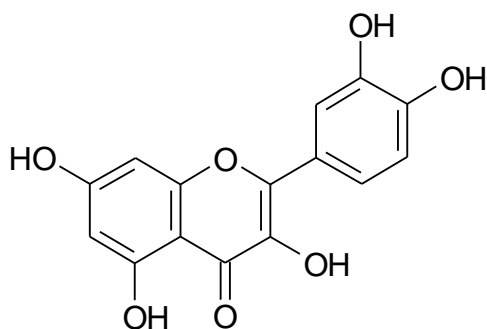
Kempferol (Obr. 11) patří mezi nejčastěji se vyskytující flavonoidy v rostlinách (Steglich 2000). Tento flavonol se nevyskytuje často jako aglykon, ale nejčastěji ho nacházíme jako glykosylovaný derivát (Aherne a O'Brien 2002). Kempferol byl studován díky svému inhibičnímu efektu na biosyntézu cholesterolu. Tento flavonol by mohl najít potenciální využití v léčbě hypercholesterolemie a s tím spojenou aterosklerózou a kardiovaskulárními chorobami (Kim et al. 2008).



Obrázek 11. Kempferol

### 3.7.3. Kvercetin

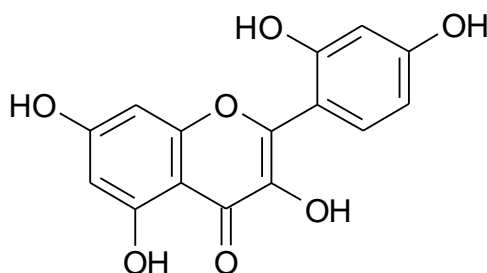
Využívá se k barvení vlny a bavlny, jako ochrana proti UV záření nebo k detekci hafnia, zinku a cínu. Další využití má jako účinný antioxidant. Kvercetin (Obr. 12) inhibuje některé enzymy. Kvercetin se převážně vyskytuje v listech *Adonanthe vernalis* (Ranunculaceae), *Allium cepa* (Alliaceae), v plodech *Vaccinium vitis-idaea* (Vacciniaceae), ale i víně, citrusech (Steglich 2000).



Obrázek 12. Kvercetin

### 3.7.4. Morin

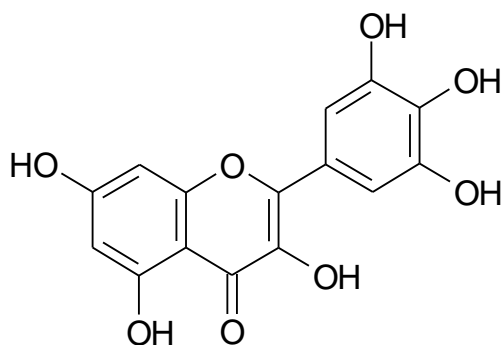
Tento flavonol (Obr. 13) se nachází ve větvích morušovníku *Morus alba* (Moraceae). Využívá se k detekci solí hliníku, zinku, india, gallia, beryllia a stroncia ve fotometrické analýze (Steglich 2000).



Obrázek 13. Morin

### 3.7.5. Myricetin

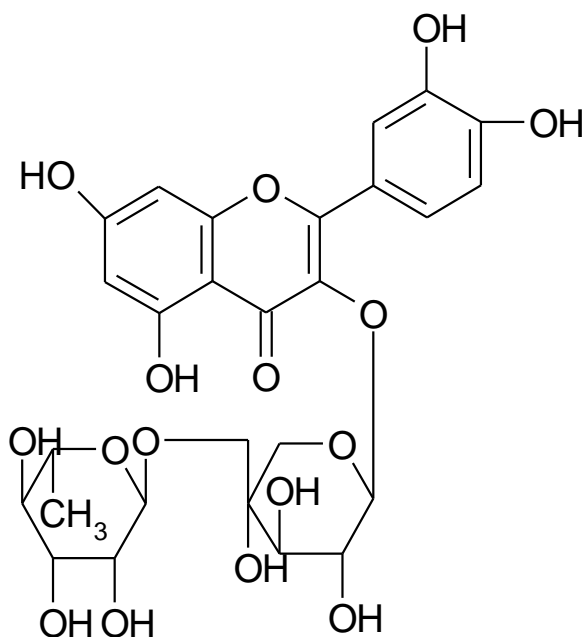
Myricetin (Obr. 14) se vyskytuje v kůře *Myrica esculenta* a v listech *Myrica gale* (Myricaceae) (Steglich 2000). Tento bioflavonol má antioxidantní i prooxidativní vlastnosti. Jeho využití je jako potenciální antikarcinogen a antimutagen (Ong a Khoo 1997).



Obrázek 14. Myricetin

### 3.7.6. Rutin

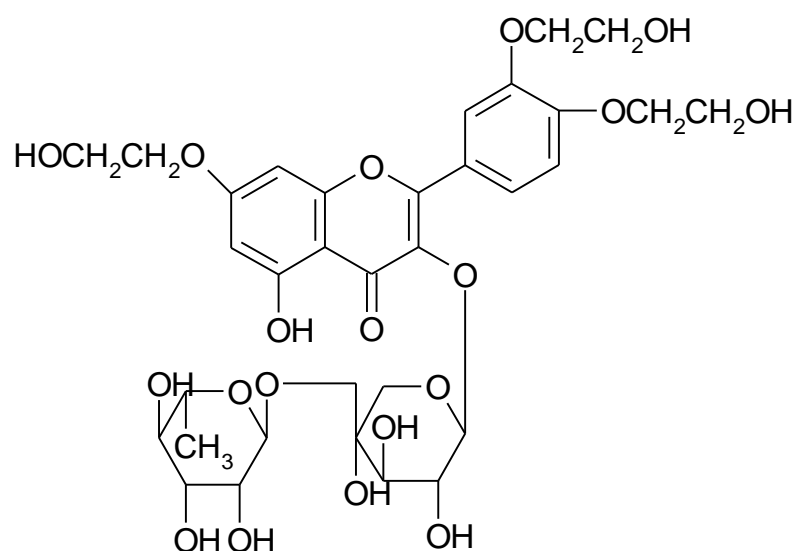
Rutin (Obr. 15) byl poprvé izolován v roce 1842 německým farmaceutem Weissem z natě *Ruta graveolens* (Rutaceae). Získává se také z listů *Sophora japonica* (Fabaceae) a z natě *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae). Často doprovází vitamin C v *Citrus* sp. (Rutaceae), a také se vyskytuje v *Solanum* sp. nebo *Nicotiana* sp. (Solanaceae). Využívá se u léčby kapilárního krvácení, u žilní insuficience (Steglich 2000).



Obrázek 15. Rutin

### 3.7.7. Troxerutin

Troxerutin (Obr. 16) neboli trihydroxyethylrutin je polosyntetický derivát od rutinu vyskytujícího se v rostlinách (Lu et al. 2011). Tento flavonol je využíván pro léčbu chronické žilní insuficience, varixů a kapilární lomivosti. Má antitrombotický, fibrinolytický efekt a reologickou aktivitu. Troxerutin chrání biomembrány a buněčnou DNA před škodlivým důsledkem gama radiace (Maurya et al. 2004).



Obrázek 16. Troxerutin

## **4. Experimentální část**

### **4.1. Materiál**

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

### **4.2. Chemikálie**

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

### **4.3. Testované látky**

- 3-hydroxyflavon (Sigma)
- Kempferol (Extrasynthese)
- Kvercetin (Extrasynthese)
- Morin (Sigma)
- Myricetin (Extrasynthese)
- Rutin (Sigma)
- Troxerutin (Sigma-Aldrich)

#### **4.4. Přístrojové vybavení**

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

#### **4.5. Příprava zásobních roztoků**

- ***Roztok měďnatých iontů 5mM***

Roztok měďnatých iontů ( $\text{Cu}^{2+}$ ) byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  v destilované vodě na požadovanou koncentraci ( $M_w = 249,69$  g/mol). Tento zásobní roztok je stabilní.

- ***Roztok hematoxylinu 5mM***

Tento roztok byl připraven rozpuštěním hematoxylinu v DMSO ( $M_w = 302,28$  g/mol). Tento základní roztok není stabilní. Zásobní roztok HEMu je proto možné použít po dobu cca 5 hodin.

- ***Roztok BCS 5mM***

Zásobní roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny byl připraven jejím rozpuštěním v destilované vodě ( $M_w = 564,54$  g/mol).

- ***Roztok hydroxylaminu 10mM***

Roztok hydroxylaminu byl připraven jeho rozpuštěním v destilované vodě ( $M_w = 69,49$  g/mol).

- ***Roztok testované látky***

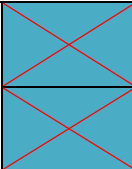
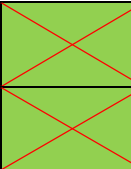
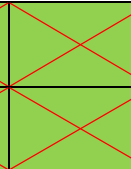
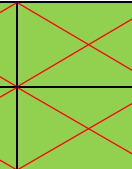
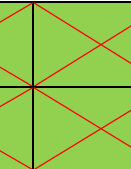
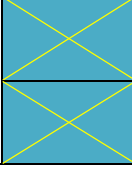
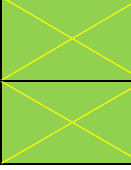
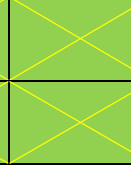
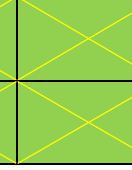
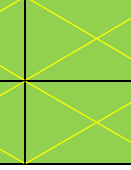
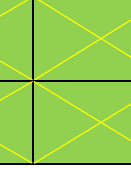
Základní roztok testovaných flavonolů byl připraven rozpuštěním v DMSO na obvykle 10mM koncentraci. Další ředění testovaných látek na požadovanou koncentraci v DMSO probíhalo dle potřeby jednotlivých měření.

#### ***4.6. Kalibrace měďnatých iontů***





Pro vytvoření kalibrační křivky měďnatých iontů závislosti absorbance na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů byly použity roztoky o stanovených koncentracích. Byla změřena absorbance a těmito naměřenými výsledky byla poté zkonstruována přímka a byl sestaven graf.

- Byly připraveny požadované základní a pracovní roztoky:  
1mM HA  
roztoky  $\text{Cu}^{2+}$  iontů o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$   
5mM BCS
- Pipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o pH 6.8 do jamek mikrotitrační destičky (Obr. 19)
- Přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku předem připravených měďnatých iontů požadované koncentrace do testovacích jamek nebo 50  $\mu\text{l}$  destilované vody do kontrolních jamek (Obr. 17)
- Bylo mícháno na třepače pro mikrotitrační destičky po dobu 1 minuty
- Přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku předem připraveného roztoku BCS do horní poloviny jamek na mikrotitrační destičce, do druhé spodní poloviny přidáno 50  $\mu\text{l}$  destilované vody
- Ihned změřena absorbance při vlnové délce  $\lambda$  484 nm

- Změřena absorbance při vlnové délce  $\lambda$  484 nm v čase 5 minut
- Zaznamenány naměřené hodnoty absorbance A při vlnové délce  $\lambda$  484 nm do tabulky
- Sestrojen graf kalibrační křivky

	Kontrola – přidána $c(\text{Cu}^{2+}) = 0 \mu\text{M}$	Přidána $c(\text{Cu}^{2+}) = 50 \mu\text{M}$	Přidána $c(\text{Cu}^{2+}) = 100 \mu\text{M}$	Přidána $c(\text{Cu}^{2+}) = 150 \mu\text{M}$	Přidána $c(\text{Cu}^{2+}) = 200 \mu\text{M}$	Přidána $c(\text{Cu}^{2+}) = 250 \mu\text{M}$
Jamky s indikátorem						
Slepé vzorky						

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

Obrázek 17. Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů

#### **4.7. Metodický postup stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem**

Při chelataci hematoxylinem byl mísen roztok testované látky (chelátoru) s roztokem měďnatých iontů a se stanovovaným pufrům. Poté se přidal roztok hematoxylinu nebo v případě, že se jednalo o kontrolní vzorek, byl přidán DMSO (tzv. blank). Poté byla měřena absorbance.

- Byly připraveny požadované základní a pracovní roztoky:  
hematoxylin o koncentraci 250  $\mu\text{M}$ , zředěn ze základního roztoku s DMSO v čas potřeby, roztok hematoxylinu možno použít pouze 90 minut  
roztok  $\text{Cu}^{2+}$  iontů zředěn ve vodě na koncentraci 250  $\mu\text{M}$   
testované látky ředěny v DMSO do požadované koncentrace
- Pipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o příslušném pH do jamek mikrotitrační destičky
- Přidáno 50  $\mu\text{l}$  250 $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů do všech jamek mikrotitrační destičky
- Přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky příslušné koncentrace, naředěné dle záměru, do testovacích jamek nebo přidáno rozpouštědlo do kontrolních jamek
- Bylo mícháno na třepačce pro mikrotitrační destičky po dobu 2 minut
- Přidáno 50  $\mu\text{l}$  250 $\mu\text{M}$  roztoku hematoxylinu do horní poloviny jamek na mikrotitrační destičce (Obr. 18), do druhé spodní poloviny přidáno 50  $\mu\text{l}$  DMSO
- Mícháno na třepačce pro mikrotitrační destičky po dobu 3 minut
- Ihned (tzn. v čase 3 min.) změřena absorbance při vlnové délce dle použitého pH,  $\lambda$  610 nm (pH 7.5),  $\lambda$  590 nm (pH 6.8),  $\lambda$  595 nm (pH 5.5),
- Poté změřena absorbance v čase 7 minut při stejné vlnové délce
- Zaznamenány naměřené hodnoty absorbance A do tabulky
- Využita statistická analýza na propočet stanovených hodnot
- Sestrojen graf křivky

	Roztok testované látky c <sub>1</sub>	Roztok testované látky c <sub>2</sub>	Roztok testované látky c <sub>3</sub>	Roztok testované látky c <sub>x</sub>	Kontrolní jamky bez testované látky
Jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X



Jamky s hematoxylinem



Jamky se slepým vzorkem – obsahují DMSO



Kontrolní jamky – použito rozpouštědlo místo chelátoru



Testované jamky – použita testovaná látka příslušné koncentrace

Obrázek 18. Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu<sup>2+</sup> iontů

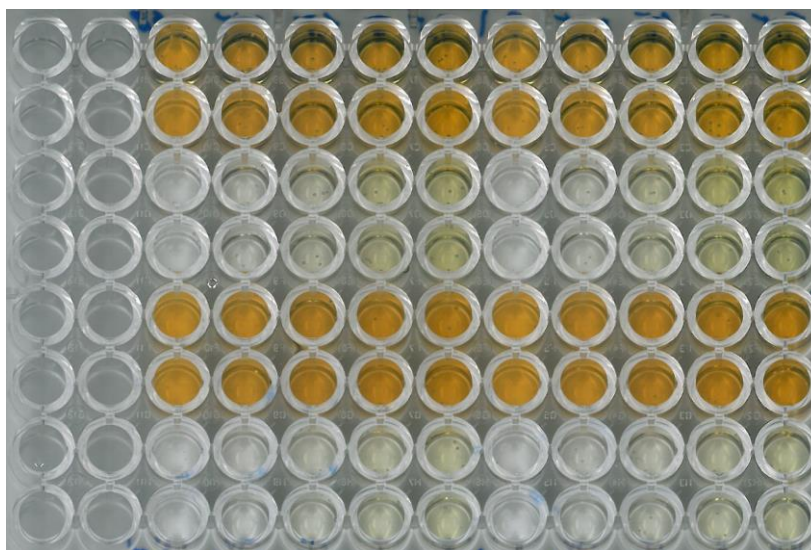
Konečný obsah jamky v mikrotitrační destičce:

150  $\mu\text{l}$  pufru

50  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů

50  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky nebo rozpouštědla

50  $\mu\text{l}$  roztoku hematoxylinu nebo DMSO



Obrázek 19. Mikrotitrační destička

#### **4.8. Statistická analýza**

K provedení statistické analýzy byl použit program MS Excel a GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, USA). Při srovnání účinnosti jednotlivých chelátorů byl použit test ANOVA s Bonferroniho post testem. Výsledky byly zpracovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka vypočítaná podle vzorce

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

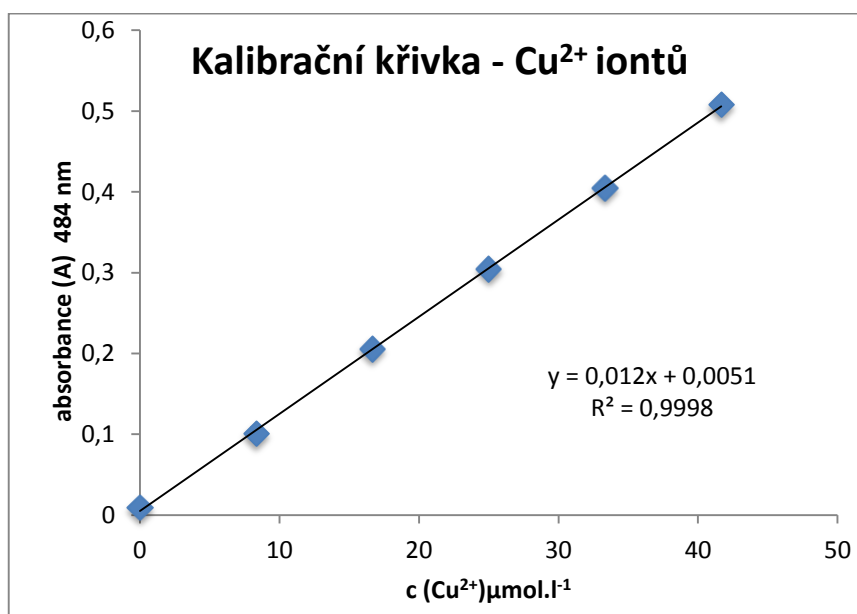
## 5. Výsledky

### 5.1. Kalibrační křivka

Z naměřených hodnot absorbancí byl sestrojen graf kalibrační křivky (Obr. 20). Byly použity tyto koncentrace měďnatých iontů: 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  (Tab. 1). Závislost absorpance na koncentraci měďnatých iontů je lineární.

Zakladní c /mM/	0	50	100	150	200	250
Finalní c /mM/	0	8,333333	16,66667	25	33,33333	41,66667
Průměr A	0,009	0,101	0,2055	0,3045	0,405	0,508

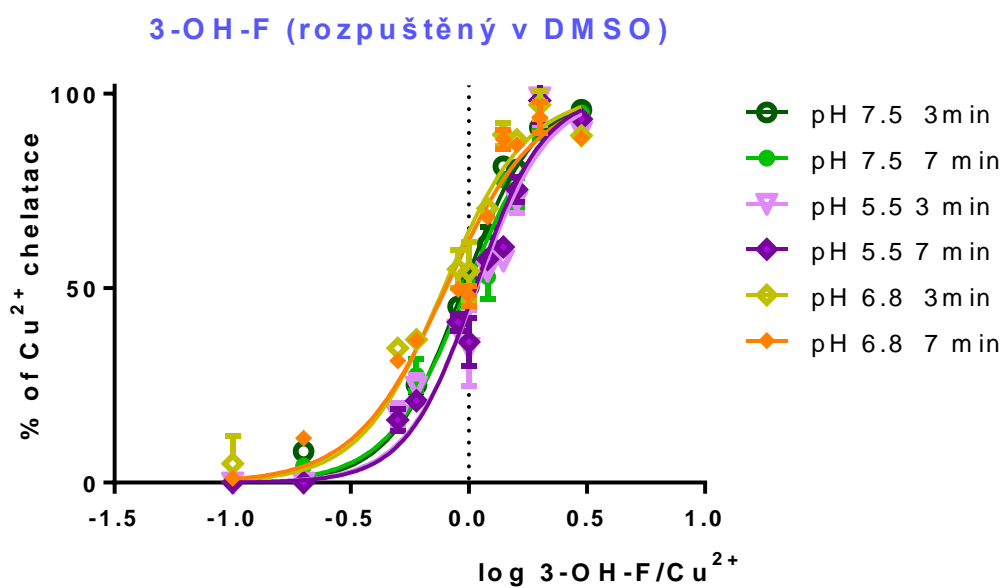
Tabulka 1. Závislost absorpance na koncentraci - hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky



Obrázek 20. Kalibrační křivka Cu<sup>2+</sup> iontů

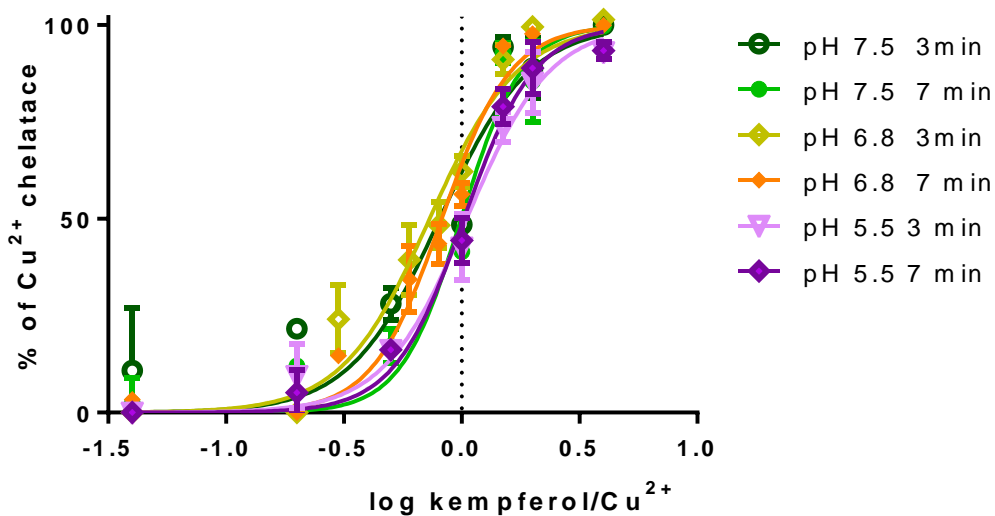
## 5.2. Chelatační aktivita jednotlivých flavonolů

Chelatační aktivita měřených flavonolů (3-hydroxyflavon, kempferol, kvercetin, morin, myricetin, rutin, troxerutin) byla převedena do grafů (Obr. 21-27).



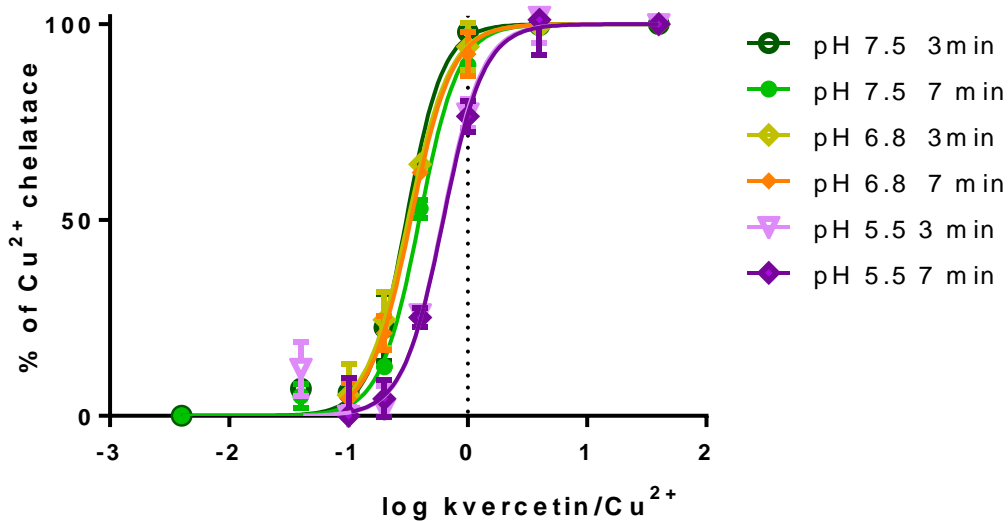
Obrázek 21. Měď<sup>2+</sup>-chelatační aktivita 3-hydroxyflavonu

### kempferol (rozpuštěný v DMSO)

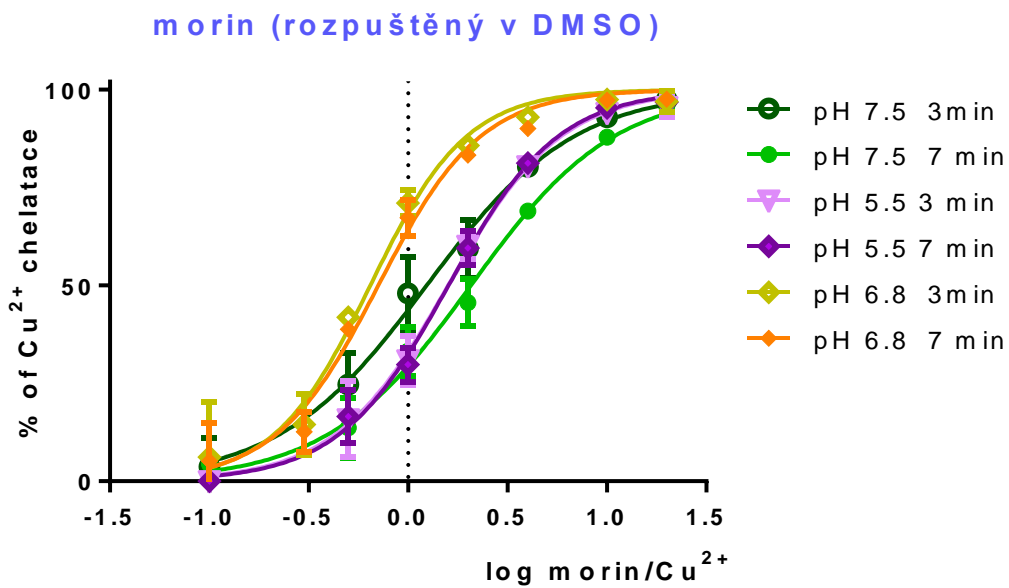


Obrázek 22. Měď<sup>2+</sup>-chelatační aktivita kempferolu

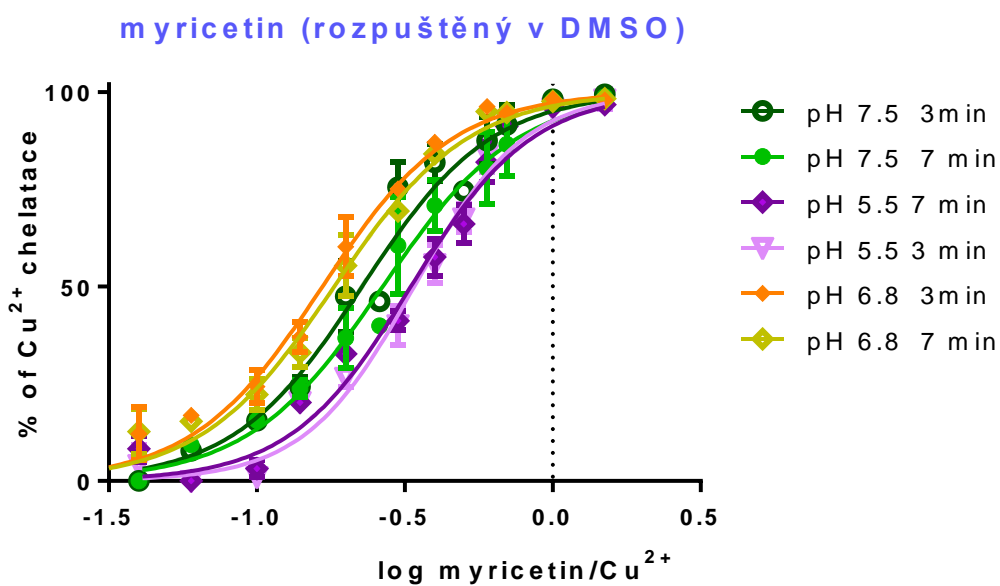
### kvercetin (rozpuštěný v DMSO)



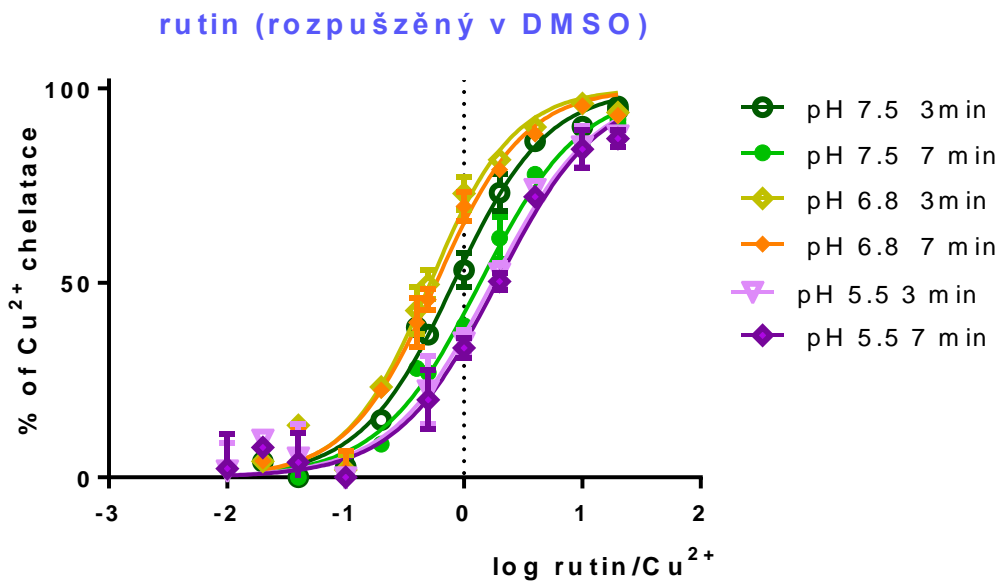
Obrázek 23. Měď<sup>2+</sup>-chelatační aktivita kvercetinu



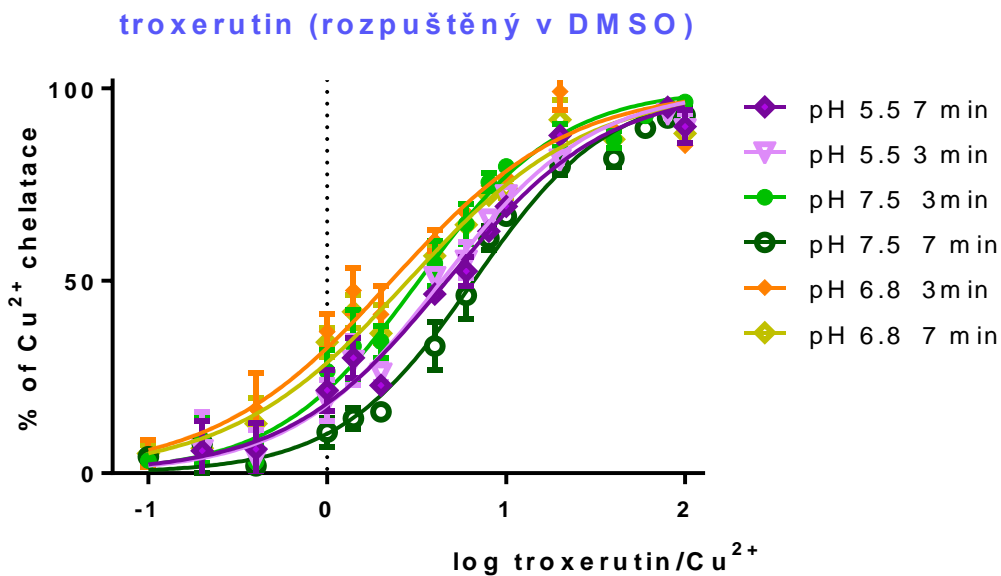
Obrázek 24. Měď-chelatační aktivita morinu



Obrázek 25. Měď-chelatační aktivita myricetinu



Obrázek 26. Měď-chelatační aktivita rutinu



Obrázek 27. Měď-chelatační aktivita troxerutinu

## 6. Diskuze

Flavonoidy jsou látky, které se běžně vyskytují v rostlinách. Díky jejich vlastnostem, jako např. antioxidační a chelatační účinky, se studuje jejich potenciální využití v terapii různých chorob.

Cílem této diplomové práce bylo stanovit měď-chelatační aktivitu vybraných flavonolů. Pro stanovení chelatační aktivity byla použita metoda mikrotitrace, kdy byla detekována zbylá měď ( $\text{Cu}^{2+}$ ), tedy měď, která nevytvořila komplex s testovaným flavonolem. Pro stanovení chelatační účinnosti flavonolů byl použit spektrofotometr a chelatační indikátor hematoxylin, který tvoří s měďnatými ionty komplex.

Bylo zjištěno, že aktivita flavonoidů závisí na jejich struktuře a pH prostředí. Všechny studované flavonoly (3-hydroxyflavon, kempferol, kvercetin, morin, myricetin, rutin a troxerutin) vykazovaly chelatační aktivitu. Tvorba stabilního komplexu při pH 7.5 byla zjištěna pouze u 3-hydroxyflavonu. U ostatních měřených pH byly vzniklé komplexy stabilní u všech testovaných látek.

Chelatační potenciál závisí na hydroxylových skupinách (zejména OH v poloze 3 a popřípadě v poloze 5), dvojně vazbě v poloze 2-3 a ketoskupině v poloze 4. Izolované hydroxylové skupiny v kruhu B u kempferolu (4'-OH) a morinu (2',4'-OH) nejsou spojeny s chelatací mědi (Mladěnka et al. 2011). Stejně výsledky byly zjištěny v této diplomové práci, kde byla měřena chelatační aktivita měďnatých iontů s hematoxylinem u flavonolů.

Kempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavon) má jen jednu OH skupinu v kruhu B v pozici 4', místem chelatace tedy bude 3-hydroxy-4-keto, případně 5-hydroxy chelatační místo. V porovnání s kvercetinem nemá katecholický kruh B, a proto se svojí aktivitou nemůže rovnat kvercetin (Obr. 22-23).

Kvercetin je 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon, který vytvoří komplex s mědí mezi hydroxyskupinou v poloze 3' a 4' v kruhu B a mezi hydroxyskupinou v poloze 3 a oxoskupinou (karbonyl) v poloze 4 (Bukhari et al. 2009). Tyto výsledky byly nepřímo potvrzeny i v této diplomové práci (Obr. 23). Komplex mědi s kvercetinem tudíž projevil vyšší chelatační potenciál než kempferol.

Morin (2',3,4',5,7-hydroxyflavon) má nižší chelatační aktivitu než kvercetin, protože hydroxyskupina v poloze 2' pravděpodobně snižuje aktivitu 3-hydroxyskupiny a 4-oxoskupiny (Obr. 24).

Myricetin (3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon) má tři hydroxylové skupiny na kruhu B, které přispívají k vyšší chelatační aktivitě (Obr. 25).

Naproti tomu rutin a troxerutin jsou glykosylovány objemnou skupinou (glukózou a rhamnózou) v poloze 3, a tak může docházet ke stérickému bránění, navíc jsou blokovány chelatační místa (např. katecholický kruh B u troxerutinu), čímž může dojít k menší měď-chelatační aktivitě (Obr. 26-27).

Na rozdíl od chelatace, nejvýznamnější antioxidační aktivita přísluší OH skupinám na B kruhu (Heim et al. 2002).

Je to patrné, např. u 3-hydroxyflavonu (Obr. 21), který je méně antioxidačně účinný než kempferol, protože nemá na kruhu B žádné hydroxylové skupiny.

Chelatovorné látky (např. D-penicilamin, kliočinol a EDTA) se používají v terapii nebo při experimentálním výzkumu. Mnohé z nich však mají nevýhodné vlastnosti, proto dochází k objevování a zkoumání nových potenciálních chelátorů. Tato práce by mohla přispět k potvrzení předešlých publikovaných sdělení. Výsledky diplomové práce jsou v souladu s doposud publikovanými zdroji.

## 7. Závěr

V rámci této diplomové práce jsem stanovovala měď-chelatační aktivitu za pomoci spektrofotometrických metod. Stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem je vhodné jako základní screening schopnosti látek chelatovat měď. Testované flavonoly (3-hydroxyflavon, kempferol, kvercetin, morin, myricetin, rutin a troxerutin) vykazovaly chelatační potenciál. Jako nejúčinnější chelátor se podle získaných výsledků jevil myricetin, kvercetin a morin, naopak jako nejméně účinný jsem shledala rutin a troxerutin.

Shrnutím poznatků o vlivu struktury na chelatační aktivitu jsem dospěla k závěru, že hydroxylové skupiny udílejí spolu s ketoskupinou v poloze 4 chelatační aktivitu.

## 8. Seznam použitých zkratek

3HF	3-hydroxyflavon
BAL	2,3-dimerkapto-1-propanol
BCS	Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
COX	Cyklooxygenasa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
GSH	Glutathion
HA	Hydroxylamin hydrochlorid
NaFeEDTA	Železo-sodná sůl EDTA
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxiddismutasa
TETA	Triethylentetraamin
TTM	Tetrathiomolybdenát
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor

## 9. Použitá literatura

### 9.1. Odborné časopisy

1. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 2002;18(1):75-81.
2. Barceloux DG. Copper. *Clinical Toxicology* 1999;37(2):217-230.
3. Bertinato J, L'Abbé MR. Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2004;15:316-322.
4. Bukhari SB, Memon S, Mahroof-Tahir M, Bhangar MI. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. *Spectrochimica Acta Part A* 2009;71:1901-1906.
5. Burkhead JL, Gray LW, Lutsenko S. Systems biology approach to Wilson's disease. *Biomedicine* 2011;24:455-466.
6. Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews* 2010;68(3):133-147.
7. Ding X, Xie H, Kang YJ. The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2011;22:301-310.
8. Ferenci P. Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Alimentary Pharmacology Therapeutics* 2004;19:157-165.
9. Fischer AEO, Naughton DP. Metal ion chelating peptides with superoxide dismutase activity. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2005;59:158-162.

10. Gandhi R, Kakkar R, Rajan S, Bhangale R, Desai S. Menkes Kinky Hair Syndrome: A Rare Neurodegenerative Disease. *Case Reports in Radiology* 2012;2012:1-4.
11. Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Control of Copper Status for Cancer Therapy. *Current Cancer Drug Targets* 2005;5:543-549.
12. Heijnen CGM, Haenen GRMM, Acker FAA, Vijgh WJF, Bast A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicology in Vitro* 2001;15:3-6.
13. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002;13:572-584.
14. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;283:65-87.
15. Kim KT, Yeo EJ, Moon SH, Cho SG, Han YS, Nah SY, Paik HD. Inhibitory Effects of Naringenin, Kaempferol, and Apigenin on Cholesterol Biosynthesis in HepG2 and MCF-7 Cells. *Food Science and Biotechnology* 2008;17:1361-1364.
16. López de Romaña D, Olivares M, Uauy R, Araya M. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2011;25:3-13.
17. Lu J, Wu D, Zheng Z, Zheng Y, Hu B, Zhang Z. Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. *Brain a Journal of Neurology* 2011;134:783-797.
18. Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters* 1997;409:12-16.

19. Maurya DK, Salvi VP, Krishnan Nair CK. Radioprotection of Normal Tissues in Tumor-bearing Mice by Troxerutin. *Journal of Radiation Research* 2004;45:221-228.
20. 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 Radical Research* 2002;36(11):1199-1208.
21. Mladěnka P, Macáková K, Filipský T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, Proietti Silvestri I, Hrdina R, Saso L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2011;105:693-701.
22. Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipský T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 2010;49:963-975.
23. Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *General Pharmacology* 1997;29(2):121-126.
24. Pękal A, Biesaga M, Pyrzyńska K. Interaction of quercetin with copper ions: complexation, oxidation and reactivity towards radicals. *Biometals* 2011;24:41-49.
25. Price KA, Crouch PJ, White AR. Therapeutic Treatment of Alzheimer's Disease Using Metal Complexing Agents. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2007;2:180-187.
26. Říha M, Karličková J, Filipský T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2013;123:80-87.
27. Sarkar B. Treatment of Wilson and Menkes Diseases. *Chemical Reviews* 1999;99:2535-2544.

28. 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. *Journal of Molecular Medicine* 2007;85:405-413.
29. Schilsky ML, Treatment of Wilson's Disease: What Are the Relative Roles of Penicillamine, Trientine, and Zinc Supplementation. *Current Gastroenterology Reports* 2001;3:54-59.
30. Silva MM, Santos MR, Caroço G, Rocha R, Justino G, Mira L. Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research* 2002;36(11):1219-1227.
31. Squitti R, Zito G. Anti-Copper Therapies in Alzheimer's Disease: New Concepts. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2009;4:209-219.
32. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2003;57:386-398.
33. Tümer Z, Møller LB. Menkes disease. *European Journal of Human Genetics* 2010;18:511-518.
34. Williams RJ, Spencer JPE. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2012;52:35-45.

## **9.2. *Knihy***

1. Andersen ØM, Markham KR. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. USA: CRC Press, 2006. ISBN 0-8493-2021-6.
2. Hejda S. Kapitoly o výživě. Praha: Avicenum, 1985.

3. Jordán V, Hemzalová M. Antioxidanty - zázračné zbraně: vitamíny, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život. 1. vydání. Brno: Jota, s.r.o., 2001. ISBN 80-7217-156-9.
4. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. Farmakologie a toxikologie. Vydání 2. české. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. ISBN 80-247-0836-1.
5. Mareček Z. Wilsonova choroba. 1. vydání. Praha: Galén, 1996. ISBN 80-85824-37-X.
6. Masopust J, Průša R. Patobiochemie metabolických drah. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 1999. ISBN 80-238-4589-6.
7. Racek J et al. Klinická biochemie. 2., přepracované vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
8. Slíva J, Votava M. Farmakologie. Praha: Triton, 2010. ISBN 978-80-7387-424-7.
9. Steglich W, Fugmann B, Lang-Fugmann S. Römpf encyclopedia natural products. New York: Thieme, 2000. ISBN 0-86577-988-0.
10. Štípek S a kolektiv. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, spol. s r.o., 2000. ISBN 80-7169-704-4.
11. Zadák Z. Výživa v intenzivní péči. 2., rozšířené a aktualizované vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2008. ISBN 978-80-247-2844-5.

## 10. Abstrakt

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické botaniky a ekologie**

**Kandidát:** Markéta Jeřábková

**Školitel:** PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Měď chelatující účinky flavonolů

Měď patří mezi životně důležité stopové prvky. Je zapojena do různých biologických pochodů nepostradatelných pro život, a proto poruchy metabolismu mědi mohou vést k patologickým projevům. Zvýšená hladina volné mědi v séru u některých chorob vzbuzuje obrovský zájem o „chelatační“ terapii a studium nových potenciálních chelátorů.

Význam chelatace spočívá v udržování homeostázy mědi a odstranění jejího nadbytku. Slouží k terapii intoxikace mědí i jiných těžkých kovů a k léčbě Wilsonovy choroby.

Flavonoidy jsou rostlinné polyfenoly s antioxidačními účinky. Jsou schopny cheltovat některé ionty kovů, čímž snižují možnost tvorby hydroxylového radikálu a tím zmírňují působení oxidačního stresu na lidský organismus. Potenciální využití „chelatační“ terapie s flavonoidy je zkoumána také u kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob, ale i výskytu rakoviny a zánětu.

Tato diplomová práce byla zaměřena na zjištění chelatační aktivity flavonolů: 3-hydroxyflavonu, kempferolu, kvercetinu, morinu, myricetinu, rutinu a troxerutinu s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty hematoxylinem při různých pH za pomoci spektrofotometrie.

Vymezením vztahu mezi strukturou flavonoidu a chelatačním potenciálem na chelatační aktivitu byl zjištěn vliv 4-oxoskupiny a hydroxylových skupin. Nejvyšší chelatační aktivita byla zjištěna u myricetinu, kvercetinu a morinu. Nejnižší aktivitu měl naopak rutin a troxerutin.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Flavonoly, Chelatační aktivita, Měď, Hematoxylin, Antioxidanty

## 11. Abstract

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradci Králové**

**Department of Pharmaceutical botanic and ecology**

**Candidate:** Markéta Jeřábková

**Supervisor:** PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

**Title of Thesis:** Copper chelating activity of flavonols

Copper belongs to essential trace elements. It is involved in different biological processes essential for life therefore metabolism disorders of copper can give rise to pathological displays. A raised level of loose copper in serum at some diseases arouses a great interest in the „chelating“ therapy and the study of new potential chelators.

The importance of chelation is based on the maintenance of copper homeostasis and the elimination of its abundance. It serves the intoxication therapy of copper and other heavy metals and the treatment of Wilson's disease.

Flavonoids are polyphenolic compounds with antioxidant effects. Flavonoids able to chelate some metal ions through which they reduce the possibility of the production of a hydroxyl radical which decrease the effect of oxidative stress on organism. The possible use of the „chelating“ therapy with flavonoids is investigated also at cardiovascular and neurodegenerative diseases, the occurrence of cancer and the inflammation.

This diploma thesis was focused on discovering chelating activity of flavonols: 3-hydroxyflavone, kaempferol, quercetin, morin, myricetin, rutin, troxerutin with  $\text{Cu}^{2+}$  ions by hematoxylin at different pH using spectrophotometry.

Defining of the structure-activity relationship of a flavonoid and a chelating potential, the influence of 4-oxo group and hydroxyl groups on chelating activity was discovered. The highest chelating activity was discovered at myricetin, quercetin and morin. On the contrary the lowest activity had rutin and troxerutin.

**KEYWORDS:** Flavonols, Chelating activity, Copper, Hematoxylin, Antioxidants