

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmakologie a toxikologie



## **MĚĎ-CHELATAČNÍ VLASTNOSTI ISOFLAVONOIDŮ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Horňasová Veronika

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

Hradec Králové 15. 5. 2015

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli při realizaci mé diplomové práce. Děkuji především svému konzultantovi Doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. nejen za jeho odborné vedení, mnoho rad a nekončící inspiraci, ale i za jeho trpělivost a ochotu. Velké díky patří i PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za spolupráci a pomoc.

Nakonec chci velmi poděkovat celé rodině, za jejich obrovskou podporu a porozumění během celého studia.

## **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakologie a toxikologie**

**Studentka:** Veronika Hornásová

**Školitel:** Doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Měď-chelatační vlastnosti isoflavonoidů

Měď je esenciální stopový prvek, který má pro náš organismus zásadní roli. Podílí se na mnoha fyziologických procesech. Na druhé straně, volná měď může být pro organismus toxická, proto musí být homeostáza mědi pečlivě regulována. Chelátory mědi představují slibnou součást léčebných strategií nejen u absolutního, ale také u relativního (lokálního) nadbytku mědi. Speciálně látky, u kterých se očekává nízký potenciál nežádoucích účinků, jako jsou isoflavonoidy, by mohly najít uplatnění nejen u Wilsonovy choroby, ale i v terapii neurodegenerativních nebo nádorových onemocnění. Isoflavonoidy patří do jedné z podtříd flavonoidů. Mají poměrně rozsáhlé biologické účinky - protizánětlivé, antioxidační, kardio- a neuroprotektivní i protinádorové.

V této diplomové práci byly otestovány chelatační vlastnosti dostupné skupiny deseti isoflavonoidů pomocí dvou indikátorů – hematoxylinu a bathocuproinu. Ke stanovení chelatačních vlastností bylo použito spektrofotometrické měření, které je ověřenou a rychlou metodou. Ze všech testovaných látek prokázaly chelataci měďnatých iontů pouze čtyři - biochanin A, genistein, genistin a prunetin. Tyto látky obsahují stejné chelatační místo, ale liší se dalšími substituenty, které ovlivňují míru chelatace. Nejvýznamnější chelatace dosáhly při pH 6.8. Při nižším i vyšším pH byly jejich chelatační účinky slabší. Za přítomnosti silného indikátoru bathocuproinu tyto látky ale nebyly schopny významně chelatovat ani měďnaté ani měďné ionty při žádném z testovaných pH.

Bylo potvrzeno, že strukturním předpokladem pro chelataci iontů mědi je u isoflavonoidů 4-keto-5-hydroxyskupina. Přestože jsou tyto látky schopny chelatace, jejich chelatační potenciál je relativně malý.

## **ABSTRACT**

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacology & Toxicology**

**Student:** Veronika Horňasová

**Supervisor:** Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Copper-chelating properties of isoflavonoids

Copper is an essential trace element that plays a crucial role in our organism. It is involved in many physiological processes. On the other hand, free copper may be toxic for the organism and therefore copper homeostasis must be carefully controlled. Copper chelators represent a promising component of therapeutic strategies not only in absolute but also in relative (local) excess of copper. Especially substances which are expected to have a lower risk for side effects, such as isoflavones, may be beneficial in the treatment of Wilson's disease as well as neurodegenerative diseases or cancer. Isoflavones belong to one of the subclasses of flavonoids. Their biological effects are quite large - anti-inflammatory, antioxidant, cardio- and neuroprotective and anti-tumor.

In this diploma thesis chelating properties of a group of ten isoflavones were tested by two indicators - hematoxylin and bathocuproin. In order to determine the chelating properties, a spectrophotometric measurement was used. It is a precise and rapid method. From the tested compounds, only four showed the chelation of cupric ions - biochanin A, genistein, genistin and prunetin. These chelating agents contain the same chelating place, but they have different additional substituents that affected the efficacy of copper chelation. The most significant chelation was reached at pH 6.8. When comparing with lower and higher pH, the chelating effects were weaker. In the presence of a strong indicator bathocuproin, these compounds were not able to significantly chelate cupric or cuprous ions at any tested pH.

It was confirmed that the structural assumption for chelation of copper ions is the 4-keto-5-hydroxy group in isoflavones. Although these substances are capable of chelation, the chelating potential is relatively small.

## Obsah

1.	Seznam zkratek .....	1
2.	Úvod .....	2
3.	Teoretická část .....	3
3.1	Fyziologie mědi v lidském organismu.....	3
3.1.1	Kuproenzymy .....	3
3.1.2	Homeostáza mědi v organismu a její regulace.....	7
3.1.3	Homeostáza mědi v buňce .....	10
3.2	Patofyziologie mědi v lidském organismu.....	15
3.2.1	Wilsonova choroba .....	15
3.2.2	Menkesova choroba.....	25
3.2.3	Narušení homeostázy mědi a její důsledky.....	27
3.3	Chelatace mědi .....	32
3.4	Isoflavonoidy.....	33
4.	Experimentální část.....	35
4.1	Cíl práce .....	35
4.2	Materiál a pomůcky .....	35
4.2.1	Chemikálie .....	35
4.2.2	Přístroje a pomůcky .....	35
4.3	Příprava základních a pracovních roztoků .....	36
4.3.1	Příprava základních a pracovních roztoků pro zkoušku HEM.....	36
4.3.2	Příprava základních a pracovních roztoků pro zkoušky BCS.....	36
4.4	Metodický postup .....	37
4.4.1	Stanovení chelatace iontů mědi HEM metodou.....	37

4.4.2	Stanovení chelatace iontů mědi BCS.....	39
4.4.3	Statistická analýza .....	41
4.5	Výsledky .....	42
5.	Diskuze .....	49
6.	Závěr.....	52
7.	Literatura .....	53

## 1. Seznam zkratek

A $\beta$	Amyloid – $\beta$ peptid
AK	Aminokyselina
APP	Amyloidový prekurzorový protein
ATOX1	Cu – chaperon, antioxidační protein vázající měď
BCS	Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
CCO	Cytochrom c oxidasa
CCS	Cu - chaperon pro SOD
CP	Ceruloplasmin
CTR1	Selektivní transportér pro měď
DDD	Doporučená denní dávka
D-pen	D-penicilamin
GSH	Glutathion
HA	Hydroxylamin
HEM	Hematoxylin
Hcy	Homocystein
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě
MAO	Monoaminoxidasa
MD	Menkesova choroba (z angl. Menkes disease)
MT	Metalothionein
OHS	Syndrom okcipitálního rohu (z angl. Occipital Horn Syndrom)
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxid dismutasa
TGN	Trans-Golgiho síť (z angl. trans-Golgi network)
TTM	Tetrathiomolybdenan
WD	Wilsonova choroba (z angl. Wilson's disease)



## 2. Úvod

Měď je esenciální stopový prvek, který má zásadní roli v lidském organismu. Je součástí kuproenzymů účastnících se mnoha životně důležitých procesů, jako je buněčné dýchání, biosyntéza neurotransmiterů a tvorba pojivové tkáně. Hladiny mědi jsou pečlivě regulovány, protože narušení jejich homeostázy vede ke vzniku patologických stavů. Mezi nejznámější patří Wilsonova a Menkesova choroba. Nadbytek mědi je pro tělo vysoce toxický. Způsobuje poškození různých biomolekul díky nadměrné tvorbě reaktivních forem kyslíku, které naruší antioxidační ochranu těla. Oxidativní stres je součástí mnoha onemocnění zahrnujících rakovinu, kardiovaskulární choroby, diabetes, neurologická onemocnění, chronické záněty a další.

Isoflavonoidy jsou podtřídou všudypřítomných flavonoidů. Mají antivirové, protizánětlivé, antioxidační a protinádorové vlastnosti.

V současnosti je uplatnění chelátorů mědi v praxi omezeno zejména na léčbu Wilsonovy choroby, při které je hladina mědi zvýšena. Nadbytek mědi je odstraňován z těla vytvořením komplexů s D-penicilaminem nebo trientinem. Perspektivní možností pro terapii Alzheimerovy choroby může být kliočinol, který zastavuje agregaci a neurotoxicitu způsobenou komplexem  $A\beta$  - Cu. Další oblastí, ve které by se mohlo využít snížení hladin mědi pomocí chelátorů, je antineoplastická strategie.

Cílem mé práce je ověření Cu - chelatačních vlastností isoflavonoidů pomocí dvou metod *in vitro*. Experimentální část je založena na spektrofotometrickém měření, které je jednoduchou, rychlou a přesnou metodou, vhodnou pro stanovení chelatace iontů mědi pomocí dvou indikátorů – hematoxylinu a disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny. Výsledkem jednotlivých měření je množství mědi chelatované zkoušeným isoflavonoidem, které společně vytvářejí komplex – chelát v závislosti na použité koncentraci isoflavonoidu a iontů mědi za stanovených podmínek (pH, doba měření, použitá vlnová délka).

### 3. Teoretická část

#### 3.1 Fyziologie mědi v lidském organismu

Měď je po železe a zinku třetím nejhojněji se vyskytujícím stopovým prvkem v lidském organismu. Organismus dospělého člověka obsahuje průměrně 100 – 150 mg mědi (Angelova et al. 2011).

Ačkoli je měď za fyziologických podmínek nepostradatelná, vzhledem k jejím chemickým vlastnostem se může stát vysoce toxickým kovem. Měď v těle existuje ve dvou oxidačních stavech, jako redukováná  $\text{Cu}^+$  a oxidovaná  $\text{Cu}^{2+}$ . Jedinečná elektronová struktura mědi dovoluje, aby mohla sloužit jako kofaktor redoxních enzymatických reakcí, nezbytných pro normální růst a vývoj (Gupte a Mumper 2008, Tümer a Møller 2010).

##### 3.1.1 Kuproenzymy

Měď je potřebná pro rozmanité procesy v lidském organismu. Jako funkční složka kuproenzymů se účastní buněčného dýchání a tvorby tepla, regulace příjmu železa, transportu kyslíku, buněčné odpovědi na stres, antioxidační ochrany, biosyntézy melaninu, metabolismu dopaminu, vzniku pojivové tkáně a několika dalších procesů (Ding et al. 2011).

Přehled hlavních kuproenzymů s jejich biologickou aktivitou je uveden v následující tabulce (**Tab. 1**).

**TABULKA 1. PŘEHLED KUPROENZYMŮ.**

<b>KUPROENZYM</b>	<b>BIOLOGICKÁ AKTIVITA</b>
<i>Cytochrom c oxidasa</i>	Buněčné dýchání
<i>Superoxid dismutasa</i>	Zhášení volných radikálů
<i>Lysyl – monoaminoxidasa</i>	Zesíťování kolagenu a elastinu
<i>Ceruloplasmin</i>	Transport Cu a Fe
<i>Dopamin-<math>\beta</math>-monooxygenasa a monoaminoxidasa</i>	Biosyntéza neurotransmiterů
<i>Tyrosinasa</i>	Produkce melaninu
<i>Koagulační faktor fVIII</i>	Hemokoagulační kaskáda

*Upraveno podle: Tümer a Møller (2010)*

*Cytochrom c oxidasa* (CCO) je terminální enzym dýchacího řetězce mitochondrií. Katalyzuje přenos elektronů na molekulární kyslík a přispívá k tvorbě elektrochemického potenciálu, který je využit pro syntézu ATP (Lutsenko et al. 2010).

*Superoxid dismutasa* (SOD) funguje jako antioxidant. Katalyzuje přeměnu superoxidových radikálů, tj. volných radikálů, na peroxid vodíku, který může být následně redukován na vodu pomocí dalších antioxidačních enzymů. SOD obsahující Cu se vyskytuje ve dvou formách: 1) Cu/Zn SOD, která je součástí většiny buněk organismu, včetně erytrocytů, a 2) extracelulární SOD, která se nachází ve větším množství v plicích, v plazmě nalezneme hladiny nižší (Angelova 2011).

*Lysyl – monoaminoxidasase* účastní katalytické oxidace postranního řetězce AK lysinu při procesu zesíťování, který je důležitý pro vytvoření kolagenu a elastinu. Toto zesíťování je nezbytné pro formaci a přestavbu extracelulární matrix během tkáňového vývoje, pro udržení integrity a elasticity pojivové tkáně v srdci, krevních cévách a pro tvorbu kostí (Angelova et al. 2011, Lutsenko et al. 2010).

*Ceruloplasmin* (CP) je kuproenzym s feroxidázovou aktivitou, tj. oxiduje železnaté ionty na železité. Skládá se z 1046 aminokyselin. Strukturně se jedná o globulární protein, tvořený třemi jednotkami, které jsou důležité nejen pro katalytickou aktivitu ceruloplasminu, ale i pro jeho strukturní stabilitu. Ačkoli měď neovlivňuje sekreci ani syntézu ceruloplasminu, neschopnost včlenit tento kov během CP syntézy do apoceruloplasminu v játrech, vede k vytvoření nestabilní formy CP, která postrádá feroxidázovou aktivitu. Funkční CP je katalyzátorem i několika dalších reakcí. Má NO-oxidásovou a glutathion-peroxidásovou aktivitu. Protože je  $\text{Cu}^{2+}$  považována za méně toxickou pro organismus, Cu-oxidásová aktivita CP má důležitou roli v detoxifikaci mědi. Nízkovalentní formy redoxně aktivních kovů např.  $\text{Cu}^+$ , se chovají jako prooxidanty, které se účastní přenosu elektronu při redukčních reakcích, díky kterým vznikají potenciálně škodlivé radikály. Tato Cu-oxidásová aktivita CP udržuje  $\text{Cu}^+$  ionty v ustáleném stavu s ohledem na jejich prooxidační aktivitu a potlačuje vznik toxicity mědi způsobené akumulací  $\text{Cu}^+$ . CP je schopný oxidovat rozsáhlou skupinu organických substrátů, které zahrnují jak xenobiotické (organické aminy), tak i příslušné fyziologické substráty (biogenní aminy, včetně hormonů - adrenalinu a noradrenalinu, a neurotransmiterů – serotoninu a dopaminu). Ceruoplasmin váže 6 atomů mědi (**Obr. 1**). Vazebná místa jsou tvořena z aminokyselin (AK) cysteinu, methioninu a dvou histidinů. CP se nachází ve dvou isoformách – glykosylované a volné. První jmenovaná isoforma syntetizovaná jako glykofoftatidylinositol je membránově vázaná. Přesná funkce této isoformy není známá, ale mohla by se účastnit oxidace a mobilizace železa na hematoencefalické a hematotestikulární bariéře. Feroxidázová aktivita glykosylované isoformy CP je nezbytná pro uvolnění železa z hepatocytů a jeho následné navázání na transferin. Většina železa poté putuje do kostní dřeně, kde je tvořen hemoglobin, čímž se podílí na udržení homeostázy železa. Druhá isoforma CP je volná a jako hlavní přenašeč mědi váže 70 – 90% mědi v krevní plazmě. Vzniká v játrech, po uvolnění slouží jako zásobárna mědi pro tkáň. Celková regulace CP je velmi složitá. Hormon estradiol zvyšuje syntézu mnoha hepatických proteinů, včetně CP. Během těhotenství se koncentrace CP zvýší třikrát až čtyřikrát, při kojení je také vyšší. Zvýšené hladiny volného CP jsou spojené i s kardiovaskulárními chorobami, pravděpodobně odráží akutní zánětlivou povahu tohoto onemocnění. Hladiny CP byly zvýšeny i u různých typů rakoviny (lymfomu, rakoviny prsu a gastrointestinálního traktu), kde je CP označován za angiogenní stimulant využívaný rakovinnými buňkami pro tvorbu nových cév. Naopak nedostatek CP je označován jako

aceruloplasminemie. Jedná se o autozomálně recesivní poruchu způsobenou mutacemi ceruloplasminového genu. U pacientů vzniká masivní kumulace železa v různých tkáních včetně jater, pankreatu a mozku. Dlouhodobá akumulace železa vede ke vzniku diabetu, degeneraci retiny a neurologickým symptomům, které jsou vysvětlovány toxicitou železa a následným poškozením tkání volnými radikály (Collins et al. 2010, Gupte a Mumper 2009, Hellman a Gitlin 2002, Lutsenko et al. 2010, Stoj a Kosman 2003, Vaschenko a MacGillivray 2013).



**OBRAZEK 1. STRUKTURA CERULOPLASMINU.**

*Barevné kuličky zobrazují šest vazebných míst pro atomy mědi.*

*Převzato z: Bento et al. (2006)*

*Dopamin -  $\beta$  - monoxygenasa a monoaminoxidasa (MAO)* jsou nezbytné pro správnou funkci mozku a nervového systému. Dopamin –  $\beta$  – monooxidasa katalyzuje přeměnu neurotransmiteru dopaminu hydroxylací na noradrenalin. Monoaminoxidasa se účastní metabolismu neurotransmiterů noradrenalinu, adrenalinu a dopaminu. Navíc rozkládá neurotransmitter serotonin (Angelova et al. 2011).

Kuroenzym *tyrosinasa* je důležitý pro tvorbu melaninového pigmentu. Melanin je produkovánv melanocytech. Ovlivňuje pigmentaci vlasů, pokožky a očí (Angelova et al. 2011).

Posledním kuproenzymem, o kterém se zmíním, je *antihemofilický faktor fVIII*, který má výraznou strukturní homologii s CP, ale liší se funkcí a vlastnostmi. Faktor fVIII je součástí vnitřní cesty hemokoagulační kaskády (Lutsenko et al. 2010).

### 3.1.2 Homeostáza mědi v organismu a její regulace

Hlavním zdrojem mědi pro lidský organismus je potrava (2 – 5 mg denně). Absorpce mědi probíhá v žaludku a duodenu. Poté je měď transportována skrz portální žílu do jater, která jsou orgánem zodpovědným za udržování homeostázy mědi v lidském organismu. Její biodostupnost z potravy je okolo 65-70 % a odráží faktory zahrnující chemickou formu mědi, interakce s ostatními kovy a složkami potravy. Biologický poločas mědi přijaté z potravy je 13 až 33 dní. Vyloučení mědi probíhá převážně hepatobiliární cestou (Ala et al. 2007, Barceloux 1999).

V následující tabulce (**Tab. 2**) jsou uvedeny průměrné koncentrace mědi v přijímané potravě ( $\mu\text{g/g}$ ). Vysoký obsah mědi nalezneme v houbách, sušeném ovoci, luštěninách, celozrnných produktech, burákovém másle, oříškách a mořských plodech. Doporučená denní dávka (DDD) pro dospělé je 0,9 mg/den. Potřeba mědi je během těhotenství a laktace vyšší, pokud jí nelze dosáhnout přijímanou dietou, ženy mohou využít mnoho doplňků stravy obsahující měď (Barceloux 1999, Collins et al. 2010, Gupte a Mumper 2009).

**TABULKA 2. POTRAVINY OBSAHUJÍCÍ MĚĎ ( $\mu\text{g/g}$ ).**

<i>Mořské ryby</i>	2,0 – 3,0	<i>Ovoce</i>	0,4 – 15,0
<i>Sladkovodní ryby</i>	0,3 – 3,0	<i>Zelenina</i>	0,3 – 3,0
<i>Drůbež</i>	0,5 – 3,0	<i>Luštěniny</i>	3,0 – 7,0
<i>Játra</i>	4,6 – 6,7	<i>Brambory</i>	2,1
<i>Oříšky</i>	6,0 – 37,0	<i>Bílá mouka</i>	0,6
<i>Obilky a semena</i>	3,0 – 8,0	<i>Klíčky</i>	6,0
<i>Otruby</i>	15,0	<i>Sladká voda</i>	0,001-0,0001

*Upraveno podle: Barceloux (1999)*

Měď přijímaná potravou musí být redukována (z  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$ ), aby mohla být transportována přes apikální membránu enterocytů, odkud putuje do intersticiální tekutiny a následně do portální krve. V tomto vícestupňovém procesu jsou využívány nescifické transportery pro kovy, ATP7A a CTR1 (Collins et al. 2010, Tümer a Møller 2010).

Z krve je měď transportována převážně do jater, v menším množství do ledvin a ostatních tkání včetně mozku. Játra jsou hlavní zásobárnou mědi v organismu a podílejí se na udržování její homeostázy. Měď navázaná na CP je z jater transportována do krve nebo do žluče. Oba procesy jsou kontrolovány proteinovým transportérem ATP7B. Hlavní cestou exkrece mědi je žluč (okolo 98 %), ztráta močí je zanedbatelná (Tümer a Møller 2010, Wijmenga a Klomp 2004).

Volná měď se v organismu prakticky nevyskytuje, její koncentrace je odhadována na  $10^{-13}$  mol/l v krvi. Zde je měď navázaná převážně na CP, albumin a histidin. CP je hlavním proteinem transportujícím měď v krvi. Množství mědi vázané na albumin a na aminokyseliny je v rovnováze. Tyto dvě formy zřejmě vytvářejí pufovací systém, který zabezpečuje nejen dostupnost mědi pro tkáň, ale i ochranu před jejími toxickými účinky (Tümer a Møller 2010).

Intracelulární transport mědi probíhá pomocí glutathionu (GSH) nebo malých cytosolických proteinů, které jsou známé jako chaperony – ATOX1, COX17 a CCS (viz. další kapitola). GSH vytváří s ionty mědi komplex, který slouží jako prostředník pro doručení mědi k metalothioneinům. Ty fungují jako složky zabraňující vzniku oxidačního stresu uvnitř buňky. Jejich hlavním úkolem je detoxikace nadbytečných kovových iontů (Gupte a Mumper 2009).

Klíčové proteiny, podílející se na homeostáze mědi v periferních tkáních včetně mozku, můžeme rozdělit do tří hlavních skupin. 1) Měď vycytávající transportery, které přenášejí měď do cytosolu. 2) Chaperony usnadňující distribuci mědi na intracelulární cílové proteiny. 3) Cu-transportující ATPasy, které buňky zbavují nadbytku mědi jeho vyloučením z intestinálních nebo jaterních buněk (Lutsenko et al. 2010, Wang a Guo 2006).

Porušením homeostázy mědi vzniká její nadbytek nebo nedostatek v organismu. Přehled jednotlivých zdravotních stavů, které charakterizují nízké nebo zvýšené koncentrace mědi, jsou uvedeny v následující tabulce (**Tab. 3**).

**TABULKA 3. PROJEVY NEDOSATKU NEBO NADBYTKU MĚDI V ORGANISMU.**

<b>SNÍŽENÁ KONCENTRACE Cu</b>	<b>ZVÝŠENÁ KONCENTRACE Cu</b>
Menkesova choroba	Cholestáza
Parkinsonova choroba	Zvýšená hladina ceruloplasminu (zánět, nádory, jaterní cirhóza, lymfom)
Parenterální výživa	Wilsonova choroba
Ztráta proteinů (nefrotický syndrom, exsudativní enteropatie)	Hyperkupremie – akutní a chronické infekce a malignity (leukemie, Hodgkinova choroba, infarkt myokardu)
Poškozená střevní resorpce	Užívání kontraceptiv nebo estrogenů
Kardiovaskulární onemocnění	
Zvýšená hladina LDL a snížená HDL	

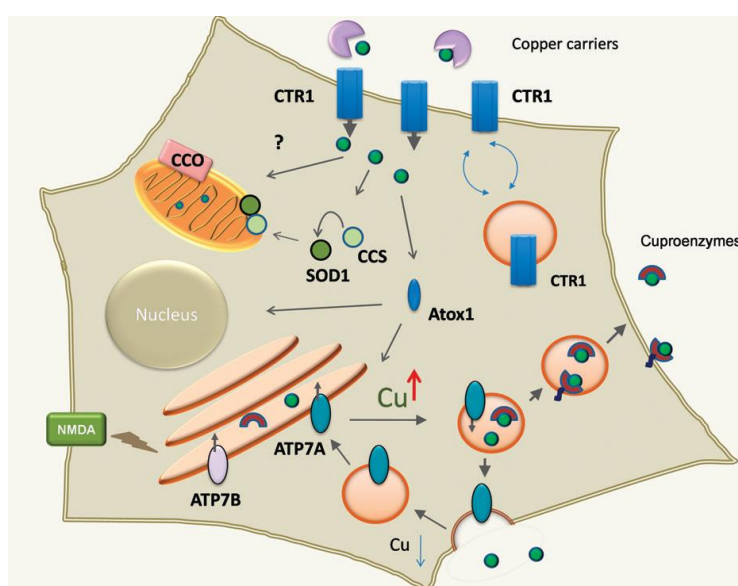
*Upraveno podle: Angelova et al. (2011)*



### 3.1.3 Homeostáza mědi v buňce

#### *Vstup mědi do buňky*

Měď vstupuje do hepatocytu přes plazmatickou membránu pomocí selektivního transportéru pro měď (CTR1)(Obr. 2). Tento přestup mědi není závislý na dodávce energie nebo ko-transportu jiného iontu. Funkce CTR1 je esenciální pro růst a vývoj organismu. U savců odpovídá množství proteinu CTR1 hladině mRNA, s vyšším výskytem v plexus choroideus a endoteliálních buňkách hladké svaloviny cév (Lutsenko et al. 2010).

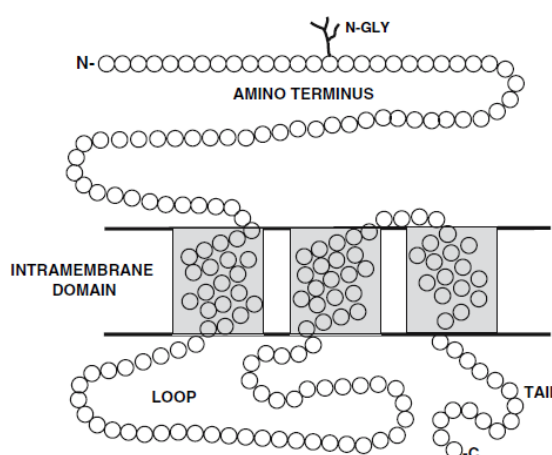


**OBRÁZEK 2.** DISTRIBUCE MĚDI UVNITŘ BUŇKY.

*Měď (zelené kuličky) vstupuje do buňky přes transportér CTR1, který je zabudován v plazmatické membráně. Uvnitř buňky je měď vázána na cytosolické chaperony CCS a ATOX1, které usnadňují její doručení k SOD1 nebo Cu-ATPasam ATP7A a ATP7B, které přenášejí měď do lumen trans-Golgiho sítě (TGN), kde je zabudována do kuproenzymů.*

*Převzato z: Lutsenko et al. (2010)*

Protein CTR1 je poskládán ze 190 AK zbytků (**Obr. 3**). Struktura je tvořena čtyřmi doménami. První doménou je glykosylovaný N – konec skládající se z 66 AK zbytků, které jsou orientovány extracelulárně. Tato glykosylace chrání CTR1 proti proteolýze. Druhá doména je tvořena třemi transmembránovými segmenty. Mezi prvním a druhým transmembránovým segmentem se nachází třetí doména - intramembránová smyčka, která je poskládána ze 46 AK zbytků. Poslední, čtvrtou doménou je relativně krátký C - konec, který se skládá pouze z 15 AK zbytků a je zakončený sekvencí His – Cys - His. V transmembránové doméně existuje několik těsných vazebných míst pro měď, které pravděpodobně vytvářejí určitý typ póru, kterým může měď vstupovat dovnitř buňky (Eises a Kaplan 2005, Maryon et al. 2006).



### ***OBRAZEK 3. STRUKTURA PROTEINU CTR1.***

*Na obrázku jsou zobrazeny jednotlivé domény CTR1. N – konec je na 15 AK glykosylován.*

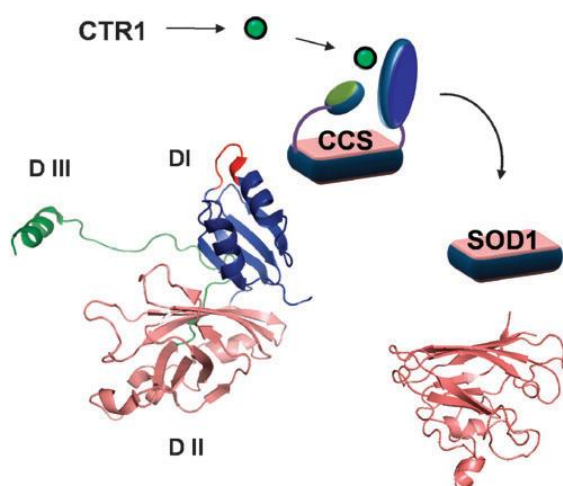
*Převzato z: Maryon et al. (2007)*

Mechanismus transportu mědi funguje na principu póru.  $\text{Cu}^+$  je dodána transportním proteinem (CP nebo albuminem) k extracelulární N – koncové doméně CTR1, která je oblastí bohatou na methioninové a histidinové zbytky. Po navázání  $\text{Cu}^+$  dochází ke konformační změně v oblasti intracelulární smyčky a otevře se transmembránový pór. C – konec a intracelulární smyčka, interagují se zatím neidentifikovanými akceptory mědi, které zajišťují distribuci  $\text{Cu}^+$  uvnitř buňky. Ačkoli detailní mechanismus, kterým CTR1 transportuje  $\text{Cu}^+$  zůstává nejasný, došlo k určitým pokrokům. Bylo dokázáno, že transport  $\text{Cu}^+$  je silně inhibován  $\text{Ag}^+$ , zatímco multivalentní ionty kovů jako jsou  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  nebo  $\text{Cd}^{2+}$  tento transport neinhibovaly, což naznačuje, že je CTR1 specifický pro monovalentní ionty (Maryon et al. 2007, Wang a Guo 2006).

### ***Transport mědi uvnitř buňky***

Po vstupu do buňky je měď v cytoplazmě vázána malými proteiny – metalothioneinem (MT) a glutathionem (GSH) nebo specifickými proteinovými přenašeči pro měď - chaperony, čímž je buňka chráněna před toxickými účinky volných iontů. Tři známé chaperony CCS, ATOX1 a COX17 váží  $\text{Cu}^+$  a přenášejí do různých částí buňky. Tak je zajištěno její efektivní doručení k Cu-dependentním enzymům (Tümer a Møller 2010).

CCS (Cu – chaperon pro SOD) má dvě hlavní funkce: 1) umožňuje vytvoření nezbytné disulfidické vazby na svém cílovém proteinu – superoxidodismutase1 (SOD1) a 2) přenáší  $\text{Cu}^+$  na katalytické místo SOD1 (**Obr. 4**). CCS je hydrofilní protein, který se nachází především v cytosolu. Struktura se skládá z 274 AA zbytků, které jsou poskládány do tří různých domén. Doména I obsahuje vazebné místo pro  $\text{Cu}^+$  a je strukturně stejná s chaperonem ATOX1. Doména II je podobná SOD1, zodpovídá za heterodimerizaci CCS a SOD1 během přenosu  $\text{Cu}^+$ . Doména III je malá s rozšířenou smyčkou a je nutná pro obě funkce CCS. Množství CCS v buňce je ovlivněno hladinou mědi. Zvýšená hladina CCS je jednou z nejvýraznějších reakcí na snížené množství mědi v buňce. Malá frakce CCS se nachází i v mitochondriích a peroxisomech (Lutsenko et al. 2010, Prohaska a Gybina 2004).



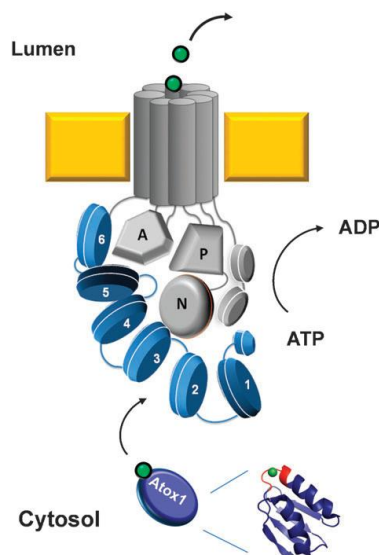
### ***OBRÁZEK 4. CCS CYTOSOLICKÝ CHAPERON MĚDI.***

*CCS přenáší měď v cytosolu na katalytické místo SOD1. Na obrázku jsou zobrazeny jednotlivé strukturní domény (D I – D III).*

*Převzato z: Lutsenko et al. (2010)*

COX17 má důležitou úlohu v přenosu  $\text{Cu}^+$  do mitochondrií, kde je pomocí dalších membránových proteinů (COX11, SCO1 a SCO2) následně zabudována do CCO. COX17 je malý protein strukturou podobný vlásence, složený z 62 AK zbytků. Má jedno vazebné místo pro  $\text{Cu}^+$ , které je tvořeno po sobě jdoucími zbytky AK cysteinu (Lutsenko et al. 2010, Prohaska a Gybina 2004).

ATOX1 (**Obr. 5**) je malý cytosolický protein, složený z 68 AK zbytků. Jeho struktura je poskládána do kompaktní ferredoxinové struktury. Po vstupu do buňky se  $\text{Cu}^+$  naváže na povrch vystavené smyčky ATOX1, která spojuje první  $\beta$ -vlákno a první  $\alpha$ -vlákno. Smyčka se skládá ze dvou cysteinů koordinujících měď, zatímco methionin je schován v hydrofobním jádru ATOX1 a stabilizuje proteinovou strukturu. Po navázání  $\text{Cu}^+$  na ATOX1 nedochází ke změně proteinové struktury, stane se pouze více rigidní. ATOX1 přenáší navázanou  $\text{Cu}^+$  k ATPasám (ATP7A a ATP7B) do Golgiho aparátu, kde přímo interaguje s N – koncem Cu-ATPas. Nadbytek mědi stimuluje translokaci ATP7B z Golgiho sítě do kanalikulární membrány hepatocytů a usnadňuje vyloučení mědi žlučí. Kromě přenašeče má ATOX1 i funkci antioxidantu a regulátoru transkripce při růstu a proliferaci buňky. ATOX1 funguje jako buněčný sensor, který kontroluje správný přenos  $\text{Cu}^+$  sekrečními drahami buněk (Collins et al. 2010, Lutsenko et al. 2010, Prohaska a Gybina 2004).



#### **OBRÁZEK 5. CHAPERON ATOX1.**

*ATOX1 přenáší měď (zelené kuličky) na N - konec Cu-transportujících ATPas ATP7A a ATP7B. Tento transport využívá pro přenos mědi energii z hydrolyzy ATP.*

*Převzato z: Lutsenko et al. (2010)*

### ***Odstranění mědi z buňky***

Za eliminaci mědi z buňky jsou zodpovědné dvě homologní, transmembránové Cu–ATPasy ATP7A a ATP7B, které patří do veliké rodiny ATPas P-typu. Označení „P-typ“ si tato rodina ATPas zasloužila díky tvorbě fosforylovaného meziprojektu během transportu kationtů přes membránu. ATP7A a ATP7B mají v buňce následující dvě funkce: 1) transportují  $\text{Cu}^+$  ke kuproenzymům a 2) zajišťují eflux mědi z buněk do portální krve. K transportu  $\text{Cu}^+$  z cytosolu do trans – Golgiho sítě, kde je začleněna jako kofaktor různých kuproenzymů (např. CP), využívají energii z hydrolýzy ATP. Tento proces zahrnuje domény specifické pro navázání a hydrolýzu ATP, které jsou podobné u všech ATPas P-typu. ATPasy jsou tvořeny těmito doménami: N – koncová doména (6 vazebných míst pro  $\text{Cu}^+$ ); nukleotid vázající doména, která defosforyluje ATP; P – doména s neměnným Asp (místo katalytické fosforylace); A – doména (aktivační doména, regulující konformační přechody) a C – konec, který je potřebný pro stabilitu a transport  $\text{Cu}^+$ . Přenos a translokace mědi dále vyžaduje specifické motivy (obsahují zbytky AK Cys) a struktury pro rozpoznání, navázání a přesun  $\text{Cu}^+$  přes membránu (Lutsenko et al. 2010, Tümer a Møller 2010).

ATP7A nalezneme ve většině orgánů s výjimkou jater, kde se nachází ATP7B. Proto je měď včleněna do CP pomocí ATP7B v hepatocytech, zatímco ATP7A transportuje  $\text{Cu}^+$  k ostatním buňkám tkání, které potřebují měď. S ohledem na lokalizaci jednotlivých ATPas si můžeme odůvodnit, proč je Menkesovo onemocnění (MD) systémovou chorobou zatímco Wilsonova choroba (WD) je charakterizována především poškozením jater. MD je onemocnění metabolismu mědi, který je způsoben poškozenou absorpcí mědi ve střevech. Dysfunkce ATP7A vede k selhání přenosu  $\text{Cu}^+$  ze střevních buněk a způsobuje nedostatek mědi v krevním oběhu. WD vede naopak k akumulaci mědi v játrech, díky poškození biliární exkrece  $\text{Cu}^+$  (Tümer a Møller 2010, Wang a Guo 2006).

Obě ATPasy umí rychle reagovat na změněné hladiny mědi v buňce. Pokud se intracelulární hladiny  $\text{Cu}^+$  zvýší, ATP7A je rozptýlena v malých veziklech od TGN, které směřují k basolaterální (sinusoidální) membráně hepatocytů. Oproti tomu, ATP7B je přemístěna z trans-Golgiho sítě ve větších veziklech směrem k apikální (kanálkové) membráně hepatocytů. Tato na mědi závislá relokace nevyžaduje de novo syntézu proteinů a je reverzibilní, protože následné vyčerpání  $\text{Cu}^+$  vede k rychlému navrácení transportérů zpět (Lutsenko et al. 2010, Wijmenga a Klomp 2004).

## **3.2 Patofyziologie mědi v lidském organismu**

### **3.2.1 Wilsonova choroba**

Wilsonova choroba (WD), která je známá také jako hepatolentikulární degenerace, byla poprvé popsána americkým neurologem Kinnearem Wilsonem v roce 1912.

Jedná se o vzácné dědičné autozomálně recesivní onemocnění jaterního metabolismu mědi. Příčina onemocnění byla odhalena v roce 1993. Tehdy byl objeven abnormální gen ATP7B zodpovědný za Wilsonovu chorobu, lokalizovaný na chromosomu 13. Jak bylo uvedeno výše, hlavní fyziologická úloha ATP7B je v játrech, kde slouží jako jaterní transportér mědi z cytosolu do Golgiho aparátu. Zde je měď postranslačně začleňována do kuproenzymů, včetně CP. Dochází ke snížené exkreci mědi žlučí, což má za následek akumulaci mědi v játrech a jejich poškození. Nakonec je měď uvolněna do krevního řečiště a ukládána v extrahepatálních orgánech, zejména mozku, ledvinách a rohovce. Snížená hladina CP v krvi je jedním z diagnostických znaků tohoto onemocnění (Burkhead et al. 2011, Roberts a Schilsky 2008).

#### ***3.2.1.1 Klinický obraz onemocnění***

Wilsonova choroba se může projevit různými klinickými stavy. Nejčastěji se jedná o onemocnění jater a neuropsychiatrickou poruchou. Žádný z klinických příznaků není pro onemocnění typický a nepomáhá tedy ke snadné diagnóze. Jedním z nejvíce charakteristických rysů Wilsonovy choroby je, že žádný ze dvou pacientů, i kdyby se jednalo o rodinné příslušníky, nemá zcela stejný projev onemocnění. Se zvyšujícím se povědomím o WD, jsou pacienti diagnostikováni dříve a pozdní následky onemocnění, jako jsou Kayserovy-Fleischerovy prstence nebo závažné neurologické symptomy se objevují méně často. Díky včasnému zahájení léčby jim totiž dokážeme předcházet (Ferenci 2003).

Wilsonova choroba se vyskytuje po celém světě s průměrnou prevalencí asi 30 postižených jedinců na milion obyvatel. Počátek klinických projevů onemocnění je obvykle mezi 5. až 35. rokem života. Ale WD je stále častěji diagnostikována i u dětí mladších pěti let s atypickými nálezy u dětí mladších dvou let, cirhózou u tříletých a akutním jaterním selháním u pětiletých dětí. Mezi nejstarší nově diagnostikované pacienty s potvrzenou WD můžeme zařadit i dospělé starší 70 let. Přestože je horní

hranice věku pro zvažení WD obecně méně než 40 let, pokud se u starších jedinců objeví neurologické nebo psychiatrické symptomy a histologické nebo biochemické nálezy, které naznačují tuto poruchu, je důležité provést další vyšetření (Roberts a Schilsky 2008).

Spektrum onemocnění WD můžeme rozdělit do 4 základních skupin klinických příznaků – hepatické, neurologické a psychiatrické a oční. V praxi se běžně setkáváme s jejich vzájemnými kombinacemi (**Tab. 4**).

**TABULKA 4. KLINICKÉ PŘÍZNAKY WILSONOVY CHOROBY.**

<b>FORMA</b>	<b>PŘÍZNAKY ONEMOCNĚNÍ</b>
JATERNÍ	<i>Asymptomatické hepatomegalie</i> <i>Izolovaná splenomegalie</i> <i>Trvale zvýšené sérové aminotransferázy</i> <i>Jaterní steatóza</i> <i>Akutní hepatitida</i> <i>Cirhóza – kompenzovaná nebo dekompenzovaná</i> <i>Akutní selhání jater</i>
NEUROLOGICKÁ	<i>Pohybové poruchy – třes, mimovolní pohyby</i> <i>Dysautonomie</i> <i>Migrenózní bolesti hlavy</i> <i>Insomnie</i> <i>Záchvaty</i> <i>Slintání, dysartrie</i>
PSYCHIATRICKÁ	<i>Deprese</i> <i>Neurotické chování</i> <i>Změny osobnosti</i> <i>Psychózy</i>
OČNÍ	<i>Kayserovy-Fleischerovy prstence</i> <i>Slunečnicové katarakty</i>
NESPECIFICKÁ	<i>Kožní příznaky – xeróza, hyperpigmentace, vitiligo</i> <i>Renální abnormality – aminoacidurie a nefrolithiasa</i> <i>Kardiovaskulární příznaky – kardiomyopatie, arytmie</i> <i>Pankreatitida</i> <i>Nepravidelná menstruace, neplodnost, opakované potraty</i> <i>Skeletální abnormality – předčasná osteoporóza a artritida</i>

*Upraveno podle: Roberts a Schilsky (2008)*



### ***Jaterní forma Wilsonovy choroby***

U většiny pacientů s WD, bez ohledu na jejich klinické příznaky, můžeme nalézt určitý stupeň jaterního poškození. Nejčastější věk, kdy se toto poškození projeví, je mezi 8. až 18. rokem. Jaterní forma WD se může podobat všem typům běžného jaterního onemocnění, včetně akutní nebo chronické hepatitidy, vážného jaterního selhání a cirhózy (Ferenci 2003).

Typ jaterního onemocnění může být vysoce variabilní. Od asymptomatických stádií s biochemickými abnormalitami, které jsou detekovatelné pouze na biochemické úrovni až k akutnímu jaternímu selhání (Roberts a Schilsky 2008).

U asymptomatické formy se nejčastěji setkáváme s abnormálními hladinami aminotransferáz v séru nebo se splenomegalií. Důvodem je klinicky nepatrná cirhóza jater s portální hypertenzí. V počátečních stádiích je hromadění mědi detekovatelné pouze imunohistochemicky. Tato akumulace je spojená s makrosteatózou, mikrosteatózou a ukládáním glykogenu v hepatocytech, které však můžeme pozorovat i u dalších poruch, např. u nealkoholické steatohepatitidy (Ala et al. 2007).

U pacientů v pokročilejších stádiích se můžeme setkat s několika dalšími typy klinických obrazů (Ala et al. 2007, Ferenci 2003, Roberts a Schilsky 2008).

*Akutní hepatitida* – k nerozeznání od ostatních akutních forem (virových nebo toxických) jaterního onemocnění. Velmi rychle může dojít ke zhoršení, které se podobá fulminantnímu jaternímu selhání.

*Fulminantní jaterní selhání* – má rychlý rozvoj, nastává po uvolnění velkého množství mědi uložené v nekrotických hepatocytech, následované závažnou hemolytickou anémií. U pacientů převažuje apoptóza parenchymálních buněk, nekróza a kolaps, často na pozadí cirhózy jater. Běžná je koagulopatie neodpovídající na parenterální podání vitamínu K. Až 12 % těchto pacientů je zařazeno na čekací listinu pro transplantaci jater. Rychlé určení diagnózy bývá obtížné.

*Chronická hepatitida a cirhóza* – klinické znaky zahrnují névus araneus (pavoučkový névus), splenomegalií, portální hypertenzi, ascites a ikterus. Bez léčby dochází u pacientů k progresivnímu zhoršení až jaternímu selhání.

*Hepatoceulární karcinom* – může se objevit společně s cirhózou a chronickým zánětem jater u dlouhodobě léčených pacientů. Vzácná forma jaterního onemocnění.

*Autoimunitní hepatitida* – pokud se objevila u dětských nebo dospělých pacientů, kteří nereagovali na terapii, mělo by být pečlivě posouzeno, zda se nejedná o WD. Zvýšené imunoglobuliny v séru a detekovatelné nespecifické protilátky mohou být přítomné jak u autoimunitní hepatitidy, tak i u WD.

### ***Neurologická a psychiatrická forma Wilsonovy choroby***

Neurologické symptomy se objevují nejčastěji u dospívajících zhruba dvacetiletých pacientů, ale jsou zdokumentované případy i starších pacientů okolo padesáti let. Příčinou této formy WD je akumulace mědi v mozku a nervové soustavě. Onemocnění se nejprve projevuje pouze drobnými náznaky u pediatrických pacientů - změny chování, zhoršení ve škole, neschopnost provést aktivity vyžadující dobrou koordinaci oko-ruka. Charakteristickým znakem neurologické formy WD je neustále se prohlubující porucha pohybu (dysartrie, dysfágie, tremor, rigidita) označovaná jako juvenilní forma Parkinsonovy choroby. Může dojít ke zhoršení rukopisu a zmenšení písmen (mikrografie) podobně jako u Parkinsonovy choroby. Dalšími projevy jsou ztráta motorické koordinace, slintání, dystonie a spasticita. Nebezpečí představuje pseudobulbární syndrom s poruchou polykání a rizikem udušení. Pacienti s neurologickou formou mohou mít i jaterní cirhózu, ale častěji jsou bez symptomů jaterního onemocnění (Ala et al. 2007, Ferenci 2003, Oder et al. 1991, Roberts a Schilsky 2008).

Psychiatrická forma WD se projevuje migrénou, bolestí hlavy, častou podrážděností a nespavostí. Spolu se změnami osobnosti a chování se objevuje deprese, anxieta a emoční labilita, zhoršení soustředění a schizofrenie. Pokud není tato forma diagnostikována a léčena včas, nezadržitelně postupuje a končí fatálně (Ala et al. 2007, Goodman et al. 2005).

### ***Oční forma Wilsonovy choroby***

Kayserovy-Fleischerovy prstence představují ukládání zrnitých depozit mědi v Descemetově membráně rohovky. Nejvíce patrné jsou na periferii rohovky. Mohou být viditelné běžným okem jako zlatohnědé prstence (**Obr. 6**). Pro jejich potvrzení je nezbytné vyšetření štěrbinovou lampou. Prstence nejsou pro Wilsonovu chorobu zcela specifické. Mohou být přítomny i u pacientů s chronickou cholestatickou hepatitidou nebo u dětí s neonatální cholestázou (Ala et al. 2007, Roberts a Schilsky 2008).



#### ***OBRÁZEK 6. KAYSEROVY-FLEISCHEROVY PRSTENCE.***

*Na periferii rohovky jsou patrné zlatohnědé prstence, které jsou tvořeny depozity mědi v Descemetově membráně.*

*Převzato z: Ala et al. (2007)*

Slunečnicové katarakty jsou mnohobarevné skvrny, které představují depozita mědi v rohovce. Jsou viditelné pouze při vyšetření štěrbinovou lampou. Nezhoršují vidění. Se zahájením léčby nebo po transplantaci jater postupně mizí stejně jako Kayserovy-Fleischerovy prstence. Vypovídají tak o compliance pacienta (Ala et al. 2007, Roberts a Schilsky 2008).

### 3.2.1.2 Diagnostika

Ke stanovení diagnózy WD neexistuje pouze jediný test. Symptomy jsou často nespecifické a onemocnění ovlivňuje mnoho odlišných orgánů, což může vést k záměně WD s jinými chorobami (Ala et al. 2007).

Pro usnadnění diagnostiky WD jsou v praxi využívána 3 základní kritéria - cirhóza, neurologické příznaky a Kayserovy-Fleischerovy prstence. Nicméně asi u poloviny pacientů s příznaky jaterního onemocnění, nejsou přítomné ani dvě z těchto tří kritérií, a proto představují složitější případy pro stanovení diagnózy. Stejně jako u jiných jaterních onemocnění mohou pacienti vyhledat lékařskou péči s poměrně mírnými klinickými příznaky (Ala et al. 2007, Ferenci et al. 2003, Roberts a Schilsky 2008).

Díky stále rozvinutějšímu oboru molekulární diagnostiky dokážeme určit vzor holotypů nebo polymorfismů DNA v okolí ATP7B. To je užitečné pro identifikaci nejbližších příbuzných u nově diagnostikovaných pacientů nebo k přímému vyšetření specifických mutací ATP7B typických pro WD na obou alelách 13. chromosomu (Roberts a Schilsky 2008).

Ke zjednodušení diagnostických postupů a nasazení správné léčby byly vytvořeny aktuální „guideliny“ se specifickými doporučeními, které shrnují předchozí zkušenosti a výzkumné práce pro péči o pediatrické a dospělé pacienty s WD (Roberts a Schilsky 2008).

Diagnostika je obvykle provedena na základě klinických nálezů a laboratorních abnormalit (**Tab. 5**).

**TABULKA 5. PŘEHLED TESTŮ POUŽÍVANÝCH KE STANOVENÍ DIAGNÓZY WD.**

TEST	TYPICKÝ NÁLEZ	NORMÁLNÍ HODNOTY
Sérový CP	nižší než 0,2 g/l	rozmezí 0,2 – 0,5 g/l
Stanovení mědi v moči (známá jako „volná“ měď, nevázaná na CP)	100 µg/24 hod	40 µg/24 hod
Obsah mědi v játrech	250 µg/g suché hmotnosti	< 55 µg/g suché hmotnosti

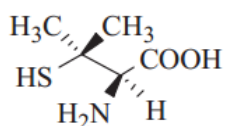
Převzato z: Ferenci (2003)

### 3.2.1.3 *Terapie*

Z hlediska terapie můžeme pacienty rozdělit do tří skupin: 1) Symptomatictí pacienti s jaterní nebo neurologickou formou WD. Zde se snažíme ke stabilizování nebo zmírnění jejich symptomů. 2) Pro skupinu pacientů, kteří překonali akutní fázi a nyní se nacházejí v klidovém stádiu onemocnění, je vhodná udržovací terapie. 3) Skupina nesymptomatických pacientů, tvořená především sourozenci nebo dětmi pacientů, kteří byli identifikováni při rodinném screeningu. U druhé a třetí skupiny pacientů usilujeme o prevenci vzniku symptomů nebo předcházíme jejich návratu (Schilsky 2001).

WD byla progresivním a fatálním onemocněním až do roku 1951, kdy byl intramuskulárně podán dimerkaprol. O několik let později, v roce 1956, John Walsh představil první perorálně podávaný chelátor mědi D-penicilamin (D-pen) a způsobil převrat v terapii. Pro pacienty, kteří léčbu D-pen netolerovali, byl v roce 1969 do praxe zaveden trientin, jako alternativa s nižším výskytem nežádoucích účinků. Poslední dva jmenované chelátory jsou stále základem chelatační léčby u WD. Tetrathiomolybdenan (TTM) je dalším chelátorem, který může najít své místo u pacientů, kterým nevyhovuje tradičnější léčba. Pro kombinační a udržovací terapii je vyhrazen zinek (Ala et al. 2007, Sarkar 1999, Roberts a Schilsky 2008).

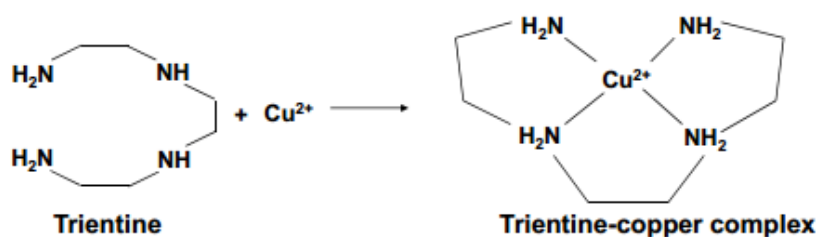
Struktura ***D-penicilaminu*** je tvořena z cysteinu, který je substituován dvěma methylovými skupinami, tedy jako  $\beta,\beta$ -dimethylcystein (**Obr. 7**). Pro chelataci je nezbytná thiolová skupina. Po navázání mědi a vytvoření stabilního komplexu je následně vyloučen močí. D-pen může indukovat účinek metalothioneinu, který funguje jako endogenní chelátor kovů. Účastní se procesu zesítnění kolagenu. Jeho imunosupresivní účinky jsou využity v terapii revmatoidní artritidy. Terapie D-pen je spojena s mnoha nežádoucími účinky. Některé z nich (toxicita kostní dřevě, proteinurie, anafylaxe) vedou k okamžitému přerušování léčby (Ala et al. 2007, Ding et al. 2010, Roberts a Schilsky 2008, Ferenci 2004).



**OBRÁZEK 7. STRUKTURA D-PENICILAMINU.**

Převzato z: Ding et al. (2011)

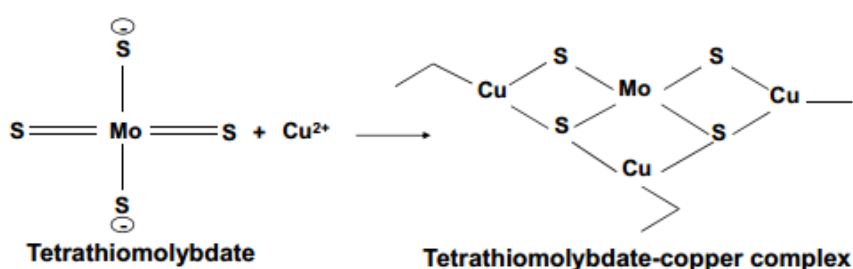
**Trientin** neboli 2,2,2-triethylentetraamin je tvořen polyaminovým uspořádáním, díky kterému je měď chelátována a vytváří stabilní komplex se čtyřmi skupinami dusíku (**Obr. 8**). Podobně jako D-pen podporuje vylučování mědi ledvinami, které však klesá rychleji. Trientin chelatuje nejen ionty mědi, ale i železa. Proto bychom se měli vyhnout jejich společnému podávání, které může vyvolat sideroplastickou anémií (Ala et al. 2007, Ferenci 2003, Roberts a Schilsky 2008).



**OBRÁZEK 8. TRIENTIN A TVORBA CHELATAČNÍHO KOMPLEXU.**

*Převzato z: Kodama et al. (2012)*

**Tetrathiomolybdenan** (TTM) je novou perspektivní látkou ze skupiny chelátorů používaných pro léčbu pacientů s WD. Při reakci s mědí vytváří komplexy díky Mo-S-Cu klastrům (**Obr. 9**). Působí dvěma mechanismy. Pokud je podán s jídlem, vytváří komplex s mědí pocházející z potravy, který je nevstřebatelný. Jestliže je podán mezi jídly, léčivo je vstřebáno a vytváří komplexy s mědí a albuminem v krvi, které jsou následně metabolizovány játry a vyloučeny žlučí. Je vhodný pro zahájení léčby u pacientů s neurologickou formou onemocnění (Ala et al. 2007, Ding et al.).



**OBRÁZEK 9. TETRATHIOMOLYBDENÁT A TVORBA CHELATAČNÍHO KOMPLEXU.**

*Převzato z: Kodama et al. (2012)*

Jednotlivá léčiva spolu se základními informacemi a nežádoucími účinky jsou uvedeny v následující tabulce (**Tab. 6**).

**TABULKA 6. FARMAKOLOGICKÁ TERAPIE WILSONOVY CHOROBY.**

LÉČIVO	MECHANISMUS ÚČINKU	NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY
<i>D-penicilamin</i>	redukce a chelatace mědi navození kupriurézy	<u>časné</u> – horečka, vyrážka, neutropenie, trombocytopenie  <u>pozdní</u> – proteinurie, poškození kostní dřene, degenerativní změny kůže, lupus-like syndrom  <u>velmi pozdní</u> – nefrotoxicita, anafylaxe, deprese, ztráta chuti, myasthenia gravis
<i>Trientin</i>	chelátor mědi zvyšuje kupriurézu	gastritida vzácně aplastická anemie reversibilní sideroblastická anemie
<i>Tetrathiomolybdenan amonný</i>	chelátor mědi blokuje absorpci mědi	anémie; neutropenie hepatotoxicita
<i>Zinek</i>	kompetice s Cu o střevní transporter, snížení střevní absorpce mědi aktivace syntézy metalothioneinu v enterocytech	dyspepsie hromadění zinku imunosuprese

*Upraveno podle: Roberts a Schilsky (2008)*

Farmakologická terapie není jedinou možností pro léčbu WD. Transplantace jater má v záchraně života pacientů nezastupitelnou roli. Je preferována především u nejzávažnější formy jaterního selhání nebo u pacientů, kde nebyla jiná terapie účinná. Za doplňkovou terapii můžeme označit podávání antioxidantů, hlavně vitamínu E, který zlepšuje symptomy WD. Součástí nefarmakologického opatření je i dieta, při které jsou omezeny potraviny s vysokým obsahem mědi. (Schilsky 2001, Roberts a Schilsky 2008).

### 3.2.2 Menkesova choroba

Menkesova choroba (MD) je X-vázané smrtelné onemocnění intracelulárního transportu mědi. Defektivním genem u tohoto onemocnění je ATP7A kódující stejnojmenný protein. ATP7A je na energii závislý transmembránový protein, který se účastní přenosu mědi k sekretovaným kuproenzymům a exportu přebytečné mědi z buněk. U pacientů pozorujeme velmi závažné klinické příznaky, a proto pacienti často umírají v raném dětství (Tümer a Møller 2010).

#### 3.2.2.1 *Klinický obraz onemocnění*

Existují dvě variabilní formy – klasická Menkesova choroba (MD) a syndrom okcipitálního rohu (OHS).

##### *Klasická Menkesova choroba*

Průběh onemocnění je závažnější než u OHS. Charakteristickými znaky jsou progresivní neurodegenerace a výrazná dysfunkce pojivové tkáně. Pacienti umírají před třetím rokem života (Tümer a Møller 2010).

Těhotenství probíhá bez komplikací. Může však dojít k předčasnému porodu. Při narození se objevují spontánní fraktury a cefalohematomy. U novorozenců se setkáváme s prolongovanou žloutenkou, hypotermií, hypoglykemií a problémy s příjmem potravy. Prvním příznakem MD, který pozorujeme u dětí starých 1 – 2 měsíce, jsou řídké vlásky bez lesku a pigmentace. Děti mají bledou pokožku, buclaté tváře, bývají bez výrazu. Okolo šestého měsíce věku dochází k postupnému zpomalení celkového psychomotorického vývoje. Děti neprospívají, mívají průjem nebo často zvrací. Postižení pojivové tkáně se projevuje jako spasticita, motorická dysfunkce a svalová slabost. Pozdními projevy onemocnění jsou slepota, subdurální hematom a selhání dechu. Většina pacientů umírá na následky infekce nebo vaskulárních komplikací jako je náhlé a masivní krvácení do mozku (Tümer a Møller 2010).

##### *Syndrom okcipitálního rohu*

OHS je mírnější formou MD. Rozlišení těchto dvou forem MD je možné při radiografickém vyšetření, kde jsou přítomny charakteristické okcipitální rohy (Tümer a Møller 2010).

Klinické příznaky jsou podobné klasické formě MD, ale nejsou tolik závažné. Vývoj motoriky je opožděn díky svalové hypotonii a je spojen s neobvyklou nemotorností.



Výška bývá normální, ale typická je mírná disproporce trupu, úzký hrudník a ramena. Klinický průběh je charakterizován chronickým průjmem, často se opakujícími infekcemi močových cest, kloubní nestabilitou a ortostatickou synkopou. Průměrná délka života je vyšší než u klasické formy MD. Někteří pacienti se dožili i padesáti let (Tümer a Møller 2010).

### 3.2.2.2 *Diagnostika*

K počáteční diagnostice poslouží klinické příznaky (zvláště typické změny vlasů) doplněné o laboratorní vyšetření, které odhalí sníženou hladinu mědi a CP v krvi. Mezi další pomocná vyšetření patří cystouretrografie, arteriografie, CT a zobrazení magnetickou rezonancí (Tümer a Møller 2010).

Rentgenové snímky pacientů s klasickou formou MD ukazují mnoho specifických abnormalit. Tyto změny zahrnují generalizovanou osteoporózu s častými zlomeninami a kostní ostruhy. K diagnostice OHS může přispět i vyšetření vlasů pod mikroskopem. Vlas je stočen kolem své vlastní osy (pili torti) s měnícím se průměrem (monilethrix) a polámaný v pravidelných intervalech (trichorrhexis nodosa)(Tümer a Møller 2010).

### 3.2.2.3 *Terapie*

Léčba MD je převážně symptomatická. Snažíme se zajistit dostatečné množství mědi pro tkáň a kuproenzymy. Při léčbě komplexem měď-histidin jsou důležité dva faktory: 1) Podaná dávka by měla udržet normální hladiny mědi a ceruloplasminu v séru. 2) Pokud MD snižuje vstřebávání mědi, měl by být tento komplex aplikován v subkutánní formě. Účinnost léčby je založena na včasném zahájení a přítomnosti alespoň částečně funkční ATP7A. Stále však přetrvává poškození pojivové tkáň (Sarkar 1999, Tümer a Møller 2010).

### 3.2.3 Narušení homeostázy mědi a její důsledky

Narušení homeostázy kovových iontů může vést k oxidativnímu stresu. Stav, který je charakterizovaný zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS), naruší antioxidační ochranu těla a následně vyvolá poškození DNA, peroxidaci lipidů a modifikaci proteinů, které jsou typické pro mnoho onemocnění zahrnujících rakovinu, kardiovaskulární choroby, diabetes, aterosklerosu, neurologická onemocnění (Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu), chronické záněty a další (Jomova a Valko 2011).

#### 3.2.3.1 Měď a oxidativní stres

Měď může vyvolat oxidativní stres dvěma mechanismy: 1) Tvorbou ROS přímou katalýzou mědi ve Fentonově reakci. 2) Vystavením organismu zvýšeným hladinám mědi, které významně sníží množství glutationu (GSH), který se chová jako antioxidant (Jomova a Valko 2011).

Měďné a měďnaté ionty se účastní oxidačních i redukčních reakcí v lidském organismu (**Reakce 1 a 2**). Měďnatý ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) může být v přítomnosti superoxidu nebo biologických redukčních činidel (např. askorbová kyselina nebo GSH) redukován na měďný ion ( $\text{Cu}^+$ ), který je schopný katalyzovat vytvoření reaktivního hydroxylového radikálu rozkladem peroxidu vodíku Fentonovou reakcí (Aruoma et al. 1991, Prousek 1995, Barbusinski 2009).



Hydroxylový radikál je extrémně reaktivní a může reagovat s prakticky jakoukoli biologickou molekulou v blízkém okolí (např. vytvoří lipidový radikál z nenasycených mastných kyselin). Měď je také schopna poškodit vlákna DNA zlomy a oxidací bází díky ROS (Jomova a Valko 2011).

Glutathion (GSH) je substrátem několika enzymů, které odstraňují ROS. Sám je silným buněčným antioxidantem. Má mnoho funkcí v intracelulárním metabolismu a detoxikaci mědi. Toxicitu mědi potlačuje přímo její chelatací a tak ji udržuje v nízkých hladinách. Vyčerpání GSH zvyšuje cytotoxický efekt ROS. (Jomova a Valko 2011).

### 3.2.3.2 *Měď a rakovina*

Role mědi v etiologii i růstu nádorů byla rozsáhle studována před více jak dvěma dekádami. Studie se zabývaly nejen mědí, ale také stanovením koncentrace zinku, železa a selenu. Je zajímavé, že zatímco koncentrace zinku, železa a selenu byla u pacientů s rakovinou snížena, koncentrace mědi byla zvýšená nebo významně zvýšená v porovnání s hodnotami zdravých jedinců (Gupte a Mumper 2009, Jomova a Valko 2011).

Vyšší hladiny mědi byly pozorovány u pacientů s rakovinou prsu, vaječníků, plic, prostaty, žaludku, retikuloendoteliálního systému a u pacientů s leukemií. Ve studiích byly zahrnuty rozdílné věkové kategorie pacientů, obě pohlaví a lidé z různých geografických lokalit. Naměřené koncentrace mědi nejvíce korelují se stádiem rakoviny a/nebo její progresí (Gupte a Mumper 2009).

O mědi je známo, že podporuje oxidativní stres a zánět. Zvýšené markery oxidačního stresu byly popsány u různých nádorů. Tyto údaje dále potvrzují domněnku, že vyšší hladiny mědi mohou mít důležitou roli v rozvoji rakoviny (Roberts et al. 2010).

#### *Angiogeneze*

Angiogeneze je definována jako proces tvorby nových krevních cév. Roli, kterou má angiogeneze v růstu tumorů, poprvé našel Judah Folkman před více než 40 lety. Pokud nedochází k angiogenezi, solidní tumor přijímá kyslík a živiny pouze difuzí, což omezuje jeho růst na 1-2 mm. U zdravých buněk zahrnuje tvorba nových krevních cév složité interakce a udržování rovnováhy mezi endogenními stimulatory a inhibitory tohoto procesu. Rakovinné buňky si mohou syntetizovat své vlastní angiogenní stimulatory nebo stimulovat endoteliální buňky k jejich syntéze. Mezi *endogenní stimulatory angiogeneze* patří vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), angiogenin, fibroblastický růstový faktor (FGF), tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), epidermální růstový faktor (EGF), cytokiny jako jsou interleukiny (IL) 1, 6 a 8, ale také stopové prvky jako je měď. K *endogenním inhibitorům angiogeneze* můžeme přiřadit cytokiny IL 10 a 12, modulatory angiotensin, endostatin a angiopoetin-2 (Folkman a Klagsbrun 1987, Gupte a Mumper 2009).

Měď může přispívat k angiogenezi několika způsoby. Pokud se naváže na angiogenní růstové faktory, zvyšuje jejich afinitu pro endoteliální buňky. Tento způsob

byl dokázán u angiogeninu. Další možností je kontrola sekrece angiogenních cytokinů a navození exprese angiogenního růstového faktoru VEGF mědi (Goodman et al. 2005).

### ***Chelátory mědi jako antiangiogenní látky***

V současnosti je intenzivně zkoumána možnost využití snížení hladin mědi v antineoplastické strategii. U chelátorů mědi D-penicilaminu, tetrathiomolybdátu, kliočinolu a trientinu byla prokázána schopnost inhibovat angiogenezi v podmínkách *in vitro* i *in vivo*. Tetrathiomolybdát spolu s doxorubicinem působí synergicky proti růstu nádorů, má více cytostatické než cytotoxické účinky. Kombinace tetrathiomolybdátu s radioterapií redukovala hmotnost tumoru u myšího modelu rakoviny plic. Trientin omezil růst nádoru i produkci endogenního stimulantu angiogeneze IL 8 u myšího modelu hepatocelulárního karcinomu. Kombinací D-penicilaminu a diety s nízkým obsahem mědi se snížila nejen hmotnost nádoru, ale i jeho cévní hustota (Goodman et al. 2005, Gupte a Mumper 2009).

### ***3.2.3.3 Měď a Alzheimerova choroba***

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které představuje nejčastější typ demence u stárnoucí populace. AD je spojena s progresivní ztrátou paměti a poškozením kognitivních funkcí následkem neuronálního morfologicky-funkčního poškození. Délka života pacientů s diagnostikovanou AD je okolo 8-10 let. Bohužel žádná léčba nedokáže zastavit nebo zvrátit neurodegeneraci. Dostupná léčiva pouze zmírňují symptomy (Squitti a Zito 2009).

Patologické změny v mozku s AD zahrnují ztrátu neuronů, tvorbu amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek. Tyto změny jsou spojeny s porušením homeostázy biologicky důležitých kovů a oxidativním stresem. Konkrétně nerovnováha mědi, železa a zinku uvnitř amyloidních plaků je pro mozek pacientů s AD typická. Zvýšená tvorba amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ) z amyloidového prekurzorového proteinu (APP) a jeho akumulace v mozku vede k oxidativnímu stresu a následnému odumírání neuronů. Při pokusech *in vitro* došlo k oxidaci cholesterolu komplexem  $A\beta$ -Cu za vzniku 4-cholesten-3-onu. U pacientů s AD bylo téměř o 100 % více cholesten-3-onu v mozkové tkáni než u kontrolní skupiny stejně starých pacientů. Pro vysvětlení patogeneze abnormálních behaviorálních a kognitivních změn jsou popsány velmi důležité. Případně

mohou dokreslit klinické příznaky syndromu demence (Crouch et al. 2007, Lutsenko 2010, Rajendran et al. 2009, Squitti a Zito 2009).

Sloučeniny, které mohou pozměnit homeostázu mědi v mozku, jsou perspektivní možností pro terapii AD. Touto sloučeninou může být i chelátor kliočinol, který dokáže prostoupit hematoencefalickou bariérou a rozpustit A $\beta$  plaky odebráním jejich kovového obsahu. Kliočinol zastavuje agregaci a oxidativní neurotoxicitu komplexu A $\beta$ -Cu (Price et al. 2007).

#### 3.2.3.4 *Měď a kardiovaskulární onemocnění*

Esenciální role Cu v kardiovaskulárním systému byla dokázána mnoha klinickými a experimentálními studiemi. Většina z nich poukázala na souvislost mezi nízkými koncentracemi Cu a incidencí kardiovaskulárních onemocnění. Zvýšený výskyt srdeční příhody je spojován s nízkým přísunem Cu. Srdce starších pacientů má nižší koncentraci Cu. Nedostatek Cu navozuje koncentrickou hypertrofii srdce s charakteristickými změnami ve struktuře myokardu. Tato hypertrofie srdce vede k městnavému srdečnímu selhání. Naopak vysoká koncentrace Cu v krvi je brána jako nezávislý rizikový faktor pro ischemickou chorobu srdeční, infarkt myokardu nebo aterosklerózu. Vzhledem k tomu, že se prakticky žádná měď nevyskytuje v biologických systémech volně, škodlivý vliv nadbytku Cu je zprostředkován molekulami, které s ní vzájemně interagují a mění tak její redoxní stav nebo biologické funkce. Avšak většina molekul, které měď váží nebo s ní interagují, jsou pro buněčný metabolismus a funkci prospěšné, s výjimkou homocysteinu (Kang 2011).

Homocystein (Hcy) je neesenciální aminokyselina a vedlejší produkt metabolismu methioninu. Za určitých podmínek sám Hcy nemá nebo má mírný škodlivý efekt a Cu je prospěšná nebo je bez negativního účinku. Ale jejich vzájemná kombinace je pro kardiovaskulární systém škodlivá. Pokud je hladina Hcy v krvi zvýšená, bývá spojena s rizikem ischemické choroby srdeční a tromboembolismu včetně cévní mozkové příhody. Hyperhomocysteinemie je spojována i s aterosklerózou z důvodu přímého toxického působení Hcy na endoteliální buňky, a také kvůli interakci Hcy se srážecími faktory a/nebo oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) (Kang 2011, Selhub 2006).

Díky zjištění současně zvýšené hladiny Cu a Hcy u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, se vytvořil větší zájem o studium interakce Cu s Hcy a o její výsledek.

Jednotlivé studie společně potvrdily rozhodující roli interakce Cu s Hcy u kardiovaskulárních chorob: 1) Hyperhomocysteinemie byla trvale pozorována ve spojení s vysokými koncentracemi Cu a CP v krvi. 2) Chelátor mědi D-pen snižuje účinky vyvolané hyperhomocysteinemií na kardiovaskulární systém. 3) Po přidání malého množství Cu se významně zvýšil inhibiční účinek Hcy na endoteliální funkce a na angiogenezi v izolované kultuře endoteliálních buněk. 4) Komplex Cu-Hcy má zvýšenou redoxní aktivitu, díky které je Cu dostupnější pro cílové molekuly a vede k oxidativnímu poškození, které se může vztahovat ke schopnosti Hcy redukovat  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$ . To může souviset i s vlivem mědi na aterosklerózu. Pravděpodobně se v důsledku interakce Cu s Hcy tvoří ROS. LDL jsou následkem toho oxidovány. Nejen LDL, ale i lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL) jsou náchylné na oxidaci, která může významně ovlivnit jejich kardioprotektivní vlastnosti. HDL jsou citlivější na oxidaci vyvolanou mědí než LDL (Jomova a Valko 2011, Kang 2011).

Efektivním přístupem k odstranění působení komplexu Cu-Hcy by bylo selektivní odstranění Hcy bez chelatace a eliminace Cu. Tato selektivní modulace koordinace Cu a Hcy vyžaduje další pochopení specifik Cu a její regulace v krvi a orgánech. Mnoho studií bude nezbytných pro pochopení změněného metabolismu Cu v přítomnosti vysoké hladiny Hcy (Kang 2011).

### 3.3 Chelatace mědi

Termín chelatace je odvozen ze slova řeckého původu *chelé*, označující klepeto. Chelatační činidla jsou organické nebo anorganické sloučeniny, které mají schopnost navázat kationty a vytvořit strukturu kruhového komplexu – chelátu. Součástí struktury chelatačních činidel jsou ligandy, které váží kationt koordináčně-kovalentní vazbou. Použití chelátorů má za následek odstranění kovů z tkání ve formě komplexu a jeho následné vyloučení močí nebo žlučí (Flora a Pachauri 2010, Sears 2013).

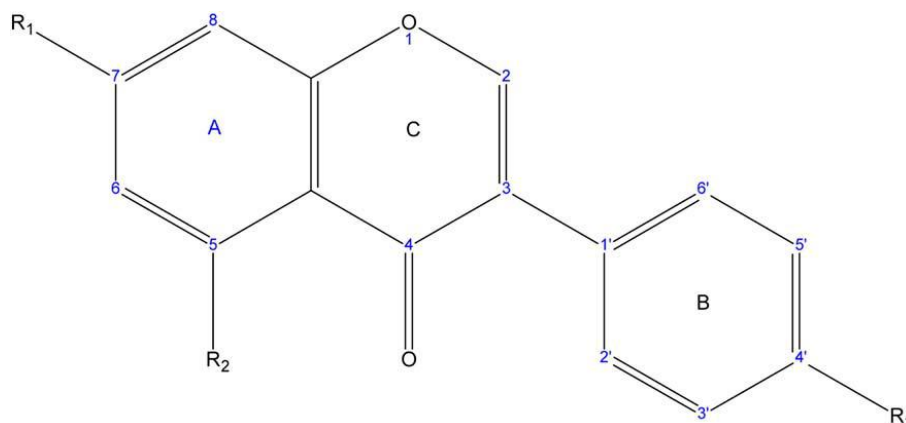
Chelatační terapie je používána k léčbě akutní nebo chronické intoxikace těžkými kovy. Toxicita způsobená těžkými kovy je vážný stav, který může způsobit mnoho komplikací včetně závažného poškození orgánů a mozku. Chelatační terapie je v tomto případě nezbytná k navázání kovových iontů, které jsou přítomné v toxických koncentracích, a jejich následnému vyloučení z těla, především močí (Jomova a Valko 2011, Rogan et al. 2001).

Ačkoli probíhá v oblasti klinického využití chelátorů mědi intenzivní výzkum, jejich použití je omezeno zejména na Wilsonovu chorobu- viz. kapitola **3.2.1. Wilsonova choroba – Terapie** (Říha et al. 2013).

Výzkum nových chelátorů mědi, které by mohly v budoucnosti najít uplatnění v terapii různých onemocnění, musí zohlednit následující kritéria: 1) afinitu chelátoru k měďným a měďnatým iontům a jejich možnou redukci; 2) stabilitu vytvořeného komplexu; 3) tvorbu chelátu v odlišném pH, které charakterizuje fyziologické i patofyziologické podmínky v organismu; 4) specifčnost k chelataci jiných iontů (hlavně iontů železa a zinku) a 5) lipofilitu, která ovlivňuje průnik do buněk a centrálního nervového systému (Říha et al. 2013, Říha et al. 2014).

### 3.4 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy tvoří podtřídu všudypřítomných flavonoidů. Charakteristickými rysy přírodních isoflavonoidů jsou 4-ketoskupina a zejména kruh B v poloze 3 (**Obr. 10**). Nejčastěji zmiňovaným zdrojem isoflavonoidů jsou luštěniny patřící do čeledi Fabaceae (bobovité). Avšak isoflavonoidy můžeme nalézt i v několika desítkách dalších čeledí, které patří do jedné ze čtyř tříd mnohobuněčných rostlin, jmenovitě – Bryopsida (mechy), Pinopsida (jehličnany), Magnoliopsida (dvouděložné rostliny) a Liliopsida (jednoděložné rostliny). Isoflavonoidy se nenacházejí pouze v rostlinách, ale i v jejich produktech jako je pivo nebo bourbon (Dowling et al. 2010, Ho et al. 2003, Lapčík 2007, Mackova et al. 2006).



**OBRÁZEK 10.** CHEMICKÁ STRUKTURA ISOFLAVONOIDŮ.

Základní isoflavonoidní struktura pro genistein ( $R_1 = OH$ ,  $R_2 = OH$  a  $R_3 = OH$ ), biochanin A ( $R_1 = OH$ ,  $R_2 = OH$  a  $R_3 = OCH_3$ ), a daidzein ( $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$  a  $R_3 = OH$ ).

Převzato z: Dowling et al. (2010)

Rostlinné polyfenoly, mezi které řadíme i isoflavonoidy, jsou důležitou složkou lidské potravy. U řady z nich předpokládáme protirakovinné vlastnosti. Epidemiologické studie naznačují nižší riziko vzniku rakoviny prsu, prostaty a tlustého střeva u populace s vysokým příjmem isoflavonoidů. Sójové boby jsou bohatým a jedinečným zdrojem dvou isoflavonoidů daidzeinu a genisteinu. U genisteinu byly prokázány protirakovinné účinky v testech *in vitro* i *in vivo*. Součástí struktury genisteinu je skupina chromen-4-on, díky které působí jako inhibitor enzymu tyrosinkinasy. Tato inhibice může být potenciálním prostředkem pro léčbu hormonálně



dependentních nádorů prsu a prostaty. U derivátu genisteinu biochaninu A, který je hlavní isoflavonoidní složkou jetele, byly také prokázány cytotoxické účinky nanádorové buňky (Barve et al. 2006, Ullah et al. 2009, Ullah et al. 2011).

Fytoestrogeny jsou sloučeniny rostlinného původu, které jsou strukturálně podobné estrogenům. Můžeme je rozdělit na dvě hlavní skupiny: lignany (vysoký obsah ve lněných semíncích) a právě isoflavonoidy (zdrojem jsou především sójové boby). Fytoestrogeny mohou působit na estrogenové receptory jako agonisté i antagonisté. Po navázání isoflavonoidu na estrogenové receptory nás mohou chránit před rozvojem aterosklerózy, podobně jako jejich agonisté. U premenopauzálních žen mohou být tyto receptory obsazené estradiolem ve větší míře než u žen postmenopauzálních, u kterých dochází k poklesu tohoto hormonu. Proto má příjem isoflavonoidů u postmenopauzálních žen větší význam. Studie týkající se postmenopauzálních žen odhalily významně nižší riziko výskytu Alzheimerovy choroby. Tyto výsledky naznačují neuroprotektivní působení isoflavonoidů díky jejich estrogennímu účinku, neboť estradiol je nezbytný pro udržení správné funkce neuronů (Del Rio et al. 2013, Ho et al. 2003, Kokubo et al. 2007, Nestel et al. 1997).

Isoflavonoidy mají i kardioprotektivní účinky. Konzumace sóji je prospěšná pro zdraví kardiovaskulárního systému díky vysokému obsahu polynenasycených tuků, vláknině, vitaminům a minerálním látkám. Náhrada živočišného proteinu sójovým snižuje nejen hladinu cholesterolu v krvi, ale také riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Při této náhradě významně poklesla hladina celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triacylglycerolů bez současného ovlivnění hladiny HDL (Kokubo et al. 2007, Sacks et al. 2006).

## 4. Experimentální část

### 4.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zjištění, zda mohou isoflavonidy chelatovat ionty mědi a jaké strukturní předpoklady jsou pro to nezbytné.

### 4.2 Materiál a pomůcky

#### 4.2.1 Chemikálie

Dimethylsulfoxid (DMSO), disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS), hematoxylin (HEM), hydroxylamin hydrochlorid (HA), chlorid měďný (CuCl), chlorid sodný (NaCl), kyselina chlorovodíková (HCl), pentahydrát síranu měďnatého (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) byly zakoupeny od firmy Sigma (Německo).

Testované isoflavonoidy byly pořízeny od následujících firem – biochanin A (Extrasynthese, Francie), cladrin (Phytolab, Německo), daidzein (Sigma), formononetin (Extrasynthese), genistein (Sigma), genistin (Extrasynthese), glycitein (Extrasynthese), isoformononetin (PhytoLab), ononin (Extrasynthese) a prunetin (Extrasynthese).

Všechna měření byla provedena v 15 mM pufrch. V acetátovém pro pH 4.5 a 5.5 a pro pH 6.8 a 7.5 byly použity HEPES pufrů.

#### 4.2.2 Přístroje a pomůcky

- Mikrotitrační destičky (Brand)
- Automatické pipety pro různé objemy (Brand)
- Vícekanálové pipety pro různé objemy (Biohit)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTech Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Analytické váhy KERN ABT120-5DM (Německo)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA<sup>®</sup> MS 3 digital
- Třepačka pro zkumavky IKA<sup>®</sup> Vortex GENIUS 3

### **4.3 Příprava základních a pracovních roztoků**

#### **4.3.1 Příprava základních a pracovních roztoků pro zkoušku HEM**

Základním zásobním roztokem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů byl 5 mM vodný roztok  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $M_w = 249,69 \text{ g/mol}$ ). Tento roztok je stabilní i po dlouhou dobu při uchovávání okolo  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Při přípravě pracovních roztoků  $\text{Cu}^{2+}$  iontů byl tento základní zásobní roztok naředěn destilovanou vodou na požadovanou koncentraci  $250 \text{ } \mu\text{M}$ .

Základním zásobním roztokem pro hematoxylin (HEM,  $M_w = 302,28 \text{ g/mol}$ ) byl 5 mM roztok v DMSO. Tento základní roztok nemá ale ideální stabilitu a podle zkušeností se dá použít po dobu cca 5 hodin. Pracovní roztoky byly připraveny ze základního roztoku naředěním pomocí DMSO na výslednou koncentraci  $250 \text{ } \mu\text{M}$ . Po 90 minutách jej bylo nutné znovu naředit kvůli nízké stabilitě.

Vzorky testovaných isoflavonoidů byly ředěny na požadované koncentrace pomocí DMSO.

#### **4.3.2 Příprava základních a pracovních roztoků pro zkoušku BCS**

Základní zásobní roztok  $\text{Cu}^{2+}$  iontů byl stejný jako ve zkoušce HEM. Ale pracovní roztok  $\text{Cu}^{2+}$  iontů o koncentraci  $250 \text{ } \mu\text{M}$  byl připraven naředěním pomocí DMSO.

Základním roztokem  $\text{Cu}^+$  iontů byl 5 mM roztok  $\text{CuCl}$  ( $M_w = 98,99 \text{ g/mol}$ ) ve vodném roztoku  $0,1 \text{ M HCl}$  a  $1 \text{ M NaCl}$ . Pracovní roztok vznikl stejně jako u  $\text{Cu}^{2+}$  iontů naředěním pomocí DMSO na požadovanou koncentraci  $250 \text{ } \mu\text{M}$ .

Hydroxylamin hydrochlorid (HA,  $M_w = 69,49 \text{ g/mol}$ ) byl rozpuštěn v destilované vodě za vzniku základního roztoku HA o koncentraci  $100 \text{ mM}$ .

Základním roztokem pro BCS byl 5 mM roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny ( $M_w = 564,54 \text{ g/mol}$ ) v destilované vodě.

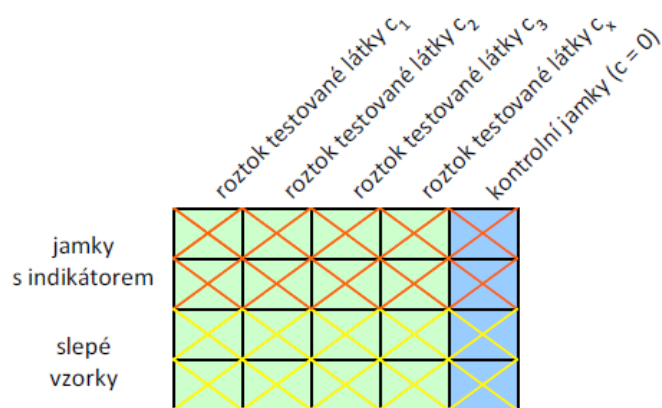
Stejně jako v předchozím případě byly vzorky testovaných isoflavonoidů naředěny na požadované koncentrace pomocí DMSO.

## 4.4 Metodický postup

### 4.4.1 Stanovení chelatace iontů mědi HEM metodou

Do všech jamek mikrotitrační destičky jsme nejprve napipetovali 150  $\mu\text{l}$  příslušného pufru (pH 7.5, 6.8, 5.5). Následně jsme do stejných jamek přidali 50  $\mu\text{l}$  250  $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Do testovacích jamek jsme poté přidali 50  $\mu\text{l}$  testované látky (isoflavonoidu) v klesající koncentraci ( $c_1 - c_x$ ). Do kontrolních jamek jsme napipetovali 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla (**Obr. 11**). Destičku jsme nechali 2 minuty protřepat. V testovacích jamkách se v případě aktivního isoflavonoidu vytvořily komplexy mezi testovanou látkou a  $\text{Cu}^{2+}$  ionty. Do první poloviny jamek (tj. do prvních dvou řad) jsme přidali 50  $\mu\text{l}$  indikátoru, tj. 250  $\mu\text{M}$  roztoku hematoxylinu. Indikátor hematoxylin reaguje s nezchelatovanými ionty  $\text{Cu}^{2+}$ , jejichž koncentrace je následně změřena. Do druhé poloviny jamek jsme přidali 50  $\mu\text{l}$  DMSO. Tyto jamky slouží jako slepé vzorky. Po dokončení třepání, které trvalo 3 minuty, se testovací destička ihned vložila (tzn. v čase 3 minut) do spektrofotometru a byla změřena absorbance. Měření jsme opakovali za další 4 minuty (tzn. v čase 7 minut).

Nastavení vlnové délky spektrofotometru, který měřil absorbanci jednotlivých vzorků, jsme měnili v závislosti na testovaném pH. Pro pH 7.5 vlnová délka odpovídala 610 nm, pro pH 6.8 590 nm a pro pH 5.5 595 nm podle předchozích experimentů (Říha et al. 2013).



**OBRÁZEK 11.** SCHÉMA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY PŘI STANOVENÍ CHELATAČE IONTŮ MĚDI HEM METODOU.

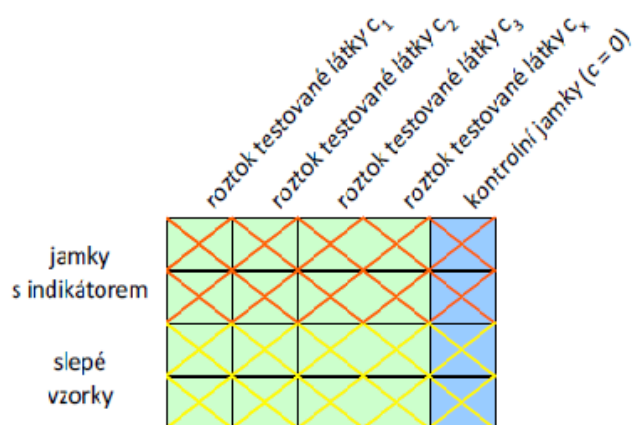
Ve všech jamkách je 150  $\mu\text{l}$  příslušného pufru a 50  $\mu\text{l}$   $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Do **testovacích jamek** bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  testovaného isoflavonoidu v klesajících koncentracích ( $c_1 - c_x$ ), do **kontrolních jamek** bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla. Nezreagovaná měď je spektrofotometricky stanovena pomocí indikátoru hematoxylinu (50  $\mu\text{l}$ ) v prvních dvou řadách (×). Do druhých dvou řad bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla (×).

#### 4.4.2 Stanovení chelatace iontů mědi BCS

Při vlastním provedení experimentu chelatace iontů mědi postupujeme dle typu kationtu mědi.

##### *Stanovení chelatace měďnatých iontů BCS*

Do jamek na mikrotitrační destičce jsme nejprve napipetovali 100  $\mu\text{l}$  příslušného pufru (4.5, 5.5, 6.8, 7.5). Poté jsme do testovacích jamek přidali 50  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky příslušné koncentrace a do jamek kontrolních 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla (**Obr. 12**). Následně jsme do všech jamek přidali 50  $\mu\text{l}$  250  $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v DMSO a nechali 2 minuty míchat. Po promíchání jsme do všech jamek napipetovali 50  $\mu\text{l}$  HA, který zredukoval nezchelatované měďnaté ionty. Koncentrace HA se lišila dle pH použitého pufru, pro pH 6.8 a 7.5 1 mM a pro pH 4.5 a 5.5 10 mM podle předchozích publikovaných experimentů (Říha et al. 2013). Destičku jsme nechali míchat 1 minutu, aby redukce proběhla kompletně. Do dvou posledních řad jsme přidali 50  $\mu\text{l}$  destilované vody. Ionty mědi v prvních dvou řadách jsme obarvili přidáním 50  $\mu\text{l}$  5mM roztoku BCS. Absorbance byla měřená při vlnové délce 484 nm ihned a po 5 minutách.

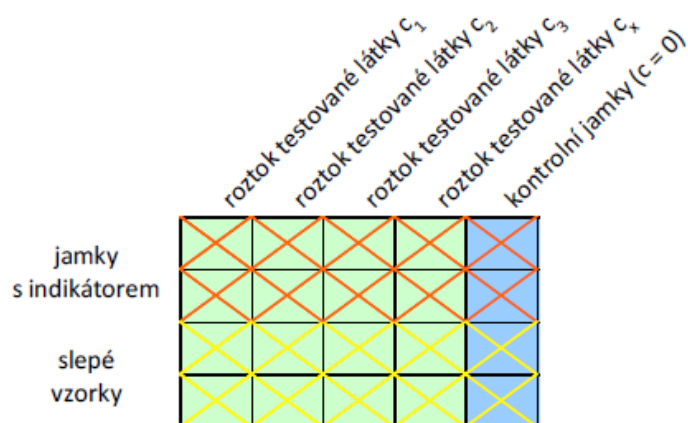


**OBRÁZEK 12.** SCHÉMA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY PŘI STANOVENÍ CHELATACE  $\text{Cu}^{2+}$  BCS.

Ve všech jamkách je 100  $\mu\text{l}$  příslušného pufru, 50  $\mu\text{l}$   $\text{Cu}^{2+}$  iontů a 50  $\mu\text{l}$  HA. Do **testovacích jamek** bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  testovaného isoflavonoidu v klesajících koncentracích ( $c_1 - c_x$ ), do **kontrolních jamek** bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla. Nezchelatované  $\text{Cu}^{2+}$  ionty jsou zredukovány přidáním HA a obarveny pomocí 50  $\mu\text{l}$  indikátoru BCS v prvních dvou řadách (×). Do druhých dvou řad bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  destilované vody (×).

### Stanovení chelatace měďných iontů BCS

Do jamek jsme napipetovali opět 100  $\mu\text{l}$  příslušného pufru (4.5, 5.5, 6.8, 7.5). Poté jsme do všech jamek přidali 50  $\mu\text{l}$  roztoku HA ve stejných koncentracích jako v předchozím případě (**Obr. 13**). HA byl přidán před roztokem měďných iontů, aby je udržel v jejich redukovaném stavu. Dále jsme do všech jamek mikrotitrační destičky přidali 50  $\mu\text{l}$  250  $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^+$  v DMSO a nechali míchat 1 minutu. Potom jsme do testovací jamky napipetovali 50  $\mu\text{l}$  zkoušeného chelátoru opět v klesajících koncentracích ( $c_1 - c_x$ ). Do kontrolních jamek jsme přidali 50  $\mu\text{l}$  DMSO. Destičku jsme nechali 2 minuty třepat a obdobně jako u předchozího stanovení, jsme do posledních dvou řad přidali 50  $\mu\text{l}$  destilované vody a do prvních dvou řad 50  $\mu\text{l}$  BCS. Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm ihned po 5 minutách.



**OBRÁZEK 13.** SCHÉMA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY PŘI STANOVENÍ CHELATACE  $\text{Cu}^+$  BCS.

Ve všech jamkách je 100  $\mu\text{l}$  příslušného pufru, 50  $\mu\text{l}$  HA a 50  $\mu\text{l}$   $\text{Cu}^+$  iontů. Do **testovacích jamek** bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  testovaného isoflavonoidu v klesajících koncentracích ( $c_1 - c_x$ ), do **kontrolních jamek** bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla. Nezchelátované  $\text{Cu}^+$  ionty jsou zredukovány přidáním HA a obarveny pomocí 50  $\mu\text{l}$  indikátoru BCS v prvních dvou řadách (×). Do druhých dvou řad bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  destilované vody (×).

### 4.4.3 Statistická analýza

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka, která se spočítá podle

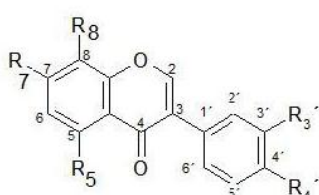
vzorce  $\sqrt{\frac{\sum(x-x)^2}{n}}$

Rozdíly v chelataci u jednotlivých isoflavonoidů byly sledovány pomocí 95 % konfidenčních intervalů, které byly připraveny pomocí programu GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, USA).



## 4.5 Výsledky

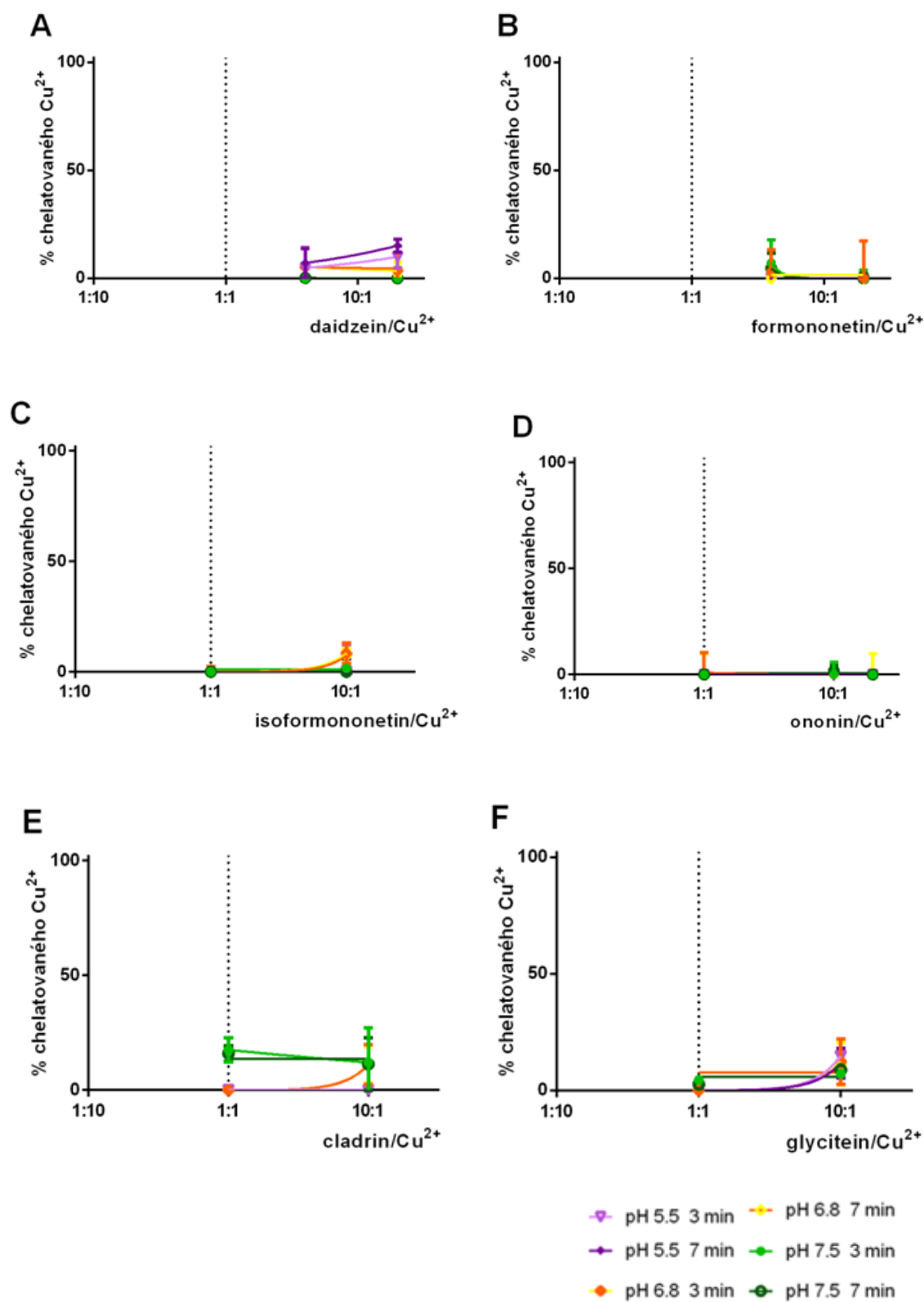
Nejprve jsme ověřili schopnost chelátovat ionty mědi u 10 testovaných isoflavonoidů (**Obr. 14**) pomocí metody HEM. Tato metoda je méně kompetitivní než metoda využívající ke stanovení chelatace indikátor bathocuproin, a proto může být použita k odhalení i méně účinných chelátorů mědi (Říha et al. 2013).



<i>isoflavonoidy</i>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>	<b>R<sub>8</sub></b>	<b>R<sub>3</sub>'</b>	<b>R<sub>4</sub>'</b>
<b>biochanin A</b>	<b>OH</b>	H	<b>OH</b>	H	H	<b>O-CH<sub>3</sub></b>
<b>cladrin</b>	H	H	<b>OH</b>	H	<b>O-CH<sub>3</sub></b>	<b>O-CH<sub>3</sub></b>
<b>daidzein</b>	H	H	<b>OH</b>	H	H	<b>OH</b>
<b>formononetin</b>	H	H	<b>OH</b>	H	H	<b>O-CH<sub>3</sub></b>
<b>genistein</b>	<b>OH</b>	H	<b>OH</b>	H	H	<b>OH</b>
<b>genistin</b>	<b>OH</b>	H	<b>O-Glc</b>	H	H	<b>OH</b>
<b>glycitein</b>	H	<b>O-CH<sub>3</sub></b>	<b>OH</b>	H	H	<b>OH</b>
<b>isoformononetin</b>	H	H	<b>O-CH<sub>3</sub></b>	H	H	<b>OH</b>
<b>ononin</b>	H	H	<b>O-Glc</b>	H	H	<b>O-CH<sub>3</sub></b>
<b>prunetin</b>	<b>OH</b>	H	<b>O-CH<sub>3</sub></b>	H	H	<b>OH</b>

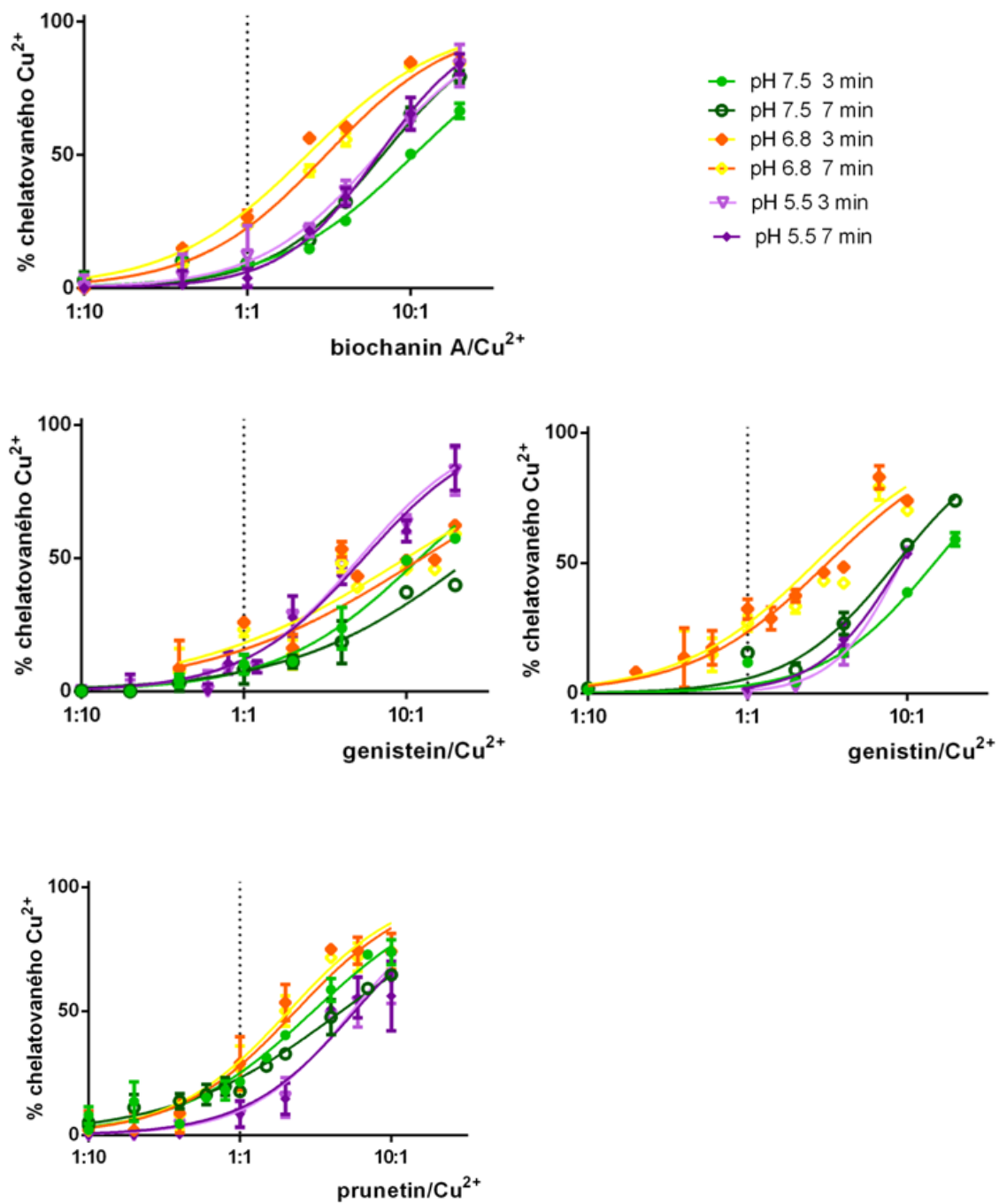
### **OBRAZEK 14. CHEMICKÁ STRUKTURA TESTOVANÝCH ISOFLAVONOIDŮ.**

U čtyř z 10 testovaných látek byla prokázána schopnost chelatace Cu<sup>2+</sup> pomocí metodiky založené na hematoxylinu. U zbylých šesti byly chelatační schopnosti zanedbatelné (**Obr. 15 A - F**). Isoflavonoidy biochanin A, genistein, genistin a prunetin, u kterých byly potvrzeny chelatační vlastnosti, chelatovaly okolo 25 % iontů mědi v poměru 1:1, isoflavonoid:Cu, při pH 6.8. Při vyšším i nižším pH byly jejich chelatační účinky nižší. V poměru 10:1 při pH 6.8 chelatoval genistein kolem 50 % iontů mědi, ostatní tři účinné isoflavonoidy zhruba 75 %. Při ostatních testovaných pH a poměru 10:1 všechny čtyři účinné isoflavonoidy chelatovaly okolo 50 % iontů mědi (**Obr. 16**).



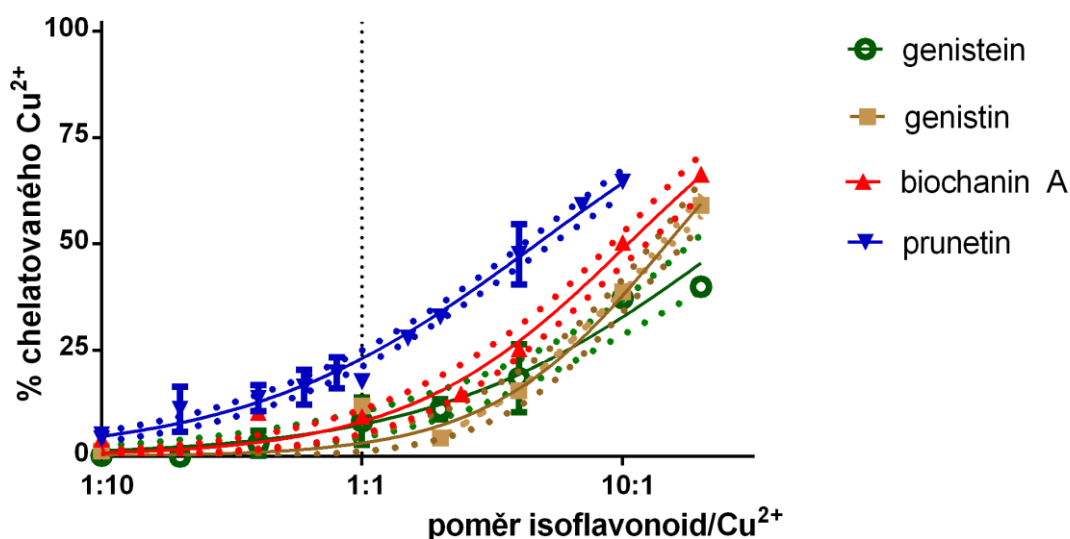
**OBRÁZEK 15.** NECHELATUJÍCÍ NEBO ZANEDBATELNĚ CHELATUJÍCÍ ISOFLAVONOIDY.

Výsledky zobrazují chelataci měďnatých iontů pomocí hematoxylinu.

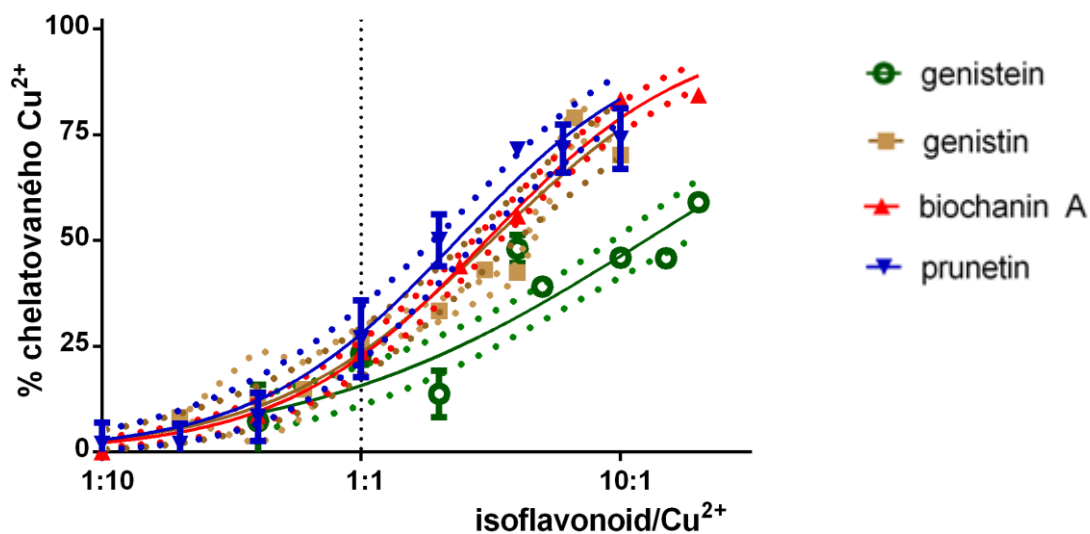


**OBRÁZEK 16.** CHELATAČE  $\text{Cu}^{2+}$  IONTŮ AKTIVNÍMI ISOFLAVONOIDY ZMĚŘENÁ HEM METODOU.

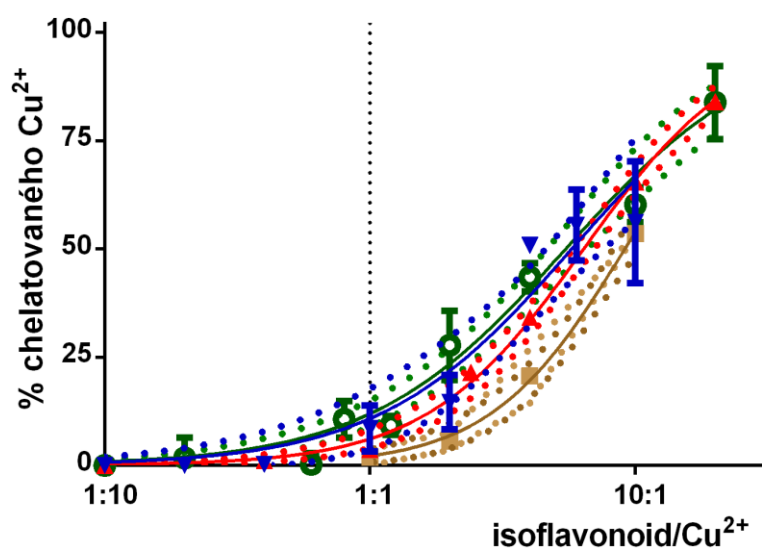
Chelatující isoflavonoidy mají ve své struktuře 4-keto-5-hydroxyskupinu, ale liší se přítomností dalších strukturních charakteristik, které významně ovlivňují schopnost chelatace, jak je patrné z konfidenčních intervalů (**Obr. 17**). Nejvýraznější rozdíl v chelataci jsme pozorovali při pH 7.5, kde má největší potenciál chelatace isoflavonoid prunetin, následovaný biochaninem A. Chelatace mědnatých iontů isoflavonoidy genisteinem a genistinem byla stejná až do poměru 10:1, isoflavonoid:Cu. Při vyšších poměrech byla pozorována mírná tendence k vyšší účinnosti genistinu (**Obr. 17**). Při pH 6.8 nebyly rozdíly v chelataci tolik výrazné. Prunetin, biochanin A a genistin měly statisticky stejný účinek, ale prokázaly lepší chelatační vlastnosti než genistein (**Obr. 18**). Měření při pH 5.5 prokázalo minimální rozdíly mezi testovanými isoflavonoidy, ale prunetin, biochanin A a genistein byly o něco účinnějšími než genistin (**Obr. 19**).



**OBRÁZEK 17.** POROVNÁNÍ CHELATAČNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH ISOFLAVONOIDŮ PRO IONTY  $\text{Cu}^{2+}$  POMOCÍ 95 % KONFIDENČNÍCH INTERVALŮ PŘI  $\text{pH}$  7.5.

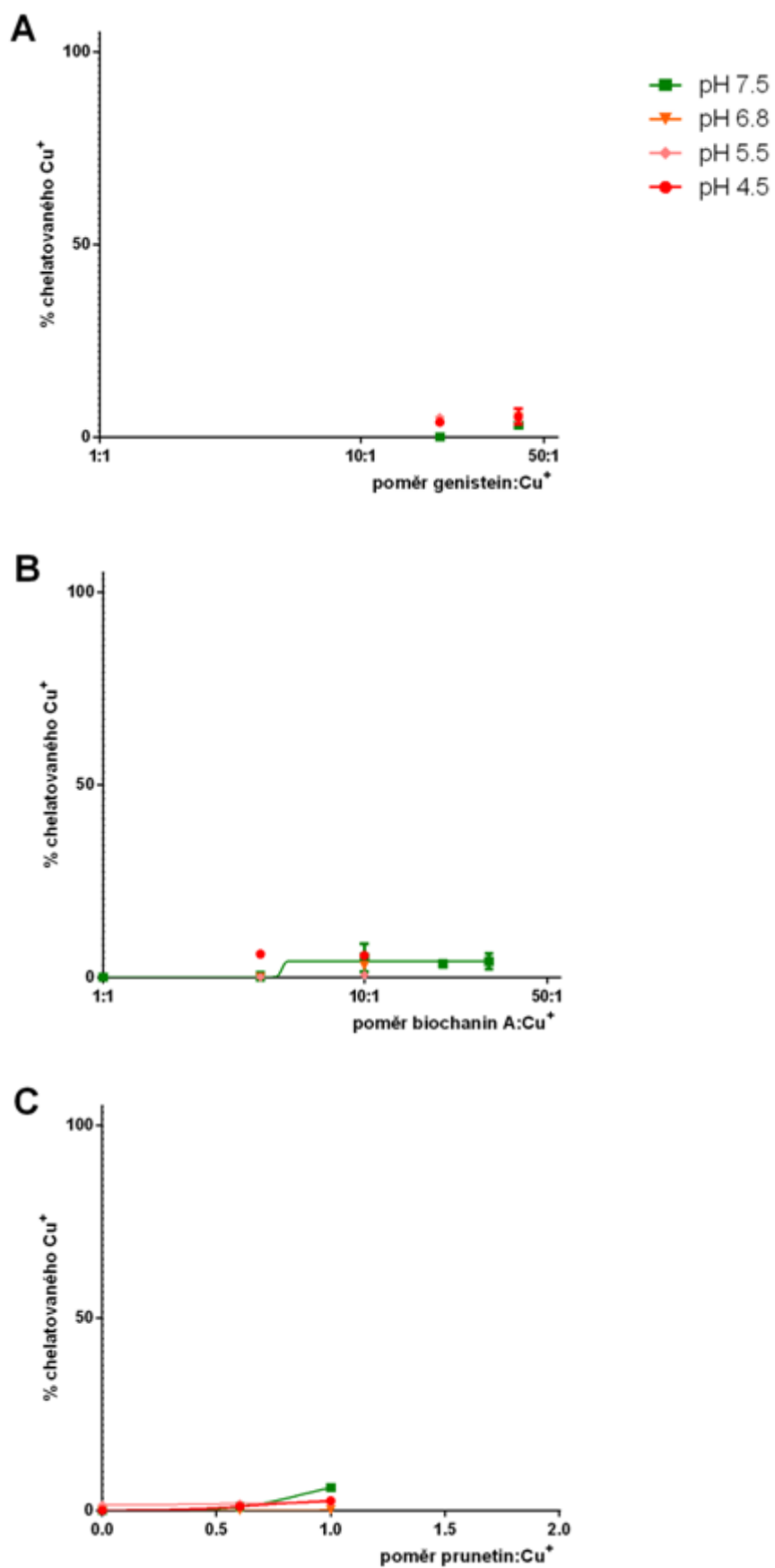


**OBRÁZEK 18.** POROVNÁNÍ CHELATAČNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH ISOFLAVONOIDŮ PRO IONTY  $\text{Cu}^{2+}$  POMOCÍ 95 % KONFIDENČNÍCH INTERVALŮ PŘI pH 6.8.

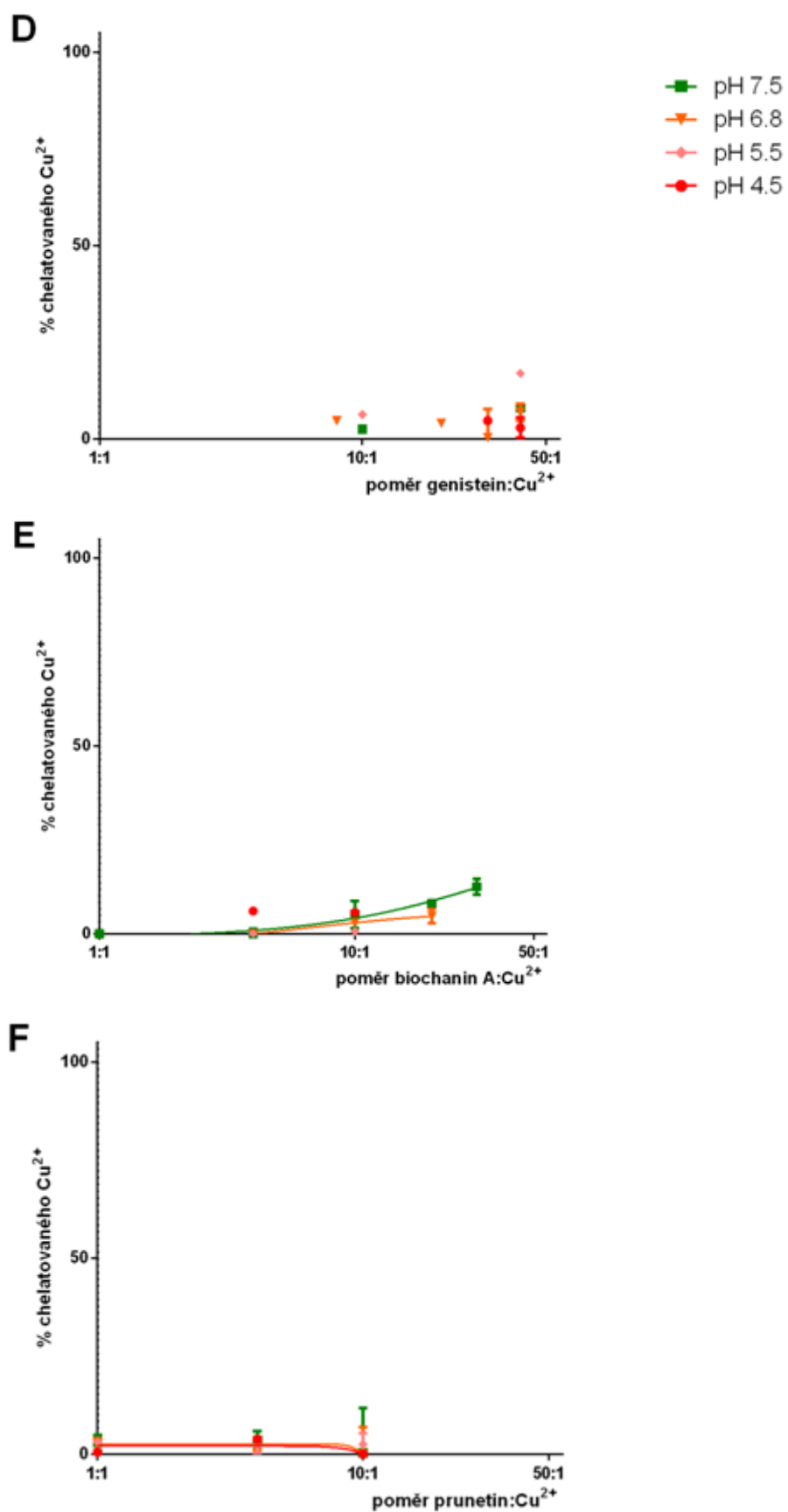


**OBRÁZEK 19.** POROVNÁNÍ CHELATAČNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH ISOFLAVONOIDŮ PRO IONTY  $\text{Cu}^{2+}$  POMOCÍ 95 % KONFIDENČNÍCH INTERVALŮ PŘI pH 5.5.

Abychom ověřili chelatační vlastnosti isoflavonoidů ve více kompetitivním prostředí, použili jsme BCS metodu, ve které slouží bathocuproin jako indikátor. Žádný z testovaných isoflavonoidů nebyl schopný chelatovat více než 10 % měďných a měďnatých iontů v poměru 10:1, isoflavonoid:Cu v jakémkoli z testovaných pH, tj. 4.5 až 7.5 (Obr. 20. A – C a Obr. 21. D – F).



**OBRÁZEK 20.** CHELATAČE MĚDNÝCH IONTŮ GENISTEINEM, BIOCHANINEM A, PRUNETINEM (A – C) POMOCÍ KOMPETITIVNÍ METODY BCS.



**OBRÁZEK 21.** CHELATAČE MĚĎNATÝCH IONTŮ GENISTEINEM, BIOCHANINEM A, PRUNETINEM (D – F) POMOCÍ KOMPETITIVNÍ METODY BCS.

## 5. Diskuze

Ke stanovení měď – chelatujících vlastností isoflavonoidů bylo v mé práci použito 10 látek z této skupiny – biochanin A, cladrin, daidzein, formononetin, genistein, genistin, glycitein, isoformononetin, ononin a prunetin, které se vzájemně liší jednotlivými substituenty základní struktury.

Cílem bylo ověřit jejich chelatační vlastnosti *in vitro* a charakterizovat funkční skupiny, které jsou zodpovědné za chelataci iontů mědi. Pro stanovení iontů mědi bylo využito spektrofotometrické měření, které je nejen rychlou, ale i levnou alternativou (Hashem et al. 2011).

Pro tuto práci byly k testování chelatačních účinků použity dvě metody, které jsou založeny na kompetici testovaného isoflavonoidu se známými chelátory mědi  $\text{Cu}^{2+}$  (HEM) a  $\text{Cu}^+$  (BCS), které mohou sloužit i jako indikátory. S mědí vytvářejí komplexy, které mají odlišnou absorbanci. Při stanovení měď – chelatujících vlastností pomocí těchto indikátorů dochází ke kompetici testované látky s daným indikátorem o ionty mědi. Tato stanovení jsou tedy lepším důkazem chelatačního potenciálu isoflavonoidu než pouhé spektrofotometrické stanovení v nekompetitivním prostředí, kde se nachází pouze kovový iont s testovaným isoflavonoidem.

Nejprve jsme stanovili chelataci iontů mědi pomocí hematoxylinu, který jako indikátor netvoří s ionty mědi stabilní komplex a není vhodný pro nízká pH (Říha et al. 2013). Vzhledem k omezením spojeným s hematoxylinem sloužila tato metoda pouze k ověření chelatačních vlastností testovaných isoflavonoidů. U šesti ze zkoušených látek nebyla nalezena významná chelatace.

Druhou metodou bylo ověření chelatace iontů mědi pomocí specifického indikátoru disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny. BCS je vhodným indikátorem, který chelatuje měďné ionty s vysokou afinitou a tvoří s nimi stabilní komplexy v širokém rozmezí pH. Tento indikátor může být použit i pro stanovení měďnatých iontů, pokud je doplněn o vhodné redukční činidlo – hydroxylamin. Navíc, pokud je testovaná látka silným chelátorem, můžeme stanovit i stechiometrii celého komplexu (Říha et al. 2013).

Z naměřených hodnot a sestavených grafů uvedených výše vyplývá, že pouze čtyři isoflavonoidy vykazují chelatační účinky na ionty mědi, a to – biochanin A, genistein,



genistin a prunetin. Při stanovení HEM metodou chelatovaly více než 25 % iontů mědi v poměru 1:1, chelátor:Cu. S postupně narůstající koncentrací daného isoflavonoidu vzrůstala i procenta chelatovaných  $\text{Cu}^{2+}$  iontů, a to až k 75 % při poměru 10:1. Během porovnávání chelatační aktivity u testovaných isoflavonoidů jsme pozorovali nejvýraznější rozdíly v chelataci při pH 7.5, kde se jako nejsilnější chelátor jeví prunetin, následovaný biochaninem A. U zbývajících pH 6.8 a 5.5 nebyly rozdíly tak výrazné, což odpovídá schopnosti hematoxylinu chelatovat především při vyšších hodnotách pH. K bližšímu posouzení chelatačních vlastností isoflavonoidů jsme použili BCS metodu, ale žádný z testovaných isoflavonoidů nechelatoval více než 10 % měďných a měďnatých iontů v poměru 10:1, isoflavonoid:Cu, v jakémkoli pH.

Z výsledků jednotlivých měření je jasné, že isoflavonoidy tvoří komplexy s ionty mědi, ale jejich chelatační vlastnosti jsou v porovnání s účinnými flavonoidy jako je baicalein nebo v porovnání chelátorem trientinem používaným v praxi nižší (Říha et al. 2014).

Bylo potvrzeno, že isoflavonoidy mají schopnost chelatace iontů mědi díky přítomnosti 4-keto-5-hydroxyskupiny v jejich struktuře. Avšak jejich chelatace závisí nejen na přítomnosti těchto skupin, ale také na typu rozpouštědla a podmínkách pH (Chen et al. 2010, Mladěnka et al. 2011, Říha et al. 2014).

Z článků týkajících se chelatačních vlastností isoflavonoidů stojí za zmínku výsledky publikované Chen et al. (2010), kteří objevili u biochaninu A schopnost chelatace dvou přechodných kovů  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Ni}^{2+}$ . O dokázání chelatace iontů  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  isoflavonoidy daidzeinem a genisteinem se pokoušeli Mira et al. (2002), kteří však chelataci neprokázali. Studie, která rozšířila naše povědomí o další isoflavonoidy, které mohou chelatovat přechodné kovy, byla publikována Dowlingem et al. (2010), kteří jako první přinesli důkaz o chelataci iontů  $\text{Cu}^{2+}$  genisteinem a  $\text{Cu}^{2+}$  spolu s  $\text{Fe}^{3+}$  biochaninem A. Součástí studie bylo ověření chelatačních vlastností isoflavonoidu daidzeinu, které se však u žádného ze zkoušených iontů nepotvrdilo. Pokud je nám známo, tak toto je první studie, která komplexně shodnotila měď a železo chelatační účinky isoflavonoidů.

Zajímavým zjištěním je, že i některé další substituenty mohou docela výrazně ovlivnit chelataci. Rozdíly ve struktuře mezi jednotlivými účinnými isoflavonoidy biochaninem A, genisteinem, genistinem a prunetinem jsou definovány odlišnými substituenty. V poloze sedm heterocyklu chromen-4-onu mají biochanin A a genistein

hydroxyskupinu, u genistinu je ve stejné poloze navázána přes kyslík molekula glukózy a u prunetinu methoxyskupina. Druhou odlišností je methoxyskupina v pozici čtyři na fenylovém jádře struktury biochaninu A. Zbývající tři isoflavonoidy mají místo methoxyskupiny skupinu hydroxylovou.

Důvod rozdílné chelatace vzhledem k variabilnímu pořadí substituentů při různých pH není úplně jasný, ale redukce iontů mědi může hrát významnou úlohu. Podle dalších, zatím nepublikovaných výsledků z naší laboratoře, jsou některé isoflavonoidy silnými redukčními činidly, tj. mohou redukovat měďnaté ionty na měďné a tím zvyšovat u BCS metodiky nabídku  $\text{Cu}^+$  tomuto indikátoru, který k nim má vysokou afinitu (Mira et al. 2002, Říha et al. 2013, Říha et al. 2014). Z tohoto důvodu je patrné, že isoflavonoidy nejsou schopny chelatovat  $\text{Cu}^+$  ionty.

## 6. Závěr

Tato diplomová práce potvrdila pomocí spektrofotometrické metody schopnost chelatace iontů mědi u těch isoflavonoidů, které mají ve své struktuře 4-keto-5-hydroxyskupinu, jmenovitě biochanin A, genistein, genistin a prunetin.

Z deseti testovaných látek vykazovaly chelační aktivitu pouze tyto čtyři isoflavonoidy. Nejpatrnější rozdíly byly naměřeny při pH 7.5, kde byl nejsilnějším chelátorem mědi prunetin, následovaný biochaninem A. U zbývajících dvou isoflavonoidů genisteinu a genistinu byla chelatace téměř stejná. Měření při pH 6.8 a 5.5 prokázalo minimální rozdíly mezi jednotlivými chelátory. Pro ověření těchto chelatačních vlastností bylo provedeno měření za pomoci BCS metody. Žádný z testovaných isoflavonoidů však nebyl schopen chelatovat více než 10 % iontů mědi v jakémkoli z testovaných pH. Isoflavonoidy jsou tedy schopny mírné chelatace měďnatých iontů, ale jejich míra chelatace měďných iontů je zanedbatelná.

## 7. Literatura

1. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet* 2007;369:397-408.
2. Angelova M, Asenova S, Nedkova V, Koleva - Kolarova R. Copper in the Human Organism. *Trakia Journal of Sciences* 2011;9:88-98.
3. Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Copper ion dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal* 1991;273:601-604.
4. Barbusinski K. Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering* 2009;16:347-358.
5. Barceloux DG. Copper. *Clinical Toxicology* 1999;37:217-230.
6. Barve V et al. Synthesis, Molecular Characterization, and Biological Activity of Novel Synthetic Derivatives of Chromen-4-one in Human Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006;49:3800-3808.
7. Bento I, Peixoto C, Zaitsev VN, Lindley PF. Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography* 2007;63:240-248.
8. Burkhead JL, Gray LW, Lutsenko S. System biology approach to Wilson's disease. *Biometals* 2011;24:455-466.
9. Collins JF, Prohaska JR, Knutson MT. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews* 2010;68:113-147.
10. Crouch PJ, White AR, Bush AI. The modulation of metal bioavailability as a therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *FEBS Journal* 2007;274:3775-3783.
11. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013;18:1818-1892.

12. Ding X, Xie H, Kang YJ. The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2001;22:301-310.
13. Dowling S, Regan F, Hughes H. The characterisation of structural and antioxidant properties of isoflavone metal chelates. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2010;104:1091-1098.
14. Eisses JF, Kaplan JH. The Mechanism of Copper Uptake Mediated by Human CTR1: a mutational analysis. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:37159-37168.
15. Ferenci P. Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2004;19:157-165.
16. Ferenci P et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2003;23:139-142.
17. Flora SJS, Pachauri V. Chelation in Metal Intoxication. *International Journal and Environmental Research and Public Health* 2010;7:2745-2788.
18. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science (New York)* 1987;235:442-447.
19. Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Control of Copper Status for Cancer Therapy. *Current Cancer Drug Targets* 2005;5:543-549.
20. Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews* 2009;35:32-46.
21. Hashem E, Seleim M, El-Zohry A. Spectrophotometric determination of copper(II) in pharmaceutical, biological and water samples by 4-(2'-benzothiazolylazo)-salicylic acid. *Journal of Applied Spectroscopy* 2011;78:586-593.
22. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition* 2002;22:439-458.

23. Ho PK, Li L, Zhao L, Qian ZM. Genistein protects primary cortical neurons from iron-induced lipid peroxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003;247:219-222.
24. Chen X, Tang LJ, Sun YN, Qui PH, Liang G. Syntheses, characterization and antitumor activities of transition metal complexes with isoflavone. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2010;104:379-384.
25. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;283:65-87.
26. Kang YJ. Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 2011;129:321-331.
27. Kodama H, Fujisawa Ch, Bhadrprasit W. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanism, Diagnosis and Treatment. *Current Drug Metabolism* 2012;13:237-250.
28. Kokubo Y, Iso H, Ishihara J, Okada K, Inoue M, Tsugane S. Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center-Based (JPHC) study cohort I. *Circulation* 2007;116:2553-2562.
29. Lapčák O. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule? *Phytochemistry* 2007;68:2909-2914.
30. Lutsenko S, Bhattacharjee A, Hubbard A. Copper handling machinery of the brain. *Metallomics* 2010;2(9):596-608.
31. Macková Z, Koblůvská R, Lapčák O. Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa – An update. *Phytochemistry* 2006;67:849-855.
32. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Research* (2002);36:1199-1208.
33. Mladěnka P, Macková K, Filipský T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry* 2011;105:693-701.

34. Nestel PJ et al. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997;17:3392-3398.
35. Oder W, Grimm G, Kollegger H, Ferenci P, Schneider B, Deecke L. Neurological and neuropsychiatric spectrum of Wilson's disease: A prospective study of 45 cases. *Journal of Neurology* 1991;238:281-287.
36. 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.
37. Prohaska JR, Gybina AA. Intracellular Copper Transport in Mammals. *Journal of Nutrition* 2004;134:1003-1007.
38. Prousek J. Fenton reaction after a century. *Chemické Listy* 1995;89:11-21.
39. Rajendran R et al. A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits-insights into the pathology of Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 2009;382:91-95.
40. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and Treatment of Wilson disease: An Update. *American Association for Study of Liver Diseases (AASLD) Practice Guidelines – Hepatology* 2008;47:2089-2111.
41. Roberts RA, Smith RA, Safe S, Szabo C, Tjalkens RB, Robertson FM. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology* 2010;276:85-94.
42. Rogan WJ et al. The effect of chelation therapy with succimer on neuropsychological development in children exposed to lead. *New England Journal of Medicine* 2001;344:1421-1426.
43. Říha M, Karlíčková J, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2013;123:80-87.
44. Říha et al. In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advances* 2014;4:32628-32638.

45. Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P, Wiston M. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for Professional from the Nutrition Committee. *Circulation* 2006;113:1034-1044.
46. Sarkar B. Treatment of Wilson and Menkes Diseases. *Chemical Reviews* 1999;99:2535-2544.
47. Sears ME. Chelation: Harnessing and Enhancing Heavy Metal Detoxification – A Review. *The Scientific World Journal* 2013;219840:1-13.
48. Selhub J. The many facet sof hyperhomocysteinemia: studies from the Framingham cohorts. *Journal of Nutrition* 2006;136:1726S-1730S.
49. 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.
50. Squitti R, Zito G. Anti-Copper Therapies in Alzheimer’s Disease: New Concepts. *Recent patents on CNS drug discovery* 2009;4:209-219.
51. Stoj Ch, Kosman DJ. Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. *FEBS Letters* 2003;554:422-426.
52. Tümer Z, Møller LB. Menkes disease. *European Journal of Human Genetics* 2010;18:511-218.
53. Ullah MF, Shamim U, Hanif S, Azmi AS, Hadi SM. Cellular DNA breakage by soy isoflavone genistein and its methylated structural analogue biochanin A. *Molecular Nutrition & Food Research* 2009;53:1376-1385.
54. Ullah MF et al. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. *Molecular Nutrition & Food Research* 2011;55:553-559.
55. Vashchenko G, MacGillivray RTA. Multi - Copper oxidases and Human Iron Metabolism. *Nutrients* 2013;5:2289-2313.
56. Wang T, Guo Z. Copper in Medicine: homeostasis, Chelation Therapy and Antitumor Druh Design. *Current Medicinal Chemistry* 2006;13:525-537.



57. Wijmenga C, Klomp LW. Molecular regulation of copper excretion in the liver. Proceedings of the Nutrition Society 2004;63:31-39.