

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY**



INTERAKCE TAMARIXETINU A ISORHAMNETINU S MĚDÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

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

Hradec Králové, 2019

Zuzana Lomozová

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



INTERACTIONS OF TAMARIXETIN AND ISORHAMNETIN WITH COPPER

DIPLOMA THESIS

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

Hradec Králové, 2019

Zuzana Lomozová

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové

Dne _____

Zuzana Lomozová

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce paní PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D., za odborné vedení diplomové práce, za pomoc a cenné rady při experimentálním měření v laboratoři, poskytnuté materiály a především za trpělivost a čas, který mi během vypracovávání diplomové práce věnovala.

Dále bych ráda poděkovala celé Katedře farmaceutické botaniky za poskytnutí laboratoře a potřebného vybavení k naměření výsledků. Tato práce vznikla za podpory grantu: GAUK 1080217 C.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za její podporu a pochopení během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	MĚĎ.....	9
3.1.1	Měď jako chemický prvek.....	9
3.1.2	Měď jako biogenní prvek.....	9
3.1.3	Měď v lidském těle	9
3.1.4	Příjem mědi potravou.....	12
3.1.5	Metabolismus mědi.....	13
3.1.6	Nedostatek mědi	14
3.1.7	Toxicita mědi	15
3.1.8	Nemoci související s mědí.....	16
3.1.9	Chelatace mědi	24
3.2	FLAVONOIDY	25
3.2.1	Rozdělení flavonoidů	25
3.2.2	Metabolismus flavonoidů.....	28
3.2.3	Účinky flavonoidů	28
3.2.4	Kvercetin a jeho metabolity.....	33
3.2.4.1	Isorhamnetin	34
3.2.4.2	Tamarixetin.....	35
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1	MATERIÁL.....	37
4.2	CHEMIKÁLIE	37
4.3	TESTOVANÉ LÁTKY.....	37
4.4	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	38
4.5	VYUŽÍVANÉ PROGRAMY.....	38
4.6	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ	38
4.7	KONTROLNÍ ZKOUŠKA ZÁKLADNÍCH ROZTOKŮ MĚDI	39
4.8	KALIBRACE MĚĎNATÝCH IONTŮ	40
4.9	CHELATACE IONTŮ MĚDI HEMATOXYLINEM	42
4.10	CHELATACE MĚĎNÝCH IONTŮ V PUFRU	43
4.11	CHELATACE MĚĎNATÝCH IONTŮ V PUFRU	44
4.12	REDUKCE MĚĎNATÝCH IONTŮ V PUFRU	45

4.13	STATISTICKÁ ANALÝZA	46
5	VÝSLEDKY	47
5.1	KALIBRAČNÍ KŘIVKA	47
5.2	CHELATAČNÍ AKTIVITA TESTOVANÝCH LÁTEK – HEMATOXYLIN.....	47
5.2.1	Tamarixetin.....	48
5.2.2	Isorhamnetin	48
5.3	KONFIDENČNÍ INTERVALY.....	48
5.3.1	Konfidenční intervaly pH 5.5	49
5.3.2	Konfidenční intervaly pH 6.8	49
5.3.3	Konfidenční intervaly pH 7.5	49
5.4	CHELATAČNÍ AKTIVITA TESTOVANÝCH LÁTEK – BATHOCUPROIN	50
5.4.1	Tamarixetin.....	50
5.4.2	Isorhamnetin	51
5.5	KONFIDENČNÍ INTERVALY.....	52
5.5.1	Konfidenční intervaly pH 4.5	52
5.5.2	Konfidenční intervaly pH 5.5	53
5.5.3	Konfidenční intervaly pH 6.8	54
5.5.4	Konfidenční intervaly pH 7.5	54
5.6	REDUKČNÍ AKTIVITA TESTOVANÝCH LÁTEK.....	55
5.6.1	Tamarixetin.....	55
5.6.2	Isorhamnetin	56
5.7	KONFIDENČNÍ INTERVALY KŘIVKY LINEÁRNÍ REGRESE.....	57
5.7.1	Konfidenční intervaly křivky lineární regrese pH 4.5	57
5.7.2	Konfidenční intervaly křivky lineární regrese pH 5.5	58
5.7.3	Konfidenční intervaly křivky lineární regrese pH 6.8.....	58
5.7.4	Konfidenční intervaly křivky lineární regrese pH 7.5	59
6	DISKUZE.....	60
7	ZÁVĚR.....	63
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	65
9	POUŽITÁ LITERATURA	66
10	ABSTRAKT.....	73
11	ABSTRACT.....	74

1 ÚVOD

Měď je biogenní stopový prvek, který se v lidském těle vyskytuje v množství 70-80 mg. Během života se uvedené množství mění a závisí na pohlaví a věku. Měď má nepostradatelnou funkci, je složkou několika esenciálních enzymů a účastní se metabolických dějů a redoxních reakcí v organizmu. Pro správné fungování těla je důležitá její homeostáza. Jak nadbytek, tak nedostatek mědi může vést ke vzniku patologických stavů.

Toxické působení mědi je dáno její účastí na vzniku vysoce reaktivních forem kyslíku. Měďnaté ionty se redukují na měďné ionty, které jsou schopny katalyzovat tvorbu hydroxylových radikálů. Oxidativní stres přispívá ke vzniku patologií, jako je rakovina nebo onemocnění nervové soustavy.

K léčbě nadbytku a akumulace mědi v těle lze použít chelatační terapii. Chelatační činidla tvoří komplexy s toxickými kovy a zvyšují jejich vylučování. V současné době se tato léčba využívá u Wilsonovy choroby.

Flavonoidy jsou polyfenolické látky, které patří mezi sekundární metabolity rostlin. Jsou nedílnou součástí lidské stravy. Významným zdrojem je ovoce a zelenina, čokoláda, červené víno nebo čaj. Flavonoidy mají pozitivní vliv na naše zdraví. Působí antioxidantně, antimikrobiálně, protizánětlivě, protinádorově, vazoaktivně a hepatoprotektivně. Jejich antioxidantní aktivita je spojena se schopností chelatovat přechodné kovy, zejména železo a měď. Mohou mít také negativní prooxidační vlastnosti, které souvisí se schopností redukovat kovové ionty, čímž se podporuje vznik volných radikálů. Z uvedených důvodů je tato diplomová práce zaměřena na stanovení měď-chelatační a redukční aktivity vybraných flavonoidů – tamarixetinu a isorhamnetinu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je zjistit, zda a jak interagují vybrané flavonoidy (tamarixetin a isorhamnetin) s mědí, především stanovit jejich měď-chelatační a redukční aktivitu v prostředí různých (pato)fyziologicky významných pH. Dále pak odvodit vztah mezi strukturou flavonoidů a jejich měď-chelatační a redukční aktivitou.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Měď

Měď je ušlechtilý kov červené barvy. Chemická značka Cu vychází z latinského názvu Cuprum. Snadná tvárnost, odolnost proti korozi, vysoká tepelná a elektrická vodivost činí měď jedním z nejoblíbenějších kovů pro průmyslové využití. Používá se jako čistý kov nebo v podobě slitin. V přírodě se vyskytuje jak v elementární formě, tak v široké škále sloučenin. Koncentrace Cu v půdě je přibližně 50 ppm. Do vzduchu se uvolňuje jak z přírodních zdrojů (sopky, prach, lesní požáry), tak z člověkem vytvořených zdrojů (hutě, ocelárny, komunální spalovny). Obsah v atmosféře se pohybuje v rozmezí od 5 do 20 ng/m³ a voda v přírodě má průměrnou koncentraci 4 až 10 µg/l [1].

3.1.1 Měď jako chemický prvek

V periodické soustavě prvků se nachází mezi přechodnými kovy ve 4. periodě, I. B skupině a má atomové číslo 29. Její elektronová konfigurace je [Ar] 3d¹⁰ 4s¹. V přírodě se nejčastěji vyskytuje ve třech hlavních oxidačních stavech, jako ryzí kov (Cu⁰), Cu(I) a Cu (II) [2]. Povrchově se oxiduje vzduchem a poskytuje zelený povlak hydroxouhličitanu a hydroxosíranu. Povlak se snadno rozpouští v kyselině sírové, kyselině dusičné, amoniaku a kyanidu draselném za přístupu vzduchu [3].

3.1.2 Měď jako biogenní prvek

Je známo celkem 28 biogenních prvků, které v živých organismech tvoří organické a anorganické sloučeniny. Podle průměrného zastoupení se dělí na makroelementy a mikroelementy. Měď spolu s ostatními 16 prvky patří mezi mikroelementy neboli stopové prvky, které se v živých systémech vyskytují ve velmi malém množství [4]. Po železe a zinku je třetím nejhojněji zastoupeným stopovým prvkem v lidském těle [5]. V biologických systémech se měď nejčastěji vyskytuje v oxidačním stavu Cu (II). Ovlivňuje enzymovou aktivitu jako kofaktor a jako alosterická složka několika cuproenzymů. Také se podílí na regulačních mechanismech genetické exprese cílových genů [6].

3.1.3 Měď v lidském těle

Lidský organismus obsahuje 70-80 mg mědi. Jako stopový prvek můžeme měď nalézt v téměř každé buňce našeho těla. Nejvyšších koncentrací dosahuje v mozku, játrech, centrálním nervovém systému a srdci. Asi 50 % obsahu mědi je uloženo v kostech a svalch.

V průběhu roku se množství mědi mění a závisí na pohlaví a věku. Tyto změny souvisí s významnými rozdíly v koncentraci **ceruloplasminu** (CP), který je hlavním nosičem mědi v krvi [7]. Jde o plazmatický alfa-2-glykoprotein, známý také jako "modrý protein" s molekulovou hmotností okolo 132 kDa. Modrá barva je typická pro proteiny bohaté na měď. Molekula ceruloplasminu silně váže šest atomů mědi. Vzniká v hepatocytech, kde dochází k zabudování mědi do CP a následnému uvolnění z jater do plazmy. Váže až 90 % plazmatické mědi a zprostředkovává její dostupnost do tkání. Koncentrace mědi v séru dospělého člověka je 11-22 $\mu\text{mol/l}$. U novorozenců je koncentrace v rozmezí 3-10 $\mu\text{mol/l}$. U těhotných žen je fyziologicky zvýšená produkce ceruloplasminu, která je příčinou zvýšené koncentrace Cu v krvi.

CP se uplatňuje také jako antioxidant. Katalyzuje oxidaci železnatých iontů (Fe^{2+}) na železité (Fe^{3+}) a brání vzniku nebezpečného hydroxylového radikálu, který vzniká Fentonovou reakcí (**Rov. 1**) [8,9].



Rovnice 1: Fentonova reakce [8]

CP zde působí jako feroxidasa. Tato aktivita se zvyšuje při zánětech a infekcích. Jedná se o reaktant akutní fáze [8,9]. Feroxidasa se významně podílí na metabolismu železa. Zajišťuje oxidaci dvojmocného železa na trojmocné. Železité ionty se dále váží na protein transferin a slouží k syntéze hemoglobinu a krvetvorbě [7].

Hefestin je homolog ceruloplasminu a má některé jeho vlastnosti. Jedná se o transmembránový protein o velikosti 134 kDa. Má feroxidasovou aktivitu a podílí se na vstřebávání železa ze střeva [10].

Měď je funkční složkou několika esenciálních enzymů. Jedním z nich je **cytochrom-c-oxidasa**, která je terminální oxidasou ve většině aerobních organismů. Nachází se na vnitřní straně mitochondriální membrány a jedná se o důležitou složku dýchacího řetězce. Katalyzuje redukci molekulárního kyslíku na vodu, při čemž cytochrom-c-oxidasa generuje elektrický gradient, který je využíván mitochondriemi k vytváření energie pro buňku, jež se poté ukládá v podobě ATP [7,10].

Dalším neméně významným enzymem, závislým na mědi je **lysyloxidasa**. Hraje důležitou roli při tvorbě pojivových tkání. Podílí se na vzniku příčných vazeb mezi vlákny kolagenu a elastinu. Zachovává elasticitu pojivové tkáně v srdci a krevních cévách [7,11].

Mnoho reakcí, které jsou nezbytné k správnému fungování mozku a nervové soustavy je katalyzováno enzymy s mědí [7]. **Monoaminoxidasa A** (MAO A) a **monoaminoxidasa B** (MAO B) jsou enzymy vnější mitochondriální membrány, které se podílí na metabolismu neurotransmiterů. Jejich funkcí je katalyzovat oxidační deaminaci serotoninu, dopaminu a noradrenalinu. Oba tyto enzymy se používají jako farmakologické cíle léčiv ze skupin antidepresiv nebo neuroprotektivních látek. MAO A a MAO B mají podobnou katalytickou aktivitu, ale vzájemně se liší v substrátové specifitě a distribuci v tkáních [12].

Enzym **tyrosinasa** patří také do skupiny enzymů obsahujících měď. Nachází se v melanocytech, buňkách produkujících melanin, kde je nezbytná pro jeho tvorbu. Melanin je jeden z nejrozšířenějších kožních pigmentů. Barva kůže, vlasů a očí je dána řadou faktorů. Mezi nejvýznamnější patří právě distribuce melaninu. Melaniny jsou heterogenní polyfenolové biopolymery, které mohou mít širokou škálu barev [13].

Superoxiddismutasa (SOD) je významný antioxidační enzym. Katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu tzv. volného radikálu na méně škodlivý peroxid vodíku, který může být následně redukován dalšími antioxidačními enzymy na vodu. U lidí se nachází tři typy SOD. Dva z nich obsahují měď. SOD1 obsahující měď a zinek je přítomna ve většině buněk organismu, včetně červených krvinek. SOD2 je extracelulární, měď obsahující enzym, který můžeme najít ve velkém množství v plicích a v nízké koncentraci v plazmě. Enzymy s mědí se podílí také na regulaci genové exprese. Množství mědi v buňkách může ovlivnit syntézu proteinů organismem, indukci nebo inhibici transkripce cílových genů. Mezi enzymy ovlivňující expresi genů patří právě SOD (obsahující měď a zinek) [7].

Metalothioneiny (MT) jsou proteiny obsahující 61 aminokyselin, z toho 20 cysteinů. Jsou schopny pevně vázat dvojmocné kovové ionty kromě Fe^{2+} iontů. Charakteristickou funkcí dané skupiny proteinů je uzavřít kovové ionty v neškodné formě, pokud jsou přítomny v nadměrném množství. Fungují jako ochrana pro buňku. Jejich expresi zvyšují i některé další faktory, zejména hormony glukagon a kortizol nebo činidla indukující zánět a reakci akutní fáze. MT vážou hlavně ionty Zn, Cu a Cd, ale mohou vázat také Hg, Ag nebo Ni. Nicméně ionty Cu jsou vázány nejpevněji a mohou tyto ostatní ionty vytěsnit [10].

Tabulka 1: Enzymy obsahující měď u savců [10]

Enzym	Funkce
Cytochrom-c-oxidasa	Elektronový transport v mitochondriích
Cu/Zn – SOD	Detoxikace volných radikálů
Metalothionein	Skladování přebytečné mědi a jiných iontů dvojmocných kovů (kromě Fe ²⁺), možný donor Cu k určitým apoproteinům
Ceruloplasmin	Feroxidasa, podporuje přenos Fe z jater do krve, reaktant akutní fáze, transport Cu
Lysyloxidasa	Zesíťování kolagenu a elastinu
Tyrosinasa	Tvorba melaninu
Monoaminoxidasa	Produkce katecholaminů
Hefestin	Feroxidasa, pomáhá vstřebávat železo, homolog ceruloplasminu
Angiogenin	Indukce tvorby cév
Faktory srážení krve V a VII	Srážení krve

3.1.4 Příjem mědi potravou

Měď je pro tělo nezbytným esenciálním prvkem. Organismus si ho neumí vytvořit sám, a proto musí být přijímán potravou. Jedná se o stopový prvek. Potřebný příjem je ve velmi malém množství [14]. Průměrná strava obyvatel západních zemí obsahuje 0,6 až 1,6 mg Cu denně. A pokryje nezbytný denní příjem.

Mezi potraviny bohaté na obsah mědi patří především mořské plody a vnitřnosti, hlavně játra. V běžném masu je koncentrace menší. Z rostlinné potravy se jedná o obiloviny, ořechy a v menší míře o ovoce a zeleninu. Zdrojem je pro nás také Cu obsažená ve vodě. V neznečištěné pitné vodě je velmi málo mědi. V mořské vodě je koncentrace vyšší a zvětšuje se s přibývajícím hloubkou, což se projevuje například v koncentraci mědi u ryb a měkkýšů lovených ze dna oceánů. Většina mědi v potravě živočišného i rostlinného původu je pevně vázána na proteiny.

Absorpce Cu probíhá především v tenkém střevě, poté co je potrava natrávena v žaludku a dvanáctníku [15]. Rychlost absorpce závisí na několika faktorech: věk, pohlaví, typ potravy, množství mědi v přijímaném jídle nebo užívání perorální antikoncepce, od čehož se odvíjí míra absorpce, která může být mezi 12 až 71 % [14]. Účinnost absorpce kovových iontů je poměrně vysoká a věkem se výrazně nemění [15].

Tabulka 2: Obsah mědi ve vybraných potravinách [14]

Potravina	Cu (mg/kg)
<u>Mléko a mléčné výrobky</u>	
-mléko	0,1-0,88
-čerstvý sýr	0,03
-zpracovaný sýr	0,025
<u>Maso a droby</u>	
-játra, hovězí	157
-ledviny, hovězí	2,1-4,3
-svalové maso, hovězí	0,1-1,8
-svalové maso, vepřové	0,1-9,1
<u>Obilné výrobky</u>	
- kukuřičné potraviny	0,6-16,6
-pšeničný chléb	2,9
-celozrnný pšeničný chléb	3,4
-celozrnné těstoviny	0,08-0,52
<u>Ovoce a zelenina</u>	
-brambory	0,48-16,0
-mrkev	0,37-0,62
-zelí	0,1-7,7
-jablka	0,1-2,3
-banány	0,7-3,0
<u>Mořské plody</u>	
-ústřice	0,3-16,0
-tuňák	0,1-1,2
-losos	0,5-0,8
-krevety	2,0-2,9

3.1.5 Metabolismus mědi

Obecně platí, že jediným způsobem, kterým měď vstupuje do organismu, je přes zažívací trakt. Za normálních podmínek neprochází přes kůži. Výjimkou jsou aplikace specifických mastí s vysokou koncentrací mědi nebo měděné šperky. Poté může dojít k absorpci několika mikrogramů denně. Aby k ní došlo, musí být splněny specifické podmínky, při kterých dochází k tvorbě komplexů glycin-měď, rozpustných v potu.

Po natrávení potravy dochází k absorpci mědi do buněk střevní sliznice. Přechod mukózní bariérou probíhá prostou difuzí nezávisle na energii. Následuje přenos přes bazolaterální membránu do intersticiální tekutiny a do krve. Transfer přes bazolaterální membránu probíhá omezenou rychlostí a je zprostředkován satureovatelným, energeticky závislým mechanismem. Dochází zde k soutěži o absorpci mezi mědí a jinými ionty přechodných kovů. Abnormálně vysoká koncentrace zinku nebo železa v potravě může snížit množství vstřebané mědi. Po vstupu do krevní plazmy nebo intersticiální tekutiny se měď

váže na dva proteiny, albumin a transkuprein. Většina takto vázané mědi se rychle ukládá do jater. Pouze malé množství putuje do ledvin. V hepatocytech následně dochází k zabudování iontů mědi do ceruplasminu, který slouží jako transportér Cu do dalších tkání [15].

Homeostázu mědi zajišťují játra. Regulují vylučování žlučí. Jde o jediný fyziologický mechanismus exkrece. Měď se v žluči vyskytuje jako neabsorbovatelný komplex, a proto už nedochází k jejímu enterohepatálnímu oběhu [16]. K minimálním ztrátám močí dochází z toho důvodu, že se v krevní plazmě téměř nevyskytuje volná forma mědi. Veškeré komplexy s nízkou molekulovou hmotností, které by mohly být filtrovány glomeruly, jsou opětovně reabsorbovány. Koncentrace mědi v žluči dospělého člověka se pohybuje kolem 4 µg/g. V moči je to pouhých 0,02-0,05 µg/g [15].

3.1.6 Nedostatek mědi

Měď se nachází ve velké škále běžně užívaných potravin, proto není u většiny obyvatel obvyklé, aby docházelo k jejímu deficitu. Za určitých okolností můžeme nedostatek pozorovat u pár jedinců. Zvýšené riziko je u předčasně narozených dětí, u osob s nedostatečným příjmem mědi z potravy, u malabsorpčního syndromu, nebo pokud dochází k nadměrným ztrátám.

Deficit z nedostatečného příjmu může nastat u pacientů, kteří jsou dlouhodobě odkázáni na totální parenterální výživu. I přes skutečnost, že se dnes jedná o známý jev a do většiny infuzních vaků je měď přidávána, se takové případy stále objevují. Na vině je změna koncentrace přípravku, která může vzniknout náhodnou kontaminací směsí. Ke stejnému problému může dojít také u novorozenců, kteří jsou po narození krmeni primárně kravským mlékem. Zejména pokud se jedná o předčasně narozené děti a děti s nízkou porodní váhou. Předčasně narozené děti jsou na rozdíl od dětí narozených v termínu v daleko větším riziku i z důvodu, že zásoby mědi se vytváří v posledním trimestru těhotenství. Přenosem mědi přes placentu se u plodu vytváří zásoby menší než 15-17mg. Takové množství Cu uložené v játrech tvoří rezervu v raném období postnatálního života kojence a poskytuje ochranu před vznikem deficitu.

Další příčinou může být malabsorpce. Často jde o následek přítomnosti patologických stavů: celiakie, syndromu krátkého střeva, cystické fibrózy, tropické sprue, průjmových onemocnění nebo gastrektomie. Jedním z nejdůležitějších klinických faktorů předurčujících malabsorpci Cu, je nadměrný příjem zinku, který způsobují podobné fyziologické vlastnosti

mezi mědí a zinkem [17]. Vysoký příjem zinku nebo vysoký molární poměr zinku k mědi v potravě snižuje vstřebané množství Cu. Zinkem vyvolaný nedostatek mědi se objevuje v případech, kde byl terapeuticky hojně podáván při léčbě jiných nemocí. K projevům deficitu mědi patří anémie, granulocytopenie, abnormality kostní dřeně a snížená sérová koncentrace mědi a ceruloplasminu [17,18]. Uvedené antagonistické působení bylo zaznamenáno také mezi železem a mědí. Riziko malabsorpce mědi může nastat u kojenců s nízkou porodní váhou, kteří dostávají vysoké dávky železa v doplňcích stravy. Problém může být i u těhotných žen, užívajících vitamínové a minerální přípravky s vysokou koncentrací železa. Právě během těhotenství je potřeba mědi zvýšená a její nedostatečné vstřebávání může vést až k deficitu. Výsledkem dlouhotrvající malabsorpce může být až hypokuprémie. Klinickými příznaky je porucha vývoje, depigmentace vlasů a kůže, bledost, křehkost cévních stěn, kostní léze, osteopenie a v některých případech také leukopenie, neutropenie a anémie.

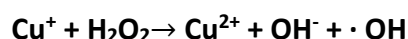
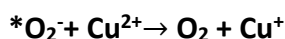
K nadměrným ztrátám mědi může docházet za různých klinických okolností. U pacientů s nefrotickým syndromem může docházet ke ztrátám ceruloplasminu močí. Také během peritoneální dialýzy můžou být zaznamenány nadměrné ztráty způsobené dialyzační výměnou. Ztráty prostřednictvím kůže se objevují u rozsáhlých popálenin. Příčinou mohou být také iatrogenní faktory. Ukázalo se, že dlouhodobá léčba glukokortikoidem dexamethasonem narušuje metabolismus mědi u předčasně narozených dětí. Byl také zaznamenán případ jinak zdravé ženy, která dlouhodobě užívala spolu s běžnou stravou až 15 tablet antacid denně. Antacida obsahují oxidy, které za alkalického pH precipitují měďnaté soli. Požití velkého množství antacid může vyvolat sekundární nedostatek mědi snížením biologické dostupnosti mědi z potravy. Je pravděpodobné, že metabolismus mědi ovlivňuje i mnoho dalších léků [17].

3.1.7 Toxicita mědi

Chronická toxicita mědi primárně ovlivňuje játra, protože jsou prvním místem ukládání Cu po vstupu do krve. Typickým projevem je vývoj jaterní cirhózy s epizodami hemolýzy, poškození renálních tubulů, mozku a dalších orgánů. Symptomy mohou vyústit v kóma, jaterní cirhózu, cévní kolaps a končit až smrtí. Konzumace vody nebo potravin kontaminovaných mědí je spojena s vývojem akutních gastrointestinálních příznaků. Akutní otrava Cu se může z počátku projevit jako slabost, letargie a anorexie. Stejně tak může mít za

následek erozi epiteliální výstelky gastrointestinálního traktu, hepatocelulární nekrózu jater a akutní tubulární nekrózu ledvin. Odhadovanou letální dávkou u dospělých je asi 10-20 g [19].

Toxické působení mědi spočívá v její účasti na vzniku kyslíkových radikálů. Jedná se o vysoce reaktivní formy kyslíku, které se podílí na peroxidaci lipidů v membránách, přímé oxidaci proteinů a štěpení DNA a RNA molekul [10]. V přítomnosti superoxidu ($*O_2^-$) nebo redukčního činidla se měďnaté ionty (Cu^{2+}) redukují na měďné ionty (Cu^+), které jsou schopny katalyzovat tvorbu hydroxylových radikálů z peroxidu vodíku. Mechanismus produkce probíhá dle Haber-Weissovy reakce (**Rov. 2**) [19].



Rovnice 2: Haber-Weissova reakce [19]

Hydroxylový radikál je pravděpodobně nejsilnější oxidační radikál, který vzniká v biologických systémech. Je schopný reagovat s prakticky každou biologickou molekulou a iniciovat oxidační poškození [19]. Jeho působení je hlavním faktorem přispívajícím ke vzniku patologií jako je rakovina, onemocnění nervové soustavy a stárnutí organismu [10].

3.1.8 Nemoci související s mědí

Onemocnění metabolismu mědi může být způsobeno genetickými poruchami, které vedou k narušení citlivé homeostázy Cu udržované v organismu. Mezi nejlépe prozkoumané a objasněné poruchy homeostázy patří Wilsonova choroba a Menkesova nemoc [20]. Zatímco Menkesův syndrom vede k nedostatku, u Wilsonovy choroby dochází k přetížení těla mědí a její toxicitě [15].

Wilsonova choroba (WD) je autozomálně recesivně dědičná porucha metabolismu mědi v játrech [21]. Jako syndrom ji poprvé popsal Kinnier Wilson v roce 1912 [22]. Nemoc vzniká mutací genu ATP7b, který kóduje ATPasu P-typu transportující měď [21]. Bylo identifikováno více než 500 mutací kauzálního genu ATP7b. Většina z nich jsou missense mutace (mutace měnící smysl), způsobené malou delecí nebo inzercí v kódující oblasti genu. Méně časté jsou úplné delece exonů, mutace promotorové oblasti genu a mnohočetné mutace [23]. U pacientů ze střední a východní části Evropy je nejčastější H1069Q mutace v exonu 14 [24]. Gen ATP7b zodpovědný za Wilsonovu chorobu je umístěn na chromozomu 13 a je vysoce exprimován v játrech, ledvinách a placentě. Má dvojí roli, syntetickou a vylučovací. Jeho funkcí dochází k začlenění Cu do plazmatického proteinu

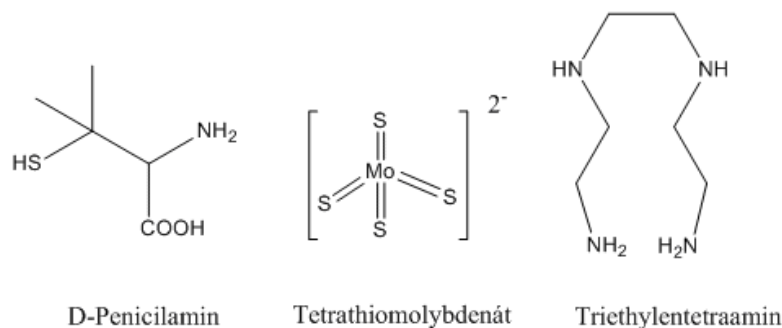
ceruloplasminu a vylučování přebytečné mědi do žluče [22]. Defektem tohoto genu nemůže probíhat vylučování mědi žlučí a akumuluje se v organismu [21].

Nemoc se z počátku projevuje jako chronické onemocnění jater, později jako neurologické poškození, které vzniká v důsledku hromadění mědi v tkáních, zejména v játrech a v mozku. Incidence se u většiny populací odhaduje na 1:30.000. Pokud není u WD zahájena léčba, může být i smrtelná [24]. Mezi klinické projevy WD související s poruchou jater patří trvalé zvýšení jaterních aminotransferas, chronická hepatitida, cirhóza a hemolytická anémie. Neurologické příznaky jsou přítomny u 40-50% pacientů. Projevují se jako akineticko-rigidní syndrom podobný Parkinsonově nemoci, třes, poruchy chůze, nedostatečná koordinace pohybů, slzení, dystonie a spasticita. Může docházet také k častým migrénám, bolestem hlavy a nespavosti. Spolu s behaviorálními změnami jsou psychiatrickými příznaky WD deprese, úzkost a psychóza.

Typickým pozorovatelným symptomem je změna vzhledu očí. Nálezem může být Kayserův-Fleischerův (K-F) prstenec nebo katarakta ve tvaru slunečnice. Oba nálezy jsou reverzibilní terapií nebo po transplantaci jater. K-F prstenec je nejlépe viditelný na okraji rohovky. Vzniká ukládáním mědi na vnitřní povrch rohovky do Descementovy membrány. Má zlatavě hnědou barvu a může být viditelný pouhým okem. Dalšími méně častými projevy může být noční slepota, optická neuritida nebo bledost optického disku [22]. Pro stanovení diagnózy je obvykle dostačující přítomnost K-F prstence a sérová koncentrace CP nižší než 0,1 g/l. Nicméně až u poloviny pacientů s jaterním postižením jako hlavním znakem choroby může K-F prstenec chybět. Nebo není dobře vidět, zejména u tmavých očí [23]. Za normální laboratorní hodnoty ceruloplasminu v séru se považují koncentrace v rozmezí 0,2-0,5 g/l. Až 95 % homozygotů a 20 % asymptomatických heterozygotů mají hodnoty sérového CP nižší než 0,2 g/l. 5 % homozygotů má normální sérové koncentrace. Příčinou může být, že CP je reaktant akutní fáze a jeho hladiny mohou být zvýšeny do normálních hodnot zánětem.

K diagnostice lze využít i stanovení obsahu mědi v játrech. Normální obsah mědi je menší než 55 $\mu\text{g/g}$ sušiny. U homozygotů je obvyklá koncentrace větší než 250 $\mu\text{g/g}$. U WD je zvýšená také 24 hodinová exkrece mědi močí. Měď v moči pochází z tzv. volné mědi cirkulující v plazmě, nenavázané na ceruloplasmin. Pokud je koncentrace větší než 100 $\mu\text{g}/24$ hod lze ji brát jako významnou pro stanovení diagnózy. Referenční limity pro normální exkreci se mezi laboratořemi liší. Většina užívá jako horní mez 40 $\mu\text{g}/24$ hod [22].

Léčba Wilsonovy choroby je celoživotní. Nelze ji kontrolovat jen nízkým příjmem Cu v potravě. V ideálním případě by léčba měla mít dvě fáze: počáteční, akutní léčbu a následně udržovací léčbu. Úprava dávky při udržovací léčbě pomáhá předcházet předávkování, které by mohlo vést až k deficitu mědi. Strategie léčby zahrnuje podávání chelátorů mědi (**Obr. 1**): D-penicilaminu, trientinu, tetrathiomolybdenátu nebo solí zinku. Chelatační činidla váží měď přímo v krvi a v tkáních a usnadňují její vylučování. Zinek narušuje vstřebávání Cu ze střeva. Zabraňuje tak akumulaci další mědi, ale má nižší potenciál mobilizovat měď z tkání, které jsou již přetíženy. Pokud navzdory adekvátní léčbě nedochází u neurologických pacientů ke zlepšení, lze podat symptomatickou léčbu. Typické jsou botulotoxinové injekce při dystonii nebo primidon proti tremoru [23].



Obrázek 1: Struktura chelátorů mědi [48]

Menkesova nemoc (MD) je recesivně dědičná porucha metabolismu mědi, vázaná na chromozom X. Proto postihuje především chlapce. Obvykle má závažný klinický průběh a končí smrtí [25]. Je způsobena mutacemi v genu kódujícím ATP7A, ATPasu P-typu transportující měď. Mutace můžou být způsobeny malými insercemi, malými nebo velkými deletcemi nebo se může jednat o nesmyslné a missense mutace. Výskyt MD je v rozmezí 1:100.000 až 1:250.000 živě narozených dětí. ATP7A je monomerní protein obsahující 1500 aminokyselin. Často je nazývaný také jako Menkesův protein. V organismu má dvojí funkci. Využívá energii z ATP k transportu mědi z cytosolu, čímž udržuje hladinu intracelulární mědi a působí při začlenění Cu do kuproenzymů. Ztráta aktivity tohoto proteinu vede k neschopnosti mědi opustit enterocyty, a tak dochází k její akumulaci ve střevě a vzniku nedostatku mědi v organismu.

Mnoho příznaků MD může být způsobeno nedostatečnou funkcí enzymů závislých na mědi [26]. MD je progresivní neurodegenerativní onemocnění, projevující se abnormalitou pojivové tkáně a typickým vzhledem vlasů. Většina pacientů má vážnou klasickou formu, která vede ke smrti v raném dětství, obvykle před třetím rokem života.

Mírnější formou Menkesovy choroby je syndrom occipital horn (OHS). Jeho hlavní klinické projevy souvisí s pojivovou tkání. Charakteristické pro něj jsou symetrické exostózy vyčnívající směrem dolů z okcipitální kosti. Průběh těhotenství je obvykle normální. Po narození může kůže vypadat vrásčitá a povolená. Nebo může být přítomna pupeční a tříselná kýla. Postupně se vyvíjí hypotermie, žloutenka, hypotonie a může docházet k problémům při krmení. Prvními příznaky, které obvykle přivedou dítě k lékaři, bývají neústupné průjmy a recidivující infekce močových cest. Předpokládaná délka života je u OHS různá, je ale podstatně delší než u MD [27].

Diagnostikovat klasickou formu MD nebývá obtížné. Diagnóza se stanovuje na základě klinických příznaků, jako je nízká hladina sérové mědi a ceruloplasminu a charakteristické radiologické změny. Dále může být potvrzena pomocí biochemických nálezů nebo lze provést diagnostiku na bázi DNA. Při perorálním nebo rektálním užívání mědi nedochází ke zlepšení hladiny Cu v séru. Měď je nutno podat intravenózně nebo subkutánně a obejít tak poškozenou střevní absorpci. Existuje v různých formách, jako je například komplex měď-histidin, měď-acetát nebo měď-ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA). Žádná z těchto látek není adekvátně prospěšná při léčbě neurologického poškození, ale zlepšují sérové hladiny mědi a ceruloplasminu. Mezi dostupnými sloučeninami mědi se komplex měď-histidin ukázal jako nejefektivnější, a využívá se proto při terapii. Je důležité zahájit léčbu co nejdříve. Pokud je podávání měď-histidinu započato již u plodu *in utero* nebo u novorozenců, může se zabránit vzniku neurologického poškození [28]. Pozitivní výsledek doplňování měď-histidinu závisí na časně iniciaci a přítomnosti alespoň částečně funkčního ATP7A proteinu. Nicméně nelze touto léčbou zabránit vzniku poruch pojivové tkáně a změně kostí [25].

Aceruloplasminémie je autosomálně recesivní porucha související se specifickými mutacemi v genu ceruloplasminu [29]. Jedná se o dědičnou poruchu metabolismu železa, způsobenou úplným nedostatkem ceruloplasminu a jeho feroxidasové aktivity. Navzdory nízkému obsahu železa v séru dochází k jeho akumulaci v mozku a viscerálních orgánech [30]. V bazálních gangliích vede masivní akumulace k rozsáhlé ztrátě neuronů. Zvýšená koncentrace železa v mozku je spojena se zvýšenou lipidovou peroxidací a vede k silnějšímu oxidačnímu stresu, který způsobuje smrt neuronálních buněk.

Charakteristickým neuropatologickým nálezem jsou zvětšené nebo deformované astrocyty a globulární struktury [30]. Klinicky se choroba projevuje charakteristickou triádou:

neurologickým onemocněním, degenerací sítnice a diabetem mellitem. Neurologické symptomy zahrnují nedobrovolné pohyby, ataxii a demenci [31].

Aceruloplasminémie je fatální onemocnění, včasná diagnóza a včasné zahájení léčby jsou pro pacienty velmi důležité. K symptomatickému snižování hladin železa v tkáních se používá vysoce afinitní chelátor železa deferoxamin. Prostupuje hematoencefalickou bariérou a podporuje vylučování přebytečného železa z organismu [29]. Deferoxamin je siderofor, látka schopná vázat železo, produkovaná bakterií *Streptomyces pilosus*. Po perorálním podání se špatně vstřebává a rychle vylučuje, proto je nutné ji podávat subkutánně nebo intravenózně. Jedna molekula deferoxaminu se váže s jedním atomem železa. Vzniklý komplex je metabolicky inertní. Komplexy s plazmatickým železem jsou vylučovány převážně ledvinami. Po absorpci deferoxaminu játry dochází k chelataci hepatocelulárního železa a exkreci žlučí. Léčba chelatačními činidly podporuje eliminaci přebytečného železa z buněk a pomáhá udržovat jeho bezpečnou hladinu [32]. Snížení tělesných zásob vede ke zlepšení stavu diabetu a ke zmírnění neurologických příznaků [29].

Neurodegenerativní onemocnění (ND), jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, prionová onemocnění a další, patří do heterogenní skupiny poruch, při kterých dochází k progresivní degradaci neuronálních systémů [33]. Společnými vlastnostmi je selektivní neuronální smrt, agregace proteinů, oxidační stres, mitochondriální dysfunkce, akumulace přechodných kovů a zánět [34]. Všechna uvedená onemocnění jsou známa již mnoho let, ale přesto na ně nebyla doposud objevena žádná účinná léčba. Pacienti postupně a nenávratně ztrácejí svou soběstačnost a jsou odkázáni na péči okolí. Onemocnění mohou být rodinného původu, jen 10-12 % má přesnou genetickou etiologii [33]. ND jsou spojena se stárnutím, ale jejich skutečná etiologie zůstává neznáma [34]. Většina případů vzniká sporadicky. Pouze prionová onemocnění mohou mít také infekční původ. Cílem výzkumu je identifikovat biologické mechanismy, které vyvolávají neurodegeneraci a na základě toho vyvinout efektivnější terapeutické strategie [33].

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní porucha, která je nejčastější příčinou vzniku demence v pozdním věku [35]. Na etiologii se podílí stárnutí, oxidační stres a hromadění kovových iontů v mozku. Nemoc se projevuje poruchou paměti, progresivním poklesem kognitivních funkcí a demencí. V současné době neexistuje úspěšná nebo preventivní léčba [34]. Pro vývoj jak sporadických, tak familiárních forem je zásadní akumulace proteinu amyloidu β ($A\beta$) [35]. $A\beta$ je stavební složkou senilních plaků a

neurofibrilárních klubek, což jsou hlavní neuropatické léze, které umožňují diagnostiku AD *post-mortem*. Senilní plaky jsou sférické, mnohobuněčné léze, které se obvykle nacházejí ve velkém počtu v limbickém systému. Dalším typem lézí jsou neurofibrilární klubka, která se hojně vyskytují v hipokampu, amygdale a entorhinální kůře [34,36]. Hromadění těchto nerozpustných agregátů v mozku je jednou z hlavních složek patogeneze AD. A β se skládá z 39-43 aminokyselin. Vzniká proteolýzou z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), transmembránového proteinu široce distribuovaného v mozku. Jeho funkce je stále neznámá. APP je štěpen skupinou enzymů zvaných sekretasy [34]. Mutace v tomto proteinu vedou k familiární AD s výrazným zvýšením akumulace A β v mozku. Přesné mechanismy degenerace neuronů nebyly doposud zcela objasněny. Zdá se, že akumulace A β vede ke zprostředkování volných radikálů a oxidativnímu poškození [35]. Studie zjistily, že za mírně kyselých podmínek může měď podporovat agregaci A β . Také bylo zjištěno, že APP váže a redukuje měď, a je proto možné, že je zapojen do transcelulárního transportu mědi. Poruchy APP při AD mohou přerušit normální přenos mědi v buňce. Navázaná měď se v přítomnosti H₂O₂ rychle reoxiduje a to doprovází fragmentace APP na jednotlivé peptidy, včetně A β . Může tak docházet ke zprostředkování agregace A β a zesílení oxidativního poškození volnými radikály [35].

Parkinsonova nemoc (PD) je druhou nejčastější neurodegenerativní poruchou na světě. Projevuje se především poruchou motoriky, jako je třes, rigidita, bradykineze a posturální nestabilita. Také mohou být zaznamenány behaviorální a kognitivní abnormality [34]. Jako první PD popsal James Parkinson v roce 1817. Jedná se o chronickou progresivní pohybovou poruchu, způsobenou ztrátou nigrostriatálních dopaminergních neuronů, což vede k deficitu dopaminu ve striatu. Nejpravděpodobnější příčinou vzniku je kombinace genetických predispozicí a faktorů vnějšího prostředí [37]. Podle některých studií se dá považovat za riziko pro rozvoj také vystavení přechodným kovům, zejména mědi a železu. Akumulace přechodných kovů v mozku naznačuje, že kovová homeostáza je během PD pozměněna [34]. Přesné mechanismy selektivních ztrát dopaminergních buněk nejsou známy. Určitou roli v patogenezi má mitochondriální dysfunkce a oxidační stres [38]. Spojení mezi oxidačním stresem a PD podporují postmortální analýzy, které objevily zvýšené markery oxidačního stresu v mozku pacientů. Kromě nich se na etiologii podílí také zánět a toxické působení oxidu dusnatého. Většina případů (90-95 %) vzniká sporadicky, zatímco případů rodinné etiologie je asi 5-10 %. Charakteristickým patologickým znakem PD je

přítomnost intracelulárních inkluzí, zvaných Lewyho tělíska. Skládají se z proteinu α -synukleinu (AS), který se ukládá uvnitř neuronů [37]. AS je 14 kDa velký protein exprimovaný převážně v centrálním nervovém systému. Jedním z účinků nerozpustných agregátů AS je oxidační poškození, které může způsobit až smrt neuronových buněk. Kinetika agregace AS je *in vitro* ovlivňována několika faktory, včetně přítomnosti některých kovových kationtů [39]. Analýza účinku různých kovových iontů ukázala, že hlinité, železité a měďnaté ionty urychlují oligomerizaci - shlukování jednotlivých molekul AS. Nejúčinnější jsou měďnaté ionty. U pacientů s PD byly také objeveny zvýšené koncentrace Cu^{2+} v mozkomíšním moku [40].

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je progredující neurodegenerativní onemocnění zatím neznámé etiologie. Prevalence se s věkem zvyšuje. Dochází zde k postupnému zániku centrálního a míšního motoneuronu se zachováním extraokulárních a sfinkterových svalů [41]. K degeneraci motorických neuronů vede mutace zesilující funkci cytosolického enzymu Cu/Zn-SOD1. Některé důkazy naznačují přímou patogenní roli mědi a zvýšené generování volných radikálů [39]. Bylo objeveno více než 50 mutací SOD1, které vedou ke vzniku ALS. Ve většině případů se jedná o missense mutace [35]. Klinickými projevy je slabost a pozvolná ztráta postižených svalů. Až 90 % všech případů vzniká sporadicky. Zbýlých 10 % jsou familiární formy, způsobené autosomálně dominantní dědičností [34]. U mužů se vyskytuje častěji než u žen. Typicky vzniká mezi 60. - 70. rokem života.

ALS se dělí na jednotlivé podtypy, které se od sebe liší prognózou. Jedná se o fatální onemocnění. Až 50 % pacientů zemře do 3 let od projevu prvních příznaků. Na začátku onemocnění může být obtížné stanovit diagnózu. Častými příznaky je porucha artikulace, obtížné polykání, svalová únava a úbytek hmotnosti v důsledku svalové atrofie [41]. Přesné mechanismy způsobující smrt motorických neuronů zůstávají neznámy. Mezi možné primární mechanismy se řadí toxické působení mutantní SOD1, včetně abnormální agregace proteinů, glutamátém zprostředkované excitotoxicity, anomální regulace intracelulárního vápníku a další procesy, které zahrnují mitochondriální abnormality a apoptózu. Glutamátový antagonistu riluzol je jediným léčivým přípravkem schváleným k léčbě ALS. Ve dvou provedených studiích prodloužil riluzol přežití o 3-6 měsíců. Podle retrospektivní analýzy zůstali pacienti užívající riluzol v mírnějším stádiu onemocnění déle než kontroly [42].

Prionová onemocnění jsou skupinou neurodegenerativních stavů vyskytujících se u lidí i zvířat. Klíčovou roli v jejich patogenezi hraje prionový protein (PrP). Lidská prionová

onemocnění jsou klinicky klasifikována jako Creutzfeldt-Jakobova nemoc, Gerstmann-Straussler-Scheinkerův syndrom, fatální familiární nespavost a kuru. Mohou být také klasifikovány podle etiologie jako získané (přenášené mezi zvířaty nebo lidmi), zděděné nebo sporadické (neznámé příčiny) [43].

Onemocnění jsou způsobena akumulací posttranslačně modifikované formy PrP. Navzdory četným studiím je molekulární mechanismus konformační konverze normální isoformy PrP^C na patogenní isoformu PrP^{Sc} stále neznámý. Stejně tak není objasněn mechanismus následné neurodegenerace. PrP^C je běžně exprimován v neuronech a gliích mozku a míchy. Také ho lze nalézt v několika periferních tkáních a v leukocytech. Jeho funkce je neznámá. Určení funkce PrP^C může být důležité pro pochopení patogeneze prionových onemocnění. Ztráta této funkce v důsledku konverze na PrP^{Sc} může vysvětlit některé znaky poruch. Několik údajů naznačuje, že PrP^C může hrát roli v metabolismu mědi. N-konec PrP^C obsahuje řadu peptidů s histidinem a glycinem, které jsou schopné vázat ionty mědi. Navázání kovu indukují konformační změny v polypeptidovém řetězci. U myši s porušeným genem pro PrP byl zjištěn celkový obsah mědi v mozku jen 20 % oproti normální hodnotě. Výsledky naznačují, že PrP^C může být hlavním proteinem vázajícím měď v mozku. Jak spolu měď a PrP^C přesně funkčně souvisí, je v současné době nejasné. Jednou z možností je, že měď slouží jako esenciální kofaktor pro dosud neurčenou enzymatickou aktivitu PrP^C, stejně jako u kuproenzymů. Díky své přítomnosti na povrchu buňky by se také mohl uplatňovat při chelataci extracelulárních iontů mědi nebo jako nosičový protein pro příjem a dodání iontů mědi k intracelulárním cílům [44].

K výrazným změnám absorpce, transportu, metabolismu nebo vylučování mědi může docházet při **zánětech** a **nádorových onemocněních**. V obou uvedených případech vzrůstá koncentrace mědi a ceruloplasminu v plazmě. Zvyšuje se rychlost syntézy a sekrece CP játry, prostřednictvím zvýšené transkripce mRNA ceruloplasminu v hepatocytech.

Měď má také určitou roli během angiogeneze, která je nezbytná pro růst nových tkání a stejně tak nádorů. Bylo zjištěno, že nádorové buňky obecně obsahují vysoké koncentrace mědi a jsou schopny si ji brát z CP. Během rakovinného onemocnění se zaznamenává snížená retence mědi ve střevní sliznici a játrech. Je zvýšena nejen koncentrace CP, ale i jiných měď vázajících složek v krvi. Stupeň zvýšení poté přímo souvisí se stavem onemocnění. Vyšetření CP se tak může použít při diagnostice a hodnocení účinnosti léčby

nádorových onemocnění. Výsledky testů ale může zkreslit přítomnost zánětlivých procesů, těhotenství nebo užívání perorální antikoncepce, obsahující estrogeny a gestageny [15].

3.1.9 Chelatace mědi

Termín chelatace pochází z řeckého slova “chelate” a znamená v překladu klepeto. Ve vzniklém komplexu váže ligand iont kovu a struktura tvarem připomíná klepeto [45]. Při chelataci dochází ke vzniku koordinačních vazeb mezi dvěma nebo více vazebnými místy ligandu a jedním centrálním atomem kovu. Vzniklý komplex se nazývá chelát [46].

Chelatační činidla lze použít k terapii patologických stavů souvisejících s toxickým nadbytkem nebo akumulací kovů v těle. Tím že, chelatační činidlo vytváří stabilní komplex s toxickým kovem, brání iontu kovu dosáhnout biologických cílů a snižuje tak jeho toxicitu. Vlastnosti ideálního chelátoru zahrnují schopnost pronikat přes buněčné membrány, rozpustnost ve vodě a rychlou eliminaci toxického kovu [45].

Měď je esenciálním stopovým prvkem, který je součástí několika enzymů a účastní se redoxních reakcí v organismu. Výskyt volných iontů mědi způsobuje nadměrnou tvorbu reaktivních forem kyslíku a vede k poškození různých biomolekul. V praxi se v současnosti chelátory mědi používají pouze při léčbě Wilsonovy choroby. Nicméně jejich klinické použití je zde naprosto nezbytné. V době, kdy ještě nebyla dostupná farmakologická léčba pomocí D-penicilaminu, byla Wilsonova choroba fatálním onemocněním. Dále se v klinické praxi používají pouze další dva chelátory mědi a to trientin a tetrathiomolybdenát. Za standardní chelátor mědi se stále považuje D-penicilamin i přes fakt, že je mnohem méně účinným chelatačním činidlem než trientin.

Výzkum nových chelátotvorných látek, které by se daly použít k léčbě dalších onemocnění, zejména poruch centrálního nervového systému, stále probíhá. Většina sloučenin je ve fázi experimentálního testování. Při screeningu potenciálních chelátorů se hodnotí několik faktorů. Důležitá je lipofilita dané sloučeniny, afinita k mědným i měďnatým iontům, účast komplexu na redoxních reakcích nebo toxicita látky. Zkouší se také vliv pH. Nižší než fyziologické pH je charakteristické pro podmínky absorpce mědi v duodenu a také pro několik patologických stavů, jako jsou zánět, nádor nebo akutní infarkt myokardu [47].

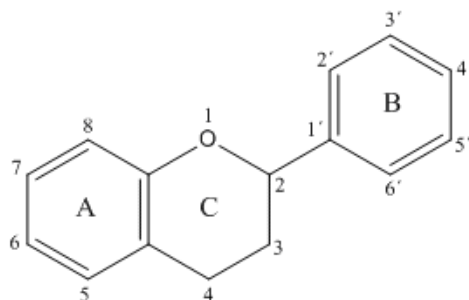
3.2 Flavonoidy

Flavonoidy představují velkou skupinu polyfenolických látek a řadí se mezi sekundární metabolity rostlin [47]. Základní strukturu tvoří benzo-*y*-pyron. Jedná se o rostlinné pigmenty, které jsou syntetizovány z fenylalaninu [51]. Bylo objeveno více než 9000 zástupců. Mnohé způsobují atraktivní zbarvení květů, plodů a listů rostlin. Syntéza fenolických sloučenin je v rostlinách indukována působením stresových podmínek, jako jsou nadměrné UV záření, zranění nebo infekce. Fenoly přispívají k odolnosti proti chorobám, působí jako podpůrné materiály buněčných stěn, fotoprotektory vůči UV záření a podílejí se na opravě ran a hojení poškozených oblastí [56]. Flavonoidy najdeme v ovoci, zelenině, obilí, kůře, kořenech a stoncích rostlin, čaji a víně. Tyto přírodní produkty byly známy pro své příznivé účinky na zdraví daleko dříve, než došlo k izolaci samotných flavonoidů jako účinných látek [52].

Flavonoidy jsou nedílnou součástí lidské stravy. Patří mezi obsahové látky, které nemohou být syntetizovány lidmi ani živočichy. V potravinách jsou zodpovědné za barvu, chuť, prevenci oxidace tuků a ochranu vitaminů a enzymů. Významným zdrojem je ovoce a zelenina, hlavně citrusy, bobulovité ovoce, červené papriky, rajčata, cibule, sójové boby a olivový olej [50]. Vysoký obsah flavonoidů najdeme také v čokoládě, kakau, červeném víně a černém a zeleném čaji [53]. Příprava a zpracování potravin mohou snížit obsah flavonoidů v závislosti na použité metodě přípravy. Stanovení průměrného denního příjmu flavonoidů je obtížné z důvodů různorodého obsahu v rostlinách a rozdílné konzumace u lidí [50]. Průměrná denní spotřeba se pohybuje mezi 20 mg/den až 70 mg/den. Hodnoty se od sebe liší v jednotlivých zemích [54].

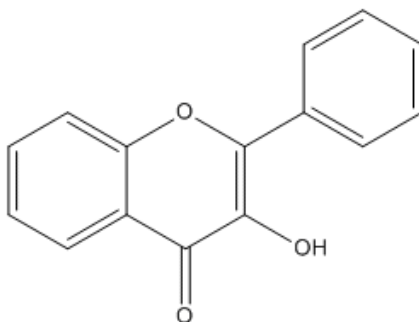
3.2.1 Rozdělení flavonoidů

Jedná se o deriváty 2-fenyl-1-benzopyran-4-onu, které můžeme podle jejich základní chemické struktury rozdělit do několika podskupin. Hlavními jsou flavonoly, flavanoly, flavanony, flavony a flavanololy [47]. Základní struktura flavonoidů je uvedena na **Obr. 2**. Různé podskupiny se od sebe navzájem liší v oxidaci a substituci kruhu C, zatímco jednotlivé sloučeniny se od sebe v rámci podskupiny liší v substituci kruhů A a B [50].



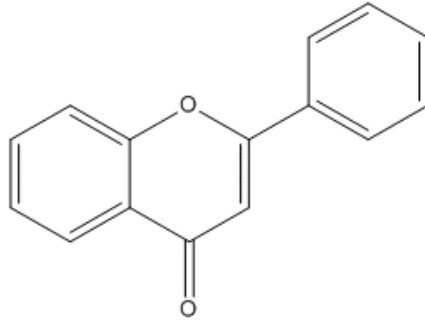
Obrázek 2: Základní struktura flavonoidů [50]

Flavonoly (Obr. 3) jsou nejrozšířenějšími flavonoidy. Nachází se v téměř všech druzích ovoce a zeleniny [49]. Jsou to nejhojněji zastoupené flavonoidy v potravě [50]. Flavonoly jsou charakteristické rovinnou strukturou, způsobenou přítomností dvojně vazby v centrálním aromatickém kruhu. Členem této skupiny je kvercetin, jeden z nejpodrobněji popsaných flavonoidů. Kvercetin je hojně obsažen v cibuli, jablkách, brokolici a bobulovitém ovoci. [52].



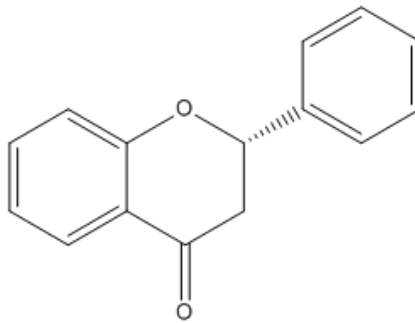
Obrázek 3: Základní struktura flavonolů [50]

Flavony (Obr. 4) jsou co do počtu látek menší skupinou než jiné druhy flavonoidů, ale mohou mít jedinečné biologické vlastnosti, jelikož jsou obecně více hydrofobní. Důležitými zdroji flavonů je rozmarýn, petržel, celer a esenciální oleje z citrusových plodů. Významným zástupcem této skupiny je luteolin [49].



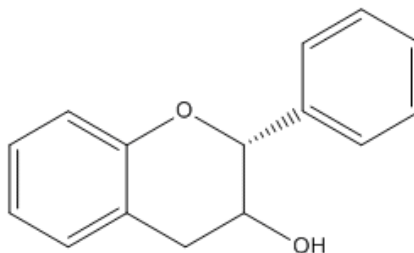
Obrázek 4: Základní struktura flavonů [50]

Flavanony (Obr. 5) jsou hlavním typem flavonoidů přítomných v citrusových plodech a šťávách. V ostatních potravinách se jen zřídka vyskytují ve znatelném množství. Hlavními flavanony obsaženými v pomerančích jsou hesperidin a narirutin. V grapefruitu je hlavním flavanonem naringin [49].



Obrázek 5: Základní struktura flavanonů [50]

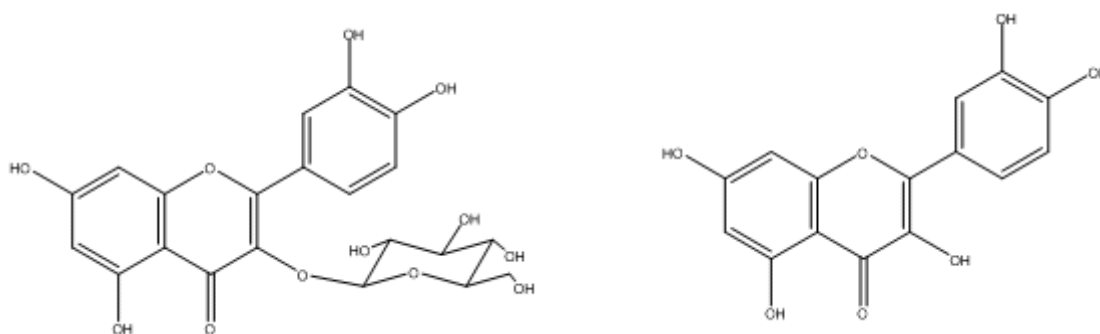
Flavanoly (Obr. 6) jsou unikátní skupinou flavonoidů, protože se ve stravě vyskytují jako monomery, oligomery a polymery. Oligomery a polymery se nazývají kondenzované taniny nebo proantokyanidy. Hlavními zdroji jsou jablka, hrušky, čaj, čokoláda, hrozny a červené víno [49].



Obrázek 6: Základní struktura flavanolů [50]

3.2.2 Metabolismus flavonoidů

Absorpce flavonoidů uvolněných z potravy závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je velikost molekuly, konfigurace, lipofilita, rozpustnost nebo pKa. Flavonoidy mohou být absorbovány z tenkého střeva nebo musí vstoupit až do tlustého střeva, což závisí na struktuře flavonoidu, zda se jedná o glykosid nebo aglykon (**Obr. 7**). Většina flavonoidů je v rostlinách přítomna ve vázané formě s cukry, jako β -glykosidy [50,55]. Cukerná jednotka je připojena pomocí C nebo O vazby. Hydroxyly flavonoidů bývají substituovány jednou nebo více jednotkami cukru [72]. Aglykony (necukerné zbytky) mohou být snadno absorbovány tenkým střevem, zatímco flavonoidní glykosidy musí být nejdříve hydrolyzovány na formu aglykonů [50,55]. Glykosidy flavonoidů jsou relativně hydrofilní, zatímco aglykony mohou být lipofilní. Jejich lipofilnost zvyšuje metylace hydroxylových skupin nebo prenylace, geranylace na různých místech skeletu [72].



Obrázek 7: Struktura glykosidu a aglykonu flavonoidu [50]

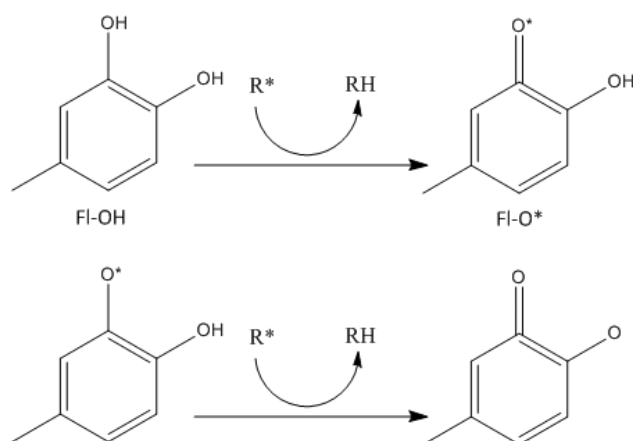
Oligomerní flavonoidy mohou být hydrolyzovány vlivem kyselých podmínek žaludku na monomery a dimery. Větší molekuly, které nemohou být vstřebány z tenkého střeva, se dostávají do tlustého střeva, kde jsou degradovány střevní mikroflórou. Po absorpci dochází v játrech ke konjugaci (glukuronidaci, sulfataci nebo metylaci) nebo jsou flavonoidy metabolizovány na menší fenolové sloučeniny. Biologická dostupnost se může výrazně lišit v závislosti na zdroji potravy. Například absorpce kvercetinu z cibule je čtyřnásobně větší než z jablka nebo čaje. Dimerizace biologickou dostupnost snižuje [50].

3.2.3 Účinky flavonoidů

Flavonoidy působí antioxidačně, antimikrobiálně, protizánětlivě, protinádorově, vazodilatorně a hepatoprotektivně. Jsou schopné chelátovat přechodné kovy, zejména železo

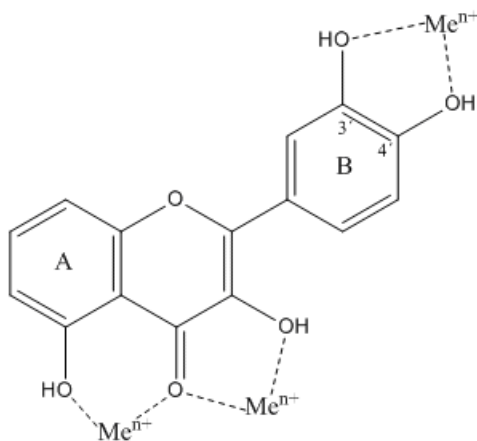
a měď. Blokují několik enzymů produkujících reaktivní formy kyslíku a díky speciální interakci s biologickými cíly mají přímý antiagregační a vazodilatační potenciál [47].

Flavonoidy mají mnoho biochemických vlastností. Nejlépe popsanou schopností je jejich **antioxidační aktivita**. Mezi mechanismy antioxidačního působení patří potlačení tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) buď inhibicí enzymů nebo chelatací stopových prvků, které se podílejí na tvorbě volných radikálů, dále pak vychytávání ROS a ochrana antioxidačních obranných systémů. Působení flavonoidů zahrnuje většinu těchto mechanismů. Antioxidační aktivita flavonoidů závisí na uspořádání funkčních skupin. Konfigurace, substituce a celkový počet hydroxylových skupin ovlivňují schopnost chelatace kovových iontů a vychytávání volných radikálů. Důležitým faktorem je konfigurace hydroxylylu na kruhu B, který dodává vodík a elektron radikálům, čímž se stabilizují a stávají méně reaktivními. Současně vzniká relativně stabilní radikál flavonoidu [50]. Reakce flavonoidů s radikály probíhá podle následující reakce (**Obr. 8**), kde $R\cdot$ je volný radikál a $O\cdot$ je volný radikál kyslíku [52].



Obrázek 8: Vychytávání ROS ($R\cdot$) flavonoidy (FI-OH) [50]

Flavonoidy mající nenasycenou 2,3 vazbu v konjugaci s 4-oxo funkční skupinou jsou silnějšími antioxidanty než flavonoidy, které tyto strukturální rysy nemají. Konjugace mezi kruhy A a B umožňuje rezonanční účinek aromatického jádra a stabilizaci vzniklého radikálu flavonoidu. Chelatace kovových iontů (železa, mědi a dalších) probíhá na specifických pozicích různých kruhů flavonoidní struktury. Vazebná místa jsou znázorněna na **Obr. 9**, kde Me^{n+} představuje ionty přechodných kovů [50].



Obrázek 9: Vazebná místa pro stopové kovy [50]

U flavonoidů lze očekávat **antimikrobiální aktivitu**, neboť jsou syntetizovány rostlinami v reakci na mikrobiální infekce. *In vitro* byly nalezeny účinky proti širokému spektru mikroorganismů. U několika flavonoidů byla prokázána silná antibakteriální aktivita. Antibakteriální flavonoidy míří na více buněčných cílů, než aby měly jedno specifické místo působení. Jedním z jejich účinků je vytváření komplexů s proteiny prostřednictvím slabých vazebných sil nebo tvorbou kovalentních vazeb. Z tohoto důvodu může být jejich antimikrobiální účinek spojen se schopností inaktivovat mikrobiální adheziny, enzymy, transportní proteiny a další. Lipofilní flavonoidy mohou také narušovat mikrobiální membrány [50].

Také **antivirová aktivita** byla u flavonoidů již prokázána. Mezi viry, které jsou ovlivňovány flavonoidy, patří například virus herpes simplex, respirační syncytiální virus, parainfluenza virus nebo adenovirus. Flavonoidy mohou interagovat s viry v různých stádiích jejich replikačního cyklu. Některé působí na úrovni intracelulární replikace viru, zatímco jiné inhibují jejich infekční vlastnosti [52]. Mechanismy účinku zahrnují inhibici virové polymerasy, vázání virové nukleové kyseliny nebo virových proteinů kapsidy [57]. Většina studií antivirové aktivity flavonoidů byla provedena *in vitro*, o účinku *in vivo* je známo zatím málo [52].

Řada flavonoidů vykazuje **protizánětlivou aktivitu** a analgetický efekt. Zánět vzniká v organismu v reakci na poškození tkáně, infekci nebo chemické podráždění. V místě poškození je vyvolán migrací buněk imunitního systému z krevních cév a uvolněním mediátorů. Následuje uvolnění ROS a prozánětlivých cytokinů s cílem odstranit cizí patogeny

a obnovit poškozené tkáně [50]. Důležitou roli hrají zánětlivé mediátory cyklooxygenasa (COX) a lipoxygenasa (LOX), které se podílí na uvolňování kyseliny arachidonové, výchozího bodem zánětlivé reakce. U vybraných fenolických sloučenin bylo prokázáno, že inhibují jak cyklooxygenasovou, tak lipoxygenasovou dráhu, čímž snižují uvolněné množství kyseliny arachidonové. Přesný mechanismus, jak flavonoidy inhibují tyto enzymy, není znám. Zvláště inhibující aktivitu vykazuje kvercetin a jeho deriváty.

Další protizánětlivou schopností flavonoidů je inhibice biosyntézy eikosanoidů, jako jsou prostaglandiny, které se podílejí na různých imunologických reakcích a jsou konečnými produkty cyklooxygenasové a lipoxygenasové dráhy. Flavonoidy také inhibují jak cytosolovou, tak membránovou tyrosinkinasu a tím zabraňují nekontrolovanému buněčnému růstu a proliferaci. Další vlastností flavonoidů je schopnost inhibovat degranulaci neutrofilů. To je přímý způsob jak snížit uvolňování kyseliny arachidonové neutrofilů a dalšími imunitními buňkami [52].

O **protinádorové aktivitě** flavonoidů se stále vede diskuze. Působení antioxidačních systémů je často nedostatečné a poškození radikály může vést ke karcinogenezi. ROS mohou poškodit DNA a dělení buněk s neopraveným nebo špatně odstraněným poškozením může vést ke vzniku mutací. Problém nastává, když se tyto změny objeví v onkogenech nebo nádorových supresorových genech. Buněčné poškození způsobené ROS může vyvolat mitózu a zvýšit riziko, že poškozená DNA povede k mutacím [52].

Faktor potravy hraje důležitou roli v prevenci vzniku nádorů [50]. Čerstvé ovoce a zelenina obsahují vitaminy A, C, E, β -karoten, flavonoidy a další složky, které byly zkoumány jako chemopreventivní činidla proti rakovině [51]. Konzumace cibule nebo jablek, dvou hlavních zdrojů flavonolu kvercetinu, je spojena s nižším výskytem rakoviny prostaty, plic, žaludku a prsou. Také se zdá, že u mírných konzumentů vína je menší riziko rozvoje rakoviny plic, endometria, jícnu, žaludku a tlustého střeva [50]. Flavonoidy přijímané potravou by měly nejen inhibovat růst nádorových buněk, ale také indukovat diferenciaci buněk.

Podle dřívějších výsledků určité flavonoidy vykazovaly silnou protinádorovou aktivitu *in vivo*. Inhibiční účinky na růst maligních buněk mohou být důsledkem ovlivnění aktivity proteinkinasy, která se podílí na regulaci buněčné proliferace a apoptózy [58]. Mezi molekulární mechanismy působení flavonoidů patří regulace mutantního proteinu p53, zastavení buněčného cyklu, inhibice tyrosinkinasy, inhibice proteinu tepelného šoku

a inhibice exprese Ras proteinů. Mutace p53 patří mezi nejběžnější genetické abnormality. Inhibice exprese p53 může vést k zastavení rakovinných buněk v G2/M fázi buněčného cyklu. Flavonoidy snižují expresi mutantního proteinu p53 na téměř nedetekovatelnou hladinu v buněčných liniích lidského karcinomu prsu.

Tyrosinkinasy jsou skupinou proteinů, které se podílejí na transdukcii signálů růstových faktorů do jádra. Předpokládá se, že jejich exprese se podílí na onkogenezi prostřednictvím schopnosti překonat regulační kontrolu růstu. Látky inhibující aktivitu tyrosinkinasy jsou považovány za možná protinádorová léčiva bez cytotoxických vedlejších účinků pozorovaných při běžné chemoterapii.

Proteiny tepelného šoku tvoří komplex s mutantním p53, který umožňuje nádorovým buňkám obcházet mechanismy zastavení buněčného cyklu. Také umožňují lepší přežití rakovinných buněk při různých tělesných stresech. Flavonoidy inhibují produkci proteinů tepelného šoku v několika maligních buněčných liniích, včetně rakoviny prsu, leukémie a rakoviny tlustého střeva [50].

Několik flavonoidů vykazuje **hepatoprotektivní aktivitu**. Různá chronická onemocnění, jako je například diabetes mellitus, vedou k rozvoji klinických jaterních projevů. Silymarin je flavonoid extrahovaný ze semen a plodů *Silybum marianum* (Asteraceae). Ukázalo se, že stimuluje enzymatickou aktivitu DNA-dependentní RNA polymerázy 1 a následnou syntézu RNA a proteinů. To vede k syntéze DNA a proliferaci buněk, čímž dochází k regeneraci poškozených jater. Mezi farmakologické vlastnosti silymarinu patří regulace permeability a integrity buněčné membrány, inhibice leukotrienů, vylučování ROS, potlačení proteinkinasy a tvorba kolagenu. Používá se při cirhóze, ischemickém poškození nebo toxické hepatitidě vyvolané různými toxiny [50].

Podle několika epidemiologických studií mají flavonoidy **pozitivní kardiovaskulární účinek** [59]. Důvodem jejich ochranného působení může být jejich schopnost bránit oxidaci LDL (lipoproteinů o nízké hustotě) na aterogenní formu. Také se uvádí jejich antiagregační a vazodilatační aktivita [51].

Spotřeba flavonoidů může zabránit endoteliální dysfunkci zvýšením vazorelaxačního procesu, který vede ke snížení arteriálního tlaku. Endoteliální dysfunkce přispívá ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Je hlavní komplikací aterosklerózy a příčinou tvorby arteriálních trombů. Spotřeba flavonoidů může zabránit vzniku řady kardiovaskulárních onemocnění včetně hypertenze a aterosklerózy [60].

Klíčovou událostí při aterogenezi je adheze leukocytů na arteriální stěnu a jejich následný přesun do subendoteliálního prostoru. Tento proces je zprostředkován expresí adhezních molekul na povrchu endotelových buněk, které mohou být významně indukovány prozánětlivými mediátory, jako je tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α), interleukin-1b (IL-1b) a další. Konzumace červeného vína u lidí snižuje TNF- α indukovanou adhezi monocytů na endoteliální buňku *ex vivo* [61].

Rozdílný příjem flavonoidů v různých zemích částečně souvisí s rozdílnou mírou mortality na kardiovaskulární onemocnění. Konzumace potravin, jako je černý a zelený čaj, může vést k nižšímu riziku vzniku aterosklerózy a ochraně před mrtvicí. Pití čaje může snižovat koagulaci krve, zvýšit fibrinolýzu, zabránit adhezi a agregaci destiček nebo snížit obsah cholesterolu v aortálních stěnách *in vivo*. Dalším důvodem příznivého působení flavonoidů může být jejich schopnost ochrany před toxicitou oxidu dusnatého. Spotřeba kvercetinů navíc chrání před kardiovaskulárním onemocněním snížením kapilární křehkosti a inhibicí agregace krevních destiček [51].

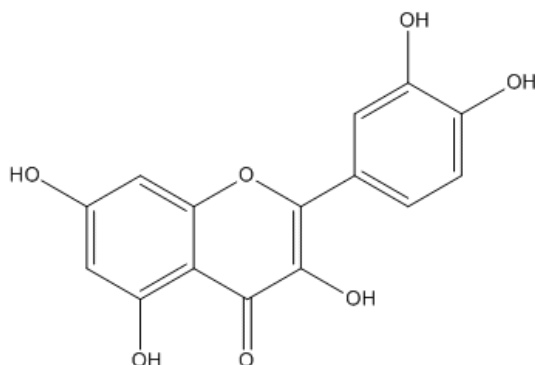
3.2.4 Kvercetin a jeho metabolity

Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon), (**Obr. 10**) je jedním z nejznámějších a nejprozkoumanějších flavonoidů. Jeho široké použití je spojeno s řadou zdraví prospěšných vlastností, včetně antioxidačních, protizánětlivých, antibakteriálních, antivirových a protirakovinotvorných účinků. Je součástí lidské stravy [62]. Denní příjem se odhaduje na 5-40 mg/den. U jedinců, kteří konzumují velké množství ovoce a zeleniny bohaté na flavonoly (jablka, cibule, rajčata), mohou hodnoty vzrůst na 200-500 mg/den. V potravinách se kvercetin vyskytuje ve formě glykosidu [63]. V rostlinách je obvykle vázán na cukry, ethery nebo fenolové kyseliny.

Různé typy glykosidů ovlivňují biologickou dostupnost a míru absorpce v tenkém střevě a žaludku [62]. Po absorpci se kvercetin metabolizuje v různých orgánech: v tenkém střevě, tlustém střevě, játrech nebo ledvinách [63]. Při metabolizaci v játrech dochází k *O*-methylaci, sulfataci nebo glukuronidaci. Konjugace se sulfátem probíhá pomocí sulfotransferas. Při *O*-methylaci vznikají jako hlavní produkty isorhamnetin (3'-*O*-methylkvercetin) a tamarixetin (4'-*O*-methylkvercetin) [62].

Plazmatické koncentrace kvercetinů se vyskytují v nanomolárním množství (<100 nM). Při suplementaci kvercetinů se mohou hodnoty zvýšit až na mikromolární koncentrace

[63,64]. Biologický poločas metabolitů kvercetinů je poměrně dlouhý. Pohybuje se mezi 11 - 28 hodinami. Při opakovaném doplňování kvercetinů můžou metabolity dosáhnout značných plazmatických hladin [64].



Obrázek 10: Vzorec molekuly kvercetinů [50]

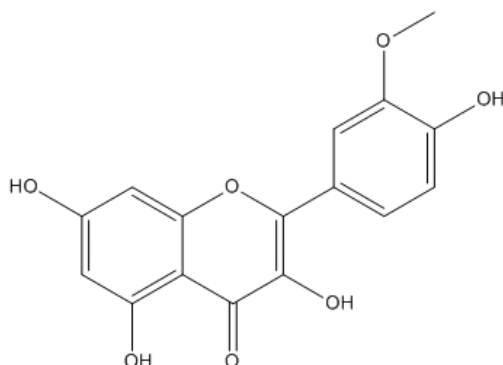
3.2.4.1 Isorhamnetin

Isorhamnetin (3'-methoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavon), (**Obr. 11**) má protizánětlivé, antioxidační a protinádorové účinky. Několik studií prokázalo, že reguluje klíčové molekuly, jako je COX-2, PGE₂ nebo TNF- α , které se podílejí na zánětlivé reakci [70]. Je extrahován především z listů a plodů *Hippophae rhamnoides* (Elaeagnaceae) [65]. Rakytník řešetlákový je dvoudomý trnitý keř nebo strom, který bývá často šlechtěn a využíván pro vysoký obsah kyseliny askorbové [66]. Je přírodním zdrojem vitaminů, minerálů, flavonoidů, karotenoidů a dalších bioaktivních látek [67].

Dalším zdrojem isorhamnetinu je *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) [65]. V listech jinanu dvoulaločného je isorhamnetin jedním z nejzastoupenějších flavonoidů a lze ho snadno extrahovat jednoduchým způsobem. Na isorhamnetin extrahovaný z jinanu byla testována jeho fluorescenční aktivita. Výsledkem bylo, že lze použít jako fluorescenční senzor pro ionty mědi. Měl dokonce vyšší citlivost a selektivitu a nižší detekční limit než kvercetin, který je v jinanu také hojně zastoupen. Lze ho použít při stanovení měďnatých iontů v řekách a jezerech nebo v ovoci a zelenině [68].

Také v parazitických rostlinách rodu *Cuscuta* (Cuscutaceae), kokotice, byl objeven isorhamnetin. V methanolovém extraktu byl detekován spolu s kávovou kyselinou a *p*-kumarovou kyselinou [69]. Dalším významným zdrojem je *Polygonum aviculare* (Polygonaceae). Truskavec ptačí je rostlina rozšířená po celém světě. Obsahuje flavonoidy, třísloviny, slizy a stopy silic. Používá se jako diuretikum, expektorans nebo lidově jako

cholagogum [71]. *Asparagus officinalis* (Asparagaceae), chřest obecný, je vytrvalá bylina. Jeho mladé výhonky se využívají jako zelenina [66]. Významným potravním zdrojem isorhamnetinu jsou pro nás také zástupci čeledi Rosaceae, *Malus* (jabloň) nebo *Pyrus* (hrušeň) [65,66].



Obrázek 11: Vzorec molekuly isorhamnetinu [75]

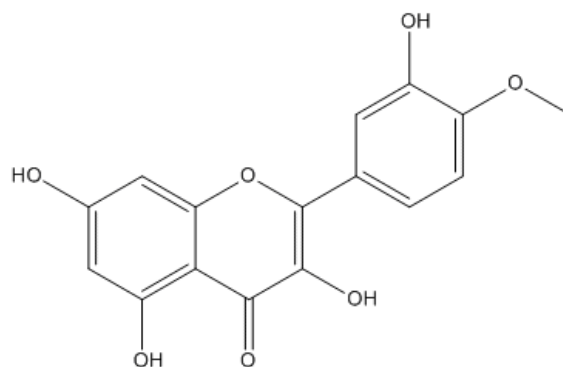
3.2.4.2 Tamarixetin

Tamarixetin (4'-methoxy-3,3',5,7-tetrahydroxyflavon), (**Obr. 12**) má stejně jako kvercetin a ostatní jeho deriváty vzhled žlutého prášku nebo krystalů. Obecně platí, že tyto sloučeniny nejsou moc dobře rozpustné ve vodě [62].

Tamarixetin vykazuje silný protizánětlivý efekt. Snižuje sekreci různých zánětlivých cytokinů. Na myším modelu bakteriální sepse došlo ke snížení množství bakterií i hladin endotoxinů. Účinek je spojen se zvýšením populace imunitních buněk produkujících interleukin-10. Tamarixetin by proto mohl sloužit jako farmaceutická substance k zabránění bakteriální sepse [74].

Má stejné antioxidační vlastnosti jako isorhamnetin, ale nižší než kvercetin, což potvrzuje fakt, že antioxidační aktivita přímo souvisí s počtem volných hydroxylových skupin. Je zajímavé, že ve srovnání s kvercetinem i isorhamnetinem, vykazuje tamarixetin významně lepší protizánětlivý účinek. Výsledkem je, že počet volných hydroxylových skupin flavonoidů není přímo úměrný jejich protizánětlivé aktivitě [75]. Při studii antiagregační aktivity flavonoidů byla u tamarixetinu prokázána biologická účinnost. Je proto vhodným kandidátem na další výzkum antiagregačních léčiv [73].

Tamarixetin není v rostlinách nijak hojně obsažen. Antimikrobiální a antioxidační účinky byly zkoumány na extraktu z listů *Tamarix ramosissima* (Tamaricaceae), tamaryšku kaspického [78]. Tamarixetin může být také izolován z methanolového extraktu *Begonia versicolor* (Begoniaceae) [76]. Dalším zdrojem je *Verbascum phlomoides* (Scrophulariaceae), která obsahuje směs několika flavonoidů [77]. Směs 11 různých flavonoidů včetně tamarixetinu byla také izolována z listů *Blumea balsamifera* (Asteraceae), která se používá v lidovém léčitelství v jihovýchodní Asii [79].



Obrázek 12: Vzorec molekuly tamarixetinu [76]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

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

4.2 Chemikálie

- Chlorid měďný (CuCl) (Sigma-Aldrich)
- Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄·5H₂O) (Sigma-Aldrich)
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) (Sigma-Aldrich)
- Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) (Sigma-Aldrich)
- Hematoxylin (HEM) (Sigma-Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner)
- Ultračistá voda (Milli-Q RG, MerckMillipore, Massachusetts, USA)
- 15 mM acetátové pufry o pH 4,5 a 5,5:
Kyselina octová (CH₃COOH) (Penta)
Octan sodný bezvodý (CH₃COONa) (Penta)
Ultračistá voda (Milli-Q RG, MerckMillipore, Massachusetts, USA)
- 15 mM HEPES pufry o pH 6,8 a 7,5:
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina) (Sigma-Aldrich)
HEPES sůl (sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonové) (Sigma-Aldrich)
Ultračistá voda (Milli-Q RG, MerckMillipore, Massachusetts, USA)

Všechny používané látky byly v čistotě p.a.

4.3 Testované látky

- Isorhamnetin Purity (HPLC) ≥99% (Extrasynthese, GenayCedex, France)
- Tamarixetin Purity (HPLC) ≥99% (Extrasynthese, GenayCedex, France)

4.4 Přístrojové vybavení

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

4.5 Využívané programy

- Vzorce molekul byly vytvořeny v programu ChemDraw Professional 17.1.
- Zpracování naměřených výsledků do grafů bylo provedeno v programu GraphPad verze 7.

4.6 Příprava zásobních roztoků

- **Roztok měďných iontů 5mM**

Roztok měďných iontů (Cu^+) byl připraven rozpuštěním chloridu měďného - CuCl ($M_w = 98,99 \text{ g/mol}$) ve vodném roztoku 0,1M kyseliny chlorovodíkové – HCl ($M_w = 36,46 \text{ g/mol}$) a 1M chloridu sodného - NaCl ($M_w = 58,44 \text{ g/mol}$) na požadovanou koncentraci 5mM v ultrazvukové lázni. Tento zásobní roztok je stabilní a uchovává se v lednici. Pro další měření byl uvedený základní roztok zředěn dimethylsulfoxidem (DMSO) nebo vodou podle prováděného konkrétního typu chelatace na pracovní roztok o požadované koncentraci.

- **Roztok měďnatých iontů 5mM**

Roztok měďnatých iontů (Cu^{2+}) byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 249,69 \text{ g/mol}$) v destilované vodě na požadovanou koncentraci 5mM. Uvedený zásobní roztok je stabilní a uchovává se v lednici. Pro další měření byl základní roztok zředěn DMSO na pracovní roztok o požadované koncentraci.

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

Roztok hematoxylinu ($M_w = 302,28 \text{ g/mol}$) byl připraven jeho rozpuštěním v DMSO na požadovanou koncentraci 5mM. Tento základní roztok není stabilní. Dá se použít po dobu

cca 5 hodin. Pro další měření byl tento základní roztok zředěn DMSO na pracovní roztok o požadované koncentraci. Jeho použitelnost byla 90 minut.

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

Roztok BCS ($M_w = 564,54 \text{ g/mol}$) byl připraven jejím rozpuštěním v destilované vodě na požadovanou koncentraci 5mM. Tento základní roztok je stabilní a uchovává se v lednici.

- **Roztok hydroxylaminu hydrochloridu (HA) 10mM**

Roztok HA ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) byl připraven jeho rozpuštěním v destilované vodě na koncentraci 100mM a následně byl naředěn na požadovanou koncentraci 10mM.

- **Roztoky testovaných látek**

Základní roztoky testovaných látek byly připraveny jejich rozpuštěním v DMSO na koncentraci 10mM. Podle potřeby byly základní roztoky zředěny DMSO na další požadované koncentrace.

4.7 Kontrolní zkouška základních roztoků mědi

Zkouška správného naředění 5mM základních roztoků Cu^+ a Cu^{2+} byla prováděna před jejich prvním použitím. Při opakovaném použití nebylo třeba zkoušku znova provádět. Roztoky byly uchovávány v lednici a zachovaly si stabilitu.

- Pod sebe do dvou jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno:
 - 150 μl pufru o pH 7,5
 - 50 μl 1mM roztoku HA
 - 50 μl 0,25mM roztoku iontů mědi
- Mikrotitrační destička s napipetovanými roztoky byla 1 minutu míchána na třepačce.
- Dále bylo přidáno:
 - 50 μl 5mM roztoku BCS
- Po uplynutí alespoň 1 minuty byla mikrotitrační destička vložena do spektrofotometru a byla změřena absorbance při vlnové délce 484 nm.
- Pokud byly roztoky správně připravené, naměřená absorbance byla okolo 0,50-0,55.
- Při vyhovujícím výsledku kontrolní zkoušky mohly být roztoky použity k dalšímu měření.

4.8 Kalibrace měďnatých iontů

Pro získání kalibrační křivky měďnatých iontů závislosti absorbance na koncentraci Cu^{2+} iontů byly použity roztoky požadovaných koncentrací a následně změřena absorbance. Z naměřených výsledků byla poté zkonstruována přímka a sestrojen graf.

- Ze základního roztoku Cu^{2+} iontů byly naředěny vodné roztoky o koncentracích 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM a 250 μM .
- Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo nepipetováno:
 - 150 μl pufru o pH 6,8
 - 50 μl 1mM roztoku HA
 - 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů požadované koncentrace do **testovacích jamek** nebo 50 μl destilované vody do **kontrolních jamek**
- Mikrotitrační destička s napipetovanými roztoky byla 1 minutu míchána na třepačce.
- Dále bylo přidáno:
 - 50 μl roztoku BCS do **horní poloviny** jamek a 50 μl destilované vody do **dolní poloviny** jamek
- Ihned byla změřena absorbance při vlnové délce 484 nm a poté znovu v čase 5 minut.
- Z naměřených výsledků byla sestrojena kalibrační křivka.

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



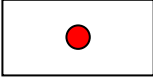
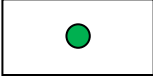
	kontrolní jamky (bez měďnatých iontů)	Konečný obsah jamek: 150 μl pufru o pH 6,8 50 μl roztoku HA 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů nebo destilované vody 50 μl roztoku BCS nebo destilované vody
	testovací jamky (měďnaté ionty dané koncentrace)	
●	jamky s indikátorem (BCS)	
●	slepé vzorky (destilovaná voda)	

Obrázek 13: Schematické zobrazení mikrotitrační destičky při kalibraci Cu^{2+} iontů

4.9 Chelatace iontů mědi hematoxylinem

- Do všech jamek testovací destičky bylo napipetováno:
 - 150 μl daného pufru
 - 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů
 - 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci do **testovacích jamek** a 50 μl rozpouštědla (DMSO) do **kontrolních jamek**
- Mikrotitrační destička byla 2 minuty míchána na třepačce.
- Poté bylo přidáno:
 - 50 μl 250 μM roztoku hematoxylinu do **prvních dvou řad** jamek a 50 μl rozpouštědla DMSO do **druhých dvou řad**
- Destička byla po dobu 3 minut opět míchána na třepačce.
- Absorbance byla změřena ihned a poté znovu po 7 minutách, pro pH 7,5 při vlnové délce 610 nm, pro pH 6,8 při 590 nm a pro pH 5,5 při 595 nm.

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

	testovací jamky (roztoky testované látky)	Konečný obsah jamek: 150 μl pufru 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů 50 μl roztoku testované látky nebo DMSO 50 μl roztoku HEM nebo DMSO
	kontrolní jamky (DMSO)	
	jamky s indikátorem (hematoxylin)	
	slepé vzorky (DMSO)	

Obrázek 14: Schematické zobrazení mikrotitrační destičky při měření chelatace Cu^{2+} iontů

4.10 Chelatace měďných iontů v pufru

- Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno:
 - 100 μl příslušného pufru
 - 50 μl roztoku HA – 1mM do prostředí o pH 6,8 a 7,5 nebo 10mM do prostředí o pH 4,5 a 5,5
 - 50 μl 250 μM roztoku Cu^+ iontů v DMSO
- Následně byla mikrotitrační destička 1 minutu míchána na třepačce.
- Dále bylo přidáno:
 - 50 μl roztoku testované látky o požadované koncentraci do **testovacích jamek** nebo rozpouštědla (DMSO) do **kontrolních jamek**
- Mikrotitrační destička byla opět míchána na třepačce po dobu 2 minut.
- Poté bylo napipetováno:
 - 50 μl 5mM indikačního roztoku BCS do **horní poloviny** jamek a destilované vody do **dolní poloviny** jamek
- Ihned byla změřena absorbance při vlnové délce 484 nm a poté znovu v čase 5 minut.

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



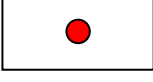
	testovací jamky (roztoky testované látky)	Konečný obsah jamek: 100 μl pufru 50 μl roztoku HA 50 μl roztoku Cu^+ iontů 50 μl roztoku testované látky nebo DMSO 50 μl roztoku BCS nebo destilované vody
	kontrolní jamky (DMSO)	
	jamky s indikátorem (BCS)	
	slepé vzorky (destilovaná voda)	

Obrázek 15: Schematické zobrazení mikrotitrační destičky při měření chelatace Cu^+ iontů v pufru

4.11 Chelatace měďnatých iontů v pufru

- Nejdříve bylo do všech jamek mikrotitrační destičky napipetováno:
 - 100 μl daného pufru
 - 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci do **testovacích jamek** nebo 50 μl rozpouštědla (DMSO) do **kontrolních jamek**
 - 50 μl 250 μM roztoku měďnatých iontů v DMSO
- Následně byla destička 2 minuty míchána na třepačce.
- Poté bylo napipetováno:
 - 50 μl roztoku HA – 1mM do prostředí o pH 6,8 a 7,5 nebo 10mM do prostředí o pH 4,5 a 5,5
- Poté byla destička opět míchána na třepačce po dobu 1 minuty.
- Na závěr bylo přidáno:
 - 50 μl 5mM indikačního roztoku BCS do **horní poloviny** jamek a 50 μl destilované vody do **spodní poloviny** jamek
- Ihned byla změřena absorbance při vlnové délce 484 nm a poté znovu v čase 5 minut.

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



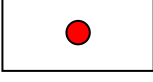
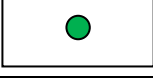
	testovací jamky (roztoky testované látky)	Konečný obsah jamek: 100 μl pufru 50 μl roztoku testované látky nebo DMSO 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů 50 μl roztoku HA 50 μl roztoku BCS nebo destilované vody
	kontrolní jamky (DMSO)	
	jamky s indikátorem (BCS)	
	slepé vzorky (destilovaná voda)	

Obrázek 16: Schematické zobrazení mikrotitrační destičky při měření chelatace Cu^{2+} iontů v pufru

4.12 Redukce měďnatých iontů v pufru

- Do příslušných jamek testovací destičky bylo pipetováno:
 - 100 μl daného pufru do všech jamek
 - do **testovacích jamek** 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci nebo rozpouštědla a do **kontrolních jamek** při pH 6,8 a 7,5 - 50 μl 1mM roztoku HA nebo při pH 4,5 a 5,5 – 50 μl 10mM roztoku HA
 - 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů do všech jamek
- Mikrotitrační destička byla třepána na třepačce po dobu 2 minut.
- Bylo nepipetováno:
 - 50 μl 5mM roztoku BCS do **horní poloviny** jamek a 50 μl destilované vody do **spodní poloviny** jamek
- Poté byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 484 nm a následně po 5 minutách znovu při stejné vlnové délce.

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_x	Rozpouštědlo (DMSO)	Kontrolní jamky (HA)
Jamky s indikátorem	●	●	●	●	●
	●	●	●	●	●
slepé vzorky	●	●	●	●	●
	●	●	●	●	●

	testovací jamky (roztoky testované látky nebo DMSO)	Konečný obsah jamek: 100 μl pufru 50 μl roztoku testované látky/DMSO nebo roztoku HA 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů 50 μl roztoku BCS nebo destilované vody
	kontrolní jamky (roztok HA)	
	jamky s indikátorem (BCS)	
	slepé vzorky (destilovaná voda)	

Obrázek 17: Schematické zobrazení mikrotitrační destičky při měření redukce Cu^{2+} iontů v pufru

4.13 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena v programu MS Excel a GraphPadPrism verze 7 pro Windows (GraphPad Software, USA). Naměřené výsledky byly zpracovány jako průměr \pm směrodatná odchylka, která byla vypočítána podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$.

Všechny křivky byly sestaveny z nejméně pěti bodů (první bod 0 % chelatace až poslední bod 100 % chelatace).

U chelatační metody s hematoxylinem byly porovnány rozdíly mezi testovanými látkami pomocí 95% konfidenčních intervalů.

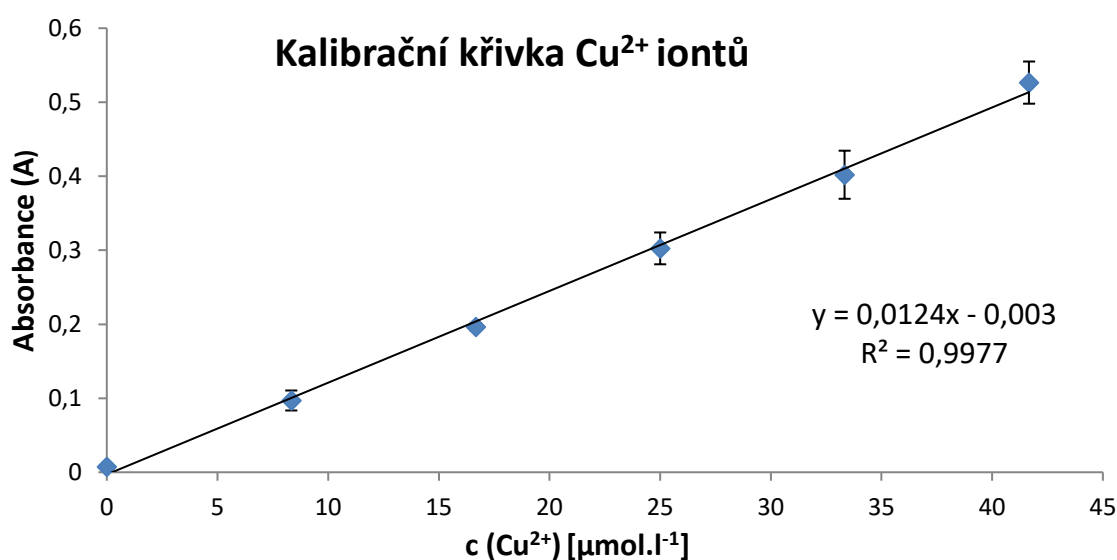
5 VÝSLEDKY

5.1 Kalibrační křivka

Z naměřených hodnot absorbancí pro roztoky měďnatých iontů o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 μM (Tab. 3) byl sestrojen graf kalibrační křivky (Obr. 18). Jedná se o lineární závislost absorpance na koncentraci měďnatých iontů.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty absorpance pro roztoky měďnatých iontů

Základní c (μM)	0	50	100	150	200	250
Finální c (μM)	0	8,333333	16,66667	25	33,33333	41,66667
Průměr A	0,0075	0,097	0,1965	0,3025	0,402	0,5265



Obrázek 18: Kalibrační křivka Cu^{2+} iontů

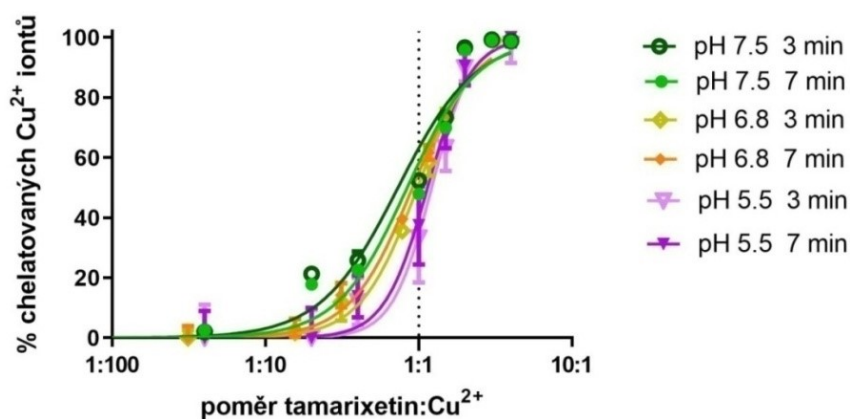
5.2 Chelatační aktivita testovaných látek – hematoxylin

Nejprve byla stanovena měď-chelatační aktivita tamarixetinu a isorhamnetinu metodou s hematoxylinem. Metoda se používá pro počáteční ověření schopnosti chelatace. Je méně kompetitivní než metoda s bathocuproinem, a proto s ní mohou být odhaleny i méně účinné chelátory mědi [47, 80].

Měření různých koncentrací testovaných látek probíhala při pH 5,5, 6,8 a 7,5, vždy v čase 3 a 7 minut.

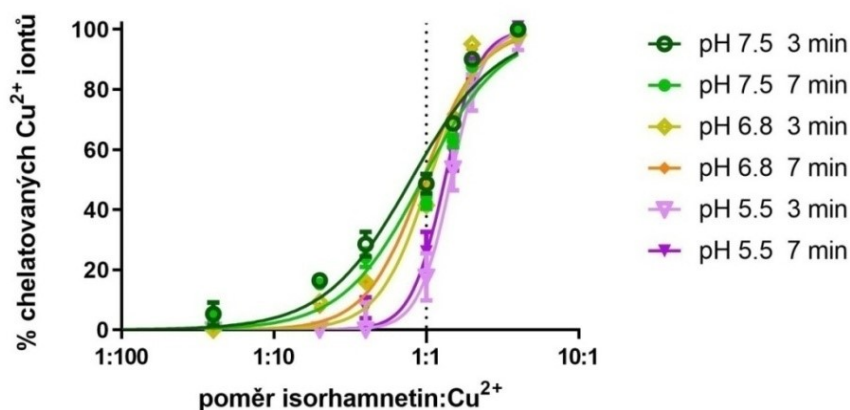
Naměřené hodnoty byly přeneseny do následujících grafů (**Obr. 19 a 20**). Na ose X je vždy zobrazen poměr koncentrací testované látky a Cu^{2+} iontů. Na ose Y se nachází v procentech vyjádřená schopnost testované látky chelatovat Cu^{2+} ionty. Různé hodnoty pH a časy jsou v grafech barevně odlišeny.

5.2.1 Tamarixetin



Obrázek 19: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity tamarixetinu – hematoxylin

5.2.2 Isorhamnetin

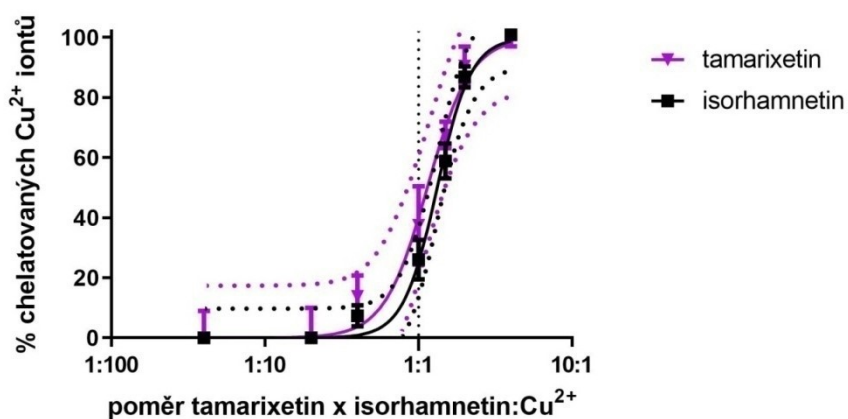


Obrázek 20: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity isorhamnetinu – hematoxylin

5.3 Konfidenční intervaly

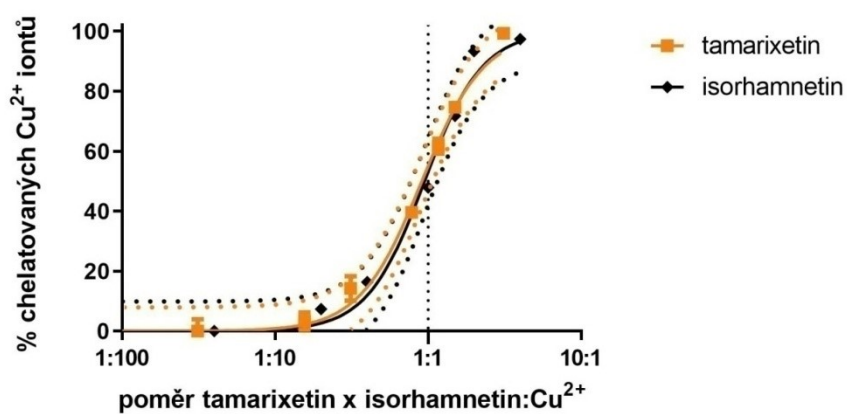
Následně byly pro porovnání chelatační aktivity tamarixetinu a isorhamnetinu při jednotlivých pH použity 95% konfidenční intervaly. Měď-chelatační aktivita obou testovaných látek je patrná z vyobrazených grafů (**Obr. 21 až 23**).

5.3.1 Konfidenční intervaly pH 5.5



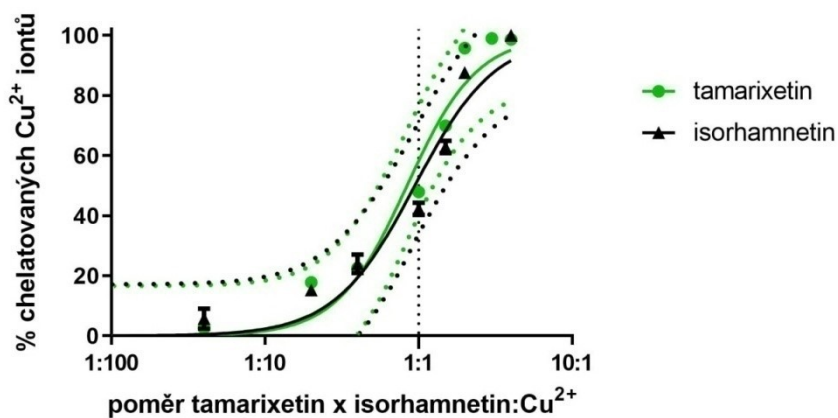
Obrázek 21: Konfidenční intervaly pH 5.5

5.3.2 Konfidenční intervaly pH 6.8



Obrázek 22: Konfidenční intervaly pH 6.8

5.3.3 Konfidenční intervaly pH 7.5



Obrázek 23: Konfidenční intervaly pH 7.5

5.4 Chelatační aktivita testovaných látek – bathocuproin

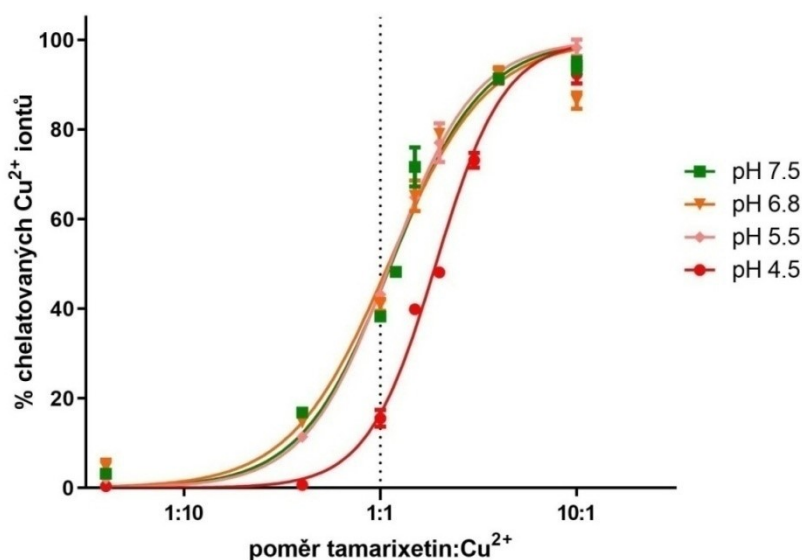
Následně byla stanovena měď-chelatační aktivita tamarixetinu a isorhamnetinu metodou s bathocuproinem. Bathocuproin chelatuje jen Cu^+ ionty. Při stanovení chelatace Cu^{2+} iontů se přidává redukční činidlo hydroxylamin, který redukuje měďnaté ionty na měďné. Hydroxylamin se přidává i při stanovení chelatace Cu^+ iontů, kde udržuje ionty v redukovaném stavu [47, 80].

Měření různých koncentrací testovaných látek probíhala při pH 4.5, 5.5, 6.8 a 7.5, vždy v čase 0 (výsledky nezobrazeny) a 5 minut.

Naměřené hodnoty byly přeneseny do následujících grafů (**Obr. 24 až 27**). Na ose X je vždy zobrazen poměr koncentrací testované látky a roztoků iontů mědi. Na ose Y se nachází v procentech vyjádřená schopnost testované látky chelatovat ionty mědi. Různé hodnoty pH jsou v grafech barevně odlišeny.

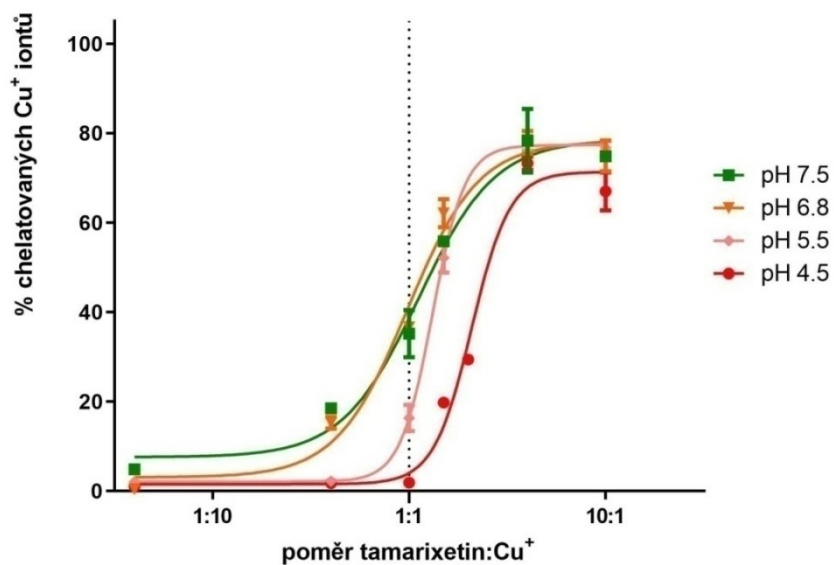
U více kompetitivní metody s bathocuproinem byly oba testované flavonoidy, v koncentračním poměru 1:1 (flavonoid: Cu), schopné chelatovat měď v rozmezí 5-50 %, při vyšších hodnotách pH, tedy 5.5 až 7.5. Pouze v kyselém prostředí o pH 4.5 byla schopnost chelatace téměř nulová (**Obr. 24 až 27**).

5.4.1 Tamarixetin



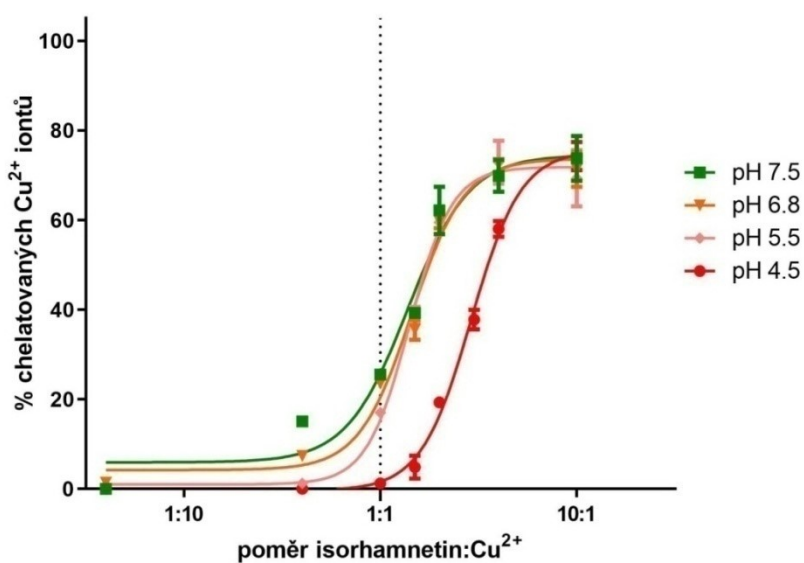
Obrázek 24: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity tamarixetinu na Cu^{2+} - bathocuproin.

Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

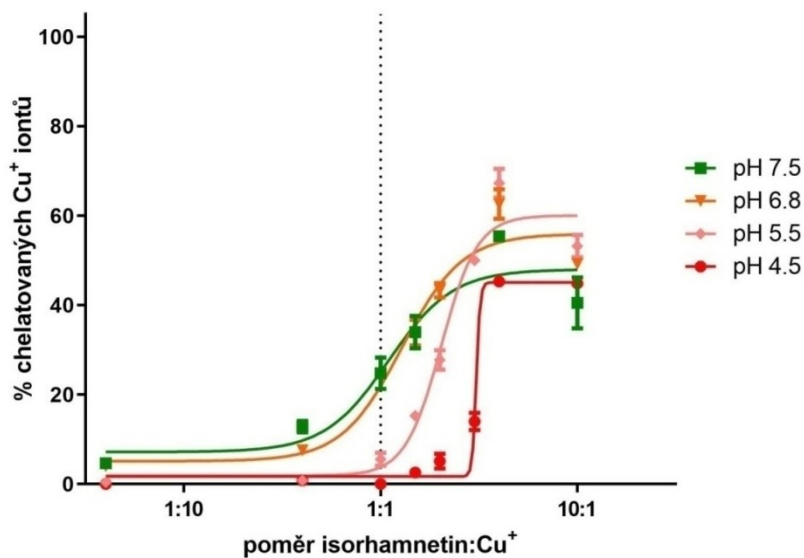


Obrázek 25: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity tamarixetinu na Cu^+ - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

5.4.2 Isorhamnetin



Obrázek 26: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity isorhamnetinu na Cu^{2+} - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

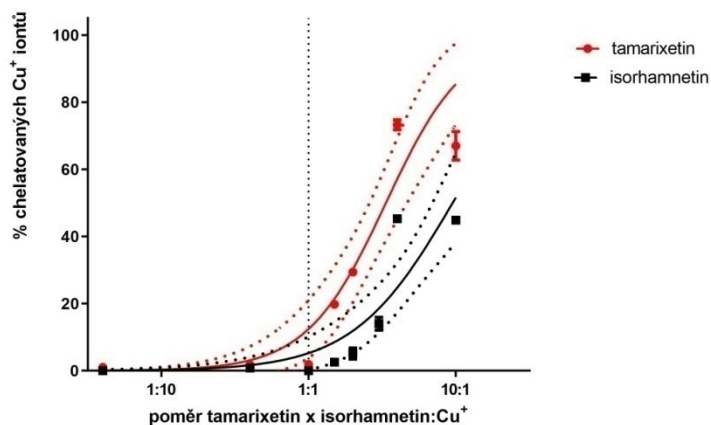


Obrázek 27: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity isorhamnetinuna Cu⁺ - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

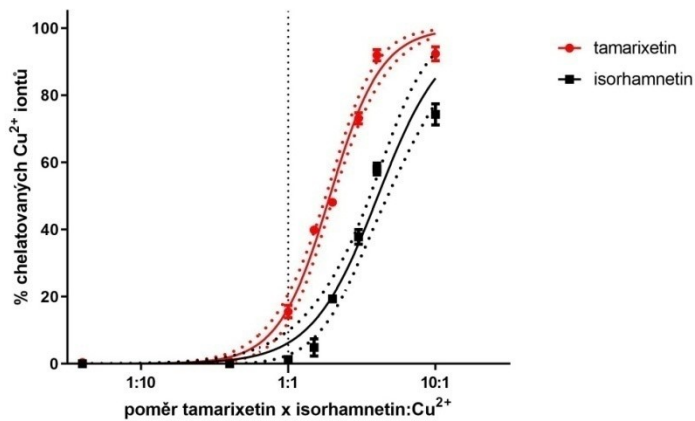
5.5 Konfidenční intervaly

Schopnost chelatace Cu⁺ a Cu²⁺ iontů tamarixetinem a isorhamnetinem při jednotlivých pH byla následně porovnána pomocí 95% konfidenčních intervalů. Měď-chelatační aktivita obou testovaných látek je patrná z vyobrazených grafů (Obr. 28 až 35).

5.5.1 Konfidenční intervaly pH 4.5

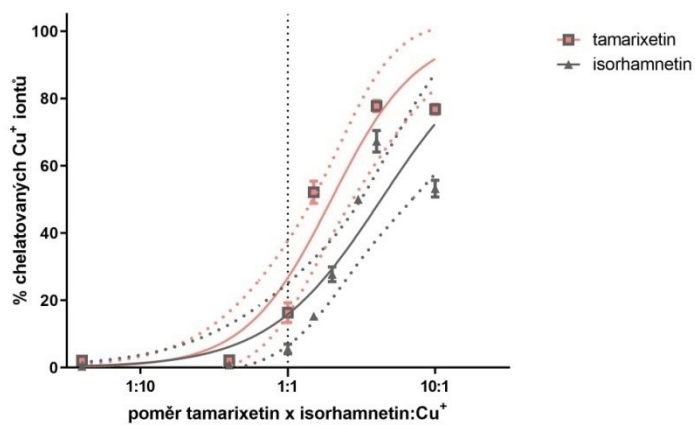


Obrázek 28: Konfidenční intervaly pH 4.5 - porovnání chelatace Cu⁺ iontů

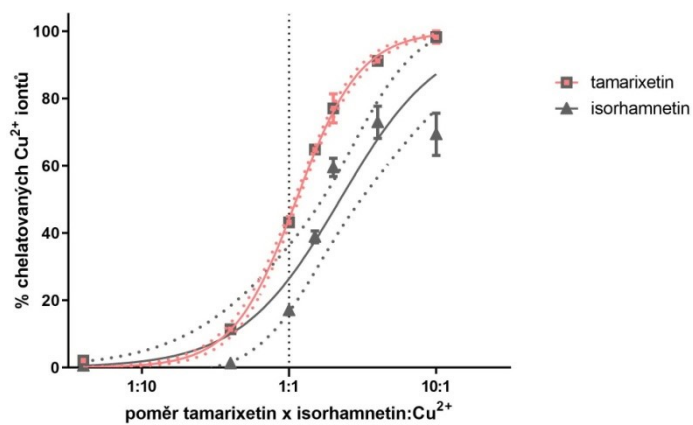


Obrázek 29: Konfidenční intervaly pH 4.5 - porovnání chelatace Cu^{2+} iontů

5.5.2 Konfidenční intervaly pH 5.5

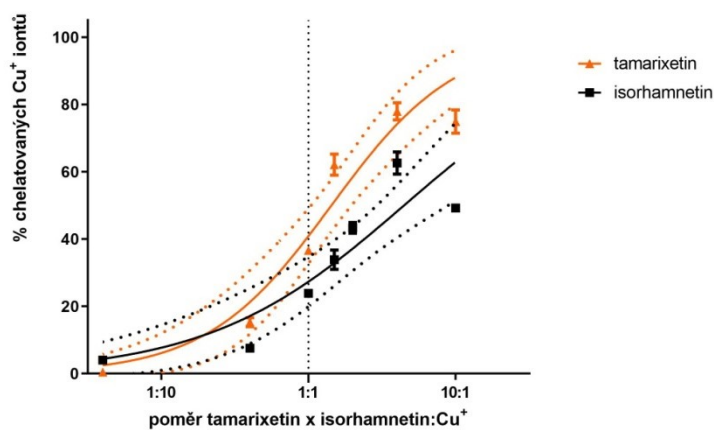


Obrázek 30: Konfidenční intervaly pH 5.5 - porovnání chelatace Cu^+ iontů

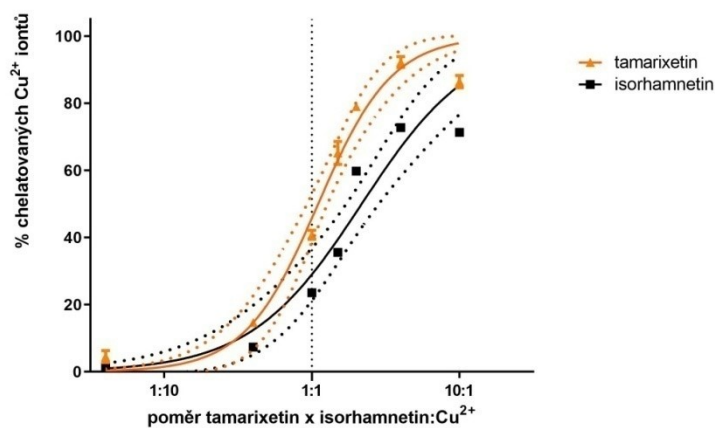


Obrázek 31: Konfidenční intervaly pH 5.5 - porovnání chelatace Cu^{2+} iontů

5.5.3 Konfidenční intervaly pH 6.8

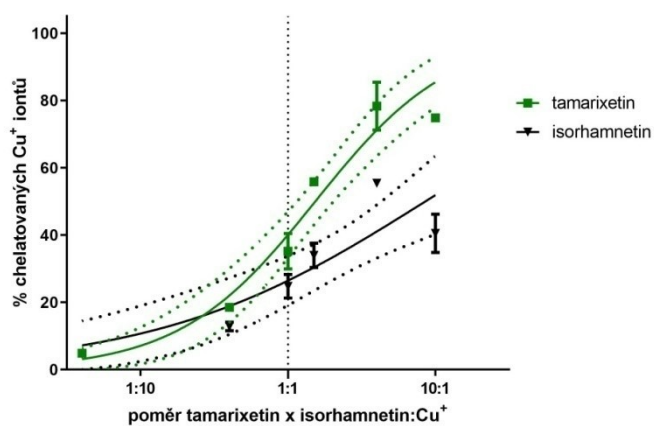


Obrázek 32: Konfidenční intervaly pH 6.8 - porovnání chelatace Cu^+ iontů

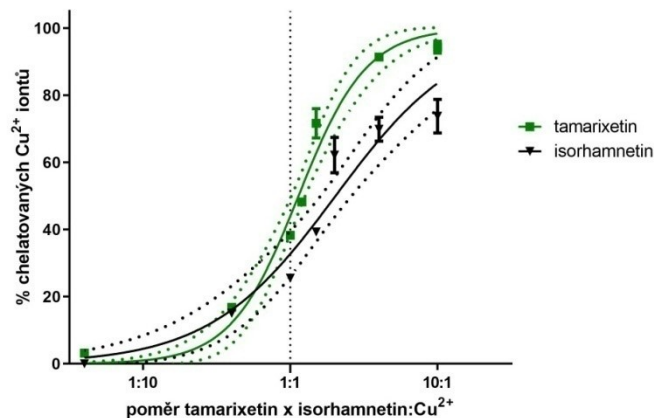


Obrázek 33: Konfidenční intervaly pH 6.8 - porovnání chelatace Cu^{2+} iontů

5.5.4 Konfidenční intervaly pH 7.5



Obrázek 34: Konfidenční intervaly pH 7.5 - porovnání chelatace Cu^+ iontů



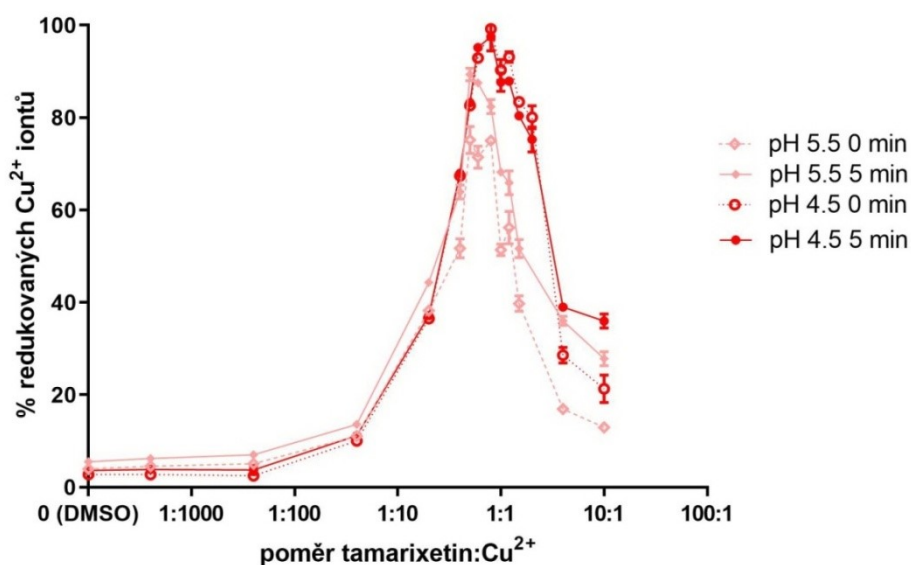
Obrázek 35: Konfidenční intervaly pH 7.5 - porovnání chelatace Cu²⁺ iontů

5.6 Redukční aktivita testovaných látek

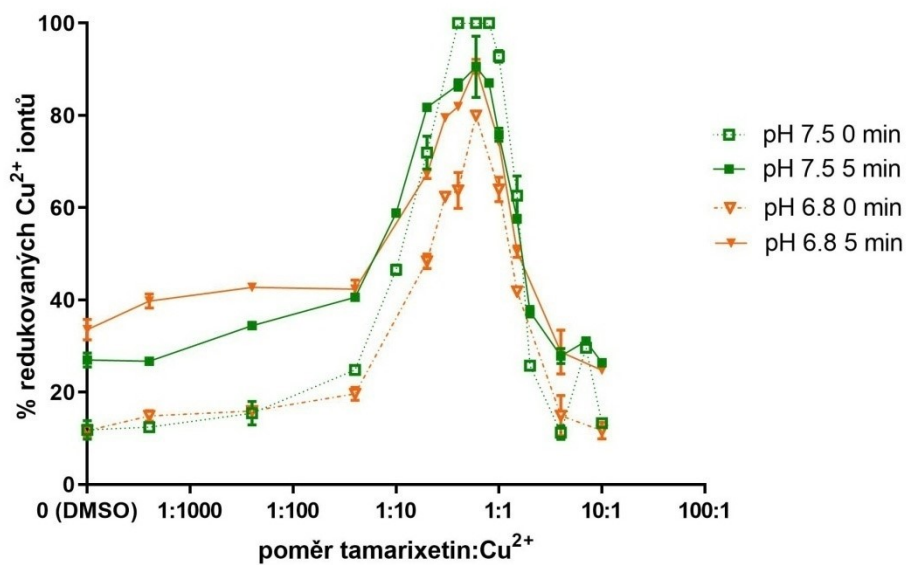
Dále byla stanovena schopnost tamarixetinu a isorhamnetinu redukovat měďnaté ionty. Měření různých koncentrací testovaných látek probíhala při pH 4.5, 5.5, 6.8 a 7.5, vždy v čase 0 a 5 minut.

Naměřené hodnoty redukčních aktivit byly přeneseny do následujících grafů (**Obr. 36 až 39**). Na ose X je vždy zobrazen poměr koncentrací testované látky a roztoku měďnatých iontů. Na ose Y se nachází v procentech vyjádřená schopnost testované látky redukovat měďnaté ionty. Různé hodnoty pH a časy jsou v grafech barevně odlišeny. Redukční schopnost obou látek byla významná (**Obr. 36 až 39**).

5.6.1 Tamarixetin

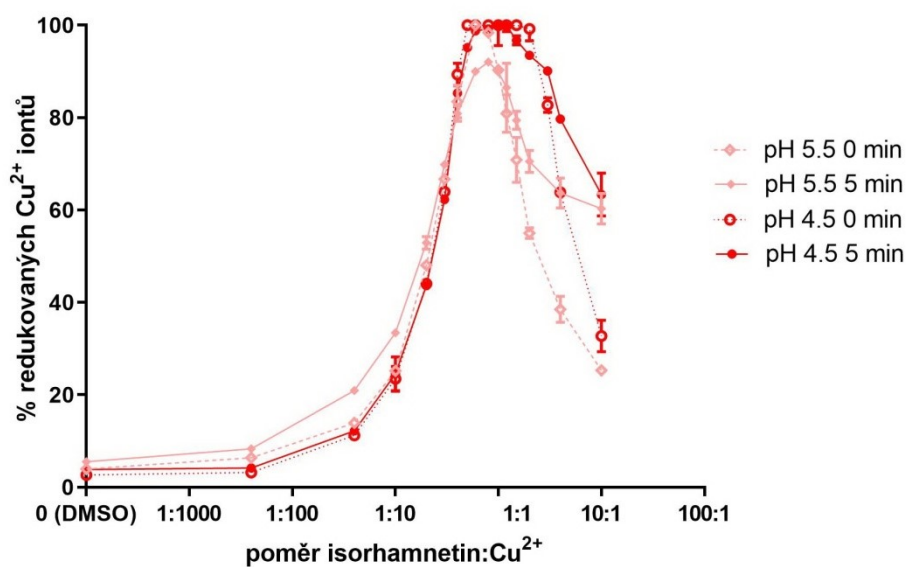


Obrázek 36: Grafické zobrazení schopnosti tamarixetinu redukovat měďnaté ionty při pH 4.5 a 5.5

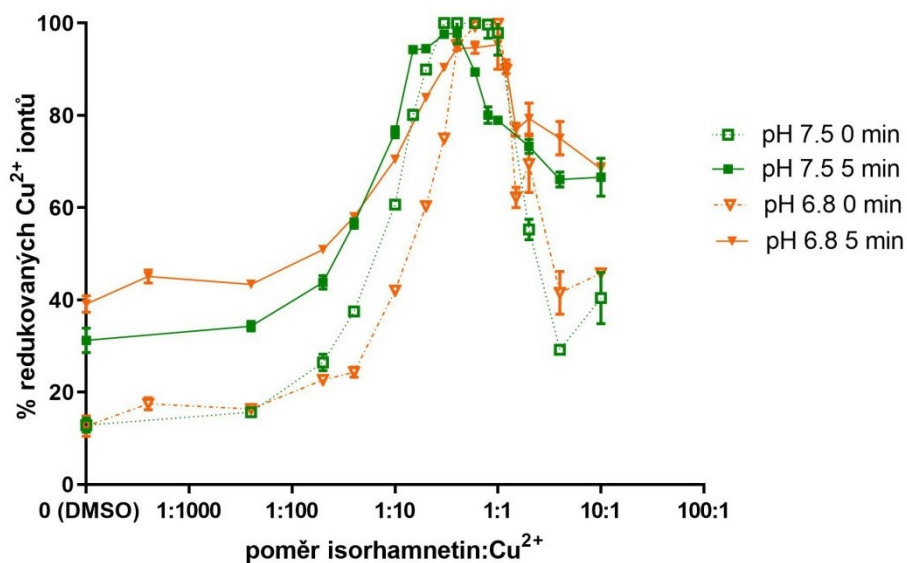


Obrázek 37: Grafické zobrazení schopnosti tamarixetinu redukovat měďnaté ionty při pH 6.8 a 7.5

5.6.2 Isorhamnetin



Obrázek 38: Grafické zobrazení schopnosti isorhamnetinu redukovat měďnaté ionty při pH 4.5 a 5.5

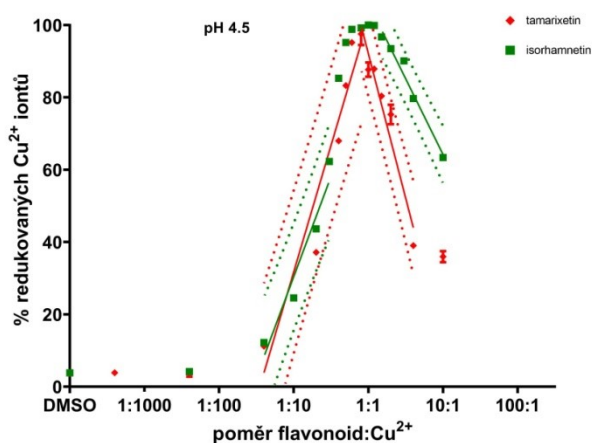


Obrázek 39: Grafické zobrazení schopnosti isorhamnetinu redukovat měďnaté ionty při pH 6.8 a 7.5

5.7 Konfidenční intervaly křivky lineární regrese

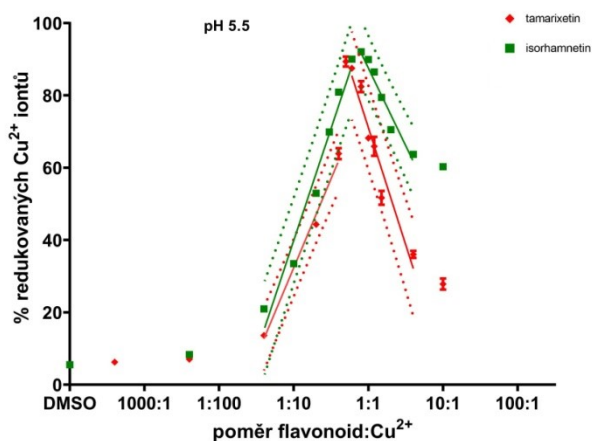
Následně byla porovnána redukční aktivita obou látek pomocí 95% konfidenčních intervalů křivky lineární regrese. Schopnost redukce měďnatých iontů při jednotlivých pH je patrná z vyobrazených grafů (Obr. 40 až 43).

5.7.1 Konfidenční intervaly křivky lineární regrese pH 4.5



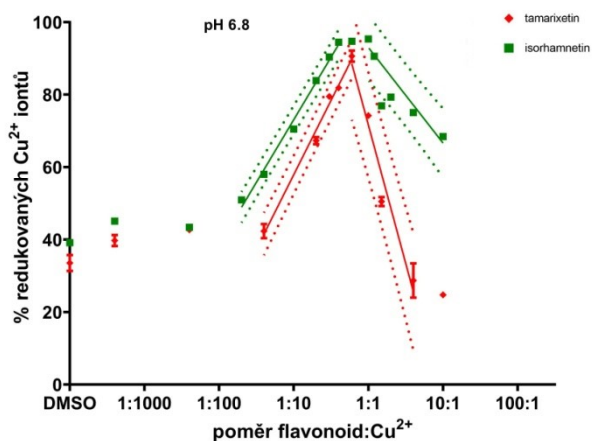
Obrázek 40: Porovnání redukce Cu²⁺ iontů pomocí 95% konfidenčních intervalů křivky lineární regrese – pH 4.5

5.7.2 Konfidenční intervaly křivky lineární regrese pH 5.5



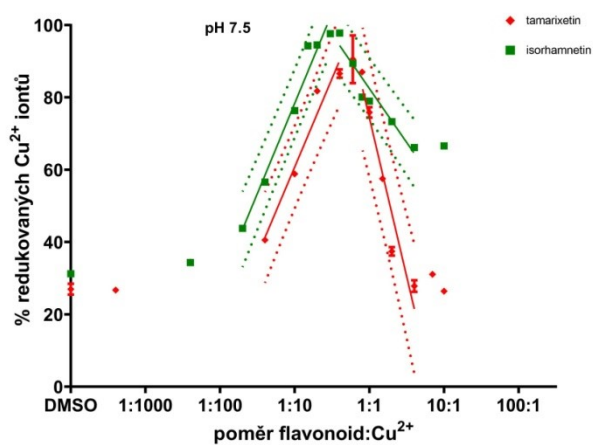
Obrázek 41: Porovnání redukce Cu^{2+} iontů pomocí 95% konfidenčních intervalů křivky lineární regrese – pH 5.5

5.7.3 Konfidenční intervaly křivky lineární regrese pH 6.8



Obrázek 42: Porovnání redukce Cu^{2+} iontů pomocí 95% konfidenčních intervalů křivky lineární regrese – pH 6.8

5.7.4 Konfidenční intervaly křivky lineární regrese pH 7.5



Obrázek 43: Porovnání redukce Cu^{2+} iontů pomocí 95% konfidenčních intervalů křivky lineární regrese – pH 7.5

6 DISKUZE

Tamarixetin a isorhamnetin jsou látky ze skupiny flavonoidů patřící mezi sekundární metabolity rostlin. Mezi biologické účinky flavonoidů se řadí jejich antioxidační, protizánětlivá, protinádorová a hepatoprotektivní aktivita [47]. Jejich potencionální využití k terapii různých chorob je předmětem výzkumu. Známa je jejich schopnost chelatovat přechodné kovy. Chelátory mědi lze použít při léčbě onemocnění souvisejících s přetížením těla mědí a jejím toxickým působením. V současné době jsou užívány pouze u Wilsonovy choroby [23].

V této diplomové práci byly použity dvě látky ze skupiny methylderivátů kvercetinu – tamarixetin a isorhamnetin ke stanovení jejich měď-chelatačních a redukčních vlastností. Pro stanovení iontů mědi *in vitro* se používají různé metody. Rychlé a levné je použití spektrofotometrického měření [84]. V našem případě byly použity dvě konkrétní metody. První za použití hematoxylinu (HEM) jako indikátoru a druhá za použití disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) jako indikátoru. Metody jsou založené na kompetici testované látky s chelátorem mědi, který slouží i jako indikátor, o ionty mědi. Chelatační schopnosti testovaných látek byly vyhodnoceny na základě vytvoření komplexu mezi ionty mědi a HEM nebo BCS [80].

K prvotnímu ověření schopnosti chelatovat měď byla použita hematoxylinová metoda, která je méně kompetitivní. Hematoxylin vytváří s ionty mědi méně stabilní komplexy a nelze ho použít při velmi kyselém pH (4.5) [80].

Stanovení chelatace Cu^{2+} iontů s hematoxylinem bylo měřeno při pH 7.5, 6.8 a 5.5. Ze získaných výsledků je patrné, že obě látky vykazovaly velmi dobrou schopnost chelatace při všech použitých pH. S narůstající koncentrací obou testovaných látek vzrůstala i procenta chelatovaných měďnatých iontů. Při koncentračním poměru 5:1 (poměr flavonoid:měďnaté ionty) dosahovala až 100 %.

Porovnáním konfidenčních intervalů lze vidět, že obě látky vykazovaly velmi podobnou chelatační aktivitu. Jen při pH 5.5 měl tamarixetin mírně vyšší chelatační potenciál. Je ovšem potřeba vzít v úvahu, že při tomto pH má hematoxylin relativně nízkou afinitu pro Cu^{2+} ionty, což lze vidět i na získaných grafech (**Obr. 19 a 20**). Z tohoto důvodu jej nelze použít k porovnávání relativních afinit testovaných látek [80].

Zatímco tamarixetin a isorhamnetin vykazují při stanovení Cu^{2+} iontů s hematoxylinem téměř stejné chelatační schopnosti, oproti kvercetinu je jejich aktivita nižší.

Z výsledků měření, kde byl kvercetin testován stejnou metodou jako tamarixetin a isorhamnetin v této práci, vyplývá, že kvercetin má vyšší chelatační potenciál. Při koncentračním poměru 1:1 vykazoval 100 % chelatace Cu^{2+} iontů, zatímco mnou testované látky vykazovaly při stejném koncentračním poměru jen 50 % chelatace [83].

Následně byla chelatační aktivita ověřena kompetitivnější metodou s bathocuproinem, při které vznikají stabilnější komplexy a lze ji použít v širším rozmezí pH. Při přidání vhodného redukčního činidla, v tomto případě hydroxylaminu, se pomocí BCS dají stanovit jak měďné, tak měďnaté ionty [80].

Chelatace Cu^+ a Cu^{2+} iontů byla měřena při pH 4.5, 5.5, 6.8 a 7.5. Tamarixetin při tomto měření prokázal vyšší chelatační aktivitu než isorhamnetin. Při stanovení Cu^{2+} iontů dosahoval v koncentračním poměru 10:1 100 % chelatovaných iontů, a to při všech použitých pH. U koncentračního poměru 1:1 (chelátor:měď) bylo při pH 7.5, 6.8 a 5.5 chelatováno 50 % měďnatých iontů, u pH 4.5 pouze 20 %. Při chelataci Cu^+ iontů bylo v prostředí o pH 5.5, 6.8 a 7.5 chelatováno maximálně 80 % iontů u poměru 10:1. V prostředí o pH 4.5 bylo naměřeno chelatační maximum 70 % při koncentračním poměru 10:1. Při poměru 1:1 bylo u pH 7.5 a 6.8 chelatováno 40 % měďných iontů, při pH 5.5 pouze 20 % a v prostředí o pH 4.5 nedošlo při uvedeném koncentračním poměru k žádné chelataci.

Isorhamnetin prokázal o něco nižší chelatační schopnosti. Při stanovení Cu^{2+} iontů bylo při koncentračním poměru 10:1 chelatováno necelých 80 % přítomných iontů při všech pH. Při poměru 1:1 bylo naměřeno 30 % chelatovaných měďnatých iontů u pH 7.5, 6.8 a 5.5 20 % a u pH 4.5 byla chelatace v tomto koncentračním poměru nulová. Pro Cu^+ ionty se maximální hodnoty pro pH 4.5 a 7.5 pohybovaly kolem 50 % při poměru 10:1. Při pH 5.5 a 6.8 byly výsledky naměřených hodnot nepatrně vyšší, a to 60 % chelatovaných iontů. Chelatace při koncentračním poměru 1:1 byla pro pH 7.5 a 6.8 asi 30 %, u pH 5.5 a 4.5 nedošlo k žádné chelataci.

Z grafů konfidenčních intervalů (**Obr. 28 až 35**) lze konstatovat, že chelatační aktivita testovaných látek byla rozdílná. Tamarixetin vykazoval při všech měřeních vyšší chelatační potenciál než isorhamnetin.

Nejnižší hodnoty u obou stanovovaných látek byly získány vždy při použití velmi kyselého prostředí s pH 4.5. Žádná z látek nebyla selektivní k jednomu konkrétnímu oxidačnímu stavu mědi ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$). Vyšší afinitu vykazovaly obecně k oxidované formě (Cu^{2+}).

Schopnost chelatace kovových iontů ovlivňují u flavonoidů hydroxylové skupiny. Důležitá je konkrétně přítomnost hydroxylové skupiny v poloze 3 (popřípadě v poloze 5), dále přítomnost ketoskupiny v poloze 4 a dvojná vazba v poloze 2-3 [47].

Stejné výsledky byly potvrzeny i v této diplomové práci. Tamarixetin i isorhamnetin mohou tvořit komplex s mědí mezi hydroxylovou skupinou v poloze 3 a karbonylovou skupinou v poloze 4 nebo případně mezi hydroxylovou skupinou v poloze 5 a karbonylovou skupinou v poloze 4. V porovnání s kvercetinem mají na kruhu B jen jednu volnou hydroxylovou skupinu a druhou mají methylovanou. Nedosahují proto takové aktivity jako kvercetin. Ze získaných výsledků lze konstatovat, že hydroxylová skupina umístěná na kruhu B v poloze 3' má pro chelatační aktivitu pravděpodobně větší význam, než když se nachází v pozici 4'.

Redukční aktivita testovaných látek byla měřena pomocí bathocuproinu, který tvoří komplex s Cu^+ ionty [81]. Jako pozitivní kontrola byl použit hydroxylamin. Jedná se o redukční činidlo, které redukuje kompletně všechny přítomné Cu^{2+} ionty.

Schopnost redukce měďnatých iontů byla zjištěna u obou testovaných látek při použití všech pH (4.5, 5.5, 6.8, 7.5). Tamarixetin vykazoval 100 % redukční aktivitu v prostředí o pH 4.5 a 7.5. V obou případech při koncentračním poměru 1:1. V prostředí o pH 5.5 a 6.8 vykazoval maximálně 90 % redukční aktivitu. Isorhamnetin vykazoval 100 % redukční aktivitu v prostředí o pH 4.5, 6.8 a 7.5. Opět při koncentračním poměru 1:1. V prostředí o pH 5.5 vykazoval maximálně 90 % redukční aktivitu.

Porovnáním konfidenčních intervalů křivek lineární regrese (**Obr. 40 až 43**) je patrné, že při nižších koncentračních poměrech nebyly mezi redukčními schopnostmi látek významné rozdíly. Obě látky zde vykazovaly podobné prooxidační působení. Redukční aktivitu látek při velmi nízkých koncentračních poměrech je potřeba ještě zjistit dalším testováním. Při vyšších koncentračních poměrech již převládla chelatace Cu^{2+} iontů nad jejich redukcí a tamarixetin se zde projevil jako významnější chelátor. Jeho křivka klesá výrazně strměji než křivka isorhamnetinu. To odpovídá výsledkům měření chelatační aktivity uvedeným výše.

Redukční schopnosti závisí u flavonoidů především na počtu hydroxylových skupin přítomných v molekule. Čím více hydroxylových skupin se vyskytuje, tím má látka větší redukční potenciál [81]. Tamarixetin i isorhamnetin obsahují čtyři hydroxylové skupiny, a proto u nich můžeme pozorovat až 100 % redukce iontů mědi.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsem stanovovala měď-chelatační a redukční schopnosti dvou flavonoidů, tamarixetinu a isorhamnetinu, pomocí spektrofotometrických metod. Jednotlivá měření probíhala v prostředí (pato)fyzilogicky významných pH (4.5, 5.5, 6.8 a 7.5).

Jako první byla použita hematoxylinová metoda, která slouží k základnímu screeningu chelatačních schopností. Obě látky se ukázaly jako vysoce účinné. Již při nižších koncentracích vykazovaly významné chelatační schopnosti. Ve vyšších koncentračních poměrech dosáhla chelatace měďnatých iontů až 100 % v prostředí všech použitých pH. Oproti kvercetinů byla jejich aktivita nižší.

Následně byla ke stanovení chelatace měďných a měďnatých iontů použita bathocuproinová metoda. Z naměřených a do grafů zpracovaných výsledků je patrné, že tamarixetin při tomto měření vykázal vyšší chelatační aktivitu než isorhamnetin. Schopnost chelatace Cu^+ a Cu^{2+} iontů byla nejvyšší při pH 7.5 a následně klesala v pořadí $7.5 > 6.8 > 5.5 > 4.5$. Z čehož lze vyvodit, že pro chelatační aktivitu je důležitým faktorem nejen struktura dané látky, ale také pH prostředí, v kterém je měření prováděno.

U obou testovaných látek byl naměřen také významný redukční potenciál. Jak tamarixetin, tak isorhamnetin byly schopné redukovat Cu^{2+} ionty při všech použitých pH. Redukce, která činila 100 %, byla zjištěna při koncentračním poměru 1:1 u obou flavonů.

Tamarixetin a isorhamnetin byly stanoveny hlavními metabolity, identifikovanými v plazmě po perorálním podání kvercetinu a jeho glykosidů u potkanů [82]. Je proto vhodné jim věnovat pozornost a zjistit, zda mohou pozitivně ovlivňovat lidské zdraví a jaká u nich lze očekávat rizika. Z provedené rešerše, která je zakomponována do teoretické části diplomové práce (str. 34 až 36), je známo, že se nacházejí také v mnoha rostlinných zdrojích.

Schopnost chelatace kovových iontů (především mědi a železa) je jedním z mechanismů antioxidačního působení flavonoidů. Redukce železa a mědi je oproti tomu spojena s jejich prooxidačním působením. Redukované kovy mohou katalyzovat tvorbu hydroxylových radikálů prostřednictvím Fentonovy reakce [81].

Z dostupných zdrojů bylo zjištěno, že u tamarixetinu ani isorhamnetinu ještě nebyla měřena interakce s ionty železa a zinku. Bylo by proto vhodné na tuto oblast zaměřit další výzkum. Podle výsledků jejich vlastností, vykazují dobrou chelatační aktivitu, a tak se mohou jevit jako slibné chelátory.

Také je třeba vzít na vědomí, že schopnosti vykazované *in vitro* nemusí být stejné jako chování látky *in vivo*. Po perorálním podání dochází u flavonoidů k metabolizaci střevní mikroflórou a látky dosahují jen nízkých plazmatických koncentrací [82].

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A β	Amyloid β
AD	Alzheimerova choroba
ALS	Amyotrofická laterální skleróza
APP	Amyloidový prekurzorový protein
AS	α -synuklein
BCS	Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
COX	Cyklooxygenasa
CP	Ceruloplasmin
DMSO	Dimethylsulfoxid
HA	Hydroxylamin hydrochlorid
HEM	Hematoxylin
IL-1b	Interleukin-1b
K-F	Kayserův-Fleischerův
LOX	Lipoxygenasa
MAO A	Monoaminoxidasa A
MAO B	Monoaminoxidasa B
MD	Menkesova nemoc
MT	Metalothionein
ND	Neurodegenerativní onemocnění
OHS	Occipital horn syndrom
PD	Parkinsonova nemoc
PrP	Prionový protein
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxiddismutasa
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor- α
WD	Wilsonova choroba

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. Gaetke L. M., Chow-Johnson H. S., Chow C. K.: Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology* 88(11), 1929–1938 (2014).
2. Committee on Copper in Drinking Water, National Research Council: *Copper in Drinking Water*. str. 11. The National Academies Press, Washington, DC 2000.
3. Cotton A. F., Wilkinson G.: *Anorganická chemie: souborné zpracování pro pokročilé*. str. 861. Academia, Praha 1973.
4. Kučera L.: *Bakalářská práce*. Biogenní prvky. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2009.
5. Ugarte M., Osborne N. N., Laurence A. B., Bishop P. N.: Iron, zinc, and copper in retinal physiology and disease. *Survey of Ophthalmology* 58(6), 585-609 (2013).
6. Uauy R., Olivares M., Gonzalez M.: Essentiality of copper in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 67(5), 952-959 (1998).
7. Angelova M., Asenova S., Nedkova V., Koleva - Kolarova R.: Copper in the Human Organism. *Trakia Journal of Sciences* 9(1), 88-98 (2011).
8. Racek J., et al.: *Klinická biochemie*. str. 63,129. Galén – Karolinum, Praha 1999.
9. Giurgea N., Constantinescu M. I., Stanciu R., Suciú S., Muresan A.: Ceruloplasmin – acute-phase reaktant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease. *Medical Science Monitor* 11(2), 48-51 (2005).
10. Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D.: Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 57(9), 386-398 (2003).
11. Smith-Mungo L. I., Kagan H.M.: Lysyloxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biology* 16(7), 387-398 (1998).
12. Hubalek F., Pohl J., Edmondson D. E.: Structural comparison of human monoamine oxidases A and B: mass spectrometry monitoring of cysteine reactivities. *The Journal of Biological Chemistry* 278(31), 28612–28618 (2003).
13. Sanchez-Ferrer A., Rodriguez-Lopez J. N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F.: Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1247, 1-11 (1995).
14. Bost M., Houdart S., Oberli M., Kalonji E., Huneau J. F., Margaritis I.: Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 35, 107-115 (2016).

15. Linder M. C., Hazegh-Azam M.: Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63(5), 797-811 (1996).
16. Tao T. Y., Gitlin J. D.: Hepatic Copper Metabolism: insights from genetic disease. *Hepatology* 37(6), 1241-1247 (2003).
17. Beshgetoor D., Hambidge M.: Clinical conditions altering copper metabolism in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67(5), 1017-1021 (1998).
18. Hoffman H. N., Phyliky R. L., Fleming C. R.: Zinc-induced copper deficiency. *Gastroenterology* 94(2), 508-512 (1988).
19. Gaetke L. M., Chow C. K.: Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189(1), 147-163 (2003).
20. Shim H., Harris Z. L.: Genetic Defects in Copper Metabolism. *The Journal of Nutrition* 133(5), 1527-1531, (2003).
21. Tao T. Y., Gitlin J. D.: Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease. *Hepatology* 37(6), 1241-1247, (2003).
22. Ala A., Walker A. P., Ashkan K., Dooley J. S., Schilsky M. L.: Wilson's disease. *The Lancet* 369(9559), 397-408 (2007).
23. Bandmann O., Weiss K. H., Kaler S. G.: Wilson's disease and other neurological copper disorders. *The Lancet Neurology* 14(1), 103-113, (2015).
24. Vrabelova S., Letocha O., Borsky M., Kozak L.: Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 86(1-2), 277-285 (2005).
25. Tümer Z., Møller L. B.: Menkes disease. *European Journal of Human Genetics* 18(5), 511-518 (2010).
26. Bertini I., Rosato A.: Menkes disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(2008), 89-91 (2007).
27. Tümer Z.: An overview and update of ATP7A mutations leading to Menkes disease and occipital horn syndrome. *Human Mutation* 34(3), 417-429 (2013).
28. Kodama H., Murata Y., Kobayashi M.: Clinical manifestations and treatment of Menkes disease and its variants. *Pediatrics International* 41(4), 423-429 (1999).
29. Harris Z. L., Klomp L. W., Gitlin J. D.: Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67(5), 972-977 (1998).

30. Kono S., Miyajima H.: Molecular and pathological basis of aceruloplasminemia. *Biological research* 39(1), 15-23 (2006).
31. Miyajima H.: Aceruloplasminemia, an iron metabolic disorder. *Neuropathology* 23(4), 345-350 (2003).
32. Brittenham G. M.: Iron-Chelating Therapy for Transfusional Iron Overload. *The New England Journal of Medicine* 364(2), 146-156 (2011).
33. Kozłowski H., Janicka-Kłos A., Brasun J., Gaggelli E., Valensin D., Valensin G.: Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coordination Chemistry Reviews* 253(21-22), 2665-2685 (2009).
34. Rivera-Mancía S., Pérez-Neri I., Ríos C., Tristán-López L., Rivera-Espinosa L., Montes S.: The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions* 186(2), 184-199 (2010).
35. Waggoner D. J., Bartnikas T. B., Gitlin J. D.: The Role of Copper in Neurodegenerative Disease. *Neurobiology of Disease* 6(4), 221-230 (1999).
36. Strausak D., Mercer J. F., Dieter H. H., Stremmel W., Multhaup G.: Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Research Bulletin* 55(2), 175-185 (2001).
37. Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M.: Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry* 345(1-2), 91-104 (2010).
38. de Lau L. M., Breteler M. M.: Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 5(6), 525-535 (2006).
39. Desai V., Kaler S. G.: Role of copper in human neurological disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88(3), 855-858 (2008).
40. Rasia R. M., Bertoncini C. W., Marsh D., Hoyer W., Cherny D., Zweckstetter M., Griesinger Ch., Jovin T. M., Fernández C. O.: Structural characterization of copper(II) binding to α -synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(12), 4294-4299 (2005).
41. Štětkářová I., Matěj R., Ehler E.: Nové poznatky v diagnostice a léčbě amyotrofické laterální sklerózy. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* 81(5), 546-554 (2018).

42. Rowland L. P., Shneider N. A.: Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 344(22), 1688-1700 (2001).
43. Mead S.: Prion disease genetics. *European Journal of Human Genetics* 14, 273–281 (2006).
44. Pauly P. C., Harris D. A.: Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *The Journal of Biological Chemistry* 273(50), 33107–33110 (1998).
45. Flora S. J., Mittal M., Mehta A.: Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *The Indian Journal of Medical Research* 128(4), 501-23 (2008).
46. Muller P.: Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry* 66(5), 1077-1184 (1994).
47. Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Rocha L., Bovicelli P., Proietti Silvestri I., Saso L., Jahodář L., Hrdina R., Mladěnka P.: *In vitro* evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advances* 4(62), 32628-32638 (2014).
48. Bechná K.: *Diplomová práce. Měď a její pato/fyziologický význam v lidském organismu.* Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové 2013.
49. Manach C., Donovan J. L.: Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research* 38(8), 771-785 (2004).
50. Kumar S., Pandey A. K.: Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal* 2013, ID 162750, 16 stran (2013).
51. Yao L. H., Jiang Y. M., Shi J., Tomás-Barberán F. A., Datta N., Singanusong R., Chen S. S.: Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59(3), 113-122 (2004).
52. Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A.: Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74(4), 418-425 (2001).
53. Hooper L., Kroon P. A., Rimm E. B., Cohn J. S., Harvey I., Le Cornu K. A., Ryder J. J., Hall W. L., Cassidy A.: Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88(1), 38-50 (2008).
54. Beecher G. R.: Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition* 133(10), 3248-3254 (2003).

55. Hollman P. C. H.: Absorption, Bioavailability and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 42 (sup 1), 74-83 (2004).
56. Justino J., v knize: *Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health* (Rodrigues A. S., Almeida D. P. F., Simal-Gándara J., Pérez-Gregorio M. R.), kap. 20. InTechOpen, 2017.
57. Cushnie T. P., Lamb A. J.: Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(5), 343-356 (2005).
58. Kanadaswami C., Lee L. T., Lee P. P., Hwang J. J., Ke F. C., Huang Y. T., Lee M. T.: The Antitumor Activities of Flavonoids. *In Vivo* 19(5), 895-909 (2005).
59. Karlíčková J., Macáková K., Říha M., Teixeira Pinheiro L. M., Filipský T., Horňasová V., Hrdina R., Mladěnka P.: Isoflavones Reduce Copper with Minimal Impact on Iron *In Vitro*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015, ID 437381, 11 stran, (2015).
60. Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B.: Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(3), 1089-1099 (2008).
61. Andersen Ø. M., Markham K. R.: *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications*. str. 335-336. Taylor & Francis, Boca Raton 2006.
62. Wang W., Sun C., Mao L., Ma P., Liu F., Yang J., Gao Y.: The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology* 56, 21-38 (2016).
63. Russo M., Spagnuolo C., Tedesco I., Bilotto S., Russo G. L.: The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and facies. *Biochemical Pharmacology* 83(1), 6-15 (2012).
64. Boots A. W., Haenen G. R., Bast A.: Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* 585(2-3), 325-337 (2008).
65. Xiao Y., Xin L., Li L., Li G., Shi X., Ji G., Mi J., Xie Y.: Quercetin and kaempferol increase the intestinal absorption of isorhamnetin coexisting in *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson (Elaeagnaceae) extracts *via* regulating multidrug resistance-associated protein 2. *Phytomedicine* (53), 154-162 (2019).
66. Jahodář L.: *FARMAKOBOTANIKA - semenné rostliny*, str. 108, 123, 158, 184. Karolinum, 3. vydání, Praha 2011.
67. Xua Y. J., Kaurb M., Dhillon R. S., Tappia P. S., Dhalla N. S.: Health benefits of sea buckthorn for the preventiv of cardiovascular diseases. *Journal of Functional Foods* 3(1), 2-12 (2011).

- 68.** Yang S., Jiang W., Zhao F., Xu L., Xu Y., Gao B., Sun H., Du L., Tang Y., Cao F.: A highly sensitive and selective fluorescent sensor for detection of copper ions based on natural Isorhamnetin from Ginkgo leaves. *Sensors and Actuators B: Chemical* 236, 386–391 (2016).
- 69.** Hřibová P., Němlička M., Švajdlenka E.: 38. konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, 14.-16. září 2009, Sborník (bez editora), str. 88
- 70.** Dou W., Zhang J., Li H., Kortagere S., Sun K., Ding L., Ren G., Wang Z., Mani S.: Plant flavonol isorhamnetin attenuates chemically induced inflammatory bowel disease via a PXR-dependent pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25(9), 923–933(2014).
- 71.** Spilková J. a kolektiv: *Farmakognozie*, str. 112-113. Karolinum, Praha 2016.
- 72.** Šmejkal K.: Hradecký den léčivých rostlin, Hradec Králové, 20. květen 2017, Sborník Hradeckého dne léčivých rostlin (bez editora), str. 9
- 73.** Khan H., Jawad M., Kamal M. A., Baldi A., Xiao J., Nabavi S. M., Daglia M.: Evidence and prospective of plant derived flavonoids as antiplatelet agents: Strong candidates to be drugs of future. *Food and Chemical Toxicology* 119, 355–367 (2018).
- 74.** Park H. J., Lee S. J., Cho J., Gharbi A., Han H. D., Kang T. H., Kim Y., Lee Y., Park W. S., Jung I. D., Park Y. M.: Tamarixetin Exhibits Anti-inflammatory Activity and Prevents Bacterial Sepsis by Increasing IL-10 Production. *Journal of Natural Products* 81(6), 1435-1443 (2018).
- 75.** Lesjak M., Beara I., Simin N., Pintać D., Majkić T., Bekvalac K., Orčić D., Mimica-Dukić N.: Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods* 40, 68–75 (2018).
- 76.** Abriyani E., Ibrahim S., Darwis D.: Isolation and elucidation structure of tamarixetin glycoside from bungo perak-perak (*Begonia versicolor* Irmsch) leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6(8), 24-27 (2014).
- 77.** Tschesche R., Delhvi S., Sepúlveda S.: Tamarixetin glycosides from the flowers of *Verbascum phlomoides*. *Phytochemistry* 18, 1248-1249 (1979).
- 78.** Sultanova N., Makhmoo T., Abilov Z. A., Parween Z., Omurkamzinova V. B., ur-Rahman A., Choudhary M. I.: Antioxidant and antimicrobial activities of Tamarix ramosissima. *Journal of Ethnopharmacology* 78(2-3), 201-205 (2001).

- 79.** Nessa F., Ismail Z., Mohamed N., Haris M. R. H. M.: Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. *Food Chemistry* 88(2), 243-252 (2004).
- 80.** Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Hrdina R., Mladěnka P.: Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 123, 80-87 (2013).
- 81.** Mira L., Fernandez M. T., Santos M., Rocha R., Florêncio M. H., Jennings K. R.: Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research* 36(11), 1199-1208 (2002).
- 82.** Zhao G., Zou L., Wang Z., Hu H., Hu Y., Peng L.: Pharmacokinetic profile of total quercetin after single oral dose of tartary buckwheat extracts in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(9), 4435-4441 (2011).
- 83.** Jeřábková M.: *Diplomová práce*. Chelatace mědi s flavonoly. Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové 2014.
- 84.** Hashem E. Y., Seleim M. M., El-Zohry A. M.: Spectrophotometric determination of copper(II) in pharmaceutical, biological and water samples by 4-(2'-benzothiazolylazo)-salicylic acid. *Journal of Applied Spectroscopy* 78(4), 586-593 (2011).

10 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Zuzana Lomozová

Školitel: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce tamarixetinu a isorhamnetinu s mědí

Klíčová slova: tamarixetin, isorhamnetin, chelatace, redukce, měď, bathocuproin, hematoxylin

Měď je biogenní stopový prvek, důležitý pro správnou funkci lidského organismu. Je nedílnou součástí několika enzymů a podílí se na metabolických procesech v těle. Nadbytek i nedostatek mědi v séru může vést ke vzniku patologických stavů. K léčbě toxického působení mědi se užívají látky schopné chelatovat měď.

Flavonoidy jsou polyfenolické látky patřící mezi sekundární metabolity rostlin. Jsou součástí lidské stravy a mají pozitivní vliv na naše zdraví. Vykazují antioxidační a protizánětlivé účinky. Jsou schopny chelatovat přechodné kovy, zejména železo a měď. Chelatační terapie se v současné době používá u Wilsonovy choroby, při které dochází k přetížení těla mědí. Do budoucna by se chelatační účinky flavonoidů mohly využít při léčbě neurodegenerativních, kardiovaskulárních nebo nádorových onemocnění.

V této diplomové práci byly otestovány interakce dvou flavonoidů (tamarixetinu a isorhamnetinu) s ionty mědi v odlišném pH, které charakterizuje fyziologické i patofyziologické podmínky v organismu. K měření měď-chelatačních a redukčních aktivit byly použity spektrofotometrické metody založené na hematoxylinu nebo disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny jako indikátoru.

Obě látky vykazaly velmi dobrou schopnost chelatace a redukce iontů mědi. Jejich aktivita se měnila v závislosti na pH prostředí.

Bylo potvrzeno, že strukturním předpokladem pro chelataci iontů mědi u flavonoidů je 4-keto-5-hydroxy skupina a také, že hydroxylová skupina u tamarixetinu umístěná na kruhu B v poloze 3' má pro chelatační aktivitu pravděpodobně větší význam, než když se nachází v pozici 4' jako u isorhamnetinu.

11 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Zuzana Lomozová

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of Thesis: Interactions of tamarixetin and isorhamnetin with copper

Keywords: tamarixetin, isorhamnetin, chelation, reduction, copper, bathocuproine, hematoxylin

Copper is a biogenic trace element important for proper function of human organism. It is an essential part of several enzymes and is involved in metabolic processes in the body. Excess or lack of serum copper can lead to pathological conditions. Copper chelating agents are used to treat copper toxic effects.

Flavonoids are polyphenolic substances belonging to secondary metabolites of various plants. They are part of the human diet and have a positive impact on our health. They exhibit antioxidant and anti-inflammatory effects and are able to chelate transient metals, especially iron and copper. Chelation therapy is currently used in Wilson's disease in which copper is overloaded. In the future, the chelating effects of flavonoids could be used to treat neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases or cancer.

In this diploma thesis, interactions of two flavonoids (namely tamarixetin and isorhamnetin) with copper ions in different buffers were tested. Spectrophotometric methods based on hematoxylin or bathocuproine as indicators, were used to measure copper-chelating and reducing activities.

Both substances showed very good ability to reduce and to chelate copper ions. Their activity varied depending on the pH.

It has been confirmed that the 4-keto-5-hydroxy group is a structural presumption for chelating of copper ions in flavonoids and also that the hydroxyl group of tamarixetin located in the ring B at the position 3' is probably more important for chelating activity than when it is located at the position 4' as in isorhamnetin.