

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické botaniky



INTERAKCE ALKALOIDŮ S PŘECHODNÝMI KOVY II.

Interactions of alkaloids with transition metals II.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Markéta Šilhová

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

Hradec Králové, 2019

Markéta Šilhová

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala Ing. Kateřině Macákové, Ph. D. za veškerou trpělivost, vstřícnost a cenné informace při vedení mé diplomové práce, za odborný dohled při experimentálních měřeních v laboratoři a také za tvorbu grafů.

Dále bych chtěla také poděkovat Katedře farmaceutické botaniky za poskytnutí laboratoře pro realizaci experimentální části této práce.

Tato práce vznikla za podpory projektu SVV 260 412.

OBSAH

Použité zkratky	7
1 Úvod	9
2 Cíl práce	10
3 Teoretická část	11
3.1 Význam mědi v lidském organismu	11
3.2 Fyziologie mědi v lidském těle	12
3.2.1 Enzymy obsahující měď	13
Ceruloplasmin	13
Superoxid dismutáza	14
Cytochrom c-oxidáza	16
Lysyl oxidáza	16
Dopamin β -hydroxyláza	17
Tyrozináza	17
Metalothionein	17
3.3 Metabolismus mědi	18
3.3.1 Absorpce	18
3.3.2 Distribuce	18
3.3.3 Eliminace	20
3.4 Patologické stavy způsobené mědí	21
3.4.1 Nadbytek mědi v těle	22
3.4.1.1 Alzheimerova a Parkinsonova choroba	22
3.4.1.2 Aceruloplasminémie	23
3.4.1.3 Diabetes mellitus	24
3.4.1.4 Idiopatická toxikóza mědi	24
3.4.1.5 Prionové onemocnění	25
3.4.1.6 Nádorová onemocnění	26
3.4.1.7 Wilsonova choroba	27
3.4.1.8 Kardiovaskulární onemocnění	29
3.4.2 Nedostatek mědi v těle	29
3.4.2.1 Kardiovaskulární onemocnění	29

3.4.2.2 Menkesova choroba	30
3.5 Chelatace mědi	30
3.6 Redukce mědi	31
3.7 Isochinolinové alkaloidy	32
3.7.1 Alkaloidy protoberberinového typu	33
3.7.1.1 Berberin-chlorid	33
3.7.1.2 Kanadin	35
3.7.1.3 Korydalin	35
3.7.1.4 Skulerin	36
3.7.1.5 Sinaktin	37
3.7.1.6 Stylopin	38
3.7.1.7 Tetrahydropalmin	38
3.7.2 Alkaloidy protopinového typu	39
3.7.2.1 Allokryptopin	39
3.7.2.2 Protopin	40
3.7.2.3 Korykavamin	41
3.7.2.4 Kryptopin	42
4 Experimentální část	44
4.1 Používané přístroje	44
4.2 Pracovní pomůcky	44
4.3 Používané chemikálie	44
4.4 Testované látky	45
4.5 Příprava používaných roztoků	45
4.6 Kalibrační křivka měďnatých iontů	47
4.7 Kontrola výchozích roztoků mědi	49
4.8 Postup stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem	49
4.9 Stanovení chelatace a redukce iontů mědi pomocí disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové	51
4.9.1 Chelatace měďnatých (Cu^{2+}) iontů v pufru	52
4.9.2 Chelatace měďných (Cu^+) iontů v pufru	53
4.9.3 Chelatace měďnatých (Cu^{2+}) iontů v DMSO	56
4.9.4 Chelatace měďných (Cu^+) iontů v DMSO	57
4.9.5 Redukce měďnatých (Cu^{2+}) iontů v pufru	59

4.9.6 Redukce měďnatých (Cu^{2+}) iontů v DMSO	60
5 Výsledky.....	62
5.1 Kalibrační křivka	62
5.2 Chelatační účinky alkaloidů	63
5.2.1 Stanovení chelatace mědi pomocí hematoxylinu	63
5.2.2 Stanovení chelatace mědi pomocí BCS	63
5.3 Měď-redukující účinky alkaloidů	65
5.3.1 Alkaloidy protoberberinového typu	65
5.3.2 Alkaloidy protopinového typu	68
6 Diskuze.....	70
6.1 Chelatační aktivita	70
6.2 Redukce měďnatých iontů	72
7 Závěr	77
8 Literatura	78
9 Abstrakt	88
9 Abstract	89

Použité zkratky

AD	Alzheimerova choroba (z angl. Alzheimer's disease)
AChE	Acetylcholinesteráza (z angl. AcetylCholinEsterase)
AGEs	konečné produkty pokročilé glykace (z angl. Advanced-Glycation End products)
APP	amyloidový prekurzorový protein (z angl. Amyloid Precursor Protein)
ATOX1	antioxidační chaperon mědi (z angl. Antioxidant 1 Copper Chaperone)
ATP7A	adenosintrifosfatáza přenášející Cu, kódována genem ATP7A
ATP7B	adenosintrifosfatáza přenášející Cu, kódována genem ATP7B
BCS	disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
CCS1	chaperon mědi pro superoxid dismutázu 1 (z angl. human Copper Chaperone for Superoxid dismutase 1)
ChAT	cholinacetyltransferáza (z angl. Cholin AcetylTransferase)
CNS	centrální nervový systém (z angl. Central Nervous System)
COX	cytochrom c-oxidáza (z angl. Cytochrome c Oxidase)
COX11	chaperon mědi pro cytochrom c-oxidázu COX11 (z angl. Cytochrome c Oxidase copper chaperone COX11)
COX17	chaperon mědi pro cytochrom c-oxidázu COX17 (z angl. Cytochrome c Oxidase copper chaperone COX17)
CP	ceruloplasmin
CTR1	specifický transportér 1 Cu ²⁺ (z angl. Copper Transporter 1)
CuZnSOD	superoxid dismutáza 1
CYP	cytochrom P450
DβH	dopamin β-hydroxyláza

DMSO	dimethylsulfoxid
ECSOD	extracelulární superoxid dismutáza (z angl. Extracellular Superoxid Dismutase)
HA	hydroxylamin hydrochlorid
HEM	hematoxylin
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina)
HuPrPC	lidský prionový protein (z angl. Human Prion Protein)
HuPrPSC	patogenní forma lidského prionového proteinu (z angl. Human Prion Protein Scrapie)
PD	Parkinsonova choroba (z angl. Parkinson's disease)
Sco1	chaperon syntetizující cytochrom c-oxidázu 1 (z angl. Synthesis of Cytochrome c Oxidase 1)
Sco2	chaperon syntetizující cytochrom c-oxidázu 2 (z angl. Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2)
SOD	superoxid dismutáza
SOD1	superoxid dismutáza 1
WD	Wilsonova choroba (z angl. Wilson's disease)

1 Úvod

Ačkoliv se měď v lidském organismu vyskytuje pouze ve stopovém množství, je pro naše tělo velice důležitá. Tento element patří mezi nejhojněji obsažené stopové prvky v lidském těle je součástí mnoha fyziologických dějů nezbytných pro život.^{1,2} S mědí se lidé setkávají již od starověku, ať už v podobě měděných předmětů, nádob či různých slitin mědi.¹ Málokdo si je však vědom důležitosti tohoto ušlechtilého kovu v lidském těle. Měď je tělu prospěšná pouze ve stanoveném množství. Do těla je přijímána nejčastěji potravou³, a proto je důležité dbát na pestré stravování, abychom si sami neškodili vysokým či nízkým příjmem mědi. Při jejím nadbytku či nedostatku může docházet k různým patologickým stavům, například k nádorovým či kardiovaskulárním onemocněním a dalším jiným závažným chorobám.¹ Některým nemocem se můžeme snažit předcházet, většina je však genetického původu. Mezi dědičné choroby řadíme například všeobecně známou Wilsonovu chorobu (WD)⁴. Je-li však měď přijímána pouze v doporučených denních dávkách a nevyskytla-li se chyba v genové výbavě člověka, stává se pro tělo velice prospěšnou. Tento stopový prvek je součástí mnoha důležitých kuproenzymů, kterými jsou například ceruloplasmin (CP), cytochrom c-oxidáza (COX), superoxid dismutáza (SOD) atd.^{5,6} Ať už kuproenzymy chrání buňky těla před oxidačním stresem, nebo se podílejí na jejím transportu a vylučování z těla či na tvorbě energie, jsou nezbytnou součástí lidského organismu a bez mědi by se tyto fyziologické pochody nemohly uskutečnit. V rámci této práce byla zkoumána chelatace a redukce mědi, které patří mezi důležité chemicko-fyzikální procesy. Stanovení chelatace a redukce přispívá k poznání dalších vlastností látek, které by mohly být v budoucnu prospěšné při léčbě některých chorob.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je změřit měď-chelatační a měď-redukující účinky vybraných protoberberinových (berberin-chlorid, kanadin, korydalin, skulerin, sinaktin, stylopin, tetrahydropalmatin) a protopinových (allokryptopin, protopin, korykavamin, kryptopin) alkaloidů při různých pH a určit vztahy mezi jejich strukturou a měď-chelatační a měď-redukční aktivitou.

3 Teoretická část

3.1 Význam mědi v lidském organismu

Pro správnou funkci lidského organismu je potřeba mnoho různých faktorů. Je to velmi složitý kompartment, jehož nedílnou součástí jsou chemické prvky, mezi které můžeme zařadit makroelementy i stopové prvky. Měď je řazena mezi ušlechtilé kovy, v periodické tabulce se nachází v 1. B skupině jako stříbro a zlato, které se vyznačují podobnými vlastnostmi. Se zinkem a niklem patří k nejvíce zastoupeným stopovým prvkům v těle.¹ Tento přechodný kov je potřebný pro normální vývoj, růst a funkci organismu.² Je důležitý pro vývoj kostry, podílí se na správné tvorbě pojivových proteinů, jimiž jsou elastin a kolagen.⁷ V mnoha studiích byly prokázány antibakteriální (např. proti *E. coli*, *Staphylococcus aureus*), antimykotické (např. proti *Candida albicans*)^{8,9} a antivirotické (např. proti polio viru, herpes simplex viru)¹⁰ účinky mědi. Extrémní citlivosti mikroorganismů na měď je využíváno v rámci neustále zvyšující se rezistence na běžně užívaná antibiotika.¹¹

Vystavení člověka mědi je považováno za relativně bezpečné.² Slitiny na bázi mědi jsou využívány ve stomatologii. Amalgámy s vyšším obsahem mědi jsou méně náchylné ke korozi. V lidovém léčitelství jsou využívány měděné náramky, které slouží k léčbě bolesti svalů a kloubů.¹ U žen je rozšířeno zavádění nitroděložních tělísek s mědí k zabránění neplánovaného početí.¹²

Koncentrace tohoto stopového prvku bývají nižší v tělních tekutinách než v buňkách, výjimkou je žluč a mozkomíšní mok.² Lidský organismus obsahuje cca 70-80 mg mědi¹³. U mužů se koncentrace mikroelementu v krvi pohybuje v rozmezí 0,614-0,970 mg/l, u žen 0,694-1,030 mg/l.¹⁴

V orgánovém zastoupení se největší koncentrace nacházejí v ledvinách, mozku, srdci, kosterním svalstvu a játrech, která jsou hlavním orgánem

podílejícím se na metabolismu mědi.² Měď do organismu nejčastěji přijímáme prostřednictvím pitné vody a potravou.³ Nejbohatšími zdroji tohoto esenciálního prvku jsou především vnitřnosti, ryby, korýši, měkkýši, ořechy a luštěniny.² K udržení rovnováhy u dospělého člověka je potřeba přibližně 1,6 mg Cu/den. Děti od narození do 6 měsíců věku by měli přijímat cca 0,4 mg denně.¹⁵ Pro muže i ženy je odhadovaný bezpečný příjem mědi stanoven na 1,5-3 mg/den.⁵ Biologický poločas rozpadu mědi ze stravy je 13-33 dní. Za toxickou koncentraci v těle se považuje požití 1 g Cu. Letální dávka je stanovena na 10-20 g mědi.¹

3.2 Fyziologie mědi v lidském těle

Funkce jednotlivých orgánových soustav v těle jsou vzájemně propojeny. Jedná se o velmi složitý systém, ve kterém měď hraje důležitou roli. Podílí se například na správné funkci centrálního nervového systému, syntéze hemoglobinu, vývoji pojivové tkáně a oxidativní fosforylaci.³

Měď je součástí mnoha sloučenin. V živých organismech se vyskytuje ve dvou oxidačních stavech: Cu^+ a Cu^{2+} . V biologických systémech je přítomna převážně forma Cu^{2+} , jelikož v přítomnosti kyslíku či jiných elektronových akceptorů se Cu^+ snadno oxidují na měďnaté ionty.¹⁶ Schopnost mědi reverzibilně přijímat a odevzdávat elektrony hraje hlavní roli při odstraňování radikálů z organismu, čímž je chráněno lidské tělo. Měď je hlavní složkou katalytických center různých redoxních enzymů, a proto je nezbytná pro normální fyziologické funkce jako je buněčné dýchání, syntéza melaninu a buněčný metabolismus železa.¹⁷

3.2.1 Enzymy obsahující měď

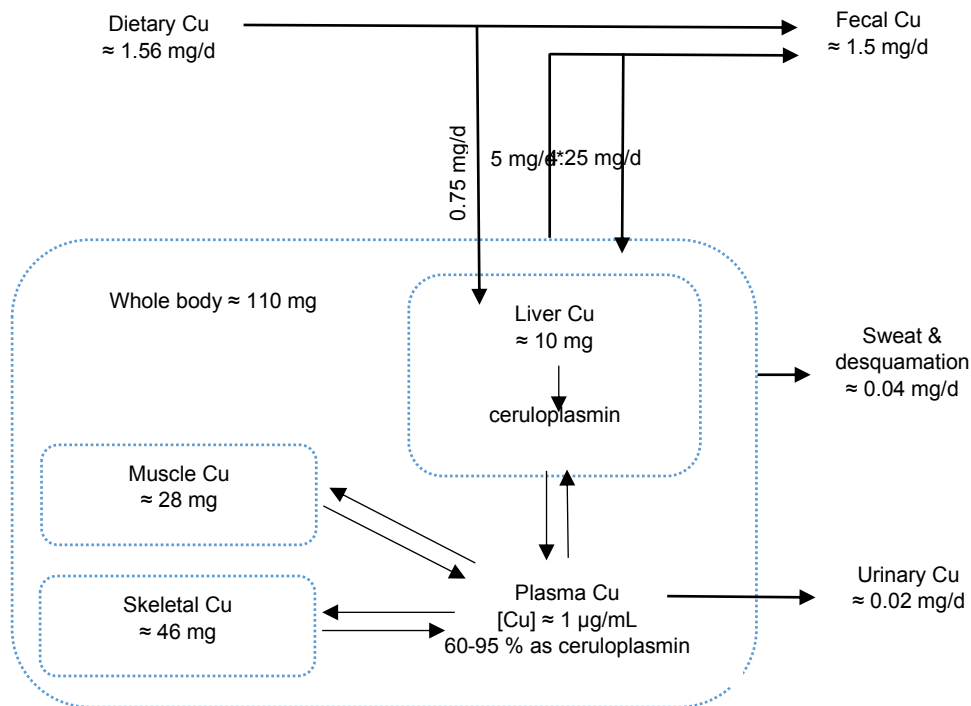
V lidském organismu se vyskytuje mnoho míst, kde se nachází tento stopový prvek. In vivo je téměř vždy vázán na specifické enzymy a proteiny transportující elektrony nebo jiné malé molekuly, kde působí jako kofaktor.^{18,18} Kuproenzymy jsou nezbytné pro fyziologické procesy u člověka (Tab. č. 1). Nejdůležitějšími intracelulárními proteiny jsou dopamin β -hydroxyláza (D β H), tyrozináza a tři další proteiny všudypřítomné v přírodě, kterými jsou COX, SOD a metalothionein, mezi extracelulární proteiny patří CP, což je důležitý reaktant akutní fáze a transportní protein v plazmě a lysyl oxidáza.⁶

Ceruloplasmin

Za normálních stravovacích podmínek vstupuje největší část mědi z potravy do jater, kde je vázána na CP, který je zde syntetizován hepatocyty.¹⁹ Do plasmy je vylučován v podobě holoceruloplasminu, který obsahuje 6-7 atomů Cu na molekulu.²⁰ Měď se zde vyskytuje v oxidované podobě, a proto nedochází k tvorbě hydroxylových radikálů.⁷

Tento α -2-globulin o hmotnosti 132 kD je hlavním proteinem vázajícím měď, je zodpovědný za její transport do buněk a vylučování z těla (Obr. č. 1).²¹ Je schopen navázat cca 95% mědi v séru, zbytek mědi tvoří komplexy s jinými proteiny.¹ Většina Cu v krvi je ve formě CP, který zde uplatňuje svou feroxidázovou aktivitu, oxiduje Fe²⁺ na Fe³⁺ před vazbou na transferin, čímž usnadňuje odtok železa z tkání.^{21,22}

Jelikož patří mezi pozitivní reaktanty akutní fáze, bývají jeho plazmatické koncentrace během zánětu, infekce a dalších patologických stavů u člověka zvýšené.²³



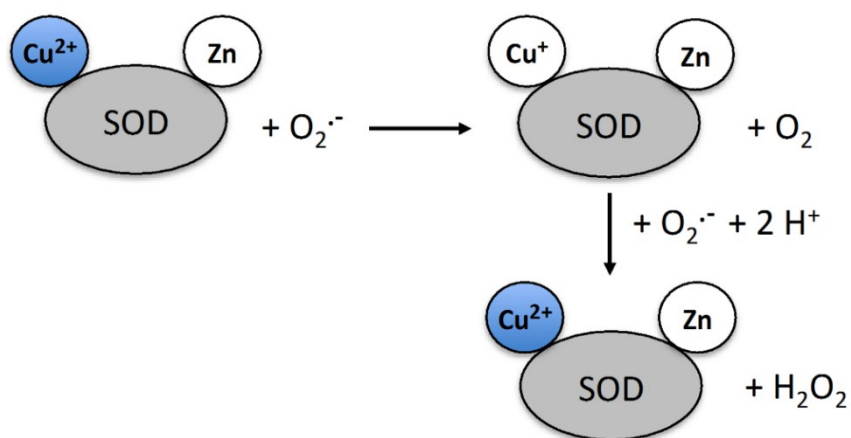
Obrázek. č. 1: Transport mědi v těle pomocí ceruloplasminu²⁴

Superoxid dismutáza

Enzymem zodpovědným za odstraňování aniontů superoxidu, patřícího mezi vysoce toxické reaktivní formy kyslíku a jeho následnou přeměnu na peroxid vodíku je SOD. Chrání tak buňky před oxidačním stresem a také má klíčovou roli v buněčné signalizaci prostřednictvím lokální produkce H_2O_2 . U lidí jsou významné především SOD obsahující měď a zinek.²⁵ První takovou izoformou SOD je extracelulární superoxid dismutáza (ECSOD) o hmotnosti 135kDa, která je tetramerním proteinem.^{6,26} ECSOD byla poprvé objevena Marklundem v roce 1982.²⁵ Další humánní izoformou SOD je CuZnSOD, typicky známá jako superoxid dismutáza 1 (SOD1). Je to vysoce stabilní enzym s molekulovou hmotností 32 kDa, který je složen ze dvou podjednotek. Každá podjednotka má aktivní místo obsahující iont mědi a zinku. Iont mědi je v aktivním místě vázán na čtyři imidazolinové histidinové zbytky. Zinek stabilizuje strukturu proteinu. Nejvyšší hladiny

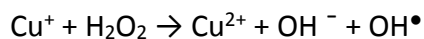
SOD1 nalezneme v mozku, játrech a ledvinové kůře.²⁶ SOD1 byla objevena roku 1969 McCordem a Fridovichem jako metaloprotein s pevně vázaným iontem mědi přítomný v bovinních erythrocytech. Nedlouho poté byl v tomto kuproproteinu detekován také zinek.²⁵ U lidí jsou mutační verze SOD1 spojeny s dědičnou formou amyotrofické laterální sklerózy.⁶

Významnou schopností tohoto kuproenzymu je disproportionace superoxidu na molekulární kyslík a peroxid vodíku. Jedná se o dvoustupňovou oxidačně-redukční reakci, která zahrnuje cyklování atomu mědi v SOD1 z Cu^{2+} na Cu^+ a poté zpět na Cu^{2+} (Obr. č. 2). Zinek se této reakce neúčastní, ale je nezbytný pro strukturu aktivního místa.²⁷



Obrázek. č. 2: Dismutace superoxidu²⁷

Vzniklý H_2O_2 se v přítomnosti Fe^{2+} či Cu^+ redukuje a dochází ke vzniku vysoce aktivního toxického hydroxylového radikálu. Tento jev je nazýván Fentonovou reakcí.²⁶



Reakce č. 1: Fentonova reakce²⁶

U nedonošených dětí je SOD produkována ve velmi malém množství, a proto je u těchto novorozenců citlivost na kyslík vysoká.⁷

Cytochrom c-oxidáza

Tento enzym se nachází uprostřed mitochondriální membrány, je terminálním enzymem elektronového transportního řetězce a redukuje O_2 na vodu. Přenos elektronů z cytochromu c na kyslík je zprostředkován čtyřmi redoxními centry, dvěma hemy a a a_3 a centry obsahující měď Cu_A a Cu_B , která jsou součástí složité struktury enzymu.⁶ Hem a a centrum obasující Cu_A přenáší elektrony a váží cytochrom c, hem a_3 a centrum obsahující Cu_B mají za úkol navázat mezi sebe O_2 a zajistit přenesení čtyř elektronů na tuto molekulu. Vzniká tak nestálý anion kyslíku a ihned dochází k vytvoření vody.⁷ Kromě toho dochází k čerpání protonů z vnitřní strany membrány na vnější stranu. Oxidací cytochromu c dochází k vytváření energie, která je využita k produkci protonového gradientu přes membránu.²¹

Lysyl oxidáza

I tento metaloprotein vyžaduje pro svou aktivitu měď. Je nedílnou součástí extracelulární matrix orgánů a tkání v těle. Hraje klíčovou roli při tvorbě, zrání a stabilizaci pojivové tkáně. Zesítnění elastinových a kolagenových vláken katalyzuje kofaktor lysyl tyrosyl chinon, který je součástí aktivního místa enzymu.²¹

Dopamin β -hydroxyláza

Při tvorbě katecholaminů, které jsou zapojeny do nervového přenosu, slouží jako klíčový enzym D β H. Enzym je spojen s noradrenergními neurony, které jsou koncentrovány v locus coeruleus, mozkovém kmeni a zadním hypothalamu.⁶ Katalyzuje přeměnu dopaminu na noradrenalin za pomoci kyseliny askorbové, která zde slouží jako koenzym přenosu kyslíku.²⁸

Tyrosináza

Jedná se o transmembránový kuproenzym, který je katalyzátorem oxidační přeměny tyrosinu, která vede až k syntéze melaninového pigmentu. Slouží také jako obranný mechanismus před ultrafialovým zářením.⁶

Metalothionein

Protein obsahující mnoho aminokyselin-cystein, pomocí kterých dochází k vazbě dvojmocných přechodných kovů Zn²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺. Funguje jako úložiště přebytků těchto stopových prvků a vyznačuje se také detoxikačními účinky.⁶

Tabulka. č. 1: Vybrané enzymy obsahující měď²⁶

Kuproenzymy	Molekulová hmotnost (kDa)	Katalyzovaná reakce	Tkáňová distribuce
SOD1	32	Superoxid \rightarrow H ₂ O ₂	Nejvíce v mozku, játrech, ledvinové kůře
ECSOD	135	Superoxid \rightarrow H ₂ O ₂	Extracelulární matrix a tekutiny
Cytochrom c-oxidáza	90	O ₂ + ADP \rightarrow H ₂ O + ATP	Mitochondrie
Lysyl oxidáza	32	Lysin \rightarrow aminoadipický semialdehyd	Pojivová tkáň
Dopamin β -hydroxyláza	290	Dopamin \rightarrow noradrenalin	Sympatikus, nadledvinky
Ceruloplasmin	135	Fe ²⁺ \rightarrow Fe ³⁺	Sérum

3.3 Metabolismus mědi

3.3.1 Absorpce

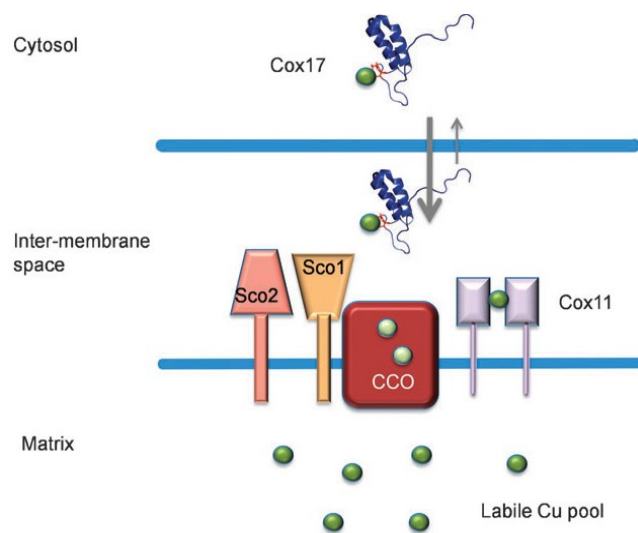
Měď, kterou přijímáme ze stravy je absorbována především slizničními buňkami, které lemují stěnu tenkého střeva, z menší části pak ze žaludku.²¹ Absorpce závisí na mnoha faktorech, mezi které patří chemická forma mědi, strava či interakce s jinými kovy. Zvýšené koncentrace zinku v těle zvyšují tvorbu střevního metalothioneinu, který blokuje absorpci mědi tím, že s ní vytváří komplexy.¹ Naopak zvýšená hladina proteinu v těle (příjem nad 100 g/den) zvyšuje biodostupnost mědi.²⁹

Měď absorbovaná ze střeva je následně transportována krví, kde se váže na různé bílkoviny.³⁰ Absorpce mědi v tenkém střevě probíhá buď difúzí, anebo použitím transportních proteinů např. transportéru 1 divalentního kovu (DMT1) nebo specifického transportéru 1 pro měď (CTR1). CTR1 vyžaduje jako substrát Cu^+ . Většina mědi se vyskytuje ve formě Cu^{2+} , což vyžaduje přítomnost reduktázy na její přeměnu.³¹ U lidí s normálním příjmem se 55-75 % mědi vstřebává a aktivně recykluje mezi zažívacím traktem, tělními tekutinami a tkáněmi (zejména játry).^{2,6}

3.3.2 Distribuce

Po absorpci mědi buňkami žaludku a tenkého střeva dochází k vazbě mědi na krevní přenašeče. Při vstupu do intersticiální tekutiny a krevní plasmy je měď vázána na proteiny albumin a transkuprein. Dalším významným proteinem vázajícím měď je kuproenzym CP. Od albuminu a transkupreinu se liší tím, že k zabudování mědi do jeho struktury dochází již během syntézy v játrech, nikoli až v krevní plasmě. CP je schopen navázat největší množství mědi. Albumin, přestože je považován za hlavní transportní protein mědi v plasmě, je ve skutečnosti schopen vázat pouze cca 180 $\mu\text{g Cu/L}$. Nejméně mědi je pak vázáno transkupreinem (cca 12 %).⁶ Poté, co je měď krví transportována jedním z přenašečů a následně pomocí CTR1 přenesena do buněčného prostředí (hepatocyty), je dále

distribučována pomocí chaperonů.³² Mezi chaperony řadíme chaperon pro SOD1 (CCS1), chaperon mědi pro cytochrom c-oxidázu COX17 (COX17) a antioxidační chaperon (ATOX1).³³ Mezi funkce CCS1 patří začleňování mědi do SOD1 a dodávání mědi mitochondriím pro aktivaci cytochrom c-oxidázy.³⁰ CCS1 je rozpustný chaperon složený ze tří odlišných domén s převládající lokalizací v cytosolu. COX17 je protein složený z 62 aminokyselinových zbytků. Hraje důležitou roli při přenosu mědi na cytochrom c-oxidázu (Obr. č. 3). Nedávné studie odhalily fascinující schopnost COX17 přenášet měď na další chaperony, které jsou důležité pro vznik cytochrom c-oxidázy, mezi které patří například chaperon mědi pro cytochrom c-oxidázu COX11 (COX11), chaperon syntetizující cytochrom c-oxidázu 1 (Sco1) a chaperon syntetizující cytochrom c-oxidázu 2 (Sco2).³⁴



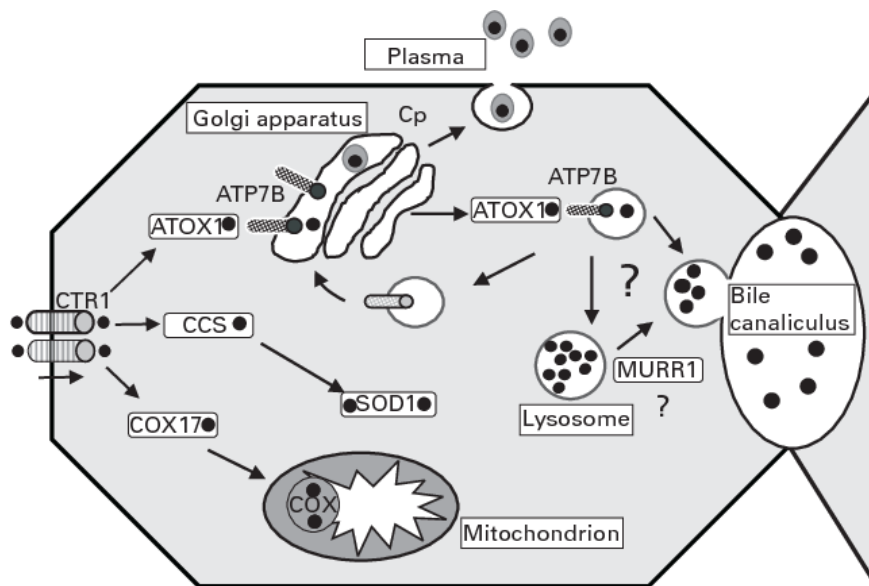
Obrázek č. 3: Přenos mědi chaperonem COX17³⁴

Chaperon COX17 přenáší měď (zelená kulička) do mezimembránového prostoru mitochondrie. Z COX17 je měď přenesena na COX11, která hraje důležitou roli při vzniku cytochrom c-oxidázy. Důležitá je také aktivita Sco1 a Sco2. Sco2 působí jako oxidoreduktáza pro Sco1. Kromě mědi vázané na proteiny nalezneme v matrixu i volně se vyskytující měď.³⁴

Třetím chaperonem je ATOX1, což je malý cytosolický protein, který existuje v roztoku jako monomer, v přítomnosti kovů může tvořit dimery. Jeho funkcí je předávat měď na N-konec Cu-transportujících adenosintrifosfátáz kódovaných geny ATP7A a ATP7B (ATP7A, ATP7B) pro jejich transport v sekreční dráze. Tyto ATPázy přenášejí měď přes membránu pomocí energie získané hydrolýzou adenosintrifosfátu (ATP).³⁴ Kromě transportní funkce chrání ATOX1 neuronální buňky před oxidačním stresem.³⁰

3.3.3 Eliminace

V lidském organismu je hlavní cestou vylučování mědi biliární exkrece, která se podílí na udržování homeostázy mědi.¹ Touto cestou je vylučováno cca 80 % mědi opouštějící játra.³⁵ Urinární exkrecí je eliminováno pouze minimální množství absorbované mědi.¹ Ústřední roli při vylučování žlučovými cestami hraje protein ATP7B, který je exprimován především v játrech a patří mezi ATPázy typu P. Je nutný pro Cu transport z cytosolu do *trans* Golgiho sítě, kde je za normálních fyziologických podmínek lokalizován. V případě zvýšených koncentracích Cu v těle je tento stopový prvek pomocí ATP7B převeden z *trans* Golgiho sítě do vezikulárních struktur, kde dochází k biliární exkreci. Za hlavní zdroj biliární mědi jsou považovány lysozomy. Působí v hepatocytu jako úložiště přebytku mědi, následně svůj obsah uvolňují přímo do žluči (Obr. č. 4). Dalším významným proteinem v eliminaci Cu z těla je ATOX1, který měď předává ATP7B. Asociace mezi těmito dvěma proteiny je nezbytná pro efektivní transport Cu.³³



Obrázek č. 4: Znárodnění metabolismu mědi v hepatocytu³³

Měď (černé kuličky) vstupuje do buňky přes CTR1, dále je transportována třemi různými cestami vazbou na chaperony ATOX1, CCS a COX17. ATP7B je nezbytný pro dodávání mědi do CP, který je vylučován do plazmy. Dojde-li ke zvýšení koncentrace mědi, ATP7B ji převede do vezikulárních struktur, čímž dojde k biliární exkreci. MURR1, též COMMD1 je protein metabolismu mědi obsahující MURR1 doménu. Jedná se o bílkovinu dosud neznámé funkce, výzkum naznačuje její významnou úlohu v biliární exkreci.³³

3.4 Patologické stavy způsobené mědí

Přestože je měď pouze stopovým prvkem, pro naše tělo je velice potřebná. Patří mezi základní nutriční elementy, je přítomna ve všech lidských buňkách a tkáních a potřebujeme ji především pro správnou funkci buněčného metabolismu.²⁶ Projevy nedostatku mědi zahrnují například srdeční dysfunkce, zvýšenou hladinu lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) a sníženou hladinu lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL), snížení SOD1 a sníženou clearance glukózy. Nadměrné hladiny mědi inhibují

sulfyhydrylové skupiny na enzimech glukóza-6-fosfatáza a glutathionreduktáza, které chrání buňky před poškozením volnými radikály. Inhibice glukóza-6-fosfatázy vede k hemolýze. Akutní otrava mědi způsobuje erozi epiteliální výstelky gastrointestinálního traktu spolu s centrilobulární nekrózou jater a akutní tubulární nekrózu v ledvinách. Může také docházet ke změně odstínu vlasů, ztrátě pokožky, nazelenalé barvě kůže či respiračním obtížím. Při akutní toxicitě napomáhá již zmiňovaný kuproenzym metalothionein. Ve spojení s akutní toxicitou mědi se můžeme setkat také s výskytem systémových účinků, kterými mohou být letargie, kóma, rhabdomyolýza, může dojít také k výskytu hemolytické anémie, renálnímu selhání, arytmiím a také k těžkým poruchám nervové soustavy.¹

3.4.1 Nadbytek mědi v těle

3.4.1.1 Alzheimerova a Parkinsonova choroba

Mnoho studií prokázalo, že příčinou nevyvážené homeostázy mědi mohou být Alzheimerova choroba (AD) a Parkinsonova choroba (PD), které se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění. Přestože jsou to nemoci zcela odlišné, vykazují určité podobnosti. U obou onemocnění hraje důležitou roli CP. U pacientů s AD i PD jsou za hlavní depo mědi (nenavázané na CP) považovány astrocyty. Astrocyty při nadměrné neurotoxicitě zprostředkované mědí nejsou schopny chránit neurony a oxidační stres tak vede k neurodegeneraci a vzniku kognitivních a neuromuskulárních poruch.³⁶ Oxidační stres poškozuje buňky pomocí toxických reaktivních forem kyslíku vznikajících Fentonovou reakcí³⁷ (Rce č. 1). Neuropatologickým znakem pacientů s PD jsou Lewyho tělíska vyskytující se v mozkovém kmeni. Na jejich vzniku se podílí protein α -synuklein.³⁶ Tato tělíska souvisejí se vznikem demence, avšak u PD se takové stádium vůbec nemusí vyskytnout. U samotné demence s Lewyho tělísky (DLB) se této duševní nemoci nevyhneme.³⁸ U lidí s onemocněním PD dále dochází

v důsledku mutace genu pro CP k úbytku feroxidázové aktivity CP, čímž dochází k hromadění železa v substantia nigra a následně vzniku extrapyramidových příznaků.³⁹

AD řadíme mezi choroby s pozdním nástupem. Měď je spouštěčem „amyloidní kaskády“. V případě AD dochází ke štěpení amyloidového prekurzorového proteinu (APP) β -sekretázou a dále γ -sekretázou, výsledkem je β -amyloid, jehož nahromaděním vznikají senilní plaky, ve kterých byly také pozorovány vysoké koncentrace mědi.⁴⁰ Hladiny mědi v plazmě a séru se ve stáří zvyšují.⁴ Existuje mnoho důkazů, že v patogenezi AD mají významnou úlohu cévní onemocnění. Cerebrovaskulární amyloidní angiopatie se ukázala jako jeden z klíčových patogenických procesů nejen při AD, ale i při vzniku vaskulární demence. Existují také důkazy o značné akumulaci konečných produktů pokročilé glykace (AGEs) v mozkové vaskulatuře při AD. Pacienti trpící touto chorobou mají zvýšené plazmatické hladiny celkové mědi, mědi, která není vázána na CP a mědi vázané červenými krvinkami. Některé klinické studie prokazují, že by určité látky vázající měď např. sloučeniny odvozené od 8-hydroxychinolinu mohly být účinné při léčbě AD, avšak zůstává nejasné, zda terapeutická účinnost těchto léků spočívá v jejich chelatačních vlastnostech.⁴¹

3.4.1.2 Aceruloplasminémie

Tato vzácná autosomálně recesivní genetická porucha je způsobena mutacemi v CP alele na chromozomu 3q, výsledkem je úplná absence CP v krvi.⁴ Měď vázaná na CP je nezbytná pro odvod železa z retikuloendoteliálního systému, jelikož se podílí na přeměně z Fe^{2+} na Fe^{3+} v plazmě, což je nezbytná forma pro vazbu transferinu a transportu železa. Absence CP nepůsobí změny v metabolismu mědi, mění pouze metabolismus železa, což u těchto pacientů naznačuje využití alternativních proteinů vázajících měď. Dochází k hromadění železa v játrech, slinivce, sítnici a centrálním nervovém systému (CNS). Uložení

železa v CNS je jedinečným znakem aceruloplasminémie. Symptomaticky se u pacientů objevují neurologické symptomy, diabetes mellitus a degenerace sítnice. Mezi neurologické příznaky zahrnujeme nejčastěji cerebrální ataxii, kognitivní poruchy a kraniofaciální dyskinezi. Zrakové symptomy nejsou navzdory degeneraci sítnice běžně hlášeny. Toto onemocnění je také prokazatelné vysokou hodnotou feritinu, nízkou hladinou mědi a železa v séru a nízkou saturací transferinu. Můžeme zde pozorovat mírnou anémii.⁴²

3.4.1.3 Diabetes mellitus

Součástí triády onemocnění u jedinců trpících aceruloplasminémií je diabetes mellitus. V současné době se předpokládá, že je tato choroba nepříznivým důsledkem kumulace Fe v pankreatu. Dochází k narušení metabolismu mědi a její kumulaci v organismu. Přítomnost iontů mědi v krvi může zvyšovat přítomnost AGEs, které jsou spojeny se vznikem sekundárních komplikací u diabetu, mezi které řadíme retinopatii, hypertenzi a mikrovaskulární onemocnění.⁴ Diabetes je způsoben přetížením organismu mědí a následně vyvolaným oxidačním stresem, který vede k poškození orgánů (sekundární komplikace). Léčba vysoce selektivním chelátorem mědi je nová experimentální terapie pro léčbu diabetu, která ještě musí projít dalšími klinickými studiemi. Diabetes je úzce spojen s AD a vaskulární demencí, s kterými sdílí patologické mechanismy jako jsou poruchy regulace mědi, zvýšený oxidační stres a vaskulopatie s akumulací AGEs ve stěnách cév. Dalšími příčinami vzniku vaskulopatií jsou změny v homeostáze lipoproteinů a lipidů, nikoliv hyperglykémie.⁴¹

3.4.1.4 Idiopatická toxikóza mědi

Tento syndrom se vyskytoval v mnoha částech světa, především u kojenců a malých dětí ve věku od 6 měsíců do 5 let.¹ Je obvykle spojován s vysokou hladinou jaterní mědi, která je způsobená vysokými koncentracemi mědi v pitné vodě a potravinách.⁴ V letech 1900-1980 zemřelo v Německu, Itálii

a na západě Rakouska asi 138 dětí kvůli této nemoci. Podobně tomu bylo v Indii, kde do sedmdesátých let bylo toto onemocnění společnou příčinou úmrtí většiny dětí a kojenců. Nyní se toto onemocnění vyskytuje vzácně. Sníženým používáním měděných a mosazných nádob k uchování potravin a mléka se snížil také výskyt této nemoci. Nemoc vzniká zvýšenou hladinou mědi, bez snížení hladiny CP. Idiopatická toxikóza mědi nebo-li indická dětská cirhóza je charakterizována akumulací Malloryho tělísek v hepatocytech a nedostatečnou regenerací uzlin bez chronického žlučového onemocnění. Jedná se o mikronodulární cirhózu.¹

3.4.1.5 Prionové onemocnění

Ionty mědi jsou zapojeny do patologických jevů různých chorob, mezi které patří i prionové onemocnění. Toto vzácné onemocnění vykazuje symptomy kognitivní i motorické dysfunkce, vakuolizaci šedé hmoty v CNS, ztrátu neuronů a astrogliózu. Změny v homeostáze vyvolané onemocněním mohou přispět k progresi patologie buďto změnou konformace proteinů nebo jejich zvýšenou agregací. Pro rozvoj onemocnění je zásadní chybné skládání extracelulárního membránově kotveného lidského prionového proteinu (HuPrPC) do patogenní formy lidského prionového proteinu (HuPrPSC), což vede k tvorbě fibrilární struktury.⁴³ HuPrPC může vázat až čtyři ionty Cu^{2+} . Je-li koncentrace Cu^{2+} zvýšená, u HuPrPC dojde ke konformační změně na β -skládaný list (HuPrPSC), který vykazuje rezistenci vůči proteázám, což jsou enzymy štěpící proteiny.⁴⁴ Následkem toho dochází k hromadění v buňkách a následnému poškození CNS. HuPrPC je exprimován v celém těle. Přestože jeho fyziologická role není stále jasná, může se zapojit do vývoje neuronů, buněčné adheze, apoptotických příhod i buněčné signalizace v CNS.⁴³ Uvádí se, že jeho aktivita je závislá na mědi.⁴⁵ Ionty mědi se váží na N-konec HuPrPC *in vivo*.⁴³ První funkcí mědi vázané na N-konec je stimulace endocytózy HuPrPC, druhá je spojená s buněčnou signalizací. Vyšší dostupnost mědi v těle může

vyvolat určitý druh oxidačních stresových podmínek, které zvyšují hladinu HuPrPC, čímž může dojít ke zvýšení infekčnosti HuPrPC.⁴ Mezi prionová onemocnění u člověka řadíme Creutzfeldt-Jakobovu chorobu, která se dělí na 4 formy: sporadickou, genetickou, získanou a variantní, dále do těchto onemocnění řadíme fatální familiární insomnií, kuru a Gerstmannův Sträusslerův-Scheinkerův syndrom.⁴⁶

3.4.1.6 Nádorová onemocnění

Důkazy získané v průběhu let ukázaly, že rakovinné buňky pro jejich růst a metabolismus obecně vyžadují více mědi oproti normálním zdravým buňkám. Vysoké hladiny mědi v séru a tkáních byly nalezeny u pacientů s různými typy nádorů, jako jsou např. Hodgkinův lymfom, leukémie, sarkom, nádor na mozku, plicích, prsu, dále pak rakovina děložního čípku a rakovina jater. Bylo také prokázáno, že koncentrace mědi v séru byla při remisi onemocnění nebo odstranění nádoru snížena zpět na fyziologické hodnoty. Angiogeneze je proces, který je nezbytný pro růst nádoru, invaze a metastázy. *In vitro* studie dokazují, že měď stimuluje proliferaci a migraci endotelových buněk⁴, a působí jako kofaktor angiogenních faktorů, kterými jsou např. tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF), interleukin (IL). Vazbou mědi na CP dojde k získání angiogenní aktivity a následné stimulaci endotelových buněk.⁴⁷ Na druhou stranu může být měď využita i při léčbě rakoviny. Hepatocelulární karcinom je celosvětově pátým nejčastějším typem nádoru. Tímto onemocněním trpí asi 75-80 % pacientů s hepatitidou B a C a dalšími rizikovými faktory jako jsou diabetes, požívání alkoholu, kouření atd. Bylo prokázáno, že měď u této nemoci může sloužit jako radiofarmakum. ⁶⁴CuCl₂ a ⁶⁷CuCl₂ lze využít pro radionuklidovou terapii hepatocelulárního karcinomu a ablaci extrahepatických metastáz.⁴⁸

3.4.1.7 Wilsonova choroba

Mutace v genech zapojených do homeostázy mědi způsobují poruchy metabolismu mědi u lidí. Nejznámější lidskou toxikózou je WD, která je způsobena mutací genu ATP7B.⁴⁹ Jedná se o autosomálně recesivní poruchu, která se projevuje jako hepatolentikulární degenerace s akumulací mědi v játrech a dalších orgánech.⁵⁰ Dalším charakteristickým rysem WD jsou abnormálně nízké hladiny CP.⁵¹ ATP7B je důležitý především pro biliární exkreci (Obr. č. 4), nachází se především v membránách buněk.⁵² Obsahuje 6 vazebných míst pro atomy mědi.⁵¹ Existuje mnoho mutací tohoto genu. V důsledku vysoké variability genu mohou být podoby klinického obrazu WD odlišné. Např. mutace, u kterých dojde k roztržení genu je provázena výskytem tohoto onemocnění u mladších pacientů. ATP7B je velmi podobný genu ATP7A, což je gen pro Menkesovu chorobu. Identita obou genů je cca 62 %, což předpokládá společný molekulární základ těchto onemocnění.⁵²

Tato choroba postihuje častěji muže než ženy, vyskytuje se především mezi 4. a 50. rokem života, nejvíce u mladistvých. Jak už jsem zmiňovala, klinický obraz WD u jednotlivých pacientů je velmi pestrý a odlišný. Liší se především v postižení orgánů a ve formách manifestace. WD se začíná vyvíjet asymptomatickou formou, při které dochází k hromadění mědi v orgánech bez jakýkoliv příznaků. Jedná se o období před manifestací WD. Období, kdy dochází k manifestaci choroby označujeme jako formu symptomatickou, která může být hepatální, neurologická a psychiatrická. Vzácnějšími formami manifestace mohou být hemolytické ataky, renální poškození, kostní, kloubní, oční a endokrinní změny, postižení srdce, cholelitiáza.⁵² U pacientů s jaterní formou WD může docházet k manifestaci akutní hepatitidy, fulminantního selhání jater nebo progresivního chronického onemocnění jater ve formě aktivní hepatitidy nebo cirhózy jater. Stupeň postižení jater je variabilní. Přidruženými

symptomy mohou být žloutenka, ascites, dále hemateméza či meléna, které jsou způsobeny portální hypertenzí.⁵³ Neurologická forma se vyznačuje ztuhlým obličejem, potížemi s řečí a polykáním, slintáním, dystonií končetin, mohou se vyskytovat i parkinsonské projevy, kterými jsou třes, nestabilita chůze a extrapyramidové příznaky. U neurologické a psychiatrické formy je typickým příznakem také Kayserův-Fleischerův prstenec, který lékaři mohou pozorovat na přechodu rohovky v bělimu. Vzhledem k pestrému klinickému obrazu dochází většinou k diagnostice onemocnění až v momentě, kdy už jsou orgány irreverzibilně změněny. Ke správné diagnóze WD nám pomáhají biochemická vyšetření, která prokazují sníženou hladinu CP v séru, zvýšený obsah mědi v moči a v játrech.⁵²

První látkou, kterou byla WD léčena byl již v roce 1948 2,3 dimerkaptopropranolol, který zvyšoval vylučování mědi močí, u pacientů však nebyly pozorovány žádné klinické změny, a tak se již dnes k terapii nepoužívá. V současné době je k léčbě WD využíván penicilamin, který zvyšuje exkreci mědi močí a jehož účinek je vysvětlován reaktivací enzymů a tvorbou chelátu s mědí.⁵² Obvyklá dávka je 1 g denně, měl by být podáván s odstupem od příjmu potravy.⁵⁴ Penicilamin kontroluje toxicitu mědi zvýšením hodnot metalothioneinu (především v játrech) na který je měď vázána. Jak je všeobecně známo, vázaná měď je netoxická, volné ionty mědi jsou naopak toxické. Další látkou, která zvyšuje vylučování mědi močí je trietylentetramin, který se oproti penicilaminu vyznačuje nižším výskytem vedlejších reakcí.⁵² K terapii WD můžeme dále využít zinek, který indukuje střevní buňky k syntéze metalothioneinu a inhibuje veškerou absorpci mědi. Dávka 150 mg/d je rozdělena do tří denních dávek, podává se alespoň v hodinovém odstupu od potravin.⁵⁴ Resorpci mědi zabraňuje i amonium tetrathiomolybdenát, který může být také použit v léčbě WD. Terapii WD můžeme podpořit snížením obsahu mědi v přijímané stravě

vhodnou dietou. Mezi zcela nevhodné potraviny při tomto onemocnění můžeme zařadit např. játra, ovesné vločky, čokoládu, kuře, luštěniny. Potravinami, které by měl pacient požívat pouze v malém množství jsou např. hovězí, skopové, telecí a králíčí maso, makrela, pórek, hlávkový salát, špenát, banány, angrešt, běžné pečivo. Malé množství mědi obsahuje vepřové maso. Za dietní stravu s nejnižším obsahem mědi jsou považovány sardinky, losos, mléko, eidam, vejce, cukr, med, dýně, vařená rýže, broskve atd.⁵²

3.4.1.8 Kardiovaskulární onemocnění

CP je důležitým kuproenzymem, který se může podílet na vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Zvýšené hladiny CP a mědi byly nalezeny u pacientů s diabetem mellitem obou typů a pacientů s metabolickým syndromem, což jsou rizikové faktory pro vznik kardiovaskulárních chorob. Dalším velice rizikovým faktorem je ateroskleróza. Jedná se o chronický zánět, při kterém bývají zvýšené hladiny CP, který je reaktantem akutní fáze. Měď obsažená v CP je schopna oxidovat LDL, oxidovaný LDL je pak součástí aterogenního procesu. Mezi rizikové faktory patří také homocystein, který interaguje s mědí a společně vytvářejí oxidační stres.⁵⁵

3.4.2 Nedostatek mědi v těle

3.4.2.1 Kardiovaskulární onemocnění

Srdce je orgánem, který je zvláště citlivý na nedostatek mědi. Při nízkých hladinách mědi v organismu můžeme pozorovat elektrokardiografické abnormality a zhoršené kontraktilní a mitochondriální respirační funkce.⁴ Dochází také k poškození cév, pravděpodobně v důsledku nedostatku kuproenzymů, jako je např. lysyl oxidáza, která hraje roli při zesílení kolagenu a SOD, která funguje jako antioxidant. Nedostatek mědi může vést také k anémii, jelikož pro tvorbu krve je potřeba cytochrom c-oxidáza.⁵⁵

3.4.2.2 Menkesova choroba

Tato choroba je vzácným dědičným onemocněním, které se nejčastěji vyskytuje u chlapců a bývá fatální v raném dětství.⁵² Postihuje přibližně jednoho z 200 000 novorozenců. Jedná se o nemoc vázanou na X-chromozom (Xq13), která je způsobena mutací genu kódujícího ATP7A.⁵⁶ ATP7A je často označován jako Menkesův protein, který je zodpovědný za transport Cu do kuproenzymů a absorpci mědi do oběhu, jejíž narušení hraje klíčovou roli u tohoto syndromu.⁵⁷ Vzhledem k tomu, že v žaludku a tenkém střevě bývají vysoké koncentrace mědi se předpokládá, že dochází k poruše transportu mědi z mukózních buněk do oběhu a následně k nedostatku mědi v celém organismu.⁵² Typickými symptomy tohoto onemocnění jsou neurologické abnormality, ke kterým dochází v důsledku snížené aktivity cytochrom c-oxidázy, degenerace pojivové tkáně a zlomeniny kostí, aneuryzma aorty, mentální retardace a změna barvy vlasů.³¹ Mnoho dětí umírá do tří let od jejich narození, kdy ještě nemáme možnost pozorovat depigmentaci vlasů, což je nejnápadnější symptom této choroby, který vzniká následkem nedostatku tyrozinázy. Snížené jsou i hladiny CP v organismu. Léčba je možná při včasné diagnóze, a to především u pacientů, u kterých je choroba součástí rodinné anamnézy.⁵² Léčba se provádí nejčastěji komplexem Cu-histidin, který je každodenně podáván intratekálně a intraperitoneálně do CNS. Podávání Cu intravenózně nevede k jejímu transportu do mozku. Včasná diagnóza a léčba komplexem Cu-histidin vedou k zabránění neurodegenerace a prodloužení života.³¹

3.5 Chelatace mědi

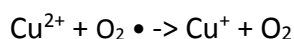
Komplexotvorná reakce při které vznikají cheláty se nazývá chelatace. Cheláty vznikají koordinační vazbou mezi donory (ligandy) a akceptory (centrální atom). Koordinační číslo odpovídá počtu ligandů, jedná-li se o monodonorové ligandy. Cheláty jsou tvořeny polydonorovými ligandy,

kteře jsou navázané na iont kovu a jsou ve srovnání s monodonorovými ligandy stabilnější, jedná se o tzv. chelátový efekt. Podle známého Chugaeva jsou nejstabilnější pětičlenné a šestičlenné chelátové prstence.⁵⁸ Chelatace mědi je často využívána v případě přetížení organismu mědi. V klinických studiích a při léčbě různých onemocnění se využívají chelátory mědi. Terapeutické aplikace chelátorů jsou zaměřeny na odstranění mědi nebo omezení biologické dostupnosti mědi v orgánovém systému. Úspěšné léčby pomocí chelátorů je dosahováno např. u Wilsonovy choroby, kde se využívá penicilamin, trietyléntetramin a amonium tetrathiomolybdenát. Chelátory slouží také k transportu mědi mezi orgány. Dosahují toho tím, že mohou měnit oxidační stav mědi z Cu^{2+} na Cu^+ . V lidském organismu se nachází mnoho různých proteinů, některé se váží na Cu^{2+} , jiné na Cu^+ . Chelátory odstraní Cu^{2+} z jednoho proteinu vázajícího měď, převedou Cu^{2+} na Cu^+ a poté přenesou Cu^+ na jiný protein. Mezi proteiny vázající Cu^{2+} řadíme např. bathocuproin, neocuproin, které patří mezi kuprizonové chelátory.⁵⁹ S chelatací mědi se můžeme setkat také u radiofarmak. Chelatace radionuklidu ^{64}Cu je potřebná pro jeho zvýšenou absorpci v požadované tkáni či orgánu.⁶⁰

3.6 Redukce mědi

Součástí základní chemie mědi je snadné uvolnění a absorpce jednoho elektronu, což je podstatou oxidačně-redukčních reakcí. Redukce probíhá současně s oxidací, jedná se o opačné děje. Při redukci dochází k snížení oxidačního čísla, u oxidace se toto číslo naopak zvyšuje. V biologických systémech se měď vyskytuje převážně jako Cu^{2+} . V přítomnosti kyslíku či jiných akceptorů elektronů dochází ke snadné oxidaci Cu^+ na Cu^{2+} , této přeměny je využito při Fentonově reakci, kdy dochází pomocí Cu^+ k transformaci H_2O_2 na hydroxylový radikál (Rce č. 1). Oxidace Cu je reverzibilní, jelikož v přítomnosti superoxidového aniontového radikálu nebo silných redukčních činidel (kyselina askorbová, glutathion)

může docházet k redukcí Cu^{2+} na Cu^+ (Rce č. 2).¹⁶ Glutathion může potlačit toxicitu mědi jejím udržováním v redukovaném stavu a zabrání tak redoxnímu cyklování mědi. Je důležitým buněčným antioxidantem působícím proti toxicitě mědi. Deplece glutathionu umožňuje, aby byl kov více katalyticky aktivní, čímž dochází k zvýšení hladin reaktivních forem kyslíku, které působí cytotoxicky.⁶¹



Reakce č. 2: Redukce měďnatých iontů v přítomnosti superoxidového aniontového radikálu⁶¹

Schopností redukovat měď se vyznačují také proteiny příbuzné neurodegenerativním onemocněním, kterými jsou β -amyloid, APP a prionový protein. Předpokládá se, že v nepříznivých podmínkách, kterými je myšleno např. abnormální zvýšení APP či akumulace β -amyloidu do amyloidních fibril dochází ke zvýšení redukce mědi, následnému zvýšení hladin Cu^+ a volných radikálů, které způsobí oxidativní poškození.⁶² Redukce mědi je využíváno při různých mechanismech v lidském těle, jedním z nich je absorpce, kdy je nutná přeměna Cu^{2+} na Cu^+ pomocí reductáz pro vazbu na CTR1, který váže pouze Cu^+ .⁶

3.7 Isochinolinové alkaloidy

Alkaloidy patří k nejrozmanitějším skupinám sekundárních metabolitů vyskytujících se v živém organismu. Jednotlivé alkaloidy se liší ve farmakologické aktivitě, biosyntetických dráhách a také ve struktuře. Alkaloidy jsou tradičně získávány převážně z rostlin, vyskytují se však také u hmyzu, mořských bezobratlých a mikroorganismů. Alkaloidy jsou již řadu let využívány v medicíně, některé z nich jsou stále prominentními léky.⁶³ Mezi alkaloidy s nejširším spektrem farmakologických účinků řadíme zejména isochinolinové alkaloidy.⁶⁴ Všechny alkaloidy jsou odvozené od aminokyselin, isochinolinové alkaloidy (s výjimkou naftylisochinolinů) jsou odvozeny od tyrosinu, který se hojně vyskytuje v živém organismu.

Isochinolinové alkaloidy můžeme dále rozdělit podle struktury a způsobu jejich tvorby v rostlinách na různé podskupiny např. benzylisochinoliny, bisbenzylisochinoliny, morfinové alkaloidy, kulariny, aporfinové alkaloidy, β -fenylethylaminy, emetin a příbuzné alkaloidy atd. Všechny podskupiny obsahují aromatická jádra nesoucí jako substituenty methoxyl, methylenedioxyhydroxy nebo aryloxy skupinu a nasycené či nenasycené postranní uhlíkové řetězce.⁶⁵ Ve své práci jsem se zabývala alkaloidy protoberberinového a protopinového typu, které jsou také podskupinami isochinolinových alkaloidů.

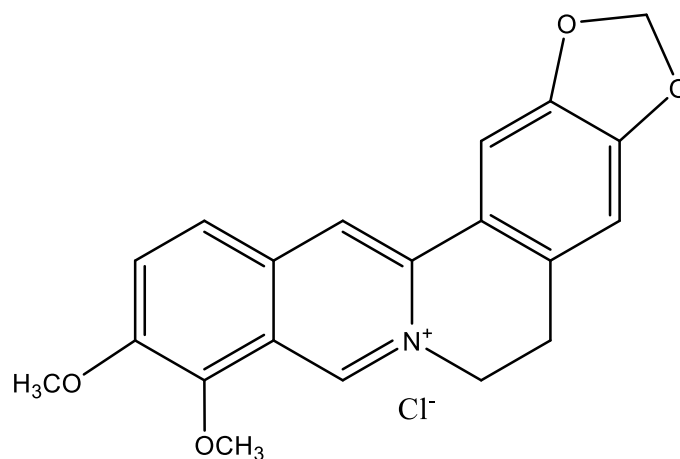
3.7.1 Alkaloidy protoberberinového typu

Většina alkaloidů protoberberinového typu existuje v přírodě buď jako tetrahydroprotoberberiny nebo jako kvarterní protoberberinové soli, v malém množství se vyskytují i jako dihydroberberiny. Jsou široce distribuovány v mnoha čeledích rostlin, kterými jsou např. Papaveraceae, Berberidaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Annonaceae.⁶⁶ Protoberberiny vykazují velké množství biologických a farmakologických účinků, které zahrnují inhibici syntézy DNA, biosyntézu proteinu, inhibici propustnosti membrány, mohou také fungovat v dýchacím řetězci jako odpojovače oxidace od fosforylace. Tyto procesy pravděpodobně přispívají k toxickým účinkům pozorovaným proti bakteriím, houbám, hmyzu, obratlovcům či jiným rostlinám. K inhibici virů a fágů pravděpodobně přispívají inhibicí reverzní transkripce.⁶⁷

3.7.1.1 Berberin-chlorid

V čínské medicíně jsou k léčbě gastroenteritidy, průjemových onemocnění a bolesti břicha používány *Coptidis rhizoma* a *Phellodendri cortex*, jejichž hlavní složkou je berberin-chlorid (Obr. č. 5).⁶⁸ Berberin-chlorid se vyznačuje antibakteriálními, antiprotozoálními a protizánětlivými účinky, působí také proti původci cholery.^{66,68} Můžeme ho také najít např. v rostlině *Hydrastis canadensis* (L.).⁶⁸ *In vitro* je aktivní proti

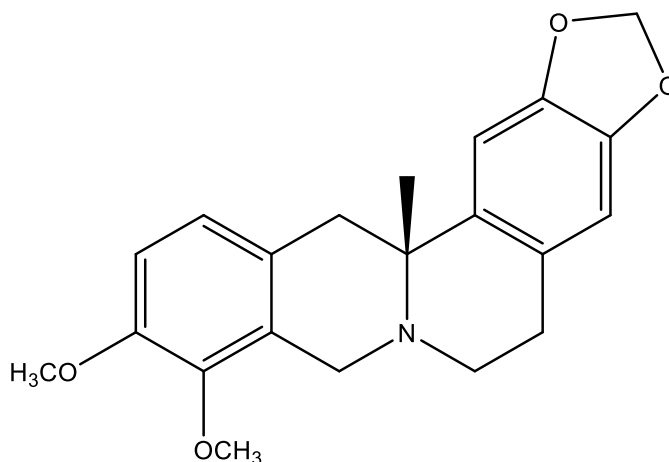
mykobakteriím, má tedy potenciální význam jako antituberkulózní lék. Alkaloid tvoří komplex s DNA, kde pravděpodobně dochází ke konfiguračním změnám. U berberin-chloridu byla dále prokázána přechodná hypotenzní aktivita u potkanů, která může být prodloužena substitucí C-9 *O*-methyl skupinou s *O*-*n*-C₄H₉ nebo *O*-*n*-C₅H₁₁.⁶⁶ Další studie ukazují neuroprotektivní účinky berberin-chloridu např. u Alzheimerovy choroby, diabetické neuropatie, Parkinsonovy choroby, ischemie předního mozku, mentální deprese a úzkosti. Působením proti oxidačnímu stresu a inhibicí mitochondriální apoptózy chrání mozek před ischemickým poraněním. Berberin-chlorid je považován za terapeutické činidlo pro léčbu neurodegenerativních poruch včetně chronické cerebrální hypoperfúze. Je schopen inhibovat acetylcholiesterázu (AChE) a také chránit cholinergní neurony v hipokampu. Aktivací cholinacetyltransferázy (ChAT) spolu s inhibicí AChE zvyšuje hladiny acetylcholinu v mozcích pacientů s Alzheimerovou chorobou.⁶⁹



Obrázek č. 5: Struktura berberin-chloridu

3.7.1.2 Kanadin

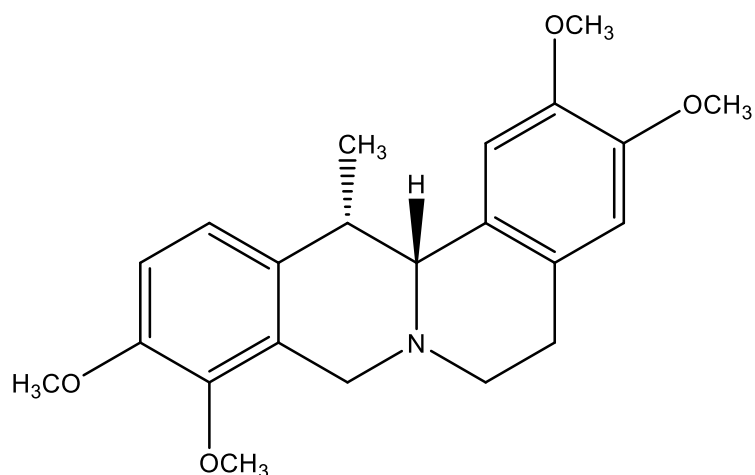
Oddenek a kořeny *Hydrastis canadensis* (L.) jsou často používány k léčbě mírných patologických stavů, kterými jsou nachlazení a chřipka. Kromě toho mají také relaxační účinky, na kterých se podílí kanadin (Obr. č. 6) s berberinem-chloridem a dalšími alkaloidy obsažené v této rostlině. Schopnost β -blokátoru timololu antagonizovat relaxační účinek extraktu kanadinu prokázaly možný účinek kanadinu na β -adrenergní receptory.⁷⁰ Kanadin můžeme připravit Mannichovou kondenzací benzylochinolinu, který reaguje s formaldehydem v přítomnosti kyseliny. Kanadin vzniká v malém množství, hlavním produktem je izomerní tetrahydropseudoberberin.⁶⁶



Obrázek č. 6: Struktura kanadinu

3.7.1.3 Korydalin

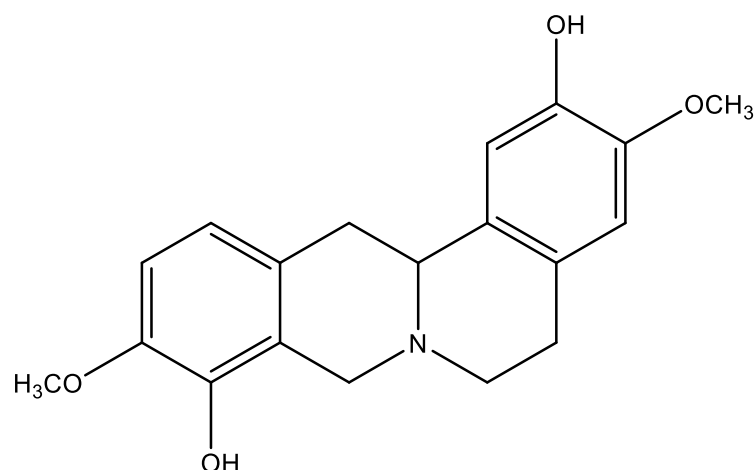
Hlíza, kořen *Corydalis yanhusuo* (Y. H. Chou & Chu C. Hsu) W. T. Wang ex Z. Y. Su & C. Y. Wu se již dlouho používá jako bylinný lék díky svým analgetickým a protivředovým účinkům. Na účincích se podílí především korydalin. Byly u něj prokázány také inhibiční účinky na AChE, účinky antialergické a antinociceptivní. Může také působit jako antispasmodikum. Dále ho můžeme najít např. v rostlině *Corydalis turtchaninovii* Besser.⁷¹



Obrázek č.7: Struktura korydalínu

3.7.1.4 Skulerin

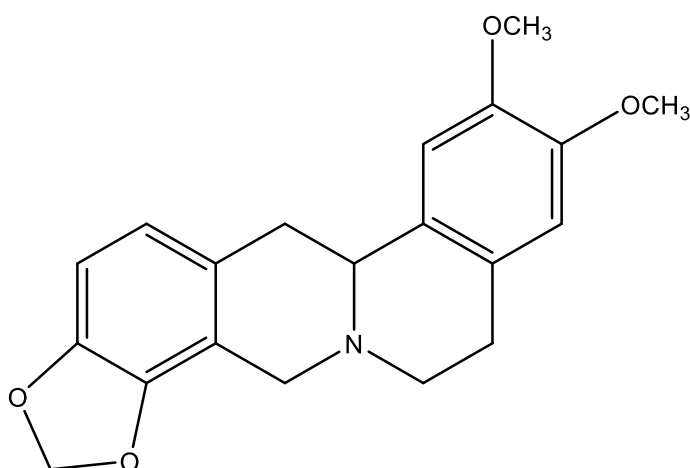
Skulerin (Obr. č. 8) je důležitým meziproductem v biosyntéze isochinolinových alkaloidů. Tvoří se z retikulínu a slouží jako prekurzor v biosyntetické dráze dalších protoberberinových alkaloidů např. berberin-chloridu, stylopinu, protopinu, sanginarinu.⁷² Skulerin je alkaloidem vykazujícím slabou antibakteriální a protizánětlivou aktivitu, je také inhibitorem AChE. Můžeme ho najít např. v rostlině *Corydalis dubia* Prain.⁷³ Biologickou studií byla prokázána i jeho významná *in vitro* antiplasmodiální aktivita proti *P. falciparum*, která ale nesplňuje kritéria stanovená v rámci léčivých přípravků pro léčbu malárie. U skulerinu byly dále zjištěny účinky antiemetické, antitusické a také afinita k receptorům kyseliny gama-aminomáselné (GABA). Skulerin by mohl mít v budoucnu význam i pro léčbu AD jako aktivní inhibitor β -amyloidu nebo by mohl být užitečný jeho cytostatický efekt při léčbě rakoviny.⁷²



Obrázek č. 8: Struktura skulerinu

3.7.1.5 Sinaktin

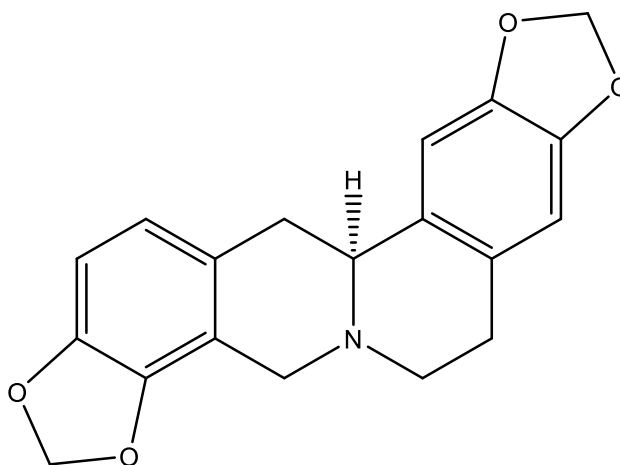
Sinaktin (Obr. č. 9) je alkaloid, který obsahuje tetrahydroberberinový skelet a jehož sumární vzorec je $C_{20}H_{21}O_4N$. Obsahuje dvě methoxy skupiny a jednu methylenedioxy skupinu. Sinaktin se zavedenou strukturou byl izolován z několika druhů rostlin, jedná se o Z-tetrahydroepiberberin, což znamená, že polohy methylenedioxy skupiny a dvou methoxyskupin se vyskytují v opačných polohách, než je tomu u tetrahydroberberinu.⁷⁴ Sinaktin jako přírodní produkt byl poprvé izolován z *Corydalis meifolia* Wall. Můžeme ho najít např. v čeledi Papaveraceae.⁷⁵



Obrázek č. 9: Struktura sinaktinu

3.7.1.6 Stylopin

U stylopinu (Obr. č. 10) byla prokázána antimalarická aktivita proti *P. falciparum*⁷⁶ a také střední cytotoxická aktivita proti lidskému karcinomu.⁷⁷ Můžeme ho najít například v rostlinách *Galanthus trojanus* A. P. Davis & N. Özhatay⁷⁶ a *Chelidonium majus* (L.).⁷⁷ Pro jeho syntézu je důležitá přeměna retikulinu na skulerin, který se dále přes cheilanthifolin mění na stylopin. Ze stylopinu vzniká postupnými kroky sanguinarin. Všechny přeměny alkaloidů jsou katalyzovány, přeměna cheilanthifolinu na stylopin je katalyzována P450-dependentními monooxygenázami a cDNA kódující stylopin syntázou (Cyp719A2 a Cyp719A3). Cyp719A2 konvertuje pouze cheilanthifolin na stylopin, zatímco Cyp719A3 také přijímá sloučeniny bez methylenedioxy můstku.⁷⁸

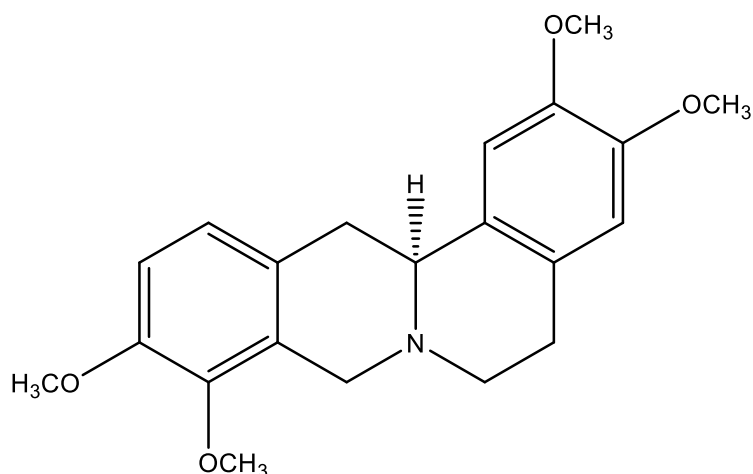


Obrázek č.10: Struktura stylopinu

3.7.1.7 Tetrahydropalmatin

Rhizoma Corydalis (yanhusuo), sušená hlíza *Corydalis yanhusuo* (Y. H. Chou & Chu C. Hsu) W. T. Wang ex Z. Y. Su & C. Y. Wu byla mnoho let používána pro léčbu bolesti na hrudi, v epigastriu, při dysmenorrhee a při traumatických otocích. Tetrahydropalmatin (Obr. č. 11) je jednou z účinných látek izolovaných ze sušené hlízy. Byly prokázány jeho hypnotické a analgetické vlastnosti, které však nezpůsobují závislost

na drogách. Dále byly hlášeny účinky hypotenzní, antiarytmické a antitrombotické. Tetrahydropalmatin obsahuje asymetrický uhlík, klinicky se používá jako racemická směs.⁷⁹



Obrázek č. 11: Struktura tetrahydropalmatinu

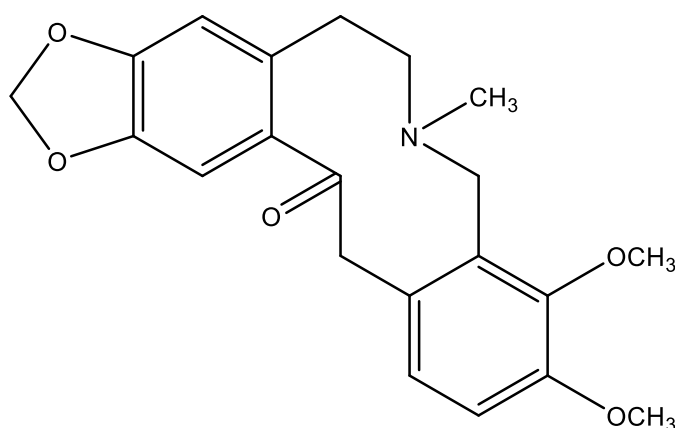
3.7.2 Alkaloidy protopinového typu

Protopinové alkaloidy nezahrnují isochinolinový systém. Vyznačují se přítomností desetičlenného kruhu, který obsahuje terciární atom dusíku a ketonovou skupinu na C-14. Jelikož jsou biogeneticky odvozeny od tetrahydroprotoberberinových prekurzorů, jsou řazeny mezi isochinolinové alkaloidy. Protopin patří mezi nejrozšířenější isochinolinové alkaloidy. Alkaloidy protopinového typu zpomalují srdeční rytmus a mají antifibrilační vlastnosti. Zvyšují také průtok krve koronárními tepnami. Protopin a kryptopin stimulují dělohu, ale účinek je krátký.⁶⁶

3.7.2.1 Allokryptopin

Allokryptopin (Obr. č. 12) se nejvíce vyskytuje v čeledích Papaveraceae, Berberidaceae, Ranunculaceae, Rutaceae a Sapindaceae. Konkrétně ho můžeme najít např. v rostlinách *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br., *Fumaria officinalis* (L.) a *Papaver somniferum* (L.). Byly u něj zjištěny antiarytmické účinky, které byly pravděpodobně vyvolány blokací draslíkového proudu v myocytech. Dále byly u allokryptopinu prokázány

relaxační účinky na ileum inhibicí fosfodiesterázy a kontraktilní účinky na močový měchýř, které byly vyvolány ovlivněním α -adrenergních receptorů. Allokryptopin vykazoval také významnou nematocidní aktivitu, byl tedy navržen jako potenciálně účinné anthelmintikum.⁸⁰

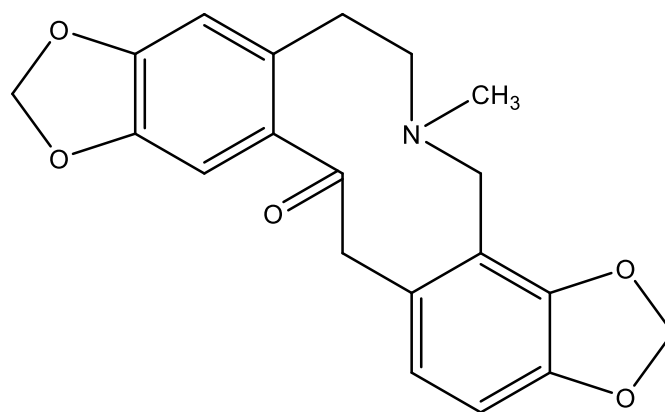


Obrázek č. 12: Struktura allokryptopinu

3.7.2.2 Protopin

Tento isochinolinový alkaloid můžeme obvykle nalézt v rostlinách vyskytujících se severovýchodní Asii.⁸¹ Protopin (Obr. č. 13) se stejně jako allokryptopin vyskytuje nejvíce v čeledích Papaveraceae, Berberidaceae, Ranunculaceae, Rutaceae a Sapindaceae. Konkrétně ho můžeme najít např. v rostlinách *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br., *Chelidonium majus* (L.), *Sanguinaria canadensis* (L.)⁸⁰, *Hyecoum erectum* (L.) atd. Bylo u něj prokázáno velké množství farmakologických aktivit jako je snížení intracelulárního toku vápníku, inhibice syntézy tromboxanu A₂, čímž zabraňuje agregaci krevních destiček, dále inhibice cyklooxygenázy 2 (COX2), čímž dochází ke snížení tvorby prostaglandinu E₂ (PGE₂) z kyseliny arachidonové. Díky své významné inhibici produkce prozánětlivých cytokinů z aktivovaných makrofágů, by protopin mohl být potencionálním kandidátem pro léčbu zánětlivých onemocnění.⁸¹ Vyznačuje se mnohočetnými účinky na kardiovaskulární systém včetně

antiarytmických, antihypertenzních, negativně inotropních a vazodilatačních⁸⁰ a také účinky antibakteriálními, antihistaminovými a anticholinergními.⁸¹ Kromě toho působí také proti *P. falciparum*.⁸² U potkanů byl prokázán hepatoprotektivní efekt protopinu, který se projevil snížením sérových hladin aspartátaminotransferázy, alaninaminotransferázy, alkalické fosfatázy a bilirubinu. Bylo zjištěno, že protopin v dávkách 10 a 20 mg podaný perorálně je stejně účinný jako léčivo silymarin. Terapeutické využití má i při léčbě psychiatrických poruch nebo poruch nervového systému.⁸⁰

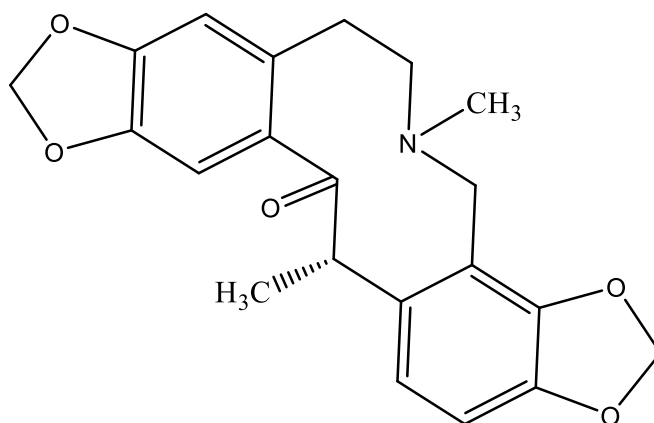


Obrázek č. 13: Struktura protopinu

3.7.2.3 Korykavamin

U korykavaminu (Obr. č. 14) byla prokázána inhibice izoforem cytochromu P450 (CYP). Enzymy CYP tvoří nadrodinu monooxygenáz obsahujících hem, které katalyzují oxidativní metabolismus široké škály xenobiotik, včetně léků. CYP se pak dělí na jednotlivé rodiny CYP1, CYP2 a CYP3. Jednotlivé enzymy CYP v těchto rodinách jsou odpovědné za metabolismus cca 70-80 % všech v současnosti užívaných léčiv. Enzymy CYP hrají také klíčovou roli v oxidačních reakcích v sekundárním metabolismu rostlin. Fluorimetrické vysoce účinné

inhibiční testy enzymů CYP jsou široce používány pro screening lékových interakcí, zejména během předklinických fází objevování léčiv. Inhibicí těchto enzymů může docházet ke zvýšení plazmatických hladin léčiv, která jsou těmito enzymy metabolizována. Korykavamin nejsilněji inhibuje izoformu CYP2D6, následně pak CYP3A4 a CYP2C19, zatímco CYP1A2, CYP2B6 a CYP2C8 inhibuje méně. Ve srovnání s kryptopinem, allokryptopinem a protopinem inhibuje nejvíce izoformem. Můžeme ho najít např. v rostlinách *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. a *Meconopsis cambrica* (L.).⁸³ Korykavamin je schopen snižovat krevní tlak a zpomalovat srdeční frekvenci.^{84,84}

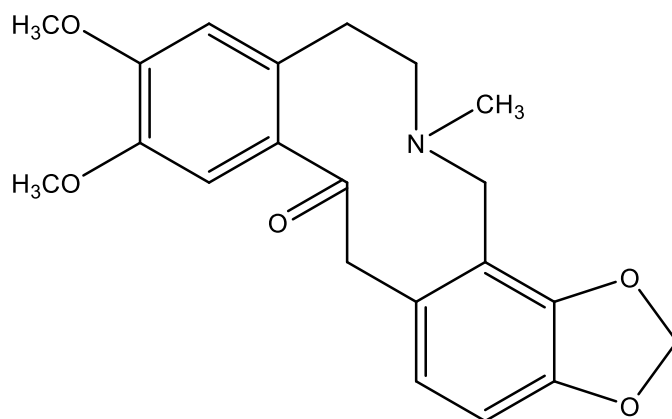


Obrázek č. 14: Struktura korykavaminu

3.7.2.4 Kryptopin

Strukturální vzorec kryptopinu (Obr. č. 15) je $C_{21}H_{23}O_5N$, byl poprvé izolován v roce 1867. Je opticky inaktivní, můžeme ho nalézt v opiu.⁶⁶ Dále ho můžeme najít také v rostlině *Fagara coco* (Gillies ex Hook. & Arn.) Engl. Byly u něj zjištěny negativní účinky na srdce v podobě snížení tlakové amplitudy, což je rozdíl mezi systolickým a diastolickým tlakem, dále dilatační účinky na koronární tepny, může způsobovat také srdeční arytmie.⁸⁵ Stimulačně působí na dělohu, avšak účinek je krátký. Chemie kryptopinu úzce souvisí s chemií protopinu, pro jehož strukturální objasnění byly použity některé stejné degradační postupy. Kryptopin

s protopinem patří mezi první alkaloidy protopinového typu, které byly chemicky zkoumány.⁶⁶



Obrázek č. 15: Struktura kryptopinu

4 Experimentální část

4.1 Používané přístroje

- Analytické váhy Kern ABT 120-5DM
- Ultrazvuková lázeň Kraintek
- Třepačka pro zkumavky a mikrozkušavky IKA vortex Genius 3
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA MS3 digital
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Synergy HT multidetection microplate reader BioTec

4.2 Pracovní pomůcky

- 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem (Brand)
- Automatické pipety různých objemů (Brand)
- Vícekanálové pipety různých objemů (Biohit)
- Zkušavky, mikrozkušavky

4.3 Používané chemikálie

Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma - Aldrich, pokud není uvedeno jinak.

- Dimethylsulfoxid (DMSO) Lachner $\geq 99,5\%$
- Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) čistota neuvedena
- Hematoxylin (HEM) certifikováno Biological Stain Commission
- HEPES (kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová) $\geq 99,5\%$
- HEPES sodná sůl $\geq 99,5\%$
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) $\geq 99,5\%$
- Chlorid měďný (CuCl) $\geq 99\%$
- Chlorid sodný (NaCl) $\geq 99,5\%$
- Kyselina chlorovodíková (HCl) $\geq 32\%$

- Kyselina octová (CH₃COOH) Penta ≥ 99%
- Octan sodný (CH₃COO⁻H⁺) ≥ 99%
- Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄·5H₂O) ≥ 99%

4.4 Testované látky

Čistota u izolovaných látek je ≥ 98 %. Testované látky byly izolovány v rámci fytochemického výzkumu rostlin z čeledi Papaveraceae na Katedře Farmaceutické botaniky (Faf UK), není-li uvedeno jinak.

- berberin-chlorid (Sigma-Aldrich)
- kanadin, tetrahydropalmin, korykavamin a korydalin byly izolovány z *Corydalis cava* (L.) Schweigg a Korte⁸⁶ (Papaveraceae)
- sinaktin a kryptopin byly izolovány z *Fumaria officinalis* (L.)⁸⁷ (Papaveraceae)
- skulerin – izolován z *Eschscholzia californica* Cham.⁸⁸ (Papaveraceae)
- stylopin, allokryptopin a protopin byly izolovány z *Chelidonium majus* (L.)⁸⁹ (Papaveraceae)

4.5 Příprava používaných roztoků

- **Roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) 5mM**
 - roztok byl připraven rozpuštěním BCS (M_w = 564,54 g/mol) v destilované vodě
- **Zásobní roztok hematoxylinu (HEM)**
 - navážením HEM a jeho následným rozpuštěním v DMSO vznikl 5mM roztok
 - pro další testování byl roztok zředěn DMSO v čas potřeby na 250μM
 - molekulová hmotnost HEM: 302,28 g/mol

Použitelnost 5mM roztoku hematoxylinu v DMSO byla 5 hodin a 250 μ M roztok hematoxylinu v DMSO se dal použít po dobu cca 90 minut.

- ***Zásobní roztok hydroxylamin hydrochloridu (HA)***

- výchozí roztok o koncentraci 10mM byl zhotoven naředěním 100 mM roztoku HA destilovanou vodou
- pro další testování byl roztok zředěn na 1mM destilovanou vodou
- molekulová hmotnost $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$: 69,49 g/mol

- ***Zásobní roztok měďnatých iontů***

- nejprve byl připraven roztok o koncentraci 5 mM rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého v destilované vodě
- následně byl roztok zředěn DMSO v čas potřeby na 250 μ M
- molekulová hmotnost $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$: 249,69 g/mol

- ***Zásobní roztok měďných iontů***

- navážením měďných iontů a následným rozpuštěním v 0,1M HCl a 1M NaCl byl připraven 5mM roztok dané koncentrace
- následně byl roztok zředěn DMSO na 250 μ M
- molekulová hmotnost NaCl: 98,99 g/mol

- ***Roztoky pufrů pro pH 4,5 a 5,5***

- smísením 15mM vodných roztoků octanu sodného a kyseliny octové byl připraven acetátový pufr, pH bylo upraveno pomocí pH metru

- ***Roztoky pufrů pro pH 6,8 a 7,5***

- smísením 15mM vodných roztoků HEPES sodné soli a HEPES kyseliny byl připraven HEPES pufr, pH bylo upraveno pomocí pH metru

- ***Roztoky testovaných látek***

- alkaloidy byly rozpuštěny DMSO na koncentraci 10 mM
- koncentrační řady byly připraveny s použitím DMSO

4.6 Kalibrační křivka měďnatých iontů

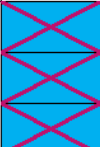
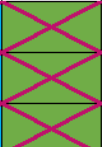
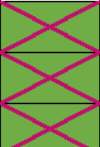
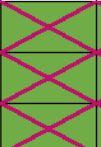

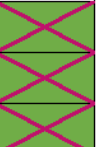
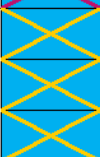
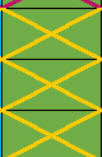

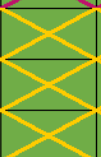

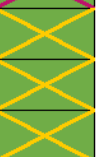
Pro sestavení kalibrační křivky byly připraveny zásobní roztoky žádaných koncentrací, které byly použity k vlastnímu měření. Měření bylo prováděno při konstantní vlnové délce (λ). Po ukončení měření byl vytvořen graf závislosti absorbance na koncentraci měďnatých iontů a byla sestrojena kalibrační křivka.

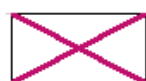
Příprava základních reagenčních roztoků:

- vodné roztoky Cu^{2+} solí o koncentracích 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 250 μM .
- BCS 5mM
- HA 1mM

Provedení experimentu:

1. Bylo napipetováno 150 μl pufru o pH 6.8 do všech určených jamek v mikrotitrační destičce.
2. Následně bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku HA.
3. Do testovacích jamek bylo napipetováno 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů žádané koncentrace a do jamek kontrolních 50 μl destilované vody (Obr. č. 16).
4. Mikrotitrační destička byla přemístěna na třepačku a doba míchání trvala 1 minutu.
5. Do 3 řad jamek bylo pipetováno 50 μl roztoku BCS a do dalších 3 řad jamek 50 μl destilované vody (Obr. č. 16).
6. Po dokončení pipetování byla ihned změřena absorbance při konstantní vlnové délce (λ) 484 nm, dále pak v čase 5 min.
7. Pomocí naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka.

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



Jamky s BCS



Slepé vzorky s destilovanou vodou



Kontrolní jamky bez Cu^{2+} iontů



Testované jamky s rozdílnými koncentracemi Cu^{2+} iontů

Obrázek č. 16: Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci Cu^{2+} iontů

4.7 Kontrola výchozích roztoků mědi

Kontrola připravených základních roztoků mědi byla prováděna vždy po přípravě 5mM i 0,25mM roztoků Cu^+ a Cu^{2+} , před vlastním měřením. Pipetování bylo prováděno do dvou jamek mikrotitrační destičky pod sebe. Absorbance správně připraveného roztoku se pohybovala v rozmezí 0,50 - 0,55.

Vlastní postup:

1. 150 μl pufru pH 7.5 bylo pipetováno do obou jamek.
2. Následně bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu.
3. Poté bylo pipetováno 50 μl 0,25mM roztoku iontů mědi.
4. Mikrotitrační destička byla vložena na třepačku a byla 1 minutu míchána.
5. Bylo přidáno 50 μl 5mM roztoku BCS.
6. Absorbance při vlnové délce 484 nm byla měřena po jedné minutě od přidání roztoku BCS.

4.8 Postup stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem

Příprava základních a pracovních roztoků a roztoků testovaných látek:

Pro stanovení chelatační aktivity látek byly připraveny tyto roztoky: 5mM a 250 μM roztok Cu^{2+} iontů, 5mM a 250 μM roztok hematoxylinu, roztoky testovaných látek v DMSO nejčastěji v koncentracích 10 mM, 1 mM a 0,1 mM - další ředění dle potřeby.

Vlastní provedení experimentu – chelatace měďnatých iontů v pufru (pH 7.5, 6.8, 5.5)

1. Do všech jamek bylo pipetováno 150 μl příslušného pufru.
2. Do každé z nich bylo následně přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů
3. 50 μl roztoku testované látky dané koncentrace bylo pipetováno do testovacích jamek a do jamek kontrolních bylo přidáno 50 μl rozpouštědla (Obr. č. 17).
4. Obsah mikrotitrační destičky byl míchán na třepačce 2 minuty.
5. Do 2 řad jamek bylo pipetováno DMSO a do dalších 2 řad jamek 50 μl 250 μM roztoku hematoxylinu (Obr. č. 17).
6. Mikrotitrační destička byla 3 minuty míchána na třepačce.
7. Absorbance byla měřena při různých vlnových délkách v závislosti na pH pufru (při pufru s pH 7.5 při vlnové délce 610 nm, u pufru, který má pH 6.8 při vlnové délce 590 nm a při použití pufru pH 5.5 při 595 nm), ihned (v čase 3 min), dále v čase 5 min a 7 min.

	kontrolní jamky (c = 0)	roztok testované látky c1	roztok testované látky c2	roztok testované látky c3	roztok testované látky cx
Jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X



Jamky s 250μM hematoxylinem



Slepé vzorky s DMSO



Kontrolní jamky bez testované látky



Jamky s testovanou látkou

Obrázek č. 17: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace iontů mědi s hematoxylinem

4.9 Stanovení chelatace a redukce iontů mědi pomocí disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové

Příprava základních a pracovních roztoků a roztoků testovaných látek:

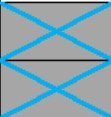
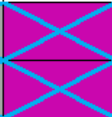
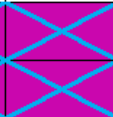
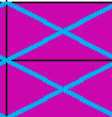
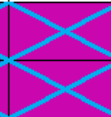
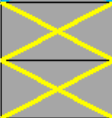
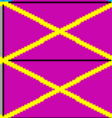
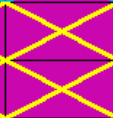
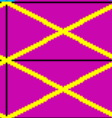
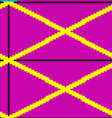
Pro stanovení chelatační aktivity látek byly připraveny tyto roztoky: 5mM roztok Cu^{2+} a 250μM roztok Cu^{2+} v DMSO, 5mM roztok Cu^+ ve vodném roztoku 0,1M HCl a 1M NaCl, 250μM roztok Cu^+ v DMSO, 10mM a 1mM HA, 5mM BCS, roztoky testovaných látek, které byly pomocí DMSO ředěny na příslušnou koncentraci.

4.9.1 Chelatace měďnatých (Cu^{2+}) iontů v pufru

U tohoto experimentu bylo nejprve prováděno vlastní měření s pufrům, který měl pH 7.5, následně pak s pufrů o pH 6.8, 5.5 a 4.5.

Provedení experimentu:

1. Bylo pipetováno 100 μl pufru o určitém pH.
2. Do testovacích jamek bylo pipetováno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace a do jamek kontrolních 50 μl rozpouštědla (Obr. č. 18).
3. Bylo přidáno 50 μl 0,25mM roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO do všech jamek.
4. Mikrotitrační destička byla vložena na třepačku a byla třepána po dobu 2 minut.
5. Byl-li používán pufr o pH 7.5 a 6.8 bylo přidáno 50 μl roztoku hydroxylaminu hydrochloridu 1mM, v případě používání pufru s pH 5.5 a 4.5 bylo pipetováno 50 μl roztoku hydroxylaminu hydrochloridu 10mM.
6. Destička byla míchána 1 minutu.
7. Do 2 řad jamek bylo napipetováno 50 μl destilované vody a do dalších 2 řad jamek 5mM roztoku BCS (Obr. č. 18).
8. Nakonec byla ihned měřena absorbance při vlnové délce 484 nm a dále pak v čase 5 min.

	kontrolní jamky (c = 0)	roztok testované látky c1	roztok testované látky c2	roztok testované látky c3	roztok testované látky cX
Jamky s indikátorem					
Slepé vzorky					



Jamky s BCS



Slepé vzorky s destilovanou vodou



Kontrolní jamky bez testované látky obsahující rozpouštědlo (DMSO)



Jamky obsahující testovanou látku

Obrázek č. 18: Znárodnění mikrotitrační destičky při stanovení chelatace měďnatých (Cu^{2+}) iontů v pufru

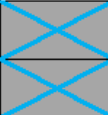
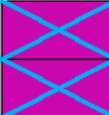
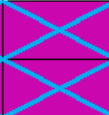
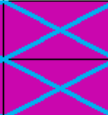
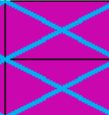
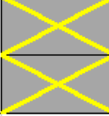
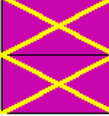
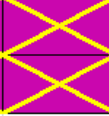
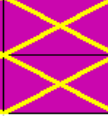
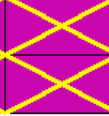
4.9.2 Chelatace měďných (Cu^+) iontů v pufru

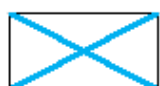
Vlastní měření bylo prováděno s pufrý o pH 7.5, pH 6.8, pH 5.5 a pH 4.5.

Vlastní postup měření:

1. Do všech jamek bylo pipetováno 100 μl příslušného pufru.

2. Při použití pufru s pH 6.8 a 7.5 bylo přidáno 50 μ l roztoku HA 1mM, u pufrů s pH 4.5 a 5.5 bylo pipetováno 50 μ l roztoku HA 10mM.
3. Do všech jamek bylo přidáno 50 μ l 250 μ M roztoku Cu^+ iontů v DMSO.
4. Destička byla vložena na třepačku a byla míchána 1 minutu.
5. Do testovacích jamek bylo napipetováno 50 μ l roztoku zkoumané látky o dané koncentraci, do jamek kontrolních bylo přidáno 50 μ l rozpouštědla (Obr. č. 19).
6. 2 minuty probíhalo míchání.
7. Nakonec bylo přidáno 50 μ l 5mM roztoku disodné soli bathocuproidisulfonové kyseliny nebo vody (Obr. č. 19).
8. Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 484 nm a dále po 5 minutách.

	kontrolní jamky (c = 0)	roztok testované látky c1	roztok testované látky c2	roztok testované látky c3	roztok testované látky cx
Jamky s indikátorem					
Slepé vzorky					



Jamky s BCS



Slepé vzorky obsahující destilovanou vodu



Kontrolní jamky bez testované látky



Jamky se zkoumanou látkou

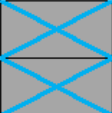
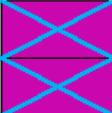
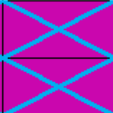
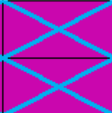
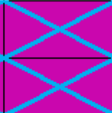
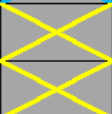
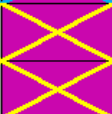
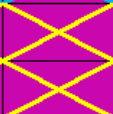
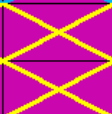
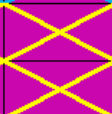
Obrázek č. 19: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace měďných (Cu^+) iontů v pufro

4.9.3 Chelatace měďnatých (Cu^{2+}) iontů v DMSO

Tento experiment byl prováděn bez přítomnosti pufru.

Postup měření:

1. Do jamek testovacích bylo pipetováno 100 μl roztoku, který byl složen z příslušné koncentrace testované látky rozpuštěné v DMSO a do jamek kontrolních 100 μl rozpouštědla, kterým byl stejně jako v předchozích experimentech dimethylsulfoxid (Obr. č. 20).
2. Poté bylo přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO do všech jamek.
3. 2 minuty byla destička míchána na třepačce.
4. Bylo pipetováno 50 μl 1mM roztoku HA.
5. Mikrotitrační destička byla míchána 1 minutu.
6. Do 2 řad jamek bylo přidáno 50 μl 5mM roztoku BCS a do dalších 2 řad bylo pipetováno místo BCS stejné množství destilované vody (Obr. č. 20).
7. Absorbance byla měřena ihned a v čase 5 min při vlnové délce 484 nm

	kontrolní jamky (c = 0)	roztok testované látky c1	roztok testované látky c2	roztok testované látky c3	roztok testované látky cX
Jamky s indikátorem					
Slepé vzorky					



Jamky s BCS



Slepé vzorky s destilovanou vodou



Kontrolní jamky s DMSO, bez testované látky



Testované jamky obsahující testovanou látku

Obrázek č. 20: Zobrazení mikrotitrační destičky při provádění chelatace měďnatých (Cu^{2+}) iontů v DMSO

4.9.4 Chelatace měďných (Cu^+) iontů v DMSO

Při provádění tohoto měření nebyly používány pufry.

Vlastní postup měření:

1. Do testovacích jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μl testované látky dané koncentrace v DMSO a do jamek kontrolních bylo přidáno místo látek 100 μl rozpouštědla (Obr. č. 21).
2. Bylo pipetováno 50 μl 1mM HA.
3. Dále bylo do jamek přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^+ iontů

4. Destička byla míchána 2 minuty.
5. Pipetování bylo zakončeno přidáním 50 μl roztoku BCS do 2 řad jamek mikrotitrační destičky nebo vody do dalších 2 řad jamek (Obr. č. 21).
6. Ihned po napipetování posledních složek (BCS a vody) byla měřena absorbance při vlnové délce 484 nm a dále po 5 minutách.

	kontrolní jamky (c = 0)	roztok testované látky c1	roztok testované látky c2	roztok testované látky c3	roztok testované látky cX
Jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X



Jamky s BCS



Slepé vzorky obsahující destilovanou vodu



Kontrolní jamky



Testované jamky

Obrázek č. 21: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^+ iontů v DMSO

4.9.5 Redukce měďnatých (Cu^{2+}) iontů v pufru

Tento experiment byl měřen s pufrům o pH 4.5, pH 5.5, pH 6.8 a pH 7.5.

Postup provádění experimentu:

1. Do všech jamek bylo pipetováno 100 μl daného pufru.
2. Do testovacích jamek bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky určité koncentrace nebo rozpouštědla (DMSO) (Obr. č. 22), do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl 1mM HA (v případě užití pufru o pH 6.8 a 7.5) či 50 μl 10mM HA (u pufrů s pH 4.5, 5.5).
3. 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů bylo přidáno do všech jamek mikrotitrační destičky.
4. Destička byla umístěna na třepačku a byla zde ponechána po dobu 2 minut.
5. Bylo přidáno 50 μl 5mM roztoku BCS a 50 μl destilované vody (Obr. č. 22).
6. Ihned byla měřena absorbance při 484 nm a v čase 5 min.

	roztok testované látky c1	roztok testované látky c2	roztok testované látky cx	rozpuštědlo	kontrolní jamky (c = 0)
Jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X



Jamky s BCS



Slepé vzorky s destilovanou vodou



Kontrolní jamky



Testované jamky

Obrázek č. 22: Zobrazení mikrotitrační destičky při stanovení redukce měďnatých Cu^{2+} iontů v pufru

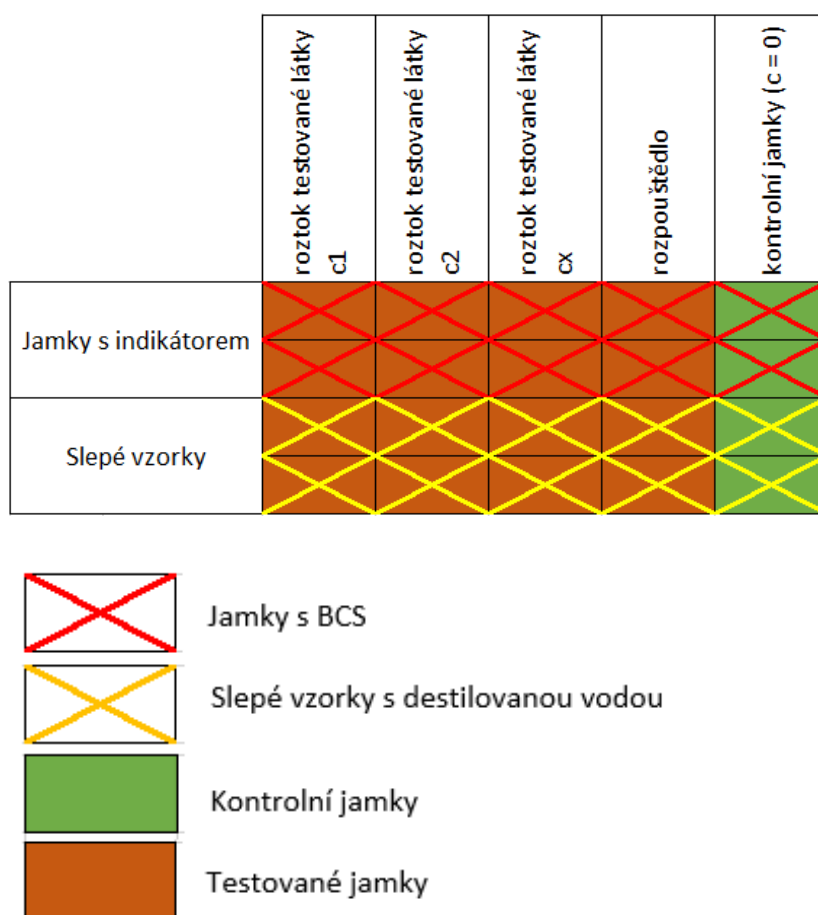
4.9.6 Redukce měďnatých (Cu^{2+}) iontů v DMSO

Tento experiment byl proveden bez přítomnosti pufrů.

Postup:

1. Bylo pipetováno 100 μl roztoku testované látky určité koncentrace rozpuštěné v DMSO nebo samotného DMSO bez látky do testovacích jamek, dále bylo přidáno 100 μl 1mM roztoku HA do jamek kontrolních (Obr. č. 23).

- Bylo pipetováno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO do všech jamek.
- Destička byla uložena na třepačku a byla tam ponechána 2 minuty.
- Do 2 řad jamek bylo přidáno 50 μl 5mM roztoku BCS a do dalších 2 řad jamek 50 μl vody (Obr. č. 23).
- V posledním kroku byla měřena absorbance při vlnové délce 484 nm, měření probíhalo ihned a dále v čase 5 min.



Obrázek č. 23: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce měďnatých (Cu^{2+}) iontů v DMSO

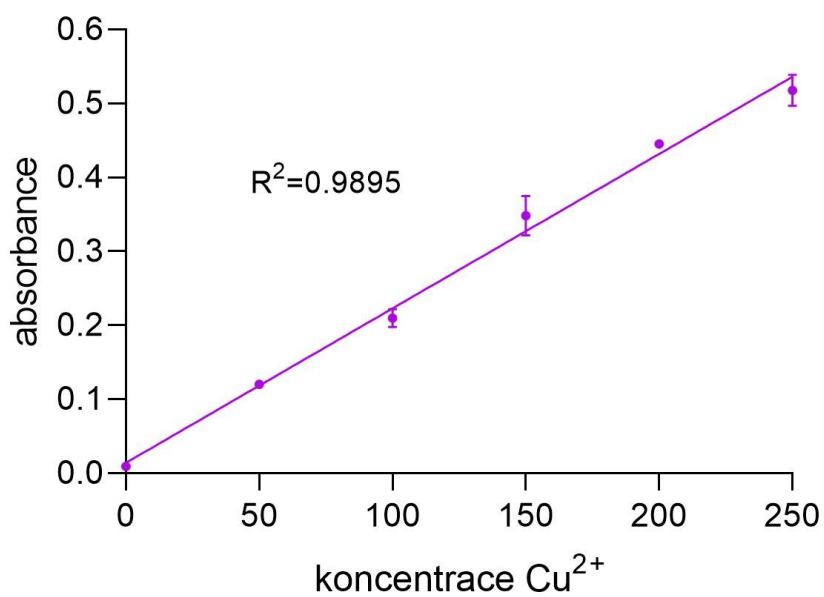
5 Výsledky

5.1 Kalibrační křivka

Z hodnot naměřených absorbancí (Tab. č. 2) byl sestrojen graf kalibrační křivky (Obr. č. 24). Základními použitými koncentracemi měďnatých iontů byly 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M a 250 μ M. Ze sestrojené kalibrační křivky je zřejmé, že závislost absorpance na koncentraci měďnatých iontů je lineární.

Koncentrace Cu ²⁺	0	50	100	150	200	250
Absorbance (průměr)	0,009333	0,120333	0,21	0,348	0,445333	0,517667

Tabulka č. 2: Naměřené hodnoty potřebné pro sestrojení grafu kalibrační křivky



Obrázek č. 24: Kalibrační křivka

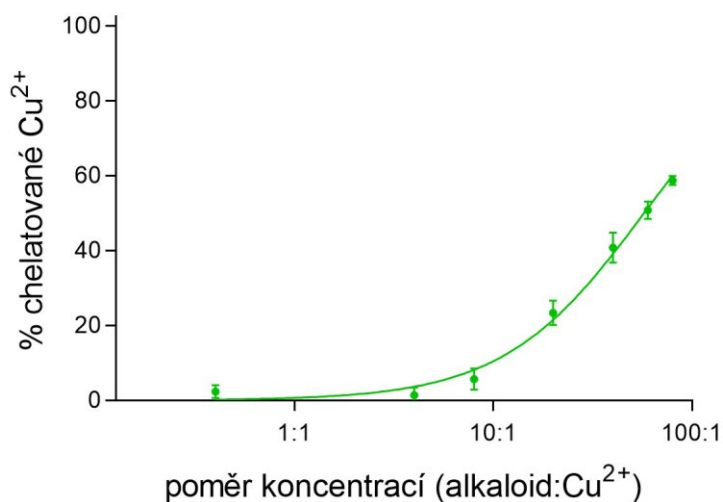
5.2 Chelatační účinky alkaloidů

5.2.1 Stanovení chelatace mědi pomocí hematoxylinu

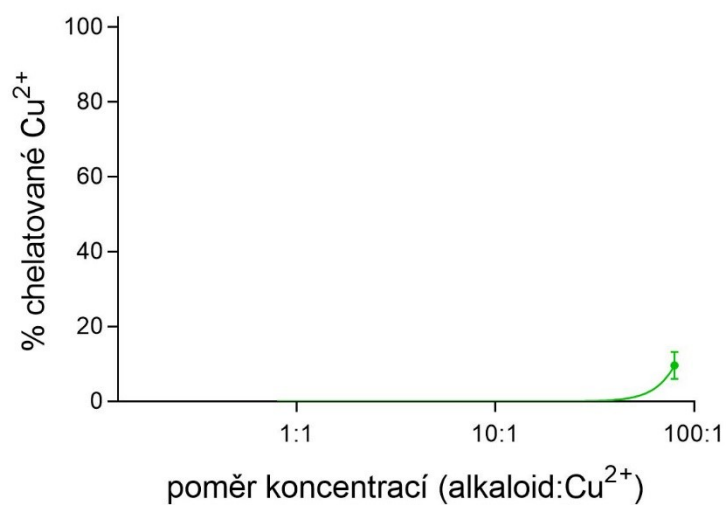
Touto metodou byly změřeny všechny látky. Měření probíhalo v prostředí pufrů (pH 7.5, 6.8, 5.5). Ze všech proměřených alkaloidů protoberberinového i protopinového typu žádná látka nevykázala chelatační aktivitu.

5.2.2 Stanovení chelatace mědi pomocí BCS

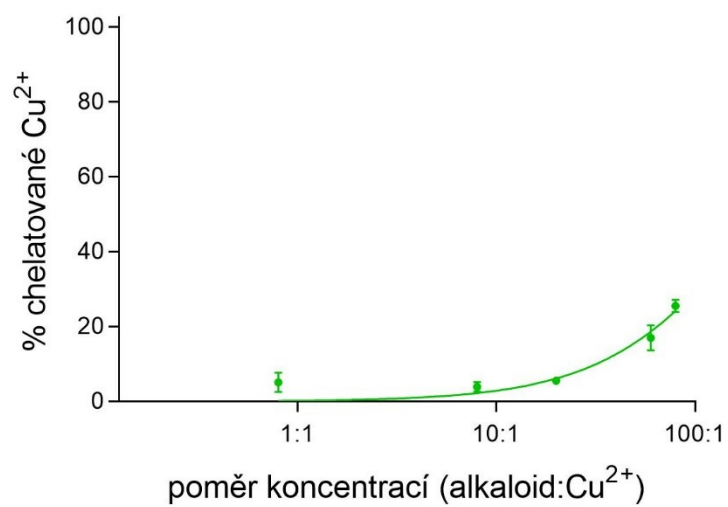
Po změření všech alkaloidů nebyla prokázána žádná chelatace měďných ani měďnatých iontů. Výjimkou jsou některé protopinové alkaloidy, které při stanovení chelatace měďnatých iontů v DMSO vykazovaly chelatační aktivitu (Obr. č. 25-27). Mezi tyto alkaloidy patří allokryptopin, korykavamin a protopin.



Obrázek č. 25: Chelatační aktivita allokryptopinu při stanovení chelatace měďnatých iontů v DMSO



Obrázek č. 26: Chelatační aktivita korykavaminu při stanovení chelatace měďnatých iontů v DMSO

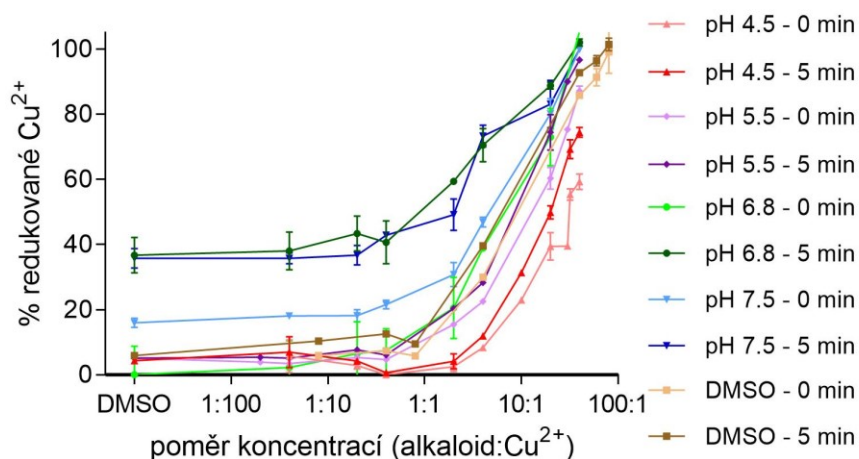


Obrázek č. 27: Chelatační aktivita protopinu při stanovení chelatace měďnatých iontů v DMSO

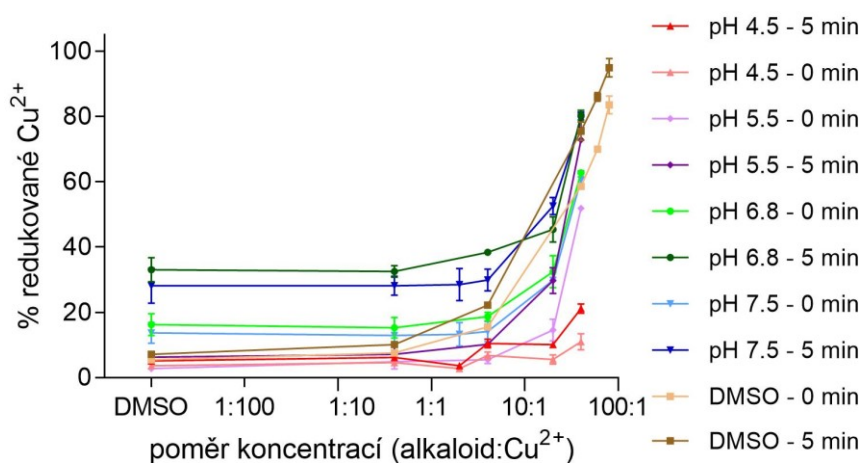
5.3 Měď-redukující účinky alkaloidů

Na obrázcích č. 28-37 jsou znázorněny měď-redukující účinky jednotlivých alkaloidů při rozdílných hodnotách pH a v prostředí DMSO vždy v časech 0 min a 5 min.

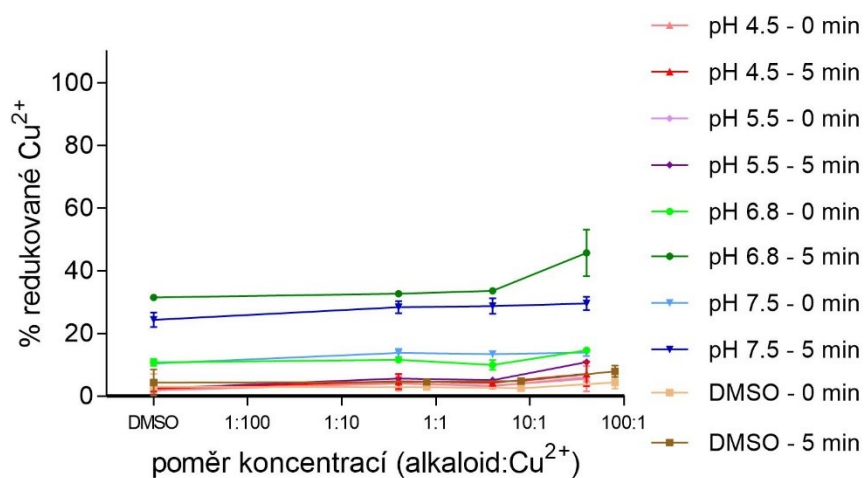
5.3.1 Alkaloidy protoberberinového typu



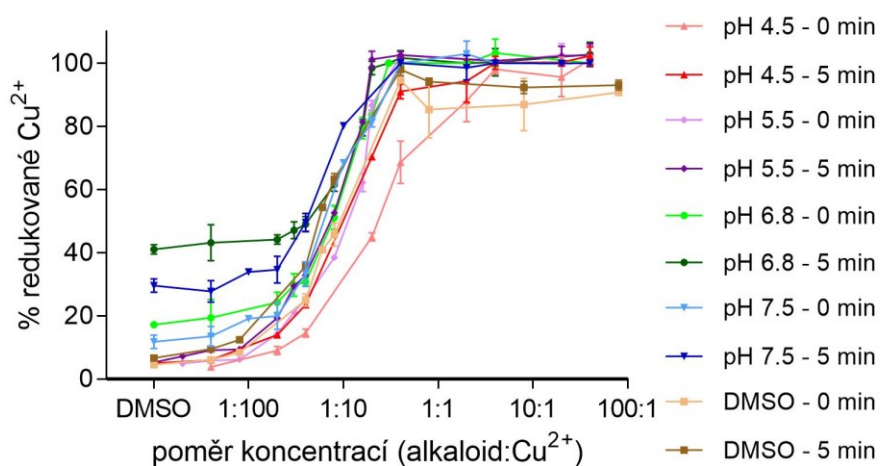
Obrázek č. 28: Měď-redukující účinky berberin-chloridu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



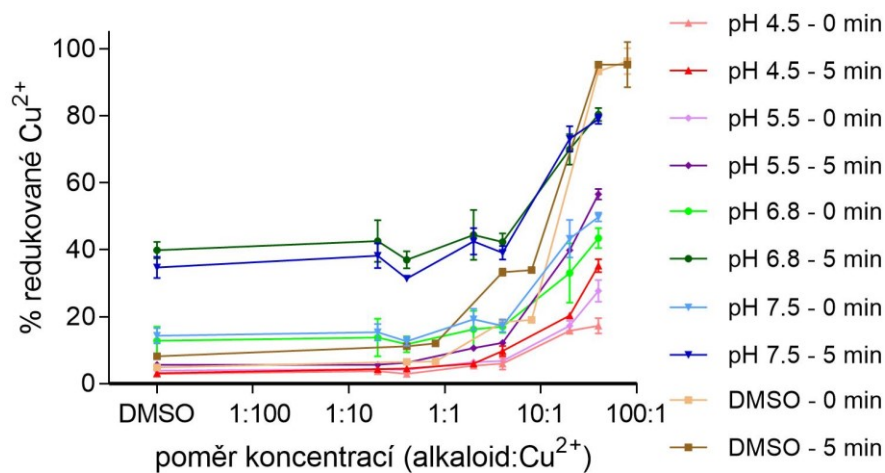
Obrázek č. 29: Měď-redukující účinky kanadinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



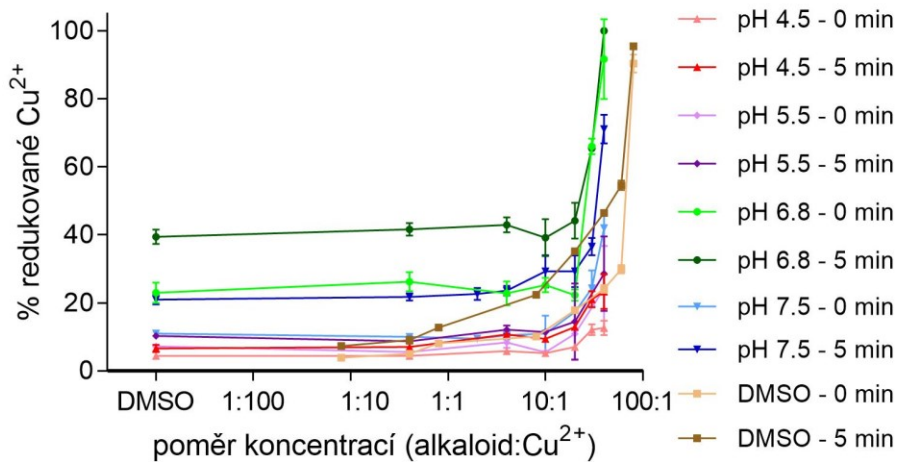
Obrázek č. 30: Měď-redukující účinky korydalinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



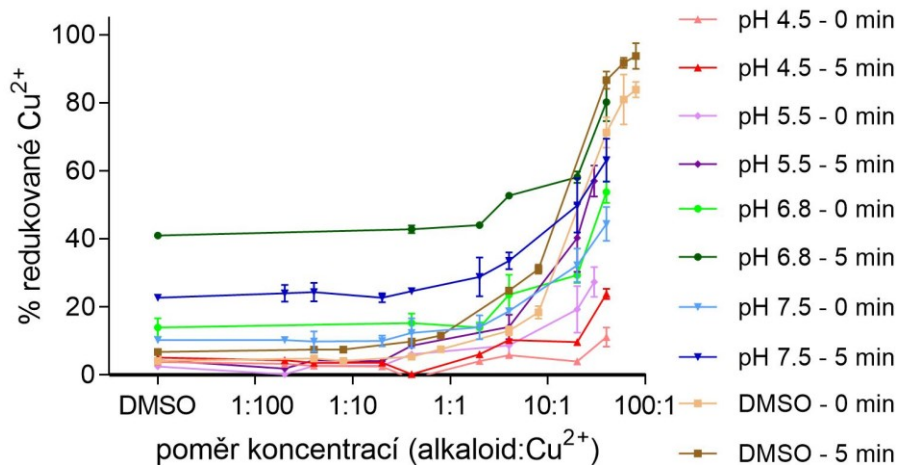
Obrázek č. 31: Měď-redukující účinky skulerinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



Obrázek č. 32: Měď-redukující účinky sinaktinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



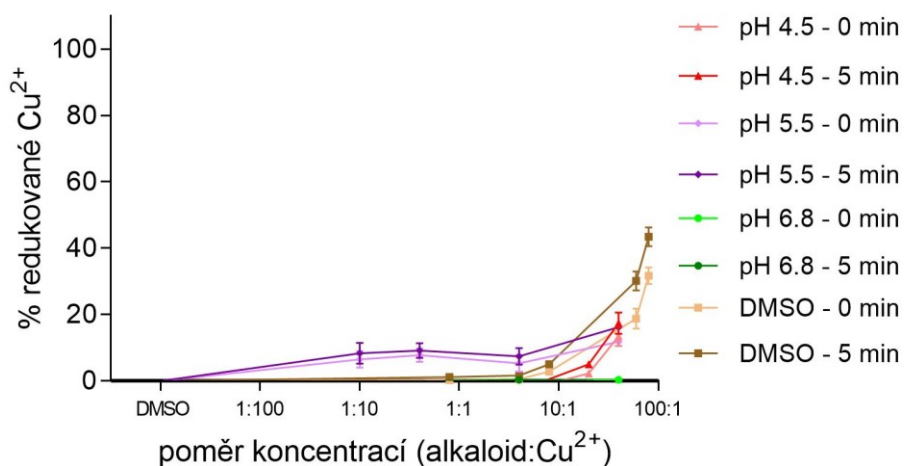
Obrázek č. 33: Měď-redukující účinky stylopininu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



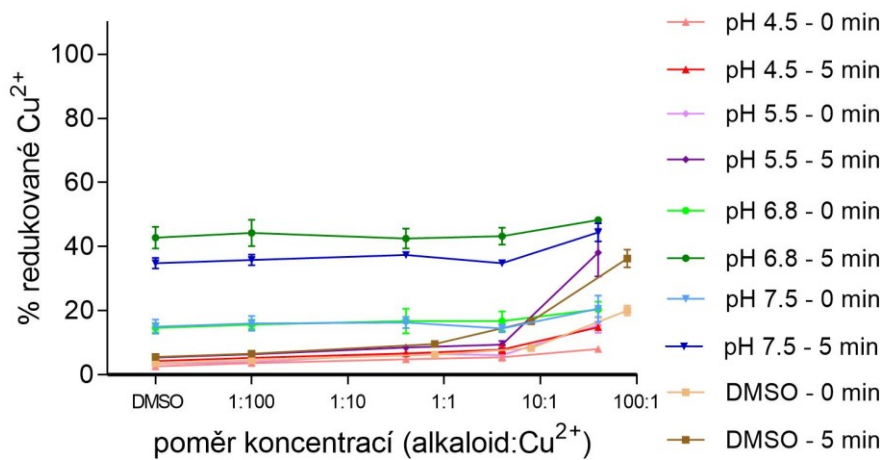
Obrázek č. 34: Měď-redukující účinky tetrahydropalmatinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

5.3.2 Alkaloidy protopinového typu

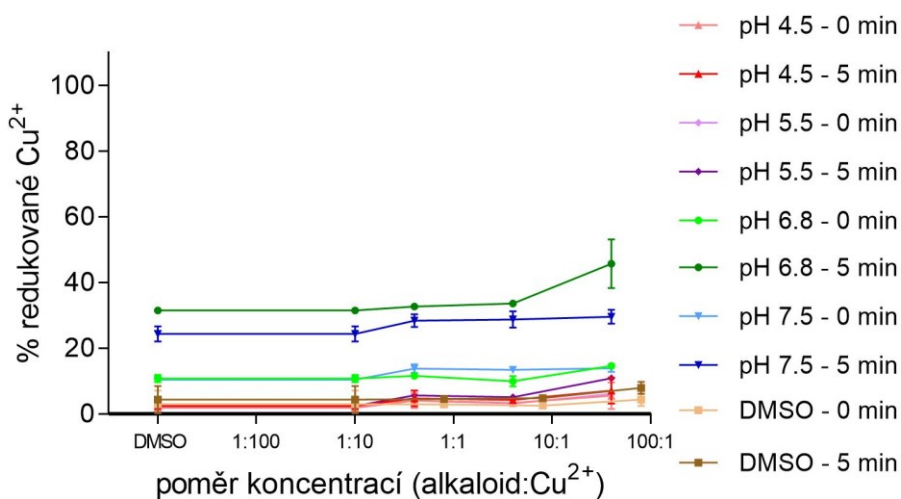
U protopinových alkaloidů je redukce velmi nízká. Allokryptopin nevykazuje žádnou redukční aktivitu (redukce menší než 5 % za všech podmínek i při nejvyšším koncentračním poměru), proto zde jeho graf není uveden.



Obrázek č. 35: Měď-redukující účinky protopinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



Obrázek č. 36: Měď-redukující účinky koryavaminu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



Obrázek č. 37: Měď-redukující účinky kryptopinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

6 Diskuze

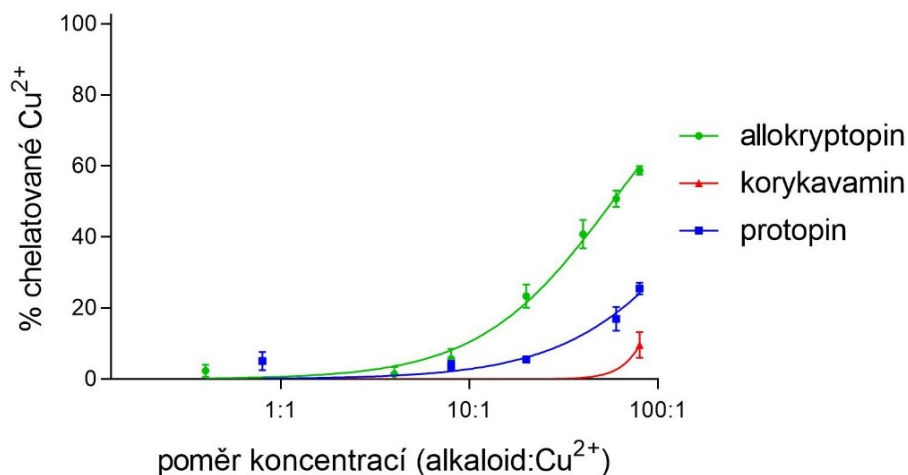
Isochinolinové alkaloidy jsou jednou z nejpočetnějších skupin alkaloidů zastoupených v rostlinné říši a mnoho z nich je biologicky aktivních. Mezi nejznámější látky, využívané v terapii, patří morfin, kodein a galanthamin.^{90,91} Na katedře farmaceutické botaniky (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova) probíhají již řadu let izolační práce zaměřené zejména na isochinolinové alkaloidy, které by mohly být využity v terapii různých onemocnění. Zvýšené hladiny iontů přechodných kovů, zejména železa a mědi, jsou popisovány u řady onemocnění jako je AD a PD, diabetes mellitus, nádorové onemocnění, ateroskleróza.⁴⁰ Stanovení chelatačních a redukčních účinků tak přispívá k poznání dalších vlastností látek, které by mohly být prospěšné při léčbě některých z těchto onemocnění.

Ze široké škály izolovaných alkaloidů byly vybrány takové, které byly dostupné v dostatečném množství. Bylo vybráno 7 protoberberinových alkaloidů a 4 alkaloidy protopinového typu. Všechny alkaloidy byly testovány kompetitivními metodami na měď-chelatační aktivitu pomocí dvou různých detekčních činidel. Pro stanovení chelatace měďnatých iontů byl jako první využit HEM, který tvoří s mědí méně stabilní komplexy, než je tomu u BCS, jejíž komplexy s měďnými ionty jsou stabilnější a je tedy silně kompetitivní. Indikátor BCS byl také použit ke stanovení redukujících vlastností látek.

6.1 Chelatační aktivita

HEM tvoří s měďnatými ionty modrý komplex, který je stanovován spektrofotometricky. Metoda je standardizována pro měření chelatačních účinků látek v prostředí pufrů o pH 5.5, 6.8 a 7.5.⁹² Za těchto podmínek byly otestovány všechny alkaloidy. Žádný z alkaloidů však nevykázal chelatační aktivitu. Vzhledem k tomu, že se jedná o slabě kompetitivní indikátor, nelze očekávat, že by látky vykazaly měřitelnou chelatační aktivitu při použití BCS

jako indikátoru. Z předchozích měření železo-chelatačních účinků alkaloidů však vyplývá, že i alkaloidy, které nevykazují žádnou chelatační aktivitu v prostředí pufrů, mohou mít chelatační schopnosti v prostředí DMSO.⁹³ Protože hematoxylinová metoda není využitelná v těchto podmínkách, byly všechny alkaloidy změřeny také pomocí BCS. BCS je indikátor, který tvoří komplexy s měďnými ionty, a proto může být využit pro stanovení Cu^+ chelatační aktivity a pro redukci Cu^{2+} iontů HA i pro stanovení chelatačních účinků vůči iontům měďnatým. Žádný z protoberberinových alkaloidů nevykázal Cu^+ a Cu^{2+} chelatační účinky. Slabou chelatační aktivitu vůči měďnatým iontům v prostředí DMSO vykazaly pouze některé protopinové alkaloidy (allokryptopin, korykavamin a protopin). Kryptopin byl zcela neaktivní. Nejvyšší schopnost chelatovat Cu^{2+} v prostředí DMSO byla prokázána u allokryptopinu. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými alkaloidy jsou pouze při velmi vysokém koncentračním poměru (alkaloid : Cu^{2+}), jak je vidět na obrázku č. 38. Při nižších poměrech pak nejsou mezi látkami významné rozdíly. Stejně jako protoberberinové alkaloidy ani žádný protopinový alkaloid nechelatoval měďné ionty. Vzhledem k tomu, že nebyly v literatuře nalezeny žádné údaje o chelatační aktivitě těchto alkaloidů, nelze s nimi naše výsledky porovnat. V porovnání s chelatační aktivitou trientinu⁹², chelátoru mědi využívaného při WD, jsou účinky námi testovaných látek nevýznamné.



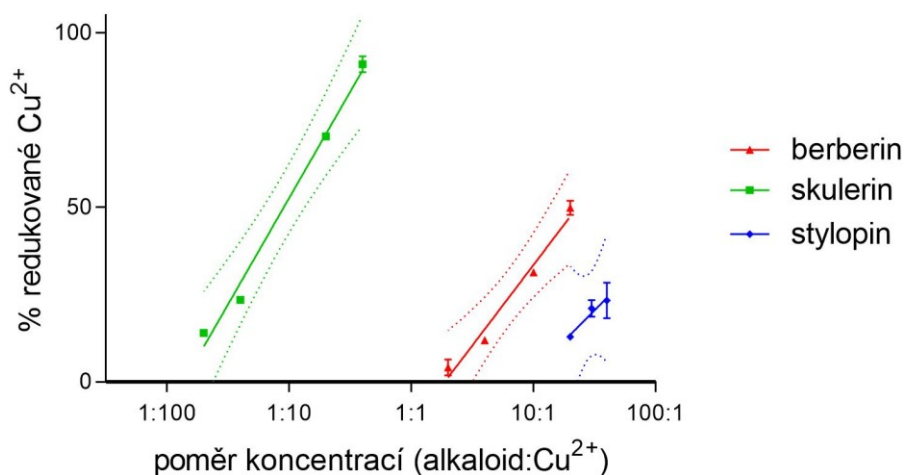
Obrázek č. 38: Porovnání měď-chelatační aktivity protopinových alkaloidů v prostředí DMSO

6.2 Redukce měďnatých iontů

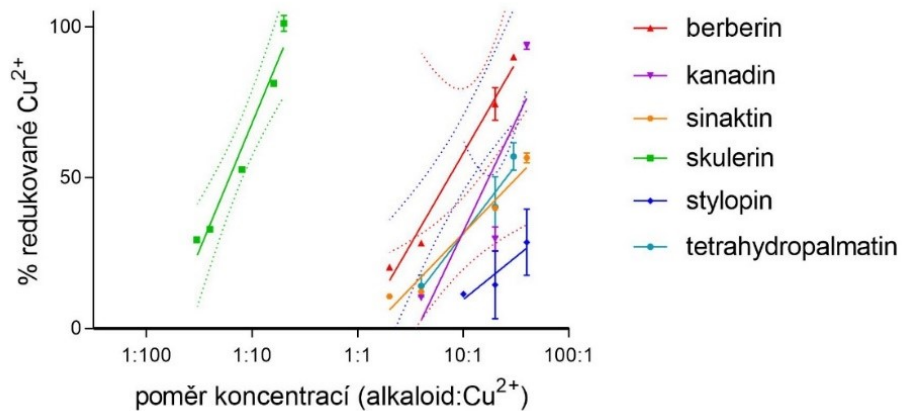
Redukcí mědi může docházet ke zvýšené tvorbě hydroxylového radikálu, což může být pro lidské tělo velice nebezpečné⁵⁶ (Rce č. 1). Dalším cílem této práce proto bylo zjistit, jaké alkaloidy jsou schopny redukovat Cu^{2+} a tím tedy napomáhat k produkci volných radikálů. Redukční aktivita vybraných alkaloidů byla měřena *in vitro* při rozdílných hodnotách pH a rozdílných koncentracích. Z naměřených hodnot redukčních aktivit alkaloidů byly sestaveny grafy. Na obrázcích č. 28-37 jsou vidět měď-redukující účinky protoberberinových a některých protopinových alkaloidů při odlišných pH a v prostředí DMSO. V grafech jsou znázorněny alkaloidy, které vykazovaly alespoň minimální redukční aktivitu. Z grafů je zřetelné, že je redukce mědi závislá na čase (0 min vs. 5 min). Pro porovnání aktivity jednotlivých protoberberinových alkaloidů byly sestaveny přímky lineární regrese s 95% konfidenčními intervaly (Obr. č. 39-43). V těchto grafech jsou u jednotlivých pH a v prostředí DMSO

vyobrazeny pouze alkaloidy, u kterých bylo za daných podmínek přímku lineární regrese možné sestavit. Při pH 4.5 vykázaly měřitelnou aktivitu pouze berberin-chlorid, skulerin a stylopin (Obr. č. 39). Porovnáme-li aktivitu těchto tří alkaloidů, je zřejmé, že je zde velký vliv počtu hydroxylových skupin ve struktuře. Jediný skulerin má ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny a jeho aktivita je výrazně vyšší než u ostatních protoberberinových alkaloidů. V souboru testovaných látek není bohužel žádná další látka s obsahem hydroxylových skupin, takže není možné porovnat aktivitu látek se dvěma a jednou hydroxylovou skupinou ani vliv jejich polohy.

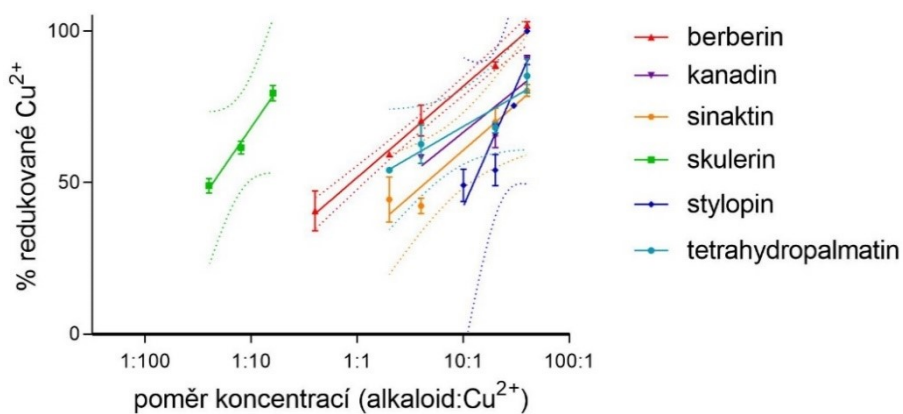
Při vyšších pH a v prostředí DMSO vykázaly měřitelnou redukční aktivitu všechny protoberberinové alkaloidy kromě korydalinu (Obr. č. 40-43). I za těchto podmínek je vidět velký vliv hydroxylových skupin, kde nejvýraznější redukční aktivitu vykázal opět skulerin se dvěma hydroxylovými skupinami.



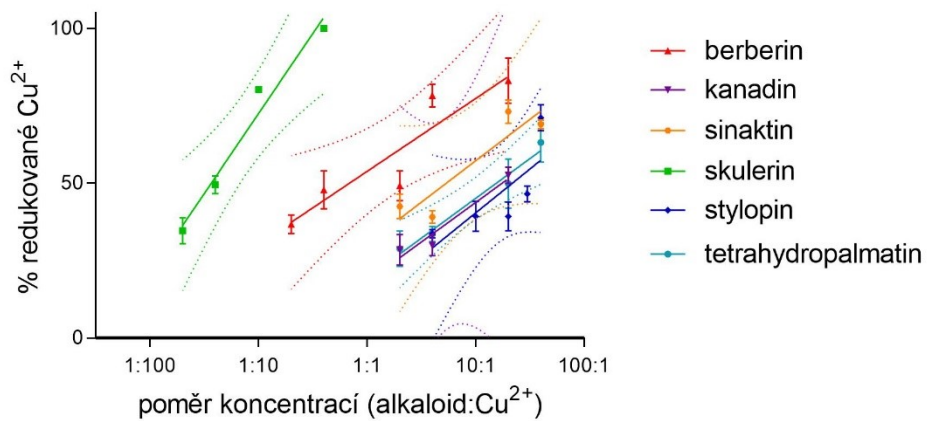
Obrázek č. 39: Porovnání měď-redukujících účinků protoberberinových alkaloidů při pH 4.5



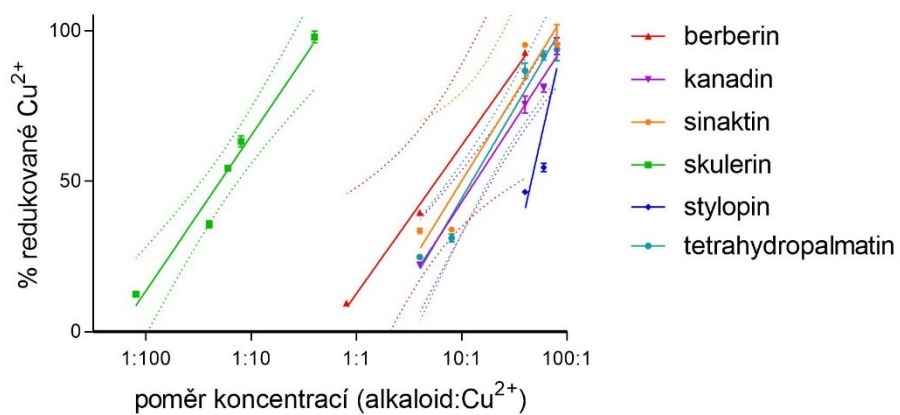
Obrázek č. 40: Porovnání měď-redukujících účinků protoberberinových alkaloidů při pH 5.5



Obrázek č. 41: Porovnání měď-redukujících účinků protoberberinových alkaloidů při pH 6.8



Obrázek č. 42: Porovnání měď-redukujících účinků protoberberinových alkaloidů při pH 7.5



Obrázek č. 43: Porovnání měď-redukujících účinků protoberberinových alkaloidů v prostředí DMSO

U všech námi měřených protopinových alkaloidů je redukce velmi nízká (Obr. č. 35-37), nelze tedy sestavit přímky lineární regrese, které by mohly být porovnány. Mezi korykavaminem, kryptopinem a protopinem nejsou statisticky významné rozdíly. Allokryptopin redukční aktivitu nevykazuje. Vzhledem k velmi nízké aktivitě ostatních protopinových alkaloidů, není statisticky významný rozdíl ani mezi allokryptopinem a dalšími látkami. Obecně byla u protoberberinových alkaloidů prokázána mnohem větší redukční aktivita oproti protopinovým alkaloidům. Stejně jako u chelatace měďných a měďnatých iontů ani redukční aktivita námi testovaných alkaloidů nebyla doposud měřena, a tak ji nelze porovnat s našimi výsledky. Jediným námi testovaným alkaloidem, který vykazoval významnou redukční aktivitu za všech podmínek, byl protoberberinový alkaloid skulerin, který má ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny. U tohoto alkaloidu bylo v minulosti prokázáno potlačení růstu nádorových buněk.⁷² U některých látek např. genisteinu, je redukce měďnatých iontů s následnou zvýšenou tvorbou volných radikálů uváděna jako jeden z mechanismů účinku látek proti nádorovým buňkám.⁹⁴ Skulerin ovlivňuje strukturu mikrotubulů, inhibuje proliferaci a zpomaluje buněčný cyklus nádorových buněk. Jeho redukční schopnosti tak mohou přispívat k jeho cytotoxickým účinkům.⁷²

7 Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo změřit měď-chelatační a měď-redukční aktivitu vybraných protoberberinových (berberin-chlorid, kanadin, korydalin, skulerin, sinaktin, stylopin, tetrahydropalmatin) a protopinových (allokryptopin, protopin, korykavamin, kryptopin) alkaloidů a porovnat tuto aktivitu s jejich strukturou. Chelatační aktivitu vykazovaly pouze protopinové alkaloidy allokryptopin, korykavamin a protopin. Nejvyšší schopnost chelatovat Cu^{2+} v prostředí DMSO byla prokázána u allokryptopinu. Redukční aktivita byla prokázána u obou strukturních typů alkaloidů. Nejnižší měď-redukující účinky byly změřeny u protopinových alkaloidů a u korydalinu. Schopností redukovat Cu^{2+} se nejvíce vyznačuje skulerin, který se svými účinky výrazně liší od ostatních alkaloidů. Vysoká redukční aktivita skulerinu pravděpodobně souvisí s výskytem hydroxylových skupin v jeho molekule.

8 Literatura

1. Barceloux D. G.: Copper. Clin. Toxicol., 37(2), 217–230 (1999)
2. Linder M. C.: *Biochemistry of Copper*, Plenum, New York, 1991
3. S. Chaiyo et al.: Highly sensitive determination of trace copper in food by adsorptive stripping voltammetry in the presence of 1,10-phenanthroline. Tal. 108, 1–6 (2013)
4. Hordyjewska A., Popiolek L., Kocot J.: The many „faces“ of copper in medicine and treatment. Biomet. 27, 611-621 (2014)
5. Johnson P. E. et al: Effect of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. Am. J. Clin. Nutr. 56, 917-925 (1992)
6. Linder M. C., Hazegh-Azam M.: Copper biochemistry and molecular biology. Am. J. Clin. Nutr. 63, 797–811 (1996)
7. Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.: *Biochemie pro studující medicíny II. díl*, Karolinum, Praha, 2009
8. Cai X., Zhang B., Liang Y., Zhang J., Yan Y., Chen X., Wu Z., Liu H., Wen S., Tan S., Wu T.: Study on the antibacterial mechanism of copper ion- and neodymium ion-modified α -zirconium phosphate with better antibacterial activity and lower cytotoxicity. Colloid. Surf. B., 132, 281–289 (2015)
9. Ren G., Hu D., Cheng E. W., Vargas-Reus M. A., Reip P., Allaker R. P.: Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. Int. J. Antimicrob. Ag., 33, 587–590 (2009)
10. Sagripanti J.-L., Routson L. B., Lytle C. D.: Virus Inactivation by Copper or Iron Ions Alone and in the Presence of Peroxide. Appl. Environ. Microbiol., 59, 4374–4376 (1993)
11. O’Gorman J., Humphreys H.: Application of copper to prevent and control infection. Where are we now? J. Hosp. Infect., 81, 217–223 (2012)

12. Sivin I.: Utility and drawbacks of continuous use of a copper T IUD for 20 years. *Contracept.*, 75, S70–S75 (2007)
13. Angelova M., Asenova S., Nedkova V., Koleva-Kolarova R.: Copper in the human organism. *Trak. J. Sci.*, 9, 88–98 (2011)
14. Wang K., Chen X., Cui Y., Gao X.: The reference interval of zinc, copper, selenium and zinc/copper ratio of healthy adult in Licang. *Trace Elem. Electroly.*, 28, 1–10 (2011)
15. National Research Council.: *Recommended dietary allowances*, National Academies Press, Washington DC, 1989
16. Arredondo M., Núñez M. T.: Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects. Med.* 26, 313-327 (2005)
17. Uauy R., Olivares M., Gonzalez M.: Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 952–959 (1998)
18. Morrell et al.: The role of insufficient copper in lipid synthesis and fatty-liver disease. *IUBMB L.* 69, 263-270, (2017)
19. Linder M. C., Wooten L., Cerveza P., Cotton S., Shulze R., Lomeli N.: Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 965–971, 1998
20. Terada K., Kawarada Y., Miura N., Yasiu O., Koyama K. and Sugiyama T.: Copper incorporation into ceruloplasmin in rat livers. *Biochim. Biophys. Act.*, 58-62 (1995)
21. Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D.: Trace elements in human physiology and pathology. *Copper. Biomed. Pharmacother.* 57, 386–398 (2003)
22. Harris Z. L., Durley A. P., Man T. K. and Gitlin J. D.: Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(19), 10812–10817 (1999)
23. Saenko E. L., Yaropolov A. I., Harris E. D.: Biological functions of ceruloplasmin expressed through copper-binding sites and a cellular receptor. *J. Tr. Elem. Exp. Med.*, 7, 69–88 (1994)

24. Bost M., Houdart S., Oberli M., Kalonji E., Huneau J. F., Margaritis I.: Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J. Tr. Elem. Med. Bio.*, 35, 107–115 (2016)
25. Robinett, N. G., Peterson, R. L., and Culotta, V. C.: Eukaryotic Cu-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. *J. Biol. Chem.* 293 (2018)
26. Ferns G. A. A., Lamb D. J., Taylor A.: The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. *Atherosclerosis* 133, 139–152 (1997)
27. Franco M. C., Dennys C. N., Rossi F. H., Estevez A. G.: Superoxide Dismutase and Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis*, IntechOpen (2013)
28. Jepma M., Deinum J., Asplund Ch. L., Rombouts S. A., Tamsma J. T., Tjeerdema N., Spape M. M., Garland E. M., Robertson D., Lenders J. W. M., Nieuwenhuis S.: Neurocognitive Function in Dopamine- β -Hydroxylase Deficiency. *Neuropsychopharmacol.* 36, 1608–1619 (2011)
29. Sandstead H. H.: Copper bioavailability and requirements. *Am. J. Clin. Nutr.* 35, 809-814 (1982)
30. Gaetke L. M., Chow-Johnson H. S., Chow C. K.: Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch. Toxicol.* 88 (11), 1929–1938. (2014)
31. Stern B. R., Solioz M., Krewski D., Aggett P., Aw T. Ch., Baker S., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C., Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., Star T. Copper and Human Health: Biochemistry, Genetics, and Strategies for Modeling Dose-response Relationships. *J. Toxicol. Environ. H. P. B. Crit. Rev.* 10, 157–222 (2007)
32. Collins J. F., Prohaska J. R., Knutson M. D.: Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr. Rev.* 68 (3),113-147 (2010)
33. Wijmenga C., Klomp L. W. J.: Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proceed. Nutr. Soc.* 63, 31-39 (2004)

34. Lutsenko S., Bhattacharjee A., Hubbard A.L.: Copper handling machinery of the brain. *Metallom.* 2(9), 596-608 (2010)
35. Gross J. B., Jr., Myers B. M., Kost L. J., Kuntz S. M., LaRusso N. F.: Biliary copper excretion by hepatocyte lysosomes in the rat: Major excretory pathway in experimental copper overload. *J. Clin. Invest.* 83, 30–39 (1989)
36. Pal A., Kumar A., Prasad R.: Predictive association of copper metabolism proteins with Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a preliminary perspective. *Biomet.* 27, 25–31 (2004)
37. Squitti R., Siotto M., Polimanti R.: Low-copper diet as preventive strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Agi.* 35, S40-S50 (2014)
38. Jiráček R., Laňková J.: *Demence.* CDP-PL, Praha 2007
39. Salazar J., Mena N., Nunez M. T.: Iron dyshomeostasis in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.*, (71), 205–213 (2006)
40. Koudelková M.: Praktické zkušenosti s laboratorní diagnostikou Alzheimerovy nemoci pomocí tau proteinu, fosfo-tau proteinu a beta amyloidu v likvoru. *Neurol. Prax.*, 10, 290–293 (2009)
41. Cooper G.J.: Therapeutic potential of copper chelation with triethylenetetramine in managing diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Dr.* 71, 1281–1320 (2011)
42. Doyle A., Rusli F., Bhathal P.: Aceruloplasminaemia: a rare but important cause of iron overload. *BMJ Cas. Rep.* (2015)
43. Sánchez-López C., Rossetti G., Quintanar L., Carloni P.: Structural Determinants of the Prion Protein N-Terminus and Its Adducts with Copper Ions. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 18 (2018)
44. Malová Z.: *Bakalářská práce.* Univerzita Karlova, Praha, 2018
45. Sigurdsson E. M., Brown D. R., Alim M. A., Scholtzova A., Carp R., Meeker H. C. et al.: Copper chelation delays the onset of prion disease. *J. Biol. Chem.* 278, 46199-46202 (2003)

46. Sedláčková E., Cardová A., Adam V., Kizek R.: Prionové proteiny a jejich interakce s těžkými kovy. *J. Metallom. Nanot.* 1, 23-26, (2014)
47. Nasulewicz A., Mazur A., Opolski A.: Role of copper in tumor angiogenesis-clinical implications. *J. Tr. Elem. Med. Biol.* 18, 1–8 (2004)
48. Wachsmann, J., Peng, F.: Molecular imaging and therapy targeting copper metabolism in hepatocellular carcinoma. *W. J. gastroenterol.* 22, 221–231 (2016)
49. Mufti A. R., Burstein E., Csomos R. A., Graf PC, Wilkinson J. C., Dick R. D., Challa M., Son J. K., Bratton S. B., Su G. L., Brewer G. J., Jakob U., Duckett C. S.: XIAP Is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders. *Mol. Cell.* 21, 775–785 (2006)
50. Gupta A., Bhattacharjee A., Dmitriev O. Y., Nokhrin S., Braiterman L. et al.: Cellular copper levels determine the phenotype of the Arg875 variant of ATP7B/Wilson disease protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5390–5395 (2011)
51. Larin D., Mekios C., Das K., Ross B., Yang A. S. et al.: Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p. *J. Biol. Chem.* 274, 28497–28504 (1999)
52. Mareček Z., *Wilsonova choroba*, Galén, Praha, 1996
53. Das S. K. and Ray K.: Wilson's disease: an update. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 482–493 (2006)
54. Brewer G. J., Askari F. K.: Wilson's disease: clinical management and therapy. *J. Hepatol.* 42, S13–S21 (2005)
55. Brewer G. J.: Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's Disease. *Exp. Biol. Med.* 232, 323-35 (2007)

56. Krupanidhi S., Sreekumar A., Sanjeevi C. B.: Copper & biological health. *Ind. J. Med. Res.* 128, 448–461 (2008)
57. Banci L., Bertini I., Cantini F., Della-Malva N., Migliardi M., Rosato A.: The different intermolecular interactions of the soluble copper-binding domains of the menkes protein, ATP7A. *J. Biol. Chem.* 282, 23140-23146 (2007)
58. Yatsimirskii K. B., Chelate, polychelate and macrocyclic effects. *Theoret. Exp. Chem.* 16, 28-33 (1980)
59. Ding X., Xie H., Kang Y. J.: The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *J. Nutr. Biochem.* 22, 301–10 (2011)
60. Wadas T. J., Wong E. H., Weisman G. R., Anderson C. J.: Copper chelation chemistry and its role in copper radiopharmaceuticals. *Curr. Pharm. Des.* 13, 3–16 (2007)
61. Ahuja, A. et al.: Copper mediated neurological disorder: visions into amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer and Menkes disease. *J. Tr. Elem. Med. Biol.*, 29, 11-23 (2015)
62. Opazo C., Barria M. I., Ruiz F. H. & Inestrosa N. C.: Copper reduction by copper binding proteins and its relation to neurodegenerative diseases. *Biomet.* 16, 91-98 (2003)
63. Roberts M. F., Wink M.: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*, Plenum Press, New York, 1998.
64. Kartsev V. G.: Natural compounds in drug discovery. Biological activity and new trends in the chemistry of isoquinoline alkaloids. *Med. Chem. Res.* 13, 325-336 (2004)
65. Bentley K. W.: *The isoquinoline alkaloids: A course in organic chemistry*, Pergamon, London, 1965
66. Shamma M.: *The Isoquinoline Alkaloids*. Academic Press, New York, 1972

67. Grycová L., Dostál J., Marek R.: Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochem.* 68, 150-175 (2007)
68. Zhou H., Mineshita S.: The effect of berberine chloride on experimental colitis in rats in vivo and in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 822-829 (2000)
69. Lotfi Aski M., Rezvani M. E., Khaksari M., Hafizi Z., Pirmoradi Z., Niknazar S. et al.: Neuroprotective effect of berberine chloride on cognitive impairment and hippocampal damage in experimental model of vascular dementia. *Ir. J. Bas. Med. Sci.* 21, 53-58 (2018)
70. Abdel-Haq H., Cometa M. F., Palmery M., Leone M. G., Silvestrini B., and Saso L.: Relaxant effects of *Hydrastis canadensis* L. and its major alkaloids on guinea pig isolated trachea. *Pharmacol. Toxicol.* 87, 218–222 (2000)
71. Lee T. H., Son M., Kim S. Y.: Effects of corydaline from *Corydalis* tuber on gastric motor function in an animal model. *Biol. Pharm. B.* 33, 958–962 (2010)
72. Habartova K., Havelek R., Seifrtova M., Kralovec K., Cahlikova L., Chlebek J., Cermakova, E., Mazankova N., Marikova J., Kunes J., Novakova L., Rezacova M.: Scoulerine affects microtubule structure, inhibits proliferation, arrests cell cycle and thus culminates in the apoptotic death of cancer cells. *Sci. Rep.* 8, 4829 (2018)
73. Wangchuk P., Sastraruji T., Taweechotipatr M., Keller P. A., Pyne, S. G.: Anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-acetylcholinesterase activities of two isoquinoline alkaloids-scoulerine and cheilanthifoline. *Nat. Prod. Commun.* 11, 1801–1804 (2016)
74. Goto K., Kitasato Z.: Constitution of sinactine (1-tetrahydroepiberberine). *J. Chem. Soc.*, 1234-1237 (1930)
75. Brossi A.: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Academic Press, London, 1986

76. Kaya G. I., Sarıkaya B., Onur M. A., Somer N. U., Viladomat F., Codina C., Bastida B., Lauinger I. L., Kaiser M., Tasdemir D.: Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochem. Lett.* 4, 301-305 (2011)
77. Lee J., Shon M. Y., Jang D. S., Ha T. J., Hwang S. W., Nam S. H., Seo E. K., Park K. H., Yang M. S.: Cytotoxic Isoquinoline Alkaloids from *Chelidonium majus* var. *asiaticum*. *Agric. Chem. Biotechnol.* 48, 198-201 (2005)
78. Facchini P. J., De Luca V.: Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Pl. J.* 54: 763–784 (2008)
79. Hong Z. Y., Fan G. R., Le J., Chai Y. F., Yin X. P., Wu Y. T.: Brain Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Tetrahydropalmatine Enantiomers in Rats after Oral Administration of the Racemate. *Biopharm. Dr. Dispos.* 27, 111–117 (2006)
80. Vacek J., Walterova D., Vrublova E., Simanek V.: The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine. *Heterocycl.*, 81, 1773–1789 (2010)
81. Bae D. S., Kim Y. H., Pan C. H., Nho C. W., Samdan J., Yansan J., Lee J. K. Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *BMB Rep.* 45, 108–113, (2011)
82. Simoes-Pires C., Hostettmann K., Haouala A., Cuendet M., Falquet J., Graz B., Christen P.: Reverse pharmacology for developing an anti-malarial phytomedicine. The example of *Argemone mexicana*. *Int. J. Parasit. Dr. Dr. Resist.* 4: 338–346, (2014)
83. Salminen K. A., Meyer A., Jerabkova L., Korhonen L. E., Rahnasto M., Juvonen R. O., Imming P., and Raunio H.: Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomed.* 18, 533–538 (2011)
84. Sekula M., *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha, 2009

85. Alles G. A., Ellis C. H.: Comparative study of the pharmacology of certain cryptopine alkaloids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 104, 253-263 (1952)
86. Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigger. & Korte (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.* 6(5), 607-610 (2011)
87. Chlebek J., Novák Z., Kassemová D., Šafratová M., Kostelník J., Malý L., Ločárek M., Opletal L., Hošťálková A., Hrabínová M., Kuneš J., Novotná P., Urbanová M., Nováková L., Macáková K., Hulcová D., Solich P., Martin C.P., Jun D., Cahlíková L.: Isoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and their biological activities related to Alzheimer's disease. *Chem. Biodivers.* 13, 91-99 (2016)
88. Cahlíková L., Macáková K., Kuneš J., Kurfürst M., Opletal L., Cvačka J., Chlebek J., Blunden G. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* 5(7), 1035-1038 (2010)
89. Cahlíková L., Opletal L., Kurfürst M., Macáková K., Kulhánková A., Hošťálková A.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* 5(11), 1751-1754 (2010)
90. Southon I. W., Buckingham J.: *Dictionary of Alkaloids*. Chapman and Hall, New York, 1989.
91. Raskin I., Ribnicky D. M., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D. A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J. M., Cornwell T., Pastor I., Fridlander B.: Plants and human health in the twenty-first century. *Tren. Biotech.* 20, 522-531 (2002)
92. Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Rocha L., Bovicelli P. et al.: In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advanc.* 4 (62), 32628-32638 (2014)

93. Rudolfová T.: *Diplomová práce*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, 2013
94. Ullah M. F., Ahmad A., Zubair H., Khan H. Y., Wang Z., Sarkar F. H., Hadi S. M.: Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. *Mol. Nutr. F. Res.* 553–559 (2011)

9 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutická botanika

Školitel: Ing. Kateřina Macáková, Ph. D.

Student: Markéta Šilhová

Název diplomové práce: Interakce alkaloidů s přechodnými kovy II.

Měď je důležitou složkou lidského organismu. Podílí se na správné funkci orgánových soustav a je také součástí mnoha pro tělo významných enzymů. V těle je třeba udržovat vyvážené množství mědi, aby nedocházelo k jejímu nadbytku či nedostatku, což může vést ke vzniku různých chorob. Cílem této diplomové práce bylo zjistit měď-chelatační a měď-redukující účinky isochinolinových alkaloidů berberin-chloridu, kanadinu, korydalinu, skulerinu, sinaktinu, stylopinu, tetrahydropalmatinu, allokryptopinu, protopinu, korykavaminu a kryptopinu. Při experimentálním měření bylo provedeno stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem a stanovení chelatace a redukce iontů mědi pomocí disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Nejvyšší redukční aktivitu vykazoval skulerin, v jehož struktuře se oproti ostatním alkaloidům vyskytují hydroxylové skupiny a u kterého byl v minulosti prokázán účinek na potlačení růstu nádorových buněk. Nejnižší redukční aktivita byla změřena u protopinových alkaloidů a u korydalinu. Redukční a chelatační aktivita závisí na chemické struktuře a prostředí, ve kterém se daný experiment provádí.

Klíčová slova: měď, redukce, chelatace, isochinolinové alkaloidy, skulerin

9 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Botany

Consultant: Ing. Kateřina Macáková, Ph. D.

Student: Markéta Šilhová

Title of Thesis: Interactions of alkaloids with transition metals II.

Copper is an important component of the human body. It is involved in the right functioning of organ systems and is also a part of many important body enzymes. It is necessary to maintain a balanced amount of copper in the body in order to avoid excess or deficiency, which can lead to various diseases.

The aim of this diploma thesis was to determine the copper chelating and copper reducing effects of isoquinoline alkaloids berberine chloride, canadine, corydaline, sculerine, sinactine, stylophine, tetrahydropalmatine, allocryptopine, protopine, corycavamine and cryptopine. In experimental measurements the determination of chelation of copper ions with hemityoxiline and the determination of chelation and reduction of copper ions using disodium salt of bathocuproindisulfonic acid was performed. The highest reducing activity was exhibited by scoulerine, whose structure in comparison with other alkaloids contains hydroxyl groups and which has been exhibited in the past to inhibit the growth of tumour cell. The lowest reducing activity was measured for protopine alkaloids and corydaline. The reducing and chelating activity depends on the chemical structure and conditions in which the experiment is performed.

Key words: copper, reduction, chelation, isoquinoline alkaloids, scoulerine