

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

INTERAKCE CHALKONŮ S PŘECHODNÝMI KOVY II.

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

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

Hradec Králové, květen 2021

Martina Šulcová

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

INTERACTION OF CHALCONES WITH TRANSITION METALS II.

Supervisor: Assoc. Prof. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Head of Department: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D

Hradec Králové, May 2021

Martina Šulcová

Poděkování:

Mezi lidmi, kterým bych chtěla poděkovat, je v první řadě vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D. Děkuji jí za odborné vedení i rady při měření dat a psaní této práce, také za důvěru, trpělivost, vytvoření přátelského prostředí a za to, že si přes své vytížení vždy našla čas pohotově reagovat na mé dotazy.

Poděkování patří také celému kolektivu katedry Farmaceutické botaniky za jejich kolegiální a vstřícnost při využití laboratoře, přístrojů pro získání dat ke zhotovení diplomové práce a také kolegyni Janě za příjemnou spolupráci.

Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům za zázemí při studiu, sestře Markétě a všem svým blízkým za podporu.

Tato práce vznikla za podpory projektu OPVVV 02_16_017: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682: Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu (MOLABI), MŠMT ČR/Univerzita Karlova v Praze.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ:

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

V Hradci Králové, 2021

Martina Šulcová

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1	MĚĎ	9
3.1.1	Obecná charakteristika.....	9
3.1.2	Význam mědi pro lidský organismus.....	9
3.1.2.1	Kuproenzymy.....	10
3.1.3	Metabolismus mědi v lidském těle.....	13
3.1.4	Patologie: nadbytek mědi v lidském organismu	14
3.1.5	Patologie: deficit mědi v lidském organismu	17
3.2	CHALKONY A DIHYDROCHALKONY	20
3.2.1	Základní údaje.....	20
3.2.2	Vlastnosti chalkonů, dihydrochalkonů	21
3.2.3	Metabolismus chalkonů	21
3.2.4	Chalkony a dihydrochalkony použité v této práci	22
3.2.4.1	Isoliquiritigenin.....	22
3.2.4.2	Likochalkon A.....	23
3.2.4.3	Naringin dihydrochalkon	23
3.2.4.4	Neohesperidin dihydrochalkon	24
3.2.4.5	Floretin	24
3.2.4.6	Florizin	25
3.3	CHELATACE	26
3.3.1	Obecně	26
3.3.2	Využití v medicíně.....	27
3.4	REDUKCE.....	30
3.4.1	Obecně	30
3.4.2	Důsledky redukce na lidský organismus.....	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	POMŮCKY	32
4.1.1	Použité chemikálie.....	32
4.1.2	Přístrojové vybavení	32
4.1.3	Použitý materiál.....	32
4.1.4	Testované látky.....	33

4.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	33
4.3	STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUPY.....	34
4.3.1	Postup pro kontrolu připravených základních roztoků mědi	34
4.3.2	Postup pro stanovení kalibrační křivky měďnatých iontů	35
4.3.3	Postup pro stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem	36
4.3.4	Stanovení chelatace a redukce iontů mědi pomocí disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové	37
4.3.4.1	Postup pro stanovení chelatace měďných iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5).....	38
4.3.4.2	Postup pro stanovení chelatace měďnatých iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5) ..	39
4.3.4.3	Postup pro stanovení chelatace měďných iontů v DMSO.....	39
4.3.4.4	Postup pro stanovení chelatace měďnatých iontů v DMSO.....	40
4.3.4.5	Postup pro stanovení redukce měďnatých iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5)	41
4.3.4.6	Postup pro stanovení redukce měďnatých iontů v DMSO	42
4.3.5	Statistická analýza	44
5	VÝSLEDKY.....	45
5.1	Kalibrační křivka	45
5.2	Chelatace iontů mědi	45
5.2.1	Stanovení chelatace mědi pomocí hematoxylinu	45
5.2.2	Stanovení chelatace mědi pomocí BCS	49
5.3	Redukce iontů mědi.....	51
6	DISKUSE	56
7	ZÁVĚR	65
8	LITERATURA.....	66
9	SEZNAMY	76
9.1	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	76
9.2	SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK.....	79
9.3	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A ZNAČEK	80
	ABSTRAKT	7
	ABSTRACT	8

1 ÚVOD

Měď je pro člověka esenciálním prvkem, který se podílí na mnoha buněčných pochodech, například dýchání, syntéza katecholaminů, tvorba pojivových tkání, důležitých pro správnou funkci a vývoj lidského těla. Schopnost odevzdávat a přijímat elektron a měnit tak oxidační stav molekuly je důležitá pro funkci metaloenzymů. Jimi jsou mimo jiné antioxidant superoxiddismutasa, transportní enzym ceruloplasmin a tyrosinasa tvořící barvivo melanin. Člověk se s mědí v okolním prostředí může setkat ve vodě, při výrobě nástrojů a elektroniky či v půdě, kde často zůstává jako reziduum pesticidů a jiných odpadů vyprodukovaných člověkem. Stravou přijímáme měď v miligramových množstvích např. díky ořechům, obilninám, játrům, měkkýšům nebo luštěninám. Pravidelný příjem mědi je pro organismus důležitý a vychýlení hladin tohoto prvku v tělních tkáních je spojené s řadou onemocnění.[1, 2] Nadbytek tohoto prvku má vliv na ukládání a metabolismus lipidů, může vést i k poškození DNA tvorbou komplexů s měďnatými ionty. Některé látky jsou schopné redukovat měďnaté ionty na měďné, které reagují s molekulárním kyslíkem a tvoří škodlivé kyslíkové radikály. Podíl redukovaných iontů se snižuje pokud struktura vykazuje chelatační aktivitu, která omezuje přísun iontů mědi.[3] Chelátory díky své struktuře selektivně váží nežádoucí volné ionty a tvoří s nimi stabilní komplexy, které se jednoduše vyloučí z organismu. S léčebným použitím chelátorů mědi se můžeme setkat zejména u Wilsonovy choroby, která dříve představovala smrtelné onemocnění. Využití nachází i v dalších onemocněních spojených s nerovnováhou hladin mědi.[4]

Chalkony a dihydrochalkony patří mezi prekurzory v biosyntéze flavonoidů v rostlinách. Mají dvě aromatická jádra spojená pomocí tříuhlíkatého můstku, který je u dihydrochalkonů saturovaný a u chalkonů není.[5] S těmito látkami se můžeme setkat v běžné stravě obsahující části rostlin, ovoce a zeleninu, např. jablka jsou významným zdrojem floretinu či florizinu.[6, 7] Látky, jako je neohesperidin dihydrochalkon a naringin dihydrochalkon, jsou známé jako sladidla.[8] Chalkony mají mnoho užitečných vlastností. Mezi ně patří protizánětlivé působení, protirakovinné, antiparazitické, antimikrobiální, antidiabetické účinky a mnoho jiných.[9]

V této diplomové práci byla studována schopnost některých chalkonů a dihydrochalkonů chelatovat a redukovat měď v prostředích o rozdílných pH, která simulují různé fyziologické a patofyziologické pochody v těle. Tyto látky mohou být potenciálně využity v budoucí léčbě některých onemocnění.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je změřit, zda vybrané látky ze skupin dihydrochalkonů (naringin dihydrochalkon, neohesperidin dihydrochalkon, floretin, florizin) a chalkonů (isoliquiritigenin, likochalkon A) jsou schopné chelatovat či redukovat měď (Cu^{+1} , Cu^{+2}) při pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5, simulujících různé fyziologické i patofyziologické podmínky v prostředí lidského těla a určit vztahy struktur měřených látek s jejich měď-chelatační a měď-redukční aktivitou.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 MĚĎ

3.1.1 Obecná charakteristika

Měď, charakteristická načervenalou barvou, se pro svou tepelnou a elektrickou vodivost využívá především v elektrotechnice. Je lehce mechanicky zpracovatelná a nekoroduje.[10] Čistá měď je pro většinu zpracování obvykle příliš měkká, proto se často využívá ve slitině s jiným kovem. Nejznámější je bronz (historicky první slitina) a mosaz. Bronz je směs s 25% podílem cínu. Využívá se k výrobě nástrojů, zbraní nebo nádob. Mosaz je oproti tomu slitina mědi s 5-45 % zinku, v minulosti hojně využívaná na výrobu římských mincí, konvic a jiných dekorací.[11] V řádu milionů tun se každoročně používá k ochraně plodin v zemědělství jako součást fungicidů, bakteriocidů a herbicidů.[12]

V biologických systémech může být přítomná ve valenčních stavech Cu^{+1} a Cu^{2+} , přičemž převažuje oxidovaný stav Cu^{2+} . [10, 13] Měďnaté ionty mají uvnitř svých 3d orbitalů jeden nepárový elektron. Oproti tomu ionty měďné mají orbitály zaplněny úplně ($10 e^-$). [14] Hlavní využití tohoto prvku představují oxidačně-redukční reakce. [15] Standardní redukční potenciál páru $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+1}$ je 0,153 V. Schopnost přijmout dva odlišné redoxní stavy činí měď velmi důležitým prvkem. Je nedílnou součástí metaloenzymů, redoxních reakcí v biologických procesech atd. Redoxní vlastnosti mědi jsou velmi důležité v procesech zprostředkovávajících přenos elektronu mezi biologickými molekulami včetně buněčné signalizace. [14] Jednomocné Cu^+ ionty bývají špatně až plně nerozpustné ve vodě. Oproti tomu dvojmocné Cu^{2+} ionty jsou ve vodě veskrze dobře rozpustné. [10]

3.1.2 Význam mědi pro lidský organismus

Měď patří mezi takzvané esenciální, tedy tělem nevytvořitelné, prvky. V lidském organismu čítá přibližně 100 mg. [16] Ačkoliv je tento esenciální kov běžně v buňce přítomný ve stopovém množství, jeho hladiny se mohou měnit podle prostředí, stravy či období života. Většina mědi v těle se nachází v orgánech s vysokou metabolickou aktivitou. Mezi ně patří játra, srdce, ledviny a mozek. Asi 5 % celkové mědi se nachází v séru, kde je z 95 % vázána na ceruloplasmin. Nevázaná měď se chová jako potenciální oxidant, katalyzující vznik vysoce reaktivních hydroxylových radikálů, které mohou být pro buňku toxické. Při extrémně vysokých koncentracích může způsobit spoustu nežádoucích účinků vedoucích až k buněčné smrti. Příčiny nedostatku mědi jsou oproti toxicitě různorodější. Může vzniknout následkem snížených zásob mědi při narození, neadekvátního příjmu, špatné absorpce, zvýšených požadavků vyvolaných aktivním růstem nebo zvýšenými ztrátami mědi. Aby se zabránilo nedostatku nebo toxicitě tohoto kovu, je většina organismů vybavena několika molekulárními a

buněčnými mechanismy. Mezi tři hlavní patří snížení absorpce, zvýšené vylučování a sekvestrace neboli vyvázání kovu.[4, 17]

Jako přechodný kov je měď kofaktorem mnoha redoxních enzymů (kapitola 3.1.2.1). Ty katalyzují velké množství enzymatických procesů jako je buněčné dýchání, biosyntéza neurotransmiterů i peptidických hormonů, ochrana proti volným radikálům nebo zesíťování elastinu, kolagenu a keratinu. Dále hraje důležitou roli v metabolismu železa, čímž nepřímo ovlivňuje hematopoézu a účastní se i v procesu krevní koagulace a angiogeneze.[16, 18]

Bohatým zdrojem mědi jsou některé potraviny (Tabulka 1). Podle institutu Food and Nutrition Board je dospělému člověku doporučeno denně přijmout 1,5-3 mg mědi prostřednictvím stravy. Mezi nejbohatší zdroje mědi patří vnitřnosti (zejména játra), následovány mořskými plody, ořechy a semeny. Ve vodě je obsah mědi vysoce proměnlivý. Je z velké části ovlivněn reakcí pH vody a potrubního systému. V některých případech mohou za zvýšení hladin mědi ve vodě např. i fungicidy obsahující měď užívané v zemědělství.[19]

Tabulka 1: Průměrný obsah mědi v potravinách, půdě, vodách a organismech. Převzato[20]

Potravina	Obsah Cu (µg/g)
Svalové maso	0,9-1,0
Mořské ryby	2-3
Sladkovodní ryby	0,3-3
Měkkýši	12-37
Drůbež	0,5-3
Játra	4,6-6,2
Ořechy	6-37
Bílá mouka	0,6
Luštěniny	3-7
Zelenina	0,3-3
Ovoce	0,4-1,5
Brambory	2,1

3.1.2.1 Kuproenzymy

Měď je esenciální pro aktivitu několika enzymů. Má roli kofaktoru, ale i alosterického modulátoru důležitého pro jejich funkci. Slouží jako elektronový přenašeč a uskutečňuje tak redoxní reakce. V tabulce (Tabulka 2) jsou uvedeni významní zástupci kuproenzymů.[21]

Tabulka 2: Role enzymů závislých na příjmu mědi. Upraveno[21]

Enzym	Funkce
Cytochrom c oxidasa	Transport elektronů do mitochondrií
Cu/Zn-superoxiddismutasa (SOD)	Detoxikace volných radikálů
Metallothionein	Skladování nadbytečného Cu a jiných bivalentních kovů (kromě Fe ²⁺), donor Cu pro různé apoproteiny.
Ceruloplasmin (extracelulární)	Ferroxidasa, umožňující tok Fe z jater do krve, zachytávač ROS, protein akutní fáze, transportér mědi
Lysyloxidasa (lysin 6-oxidasa)	Tvorba příčných vazeb kolagenu a elastinu
Tyrosinasa (katechol oxidasa)	Tvorba melaninu
Dopamin β-monooxygenasa	Produkce katecholaminů
Aminooxidasa (extracelulární)	Inaktivace histaminu, tyraminu, dopaminu, serotoninu?
Peptidylglicin monooxygenasa	Bioaktivace peptidických hormonů
Hephaestin	Ferroxidasa
Matrixový glykoprotein chrupavky (CMGP)	Ferroxidasa/aminooxidasa, homolog ceruloplasminu (chondrocyty a ciliární epitel v oku)
β-amyloidní prekurzorový protein	Normální funkce momentálně neznámá
Prionový protein (PrPC)	Vazba mědi a možná ochrana proti ROS, aktivita podobná SOD, na synapsích může vracet Cu do neuronu
S-adenosylhomocystein	Metabolická hydrolasa sirných aminokyselin
Angiogenin	Tvorba krevních cév
Srážecí faktory V a VIII	Srážení krve

ROS- reaktivní formy kyslíku

Cytochrom c oxidasa

Cytochrom c oxidasa je enzym na vnitřní mitochondriální membráně, který ve své složité stavbě obsahuje měď v oxidačních stavech +1 a +2. Tvoří komplex s cytochromy a a₃. Slouží k přenosu elektronů na kyslík dýchacího řetězce a následnému vytvoření vody jeho redukcí. Udržuje elektronový gradient pumpováním elektronů z vnitřní na vnější stranu membrány.[18, 22]

Cu/Zn superoxid dismutasa

Cu/Zn superoxid dismutasa (Cu/Zn SOD) je nejhojněji zastoupeným extracelulárním metaloenzymem. Najdeme ho hlavně v mozku, játrech a ledvinové kůře. Má za úkol odstranění reaktivní formy kyslíku (tzv. superoxidových radikálů) a jejich přeměnu na peroxid vodíku směřující k likvidaci pomocí katalázy a glutathionperoxidasy. Enzym se skládá ze dvou podjednotek. Každá obsahuje vazebné místo pro Cu

a Zn. Zatímco ionty mědi jsou vázané na imidazolových zbytcích histidinu, Zn slouží ke stabilizaci struktury proteinu.[18]

Ceruloplasmin

Transportní enzym ceruloplasmin, charakteristický svou modrou barvou, byl poprvé popsán a izolován v roce 1948. Je to sérová ferroxidasa, která váže více než 95 % mědi nalezené v plazmě. Ve své molekule obsahuje hned tři typy vazebných míst. Vazebné místo typu I se podílí na procesu přenosu elektronu. Právě při navázání mědi na síru v jeho cysteinovém ligandu vyznačuje charakteristickou modrou barvu. Vazebné místo typu II je v molekule pouze jedno a je tvořeno dusíky čtyř imidazolových jader. Vyskytuje se v těsné blízkosti III. vazebného místa (v molekule 2x), kde dohromady tvoří tříjaderný shluk, kam se může při dalších procesech navázat kyslík. Celkem tedy pojme až 6 molekul mědi.[22, 23] Místem jeho tvorby jsou jaterní buňky, kde je pomocí ATPasy ATP7B měď vložena do struktury apoceruloplasminu. Z něj se tímto krokem stane ceruloplasmin, který je z jater uvolněn do krevního řečiště. Putuje po těle, kde přenáší molekuly mědi a jako enzym se zapojuje do metabolických procesů, hlavně do metabolismu železa. Pokud se na apoceruloplasmin nepřipojí měď nebo ATPasa, dojde ve většině k jeho rozkladu. Do metabolismu železa ceruloplasmin zasahuje svou schopností oxidovat železnaté ionty (Fe^{2+}) na železité (Fe^{3+}). Také napomáhá připojení železa k transportnímu proteinu transferrinu a kontrole oxidace membránových lipidů. Při nedostatku ceruloplasminu, které může nastat např. u dědičného onemocnění zvané aceruloplasminémie (kapitola 3.1.5), je homeostáza Fe v těle narušena a dochází k jeho hromadění v tkáních.[24]

V přítomnosti superoxidu ceruloplasmin napomáhá oxidaci LDL a může vést až k tvorbě aterosklerózy. Jako protein akutní fáze se účastní zánětlivých procesů nebo při poranění buněk. Jeho hladiny mohou být přirozeně vyšší u žen užívajících perorální kontraceptiva nebo u těhotných, a to kvůli zvýšeným hladinám estrogenů i progesteronů.[24]

Lysyloxidasa

Lysyloxidasa (lysin 6-oxidasa) je měď obsahující enzym ze skupiny aminooxidas, který se podílí na zpevnění kolagenních fibril příčnými vazbami za oxidace s využitím kyslíku. Mechanismem deaminace lysinových zbytků vzniknou na molekulách dusíku dvě aldehydové skupiny, které spolu reagují za tvorby cyklické pyridiniové struktury podobné desmosinům elastinu. Díky příčným vazbám vzniká fibrila s vysokou pevností, ale malou roztažitelností. Příčné vazby zaručují pevnost např. u Achillovy šlachy. Při nedostatku mědi se může tvorba vazeb narušit. Na funkci lysyloxidasy mají vliv tzv. latyrogeny (obsažené v semenech hrachoru *Lathyrus odoratus*) blokující její činnost.[22]

Tyrosinasa

Tyrosinasa (neboli katechol oxidasa) je jednořetězcový enzym potřebný k syntéze pigmentu melaninu. Ten je důležitý při ochraně proti ultrafialovému záření a dává odstín vlasům, očím i kůži. Enzym tyrosinasa je umístěn v melanosomech kožních melanocytů. Syntéza melaninu vede přes hydroxylaci monofenolu na o-difenol, ten se dále přemění na o-quinone a dalšími reakcemi směřuje až ke konečnému melaninu. Aktivita enzymu může být snižována zástupci polyfenolů (stilbenoidy, flavonoidy), chelátory mědi a lapači volných radikálů. Mutace v genu TYR působí rozdílnou tvorbu melaninu a některé typy albinismu zvyšující citlivost na ostré světlo.[20, 25]

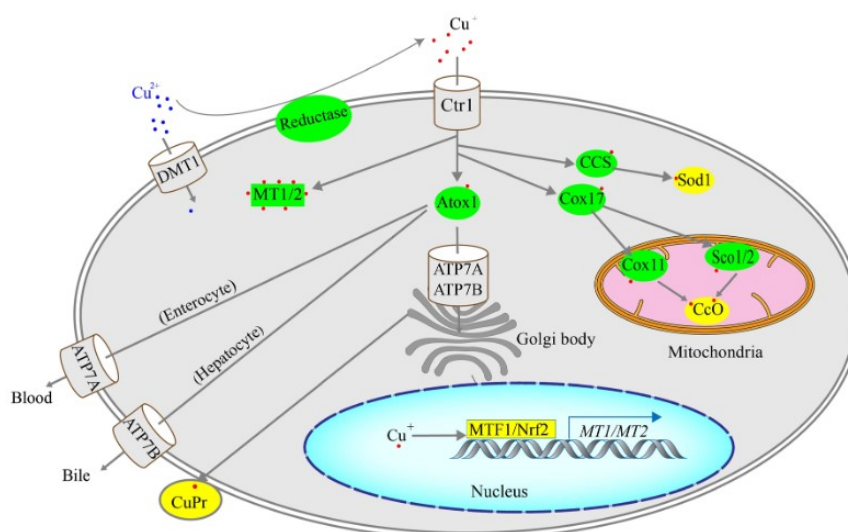
Dopamin β -monoxygenasa

Je klíčovým enzymem v procesu výroby katecholaminů v lidském těle. Ty jsou nesmírně důležité pro nervový přenos, ale vyplavují se také při stresovém podráždění nadledvinek. Enzym je uložen v granulech blízko synapsí a stejně tak i v nadledvinách. Má stavbu tetramerního homoproteinu a ve většině obsahuje 2 atomy mědi na každé podjednotce. Účastní se například hydroxylace dopaminu na norepinefrin.[20]

3.1.3 Metabolismus mědi v lidském těle

Měď obsažená v potravinách je absorbována hlavně pomocí buněk tenkého střeva, kde kompetuje se zinkem. Pokud se množství vstřebané mědi zvýší, sníží se množství vstřebaného zinku a naopak. Extracelulární Cu^{2+} ionty mohou být přímo začleněny pomocí transportéru pro dvojmocné kovy DMT1 nebo endocytózou. Nemohou však v tomto stavu být využity buňkami. Proto se pomocí různých reduktáz mění na Cu^+ a pak mohou být inkorporovány pomocí transportéru CTR1. Některé ionty mědi jsou cílené na různé kuproproteiny pomocí chaperonů (Cox_{17} , CCS, Cox_2 , Atox_1) třemi cestami: cytosolickou, mitochondriální a Golgiho cestou (Obrázek 1). Atox_1 předává měď na dva druhy ATPas přenášejících měď přes membránu: ATP7A (ATPasa přenášející měď α) vyskytující se v mnoha tkáních kromě jater, kde najdeme ATP7B (ATPasa přenášející měď β). Ty jsou umístěny buď na trans-golgiho síti (plnění mědi do kuproproteinů) nebo na plazmatické membráně (systémová distribuce) a pumpují měďnaté ionty na druhou stranu membrány. Z plazmatické membrány jsou vyloučeny do krevního řečiště. Nadbytek Cu^+ iontů je zadržen v cytosolu, vázán na glutathion, poté na metalothioneiny nebo proteiny podobné velikosti. Velká část mědi z hepatocytů míří golgiho cestou k navázání na apoceruloplasmin. Dojde ke vzniku ceruloplasminu, který je uvolněn do krevní cirkulace. Dále se měď může v séru vázat na volné aminokyseliny (hlavně histidin), albumin nebo transkuprein.

Při zvýšené hladině mědi v hepatocytech se pomocí ATP7B buď přesměruje tok z Golgiho aparátu do lumen lysosomu, odkud se může vyloučit do žluči, nebo se do žluči vyloučí rovnou. Denně je z těla vyloučen asi 1 mg Cu.[21, 26–28]



Obrázek 1: Metabolismus mědi v buňce. Přenašeče DMT1- divalentní transportér kovů 1; CCS, Cox17 a Atox1- chaperony přemísťující Cu⁺ ionty na cílová místa v buňce; CcO- cytochrom c oxidasa; MT1/2- metalothioneiny; CuPr- kuproproteiny; ATP7A/B- měď přenášejí ATPasa α/β; MTF1 a Nrf2-transkripční faktory pro tvorbu MT1/2. Převzato[28]

3.1.4 Patologie: nadbytek mědi v lidském organismu

Akutní intoxikace

Po jednorázovém nebo opakovaném požití pitné vody se zvýšenými hladinami mědi (obvykle nad 3-6 mg/l) se objevují gastrointestinální obtíže, které při změně zdroje pitné vody odezní. Nejčastěji se setkáme s nevolností, zvracením a podrážděním žaludeční sliznice. Není ale zřejmé, zda jsou symptomy způsobeny spíše akutním podrážděním sliznice nebo hořkou kovovou pachutí.[1]

Chronická expozice

Chronická toxicita mědi se v první řadě projeví na jaterní tkáni cirhózou, problémy s imunitním systémem a hemolýzou. Přímé oxidační poškození membrán spolu s poškozením ledvinových tubulů, mozku a dalších může při dlouhodobé expozici vrcholit upadnutím do kómatu, jaterní nekrózou, kolapsem oběhu a smrtí. Do rizikových skupin spadají pacienti dialyzovaní pomocí zařízení s Cu trubicemi, pracovníci v kontaktu s pesticidy obsahující měď, kojenci na dlouhodobé parenterální výživě či jedinci s chronickým onemocněním jater. Nepřímá toxicita z nadměrného příjmu mědi do organismu se projevuje interakcemi s jinými živinami. Jako příklad může sloužit anémie způsobená interferencí mědi s transportem železa. Měď v kontaktu s kůží nevyvolává systémovou toxicitu, pouze může u

vnímavějších lidí způsobit alergické reakce. Otrava mědi může v raných stádiích způsobit ochablost, letargii, anorexii, později erozi sliznice GITu, hepatocelulární nekrózu a tubulární nekrózu ledvin. Letální dávky mědi u neléčených jedinců dosahují 10-20 g.[18, 29]

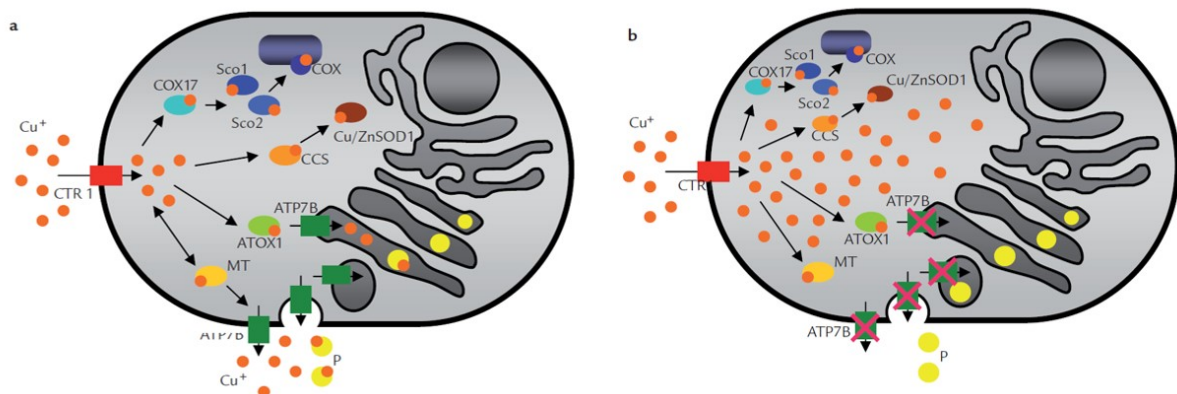
Wilsonova choroba

Wilsonova choroba (WD) je metabolické onemocnění, které má v Evropě klinickou prevalenci 1,2 až 2 na 100 000 obyvatel. Genetická prevalence je ještě vyšší a postihuje asi 1 člověka ze 7000. WD je způsobena více než 700 druhy mutací ovlivňující gen ATP7B, jenž se nachází na krátkém raménku 13. chromozomu. Tento gen kóduje měď transportní ATPasu umístěnou zejména v játrech, ale i v mozku. Protein ATP7B je důležitý při udržování hladiny mědi a v hepatocytech má tyto funkce:

A) napomáhá začlenění mědi do apoceruloplasminu k vytvoření ceruloplasminu, který se vylučuje do krve

B) fyziologicky eliminuje měď do žluči k vyloučení stolicí

Při dysfunkci ATP7B (Obrázek 2) se měď kumuluje v krvi ve volné formě a je vylučována spíše močí. Po vyloučení z jater se měď kumuluje nejčastěji v rohovce a mozku, kde způsobuje oxidační poškození a apoptózu. Nemoc se tak z jater rozšiřuje dále do těla. Protože se jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, je pro jeho projev nutné mít mutaci na obou alelách. Buď se jedná o stejný typ mutace (homozygot), nebo jiný (heterozygot).[30, 31]



Obrázek 2: Jak probíhá transport mědi a) za fyziologických podmínek b) pokud je narušen protein ATP7B u Wilsonovy choroby. ATP7B- membránová ATPasa, Cu/Zn SOD1- Cu/Zn superoxididmutasa, Cu-atomy mědi, COX- cytochrom oxidasa, CTR1- přenašeč mědi, MT- metallothionein, P- protein (např. ceruloplasmin), ostatní jsou metalochaperony. Převzato[32]

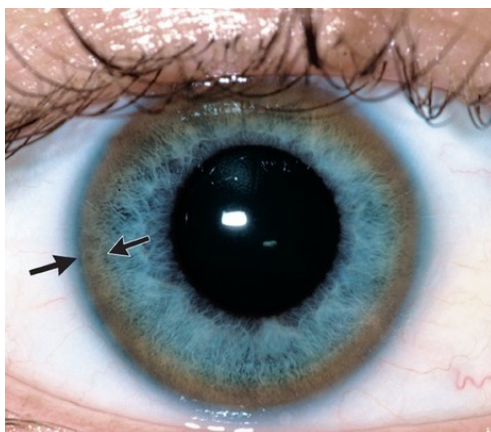
Onemocnění se může manifestovat v těchto nejčastějších formách či jejich smíšených formách:

Jaterní postižení u Wilsonovy choroby se může projevit v různých formách asi v 1/3 případů. I když je to spíše chronické onemocnění, může se projevit akutní hepatitidou, a to zejména v období dospívání a v dětském věku. Klinickými příznaky (zvýšené transaminázy, únava a mírná žloutenka, bez

neurologických příznaků) se podobá hepatitidám virové a autoimunitní etiologie. Většinou akutní fáze odezní a přejde do chronické formy se zvětšenými játry i zvýšenými jaterními testy. Objevit se může jaterní fibróza až cirhóza a nekrotické změny. V různých fázích může onemocnění přejít do tzv. fulminantního selhání, kdy dochází k destrukci erytrocytů náhle uvolněnou masou Cu z jater, i když hladiny ceruloplasminu nejsou výrazně vychýlené z normy.

Neurologická forma je častějším typem vyskytujícím se poprvé až mezi 20. a 30. rokem života. Mezi charakteristické projevy patří obtíže s psaním, jemnou motorikou a třesoucíma se rukama. Pokud není zahájena léčba, může choroba vyústit v poruchy řeči, nadměrné mimovolní pohyby a stahy svalů až křeče vedoucí k deformaci končetin. Většina nemocných má tzv. Keyser-Fleischerův prstenec (Obrázek 3) na rohovce a snížené hodnoty ceruloplasminu.

V psychiatrické formě se projevují více psychické změny. Změny nálad, chování, neschopnost učit se vedoucí až ke stavům deprese a mánie.[32, 33]



Obrázek 3: Keyser-Fleischerův prstenec u Wilsonovy choroby, způsobený patologickou kumulací mědi na periférii rohovky. Převzato[34]

Při časném zachycení může být WD úspěšně farmakologicky léčena a doba přežití se neliší od zdravých jedinců. Proto je třeba provést screening nejbližších příbuzných a zabývat se diferenciální diagnostikou pro správnou léčbu při jiných onemocněních jater. U nemocných je třeba vyhýbat se potravinám s vysokou koncentrací mědi (Tabulka 1) a potenciálně hepatotoxickým látkám (alkohol, léky, byliny). U dobře kompenzovaných pacientek, bez pokročilé cirhózy a portální hypertenze, je možné úspěšné těhotenství. Pacientky dostávají snížené dávky chelátorů během 1. a 2. trimestru. Ve 3. trimestru mohou být v závislosti na jaterních funkcích dávky ještě menší. U solí zinku není potřeba v těhotenství dávky měnit. Kojení není kvůli prostupu léčiv do mléka doporučeno.

Léčba je zprostředkována látkami, jež vytvářejí negativní rovnováhu mědi v těle. Kromě chelátorů, popsanych níže, se mohou použít zinkové soli, které brání samotné absorpci v trávicím traktu. Dále se

léčí symptomaticky a při nevratném poškození jater se nabízí možnost transplantace. V budoucnu by se mohla objevit genová terapie a nové typy chelátorů.[30]

Indická dětská cirhóza

Je onemocnění postihující děti z indického venkova ve věku od 6 měsíců do 5 let věku. Do 70. let minulého století patřilo mezi běžnou příčinu úmrtí, nyní je už spíše vzácné. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je nadměrné požití mědi. Předpokládá se, že počet nemocných klesl v důsledku omezení používání mosazných nádob na ukládání potravin. Může se ale jednat o dědičnou metabolickou poruchu, protože se objevily i případy nemocných mimo tuto zeměpisnou oblast. S nemocí je spojena masivní akumulace mědi v játrech a snížení aktivity katalázy vedoucí ke změnám na hepatocytech. Oproti WD se cholestáza objevuje v pozdějším stádiu nemoci. Steatóza se neobjevuje.[35]

3.1.5 Patologie: deficit mědi v lidském organismu

Projevy nedostatku mědi

Nedostatek mědi může být důsledkem podvýživy, vážných průjmů a parenterální výživy dlouhodobého charakteru bez náhrady mědi. Projevuje se hypochromní normocytární anémií a poruchami kostního metabolismu z důvodu snížené syntézy kolagenu.[27] Nízké hladiny Cu mohou být spojeny i s osteoporózou. Kuproenzym lisyloxidasa je potřebný k tvorbě pojivových tkání a jeho nedostatek vede ke ztrátě kostní hmoty. Nízké hodnoty Cu byly naměřeny i u vážných forem revmatoidní artritidy. Nízký příjem mědi negativně ovlivňuje obranu organismu proti oxidačnímu poškození. To je způsobeno jeho důležitou pozicí v metabolismu antioxidantních enzymů s důrazem na superoxiddismutasu a katalasu. Je možné, že substituce nízkých hladin mědi pozitivně působí na proces stárnutí buněk. Jeho nadměrný příjem je však z hlediska antioxidantního působení také nežádoucí (kapitola 3.1.4). U makulární degenerace (vedoucí ke slepotě) spojené s vyšším věkem, vedlo podávání Cu a jiných mikronutrientů ke snížení progresu onemocnění u 25 % lidí.[17]

Castillo-Durán se svým týmem ověřil spojitost mezi zvýšenou incidencí infekcí a nedostatkem mědi.[36] Klinickým příznakem a možným vysvětlením je neutropenie neboli stav charakterizovaný nízkými koncentracemi neutrofilů v krvi a sníženou imunitní odpovědí. Jiný efekt byl popsán u makrofágů a jejich aktivace, ale na druhou stranu zdroj hovoří i o zvýšení prozánětlivých reakcí v důsledku sníženého ceruloplasminu.[17]

Sekundární příčiny nedostatku mědi

- a) interakce s potravou: kompetice se Zinkem (Zn) díky stejným fyzikálně chemickým vlastnostem
tvorba komplexů s Molybdenem (Mo)
zvýšený příjem fruktosy

b) léčiva chelatující měď (kapitola 3.3)

c) onemocnění: diabetes, alkoholismus, hypertenze, chronický průjem[37]

Nedostatek mědi v těhotenství a kojení

Hladiny mědi v organismu lidí v plodném věku jsou obvykle nižší než adekvátně stanovené hladiny. Většina těchto lidí má však pouze mírný nedostatek mědi. Fakt, že je správná hladina mědi v organismu esenciální pro embryogenezi, byl ověřen na zvířatech. Byly odhaleny komplikace od retardace růstu a teratogeneze až k potratu embrya/plodu. U lidí se při pozorování objevila jistá korelace nízkého obsahu mědi v pitné vodě a defektů na neurální trubici plodu vedoucí k vrozeným vadám. Nedostatek mědi v těhotenství ve většině případů není způsoben malým příjmem v potravě, ale spíše sekundárně viz. výše. Při užívání chelatačních činidel v těhotenství se rodily děti s abnormalitami: hyperflexibilní klouby, křehké cévy a změny měkkých tkání. Otázkou bylo, zda změny nastaly kvůli nedostatku Cu v buňkách plodu nebo spíše v návaznosti na nedostatek mědi v metabolismu enzymů matky zajišťující vývoj plodu. To je předmětem dalších výzkumů.[37]

Nedostatek mědi je častější u předčasně narozených dětí. Hlavně u těch s nízkou porodní váhou, a to z důvodu snížené zásoby mědi při narození vzhledem k menší relativní velikosti jater a vyšším požadavkům určeným jejich vysokou mírou růstu v porovnání s novorozenci.[13] Měď v mateřském mléce má podstatně vyšší biologickou dostupnost než v mléce kravském, proto jsou děti krmené výhradně kravským mlékem náchylnější k rozvoji nedostatku mědi než kojenci.[38, 39]

Menkesova choroba

Je geneticky podmíněné onemocnění zvané také trichopoliodystrophia nebo „kinky-hair“ syndrom. Je vázáno na chromosom X, a proto jím trpí téměř výhradně mužské pohlaví. Onemocnění je způsobeno mutací genu sloužícího pro tvorbu ATPasy transportující Cu^{2+} ionty. Konkrétně jde o enzym ATP7A, který umožňuje přenos Cu do golgiho aparátu. Buňky střevní sliznice tedy nedovedou přenést Cu skrz bazolaterální membránu do krevního řečiště. Projevuje se u chlapců již krátce po narození a postižení jedinci se dožívají většinou maximálně tří let. Hlavním důvodem je potřeba mědi k tvorbě enzymu lisyloxidasy. Enzym se podílí na stavbě kolagenních a elastinových vláken nezbytných pro správný růst kostí a pevnost cév. Omezeně tvořené jsou i další enzymy jako cytochrom c oxidasa, dopamin β -hydroxylasa a superoxidodismutasa, kde její nedostatek vede k neurodegeneraci a demyelinizaci. Ta u mozkových tkání ústí v mentální retardaci. Důsledkem jsou i rozdílné koncentrace katecholaminů v plasmě a mozkomíšním moku. Byl stanoven index DOPA (dopamin a prekurzory) / DHPG (dihydroxyfenylglykol) a jeho zvýšení je ukazatelem při diagnostice. Nedostatek enzymu tyrosinasy způsobuje nedostatek melaninu a postižení jedinci bývají charakterističtí křehkými

kudrnatými a málo pigmentovanými vlasy ocelového vzhledu, mimo jiné i kvůli nedostatku enzymu důležitého pro zesíťování keratinu. Měď se při intravenózní aplikaci nemůže dostat do mozku. Proto jsou možností léčby při časně diagnóze intraperitoneální a intrathekální injekce Cu-histidinu prováděné denně, aby se mohlo zabránit neurodegenerativním pochodům a prodloužit život nemocného.[18, 26]

Syndrom týlního rohu

Mírnější forma MD se nazývá syndrom týlního rohu (neboli Occipital horn syndrom). Je to také genetické onemocnění spojené s chromozomem X a následným snížením tvorby ATP7A. Neurologické symptomy však bývají mírnější. Může být přítomna mírná mentální retardace. Charakteristické a klinicky významné jsou abnormality kostních a pojivových tkání zahrnující kostní výrůstek v týlní části hlavy. Tento typ onemocnění je vzácný.[40]

Aceruloplasminémie

Geneticky podmíněná choroba (autosomálně recesivní dědičnost) způsobená mutací genu pro tvorbu proteinu ceruloplasminu. Ačkoliv má ceruloplasmin mnoho funkcí včetně transportu mědi, u pacientů s tímto onemocněním vede nedostatek až absence enzymu ceruloplasminu k akumulaci železa v mozku a jiných orgánech. Projevuje se vážnými zdravotními obtížemi již ve 30 letech věku (diabetes mellitus, retinální degenerace, neurologické poruchy).[21, 41]

Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je progredující neurodegenerativní onemocnění spojené s nevratným poškozením funkčních neuronů postupně vedoucí až k úplné demenci. Jelikož se nemoc kvůli nedostatečným znalostem mechanismů patogeneze zatím léčí pouze symptomaticky, pacienti se od stanovení diagnózy dožívají zhruba 8-10 let. V mozku pacienta s AD se odehrávají kromě jiných (změny na amyloidních placích, objevuje se fosforylovaný tau protein, zvýšené oxidativní poškození, agregace A β peptidu) i změny v homeostáze kovů (Fe, Zn, Mn, Ca, Mg). Z povahy diplomové práce se zaměříme na roli homeostázy mědi, která je zodpovědná za správnou funkci kuproenzymů v různých částech těla. Podle nejnovějších poznatků je hladina mědi v mozku u pacientů s AD nejčastěji snižena, přičemž její hladiny v cerebrospinální tekutině mohou být odlišné od sérových hladin. Snižené hladiny mohou být spojené s neurofibrilárními shluky a zvýšenou formací A β plaků v přítomnosti mědi, které následně vedou k narušení přenosu mědi. Ta je transportována ve větším množství do extracelulárního prostoru a snižuje se její koncentrace v intracelulárním prostoru. Tvorba A β plaků probíhá štěpením membránového APP (protein amyloidních prekurzorů vázající ve své struktuře měď, je také zodpovědný za detoxikaci mědi *in vivo*) pomocí enzymu štěpícího prekurzor proteinu amyloidu v β -místě 1 (BACE1). Enzym BACE1 interaguje s chaperonem mědi pro superoxidodismutasu (CCS), tedy

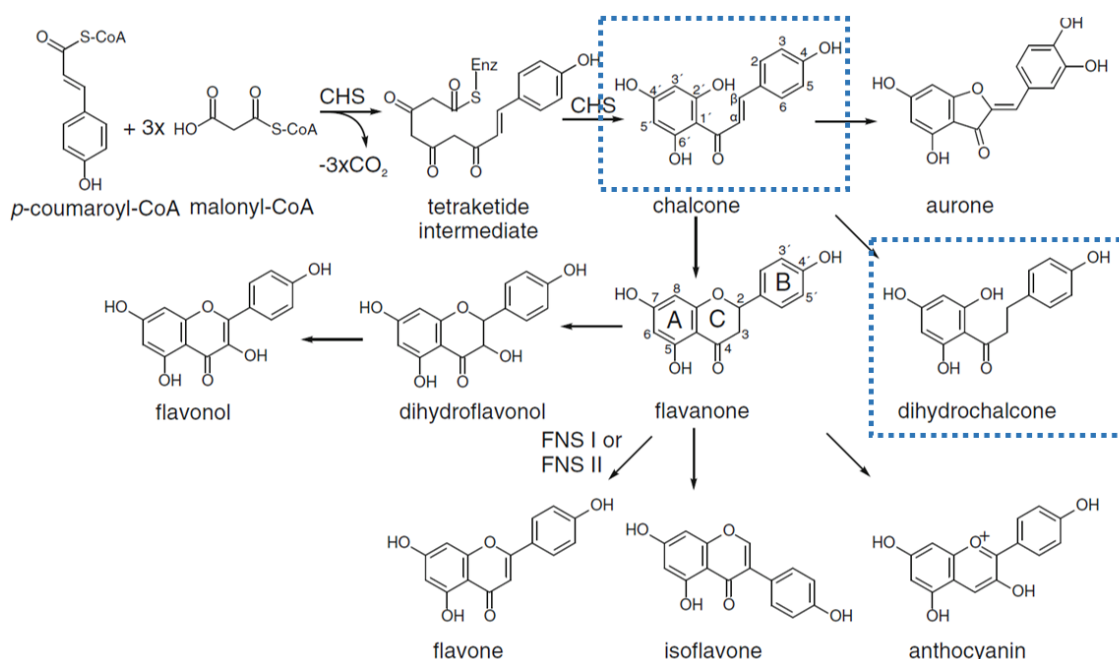
proteinem důležitým pro dodávání mědi enzymu superoxidodismutase, a může tak snižovat její schopnost likvidace reaktivních forem kyslíku. Při nadměrné expresi BACE1 se hodnoty CCS snižují, což vede ke snížení hladin intracelulární mědi.[42, 43]

Měď je důležitá pro normální funkci a vývoj mozku a její narušená homeostáza v centrálním nervovém systému může působit i v patogenezi dalších neurodegenerativních onemocnění. Kromě výše uvedených mezi ně patří Parkinsonova choroba, Amyotrofická laterální skleróza, Huntingtonova choroba a Prionová onemocnění.[44]

3.2 CHALKONY A DIHYDROCHALKONY

3.2.1 Základní údaje

Chalkony i dihydrochalkony patří mezi bicycké sloučeniny. Mají dva aromatické kruhy spojené tříuhlíkatým můstkem. Ten je nenasycený u chalkonů a u dihydrochalkonů nasycený (Obrázek 4).[5] Skupinou jim nadřazenou jsou flavonoidy patřící do skupiny sekundárních metabolitů rostlin. Chalkony mohou být snadno syntetizovány např. Claisen-Shmidtovou kondenzací nebo spolu s dihydrochalkony získávány izolací z rostlin.[6, 45, 46] Dihydrochalkony se mohou získávat i katalytickou hydrogenací v zásaditém prostředí z běžných flavonoidů.[47]



Obrázek 4: Metabolické cesty v syntéze flavonoidů a změna číslování struktury při uzavření kruhu. CHS- chalkonové syntázy, FNS-flavonové syntázy. Převzato[48]

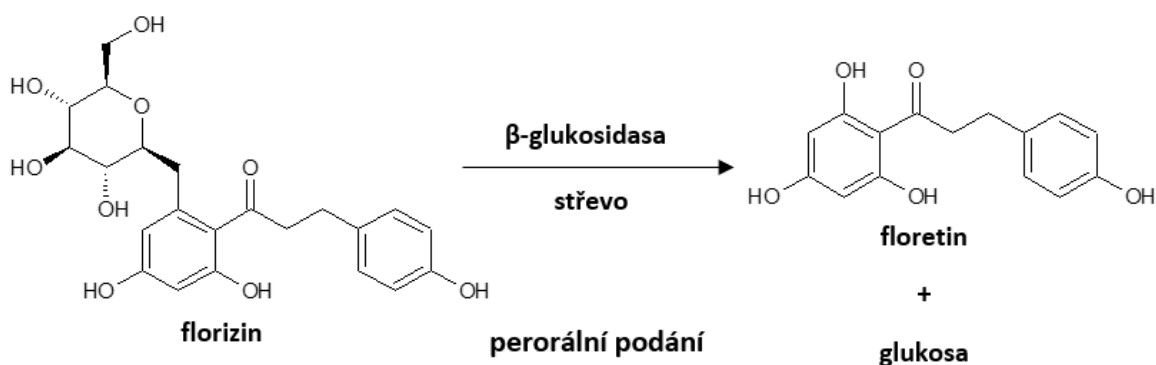
3.2.2 Vlastnosti chalconů, dihydrochalconů

Nejbohatší zdroje těchto přírodních látek jsou různé druhy ovoce. V případě dihydrochalconů se jedná většinou o jablka. Jejich přítomnost v potravě vykazuje velké množství pozitiv pro zdraví. Dihydrochalkony mají protizánětlivé, antivirové, antibakteriální, antioxidační, antidiabetické, neuroprotektivní vlastnosti a modulují imunitu. U látek ze skupiny chalconů byl popsán antioxidační, antibakteriální, antitrombotický, protizánětlivý, protivirový, imunosupresivní, antidiabetický a cytotoxický potenciál. U obou skupin látek se zjistilo, že mohou potlačovat nádorová bujení.[6, 7]

3.2.3 Metabolismus chalconů

Pohled na metabolismus použitých látek je důležitým parametrem v souvislosti se změřenými hodnotami chelatace či redukce, protože změna struktury při metabolizaci může tyto vlastnosti v prostředí těla velmi ovlivnit. Znalost metabolizace látek použitých v této práci se v organismu u každé struktury liší. Je známo, že orálně podaná dávka u isoliquiritigeninu je absorbována z 92 %, ale biodostupnost kvůli značné metabolizaci v tenkém střevě a játrech činí jen 11,8 %.[49] Zatímco u více prozkoumaného neohesperidinu DHC se zjistilo, že metabolismus v lidském těle probíhá v několika krocích. Prvním je deglukosylace pomocí střevní mikrobioty na hesperetin dihydrochalcon 4'- β -D-glukosid a následně na aglykon hesperetin dihydrochalcon. Dále se tento produkt hydrolyzuje na kyselinu 3-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl) propionovou a pravděpodobně na floriglucinol.[6]

Florizin a floretin mají společnou metabolickou cestu. Florizin je absorbován v tenkém střevě pomocí sodno-glukózových transportérů (SGLT). Následuje deglukosylace florizin-laktát hydrolasou (β glukosidasová aktivita) na floretin (Obrázek 5).



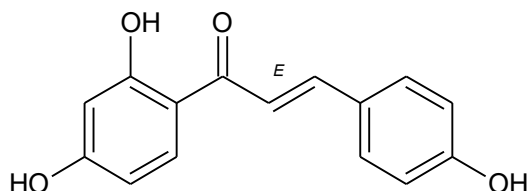
Obrázek 5: Hydrolýza florizinu β -glukosidasou ve střevě. Převzato[50]

Hlavním enzymem metabolizujícím floretin ve střevě a játrech je CYP3A4 jako podtyp cytochromu P450. Nejčastější oxidační reakcí na skeletu je hydroxylace uhlíku fenylového kruhu na 3-OH floretin.[51, 52] Floretin také inhibuje katalytickou aktivitu tohoto cytochromu, který je nezbytný pro

metabolizaci majoritního souboru léčivých látek. Jeho inhibice by tak mohla způsobit významné nežádoucí účinky a interakce s léčivými.[51]

3.2.4 Chalkony a dihydrochalkony použité v této práci

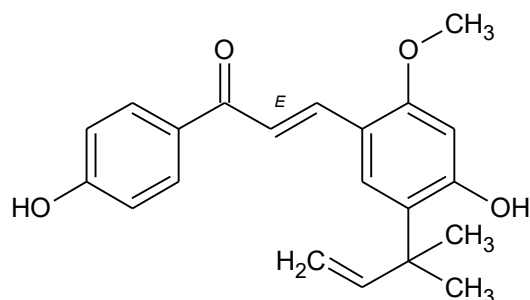
3.2.4.1 *Isoliquiritigenin*



Obrázek 6: *Isoliquiritigenin*. Převzato z SciFinder[53]

Isoliquiritigenin (ISL) (Obrázek 6) je izolován z lékořice druhů *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Glycyrrhiza glabra* L.[54] Působí jako fytoestrogen. Váže se na lidský estrogenní receptor a může účinkovat v prevenci nemocí způsobených jeho nedostatkem. V dermatologických studiích byla zjištěna jeho možná aktivita jako depigmentačního činidla pomocí inhibice enzymu tyrosinasy. ISL demonstroval svou antiproliferační aktivitu hned u několika druhů nádorů jako je rakovina prsu, prostaty, plic, nebo gastrointestinálního traktu. Užitečné mohou být jeho relaxační účinky na cévy jako případná prevence mozkové ischemie.[55] Může působit neuroprotektivně, a to např. potlačením glutamátom indukovaných reaktivních forem kyslíku, které poškozují nervová vedení. Působí i protizánětlivě, hepatoprotektivně a kardioprotektivně. Zajímavý je i kladný vliv na anorexii spojenou se stářím díky působení na serotonin. Oproti liquiritigeninu prokázal ISL vyšší antimikrobiální aktivitu v případě patogenů *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* a *Prevotella intermedia*, způsobujících zánět ozubice (periodontitidu). Byl zkoumán nadějný zásah ISL do enzymatického metabolismu potřebného pro existenci *Mycobacterium tuberculosis*. V neposlední řadě je kandidátem k léčbě diabetu pro své účinky na snížení glykémie ověřené *in vivo* a inhibiční působení na enzym aldosa reduktasu.[54] Tento enzym je totiž zodpovědný za řadu chronických komplikací diabetu kvůli své schopnosti přeměňovat glukosu na sorbitol, který se následně ukládá v tkáních nervů, sítnice i jiných struktur, jejichž membrána není řízena inzulinem, a mění tak osmotický tlak v buňkách.[56]

3.2.4.2 Likochalkon A

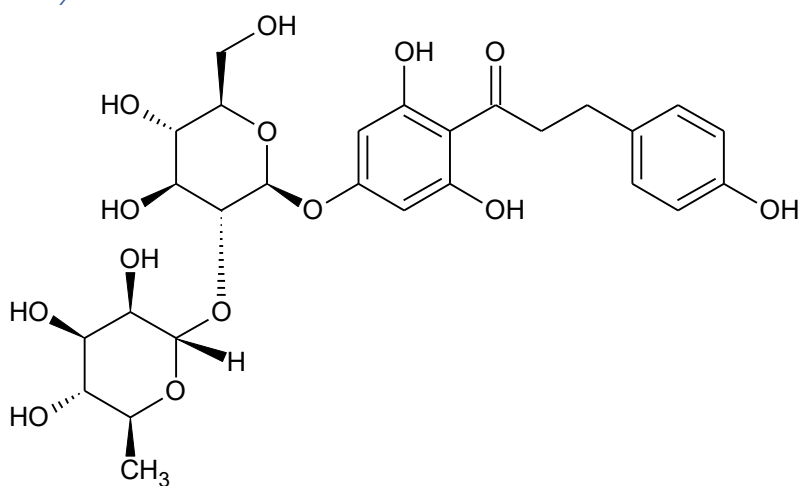


Obrázek 7: Likochalkon A. Převzato z SciFinder[57]

Likochalkon A (Obrázek 7) byl izolován z kořenů lékořice (*Glycyrrhiza inflata* Batalin). Tato rostlina je charakteristická přítomností retrochalkonů, které se od běžných chalkonů odlišují chybějící hydroxylovou funkční skupinou na pozici 2' a 6'. A kromě již zmíněného likochalkonu A zde najdeme i typ B, C, D a echinatin.[58]

Likochalkon A vykazuje estrogení, antiprotozoální aktivitu a působí protizánětlivě vlivem inhibice syntézy i následné aktivity COX-2. Díky svým vlastnostem může být využitý při léčbě rakoviny prostaty i jiných nádorů. Likochalkon A také působí antimikrobiálně. *In vitro* byla prokázána jeho účinnost i proti *Helicobacteru pylori*. [55, 58, 59] Dále vylepšuje kognitivní schopnosti pomocí aktivace signalizační dráhy IL-17, zvyšuje proliferaci T a B buněk ve slezině a následně v krevním oběhu u myši.[60] V jiné studii na myších bylo zjištěno, že likochalkon A dokáže blokovat aktivaci makrofágů, potlačit uvolňování zánětlivých i nekrotických faktorů buněk a má tak potenciál mírnit neuropatické bolesti.[61]

3.2.4.3 Naringin dihydrochalkon

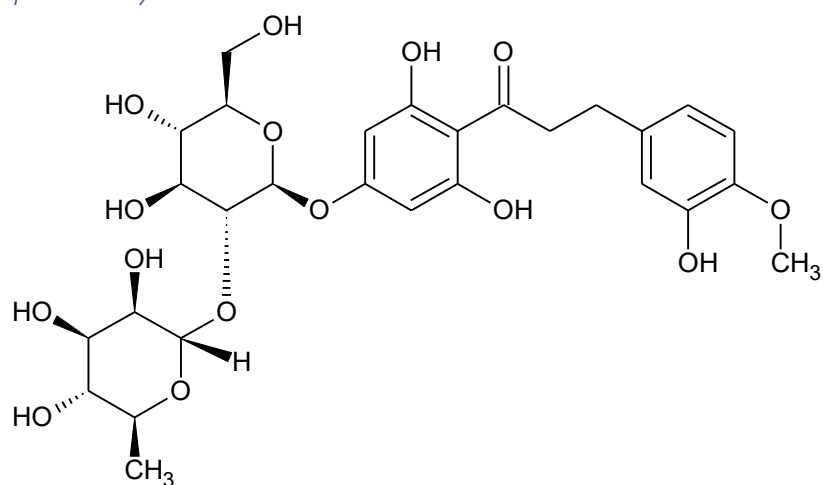


Obrázek 8: Naringin dihydrochalkon. Převzato z SciFinder[62]

Naringin dihydrochalkon (Naringin DHC) (Obrázek 8) je široce používaný derivát přírodní sloučeniny zvané naringin. Samotný naringin se vyznačuje hořkou chutí a můžeme ho najít v některých citrusech.[63] Dihydrochalkon, vyrobený katalytickou hydrogenací, je naopak velmi sladký.[8]

Cukernou část v něm tvoří rhamnosa a glukosa připojená pomocí o-glykosidického můstku na skelet typický pro chalkony.[8] Má inhibiční účinky na funkci některých isoformů cytochromu P450 a je přibližně 500-700x sladší než sacharóza. K jeho přednostem patří právě jeho vysoce sladká chuť, málo kalorií a bezpečnost. Díky jeho zvláštní slabé vůni, čisté a dlouhotrvající chuti je využíván při výrobě léků či v potravinářství, zejména tučných mražených potravin, žvýkaček nebo mléčných výrobků.[64] Studie z roku 2018 prokázala, že antioxidační potenciál naringinu DHC má příznivé účinky v léčbě kognitivních poruch. Dále byl schopen potlačit neurologické záněty a neurogenezi, proto je slibným kandidátem pro léčbu Alzheimerovy choroby.[65]

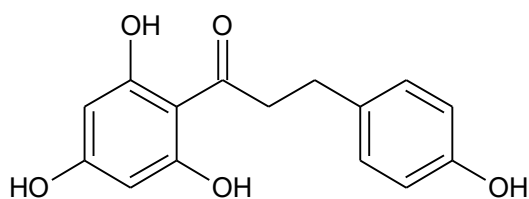
3.2.4.4 Neohesperidin dihydrochalkon



Obrázek 9: Neohesperidin dihydrochalkon. Převzato z SciFinder[66]

Neohesperidin dihydrochalkon (Neohesperidin DHC) (Obrázek 9) patří k vysoce intenzivním přírodním sladidlům používaným v EU. Je asi 1500-2000x sladší než sacharóza.[67] Tohoto zástupce flavanonových glykosidů můžeme najít v citrusech. Nejčastěji se jedná o grapefruit (*C. paradisi* Macfad.), citron (*Citrus limon* (L.) Osbeck), tangelo či plod pomerančovníku hořkého (*Citrus × aurantium* L.).[68] Vykazuje neuroprotektivní aktivitu a antiproliferační účinky. V nedávné studii bylo zjištěno, že by mohl inhibovat běžné alergické reakce *in vitro* a *in vivo*, vykazuje také ochranné účinky při progresivní plicní fibróze.[69] Inhibuje diferenciaci osteoklastů, kostní resorpci, genovou expresi markerů pro osteoklasty, dále inhibuje ligand pro receptorový aktivátor nukleárního faktoru kappa-B (RANKL), důležitý pro správnou funkci osteoklastu.[70]

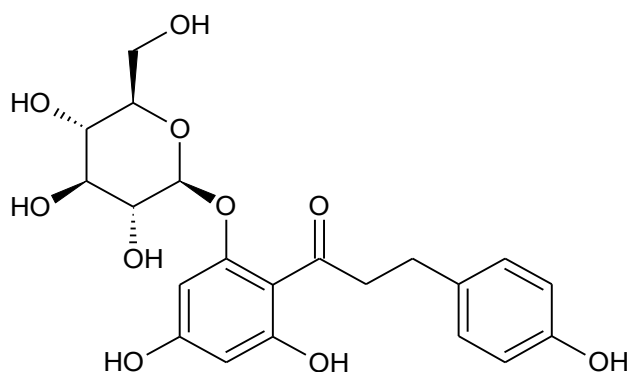
3.2.4.5 Floretin



Obrázek 10: Floretin. Převzato z SciFinder[71]

Floretin (Obrázek 10) a jeho deriváty jsou přirozeně vyskytující se dihydrochalkony objevené v jablkách (*Malus* spp., čeleď Rosaceae), hruškách, jahodách, kumquatu, zelenině, ale v menší míře je najdeme i u druhů *Rhododendron* spp. (Ericaceae), *Ziziphus* spp. (Rhamnaceae) aj. K izolaci floretinu se spíše hodí nezralý jablečný plod, slupka, listy, kořeny, ale látka je obsažena i v produktech jako je jablečný džus nebo cider. Základem chemické struktury jsou dva fenolické kruhy spojené tříuhlíkatým řetězcem, kde OH skupiny na kruhu A výrazně zvyšují jeho antioxidační aktivitu. Tou je myšleno ku příkladu snížení hladin reaktivních forem kyslíku (superoxidový anion, peroxyinitrit, hydroxylový radikál) a zvýšení produkce glutathionu jako markeru oxidačního stresu. Dále byl popsán účinek na glutathionperoxidasu, superoxidodismutasu, pokles peroxidace lipidů aj.[72] Experimentálně byl prokázán účinek floretinu na snížení hladin prozánětlivého PGE₂ a NO u aktivovaných makrofágů. Efektivně redukoval hladiny IL-6 a TNF- α , které ve zvýšených množstvích mohou způsobit např. sepse.[73] Významně potlačuje růst rakovinných buněk, také zasahuje do procesu tvorby osteoklastů, kde snižuje kostní resorpci mimo jiné i působením na RANKL receptor. Má antimikrobní potenciál proti methicillin-resistentní *S.aureus* a *Salmonella typhimurium*. [72, 74]

3.2.4.6 Florizin



Obrázek 11: Florizin. Převzato z SciFinder[75]

Dihydrochalkon florizin (Obrázek 11) je β -D-glykosidem floretinu s glykosidickým můstkem v poloze 2.[76] Poprvé byl izolován francouzskými chemiky z kořenové kůry jabloně *Malus domestica* Borkh. už roku 1835. Jeho důležitým zdrojem se stala jablečná drť.[77] Ve stopovém množství byl nalezen i v jahodách (*Fragaria x ananassa* Duchesne).[78]

V minulosti bylo zjištěno, že léčba u zvířat pomocí florizinu normalizovala plazmatickou glukózu a předcházela expresi IL-1 β buněk, které se účastní zánětlivého procesu při diabetu 2. typu. Tím léčba přispěla k ochraně funkčnosti β buněk pankreatu a poukázala na své možné využití při léčbě diabetu.[79] Později bylo zjištěno, že se jedná o neselektivní inhibitor SGLT zvyšující exkreci glukózy v ledvinách. Florizin a jiné časné inhibitory jako sergliflozin a remogliflozin se pak zřejmě kvůli nestabilitě

a již zmíněné neselektivně dále nevyvíjely.[80] Ve studii Hao Wanga vykázal florizin pozitivní efekt na antioxidační mechanismy u křečků krmených tučnou stravou. Dále signifikantně snížil hladiny celkového cholesterolu a triglyceridů v plasmě a potvrdil své protektivní účinky na kardiovaskulární systém.[81] Podobně jako další polyfenoly vykazuje také antioxidační vlastnosti a brání růstu některých typů rakovinných buněk.[51] Florizin můžeme v lidském těle najít i jako součást enzymu laktasy (celým názvem laktasy-florizin hydrolasy), která ve vodném prostředí střeva rozkládá laktosu na menší jednotky glukosu a galaktosu.[82]

3.3 CHELATAČE

3.3.1 Obecně

Chelatace je charakterizována jako fyzikálně-chemický proces, kdy se vytvoří vazby mezi vícevalentními kationty a organickými sloučeninami.[83] Její objev sahá do roku 1893, když Alfred Werner přišel s průlomovou myšlenkou, za níž v roce 1913 získal Nobelovu cenu. Navrhl novou strukturu pro popis atomů, které mohly existovat ve více než jednom valenčním stavu a přitom být stabilní. Tyto teoretické struktury nazval „komplexy“. K jejich ilustraci postavil do středu kovový kation (v jeho případě platinu) a molekuly mající s ním vazbu (ligandy) rozmístil do rohů osmistěnu. Zavedl související pojmy koordinační číslo a oxidační číslo, které molekulu charakterizují. S pojmem chelatace přišli až později Morgan a Drew. Je odvozen od způsobu, jakým se ligandy poutají ke kationtu. Připomínají totiž klepeto, v řečtině *chelé*. [84]

Chelatační činidla jsou využívána jako výživové doplňky, k vyvíjení radiofarmak, jako přídavné látky v chemickém čištění, kosmetice, zemědělských hnojivech a k odstraňování škodlivých látek z těla (chelatační terapie).[4] Nejčastěji chelátované jsou kovy, které se do těla dostanou z okolního prostředí: ze splašků, při spalování fosilních paliv, těžbě, aplikaci pesticidů nebo odpadu z elektroniky. Těžké kovy (As, Hg, Pb a Cd) jsou nebezpečné již při malých koncentracích (nedají se biologicky odbourat), ale esenciální kovy (Zn, Cu, Fe) až při překročení prahové hodnoty. Mohou se v nadbytku vázat na různé tělesné tkáně včetně polysacharidů a proteinů. Mnoho z nich je přitom biologicky aktivních. Účastní se rozličných fyziologických a z našeho pohledu významnějších patofyziologických tělních reakcí. Zde přichází na řadu chelatace. Její využití v léčbě se zakládá na molekulách chelátoru vstupujícího do krevního oběhu, kde cíleně váže ionty kovů. Proces vyžaduje, aby afinita chelatačního komplexu na kovový ion byla vyšší než afinita kovového iontu k tělní struktuře. Tím vytvoří komplex, který zůstává v krevním řečišti až do vyloučení játry či filtrace ledvinami.[85–87] Ideální chelatační činidlo by mělo být dobře rozpustné ve vodě. Mělo by být schopné vstoupit i do buňky přes její membránu, vykazovat afinitu k iontům kovu v různých oxidačních stavech a tvořit s ním netoxické komplexy. Je důležité, aby si uchovalo své chelatační schopnosti i v pH tělních tekutin (nižší pH je

charakteristické jak pro absorpci ve střevě, tak pro patologický stav zánětu). Jeho distribuce v těle by měla být co nejpodobnější hledaným toxickým kovům. Pokud se toxické kovy ukládají v mozku, je k překročení HEB preferováno činidlo s malou molekulou a vysokou lipofilitou.[46, 87, 88]

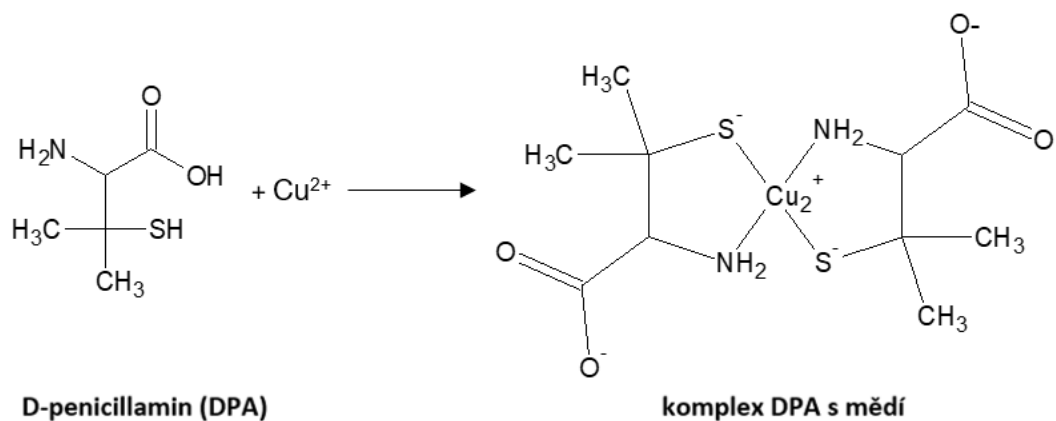
3.3.2 Využití v medicíně

Toxicita z nadbytku mědi stejně jako potíže s jejím nedostatkem jsou spíše vzácné a zpravidla bývají spojené s genetickou poruchou transportu mědi. Příkladem může být buď přesycení mědí spojené s Wilsonovou chorobou, nebo naopak nedostatek při Menkesově chorobě. Díky jejím funkcím v organismu (kapitola 3.1.2) je schopna narušit homeostázu vedoucí k nerovnoměrné distribuci. Ta může být spojená hned s několika poruchami, u kterých probíhají klinické studie o možném využití chelatační terapie. Jedním z nich je diabetes, avšak přínos léčby se v klinickém testování zatím s jistotou neprokázal. U neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova a Parkinsonova choroba, se kvůli limitovaným informacím o mechanismech patologie mědi v mozku zatím nepodařilo chelataci úspěšně použít. V případě nádorových onemocnění se díky selektivitě chelátoru k nádorovým buňkám prokázalo snížení angiogeneze a schopnosti nádoru metastazovat.[4]

Pacienti s WD jsou úspěšně léčeni různými chelatačními činidly zahrnujícími D-penicillamin, trientin hydrochlorid a tetrathiomolybdenát. Hlavním cílem je prvotně vyloučit měď nahromaděnou v tkáních a poté zamezit její další akumulaci.[4, 89]

D-penicillamin

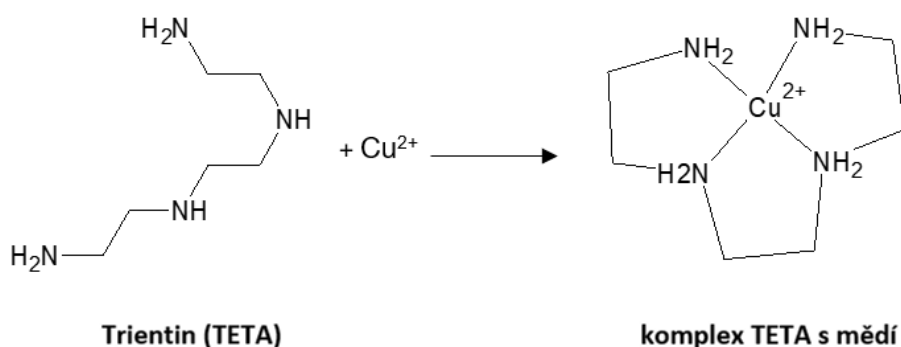
D-penicillamin (DPA) (Obrázek 12) je demetylovaný cystein používaný při symptomatické léčbě WD od roku 1956. Má schopnost mobilizovat zásoby mědi z tkání a vylučuje je močí. Je rozpustný ve vodě a má schopnost procházet membránami. Jako jeden z mála chelátorů dokáže odstranit jak Cu^{1+} , tak Cu^{2+} ionty díky schopnosti je redukovat a současně být oxidován na D-penicillamin disulfid. U 10-20 % pacientů léčených DPA se může na začátku léčby vyskytnout nežádoucí účinek v podobě náhlého zhoršení neurologických příznaků. Zřejmě kvůli zvýšeným hladinám mědi v mozku. Dalšími NÚ mohou být nefropatie a kožní problémy. Pokud je lék užíván na lačno, jeho biodostupnost může být zvýšena až o 50 %. Léčba DPA je povolena i v těhotenství.[4, 89, 90]



Obrázek 12: Chelatace mědi pomocí D-penicillaminu. Upraveno[91]

Trientin

Trientin (TETA) neboli trientin dihydrochlorid je hygroskopické, liposolubilní chelatační činidlo, které podobně jako DPA prochází membránami a vylučuje měď močí. Světu byl představen v roce 1982 jako alternativa pro pacienty s vážnými vedlejšími účinky způsobenými DPA. Na rozdíl od DPA není v molekule TETA přítomna sulfhydrylová skupina a z těla dokáže vyloučit pouze Cu^{2+} ionty (Obrázek 13). Místo ní pohlcuje měď kruhový komplex tvořený čtyřmi aminoskupinami. Používá se jak u symptomatických, tak i u asymptomatických pacientů nevyjímaje těhotné. Zhoršení neurologických symptomů se vyskytuje se stejnou pravděpodobností jako u DPA, avšak ostatní hypersenzitivní reakce nejsou tak časté. Kvůli tvorbě toxických komplexů by trientin neměl být podáván současně s přípravky obsahujícími železo. Vyskytlo se i několik hlášení o trientinem indukované sideroblastické anemii.[89, 90, 92]

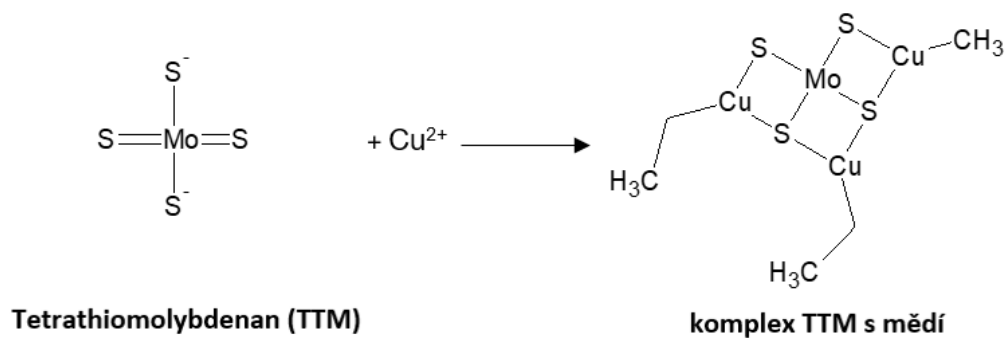


Obrázek 13: Chelatace mědi pomocí TETA. Upraveno[93]

Tetrathiomolybdenan

Tetrathiomolybdenan (TTM) působí na rozdíl od předchozích chelatačních činidel i mechanismem snižujícím absorpci mědi ve střevě. Délka terapie je doporučena pouze na pár měsíců. Účinek

samotného molybdenu byl dlouho znám ve veterinární medicíně při pastvě ovcí na molybdenem kontaminované půdě. Už v roce 1940 se uvažovalo o jeho využití u člověka, ale kvůli rozdílu mezi složeným žaludkem ovce (probíhala redukce na TTM) a jednoduchým lidským (redukce neprobíhala) to skončilo neúspěchem. Až v roce 1980 byla poprvé použita redukováná forma s názvem TTM (Obrázek 14). Mechanismus účinku se liší podle toho, zda je TTM podán s jídlem (tvoří neabsorbovatelné komplexy s mědí ve střevě) nebo bez něj (absorbuje se ve střevě a tvoří komplexy s volnou mědí v séru). V onkologických studiích byl zjištěn inhibiční vliv TTM na angiogenezi, fibrózu a zánětlivé reakce spojené s cytokiny závislými na mědi. Vedlejší účinky jsou všeobecně málo časté. Může se vyskytnout reversibilní poškození kostní dřeně, akutní hepatitida, záchvaty, zvýšení hladin cholesterolu, triglyceridů či aminotranferas. Neurologické obtíže jsou ve srovnání s DPA a TETA mnohem méně časté.[90, 93]

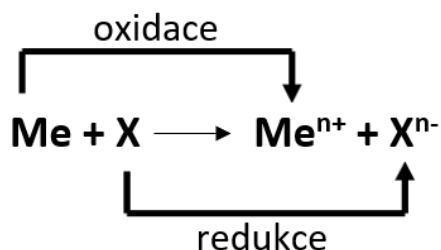


Obrázek 14: Chelatace mědi pomocí TTM. Upraveno[93]

3.4 REDUKCE

3.4.1 Obecně

Typicky přenášenou částicí u oxidačně redukčních reakcí je elektron. Při oxidaci látka zvaná oxidační činidlo přijímá elektrony a redukuje se, zatímco látka oxidovaná je poskytuje. Při redukci první látka (neboli redukční činidlo) poskytuje elektrony jiné látce a sama podléhá oxidaci, zatímco látka přijímající elektron se redukuje. Jelikož je třeba zachovat rovnováhu a odevzdaný proton jinde přijmout, musí být i oxidace vždy spojena s redukcí a vice versa. To znamená, že množství přijatých a odevzdaných elektronů se musí rovnat a je nezbytné, aby oxidace i redukce probíhaly současně (Obrázek 15). Zkráceně se proto nazývají redoxní reakce.[94]

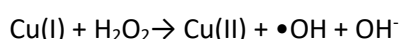


Obrázek 15: Redoxní reakce, přesun elektronů musí vždy probíhat současně. Upraveno[95]

3.4.2 Důsledky redukce na lidský organismus

Díky velké redoxní aktivitě může měď přijímat i odevzdávat elektrony a měnit tak své oxidační stavy. Tato schopnost je klíčová pro aktivitu mnoha významných enzymů (kapitola 3.1.2.1). Je pozoruhodné, že žádný jiný kov nemůže měď funkčně nahradit v těchto tzv. kuproproteinech. Měď je důležitá i pro správný metabolismus železa, syntézu pojivové tkáně, erytropoézu, tvorbu pigmentu, imunitní reakce a předávání neurologických signálů. Ačkoliv je redoxní potenciál mědi nepostradatelný pro organismus, v některých případech může vést k potencionální toxicitě.[96]

Obecně nejpříjemnější vysvětlení toxicity mědi v buňce se zakládá na předpokladu, že ionty mědi mají tendenci účastnit se tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS). Měďné a měďnaté ionty se mohou účastnit oxidačních a redukčních reakcí. Měďnaté (Cu^{2+}) ionty v přítomnosti biologických látek s redukčními schopnostmi jako je kyselina askorbová nebo GSH mohou být redukovány na Cu^{1+} ionty. Ty jsou pak schopné katalyzovat tvorbu reaktivních hydroxylových radikálů ($\bullet\text{OH}$) rozkladem peroxidu vodíku (H_2O_2) Fentonovou reakcí (Reakce 1).[97, 98]



Reakce 1: Fentonova reakce přeměny oxidačního stavu Cu z +I na +II a současném vzniku hydroxylového radikálu. Převzato[97]

Vysoce reaktivní hydroxylový radikál, s životností několik nanosekund, může reagovat prakticky s jakoukoliv biologickou molekulou v blízkém okolí a vytvořit například lipidový radikál z nenasycených

mastných kyselin. Oxidace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) má různé zdravotní důsledky včetně výskytu aterosklerózy. Kromě LDL částic jsou snadno oxidovatelné i lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL). To významně ovlivňuje jejich kardioprotektivní působení. Zdá se, že HDL částice jsou dokonce mnohem náchylnější k oxidačnímu poškození v důsledku působení radikálu α -tokoferolu, který vzniká v průběhu redukce měďnatých iontů na měďné pomocí α -tokoferolu.

Měď indukovaná tvorba volných radikálů může vést k poškození DNA a oxidaci bazí, proto se měď v cytosolu nemůže volně vyskytovat, ale je neustále vázána pomocí komplexů.[14, 96]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POMŮCKY

4.1.1 Použité chemikálie

Pokud není uvedeno jinak, všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich.

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 $\geq 99\%$

Octan sodný (CH₃COO⁻Na⁺) $\geq 99\%$

Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄·5H₂O) $\geq 99\%$

4.1.2 Přístrojové vybavení

Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky NEO2MALPHA Synergy 02 (BioTech, Praha)

Třepačka na mikrotitrační destičky IKA®MS 3 digital

Třepačka na zkumavky IKA®VORTEX GENIUS 3

Váhy analytické KERN ABT120-5DM

Ultrazvuková lázeň KRAINTEK

4.1.3 Použitý materiál

Automatické pipety o odlišných objemech (Brand)

Vícekanálové pipety o odlišných objemech (Biohit)

Mikrotitrační destičky (Brand)

4.1.4 Testované látky

Isoliquiritigenin (≥ 98 %, Sigma-Aldrich)

Likochalkon A (≥ 96 %, Merck Germany)

Naringin dihydrochalkon (čistota neuvedena, Sigma-Aldrich)

Neohesperidin dihydrochalkon (≥ 98 %, Sigma-Aldrich)

Floretin (≥ 97 %, Merck Germany)

Florizin (≥ 99 %, Sigma-Aldrich)

Struktury testovaných látek byly vytvořeny v programu ACD LABS 12.0 a jsou uvedeny v teoretické části (Obrázek 6-11).

4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) o koncentraci 5 mM

Roztok BCS byl zhotoven rozpuštěním disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové ($M_w = 564,54$ g/mol) v destilované vodě na koncentraci 5 mM. Je stabilní v lednici.

Měďnaté ionty v roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci 5 mM

Roztok byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ s $M_w = 249,69$ g/mol) v destilované vodě na koncentraci 5 mM. Vzniklý základní roztok byl poté pro měření naředěn na koncentraci 250 μM pomocí:

- a) DMSO (použitelné pro měření pomocí BCS)
- b) vodou (v případě stanovení pomocí HEM)

Roztoky jsou stabilní v lednici.

Měďné ionty v roztoku CuCl o koncentraci 5 mM

Tento roztok byl připraven rozpuštěním CuCl ve vodném roztoku 0,1M HCl a 1M NaCl ($M_w = 98,99$ g/mol) v několika krocích. Nejprve bylo přichystáno rozpouštědlo pro CuCl. V prvním kroku jeho výroby byl připraven 0,1M roztok HCl (bylo napipetováno 442 μl 32% HCl do 44558 μl destilované vody) ($M_w = 36,46$ g/mol, 1 l $\approx 1,16$ kg). V druhém kroku v 0,1M roztoku HCl rozpuštěno NaCl na 1M roztok ($M_w = 58,44$ g/mol). Nakonec byl CuCl pomocí rozpouštědla rozpuštěn v ultrazvukové lázni. Vzniklý základní

roztok byl poté pro měření naředěn na koncentraci 250 μM pomocí DMSO při měření pomocí BCS. Roztoky jsou stabilní v lednici.

Roztok hematoxylinu (HEM) o koncentraci 5 mM

Hematoxylin ($M_w = 302,28 \text{ g/mol}$) byl naředěn pomocí DMSO na požadovanou koncentraci 5 mM. Takto vznikne základní roztok, který je možné použít po dobu 5 hodin.

Hydroxylamin hydrochlorid (HA) základní roztok o koncentraci 100 mM

Roztok byl připraven rozpuštěním látky hydroxylamin hydrochlorid ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) v destilované vodě tak, aby jeho koncentrace odpovídala 100 mM. Z tohoto základního roztoku byl ředěn podle potřeby na koncentrace 10 mM a 1 mM. Roztok je stabilní, uchovávat v lednici.

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.

4.3 STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUPY

4.3.1 Postup pro kontrolu připravených základních roztoků mědi

Kontrola byla provedena vždy po přípravě (tzn. před prvním použitím) základních tedy 5mM roztoků Cu^{2+} a Cu^+ iontů. Připravené roztoky uchovávané v lednici jsou stabilní a není třeba před dalším použitím znovu provádět kontrolu.

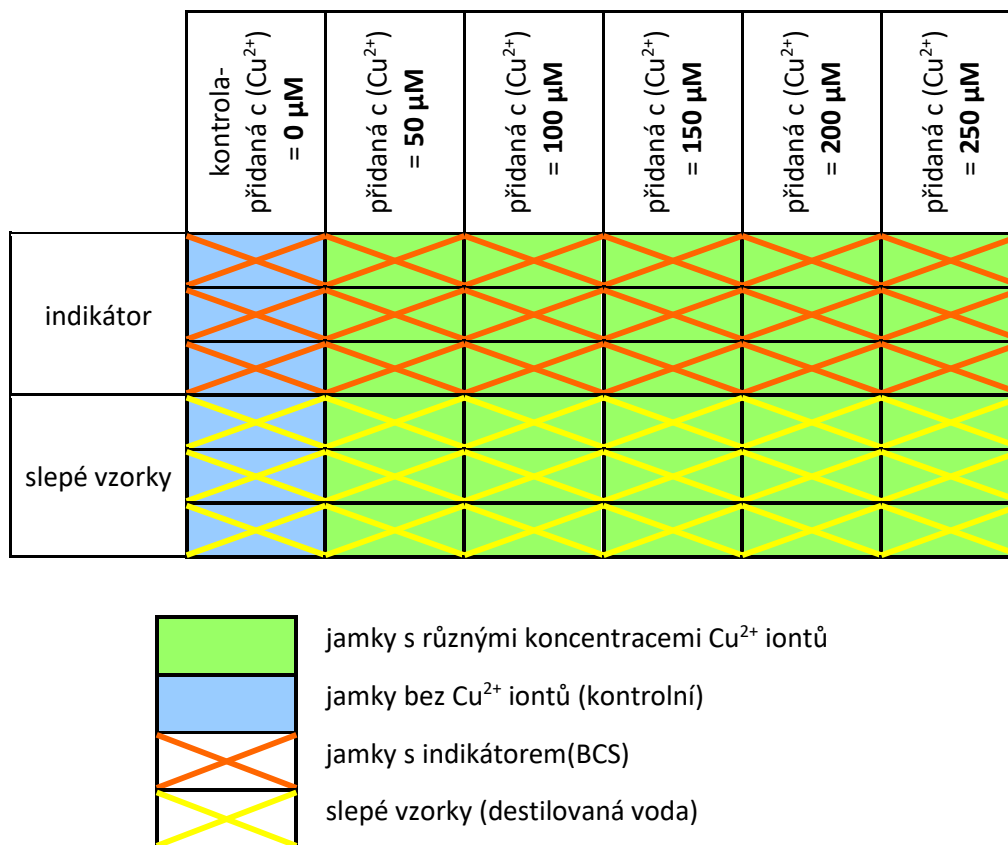
Na mikrotitrační destičku byly do dvou sousedících jamek postupně pipetovány tyto roztoky:

- a) 150 μl pufru o pH 7,5
- b) 50 μl 1mM roztoku hydroxylaminu
- c) 50 μl 0,25mM roztoku iontů mědi (Cu^{2+} nebo Cu^+), který byl připraven smísením 950 μl superčisté vody a 50 μl základního roztoku
- d) mikrotitrační destička byla vložena na třepačku a míchána po dobu 1 minuty
- e) 50 μl 5mM roztoku BCS
- f) po 1 minutě od přidání BCS byla změřena absorbance při vlnové délce 484 nm.

Pokud byl zkoušený roztok správně připravený, měla by se jeho absorbance pohybovat okolo 0,50-0,55.

4.3.2 Postup pro stanovení kalibrační křivky měďnatých iontů

- a) Před měřením byly připraveny základní reagenční roztoky:
 - 5mM roztok BCS v destilované vodě ($M_w = 564,54 \text{ g/mol}$), stabilní v lednici
 - 5mM roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v destilované vodě ($M_w = 249,6861 \text{ g/mol}$), stabilní v lednici
- b) Přípravy roztoků před vlastním pokusem:
 - Byly připraveny vodné roztoky měďnatých solí o koncentracích 50, 100, 150, 200 a $250 \mu\text{M}$.
- c) V tomto bodu, kdy započal vlastní experiment, bylo do připravené mikrotitrační destičky napipetováno 150 μl pufru o pH 6,8.
- d) Do všech jamek bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku HA.
- e) Poté byly (dle přiložené tabulky) přidány žádané koncentrace měďnatých iontů v objemu 50 μl (pro $c=0$ bylo přidáno 50 μl destilované vody).
- f) Destička byla vložena na 1 minutu do třepačky.
- g) Do poloviny jamek bylo přidáno 50 μl roztoku BCS a do druhé poloviny 50 μl destilované vody (Obrázek 16).
- h) Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm ihned a poté v čase 5 min (začátek měření v čase 4 min 30 s).
- i) Na základě zjištěných informací byla sestavena kalibrační křivka.

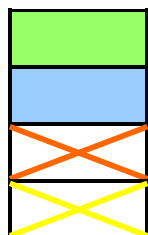
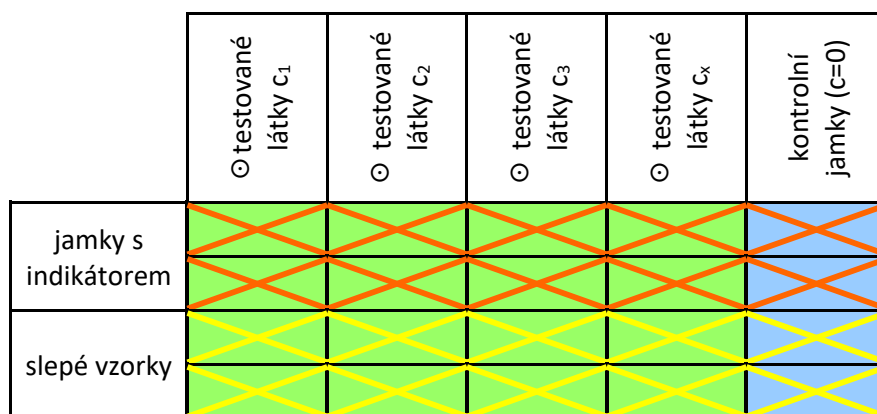


Obrázek 16: Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci měďnatých iontů.

4.3.3 Postup pro stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem

- a) Před měřením byly připraveny základní reagenční roztoky:
 - 5mM roztok CuSO₄·5H₂O v destilované vodě (M_w = 249,69 g/mol), stabilní v lednici
 - roztok 5mM hematoxylinu v DMSO (M_w = 302,28 g/mol), stálý max. po dobu 5 hod.
- b) Před vlastním pokusem byly připraveny pracovní roztoky a roztoky testovaných látek:
 - Byl připraven základní 10mM roztok testované látky rozpuštěné v DMSO, který byl dále ředěn pomocí DMSO dle potřeby na nižší koncentrace.
 - Dále byl ze základního roztoku naředěn 250μM roztok Cu²⁺ ve vodě.
 - Byl naředěn 250μM roztok hematoxylinu v DMSO (roztok je stálý po dobu 90 minut).
- c) V tomto bodu, kdy započal vlastní experiment, bylo pipetováno do všech jamek 150 μl pufru o pH 7,5; 6,8 nebo 5,5.
- d) Do všech jamek bylo přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu²⁺ iontů.

- e) Dále bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci do označených testovacích jamek nebo rozpouštědla do kontrolních jamek (Obrázek 17).
- f) Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 2 minuty.
- g) V tomto kroku bylo přidáno 50 μl roztoku DMSO do spodních dvou řad destičky a poté stejné množství 250 μM hematoxylinu do vrchních dvou řad destičky (Obrázek 17).
- h) Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 3 minuty.
- i) Absorbance byla měřena při vlnové délce 610 nm (při pH 7,5)/590 nm (pH 6,8)/595 nm (pH 5,5) ihned (tedy v čase 3 minuty od provedení kroku g)) a poté v čase 5 min a 7 minut.



jamky s testovanou látkou

jamky kontrolní bez testované látky (DMSO)

jamky s indikátorem (HEM)

slepé vzorky (DMSO)

Složení měřeného roztoku:

150 μl	pufr
50 μl	⊙ Cu^{2+}
50 μl	⊙ testované látky/rozpouštědla
50 μl	⊙ HEM/DMSO

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

4.3.4 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:

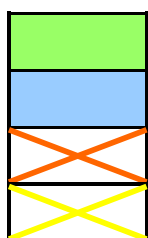
- 5mM základní roztok Cu^{2+} iontů a pracovní roztok 250 μM Cu^{2+} iontů v DMSO
- 5mM roztok Cu^+ iontů ve vodném roztoku 0,1M HCl a 1M NaCl a pracovní roztok 250 μM Cu^+ iontů v DMSO
- 10mM a 1mM HA

- 5mM BCS
- roztoky testovaných látek ředěné pomocí DMSO na příslušnou koncentraci

4.3.4.1 Postup pro stanovení chelatace mědných iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5)

- Na mikrotitrační destičku bylo do všech jamek pipetováno 100 μl žádaného pufru.
- Bylo přidáno 50 μl roztoku HA, pro pH 6,8 a 7,5 v koncentraci 1 mM nebo pro pH 4,5 a 5,5 v koncentraci 10 mM.
- Dále bylo do všech jamek pipetováno 50 μl 250 μM roztoku Cu^+ iontů v DMSO.
- Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 1 minutu.
- Poté bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci do testovacích jamek nebo rozpouštědla do kontrolních jamek (Obrázek 18).
- Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 2 minuty.
- Posledním krokem bylo přidání 50 μl 5mM roztoku BCS do horních nebo stejné množství vody do spodních jamek (Obrázek 18).
- Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm ihned po provedení kroku g) a po 5 min. (začátek měření v čase 4 min 30 s).

	⊙ testované látky c_1	⊙ testované látky c_2	⊙ testované látky c_3	⊙ testované látky c_x	kontrolní jamky ($c=0$)
jamky s indikátorem					
slepé vzorky					



- jamky s testovanou látkou
- jamky kontrolní bez testované látky (DMSO)
- jamky s indikátorem (BCS)
- slepé vzorky (VODA)

Složení měřeného roztoku:

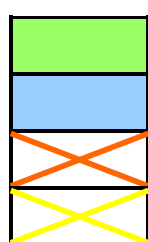
- 100 μl pufr
- 50 μl ⊙ HA
- 50 μl ⊙ Cu^+
- 50 μl ⊙ testované látky/rozpuštědla
- 50 μl ⊙ BCS/VODA

Obrázek 18: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^+ iontů v pufru.

4.3.4.2 Postup pro stanovení chelatace měďnatých iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5)

- Na mikrotitrační destičku bylo do všech jamek pipetováno 100 μl žádaného pufru.
- Poté bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci do testovacích jamek nebo rozpouštědla do kontrolních jamek (Obrázek 19).
- Dále bylo do všech jamek pipetováno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO.
- Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 2 minuty.
- Bylo přidáno 50 μl roztoku HA, pro pH 6,8 a 7,5 v koncentraci 1 mM nebo pro pH 4,5 a 5,5 v koncentraci 10 mM.
- Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 1 minutu.
- Posledním krokem bylo přidání 50 μl 5mM roztoku BCS do horních nebo stejné množství vody do spodních jamek (Obrázek 19).
- Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm ihned po provedení kroku g) a po 5 min. (začátek měření v čase 4 min 30 s).

	⊙ testované látky c_1	⊙ testované látky c_2	⊙ testované látky c_3	⊙ testované látky c_x	kontrolní jamky ($c=0$)
jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
slepé vzorky	X	X	X	X	X



jamky s testovanou látkou

jamky kontrolní bez testované látky (DMSO)

jamky s indikátorem (BCS)

slepé vzorky (VODA)

Složení měřeného roztoku:

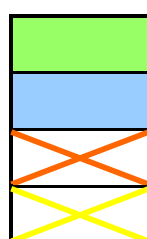
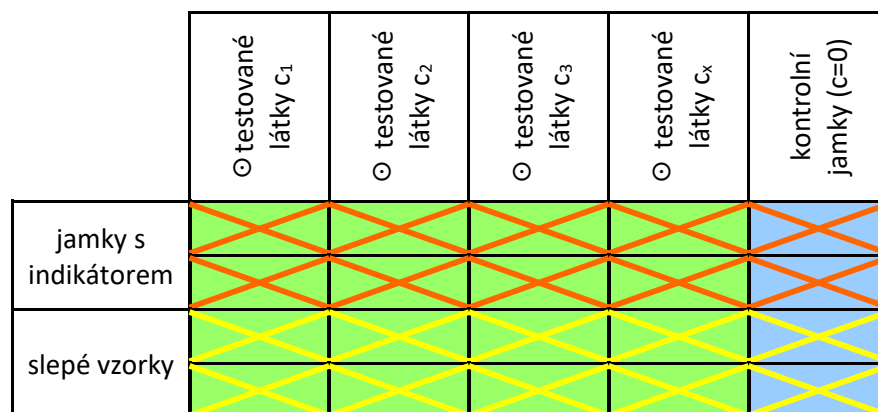
100 μl	pufr
50 μl	⊙ testované látky/rozpouštědla
50 μl	⊙ Cu^{2+}
50 μl	⊙ HA
50 μl	⊙ BCS/VODA

Obrázek 19: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^{2+} iontů v pufru.

4.3.4.3 Postup pro stanovení chelatace měďných iontů v DMSO

- Bylo pipetováno 100 μl roztoku testované látky o dané koncentraci v DMSO do testovacích jamek nebo rozpouštědla (DMSO) do kontrolních jamek (Obrázek 20).

- b) Bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku HA.
- c) Dále bylo do všech jamek pipetováno 50 μl 250 μM roztoku Cu^+ iontů v DMSO.
- d) Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 2 minuty.
- e) Posledním krokem bylo přidání 50 μl 5mM roztoku BCS do horních nebo stejné množství vody do spodních jamek (Obrázek 20).
- f) Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm ihned po provedení kroku e) a po 5 min. (začátek měření v čase 4 min 30 s).



jamky s testovanou látkou

jamky kontrolní bez testované látky (DMSO)

jamky s indikátorem (BCS)

slepé vzorky (VODA)

Složení měřeného roztoku:

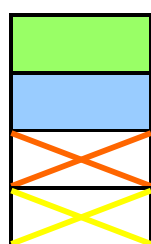
100 μl ⊙ testované látky v DMSO/DMSO
 50 μl ⊙ HA
 50 μl ⊙ Cu^+
 50 μl ⊙ BCS/VODA

Obrázek 20: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^+ iontů v DMSO.

4.3.4.4 Postup pro stanovení chelatace mědnatých iontů v DMSO

- a) Bylo pipetováno 100 μl roztoku testované látky o dané koncentraci v DMSO do testovacích jamek nebo rozpouštědla (DMSO) do kontrolních jamek (Obrázek 21).
- b) Dále bylo do všech jamek pipetováno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO.
- c) Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 2 minuty.
- d) Bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku HA.
- e) Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 1 minutu.
- f) Posledním krokem bylo přidání 50 μl 5mM roztoku BCS do horních nebo stejné množství vody do spodních jamek (Obrázek 21).
- g) Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm ihned po provedení kroku f) a po 5 min. (začátek měření v čase 4 min 30 s).

	⊙ testované látky c ₁	⊙ testované látky c ₂	⊙ testované látky c ₃	⊙ testované látky c _x	kontrolní jamky (c=0)
jamky s indikátorem	X	X	X	X	X
slepé vzorky	X	X	X	X	X



jamky s testovanou látkou

jamky kontrolní bez testované látky (DMSO)

jamky s indikátorem (BCS)

slepé vzorky (VODA)

Složení měřeného roztoku:

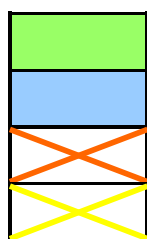
100 μl	⊙ testované látky v DMSO/DMSO
50 μl	⊙ Cu ²⁺
50 μl	⊙ HA
50 μl	⊙ BCS/VODA

Obrázek 21: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu²⁺ iontů v DMSO.

4.3.4.5 Postup pro stanovení redukce měďnatých iontů v pufru (pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5)

- Na mikrotitrační destičku bylo do všech jamek pipetováno 100 μl žádaného pufru.
- Poté bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci/rozpuštědla do testovacích jamek nebo 50 μl 1mM (u pH 6,8 a 7,5)/10mM (u pH 4,5 a 5,5) roztoku HA do kontrolních jamek (Obrázek 22).
- Dále bylo do všech jamek pipetováno 50 μl 250 μM roztoku Cu²⁺ iontů v DMSO.
- Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 2 minuty.
- Posledním krokem bylo přidání 50 μl 5mM roztoku BCS do horních nebo stejné množství vody do spodních jamek (Obrázek 22).
- Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm ihned po provedení kroku g) a po 5 min. (začátek měření v čase 4 min 30 s).

	⊙ testované látky c_1	⊙ testované látky c_2	⊙ testované látky c_x	rozpouštědlo	kontrolní jamky (HA)
jamky s indikátorem					
slepé vzorky					



jamky s testovanou látkou

jamky kontrolní bez testované látky (DMSO)

jamky s indikátorem (BCS)

slepé vzorky (VODA)

Složení měřeného roztoku:

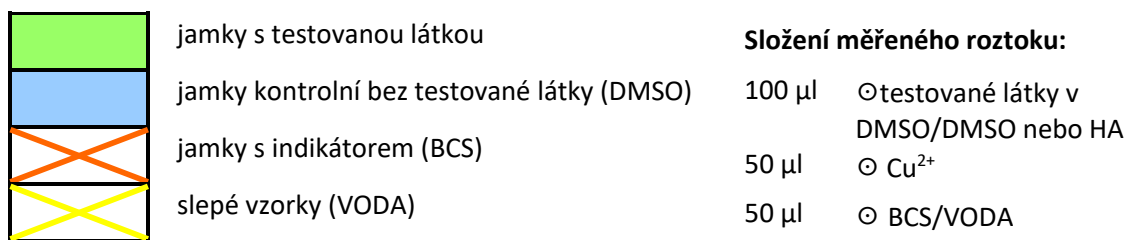
100 μ l	puf
50 μ l	⊙ testované látky/rozpouštědlo nebo ⊙ HA
50 μ l	⊙ Cu^{2+}
50 μ l	⊙ BCS/VODA

Obrázek 22: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Cu^{2+} iontů v pufu.

4.3.4.6 Postup pro stanovení redukce měďnatých iontů v DMSO

- Bylo pipetováno 100 μ l roztoku testované látky o dané koncentraci v DMSO nebo rozpouštědla DMSO do testovacích jamek nebo 100 μ l 1mM roztoku HA do kontrolních jamek (Obrázek 23).
- Dále bylo do všech jamek pipetováno 50 μ l 250 μ M roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO.
- Mikrotitrační destička byla vložena do třepačky na 2 minuty.
- Posledním krokem bylo přidání 50 μ l 5mM roztoku BCS do horních nebo stejné množství vody do spodních jamek (Obrázek 23).
- Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm ihned po provedení kroku d) a po 5 min. (začátek měření v čase 4 min 30 s).

	⊙ testované látky c_1	⊙ testované látky c_2	⊙ testované látky c_x	rozpouštědlo	kontrolní jamky (HA)
jamky s indikátorem					
slepé vzorky					



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

4.3.5 Statistická analýza

Pro výpočet množství nezchelatované či redukované mědi bylo třeba stanovit rozdíly absorbancí mezi testovanou látkou (s indikátorem HEM/BCS) a slepým vzorkem (bez indikátoru HEM/BCS). Výsledek byl dělený rozdílem kontrolního vzorku a jeho slepého vzorku. Tím bylo zjištěno množství nezchelatované mědi. Pro zjištění množství chelatované mědi, byla hodnota nezchelatované mědi odečtena od 100 %.

Analýza chelatace byla provedena v programech MS Excel a GraphPad Prism verze 8 pro Windows (GraphPad Software, USA). Z výsledků zpracovaných dat byl stanoven průměr \pm směrodatná odchylka

vypočítaná dle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$.

K porovnání účinnosti jednotlivých chelátorů bylo nutné srovnat 95% konfidenční (predikční) intervaly chelatačních křivek.

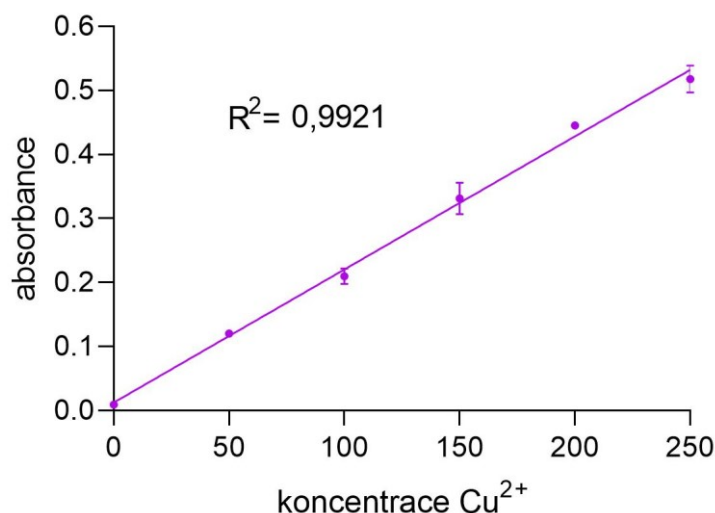
K provedení statistické analýzy a zpracování výsledků redukce byl využit program MS Excel. Statistická analýza byla provedena pomocí t-testu, kde byly porovnány hodnoty oproti negativní kontrole (spontánní redukce). Účinky jednotlivých látek byly porovnány pomocí přímek lineární regrese s 95% konfidenčními intervaly.

Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism verze 8 pro Windows.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kalibrační křivka

Z hodnot absorbancí získaných z provedených měření byla sestrojena křivka závislosti naměřené absorbance na koncentraci (Obrázek 24). Na sestrojení grafu byly použity měďnaté ionty v koncentraci 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM a 250 μM . Sestrojená kalibrační křivka vykazuje lineární trend závislosti absorbance na koncentraci měďnatých iontů.



Obrázek 24: Kalibrační křivka měďnatých iontů.

5.2 Chelatace iontů mědi

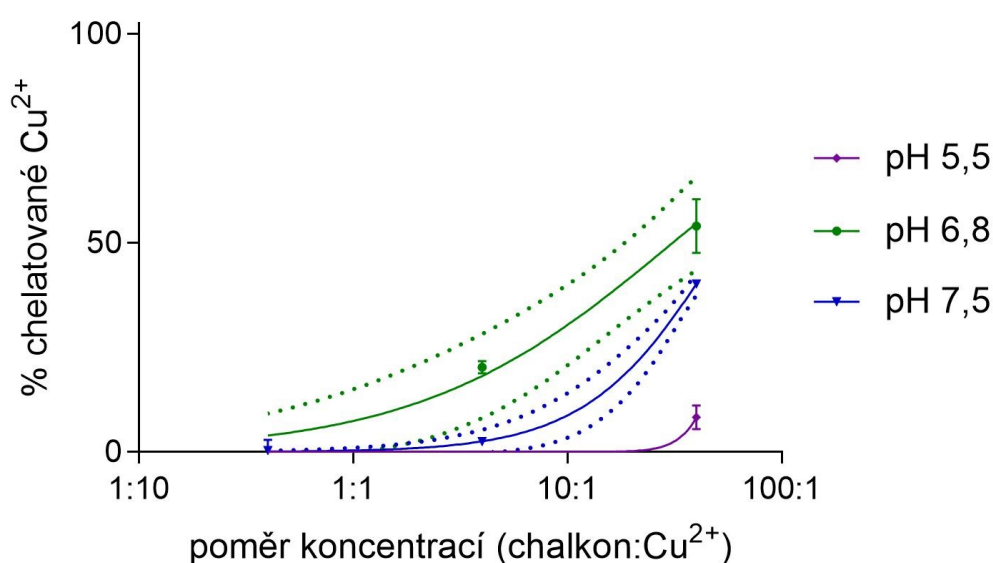
Měření chelatace iontů mědi bylo provedeno rychlou a levnou metodou za použití spektrofotometru.[92] K měření pomocí kompetitivní metody byly použity dva typy indikátorů: disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) a hematoxylin (HEM). Zatímco použití HEM je vhodné pro základní zjištění schopnosti chelatace a návrh stechiometrie komplexu u aktivních chelátorů, indikátor BCS je mimo to i silným chelátorem měďných iontů a kompetuje se zkoušenou látkou při tvorbě komplexů. Díky tomu lze posoudit stabilitu komplexů a tím i účinnost chelátoru.[46]

5.2.1 Stanovení chelatace mědi pomocí hematoxylinu

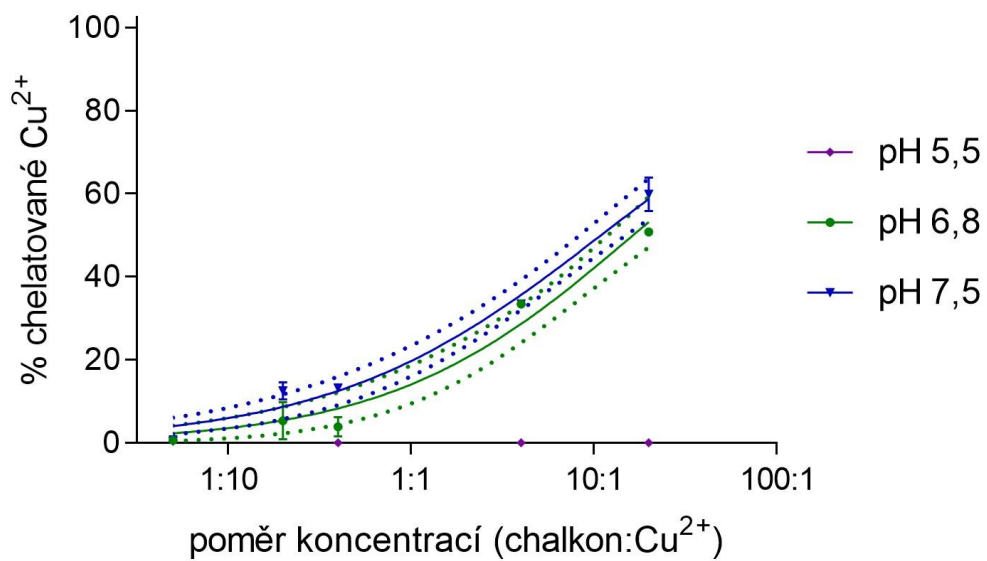
Hematoxylin je méně kompetitivním indikátorem a reaguje pouze s Cu^{2+} ionty. Tato metoda je charakteristická snižující se afinitou HEM k mědi se snižujícím se pH a je nemožné ji použít v prostředí o pH 4,5. Při pH 7,5 tvoří stabilní komplexy s mědí pouze velmi aktivní chelátory, protože afinita mědi k hematoxylinu je vysoká. Při pH 6,8 a 5,5 se afinita HEM k Cu^{2+} snižuje a lze měřit i méně aktivní chelátory a stanovit stechiometrii chelatace.[46, 92]

Následující grafy zobrazují chelatační aktivitu jednotlivých látek stanovenou pomocí hematoxylinu. Na ose Y je procentuálně vyjádřena schopnost daného chalkonu/dihydrochalkonu chelatovat Cu^{2+} ionty a body na ose X značí poměry koncentrací chalkonů/dihydrochalkonů a Cu^{2+} iontů. Látky naředěné do příslušných koncentrací byly měřeny při pH 5,5; 6,8 a 7,5 představující různá prostředí v těle. Absorbance byla měřena ihned (v čase 3 minuty) po přidání indikátoru/vody a poté v čase 5 a 7 minut. Grafy zachycují výsledky v čase 7 min.

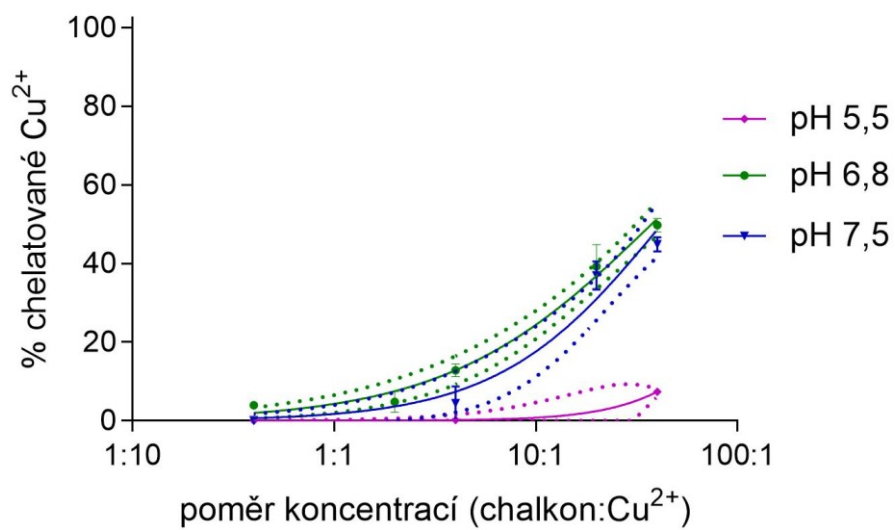
Chelatační aktivitu vykázaly všechny zkoušené látky (Obrázek 25-30). U některých látek s velmi nízkou aktivitou (v pH 5,5) nebylo možné vytvořit konfidenční intervaly.



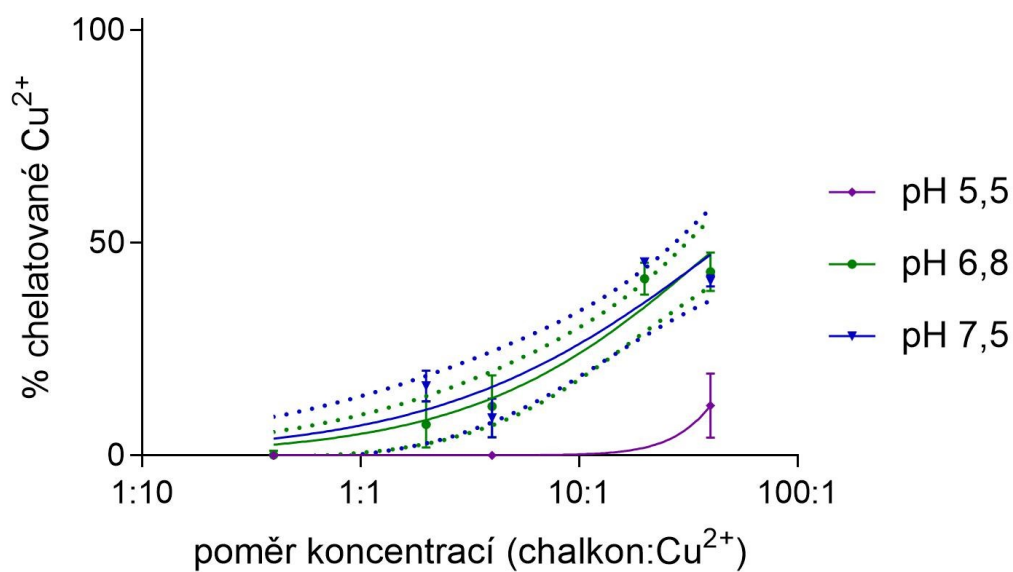
Obrázek 25: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů isoliquiritigeninem metodou s využitím hematoxylinu.



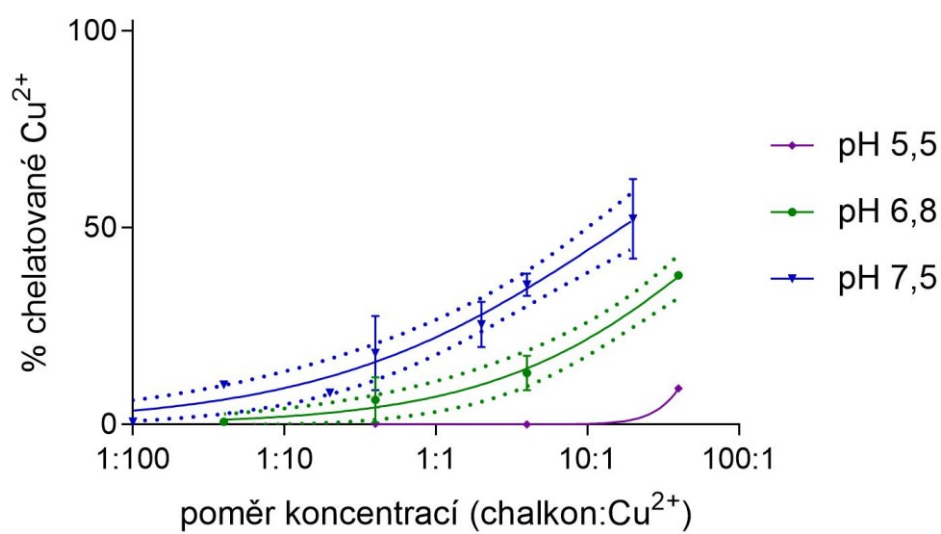
Obrázek 26: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů likochalkonem A metodou s využitím hematoxylinu.



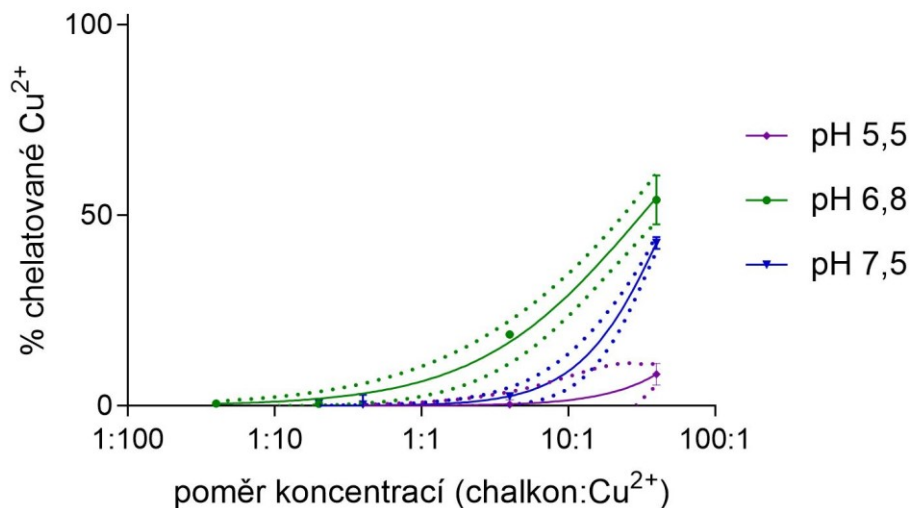
Obrázek 27: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů naringinem DHC metodou s využitím hematoxylinu.



Obrázek 28: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů neohesperidinem DHC metodou s využitím hematoxylinu.



Obrázek 29: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů florizinem metodou s využitím hematoxylinu.



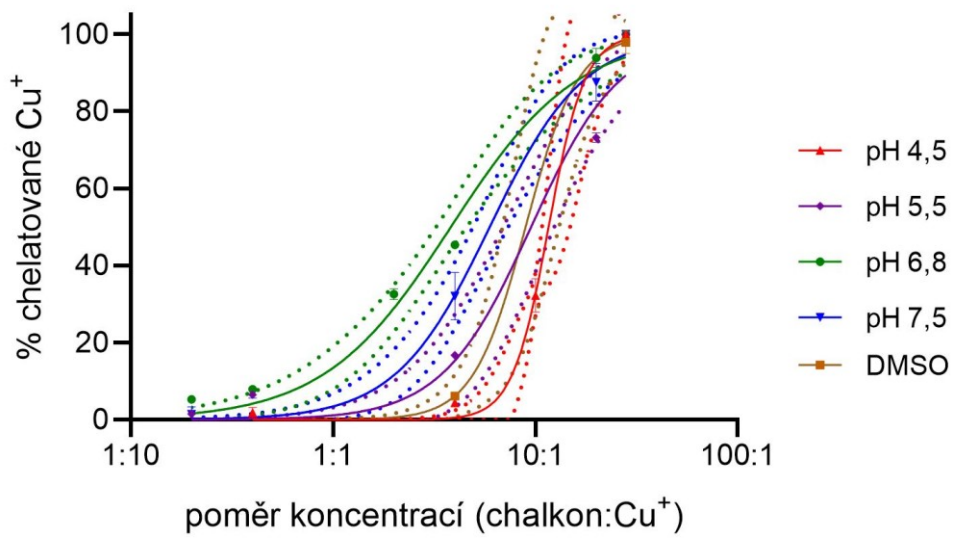
Obrázek 30: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů floretinem metodou s využitím hematoxylinu.

5.2.2 Stanovení chelatace mědi pomocí BCS

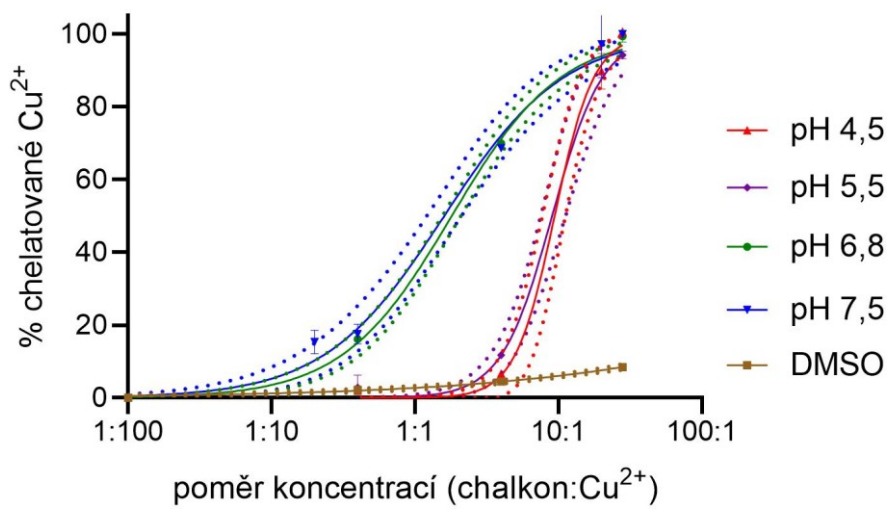
Další metodou bylo stanovení chelatace chalkonů/dihydrochalkonů pomocí více kompetitivního indikátoru BCS. V případě měření BCS byl oproti HEM přidáván hydroxylamin (HA). Při měření měďných iontů byl HA přidáván před roztoky mědi, aby měď udržel v redukovaném stavu. U stanovení měďnatých iontů byl HA přidán až po roztoku mědi, za účelem redukce nezreagovaných měďnatých iontů.[46]

Následující grafy zobrazují chelatační aktivitu jednotlivých látek stanovovanou pomocí BCS. Na ose Y je procentuálně vyjádřená schopnost daného chalkonu/dihydrochalkonu chelatovat Cu⁺/Cu²⁺ ionty a body na ose X značí poměry koncentrací chalkonů/dihydrochalkonů a Cu⁺/Cu²⁺ iontů. Látky naředěné do příslušných koncentrací byly měřeny při pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5 představující různá prostředí v těle a také v nepufrovaném prostředí DMSO. Absorbance byla měřena ihned po přidání indikátoru/vody a po 5 minutách.

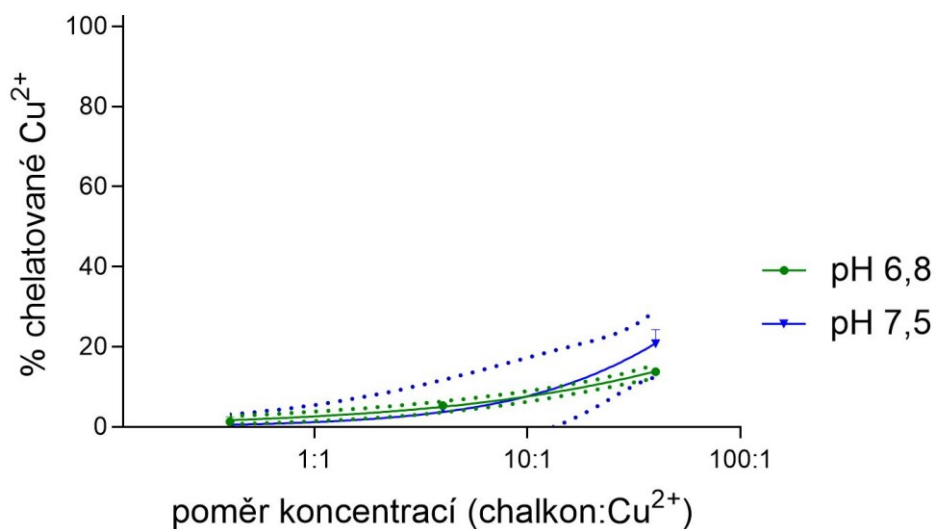
Chelatační aktivita v prostředí BCS (Obrázek 31-34) u Cu⁺ i Cu²⁺ iontů byla zjištěna u likochalkonu A ve všech pufrch i v prostředí DMSO. Dále byla naměřena nízká chelatační aktivita v případě Cu²⁺ iontů u isoliquiritigeninu (při pH 7,5 a 6,8) a floretinu (pouze u pH 7,5). V případě floretinu nebylo možné z naměřených hodnot sestavit konfidenční interval.



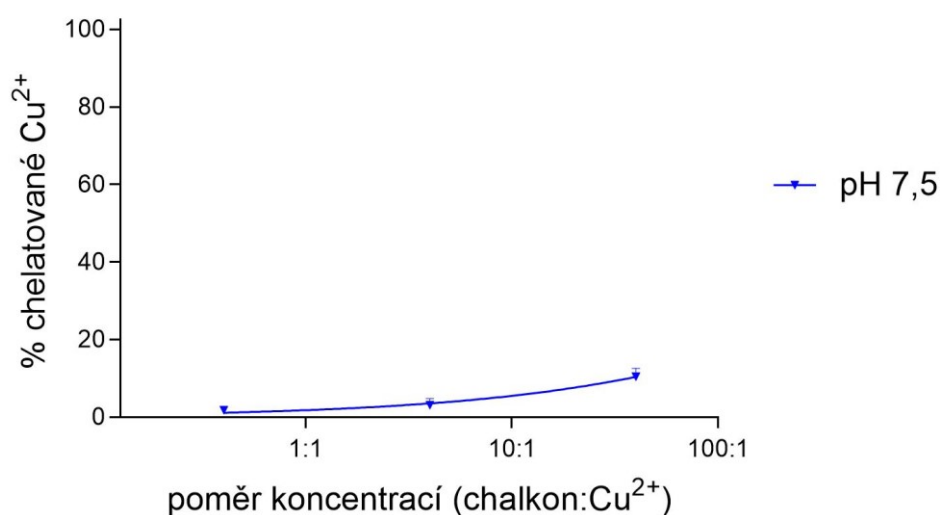
Obrázek 31: Grafické znázornění chelatace měďných iontů likochalkonem A metodou s využitím BCS.



Obrázek 32: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů likochalkonem A metodou s využitím BCS.



Obrázek 33: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů isoliquiritigeninem metodou s využitím BCS.



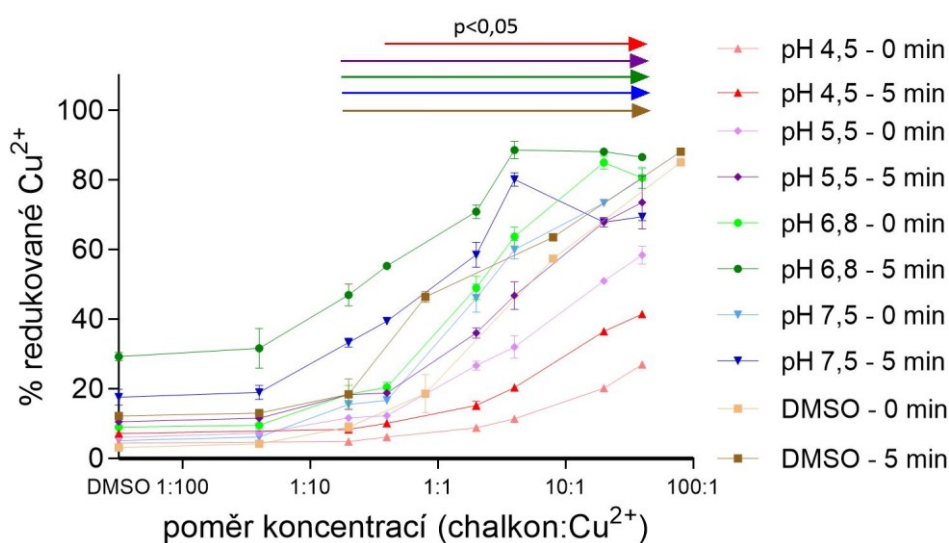
Obrázek 34: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů floretinem metodou s využitím BCS.

5.3 Redukce iontů mědi

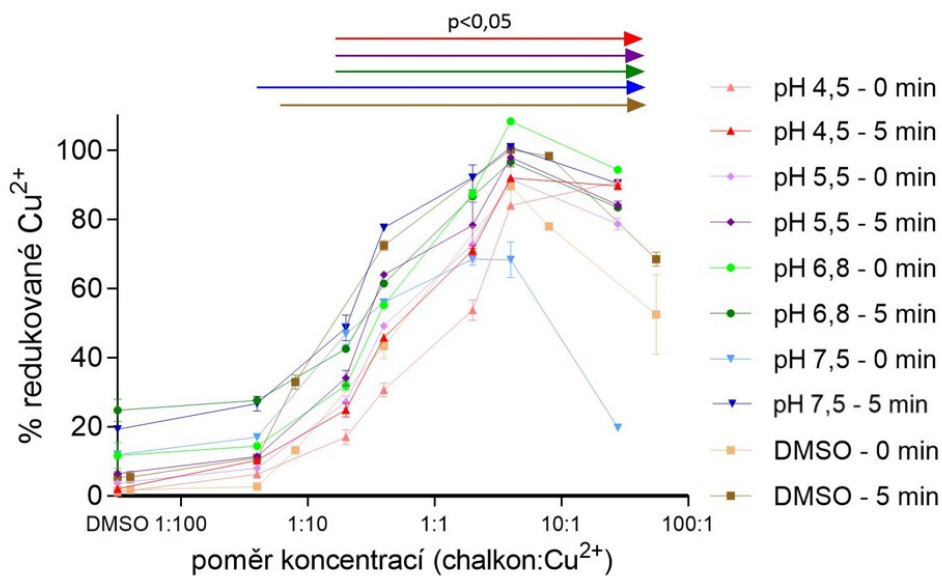
U dvou látek ze skupiny chalkonů a čtyř ze skupiny dihydrochalkonů bylo dále provedeno stanovení redukčních schopností pomocí BCS. Protože jsou ionty mědi v oxidovaném stavu Cu^{2+} , není možná jejich interakce s indikátorem (BCS tvoří komplexy pouze s Cu^+ ionty). Testovaná látka proto musí být schopna měďnaté ionty redukovat na měďné, které jsou schopné s indikátorem rychle utvořit barevný komplex měřitelný spektrofotometricky.[99] Jako pozitivní kontrola slouží jamky, kde na místo zkoušené látky pipetujeme hydroxylamin, jenž zaručuje 100% redukci iontů mědi.[100]

Následující grafy zobrazují redukční aktivitu jednotlivých látek stanovovanou pomocí BCS. Na ose Y je procentuálně vyjádřená schopnost daného chalkonu/dihydrochalkonu redukovat Cu^{2+} ionty a body na ose X značí poměry koncentrací chalkonů/dihydrochalkonů a Cu^{2+} iontů. Látky naředěné do příslušných koncentrací byly měřeny při pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5 simulujících fyziologické a patofyziologické tělní pochody a v nepufrovaném prostředí DMSO. Absorbance byla měřena ihned po přidání indikátoru/vody a po 5 minutách. Šipky označují hodnoty, které se statisticky významně ($p < 0,05$) liší od negativní kontroly (spontánní redukce).

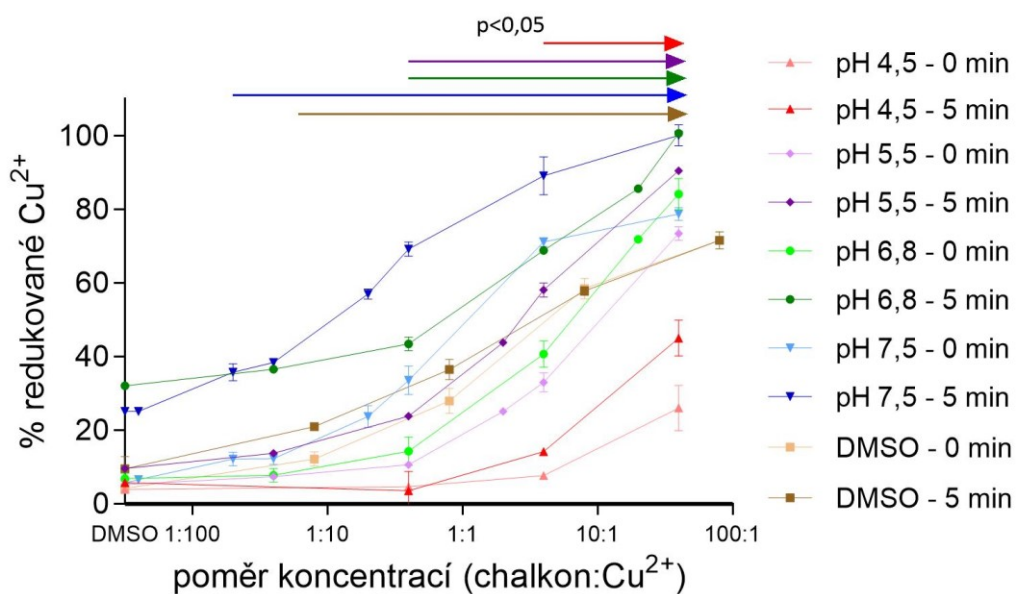
Měřitelná redukční aktivita v prostředí BCS s Cu^{2+} ionty byla zjištěna u všech zkoumaných látek (Obrázek 35-40).



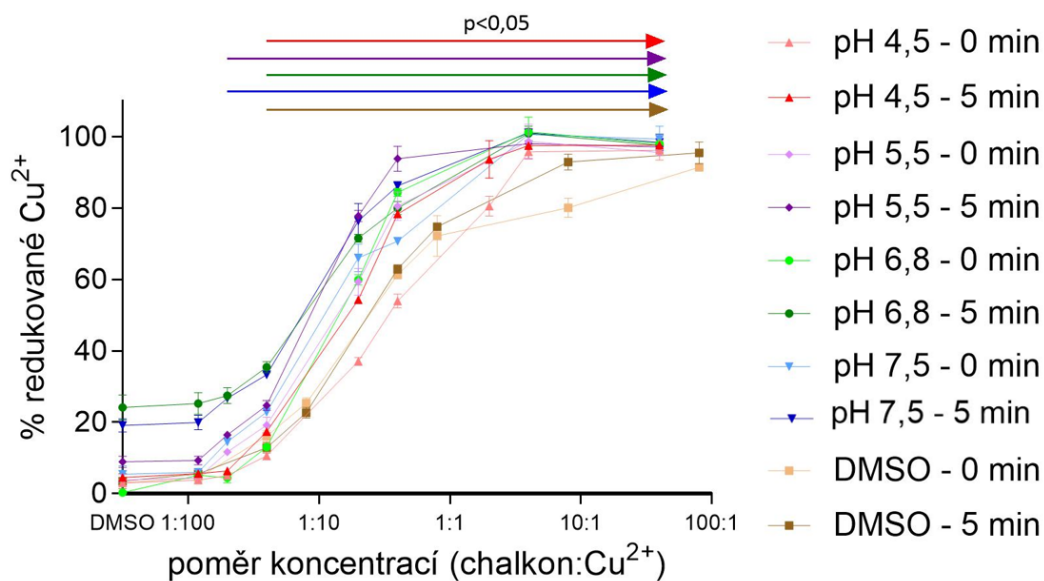
Obrázek 35: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí isoliquiritigeninu.



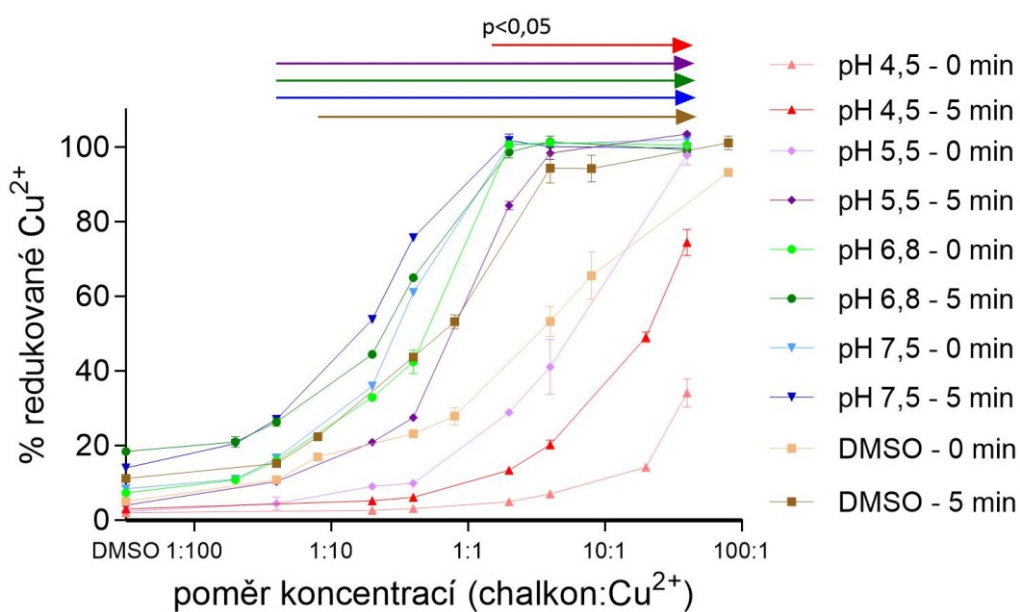
Obrázek 36: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí likochalkonu A.



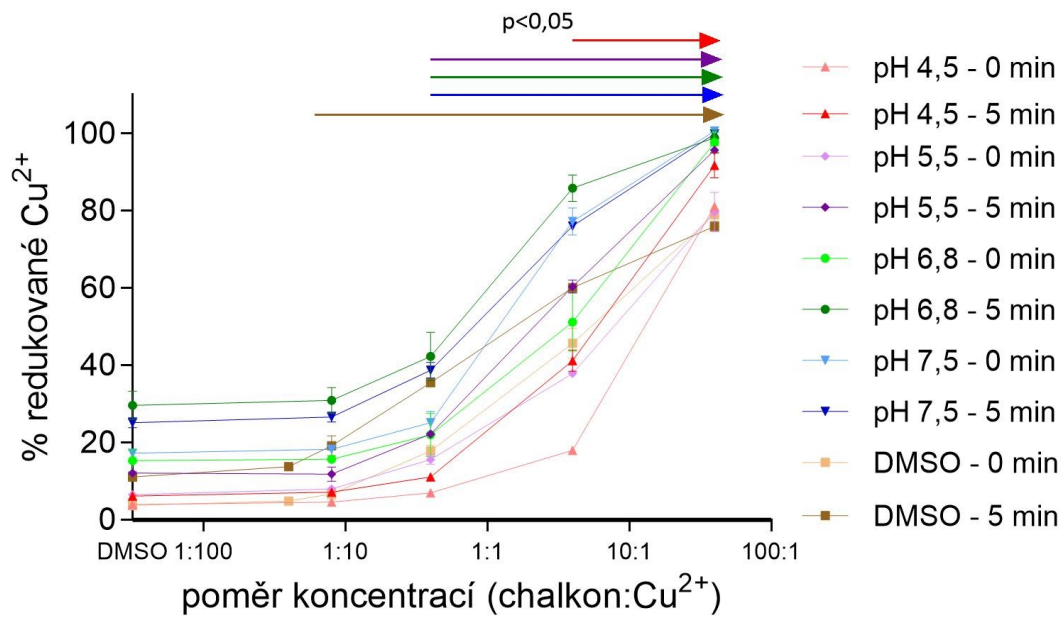
Obrázek 37: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí naringinu DHC.



Obrázek 38: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí neohesperidinu DHC.



Obrázek 39: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí fletininu.

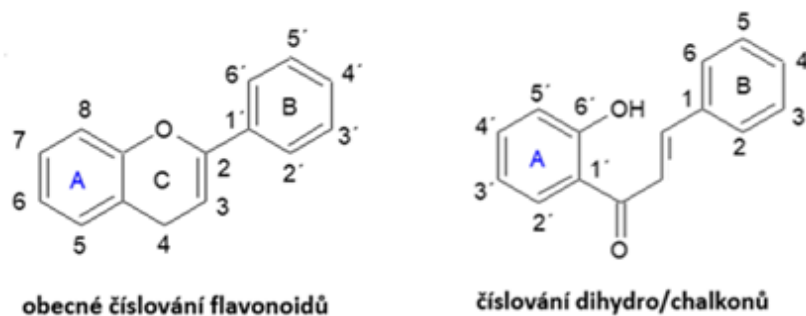


Obrázek 40: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí florizinu.

6 DISKUSE

Cílem této práce bylo stanovit chelatační a redukční aktivitu 6 látek ze skupiny flavonoidů s otevřeným kruhem C. Glykosidy naringin dihydrochalkon, neohesperidin dihydrochalkon, florizin a aglykon floretin patří do skupiny dihydrochalkonů, kde je řetězec spojující kruhy A a B nasycený. Testovány byly i isoliquiritigenin a likochalkon A zastupující skupinu chalkonů, které se vyznačují dvojnou vazbou na spojovacím řetězci. Kromě těchto základních rozdílů se liší i jinými substituenty.

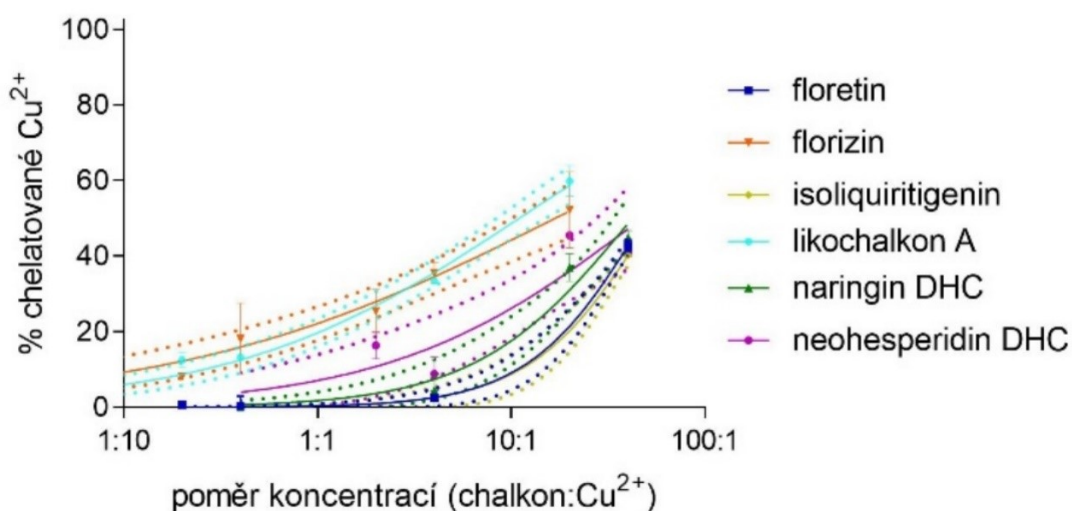
Nejprve byla ověřována schopnost chelatace v méně kompetitivním prostředí hematoxylinu. Jak už bylo zmíněno výše, tato metoda se na rozdíl od BCS hodí k navržení stechiometrie komplexů a zjištění chelatačního působení i při tvorbě nestabilních komplexů.[46] Mezi struktury spojené s významnou chelatací mědi u flavonoidů patří 5,6,7-trihydroxyl nebo 6,7-dihydroxyl, 3',4'-dihydroxyl, 3-hydroxyl-4-keto nebo 5-hydroxy-4-keto skupina.[46] Při porovnání aktivity chalkonů a flavonoidů je třeba vzít v úvahu odlišné číslování struktur (Obrázek 41). Žádná z testovaných látek nemá ve své struktuře hydroxylové skupiny v poloze ortho, které jsou u flavonoidů spojovány s významnější aktivitou, což může být důvodem nízké aktivity testovaných látek.



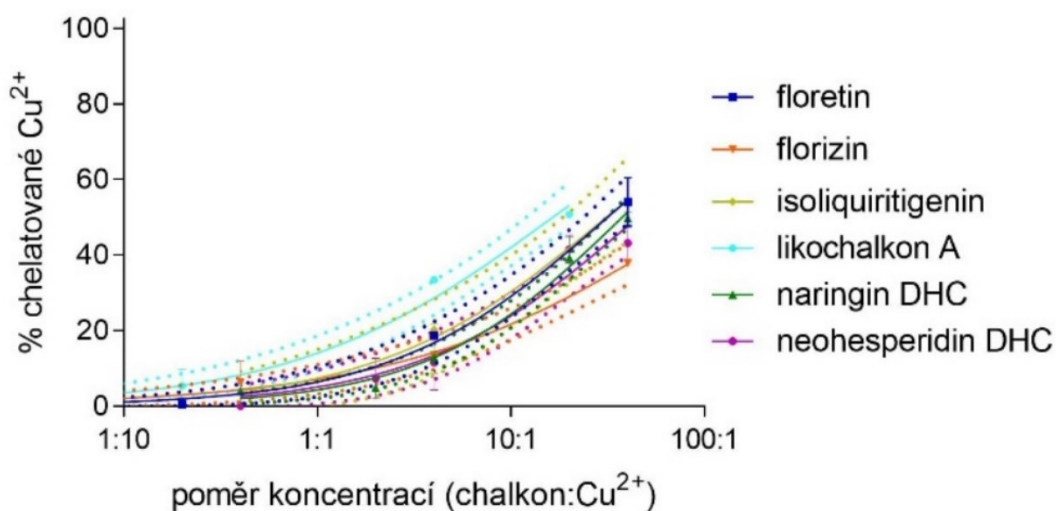
Obrázek 41: Rozdíl v číslování struktur s uzavřeným a otevřeným kruhem C. Upraveno[101]

Všechny testované látky vykazaly chelatační aktivitu a většina z nich dosahovala nejvyšší chelatace při pH 6,8, při pH 5,5 nevykázaly látky žádnou nebo jen velmi nízkou chelatační aktivitu. Výjimku tvořil florizin, který byl nejúčinnější při pH 7,5 a neohesperidin DHC s likochalkonem A, kde se chelatace při pH 6,8 a 7,5 významně nelišila (Obrázek 42 a 43). Při pH 7,5 nejvyšších hodnot dosahoval likochalkon A, který měl při poměru látka:Cu²⁺ ionty 10:1 chelataci okolo 50 % a florizin se srovnatelnými hodnotami. Ostatní látky chelatovaly při poměru 10:1 z 30 % či méně. Převědeme-li strukturní požadavky pro chelataci známé u flavonoidů s uzavřeným kruhem C na látky s kruhem otevřeným testované v této práci, tak preferovaná vazebná místa pro chelataci mědi zahrnují keto skupinu na řetězci spojujícím jádra A a B spolu s 2'-OH skupinou na kruhu A.[46, 102] S ohledem na tyto strukturní požadavky je překvapující, že nejvyšších hodnot chelatace dosahovaly struktury, které jako jediné

nemají 2'-OH volnou (glykosidová vazba florizinu) či ji nemají vůbec (likochalkon A). I v literatuře najdeme tvrzení, že chelatační aktivita je snižena, pokud je keto skupina v molekule bez přítomnosti 2'-OH.[103] Pro zjištění vazebných míst u těchto látek by bylo třeba provést další pokusy. Srovnáme-li aktivitu naringinu DHC a florizinu, které se liší polohou a velikostí glykosidově vázané cukerné složky, zdá se, že o-glykosilace v poloze 2' (florizin) vede k mírně vyšší chelataci oproti poloze 4' (naringin DHC). Flavanony (naringin, hesperidin a jejich glykosidy), které nemají 2,3-dvojnou vazbu a hydroxy-skupinu v poloze 3, mají ve srovnání s ostatními flavonoidy nízkou chelatační aktivitu, což platí i pro analogické chalkony (naringin DHC, neohesperidin DHC, floretin a florizin).[46]



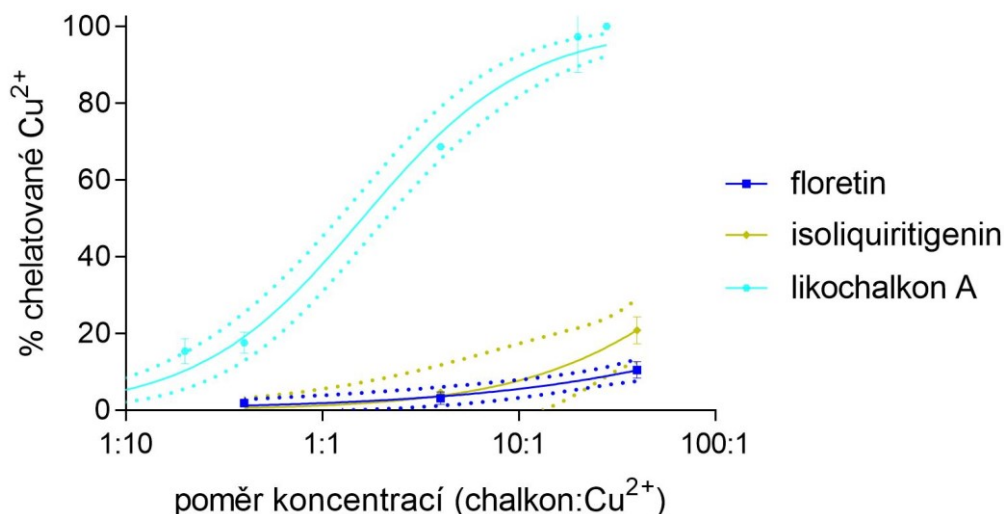
Obrázek 42: Porovnávací graf chelatace při pH 7,5 v prostředí hematoxylinu.



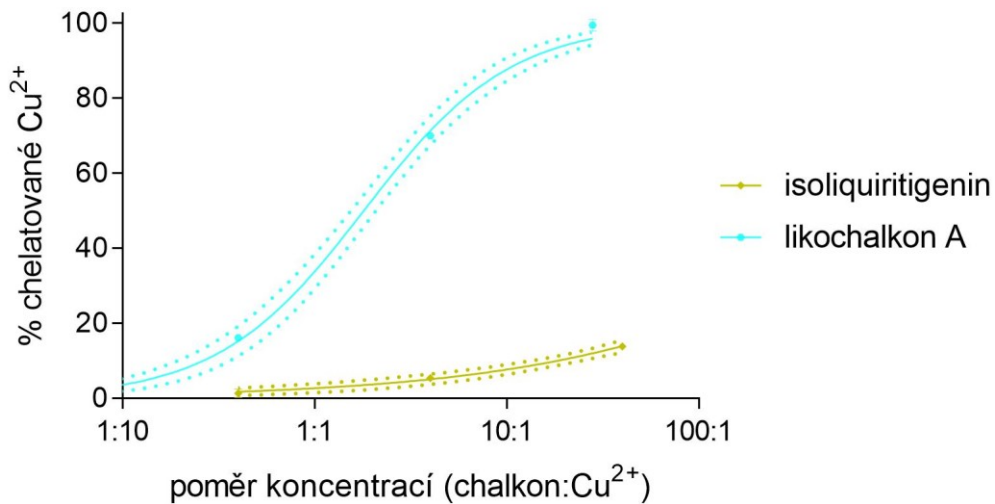
Obrázek 43: Porovnávací graf chelatace při pH 6,8 v prostředí hematoxylinu.

Při měření chelatace v kompetitivním prostředí indikátoru BCS, který je mimo to i chelátorem mědi, svou aktivitu mohly dokázat pouze silné chelátory, které tvořily stabilní komplexy s mědí.[46] Při pH 7,5 vykázaly měřitelnou chelatační aktivitu vůči měďnatým iontům likochalkon A, isoliquiritigenin a floretin (Obrázek 32-34). Isoliquiritigenin i likochalkon A strukturně patří mezi chalkony s dvojnou vazbou. Jelikož je dvojná vazba v literatuře považována za prvek zvyšující planaritu zásahem do π elektronového systému a umožňující tvorbu stabilních komplexů, můžeme ji považovat za důležitý prvek pro reaktivitu v kompetitivním prostředí BCS.[46] Isoliquiritigenin a floretin při nejvyšším pH (poměr 10:1) jevíly chelatační aktivitu do 10 %. Při nižších pH pak chelatoval pouze likochalkon A, stejně jako v případě chelatace měďných iontů (Obrázek 31) a při pH 6,8 vykázal mírnou chelatační aktivitu vůči měďnatým iontům isoliquiritigenin.

Porovnáme-li hodnoty chelatace u jednotlivých látek v kompetitivním prostředí BCS (Obrázek 44 a 45), nejlepším chelátorem je jednoznačně likochalkon A, který jako jediný dokázal chelatovat Cu^{2+} i Cu^+ ionty. Při měření chelatace měďných iontů likochalkonem A při všech pH i v nepufrovaném prostředí rozpouštědla DMSO v poměru 10:1 nevykazují hodnoty chelatace v těchto prostředích statisticky významný rozdíl (Obrázek 31). V případě měření chelatace likochalkonu A s měďnatými ionty v poměru 10:1 ale byl nalezen rozdíl mezi měřením v pH 6,8 a 7,5 (hodnoty dosahovaly 90 %) a kyseljším prostředím o pH 4,5 a 5,5 (hodnoty dosahovaly přibližně 55 %). V rozpouštědle DMSO byla zaznamenána chelatace do 10 % (Obrázek 32).

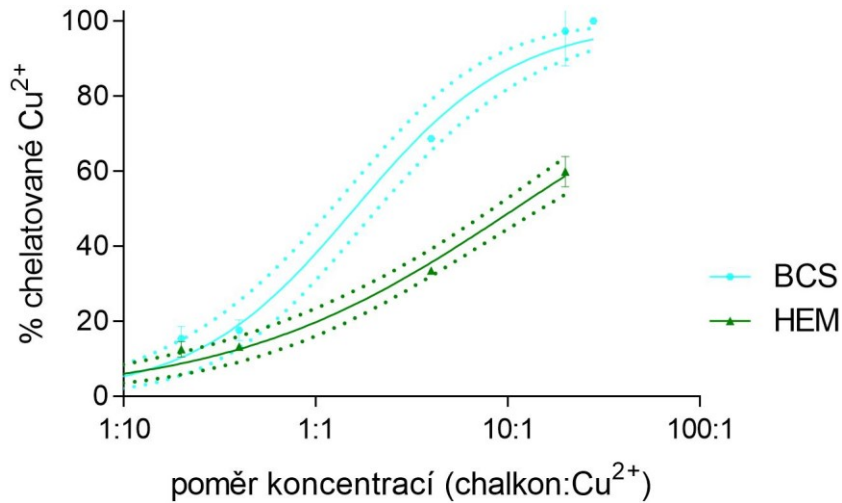


Obrázek 44: Porovnávací graf chelatace při pH 7,5 v prostředí BCS.



Obrázek 45: Porovnávací graf chelatace při pH 6,8 v prostředí BCS.

V prostředí BCS látky obvykle vykazují nižší aktivitu v porovnání s prostředím HEM, protože v kompetitivním prostředí BCS jsou měřeny pouze stabilní komplexy látky s kovem. Je tedy zvláštní, že likochalkon A vykazoval v prostředí BCS aktivitu vyšší než v prostředí HEM (Obrázek 46). Pro objasnění této situace je třeba provést další experimenty.



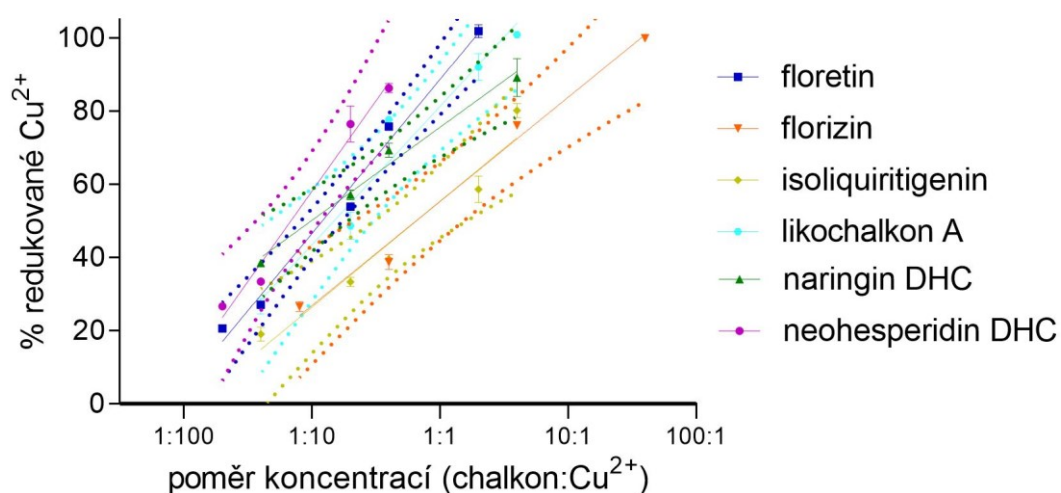
Obrázek 46: Porovnávací graf chelatace likochalkonu A v prostředí HEM a BCS při pH 7,5.

Redukční schopnost chalkonů a dihydrochalkonů byla stanovena pomocí indikátoru BCS. Tento indikátor má schopnost tvořit komplexy pouze s redukovanými Cu⁺ ionty. Vzniklé barevné komplexy jsou měřeny spektrofotometricky.[46, 92] Ve všech studiích zabývajících se redukční aktivitou flavonoidů byla prokázána vyšší redukční schopnost vůči měďnatým iontům než vůči iontům železitým.

Tento fakt je spojen s nižší hodnotou standardního redukčního potenciálu páru $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ s hodnotou +0.15 V oproti $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ s hodnotou + 0.77 V.[102] Podle provedených výzkumů na různých skupinách flavonoidů redukční vlastnosti nejvíce ovlivňuje počet a uspořádání hydroxylových skupin.[104, 105]

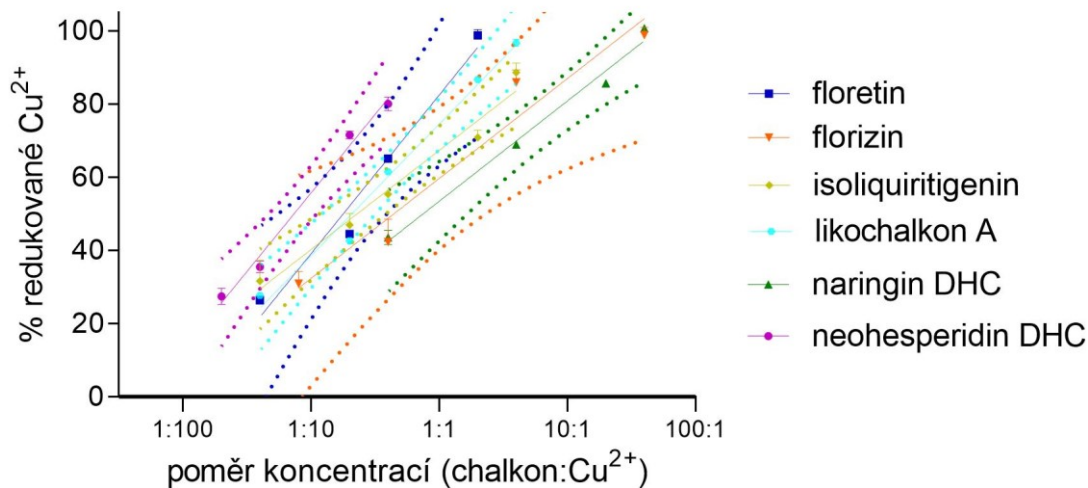
Všechny testované látky byly schopny redukovat měďnaté ionty (Obrázek 35-40). U likochalkonu A, neohesperidinu DHC a florizinu nedošlo k statisticky významným rozdílům v redukcí při měření v prostředích o různém pH či v prostředí DMSO. U isoliquiritigeninu v poměru 10:1 bylo pozorovatelné snížení aktivity při pH 4,5 oproti ostatním pH či v prostředí DMSO (Obrázek 35). V případě naringinu se redukční aktivita významně liší mezi pH 6,8; 7,5 a prostředím DMSO; pH 5,5. Nejnižší redukce dosahuje při pH 4,5 (Obrázek 37). Floretin redukoval měďnaté ionty méně při pH 4,5 oproti ostatním pH a DMSO (Obrázek 39). Jak bylo zjištěno dříve, při všech podmínkách stačilo na vytvoření komplexů 5 min., poté už změny nenastaly. Nejvyšší hodnoty redukce proto můžeme obvykle čekat právě po uplynutí této doby.[92] Likochalkon A dosahoval k maximálním hodnotám redukce téměř ve všech prostředích, přičemž redukce se po dosažení maxima začala opět snižovat. Důvodem je vztah mezi redukcí a chelatací. Flavonoidy redukují ionty kovu a ty se podílejí na prooxidačních reakcích a vzniku reaktivních forem kyslíku. Když je kov flavonoidem chelatovaný, stává se tak neaktivním pro redukcí. Proto snížení redukce po dosažení maxima napovídá tomu, že část iontů byla chelatována.[102]

Při pH 7,5 (Obrázek 47) za použití konfidenčních intervalů bylo zjištěno, že do koncentrace 1:1 se v tomto prostředí rozdílly ve struktuře při redukcí výrazně neprojevíly. Při koncentraci vyšší než 1:1 se odlišily podobné hodnoty redukce isoliquiritigeninu a florizinu oproti výrazněji redukujícím likochalkonu a floretinu.



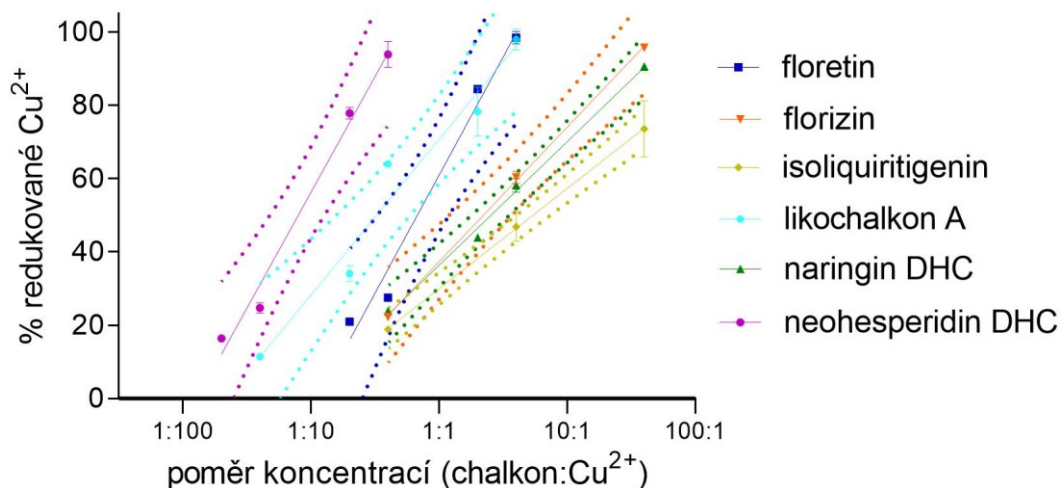
Obrázek 47: Porovnávací graf redukce při pH 7,5 v prostředí BCS.

V prostředí o pH 6,8 nejvyšších hodnot dosahoval glykosid neohesperidin DHC a významně se lišila jeho redukční aktivita oproti glykosidu naringinu DHC a glykosidu florizinu se srovnatelnými hodnotami redukce (Obrázek 48). Hydroxylové skupiny v poloze 3 a 4 kruhu B tvoří tzv. katecholovou strukturu, která má velký redukční potenciál.[102] U neohesperidinu DHC sice tato struktura není (jedna hydroxylová skupina je methylovaná), nicméně i stericky bráněné katecholové uspořádání zřejmě zvyšuje aktivitu neohesperidinu DHC oproti ostatním glykosidům. Při nižších pH je rozdíl lépe patrný.



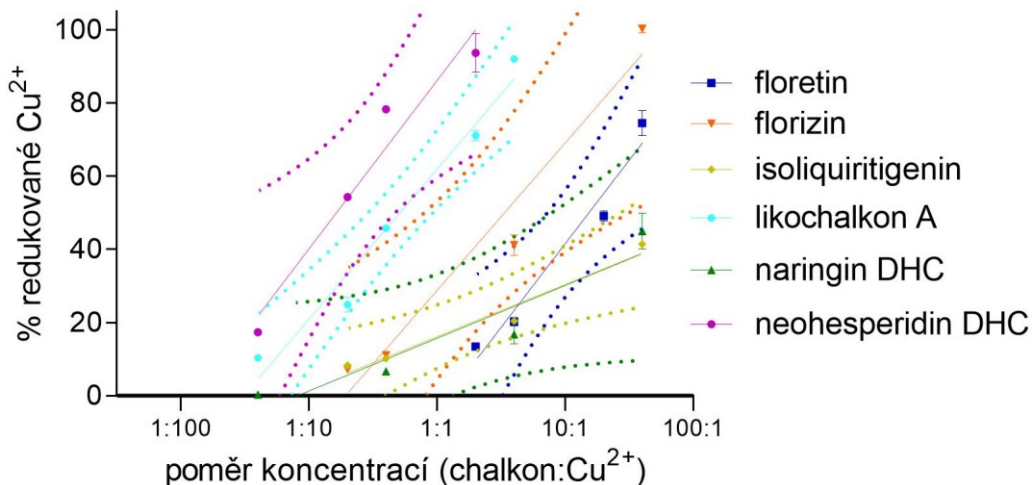
Obrázek 48: Porovnávací graf redukce při pH 6,8 v prostředí BCS.

Neohesperidin DHC opět patřil mezi významně chelatující látky při pH 5,5 spolu s likochalkonem A (Obrázek 49). Zřetelně nižší aktivity měl isoliquiritigenin, florizin a naringin. Floretin se strukturně liší od naringinu DHC a florizinu pouze absencí o-glykosilace. V literatuře je zmíněno, že blokáce hydroxylových skupin pomocí navázání cukru snižuje redukční potenciál.[99] Pravděpodobně je to důvod proč glykosidy naringin DHC a florizin byly schopné redukovat kov až při vyšších koncentracích.



Obrázek 49: Porovnávací graf redukce při pH 5,5 v prostředí BCS.

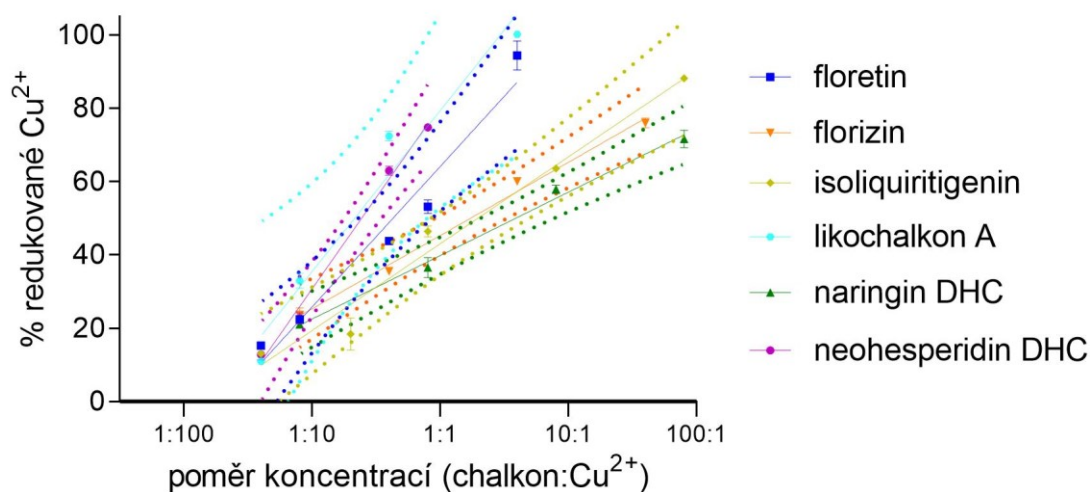
Při pH 4,5 byly nejvíce redukujícími strukturami neohesperidin DHC a likochalkon A. Aktivita neohesperidinu DHC je v těchto podmínkách výrazně vyšší než u ostatních dihydrochalkonů. Likochalkon A oproti isoliquiritigeninu ze stejné skupiny měl viditelně vyšší redukční aktivitu. Floretin v tomto prostředí redukuje viditelně méně než v jiných podmínkách.



Obrázek 50: Porovnávací graf redukce při pH 4,5 v prostředí BCS.

V nepufrovaném prostředí DMSO byla zaznamenána velmi podobná aktivita likochalkonu A a neohesperidinu DHC, ač tyto dvě látky mají mnoho strukturálních odlišností. Statisticky významné rozdíly v redukcí látek byly nalezeny až při koncentraci 1:1. Tam můžeme rozlišit vyšší aktivitu neohesperidinu DHC a podobně redukujícího floretinu v porovnání s nižšími hodnotami florizinu a naringinu DHC

(Obrázek 51). Zde floretin opět dokazuje, že glykosilace snižuje redukční účinek. Isoliquiritigenin měl podobně nízkou aktivitu jako florizin a naringin DHC.



Obrázek 51: Porovnávací graf redukce v nepufrovaném prostředí DMSO s indikátorem BCS.

Naringin a florizin se ve své struktuře liší pouze polohou o-glykosilace a navázaným cukrem. Z měření je možno usoudit, že mezi polohou glykosilace 4'-OH (florizin) a 2'-OH (naringin DHC) na kruhu A není z hlediska redukční aktivity v různých prostředích statisticky významný rozdíl.

V literatuře jsou dostupné poznatky, že dvojná vazba v struktuře flavonoidů není pro ovlivnění aktivity nijak důležitá.[102] Vysoké hodnoty redukčních aktivit chalkonů i dihydrochalkonů naznačují, že ani přítomnost dvojná vazby na spojovacím řetězci, odlišující tyto dvě skupiny látek, zřejmě redukci neovlivňuje. Zajímavé je, že isoliquiritigenin postrádající 6'-OH skupinu jako jediný nedosahuje 100 % redukce ani v jednom prostředí. Je tedy zvláštní, že likochalkon A, který postrádá obě hydroxylové skupiny v polohách 2',6', se jeví jako nejsilněji redukující struktura z prezentovaných. Mohlo by to být způsobeno methoxylovou skupinou ve společnosti hydroxylové skupiny na kruhu B a stericky bránícím rozvětveným alkylem.

Při absorpci polyfenolických látek v trávicím systému člověka hraje velkou roli počet a druh připojených cukerných molekul. Struktury obsahující glukosový glykosid (florizin), jsou vstřebávány v tenkém střevě cytosolickou β -glukosidasou laktasa florizin hydrolasou či pomocí specifických přenašečů. Látky mající v molekule rhamnosu (naringin DHC a neohesperidin DHC) nemohou být absorbovány v tenkém střevě. Jsou degradovány rhamnosidasou, která je produkována střevním mikrobiotem. Vyšší dávky polyfenolických látek jsou metabolizovány spíše v játrech, nižší již ve střevní sliznici. Tyto látky bývají přijímány jen v množství miligramů ve zředěných dávkách, pokud ale příjem dosáhne farmakologické dávky, je možné najít jejich volnou formu v krvi. Při metabolizaci jsou fenolické látky hydrolyzovány do

formy aglykonů a poté se účastní konjugace.[106] Neohesperidin DHC, který vykazuje nejvyšší hodnoty redukce je metabolizován přes hesperetin dihydrochalkon až na kyselinu 3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)propionovou a floroglucinol.[6] Hesperetin DHC je velmi podobný molekule floretinu obohacené o methoxyskupinu v poloze 4, proto je možné, že díky odblokování skupiny 4' bude mít tento metabolit v prostředí lidského těla zvýšenou redukční aktivitu oproti těmto měřením. Nicméně v literatuře není zmínka o jeho chelatační či redukční aktivitě. Společným metabolitem florizinu a floretinu je 3-OH floretin, který má na kruhu B dvě hydroxylové skupiny v poloze ortho.[51] V odborných zdrojích nebyla hodnocena aktivita tohoto metabolitu, ale jak bylo řečeno výše, toto uspořádání zvyšuje chelatační aktivitu. Zároveň nově vzniklá skupina by zvýšila celkový počet hydroxylových skupin na 5 a pravděpodobně by to mělo příznivý účinek na redukční aktivitu. Mezi metabolity isoliquiritigeninu patří liquiritigenin, isoliquiritigenin glukuronát a liquiritigenin glukuronát. Jeho biodostupnost je však jen 11,8 %.[49] Nebyly nalezeny záznamy o jejich redukční či chelatační aktivitě. Likochalkon A má mnoho metabolitů, jejichž vlastnosti nejsou zatím popsány.[107] Metabolity naringin dihydrochalkonu jsou dosud nezjištěné.

7 ZÁVĚR

V této práci byla měřena chelatační a redukční aktivita vybraných látek dvou strukturně blízkých skupin s otevřeným kruhem C s ionty mědi. Ze skupiny dihydrochalkonů to byl aglykon floretin a glykosidy naringin dihydrochalkon, neohesperidin dihydrochalkon a florizin. Druhým typem látek byly chalkony, které na rozdíl od dihydrochalkonů disponují dvojnou vazbou ve spojovacím řetězci. Z nich byly pro měření vybrány isoliquiritigenin a likochalkon A. Při měření se pomocí pufrů (pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) simulovala prostředí, se kterými se měřené látky potenciálně mohou v lidském těle setkat a zjišťoval se vliv na jejich aktivitu.

Chelatační aktivita byla změřena u všech testovaných látek, ale jen floretin, isoliquiritigenin a likochalkon A tvořily stabilní komplexy s ionty mědi. Nejvíce komplexů se tvořilo v pH 7,5 a 6,8. S dalším poklesem pH se snižovala i aktivita chelátorů. Likochalkon A se ukázal být nejsilnějším chelátorem. Ale protože je strukturně odlišný od zbytku sloučenin v této diplomové práci, nelze s jistotou tvrdit, jaké substituenty toto chování způsobují. Likochalkon paradoxně prokázal vyšší chelatační aktivitu v kompetitivnějším prostředí BCS. Dvojná vazba sice nemá vliv na výši chelatační aktivity, ale molekulu stabilizuje a tím i komplexy které tvoří s kovem.

Efektivita redukce v daných prostředích vykazovala stejný trend jako u chelatace. Důležitá je přítomnost volných hydroxylových skupin. Nejsilněji redukující látkou byl neohesperidin DHC. Pravděpodobným důvodem je přítomnost stericky bráněné katecholové skupiny v jeho molekule. Další významně redukující látkou byl likochalkon A, který ve své struktuře neobsahoval žádný z doložených redukcí podporujících substituentů a je třeba jeho aktivitu doložit dalšími experimenty. Bylo zjištěno, že přítomnost o-glykosilace v molekule snižuje redukční aktivitu, ale její poloha není důležitá a rovněž ani dvojná vazba ve spojovacím řetězci nemá vliv na hodnoty redukce.

8 LITERATURA

- [1] Stern B. R., Solioz M., Krewski D., Aggett P., Aw T.-C., Baker S., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C., Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., Starr T.: Copper and human health: Biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *Journal of Toxicology and Environmental Health B* 10(3), 157–222 (2007).
- [2] Pierson H., Yang H., Lutsenko S.: Copper transport and disease: What can we learn from organoids? *Annual Review of Nutrition* 39, 75–94 (2019).
- [3] Eghbaliferiz S., Iranshahi M.: Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals: Prooxidant activity of polyphenols and carotenoids. *Phytotherapy Research* 30, 1379–1391 (2016).
- [4] Baldari S., Di Rocco G., Toietta G.: Current biomedical use of copper chelation therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1069 (2020).
- [5] Szliszka E., Czuba Z. P., Mazur B., Paradysz A., Krol W.: Chalcones and dihydrochalcones augment trail-mediated apoptosis in prostate cancer cells. *Molecules* 15, 5336–5353 (2010).
- [6] Stompor M., Broda D., Bajek-Bil A.: Dihydrochalcones: Methods of acquisition and pharmacological properties—a first systematic review. *Molecules* 24, 4468 (2019).
- [7] Orlikova B., Tasdemir D., Golais F., Dicato M., Diederich M.: Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes & Nutrition* 6, 125–147 (2011).
- [8] Esaki S., Nishiyama K., Sugiyama N., Nakajima R., Takao Y., Kamiya S.: Preparation and taste of certain glycosides of flavanones and of dihydrochalcones. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58, 1479–1485 (1994).
- [9] Salehi B., Quispe C., Chamkhi I., El Omari N., Balahbib A., Sharifi-Rad J., Bouyahya A., Akram M., Iqbal M., Docea A.O., Caruntu C., Leyva-Gómez G., Dey A., Martorell M., Calina D., López V., Les F.: Pharmacological Properties of Chalcones: A review of preclinical including molecular mechanisms and clinical evidence. *Frontiers in Pharmacology* 11, 592654 (2021).
- [10] Modrá H., Svobodová Z., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie: *Speciální veterinární toxikologie: pro posluchače Fakulty veterinární hygieny a ekologie a posluchače Fakulty veterinárního lékařství*, str. 39-41. Tribun EU, Brno 2009.

- [11] It's elemental - the element copper: <https://education.jlab.org/itselemental/ele029.html>, staženo 5.12. 2020
- [12] Husak V.: Copper and copper-containing pesticides: Metabolism, toxicity and oxidative stress. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University* 2, 38–50 (2015).
- [13] Uauy R., Olivares M., Gonzalez M.: Essentiality of copper in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67 (5), 952S-959S (1998).
- [14] Valko M., Jomova K., Rhodes C.J., Kuča K., Musílek K.: Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology* 90, 1–37 (2016).
- [15] Mehri A.: Trace elements in human nutrition (II) - an update. *International Journal of Preventive Medicine* 11, 2 (2020).
- [16] Bost M., Houdart S., Oberli M., Kalonji E., Huneau J.-F., Margaritis I.: Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 35, 107–115 (2016).
- [17] Malavolta M., Mocchegiani E.: *Trace elements and minerals in health and longevity*, str. 35-62. Springer International Publishing AG, Switzerland, 2018.
- [18] Pavelková M., Vysloužil J., Kubová K., Vetchý D.: Biological role of copper as an essential trace element in the human organism. *Česká a slovenská farmacie* 67(4), 143-153 (2018).
- [19] National Research Council (U.S.), Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs: *Recommended dietary allowances*, str. 224-228. National Academy Press, Washington, D.C. 1989.
- [20] Linder M. C., Hazegh-Azam M.: Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63, 797S-811S (1996).
- [21] Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D.: Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57, 386–398 (2003).
- [22] Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J., Univerzita Karlova: *Biochemie pro studující medicíny*, str.76, 82, 83, 298, 441. Karolinum, Praha 2009.
- [23] Hellman N. E., Gitlin J. D.: Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition* 22, 439-58 (2002).

- [24] Lopez M. J., Royer A., Shah N. J.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554422/>, staženo 12. 12. 2020
- [25] Abdelrasoo M., Said A.: https://www.researchgate.net/publication/322024004_Literature_Review_on_Tyrosinase_Enzyme, staženo 16. 1. 2021
- [26] Masopust J., Průša R., Univerzita Karlova, Lékařská fakulta: *Patobiochemie metabolických drah*, str. 177-8. Univerzita Karlova, Praha 1999.
- [27] Racek J.: *Klinická biochemie*, str. 129. Galén, Praha 1999.
- [28] Chen J., Jiang Y., Shi H., Peng Y., Fan X., Li C.: The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 472, 1415–1429 (2020).
- [29] Gaetke L.: Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147–163 (2003).
- [30] Członkowska A., Litwin T., Dušek P., Ferenci P., Lutsenko S., Medici V., Rybakowski J.K., Weiss K. H., Schilsky M. L.: Wilson disease. *Nature Reviews Disease Primers* 4, 21 (2018).
- [31] Poujois A., Woimant F.: Wilson's disease: A 2017 update. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 42, 512–520 (2018).
- [32] Mareček Z., Brůha R.: Wilsonova choroba. *Vnitřní lékařství* 59(7), 578–583 (2013).
- [33] Klener P., Univerzita Karlova: *Vnitřní lékařství*, str. 493-6. Galén, Praha 2006.
- [34] Medicomaestro: <https://medicomaestro.com/kayser-fleischer-ring/>, staženo 3. 12. 2020
- [35] Barceloux D. G., Barceloux D.: Copper. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 37, 217–230 (1999).
- [36] Castillo-Durán C., Fisberg M., Valenzuela A., Egaña J.I., Uauy R.: Controlled trial of copper supplementation during the recovery from marasmus. *The American Journal of Clinical Nutrition* 37, 898–903 (1983).
- [37] Keen C. L., Uriu-Hare J. Y., Hawk S. N., Jankowski M. A., Daston G. P., Kwik-Urbe C. L., Rucker R. B.: Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67, 1003S-1011S (1998).

- [38] Dörner K., Dziadzka S., Höhn A., Sievers E., Oldigs H.-D., Schulz-Lell G., Schaub J.: Longitudinal manganese and copper balances in young infants and preterm infants fed on breast-milk and adapted cow's milkformulas. *British Journal of Nutrition* 61, 559–572 (1989).
- [39] Ehrenkranz R. A., Gettner P. A., Nelli C. M., Sherwonit E. A., Williams J. E., Ting B. T. G., Janghorbani M.: Zinc and copper nutritional studies in very low birth weight infants: Comparison of stable isotopic extrinsic tag and chemical balance methods1. *Pediatric Research* 26, 298–307 (1989).
- [40] Beyens A., Meensel K., Pottie L., Rycke R., Bruyne M., Baeke F., Hoebeke P., Plasschaert F., Loeys B., Schepper S., Symoens S., Callewaert B.: Defining the clinical, molecular and ultrastructural characteristics in occipital horn syndrome: Two new cases and review of the literature. *Genes* 10, 528 (2019).
- [41] Miyajima H., Hosoi Y., Adam M. P., Ardinger H. H., Pagon R. A., Wallace S. E., Bean L. J., Mirzaa G., Amemiya A.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1493/>. staženo: 22.11. 2020
- [42] Cilliers K.: Trace element alterations in Alzheimer's disease: A review. *Clinical Anatomy*, 1-7 (2021).
- [43] Squitti R., Salustri C.: Agents complexing copper as a therapeutic strategy for the treatment of alzheimers disease. *Current Alzheimer Research* 6, 476–487 (2009).
- [44] Davies K. M., Mercer J. F. B., Chen N., Double K. L.: Copper dyshomeostasis in Parkinson's disease: implications for pathogenesis and indications for novel therapeutics. *Clinical Science* 130, 565–574 (2016).
- [45] Kučerová-Chlupáčová M., Doseděl M., Kuneš J., Soltesová-Prnová M., Majeková M., Štefek M.: Chalcones and their pyrazine analogs: synthesis, inhibition of aldose reductase, antioxidant activity, and molecular docking study. *Monatshefte für Chemie* 149, 921–929 (2018).
- [46] Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Rocha L., Bovicelli P., Silvestri I. P., Saso L., Jahodář L., Hrdina R., Mladěnka P.: In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advances* 4, 32628–32638 (2014).
- [47] Rowe R. C., Sheskey P. J., Owen S. C., American Pharmacists Association: *Handbook of pharmaceutical excipients*, str. 486-7. Pharmaceutical Press, London 2006.
- [48] Berim A., Gang D. R.: Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 15, 363–390 (2016).

- [49] Lee Y. K., Chin Y.-W., Bae J.-K., Seo J. S., Choi Y. H.: Pharmacokinetics of isoliquiritigenin and its metabolites in rats: low bioavailability is primarily due to the hepatic and intestinal metabolism. *Planta Medica* 79, 1656–1665 (2013).
- [50] Nomura S.: *Comprehensive medicinal chemistry III [online]*, str. 349-365. Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Toda, Japan 2017.
- [51] Nguyen N., Cao N., Nguyen T., Le T.-K., Cha G., Choi S.-K., Pan J.-G., Yeom S.-J., Kang H.-S., Yun C.-H.: Regioselective hydroxylation of phloretin, a bioactive compound from apples, by human cytochrome P450 Enzymes. *Pharmaceuticals* 13, 330 (2020).
- [52] Thummel K. E.: Gut instincts: CYP3A4 and intestinal drug metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 117, 3173–3176 (2007).
- [53] SciFinder:
https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf?sfow_newpage=/scifinder/view/substance/substanceDetail.jsf&nav=eNpb85aBtYSBMbGEQcXI3MjZ1cTUPMLCzM3Y1MDSIsLU2NjRyc3M0sjM0MXEzMLYwAyoNkm4iEEwK7EsUS8nMS9dzzOvJDU9tUjo0YI13xvbLZgYGDOZWMSscOpTK4oYBBDq_Epzk1KL2tZMleWe8qCbiYGHooCBgYERaGB-IUMdyBFMRWWoRjvl5-ekJuadVShquDrn1zug0VEwowsYAJHFOUc, staženo 28.10. 2020
- [54] Peng F., Du Q., Peng C., Wang N., Tang H., Xie X., Shen J., Chen J.: A review: The pharmacology of isoliquiritigenin. *Phytotherapy Research* 29, 969–977 (2015).
- [55] Asl M. N., Hosseinzadeh H.: Review of pharmacological effects of glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research* 22, 709–724 (2008).
- [56] Opletalová V., Chlupáčová M.: Chalkony jako potenciální inhibitory aldosa reduktasy. *Chemické listy* 98, 320–323 (2004).
- [57] SciFinder:
https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf?sfow_newpage=/scifinder/view/substance/substanceDetail.jsf&nav=eNpb85aBtYSBMbGEQcXI3NjMwNLCzOCLCzM3Y1MDSIsLMxcjY1cTV0tDS1NLR0NHMxBSoNkm4iEEwK7EsUS8nMS9dzzOvJDU9tUjo0YI13xvbLZgYGD0ZWMSscOpTK4oYBBDq_Epzk1KL2tZMleWe8qCbiYGHooCBgYEJaGB-cSFDHQMzkMdYwsBUVIZqVIN-fk5qYt5ZhaKGq3N-vQOaHwUzv4ABAHU7OcE, staženo 28.10. 2020

- [58] Cui Y., Ao M., Hu J., Yu L.: Anti-inflammatory activity of licochalcone a isolated from glycyrrhiza inflata. *Zeitschrift für Naturforschung C* 63, 361–365 (2008).
- [59] Fu Y., Hsieh T., Guo, J., Kunicki J., Lee M. Y. W. T., Darzynkiewicz Z., Wu J. M.: Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 263-270 (2004).
- [60] Wu Y., Zhu J., Liu H., Liu H.: Licochalcone a improves the cognitive ability of mice by regulating T- and B-cell proliferation. *Aging* 13(6), 8895-8915 (2021).
- [61] Li P., Yu C., Zeng F.-S., Fu X., Yuan X.-J., Wang Q., Fan C., Sun B.-L., Sun Q.-S.: Licochalcone A attenuates chronic neuropathic pain in rats by inhibiting microglia activation and inflammation. *Neurochemical Research* 46(5), 1112-1118 (2021).
- [62] SciFinder:
https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf?sfow_newpage=/scifinder/view/substance/substanceDetail.jsf&nav=eNpb85aBtYSBMBGGEQcXI3NjR3NjCjCzLM3Y1MDSlsLUydjQ1NXCwtDU0cjCwMLV2RCoNKm4iEEwK7EsUS8nMS9dzzOvJDU9tUjo0YII3xvbLZgYGD0ZWMsSc0pTK4oYBBDq_Epzk1KL2tZMleWe8qCbiYGHooCBgYFaGB-cSFDHQMzkMdYwsBUVIZqvIN-fk5qYt5ZhaKGq3N-vQOaHwUzv4ABAHkYOcc,
 staženo 28. 10. 2020
- [63] Shin W., Kim S. J., Shin J. M., Kim S. H.: Structure-taste correlations in sweet dihydrochalcone, sweet dihydroisocoumarin, and bitter flavone compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 38, 4325–4331 (1995).
- [64] Selleckchem.com: [https://www.selleckchem.com/products/Naringin-Dihydrochalcone\(Naringin-DC\).html](https://www.selleckchem.com/products/Naringin-Dihydrochalcone(Naringin-DC).html), staženo 6. 1. 2021
- [65] Yang W., Zhou K., Zhou Y., An Y., Hu T., Lu J., Huang S., Pei G.: naringin dihydrochalcone ameliorates cognitive deficits and neuropathology in APP/PS1 transgenic mice. *Frontiers in Aging Neuroscience* 10, 169 (2018).
- [66] SciFinder:
https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf?sfow_newpage=/scifinder/view/substance/substanceDetail.jsf&nav=eNpb85aBtYSBMBGGEQcXI3MTEwMDCPMLCzLM3Y1MDSIsLQyc3QzMjcONTRxM3N2MjI0BmoNKm4iEEwK7EsUS8nMS9dzzOvJDU9tUjo0YII3xvbLZgYGD0ZWMSsSc0pTK4oYBBDq_Epzk1KL2tZMleWe8qCbiYGHooCBgYFaGB-

cSFDHQMzkMdYwsBUVIZqvIN-fk5qYt5ZhaKGq3N-vQOaHwUzv4ABAGQjOak,
staženo 28. 10. 2020

- [67] Chen J., Lei Y., Zhang, Y., He S., Liu L., Dong X.: Beyond sweetness: The high-intensity sweeteners and farm animals. *Animal Feed Science and Technology* 267, 114571 (2020).
- [68] Khan M. K., Zill-E-Huma, Dangles O.: A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 33, 85–104 (2014).
- [69] Gandhi G. R., Vasconcelos A. B. S., Wu D.-T., Li H.-B., Antony P. J., Li H., Geng F., Gurgel R. Q., Narain, N., Gan R.-Y.: Citrus flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: A systematic review of in vitro and in vivo studies. *Nutrients* 12(10), 2907 (2020).
- [70] Tan Z., Cheng J., Liu Q., Zhou L., Kenny J., Wang T., Lin X., Yuan J., Quinn J. M. W., Tickner J., Hong G., Qin A., Zhao J., Xu J.: Neohesperidin suppresses osteoclast differentiation, bone resorption and ovariectomised-induced osteoporosis in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 439, 369–378 (2017).
- [71] SciFinder:
https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf?sfow_newpage=/scifinder/view/substance/substanceDetail.jsf&nav=eNpb85aBtYSBMbGEQcXI3MTMzdTNIslCzM3Y1MDSIsLI1cDZ0tTN2NjRyc3C1MTFxBCoNkm4iEEwK7EsUS8nMS9dzzOvJDU9tUjo0YI13xvblZgYGD0ZWMsScOpTK4oYBBDq_Epzk1KL2tZMleWe8qCbiYGHooCBAWx3fnEhQx0DM5DHWMLAVFSGar5Tfn5OamLeWYWihqtzfr0Dmh8FM7-AAQCTSjny, staženo 28. 10. 2020
- [72] Behzad S., Sureda A., Barreca D., Nabavi S. F., Rastrelli L., Nabavi S. M.: Health effects of phloretin: from chemistry to medicine. *Phytochemistry Reviews* 16, 527–533 (2017).
- [73] Chang W.-T., Huang W.-C., Liou C.-J.: Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Food Chemistry* 134, 972–979 (2012).
- [74] Kim J.-L., Kang M.-K., Gong J.-H., Park S.-H., Han S.-Y., Kang Y.-H.: Novel antiosteoclastogenic activity of phloretin antagonizing RANKL-induced osteoclast differentiation of murine macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research* 56, 1223–1233 (2012).
- [75] SciFinder:
https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf?sfow_newpage=/scifinder

r/view/substance/substanceDetail.jsf&nav=eNpb85aBtYSBMbGEQcXI3NTAyDXENMLCzM3Y1M
DSIsLlwMTU1dLYwtDA0NjQ2NnJ0RSoNKm4iEEwK7EsUS8nMS9dzzOvJDU9tUjo0YII3xvbLZgYGD
OZWMSscOpTK4oYBBDq_Epzk1KL2tZMleWe8qCbiYGHooCBgYENaGB-
cSFDHQMzkMdYwsBUVIZqvIN-fk5qYt5ZhaKGq3N-vQOaHwUzv4ABAGN9OaY,
staženo 28. 10. 2020

- [76] PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6072>, staženo 29. 10. 2020
- [77] Muceniece R., Namniece J., Nakurte I., Jekabsons K., Riekstina U., Jansone B.: Pharmacological research on natural substances in Latvia: Focus on lunasin, betulin, polyphenol and phlorizin. *Pharmacological Research* 113, 760–770 (2016).
- [78] Hilt P., Schieber A., Yildirim C., Arnold G., Klaiber I., Conrad J., Beifuss U., Carle R.: Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC–PDA–MS/MS and NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2896–2899 (2003).
- [79] Maedler K., Sergeev P., Ris F., Oberholzer J., Joller-Jemelka H. I., Spinass G. A., Kaiser N., Halban P. A., Donath M. Y.: Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *Journal of Clinical Investigation* 110, 851–860 (2002).
- [80] Chao E. C., Henry R. R.: SGLT2 inhibition — a novel strategy for diabetes treatment. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 551–559 (2010).
- [81] Wang H., Sun Z., Rehman R.-U., Shen T., Riaz S., Li X., Hua E., Zhao J.: Apple phlorizin supplementation attenuates oxidative stress in hamsters fed a high-fat diet. *Journal of Food Biochemistry* 42, e12445 (2018).
- [82] Skoupilová H.: Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2012
- [83] Vokurka M., Hugo J.: *Velký lékařský slovník*, str. 437. Maxdorf, Praha 2008.
- [84] Ashmead H. D.: *Amino acid chelation in human and animal nutrition*, str. 19-34. CRC Press, Boca Raton 2012.
- [85] Lamas G. A., Navas-Acien, A. Mark D. B., Lee K. L.: Heavy metals, cardiovascular disease, and the unexpected benefits of chelation therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 67, 2411–2418 (2016).
- [86] Aaseth J., Skaug M. A., Cao Y., Andersen, O.: Chelation in metal intoxication—Principles and paradigms. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 31, 260–266 (2015).

- [87] Kim J.-J., Kim Y.-S., Kumar V.: Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 54, 226–231 (2019).
- [88] Flora S. J. S., Pachauri V.: Chelation in metal intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7, 2745–2788 (2010).
- [89] Ding X., Xie H., Kang Y. J.: The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 22, 301–310 (2011).
- [90] Aggarwal A., Bhatt, M.: Advances in treatment of wilson disease. *Tremor and Other Hyperkinetic Movement*. 8, 525 (2018).
- [91] Katerji M., Barada K., Jomaa M., Kobeissy F., Makkawi A.-K., Abou-Kheir W., Usta J.: Chemosensitivity of U251 cells to the co-treatment of D-penicillamine and copper: Possible implications on Wilson disease patients. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10, 1-18 (2017).
- [92] Říha M., Karlíčková J., Filipický T., Macáková K., Hrdina R., Mladěnka P.: Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 123, 80–87 (2013).
- [93] Kodama H., Fujisawa C., Bhadrprasit W.: Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. *Current drug metabolism* 13, 237–250 (2012).
- [94] Sedmidubský D.: *Základy chemie pro bakaláře [online]*, str. 25. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2011.
- [95] Cídlová H., Mokrý Z., Valová B.: *Obecná chemie [online]*, str. 177. Masarykova univerzita, Brno 2018.
- [96] Denoyer D., Masaldan S., La Fontaine S., Cater M.A.: Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper that cancer.’ *Metallomics* 7, 1459–1476 (2015).
- [97] Valko M., Morris H., Cronin M.: Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12, 1161–1208 (2005).
- [98] Uriu-Adams J. Y., Keen C. L.: Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 268–298 (2005).
- [99] Karlíčková J., Macáková K., Říha M., Pinheiro L.M.T., Filipický T., Horňasová V., Hrdina R., Mladěnka P.: Isoflavones reduce copper with minimal impact on iron *in vitro*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015, 1–11 (2015).

- [100] Mladěnka P., Karlíčková J., Hrubša M., Veljović E., Muratović S., Carazo A., Shivling Mali A., Špirtović-Halilović S., Saso L., Pour M., Durić K.: Interaction of 2,6,7-trihydroxy-xanthene-3-ones with iron and copper, and biological effect of the most active derivative on breast cancer cells and erythrocytes. *Applied Sciences* 10, 4846 (2020).
- [101] Rauter A. P., Ennis M., Hellwich K.-H., Herold B. J., Horton D., Moss G. P., Schomburg I.: Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017). *Pure and Applied Chemistry* 90, 1429–1486 (2018).
- [102] Mira L., Fernandez T., M., Santos M., Rocha R., Florêncio M. H., Jennings K. R.: Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research* 36, 1199–1208 (2002).
- [103] Mladěnka P., Macáková K., Filipský T., Zatloukalová L., Jahodář L., Bovicelli P., Silvestri I. P., Hrdina R., Saso L.: In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105(5), 693-701 (2011).
- [104] Ambrožová K.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2015
- [105] Koblášová A.: Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2015
- [106] Hijová E.: Bioavailability of chalcones. *Bratislavské lekárske listy* 107, 80–84 (2006).
- [107] Huang L., Nikolic D., van Breemen R. B.: Hepatic metabolism of licochalcone A, a potential chemopreventive chalcone from licorice (*Glycyrrhiza inflata*), determined using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409, 6937–6948 (2017).

9 SEZNAMY

9.1 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Metabolismus mědi v buňce. Přenašeče DMT1- divalentní transportér kovů 1; CCS, Cox17 a Atox1- chaperony přemísťující Cu^+ ionty na cílová místa v buňce; CcO- cytochrom c oxidasa; MT1/2- metalothioneiny; CuPr- kuproproteiny; ATP7A/B- měď přenášející ATPasa α/β ; MTF1 a Nrf2- transkripční faktory pro tvorbu MT1/2. Převzato[28].....	14
Obrázek 2: Jak probíhá transport mědi a) za fyziologických podmínek b) pokud je narušen protein ATP7B u Wilsonovy choroby. ATP7B- membránová ATPasa, Cu/Zn SOD1- Cu/Zn superoxididmutasa, Cu-atomy mědi, COX- cytochrom oxidasa, CTR1- přenašeč mědi, MT- metalothionein, P- protein (např. ceruloplasmin), ostatní jsou metalochaperony. Převzato[32]	15
Obrázek 3: Keyser-Fleischerův prstenec u Wilsonovy choroby, způsobený patologickou kumulací mědi na periferii rohovky. Převzato[34].....	16
Obrázek 4: Metabolické cesty v syntéze flavonoidů a změna číslování struktury při uzavření kruhu. CHS- chalconové syntázy, FNS-flavonové syntázy. Převzato[48]	20
Obrázek 5: Hydrolýza florizinu β -glucosidasou ve střevě. Převzato[50]	21
Obrázek 6: Isoliquiritigenin. Převzato z SciFinder[53].....	22
Obrázek 7: Likochalkon A. Převzato z SciFinder[57].....	23
Obrázek 8: Naringin dihydrochalkon. Převzato z SciFinder[62]	23
Obrázek 9: Neohesperidin dihydrochalkon. Převzato z SciFinder[66]	24
Obrázek 10: Floretin. Převzato z SciFinder[71]	25
Obrázek 11: Florizin. Převzato z SciFinder[75]	25
Obrázek 12: Chelatace mědi pomocí D-penicillaminu. Upraveno[91]	28
Obrázek 13: Chelatace mědi pomocí TETA. Upraveno[93]	28
Obrázek 14: Chelatace mědi pomocí TTM. Upraveno[93]	29
Obrázek 15: Redoxní reakce, přesun elektronů musí vždy probíhat současně. Upraveno[95]	30
Obrázek 16: Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci měďnatých iontů.	36
Obrázek 17: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem.	37
Obrázek 18: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^+ iontů v pufru.	38
Obrázek 19: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^{2+} iontů v pufru.	39
Obrázek 20: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^+ iontů v DMSO.	40
Obrázek 21: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu^{2+} iontů v DMSO.	41
Obrázek 22: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Cu^{2+} iontů v pufru.	42
Obrázek 23: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Cu^{2+} iontů v DMSO.	43

Obrázek 24: Kalibrační křivka měďnatých iontů.	45
Obrázek 25: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů isoliquiritigeninem metodou s využitím hematoxylinu.....	46
Obrázek 26: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů likochalkonem A metodou s využitím hematoxylinu.....	47
Obrázek 27: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů naringinem DHC metodou s využitím hematoxylinu.....	47
Obrázek 28: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů neohesperidinem DHC metodou s využitím hematoxylinu.	48
Obrázek 29: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů florizinem metodou s využitím hematoxylinu.....	48
Obrázek 30: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů floretinem metodou s využitím hematoxylinu.....	49
Obrázek 31: Grafické znázornění chelatace měďných iontů likochalkonem A metodou s využitím BCS.	50
Obrázek 32: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů likochalkonem A metodou s využitím BCS.	50
Obrázek 33: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů isoliquiritigeninem metodou s využitím BCS.....	51
Obrázek 34: Grafické znázornění chelatace měďnatých iontů floretinem metodou s využitím BCS....	51
Obrázek 35: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí isoliquiritigeninu.	52
Obrázek 36: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí likochalkonu A.	53
Obrázek 37: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí naringinu DHC.....	53
Obrázek 38: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí neohesperidinu DHC.....	54
Obrázek 39: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí floretinu.	54
Obrázek 40: Grafické znázornění redukce měďnatých iontů pomocí florizinu.....	55
Obrázek 41: Rozdíl v číslování struktur s uzavřeným a otevřeným kruhem C. Upraveno[101].....	56
Obrázek 42: Porovnávací graf chelatace při pH 7,5 v prostředí hematoxylinu.....	57
Obrázek 43: Porovnávací graf chelatace při pH 6,8 v prostředí hematoxylinu.....	57
Obrázek 44: Porovnávací graf chelatace při pH 7,5 v prostředí BCS.....	58
Obrázek 45: Porovnávací graf chelatace při pH 6,8 v prostředí BCS.....	59
Obrázek 46: Porovnávací graf chelatace likochalkonu A v prostředí HEM a BCS při pH 7,5.....	59
Obrázek 47: Porovnávací graf redukce při pH 7,5 v prostředí BCS.	60
Obrázek 48: Porovnávací graf redukce při pH 6,8 v prostředí BCS.	61

Obrázek 49: Porovnávací graf redukce při pH 5,5 v prostředí BCS.	62
Obrázek 50: Porovnávací graf redukce při pH 4,5 v prostředí BCS.	62
Obrázek 51: Porovnávací graf redukce v nepufrovaném prostředí DMSO s indikátorem BCS.	63

9.2 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Průměrný obsah mědi v potravinách, půdě, vodách a organismech. Převzato[20].....	10
Tabulka 2: Role enzymů závislých na příjmu mědi. Upraveno[21].....	11

9.3 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A ZNAČEK

AD	(= Alzheimer's disease) Alzheimerova choroba
Atox ₁	antioxidační chaperon mědi 1
ATPasa	adenosintrifosfatasa
ATP7A	adenosintrifosfatasa přenášející Cu, kódovaná genem ATP7A
ATP7B	adenosintrifosfatasa přenášející Cu, kódovaná genem ATP7B
BACE 1	enzym štěpící prekurzor proteinu amyloidu v β-místě 1
BCS	disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové
CCS	(= copper chaperone for SOD1) měď obsahující chaperon pro enzym superoxiddismutasu
CMGP	(= cartilage matrix glycoprotein) matrixový glykoprotein chrupavky
COX-2	cyklooxygenasa 2
Cox ₁₇	chaperon mědi pro cytochrom c oxidasu COX 17
Cox ₂	chaperon mědi pro cytochrom c oxidasu COX 2
CTR1	(= copper transporter 1) transportní protein mědi
Cu/Zn SOD	superoxiddismutasa 1
DHPG	dihydroxyfenylglykol
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT1	(= divalent metal transporter 1) divalentní transportér kovů 1
DOPA	prekurzor dopaminu
DPA	D-penicillamin
GIT	gastrointestinální trakt
GSH	glutathion
HA	hydroxylamin hydrochlorid
HDL	(= high density lipoproteins) lipoproteiny o vysoké hustotě
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová
HEB	hematoencefalická bariéra
HEM	hematoxylin
IL-1β	cytokin interleukin 1β
IL-6	cytokin interleukin 6
ISL	isoliquiritigenin
LDL	(=low density lipoproteins) lipoproteiny o nízké hustotě

NO	oxid dusnatý
NÚ	nežádoucí účinky
PGE ₂	prostaglandin E2
pH	potential of hydrogen (potenciál vodíku)
RANKL	ligand pro receptorový aktivátor nukleárního faktoru kappa-B
ROS	(=reactive oxygen species) reaktivní formy kyslíku
SGLT	(= sodium glucose transport proteins) přenašeče glukózy v buňce
TETA	trientin
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TTM	tetrathiomolybdenan
WD	(= Wilson's disease) Wilsonova choroba
⊙	symbol pro roztok

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Martina Šulcová

Školitel: Doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce chalkonů s přechodnými kovy II.

Měď patří mezi esenciální prvky lidského těla, který se podílí na fungování mnoha enzymů a metabolických drah. I když se v těle objevuje ve stopovém množství, jeho funkce je nezastupitelná. Hladina iontů však musí být udržována v rovnováze různými tělními mechanismy. Pokud je měď v těle v nadbytku či nedostatku, může tento stav vést k vývoji zdravotních problémů.

Chalkony jsou látky patřící ke skupině flavonoidů. Jejich polyfenolická struktura nemá uzavřený kruh C. Studie popisují jejich protirakovinné, protizánětlivé, protivirové, antidiabetické, antibakteriální, antioxidační, imunosupresivní a jiné vlastnosti.

V této diplomové práci byly testovány vybrané látky ze skupin dihydrochalkonů (naringin dihydrochalkon, neohesperidin dihydrochalkon, floretin, florizin) a chalkonů (isoliquiritigenin, likochalkon A) pro jejich schopnost chelatovat či redukovat ionty mědi. Aktivita byla měřena při různých pH prostředí (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) a v prostředí DMSO spektrofotometricky za použití indikátorů hematoxylinu a disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Na základě výsledků byly odvozeny vztahy mezi strukturou a účinkem.

Nejsilněji chelatuující látkou byl likochalkon A. Důležitý podíl na vzniku stabilních komplexů má dvojná vazba. Pro redukční aktivitu byla důležitá přítomnost volných hydroxylových skupin. Nejsilněji redukující látkou byl neohesperidin DHC zřejmě kvůli přítomnosti stericky bráněné katecholové skupiny. Další významně redukující látkou byl likochalkon A, který ve své struktuře neobsahoval žádný z doložených redukcí podporujících substituentů a je třeba jeho aktivitu doložit dalšími experimenty.

Klíčová slova: chalkony, dihydrochalkony, měď, chelatace, redukce

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Martina Šulcová

Supervisor: Assoc. Prof. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Interaction of chalcones with transition metals II.

Copper is one of the essential elements in human body which is involved in the functioning of many enzymes and metabolic pathways. Although it appears in trace amounts in the body, its functions are irreplaceable. However, the ion level must be kept in balance by the various mechanisms of the body. If there is an excess or deficiency of copper in the body, this condition can lead to the development of health issues.

Chalcones are substances belonging to the group of flavonoids. Their polyphenolic structure does not have a closed ring C. Studies describe their anticancer, anti-inflammatory, antiviral, antidiabetic, antibacterial, antioxidant, immunosuppressive and other properties.

Chosen substances in the group of dihydrochalcones (naringin dihydrochalcone, neohesperidin dihydrochalcone, phloretin, phlorizin) and chalcones (isoliquiritigenin, licochalcone A) were tested for their chelation and reduction activity of the copper ions in this diploma thesis. The activity was measured at different pH environments (7.5; 6.8; 5.5 and 4.5) and in DMSO environment spectrophotometrically using hematoxylin and bathocuproinedisulfonic acid disodium salt indicators. Based on the results, relationships between structure and effect were derived.

The strongest chelating agent was licochalcone A. The double bond plays an important role in the formation of stable complexes. The presence of free hydroxyl groups was important for the reducing activity. The strongest reducing agent was neohesperidin DHC. This happens probably due to the presence of a sterically hindered catechol group in its molecule. Another significantly reducing substance was licochalcone A, which in its structure did not contain any of the documented reduction-promoting substituents and its activity needs to be documented by further experiments.

Key words: chalcones, dihydrochalcones, copper, chelation, reduction