

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



INTERAKCE FENYLPROPIONOVÝCH KYSELIN S MĚDÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

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

Hradec Králové, květen 2017

Kamila Zemanová

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY



**INTERACTION OF PHENYLPROPIONIC ACIDS WITH
COPPER**

DIPLOMA THESIS

Supervisor: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

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

Hradec Králové, May 2017

Kamila Zemanová

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

.....

Kamila Zemanová

Poděkování

Především bych velmi ráda poděkovala PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za vedení diplomové práce, za pomoc i rady při experimentálních měřeních a za čas, který mi během vypracování diplomové práce věnovala, nejen na konzultacích.

Dále bych také ráda poděkovala Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za poskytnutí laboratoře pro naměření výsledků, za ochotu a vstřícné jednání.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a příteli za jejich pochopení a podporu během celého studia.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD.....	9
2 CÍL PRÁCE	10
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1 Měď.....	11
3.1.1 Funkce mědi v buňkách savců.....	12
3.1.2 Homeostáza mědi.....	13
3.1.3 Absorpce mědi	13
3.1.4 Distribuce mědi.....	14
3.1.5 Vylučování mědi.....	15
3.1.6 Měď a oxidační poškození.....	16
3.1.7 Toxicita mědi.....	17
3.1.8 Nedostatek mědi.....	17
3.1.9 Onemocnění a měď	18
3.1.10 Oxidační obranný systém a antioxidační živiny	22
3.1.11 Chelatace mědi.....	23
3.2 Fenylypropanoidy	25
3.2.1 Kumariny.....	27
3.2.2 Flavonoidy	27
3.2.3 Isoflavonoidy.....	28
3.2.4 Fenylypropionové kyseliny.....	28
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1 Materiál	32
4.2 Testované látky.....	32
4.3 Chemikálie	32
4.4 Přístrojové vybavení.....	32
4.5 Příprava zásobních roztoků.....	33
4.6 Kalibrace měďnatých iontů.....	34
4.7 Metodický postup stanovení chelatace měďných iontů v pufru.....	36

4.8	Metodický postup stanovení chelatace měďnatých iontů v pufru	38
4.9	Metodický postup stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem.....	40
4.10	Statistická analýza.....	41
5	VÝSLEDKY.....	43
5.1	Kalibrační křivka.....	43
5.2	Chelatační aktivita fenylpropionových kyselin – hematoxylin.....	44
5.2.1	3-fenylpropionová kyselina.....	44
5.2.2	3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina.....	45
5.2.3	3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina.....	45
5.2.4	3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina	46
5.2.5	3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina	46
5.2.6	3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina	47
5.3	Konfidenční intervaly	48
5.3.1	Konfidenční intervaly pH 5.5.....	48
5.3.2	Konfidenční intervaly pH 6.8.....	48
5.3.3	Konfidenční intervaly pH 7.5.....	49
5.4	Chelatační aktivita fenylpropionových kyselin – bathocuproin	49
5.4.1	3-fenylpropionová kyselina.....	50
5.4.2	3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina.....	51
5.4.3	3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina.....	52
5.4.4	3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina	53
5.4.5	3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina	54
5.4.6	3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina	55
6	DISKUZE	56
7	ZÁVĚR.....	59
8	POUŽITÁ LITERATURA	60
	ABSTRAKT	65
	ABSTRACT	66

Seznam zkratek

A - absorbance

A β – β -amyloidní protein

AD – Alzheimerova choroba

APP – amyloidní prekurzorový protein

ATP7A – Menkesův protein transportující měď

ATP7B – Wilsonův protein transportující měď

ATOX1 – antioxidační Cu-chaperon

BCS – disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny, bathocuproin

4CL – 4-kumarát-CoAligasa

C4H – cinnamát-4-hydroxylasa

CCS – Cu-chaperon pro SOD

CFI– chalkon-flavavonisomerasa

CHR – chalkonreduktasa

CHS– chalkonsynthasa

COX 17 – chaperon pro cytochrom-c-oxidasu

CTR1 – selektivní transportér pro měď

CTR2 – selektivní transportér pro měď

DFR – dihydroflavonolreduktasa

DMSO – dimethylsulfoxid (rozpouštědlo)

F3H – flavanon-3-hydroxylasa

HA – hydroxylamin hydrochlorid

HEM – hematoxylin

LDL – low density lipoprotein

MD – Menkesovo onemocnění

PAL – fenylalaninamoniaklyasa

PrPC – prionový protein

PrPSc – abnormální forma prionového proteinu

ROS – reaktivní formy kyslíku

SOD – superoxiddismutasa

Trientin - triethylentetraamin

VLDL – very low density lipoprotein

WD – Wilsonova choroba

1 Úvod

V této diplomové práci bude diskutováno, zda a jak fenylpropionové kyseliny mohou interagovat s mědí.

Měď je jeden ze základních esenciálních prvků, který je nezbytný pro živé organismy. Vyskytuje se v různých buňkách a tkáních našeho těla, kde ovlivňuje důležité životní funkce a orgány. Dále hraje důležitou roli u řady hlavních enzymatických drah jako katalyzátor těchto reakcí. Na druhou stranu může měď vystupovat i jako velmi nebezpečný prvek. Nerovnováha mědi (nedostatek i nadbytek) může vyvolat oxidační poškození a vést k řadě závažným onemocněním, jako je například Menkesovo onemocnění, Wilsonova či Alzheimerova choroba.

Chelatace je v současné době využívána hlavně jako léčba při přetížení organismu toxickými kovy, včetně mědi, a cílem této léčby je odstranit toxické kovové ionty z postižených orgánů pomocí chelatačních činidel. Chelatační terapie se prozatím používá zejména u Wilsonovy choroby.

Fenylpropionové kyseliny, jež se řadí do skupiny fenolových sloučenin, mohou vykazovat různé biologické účinky – protizánětlivé, protirakovinné i antioxidační. Pomocí antioxidační aktivity se podílejí na vychytávání volných radikálů a reaktivních forem kyslíku. Fenylpropionové kyseliny se nacházejí zejména v rostlinách, ale mohou vznikat i v lidském organismu metabolismem jiných látek. U některých látek ze skupiny fenolových sloučenin již také byla prokázána schopnost chelatace mědi.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak vybrané fenypropionové kyseliny (konkrétně 3-fenylpropionová, 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, 3-(4-hydroxyfenyl)propionová, 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová, 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová a 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová) reagují s mědí, zejména odhalit jejich měď-chelatační účinky, při různých pH v závislosti na jejich struktuře dvěma odlišnými spektrofotometrickými metodami (s hematoxylinem a následně s disodnou solí bathocuproindisulfonové kyseliny).

3 Teoretická část

3.1 Měď

Měď je stopový prvek potřebný pro všechny živé organismy.¹ U člověka je v malém množství nalezena v různých buňkách a tkáních, avšak nejvyšší koncentrace měď dosahuje v játrech.² Hraje zásadní roli v normální lidské fyziologii - ovlivňuje vývoj srdce a centrální nervové soustavy, funkci jater, metabolismus lipidů, je nezbytná pro dýchání, tvorbu pojivové tkáně, metabolismus a mnoho dalších procesů.³

Důležitou vlastností, která řídí rozmanité funkce mědi, je existence dvou redoxních stavů mědi. Ve všech živých organismech nalezneme měď ve stavu oxidovaném (Cu^{2+}) a redukovaném (Cu^+). Měďné (Cu^+) i měďnaté (Cu^{2+}) ionty se mohou účastnit celé řady reakcí s proteiny a řídit tak rozmanité biochemické reakce. Například Cu^+ ionty spíše reagují s thiolovou či thioetherovou skupinou (př. s cysteinem, methioninem), zatímco Cu^{2+} ionty mají větší afinitu ke kyslíku a imidazolové skupině (př. na glutamové kyselině, histidinu). Přechod mezi Cu^+ a Cu^{2+} ionty je velmi jednoduchý a může se během něho vygenerovat hydroxylový radikál. Tento radikál dokáže poškodit řadu proteinů, nukleových kyselin i lipidů.⁴

Jednou ze zásadních vlastností mědi také je, že vystupuje jako prostetická skupina, která umožňuje snadný přenos elektronů v celé řadě hlavních enzymatických drah. Jako taková je měď nutná pro katalytickou aktivitu enzymů, mezi které patří i Cu/Zn-superoxiddismutasa (důležitá obrana proti oxidačnímu stresu), cytochrom-c-oxidasa (účastníci se mitochondriálního respiračního řetězce), lisyloxidasa (důležitá pro vývoj pojivové tkáně), tyrozinasa (nezbytná pro syntézu melaninu), ceruloplasmin (nutný pro homeostázu železa) a dopamin- β -hydroxylasa (součást syntézy katecholaminů).^{1,5}

Lidský organismus může měď přijímat z potravy. Hlavními zdroji jsou obiloviny, semena, ořechy, fazole, koryši a játra. Průměrný denní příjem mědi by měl být v rozmezí 0,6 – 1,6 mg/den. Nedostatek mědi u lidí je poměrně vzácný, avšak nerovnováha mědi může vést k závažným onemocněním, jako je Menkesova

a Wilsonova choroba, které se obě vyznačují neschopností distribuovat měď do buněk a tkání v těle.^{6 7} Dále se měď může podílet na neurodegenerativních onemocněních, Alzheimerově chorobě či familiární amyotrofické laterální skleróze.⁷

3.1.1 Funkce mědi v buňkách savců

Měď, jako kofaktor, je nezbytná u celé řady enzymů v metabolismu. Je potřebná u cytochrom-c-oxidasy, což je enzym, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně a obsahuje čtyři redoxně aktivní místa s navázaným kovem – dvě hemová a dvě místa s mědí. Cytochrom-c-oxidasa je důležitá, protože redukuje molekulární kyslík (O_2) na vodu (H_2O) a čerpá protony z vnitřní na vnější stranu membrány. Dále je měď důležitá u Cu/Zn-superoxiddismutasy, která chrání buňky před oxidačním stresem. Pokud je v těle k dispozici málo mědi, indukuje to expresi superoxid-dismutasy, což je první enzym, který ztratí svoji aktivitu. Rovněž lisyloxidasa, která hraje klíčovou roli při vzniku, zrání a stabilizaci pojivové tkáně, vyžaduje pro svou činnost měď.

Měď je také součástí metalothioneinů, proteinů s vysokým počtem cysteinů, které se podílejí na vylučování iontů kovů v neškodné formě, pokud se tyto ionty vyskytují v nadbytku. Přebytek mědi se hromadí v metalothioneinech tkání postižených Wilsonovou nemocí.

V neposlední řadě je měď nezbytná jako součást ceruloplasminu. Nejen že ceruloplasmin transportuje měď do buněk a zprostředkovává její vyloučení, ale také vystupuje jako feroxidasa se schopností oxidovat Fe^{2+} na Fe^{3+} ionty. Tato změna je užitečná pro poskytnutí železa ve formě potřebné pro navázání na transferin, nosič železa, pro další dopravu z červených krvinek, kde je železo lokalizováno nejvíce. Při nedostatku mědi plazma obsahuje jen málo nebo žádný ceruloplasmin a železo se kumuluje v játrech.

Během embryogeneze, kdy je buněčná proliferace velmi aktivní, je dýchání a cytochrom-c-oxidasa nezbytná. V poslední části těhotenství je měď za pomoci ATP7A a ATP7B převedena pomocí placenty či plodové vody z mateřské cirkulace do plodu. V průběhu kojení je použita měď společně se zinkem a železem, které jsou uloženy v játrech matky.⁶

3.1.2 Homeostáza mědi

Protože je měď vyžadována pro normální funkci mnoha biologických procesů, je homeostáza mědi velmi důležitá.⁸ V biologických systémech je homeostáza mědi popisována na molekulární úrovni. Je koordinována několika proteiny jako například glutathionem, metalothioneinem, na mědi závislými ATPasami (P-ty) a chaperony mědi.⁶ Každý organismus má k dispozici mnoho komplikovaných mechanismů, které slouží ke kontrole buněčného příjmu, distribuce i eliminace mědi a které reagují na měnící se hladiny mědi v těle, na nadbytek či nedostatek.^{1,9}

3.1.3 Absorpce mědi

Množství mědi v organismu u savců může být zčásti ovlivňováno jejich stravovacími zvyklostmi.² U zvířat a lidí je měď z potravy absorbována přes sliznici buněk, které lemují žaludek a tenké střevo (hlavně přes buňky tenkého střeva). U lidí s normálním příjmem mědi je 55 - 75% absorbováno a aktivně rozloženo mezi zažívací trakt, tělní tekutiny a tkáně, především játra.⁶ Klíčovou roli v absorpci mědi hraje protein Ctr1 (selektivní transportér pro měď), který obsahuje N-konec bohatý na methionin a serin a vyskytuje se v mnoha tkáních a orgánech (nejvyšších koncentrací dosahuje v játrech, nižších hladin poté v mozku a ve slezině).^{1, 3} V buňkách se Ctr1 nachází na plazmatické membráně nebo v intracelulárních vezikulech. Distribuce Ctr1 mezi těmito dvěma místy je buněčně specifická a ovlivněná hladinami mědi. V játrech, ledvinách, placentě a mléčné žláze převládá Ctr1 na bazolaterální straně plazmatické membrány, kde přepravuje měď z cirkulace. Naopak ve střevě je Ctr1 lokalizováno intracelulárně v blízkosti apikální membrány, kde se podílí na přetváření nutriční mědi pro další využití. Pokud v těle dojde k navýšení extracelulární mědi, je tím vyvolán přechod Ctr1 do vezikul, což sníží příjem mědi přes membránu. Zatímco snížení extracelulární mědi obnovuje hladinu Ctr1 na plazmatické membráně a příjem mědi přes membránu se zvýší. Kromě akutní regulace hladin Ctr1 na plazmatické membráně je modulována na úrovni mRNA i celková část Ctr1 v závislosti na dlouhodobých změnách koncentrací mědi.³

I přes výrazně snížené množství Ctr1 měď do buněk vstupuje, avšak v nedostatečném množství, aby plně podporovala aktivitu enzymů závislých na mědi.³

V lidském těle byl dále identifikován protein Ctr2 (selektivní transportér pro měď), který se nejvíce vyskytuje v placentě, méně v játrech a oproti Ctr1 obsahuje méně methioninových zbytků.¹ Ctr2 je z největší části lokalizován intracelulárně a slouží k uvolňování mědi z lysozomů a jim podobným kompartmentům pro další využití, z čehož vyplývá, že hraje roli při mobilizaci intracelulárních zásob mědi.^{1,3} Nicméně malý zlomek Ctr2 je detekován i na plazmatické membráně a jeho nadměrná exprese je spojována se zvýšenou absorpcí mědi.³

3.1.4 Distribuce mědi

Vzhledem k vysoké reaktivitě mědi by bylo velmi škodlivé, kdyby se Cu^+ ionty vyskytovaly v těle volně, protože se účastní reakcí, jejichž produkty by mohly poškodit buněčné membrány, proteiny a nukleové kyseliny. Z tohoto důvodu je měď dodávána ke specifickým molekulám pomocí vytvořeného komplexu s Cu-chaperony.⁶

Antioxidační enzym, Cu/Zn-superoxiddismutasa (SOD), je u savců lokalizovaný zejména v cytosolu a mezimembránovém prostoru mitochondrií a využívá redoxní vlastnosti mědi katalyzovat disproportionaci superoxidu ($\text{O}_2^{\bullet-}$) na peroxid vodíku (H_2O_2) a kyslík (O_2), čímž chrání buňky proti oxidačnímu poškození. Dodání mědi na tento enzym vyžaduje specifický Cu-chaperon pro SOD (CCS).⁷ Specifické pro nedostatek mědi je snížená rychlost degradace CCS, což vede ke zvýšené expresi CCS, čímž se zvyšuje i účinnost přenosu mědi na SOD. V tomto případě je měď brána z buněčných zásob.¹

Další již identifikovaný specifický Cu-chaperon je Cox17. Tento chaperon dodává měď do mitochondrií, kde je potřebná pro cytochrom-c-oxidasu, terminální enzym v buněčném dýchání.⁶ Důležité jsou také mitochondriální proteiny SCO1 a SCO2, které měď do tohoto enzymu začleňují.¹

U savců se dále vyskytuje Cu-chaperon známý jako Atox1 (antioxidační protein vázající měď), který ji přenáší k ATPasam P-typu, což jsou transportní

proteiny pro měď. Měď je dodávána pomocí interakce protein-protein, která je i přítomností mědi stimulována.¹ Kladně nabitý povrch Atox1 se zapojuje do iontových interakcí s negativně nabitými zbytky na ATPasach.⁷ Rozlišujeme dva typy ATPas – ATP7A a ATP7B. Obě ATPasy obsahují na N-konci vazebná místa pro měď se sekvencí aminokyselin MXCXXC, kde M je methionin, C označuje cystein a X zastupuje jakoukoliv jinou aminokyselinu. Tyto ATPasy tvoří rodinu transportérů, která využívá energii z hydrolýzy ATP na přemístění kovových kationtů přes lipidovou dvouvrstvu. ATP7A je ve vysokých koncentracích zastoupena ve svalech, ledvinách, plicích a mozku. Dále je v nízkých hladinách exprimována v placentě a slinivce břišní a pouze ve stopovém množství je obsažena v játrech. Naproti tomu ATP7B je v játrech a ledvinách hojně zastoupena. Za normálních podmínek mědi jsou ATP7A i ATP7B převážně lokalizovány v trans-Golgiho síti, kde hrají roli v sekreční dráze mědi jejím poskytnutím pro zabudování do tvořících se proteinů s obsahem mědi (kuproproteinů).¹ V přítomnosti zvýšených hladin mědi je ATP7A, která je mimo jaterní tkáň, distribuována na plazmatickou membránu, kde zajišťuje vyloučení mědi do extracelulárního prostředí. ATP7A má poté díky své struktuře zajištěnou endocytózu zpět do trans-Golgiho sítě. ATP7B obsažená v jaterní tkáni může přecházet z trans-Golgiho sítě do intracelulárních vezikul, kde se pravděpodobně podílí na exkreci mědi z jater do žluče.⁷ Změna v subcelulární distribuci je u obou transportérů reverzibilní, nezávislá na syntéze nových proteinů a úroveň jejich exprese je ovlivněna změnami v buněčné koncentraci mědi. V souladu s rolí Atox1, dodání mědi na ATP7A a ATP7B, buňky s nedostatkem Atox1 hromadí vysoké koncentrace mědi s důsledkem nedostatečného buněčného vylučování mědi, což může mít za následek růstové retardace, zvýšenou perinatální úmrtnost, krvácení, hypotermii, hypopigmentaci a snížený placentární transport mědi.^{1,7}

3.1.5 Vylučování mědi

Regulace vylučování mědi je hlavním mechanismem pro homeostázu mědi. Primární cesta vylučování mědi z těla je z hepatocytů přes žluč. S výjimkou mědi z tkání, které produkují sekrety pro gastrointestinální trakt (slinivka, epitel žaludku

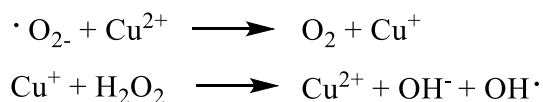
a střev), se většina mědi musí vrátit do jater kvůli svému vyloučení. Měď je transportována pomocí plazmatických přenašečů – transkupreinu, albuminu a ceruloplasminu. Jak už bylo uvedeno výše, na vylučování mědi se také podílejí měďné ATPasy – ATP7A i ATP7B.

Měď určená pro trvalé vyloučení je směřována do žluči, jelikož odtud je mnohem méně reabsorbována než z jiných gastrointestinálních tekutin. Schopnost se reabsorbovat se mění v závislosti na množství mědi v hepatocytech.⁶

3.1.6 Měď a oxidační poškození

Všechny vyšší organismy potřebují pro svůj život kyslík. Velká část kyslíkového metabolismu probíhá v mitochondriích, kde jsou vysokoenergetické fosfátové vazby přetvářeny do formy adenosintrifosfátu. Při tomto procesu jsou zužitkovány živiny i kyslík, ale mohou být vytvořeny i toxické vedlejší produkty nazývané reaktivní formy kyslíku (ROS). Mezi ROS jsou zařazeny superoxidový anion, peroxid vodíku a hydroxylový radikál.¹⁰ Na tvorbě ROS se podílí i ionty mědi a mohou se účastnit jak oxidace, tak i redukce.² ROS mohou vyvolat poškození u většiny biologických molekul, včetně DNA, proteinů a lipidů, které vyplývá z poškození membrán a různých buněčných organel.¹⁰

V přítomnosti superoxidu ($\cdot\text{O}_2^-$) či redukčních činidel (př. glutathion, askorbová kyselina) mohou být Cu^{2+} ionty redukovány na Cu^+ , jenž jsou schopny katalyzovat z peroxidu vodíku (H_2O_2) produkci hydroxylového radikálu ($\text{OH}\cdot$) pomocí Haber-Weiss reakce.²



Obrázek 1: Haber-Weiss reakce²

Hydroxylový radikál je velmi silný oxidační radikál, který může vznikat v biologických systémech a také je schopen reagovat s téměř každou biologickou molekulou. K oxidačnímu poškození může docházet odstraněním vodíku z uhlíku, jenž je nesen aminoskupinou, a vytvořením proteinového radikálu, anebo odstraněním vodíku z nenasycené mastné kyseliny, což vytvoří lipidový radikál.²

Oxidační poškození může být způsobeno zejména toxicitou mědi a vést až k poškození tkání, k čemuž dochází díky výše popsané schopnosti katalyzovat reakci mezi superoxidovými anionty a peroxidem vodíku. Avšak i nedostatek mědi vyvolává oxidační stres a poškození tkání kvůli změnám v oxidačním obranném systému (Cu/Zn-SOD, ceruloplasmin, glutathion, metalothionein).¹¹

3.1.7 Toxicita mědi

Akutní či chronická toxicita mědi je poměrně vzácná díky schopnosti regulace pomocí zvýšené absorpce či exkrece. Avšak nadbytek mědi nastává vlivem nehody, rizika z povolání, znečištěním životního prostředí či vrozené poruchy metabolismu mědi. Vystavení zvýšeným koncentracím mědi je velmi škodlivé.

Chronická toxicita mědi postihuje především játra, protože se jedná o první místo, kde se měď vyskytuje po vstupu do krve. Obvykle se projevuje rozvojem jaterní cirhózy s hemolýzou a poškozením renálních kanálek, mozku i jiných orgánů. Příznaky se mohou vystupňovat až ke kómatu, jaterní nekróze, cévnímu kolapsu a smrti.²

Akutní toxicita mědi se objevuje po konzumaci potravin a vody kontaminovaných mědí nebo po náhodném požití vysokého množství solí mědi. Je spojována s rozvojem akutních gastrointestinálních příznaků, které zahrnují bolest břicha, nevolnost, zvracení, průjem, ale také s rozvojem tachykardie, respiračních potíží a jaterním či ledvinovým selháním.¹¹

Smrtelná dávka mědi se odhaduje na 10 – 20 g u neléčeného dospělého člověka.²

3.1.8 Nedostatek mědi

Z důvodu nezbytnosti mědi v lidském organismu i nedostatek mědi vyvolává vážné zdravotní postižení.

Redoxní aktivita mědi hraje důležitou roli při přenosu elektronů u řady reakcí, z čehož vyplývá, že nedostatek mědi může mít za následek sníženou produkci energie, abnormální metabolismus glukózy a cholesterolu, zvýšené oxidační

poškození, zvýšené tkáňové železo, abnormální syntézu a zpracování neuropeptidů, zhoršenou kontraktilitu myokardu a trvalé účinky na nervový a imunitní systém.

Ke stavu nedostatku mědi dochází v důsledku genetických defektů v jejím metabolismu, což se projevuje neuronální degenerací, mentální retardací, abnormalitami ve vlasech, kůži a pojivové tkáni, také cévními abnormalitami či degenerací sítnice. Dalším důvodem nedostatku mědi je její nízký příjem potravou a i předčasně narození kojenci mohou mít nízkou zásobu mědi. U těch se deficit mědi projevuje jako neutropenie, osteopenie, depigmentace kůže a vlasů a patologické zlomeniny kostí.

Mnoho z klinických příznaků genetického, dietního či získaného deficitu mědi může být přičítáno snížené aktivitě enzymů, které jsou závislé na mědi, jako je lisyloxidasa, cytochrom-c-oxidasa, monoaminoxidasa, Cu/Zn-superoxiddismutasa a ceruloplasmin.¹¹

3.1.9 Onemocnění a měď

Menkesovo onemocnění

Menkesovo onemocnění (MD) je vzácné na chromozomu X vázané dědičné onemocnění. Vychází z nedostatku činnosti ATP7A (Menkesův protein), což vede k selhání dodávky mědi ze střevního epitelu do krevního oběhu, a v důsledku toho se vyznačuje deficitem mědi obecně.¹² Ztráta funkce ATP7A u postižených jedinců také vede k selhání přenosu mědi přes placentu a hematoencefalickou bariéru.⁵ Snížená aktivita Cu-závislých enzymů způsobuje nižší dodávku mědi do mozku, což u pacientů s MD vyvolává závažné mentální a vývojové poruchy.¹² Mezi další klinické příznaky MD patří křeče, hypotermie, svalová hypotonie, abnormality pojivové tkáně, hypopigmentace vlasů a kůže, abnormální myelizace a difúzní atrofie mozku.^{5,12}

Frekvence Menkesova onemocnění je přibližně 1 nemocný na 200 000 zdravých lidí a převážně se projevuje u chlapců ve věku 2 až 3 měsíců s následnou ztrátou dříve získaných vývojových milníků.^{13, 14} Bez brzké léčby smrt obvykle nastává několik let po nástupu onemocnění.¹⁴

U pacientů s MD včasná léčba mědi a histidinem může předcházet neurologickým poškozením a prodloužit přežití tím, že přejde do projevu mírnější formy.¹⁵

Wilsonova choroba

Wilsonova choroba (WD) je autozomálně recesivní onemocnění metabolismu mědi s jaterními, očními, neurologickými a psychiatrickými symptomy. Tyto symptomy pochází z genetického defektu ATP7B (Wilsonův protein), který je nezbytný pro transport mědi. V důsledku zhoršené funkce ATP7B měď nemůže být vylučována z hepatocytů do žluče a akumuluje se v játrech a dalších extrahepatálních tkáních, včetně mozku, což vede k chronické toxicitě mědi.¹²

Ačkoli klinické projevy WD jsou různé, většina pacientů má přítomny jaterní nebo neurologické symptomy.⁵ Mezi počáteční příznaky onemocnění, které bývají často necharakteristické, patří nechutenství, únava i mírná bolest břicha.¹⁶ Následně se akumulace mědi v játrech projevuje buď jako akutní selhání jater, anebo jako chronické jaterní onemocnění, například jaterní cirhóza.¹⁴ Depozice mědi v bazálních gangliích s výsledkem degenerace a ztráty neuronů je naopak zodpovědná za neurologické projevy, které zahrnují Parkinsonovy příznaky, třes a dystonii. Psychiatrické onemocnění je také význačný rys WD a může zahrnovat abnormální chování, změny osobnosti, deprese, úzkost, dezorientaci a schizofrenii.⁵ U WD mohou být pozorovány i depozita mědi v rohovce očí, které jsou známé jako Kayser-Fleischerovy prsteny.¹³ Onemocnění jater je nejběžnější počáteční projev u dětí, zatímco neuropsychiatrické symptomy jsou přítomny spíše u starších jedinců.¹⁵

WD se běžně léčí systémovou chelatační terapií (D-penicilaminem nebo triethylentetraminem), která se snaží obnovit a udržet homeostázu mědi v těle tím, že chelatační činidla naváží měď přímo v krvi nebo v tkáních a usnadní její vylučování.^{12, 14} Pro léčení pre-symptomatických pacientů se aplikuje zinek, který omezuje absorpci mědi ve střevě a může také pomoci omezit hromadění mědi v mozkových buňkách.¹² Medikamentózní léčba u WD musí být celoživotní, protože abnormální akumulace mědi nemůže být řízena stravou s nízkým obsahem mědi,

ale i přesto je potřeba potravin bohaté na měď omezit.^{14, 16} V ideálním případě se léčba dělí na dvě fáze, počáteční a následně udržovací terapii. Po počátečním agresivnějším ošetření jsou dostačující redukované dávky k udržení normální homeostázy mědi. Udržovací dávka by měla být taková, aby se zabránilo nadměrné léčbě, která může vést k nedostatku mědi.¹⁴ Při časně stanovené diagnóze a včasné léčbě je prognóza onemocnění poměrně dobrá.¹⁶

Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které způsobuje ztrátu paměti a psychiatrické poruchy a je převládající příčinou demence ve stáří.⁵ Hlavním rizikovým faktorem u AD je pokročilý věk (obvykle začíná před dosažením věku 60 let) a vzhledem k zvýšené životnosti se předpokládá, že se počet lidí trpících AD bude dále zvyšovat.^{12, 17} Mezi další rizikové faktory patří také pohlaví, genetické a enviromentální faktory.¹²

Extracelulární senilní plaky v mozku a intracelulární neurofibrilární klubka jsou považovány za charakteristické patologické znaky AD. Senilní plaky se skládají z polypeptidů β -amyloidu ($A\beta$), které jsou generovány pomocí proteolytického štěpení membránového amyloidního prekurzorového proteinu (APP) β - a γ -sekretasou.¹² Všechny tyto molekuly vážou měď. APP má vazebnou doménu pro měď, která redukuje Cu^{2+} ionty na Cu^+ a podporuje tak oxidační poškození. To stejné platí i pro γ -sekretasu a $A\beta$, které vážou měď i cholesterol a usnadňují mědi způsobenou oxidaci cholesterolu na 7-OH cholesterol, který je extrémně toxický pro neurony.¹⁰

Aceruloplasminemie

Aceruloplasminemie patří do skupiny neurodegenerativních poruch, u kterých se hromadí železo nejen v mozku, ale i v játrech a slinivce, a je způsobena autozomálně recesivní mutací v genu ceruloplasminu. Ceruloplasmin váže měď, ale také vystupuje jako feroxidasa. Aceruloplasminemie je charakterizována sítnicovou degenerací, diabetem a neurologickými symptomy. Kromě nízkého nebo žádného ceruloplasminu pacienti mají obvykle vysokou koncentraci feritinu a nízkou

koncentraci železa v séru a také nízkou sérovou hladinu mědi s vylučováním normálních koncentrací. U pacientů, kteří mají symptomy připomínající WD, je možné aceruloplasminemii zaměnit s WD z důvodu velmi nízké nebo žádné koncentrace ceruloplasminu v séru, avšak u WD se nevyskytuje akumulace železa.¹⁴

Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza je neurodegenerativní onemocnění, které postihuje horní a dolní motorické neurony, což vede k progresivní svalové slabosti, atrofii a smrti, která často nastane do 3 let od nástupu příznaků. Ve většině případů etiologie této nemoci není známá, avšak u malého zlomku pacientů nastává v důsledku autozomálně dominantních dědičných mutací v genu, který kóduje cytosolickou Cu/Zn-superoxiddismutasu. Neuronální degenerace u těchto případů nevychází ze ztráty činnosti SOD, ale spíše ze zisku abnormální funkce.⁵

Prionová onemocnění

Prionová onemocnění jsou skupinou poruch, které byly spojené s přeskupením prionového proteinu (PrPC) do abnormální patogenní konformace (PrPSc). Jsou to vzácné, ale fatální nemoci a patří mezi ně například Creutzfeld-Jacobova choroba, Kuru, fatální familiární insomnie či spongiformní encefalopatie.¹² Prionová onemocnění se nejčastěji projevují progresivní demencí a ataxií.⁵ PrPC je schopný vázat měď, což se zdá, že zvyšuje jeho stabilitu a infekčnost.^{6, 18} Abnormální forma tohoto proteinu se u těchto onemocnění kumuluje a je rezistentní vůči proteolýze.⁶ Měď také podporuje renaturaci PrPSc, což obnovuje odolnost na proteázy, a je jedním z mnoha faktorů, které mají vliv na rychlost progresu prionového onemocnění.^{5, 18}

Zánět, infekce a rakovina

Během zánětu, infekce a rakoviny se změní metabolismus mědi, kdy její koncentrace i hladina ceruloplasminu stoupá. Měď je sama o sobě důležitá pro imunitní odpověď, podporuje tvorbu IL-2 aktivovaných lymfocytárních buněk a taky aktivitu a účinnost buněčné a humorální imunity. Ve zhoubných nádorech je

hladina mědi oproti původní tkáni zvýšena, protože je nádorem absorbována z ceruloplasminu a z neceruloplasminových zdrojů v krvi. Navíc měď může hrát také roli při angiogenezi.⁶ Zvýšené hladiny mědi v séru a tumoru byly prokázány zejména u rakoviny plic, prsu, gynekologických orgánů a u leukémie.¹⁹

Diabetes mellitus

V některých studiích byl zaznamenán změněný metabolismu glukózy u lidí s nedostatkem mědi v potravě. Změněný metabolismus mědi může přímo či nepřímo měnit homeostázu glukózy, ale i diabetes může narušit metabolismus mědi (například zvýšené koncentrace mědi v játrech a v ledvinách, které jsou spojeny se zvýšenou hladinou metalothioneinu).¹¹

Kardiovaskulární onemocnění

Srdce a srdeční cévy jsou velmi náchylné k nedostatku mědi, který může vyvolat změny srdeční morfologie, což zahrnuje zvětšené monocyty, postižené myofibrily a bazální laminy a mitochondriální proliferaci. Dále jsou v důsledku nedostatku mědi pozorovány elektrokardiografické abnormality, narušená kontraktilita a mitochondriální respirační funkce či změněná struktura elastických vláken, což způsobuje prasklinu na aortě. Bylo navrženo, že tato poškození jsou vyvolána prostřednictvím produkce ROS spolu s nízkou aktivitou oxidačních obranných enzymů v srdci ve srovnání s jinými tkáněmi.¹¹

3.1.10 Oxidační obranný systém a antioxidační živiny

Jako je měď schopna katalyzovat produkci ROS, existuje obranný systém a živiny, které mohou poskytnout ochranu proti oxidačnímu poškození vyvolaného mědí. Tato antioxidační ochrana je zajištěna několika možnými mechanismy, mezi které můžeme zařadit omezení mitochondriálního generování superoxidu, spotřebování ROS, chelatační převedení či odebrání iontů kovů z místa tvorby ROS, sníženou produkci peroxidu vodíku a reparaci poškozených molekul.²

Do oxidačního obranného systému v lidském těle zahrnujeme Cu/Zn-superoxiddismutasu, Mn-superoxiddismutasu, katalasu

a glutathionperoxidasu a mezi antioxidační živiny patří vitamin C a E, glutathion, selen, β -karoten a koenzym Q.^{2, 11, 20}

Vitamín E (α -tokoferol), což je hlavní antioxidant volných radikálů, je schopný narušit iniciaci a rozvoj oxidačního poškození, které je vyvolané mědí. Suplementace vitamínem E zvyšuje odolnost vůči oxidaci LDL a inhibuje oxidaci VLDL, což naznačuje, že vitamín E může zabránit endoteliální dysfunkci spojené s metabolismem cholesterolu a pomáhá při prevenci funkčního poškození vyvolaného ROS, které je spojené s aterosklerózou.²

Vitamín C (askorbová kyselina) vystupuje jako důležitý vitamín rozpustný ve vodě, ale také jako antioxidant. Je vynikající redukční činidlo a antioxidační dárce u procesu oxidace, který je zprostředkovaný volnými radikály, ale také je askorbová kyselina schopna redukovat redoxně aktivní kovy, čímž zvyšuje jejich prooxidační aktivitu a stimuluje oxidační poškození tkání.^{2, 20} V nízkých koncentracích vystupuje kyselina askorbová spíše jako prooxidant, naopak při vysokých koncentracích má tendenci být antioxidant.²

Koenzym Q (ubichinon/ubichinol) je přítomen ve všech membránách, v nichž ve spolupráci s α -tokoferolem také může tlumit radikálové reakce.²⁰

3.1.11 Chelatace mědi

V dnešní době je chelatace mědi používána zejména jako léčba při přetížení organismu toxickými kovy. Cílem chelatační léčby je odstranit toxické kovové ionty ze zranitelných míst v postižených orgánech a to v první řadě vyžaduje, aby chemická afinita chelatačního činidla pro kovové ionty byla vyšší než afinita kovových iontů pro biologické molekuly. Dalšími důležitými vlastnostmi chelatačních činidel jsou nízká toxicita, tvorba chelátu s rychlou eliminací a vhodná farmakokinetika.²¹

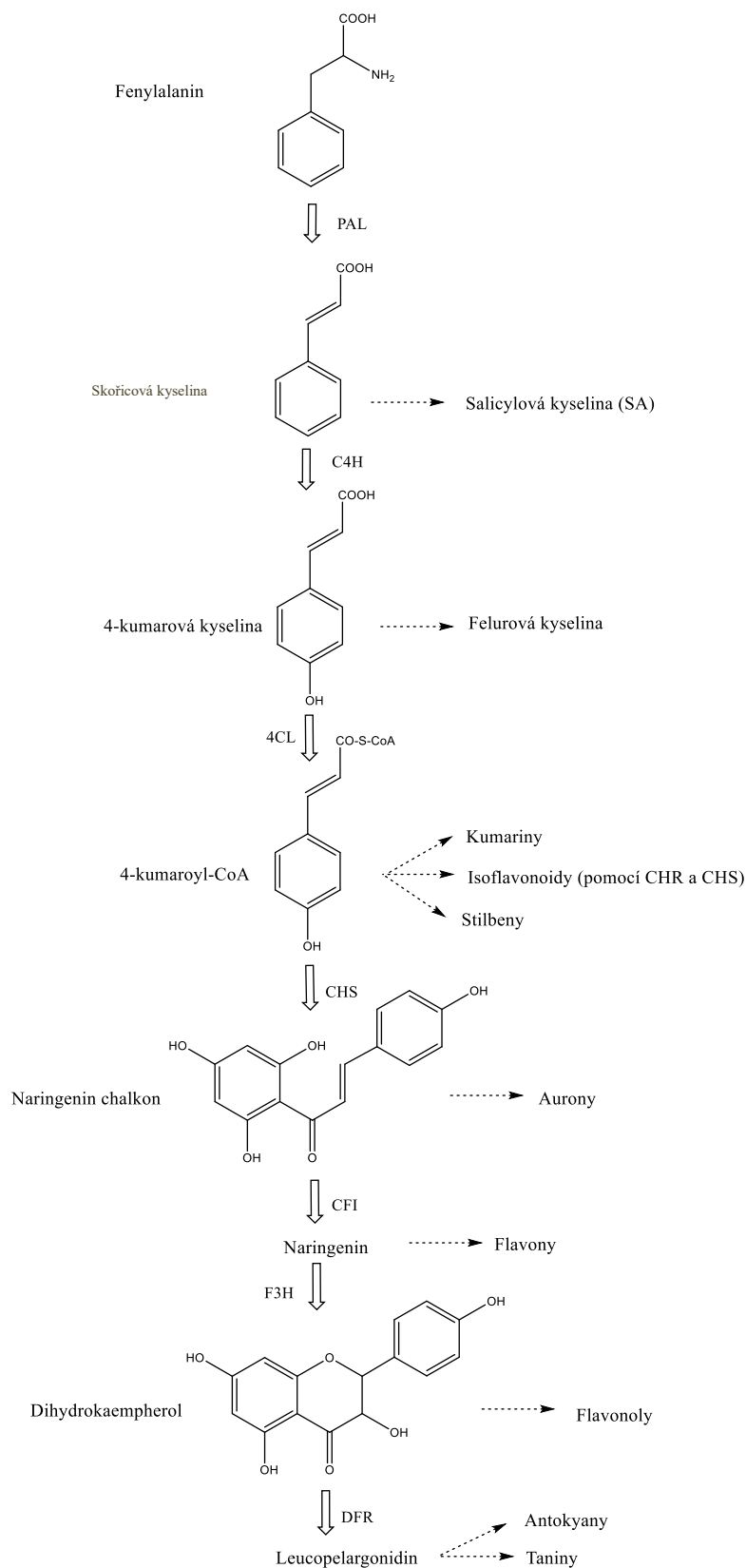
V souvislosti s mědí se chelatace využívá hlavně při léčbě Wilsonovy nemoci. Klíčovou terapií tohoto onemocnění reprezentují Cu-chelátory D-penicilamin, triethyltetraamin (trientin) a tetrathiomolybdát. D-penicilamin je považován za standardní terapii WD, avšak vykazuje významné vedlejší účinky, které se týkají zejména imunitního systému, ledvin, pojivové tkáně a rizika počátečního zhoršení

neurologických příznaků. Dalším měď-chelatačním činidlem v léčbě WD je trientin, který byl zavedený u D-penicilamin-netolerantních pacientů.²²

V současné době probíhá výzkum nových Cu-chelátorů zejména pro onemocnění nervového systému, ale většina sloučenin je teprve ve fázi experimentálního testování.²³ Konkrétně jsou chelátory mědi testovány pro jejich využití v terapii Alzheimerovy choroby.²⁴

3.2 Fenylpropanoidy

Mezi fenylpropanoidy rostlin se řadí mnoho od fenylalaninu odvozených chemických látek, jež mají obecnou fenylpropanovou kostru (C6-C3).²⁵ Metabolismus těchto látek zahrnuje složitou sérii větvených biochemických reakcí, kterými rostliny poskytují řadu významných fenolových sloučenin, z nichž mnohé jsou specifické pro jednotlivé druhy rostlin. Významná větev tohoto metabolismu vede k produkci flavonoidů, včetně flavonolů, antokyanů a taninů.²⁶



Obrázek 2: Schématické zobrazení jedné větve fenylpropanoidového metabolismu. PAL (fenylalaninamoniaklyasa), C4H (cinnamát-4-hydroxylasa), 4CL (4-kumarát-CoAligasa), CHS (chalkonsynthasa) CFI (chalkon-flavononisomerasa), F3H (flavanon-3-hydroxylasa), DFR (dihydroflavonolreduktasa), CHR (chalkonreduktasa).²⁶

Fenylpropanoidy patřící mezi fenolové látky jsou široce rozšířeny v rostlinách, ovoci, zelenině a v obilí a získaly značnou pozornost jako biologicky aktivní sloučeniny kvůli jejich účinkům, včetně antioxidační, protinádorové a protizánětlivé aktivity.^{27, 28} Jsou zejména vynikajícími antioxidanty, které vychytávají volné radikály, reaktivní formy kyslíku a přechodné kovy s chelatační aktivitou, dále hrají důležitou roli jako UV-absorbující sloučeniny a pigmenty (antokyany).^{26, 28} Kromě toho vysoký příjem ovoce a zeleniny bohaté na fenolové sloučeniny může snížit riziko kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a dalších nemocí.²⁸ Některé rostlinné růstové inhibitory se také mohou zařadit mezi fenolové látky.²⁹

V současné době se tyto sloučeniny získávají hlavně extrakcí z čerstvého rostlinného materiálu.³⁰ A přestože jsou široce používány jako doplňky stravy a průmyslový materiál, jejich extrakční výtěžky jsou poměrně nízké, protože většina z těchto látek se hromadí v rostlinných buňkách v nízkých hladinách.³¹

3.2.1 Kumariny

Kumariny se řadí do skupiny látek, které mohou vznikat z jedné větve fenylpropanoidového metabolismu.²⁶ Jsou to deriváty α -chromonu, které vznikají vytvořením laktonu z 3-(2-hydroxyfenyl)prop-2-enové kyseliny (cis-formy). Vyskytují se zejména v čeledi Apiaceae, Asteraceae a Fabaceae.³² Některé látky patřící mezi kumariny mohou také vykazovat antioxidační aktivitu, která je založena na vychytávání reaktivních forem kyslíku a dusíku, na inhibici enzymů, které tyto reaktivní formy produkují, a na chelataci přechodných kovů, jako je měď a železo.³³ Dále byl u kumarinů prokázán jejich vazodilatační a protidestičkový potenciál.³⁴

3.2.2 Flavonoidy

Další skupinou látek, která vzniká z jedné větve metabolismu fenylpropanoidů jsou flavonoidy.²⁶ Strukturně jsou flavonoidy deriváty 2-fenylchromanu. Účinky flavonoidů jsou velmi široké – antioxidační aktivita, schopnost vychytávat volné radikály a reaktivní formy kyslíku, protizánětlivé a protinádorové účinky, inhibiční aktivita některých enzymů, jejichž činností se

může chelatovat měď či železo, a potenciace účinku vitamínu C (použití jako podpora při léčbě infekčních nemocí). Flavonoidy můžeme rozdělit do několika skupin: flavonoly, flavony, flavanony, chalkony, aurony a další.³²

3.2.3 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou také jednou ze skupin látek, které vznikají během fenylypropanoidového metabolismu.²⁶ Na rozdíl od flavonoidů je jejich struktura odvozená od 3-fenylchromanu. Isoflavonoidy jsou charakteristické pro některé rostliny z čeledi Fabaceae (např. *Glycine max* L., *Trifolium pratense* L.) a vykazují mírné estrogení účinky. Stejně jako flavonoidy se rozdělují do několika skupin – isoflavany, isoflavony, isoflavanony.³²

3.2.4 Fenylypropionové kyseliny

Předmětem zájmu jsou i fenylypropionové kyseliny z důvodu jejich biologických a farmakologických účinků na zdraví člověka. Jsou to meziproducty v obecné fenylypropanové cestě a velmi hojně se vyskytují v rostlinách.³⁵ Například kyseliny skořicová, kávová a chlorogenová mohou být izolované z plodů dřeviny *Chaenomeles speciosa* z čeledi Rosaceae a kyseliny kávová, ferulová a 4-hydroxyskořicová byly identifikovány v suchých extraktech z *Astragalus dolichophyllus* a z *A. brachylobus* z čeledi Fabaceae.^{36, 37, 38}

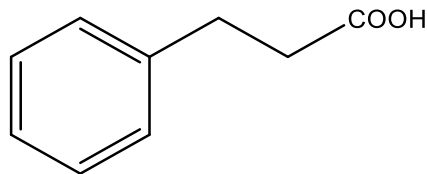
Fenolové kyseliny odvozené od kyseliny skořicové se jen velmi zřídka vyskytují ve volné formě, avšak velmi hojně se dají nalézt ve formě esterifikované. Konkrétně estery kyseliny kávové jsou obsaženy v artičoku (*Cynara scolymus* L., Asteraceae) či v rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae).³⁰

Další studie ukazují, že některé hydroxyfenylypropionové kyseliny mohou vznikat pomocí mikroflóry tlustého střeva při metabolizaci procyanidinů i při metabolizaci flavonolů, flavanonů, flavan-3-olů a hydroxycinnamátů.^{39, 40}

3-fenylypropionová kyselina

3-fenylypropionová kyselina má obecnou fenylypropanovou strukturu (C6-C3) a jako jedna z fenolových kyselin byla identifikována v kořenových exudátech

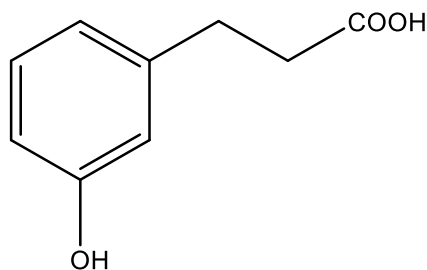
tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) z čeledi Solanaceae.^{29, 38, 41} Může být také izolována z poměrně nového bakteriálního kmene *Streptomyces*.⁴²



Obrázek 3: 3-fenylpropionová kyselina

3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina

3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina má hydroxylovou skupinu navázanou v poloze 3 aromatického kruhu. Jako metabolit kvercetinu produkovaný lidskou mikroflórou vykazuje i vazodilatační účinky.⁴³

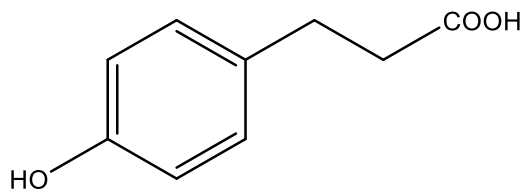


Obrázek 4: 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina

3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina

Tato fenylpropionová kyselina má ve své struktuře aromatický kruh substituovaný hydroxylovou skupinou v poloze 4. 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina byla identifikována a izolována z celých rostlin *Dendrobium moniliforme* z čeledi Orchidaceae a také může být izolována z kapradiny *Lepisorus contortus*

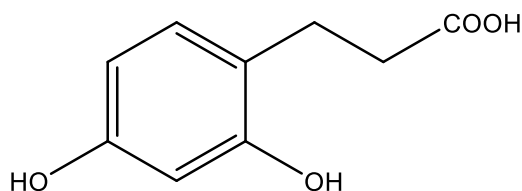
z čeledi Polypodiaceae.^{38, 44, 45} Ukázalo se, že některé syntetické deriváty této kyseliny vykazují i hypocholesterolemický účinek.⁴⁶



Obrázek 5: 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina

3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

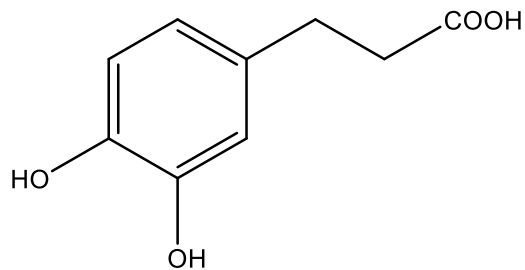
Kyselina 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová se vyznačuje dvěma hydroxylovými skupinami na aromatickém kruhu a je možné ji izolovat z listů a plodů fíkovníku (*Ficus carica* L.) z čeledi Moraceae.^{38, 47} Může vystupovat jako inhibitor tyrosinasy, což je enzym obsahující měď, široce rozšířený v přírodě.⁴⁷



Obrázek 6: 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

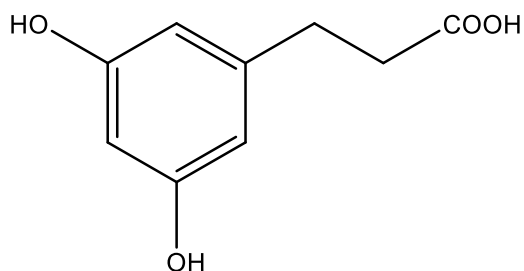
3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina se také vyznačuje dvěma navázanými hydroxylovými skupinami (v poloze 3 a 4) a může být získána izolací z rostliny *Salicornia herbacea* L. z čeledi Chenopodiaceae.^{28, 48}



Obrázek 7: 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

Tato fenylpropionová kyselina má také ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny, avšak v poloze 3 a 5. Může vznikat během první fáze metabolismu alkylresorcinolů, což jsou fenolové lipidy přítomné v celých zrnech žita a pšenice.⁴⁹



Obrázek 8: 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

4 Experimentální část

4.1 Materiál

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

4.2 Testované látky

- 3-fenylpropionová kyselina
- 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina
- 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina
- 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina
- 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina
- 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

Všechny testované kyseliny jsou získány od firmy Sigma Aldrich.

4.3 Chemikálie

- Pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner)
- Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) (Sigma Aldrich)
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) (Sigma Aldrich)
- Hematoxylin (HEM) (Sigma Aldrich)
- Chlorid měďný (CuCl) (Sigma Aldrich)
- 15mM acetátové pufrý o pH 4.5 a 5.5 (octová kyselina, octan sodný, ultračistá voda)
- 15mM HEPES pufrý o pH 6.8 a 7.5 (HEPES, HEPES sůl, ultračistá voda)

4.4 Přístrojové vybavení

- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

- Analytické váhy KERN ABT120-5DM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Třepačka pro zkumavky IKA® VORTEX GENIUS 3 (IKA® - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA® MS 3 digital (IKA® - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)
- Ultrazvuková lázeň KRAINTEK® (Slovenská republika)

4.5 Příprava zásobních roztoků

- **Roztok měďnatých iontů o koncentraci 5 mM**

Roztok měďnatých iontů byl připravován rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 249,69 \text{ g/mol}$) v destilované vodě na požadovanou koncentraci 5 mM. Připravený zásobní roztok byl stabilní a uchovávan v lednici. Dále jsme ředili již připravený 5mM zásobní roztok měďnatých iontů v dimethylsulfoxidu (DMSO) na požadovanou koncentraci podle konkrétních pracovních podmínek.

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

Roztok BCS byl připravován rozpuštěním disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny ($M_w = 564,54 \text{ g/mol}$) v destilované vodě na požadovanou koncentraci 5 mM.

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

Roztok hematoxylinu byl připravován jeho rozpuštěním v dimethylsulfoxidu (DMSO) na požadovanou koncentraci 5 mM ($M_w = 302,28 \text{ g/mol}$). Tento zásobní roztok není stabilní, proto se dá použít po dobu cca 5 hodin.

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

Tento roztok byl připravován rozpuštěním hydroxylaminu ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) v destilované vodě na požadovanou koncentraci 100 mM a následně byl roztok naředěn na koncentraci 10 mM.

- **Roztok hydroxylaminu hydrochloridu (HA) o koncentraci 1 mM**

Roztok hydroxylaminu byl připravován jeho rozpuštěním v destilované vodě na požadovanou koncentraci 100 mM a poté dále naředěn na koncentraci 1 mM, která byla potřebná pro experiment ($M_w = 69,49$ g/mol).

- **Roztok chloridu měďného (CuCl) o koncentraci 5 mM**

Tento roztok byl připravován rozpuštěním CuCl ve vodném roztoku 0,1M HCl a 1M NaCl ($M_w(\text{CuCl}) = 98,99$ g/mol, $M_w(\text{CuBr}) = 143,45$ g/mol). Nejprve bylo potřeba připravit rozpouštědlo. Prvním krokem v přípravě rozpouštědla byla příprava 0,1M roztoku HCl (napipetovali jsme 442 μl 32% HCl ($M_w = 36,46$ g/mol, 1 l \approx 1,16 kg) do 44558 μl destilované vody) a poté jsme v 0,1M roztoku HCl rozpustili NaCl ($M_w = 58,44$ g/mol) na 1M roztok. Nakonec jsme CuCl rozpustili v připraveném rozpouštědle v ultrazvukové lázni.

- **Roztok testované látky**

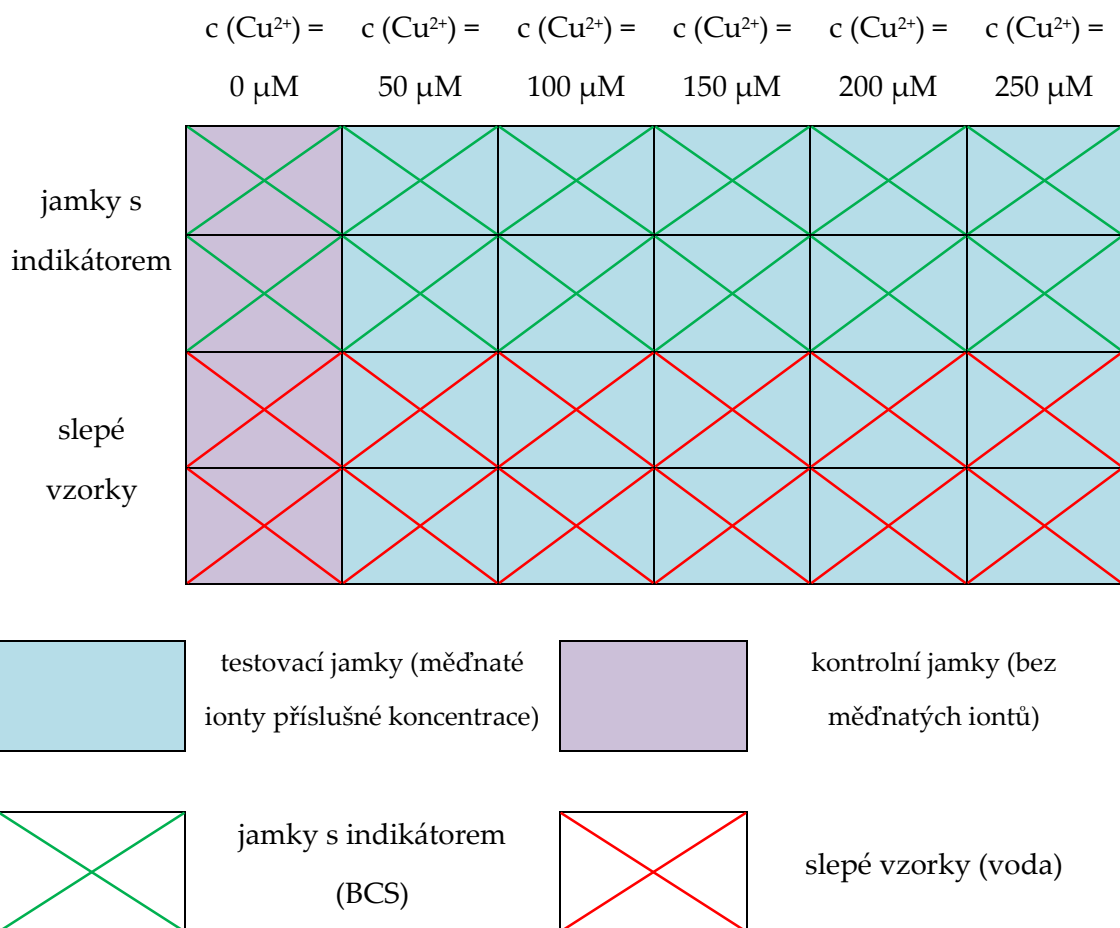
Základní roztoky testovaných fenylpropionových kyselin byly připravovány jejich rozpuštěním v dimethylsulfoxidu (DMSO) na různou výchozí koncentraci, obvykle to však byla koncentrace 10 či 25 mM a následně byly ředěny v DMSO na koncentrace požadované v jednotlivých měřeních.

4.6 Kalibrace měďnatých iontů

Pro získání kalibrační křivky měďnatých iontů závislosti absorbance na koncentraci Cu^{2+} iontů jsme si nejprve připravili pracovní roztoky potřebných koncentrací. V přesném pořadí a množství jsme je napipetovali do mikrotitrační destičky a následně nechali změřit absorbanci. Z naměřených výsledků jsme sestavili přímkou a zkonstruovali graf.

- Nejdříve jsme si připravili základní a pracovní roztoky.
 - 1mM roztok hydroxylaminu hydrochloridu (HA)
 - 5mM roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) ve vodě
 - 5mM roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve vodě
 - roztoky Cu^{2+} iontů o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 μM

- Poté jsme napipetovali 150 μl pufru (pH 6.8) do všech jamek testovací destičky.
- Do všech jamek jsme přidali 50 μl 1mM roztoku HA.
- Posléze jsme do testovacích jamek vložili 50 μl roztoku měďnatých iontů příslušné koncentrace a do všech jamek kontrolních jsme použili 50 μl vody.
- Nechali jsme destičku 1 minutu promíchat na třepačce.
- Následně jsme do prvních dvou řad napipetovali 50 μl roztoku BCS a do dvou spodních řad jsme přidali 50 μl vody.
- Absorbance byla měřena při vlnové délce 484 nm ihned a po 5 minutách.
- Naměřené hodnoty jsme zaznamenali do předem připravené tabulky.
- Nakonec jsme sestavili graf kalibrační křivky.



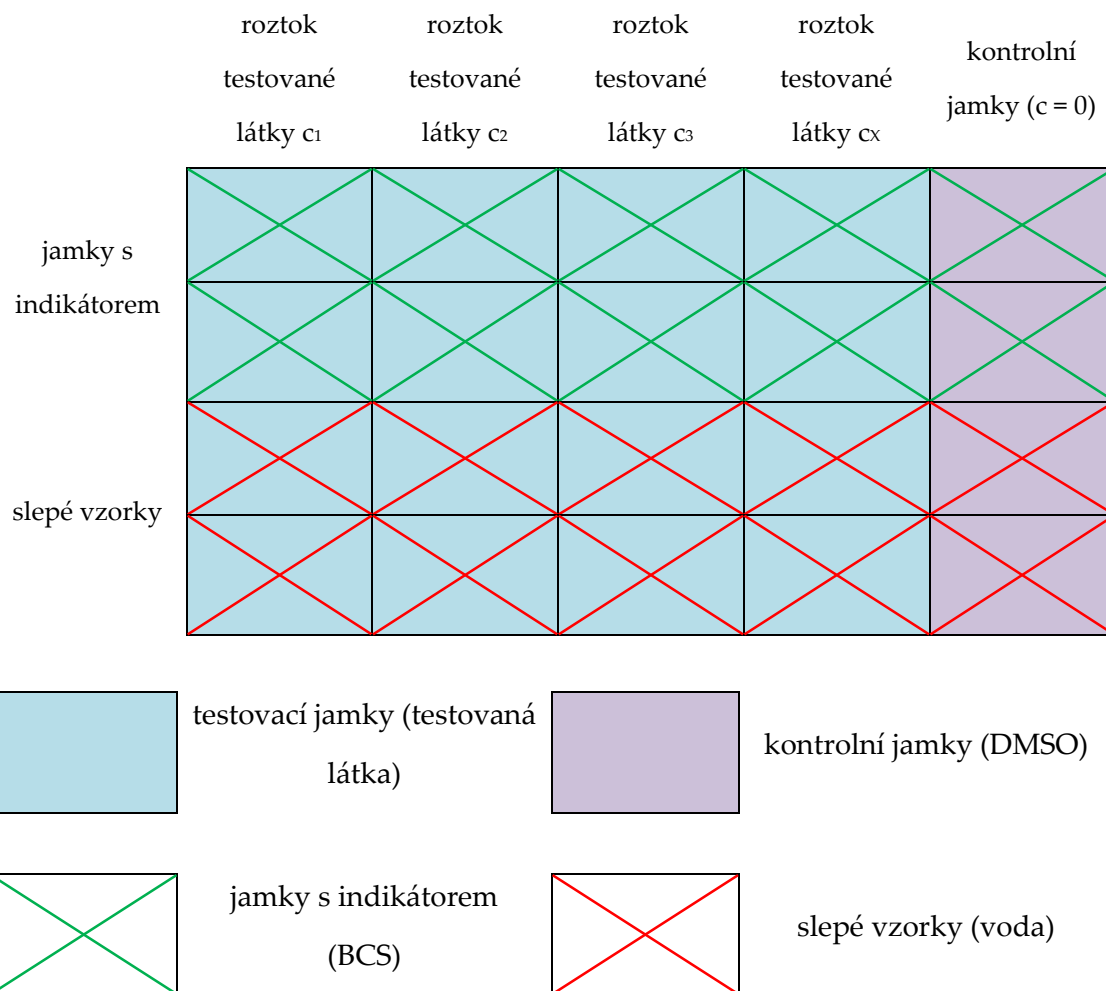
Obrázek 9: Schématické zobrazení mikrotitrační destičky při kalibraci měďnatých iontů

4.7 Metodický postup stanovení chelatace měďných iontů v pufru

Při chelataci měďných iontů v pufru byl k danému pufru přidáván do všech jamek roztok hydroxylaminu hydrochloridu a roztok měďných iontů. Po promíchání byl do testovacích jamek napipetován roztok testované látky a do jamek kontrolních čisté rozpouštědlo, v našem případě DMSO. Po opětovném promíchání byl do jamek přidán roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny nebo vody. Absorbance byla měřena spektrofotometrickou analýzou při vlnové délce 484 nm.

- Nejprve jsme si připravili pracovní a základní roztoky.
 - 1mM/10mM roztok hydroxylaminu hydrochloridu
 - 250 μ M roztok měďných iontů v DMSO
 - 5mM roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS)
 - roztok testované látky o příslušné koncentraci
- Do každé jamky testovací destičky jsme napipetovali 100 μ l příslušného pufru (pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5).
- Poté jsme přidali do jamek 50 μ l roztoku HA – 1mM k pufru pH 6.8 a 7.5 a 10mM k pufru pH 4.5 a 5.5.
- Dalším krokem bylo napipetovat do všech jamek testovací destičky 50 μ l roztoku měďných iontů v DMSO o koncentraci 250 μ M.
- Nechali jsme po dobu 1 minuty míchat testovací destičku na třepačce.
- Následně jsme přidali 50 μ l roztoku testované látky příslušné koncentrace do testovacích jamek nebo 50 μ l DMSO do jamek kontrolních.
- Opět jsme nechali míchat na třepačce po dobu 2 minut.
- Dále jsme do horní poloviny jamek testovací destičky přidali 50 μ l 5mM roztoku BCS a do dolní poloviny jamek 50 μ l vody.
- Měřili jsme absorbanci při vlnové délce 484 nm ihned a ještě jednou po 5 minutách.
- Naměřené hodnoty absorbance jsme zaznamenali do tabulky.
- Pomocí statistické analýzy jsme propočítali stanovované hodnoty.

- Závěrem jsme sestavili graf křivky.



Obrázek 10: Schématické zobrazení mikrotitrační destičky při stanovení chelatace měďných iontů

Konečný obsah jamek v testovací destičce.

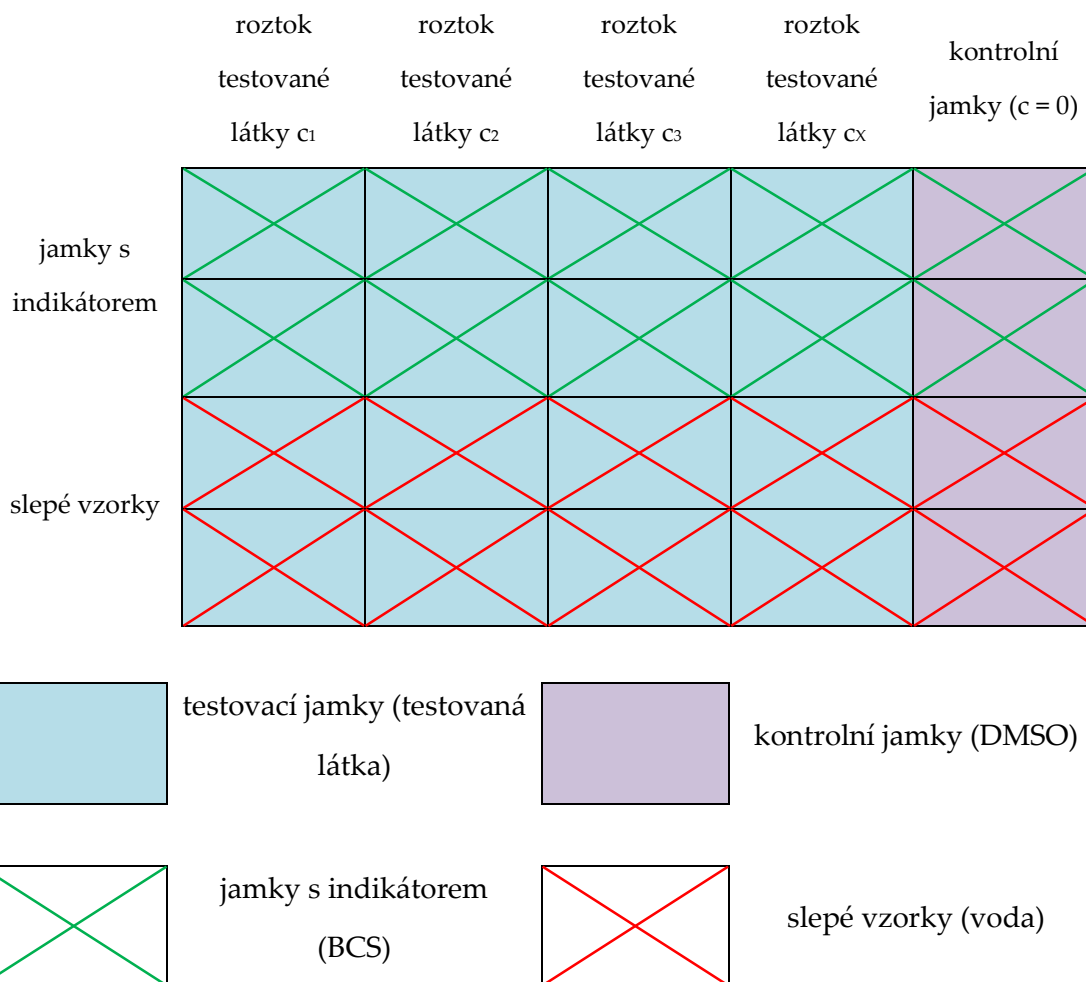
- 100 μ l pufr
- 50 μ l roztok HA
- 50 μ l roztok Cu⁺ iontů
- 50 μ l roztok testované látky/DMSO
- 50 μ l roztok BCS/voda

4.8 Metodický postup stanovení chelatace měďnatých iontů v pufru

Při chelataci měďnatých iontů v pufru byl k danému pufru přidán do testovacích jamek roztok testované látky a do kontrolních jamek napipetováno rozpouštědlo. Následně byl do všech jamek testovací destičky přidán roztok měďnatých iontů. Po promíchání byl přidán roztok hydroxylaminu hydrochloridu a po opětovném míchání byl napipetován roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny nebo voda. Nakonec se změřila absorbance při vlnové délce 484 nm.

- Prvním krokem bylo připravení základních a pracovních roztoků.
 - roztok testované látky příslušné koncentrace
 - 250 μ M roztok měďnatých iontů v DMSO
 - 1mM a 10mM roztok hydroxylaminu hydrochloridu (HA)
 - 5mM roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS)
- Do všech jamek testovací destičky jsme napipetovali 100 μ l příslušného pufru.
- Dále jsme do testovacích jamek přidali 50 μ l roztoku testované látky a do jamek kontrolních 50 μ l rozpouštědla, kterým bylo v našem případě DMSO.
- V dalším kroku jsme do všech jamek přidali 50 μ l roztoku měďnatých iontů v DMSO a nechali jsme testovací destičku promíchat na třepačce 2 minuty.
- Po promíchání jsme do všech jamek napipetovali 50 μ l roztoku HA. V přítomnosti pufru pH 6.8 a 7.5 jsme přidali 1mM roztok a v případě pH 4.5 a 5.5 jsme použili 10mM roztok.
- Opět jsme testovací destičku nechali promíchat, tentokrát po dobu 1 minuty.
- Následně jsme přidali 50 μ l 5mM roztoku BCS do horní poloviny jamek a do dolní poloviny jamek 50 μ l vody.
- Proměřili jsme absorbanci při vlnové délce 484 nm ihned po přidání BCS a poté ještě jednou po 5 minutách.

- Naměřené hodnoty jsme zaznamenali do připravené tabulky a na propočít stanovovaných hodnot jsme použili statistickou analýzu.
- Nakonec jsme sestavili graf křivky.



Obrázek 11: Schématické zobrazení mikrotitrační destičky při stanovení chelatace měďnatých iontů

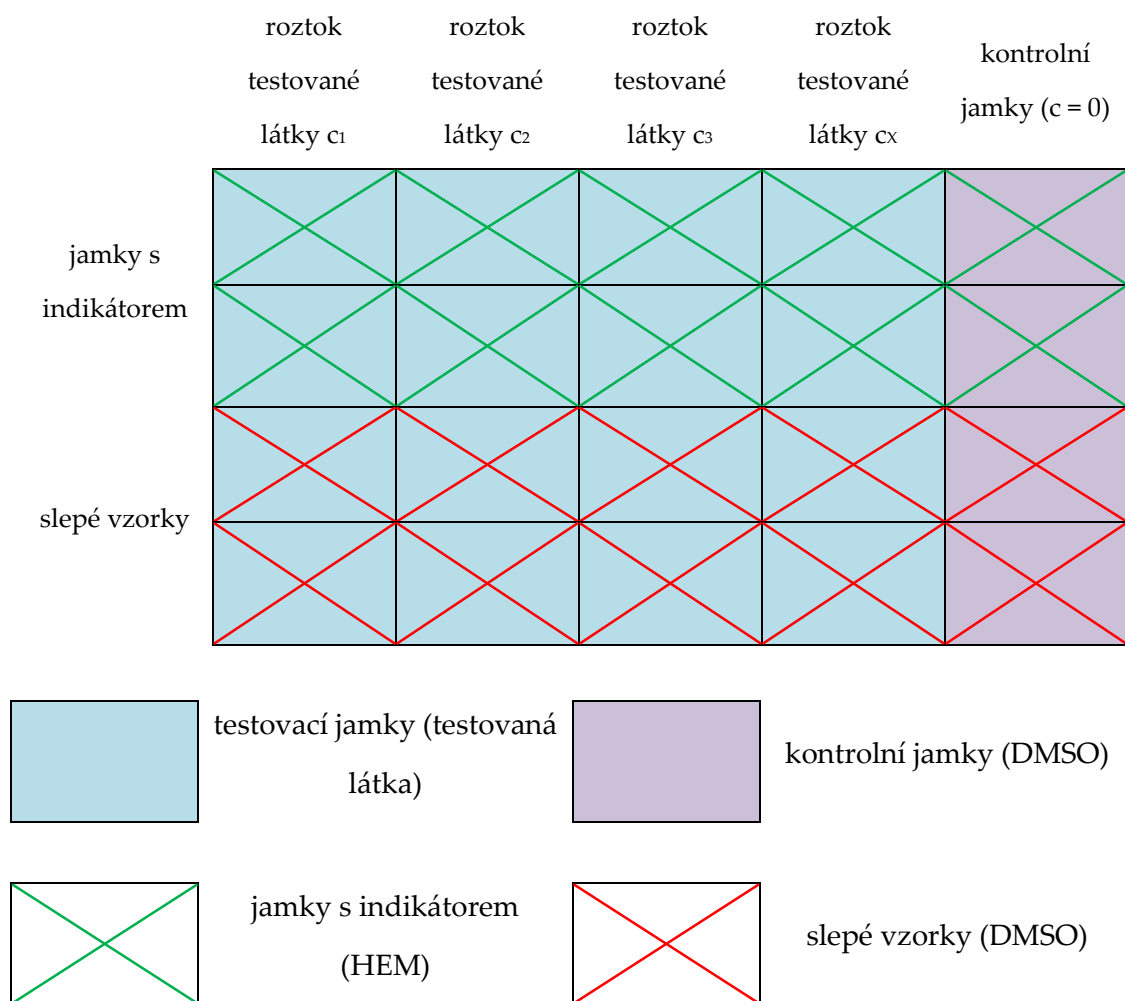
Konečný obsah jamek v testovací destičce.

- 100 μ l příslušný pufr
- 50 μ l roztok testované látky/DMSO
- 50 μ l roztok Cu²⁺ iontů
- 50 μ l roztok HA
- 50 μ l roztok BCS/voda

4.9 Metodický postup stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem

Při chelataci iontů mědi hematoxylinem (HEM) se k příslušnému pufru přidal roztok měďnatých iontů. Dále se do testovacích jamek napipetoval roztok testované látky v příslušné koncentraci a do jamek kontrolních se použilo rozpouštědlo. Po promíchání se do jamek přidal hemytoxylin či DMSO a změřila se absorbance.

- Prvním krokem byla příprava základních a pracovních roztoků.
 - 250 μ M roztok měďnatých iontů ve vodě
 - roztok testované látky příslušné koncentrace
 - 250 μ M roztok hematoxylinu v DMSO – Naředěn až v čase potřeby, protože je stabilní pouze 90 minut. Po uplynutí této doby musí být roztok naředěn znovu.
- Poté jsme do všech jamek testovací destičky napipetovali 150 μ l příslušného pufru, v tomto měření se jednalo o pufrы pH 5.5, 6.8 a 7.5.
- Následně jsme k pufru do všech jamek přidali 50 μ l 250 μ M roztoku měďnatých iontů ve vodě.
- Do testovacích jamek jsme napipetovali 50 μ l roztoku testované látky příslušné koncentrace a do jamek kontrolních použili 50 μ l rozpouštědla, kterým bylo DMSO.
- Nechali jsme 2 minuty míchat testovací destičku na třepačce.
- Po promíchání destičky jsme do spodních dvou řad přidali 50 μ l DMSO a do horní poloviny jamek testovací destičky (první dvě řady) jsme napipetovali 50 μ l 250 μ M roztoku hematoxylinu.
- V zápětí jsme nechali destičku 3 minuty míchat na třepačce.
- Absorbanci jsme měřili ihned po promíchání a po 7 minutách od podání hematoxylinu. Vlnová délka pro měření absorbance byla 610 nm pro pH 7.5, 590 nm pro pH 6.8 a 595 nm pro pH 5.5.
- Získané hodnoty jsme zaznamenali do předem připravené tabulky.
- Na propočet stanovovaných hodnot byla použita statistická analýza a poté jsme sestavili graf křivky.



Obrázek 12: Schématické zobrazení mikrotitrační destičky při stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem

Konečný obsah jamek v testovací destičce.

- 150 µl pufr
- 50 µl roztok Cu²⁺ iontů
- 50 µl roztok testované látky/DMSO
- 50 µl roztok HEM/DMSO

4.10 Statistická analýza

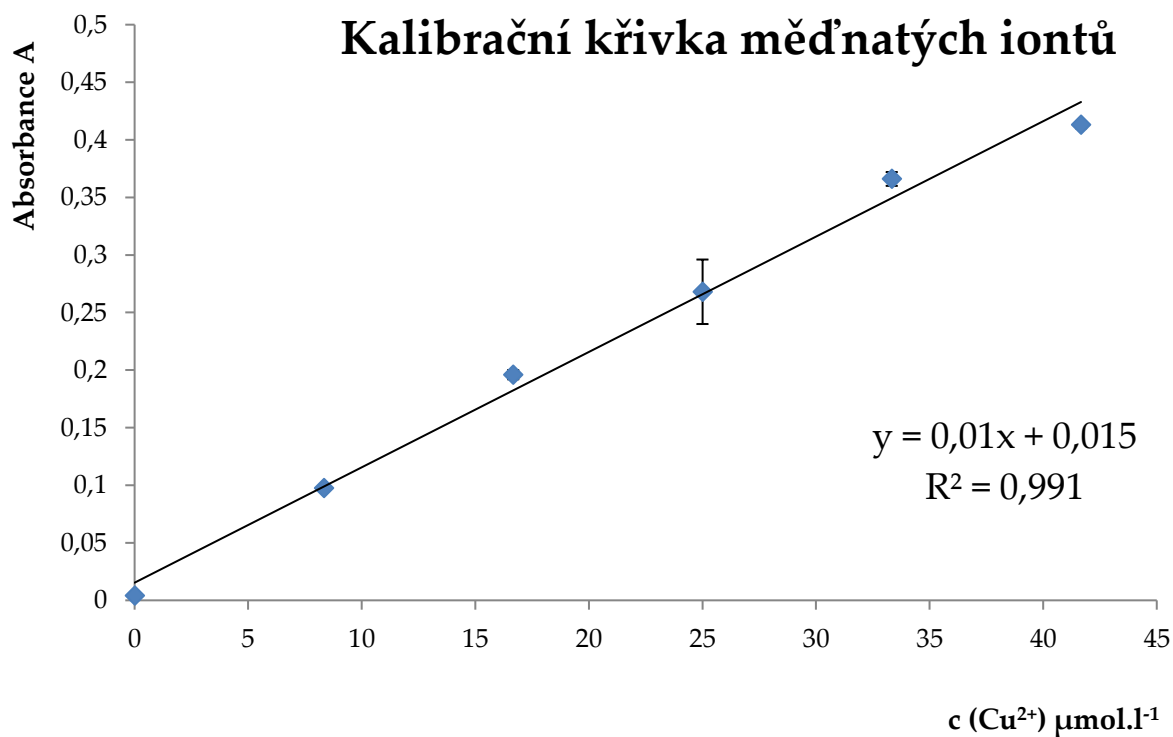
Pro statistickou analýzu byl použit program MS Excel a GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, USA). Naměřené výsledky jsme zpracovali jako průměr ± směrodatná odchylka, která byla vypočítána podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$.

Rozdíly mezi testovanými látkami byly zjištěné na základě porovnání 95% konfidenčních intervalů.

5 Výsledky

5.1 Kalibrační křivka

Pro sestavení grafu kalibrační křivky (Obr. 14) jsme použili naměřené hodnoty absorbance (A), dále koncentrace měďnatých iontů 50, 100, 150, 200 a 250 μM . Výsledný graf závislosti absorbance na koncentraci Cu^{2+} iontů je lineární.



Obrázek 13: Kalibrační křivka měďnatých iontů

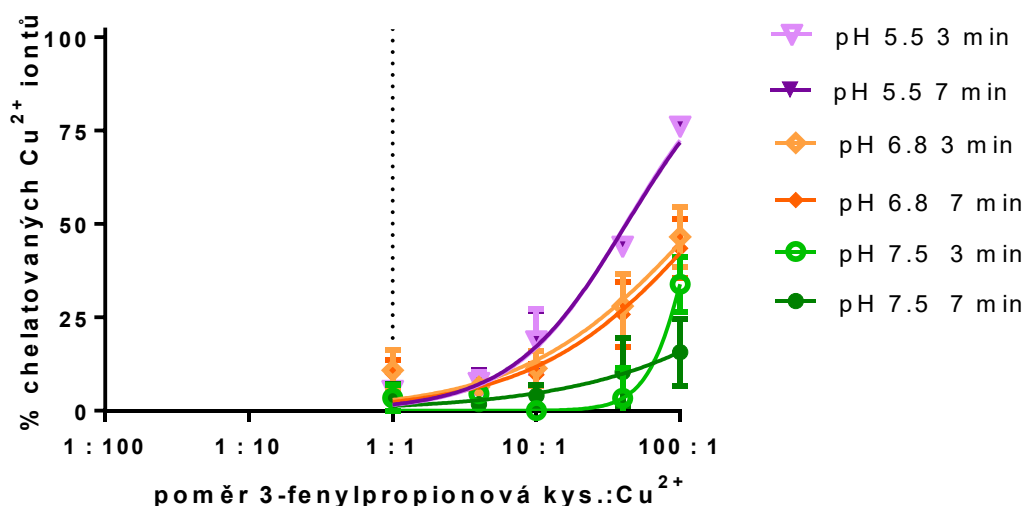
5.2 Chelatační aktivita fenylpropionových kyselin – hematoxylin

Nejprve byla u šesti stanovovaných fenylpropionových kyselin provedena metoda s hematoxylinem. Tato metoda slouží pouze k počátečnímu ověření měď-chelatační aktivity. Oproti bathocuproinu se při testech s hematoxylinem používají nižší koncentrace látek, hematoxylin tvoří s mědí méně stabilní komplexy a jeho metoda se projevuje jako méně kompetitivní.²²

V následujících grafech, zobrazujících měď-chelatační aktivitu stanovovanou metodou s hematoxylinem, je vždy na ose Y v procentech vyjádřena schopnost dané kyseliny chelatovat Cu^{2+} ionty a na ose X vyjádřen poměr koncentrací dané kyseliny a Cu^{2+} iontů. U metody s hematoxylinem jsme testovali fenylpropionové kyseliny při pH 5.5, 6.8 a 7.5, které jsou v grafech zobrazeny odlišnými barvami, vždy v čase 3 a 7 minut (Obr. 14, 15, 16, 17, 18 a 19).

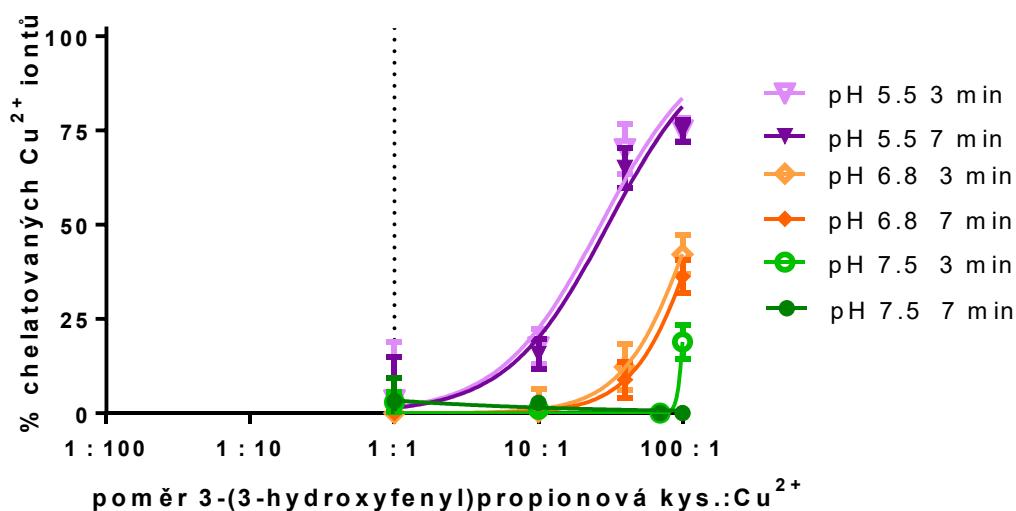
Pro měření byly využity koncentrace testovaných kyselin 25, 2.5, 0.25, 0.025 a 0 mM. Pokud bylo potřeba, došlo k naředění dalších koncentrací v rámci uvedeného rozmezí.

5.2.1 3-fenylpropionová kyselina



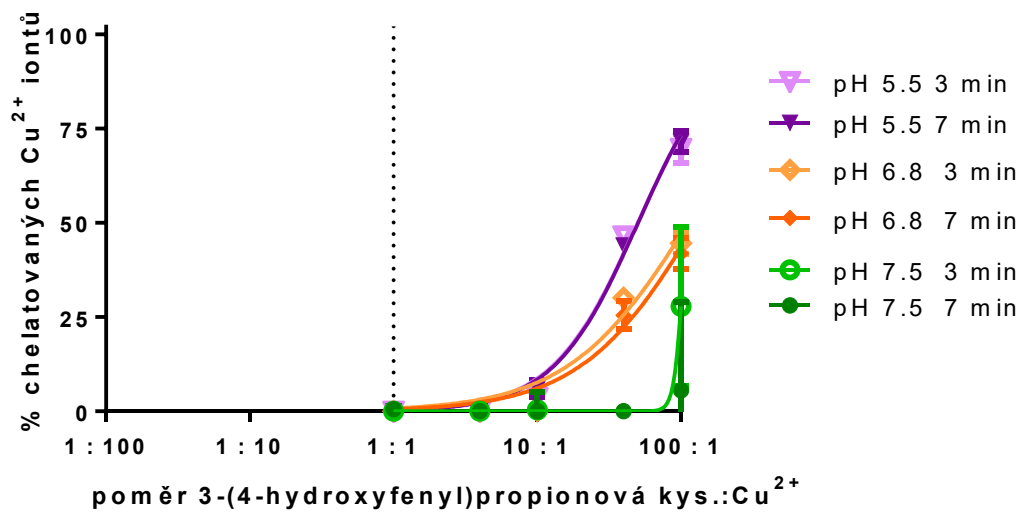
Obrázek 14: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-fenylpropionové kyseliny - hematoxylin

5.2.2 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina



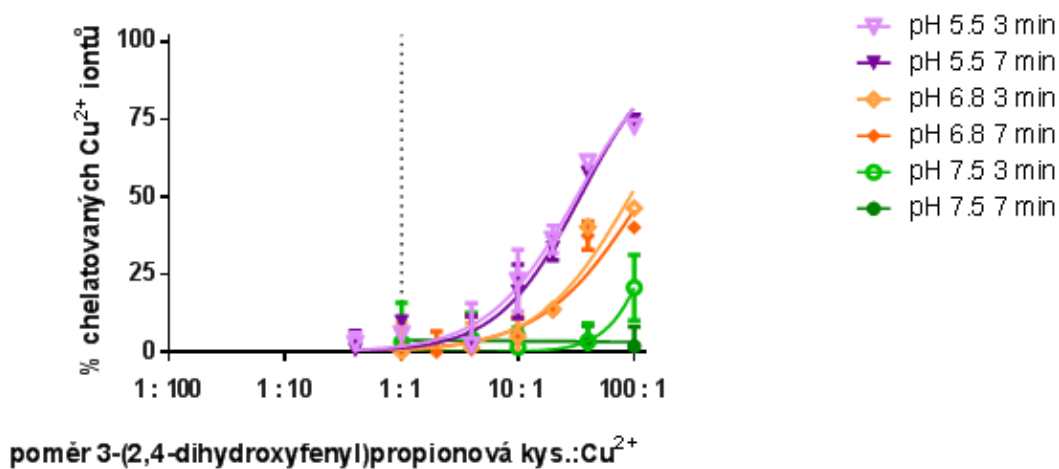
Obrázek 15: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny - hematoxylin

5.2.3 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina



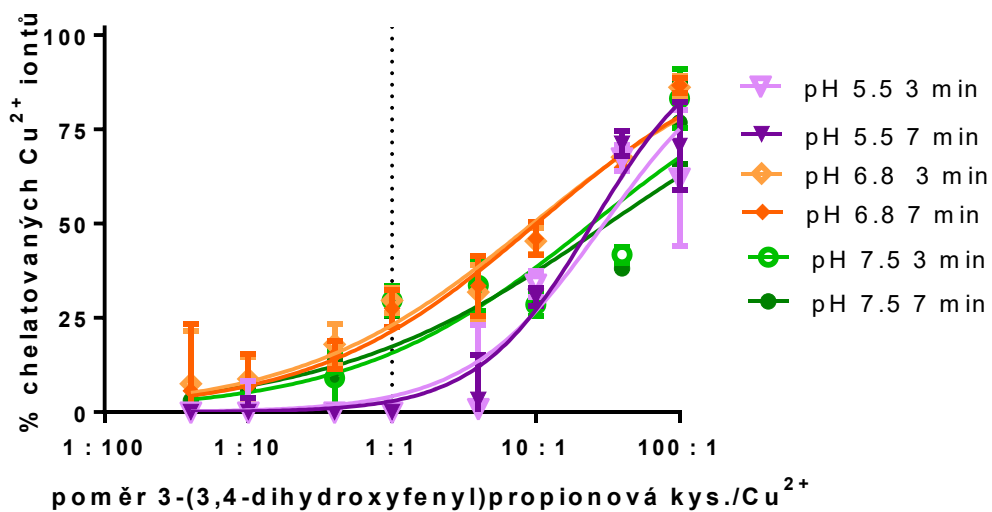
Obrázek 16: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(4-hydroxyfenyl)propionové kyseliny - hematoxylin

5.2.4 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina



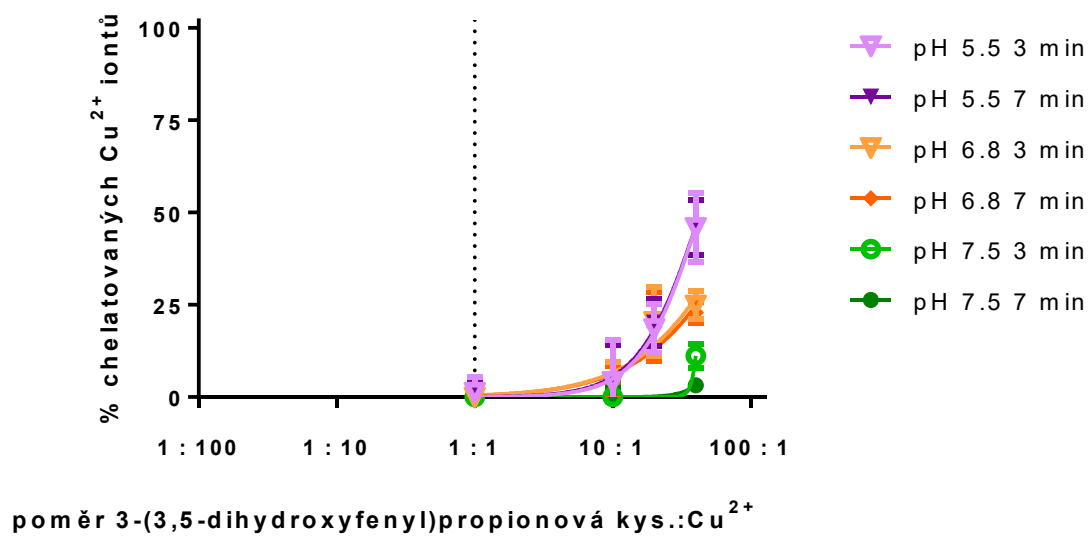
Obrázek 17: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny - hematoxylin

5.2.5 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina



Obrázek 18: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny - hematoxylin

5.2.6 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

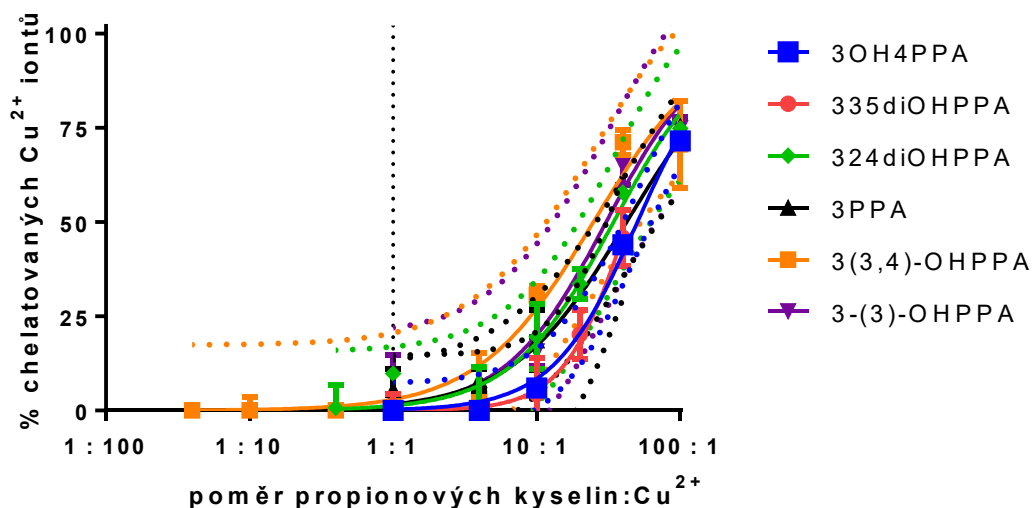


Obrázek 19: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny - hematoxylin

5.3 Konfidenční intervaly

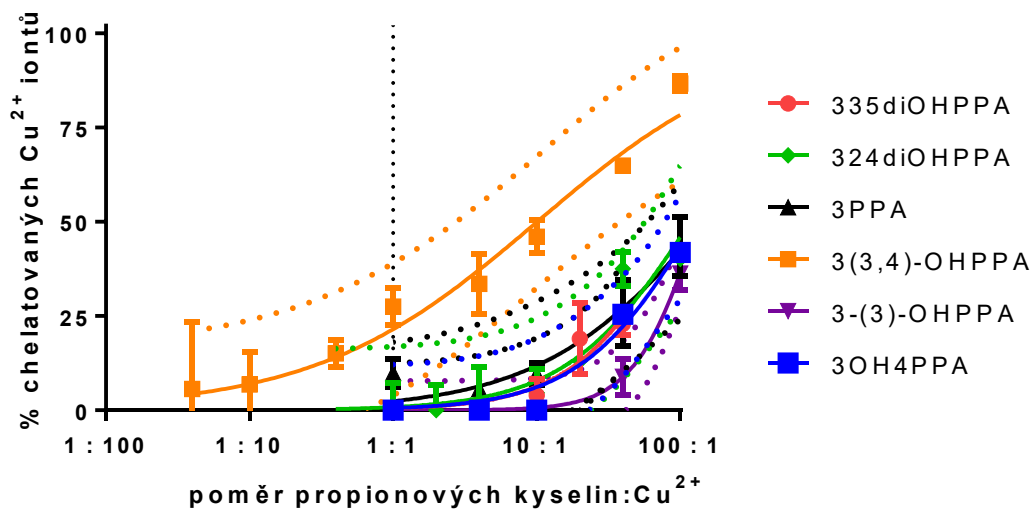
U metody s hematoxylinem jsem pro porovnání chelatační aktivity testovaných fenylpropionových kyselin při jednotlivých pH využila 95% konfidenční intervaly.

5.3.1 Konfidenční intervaly pH 5.5



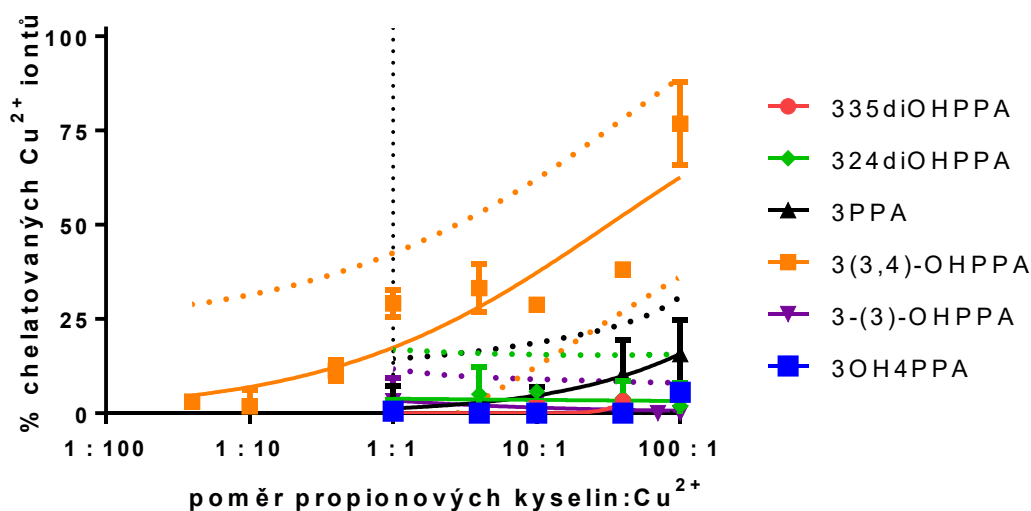
Obrázek 20: Konfidenční intervaly pH 5.5

5.3.2 Konfidenční intervaly pH 6.8



Obrázek 21: Konfidenční intervaly pH 6.8

5.3.3 Konfidenční intervaly pH 7.5



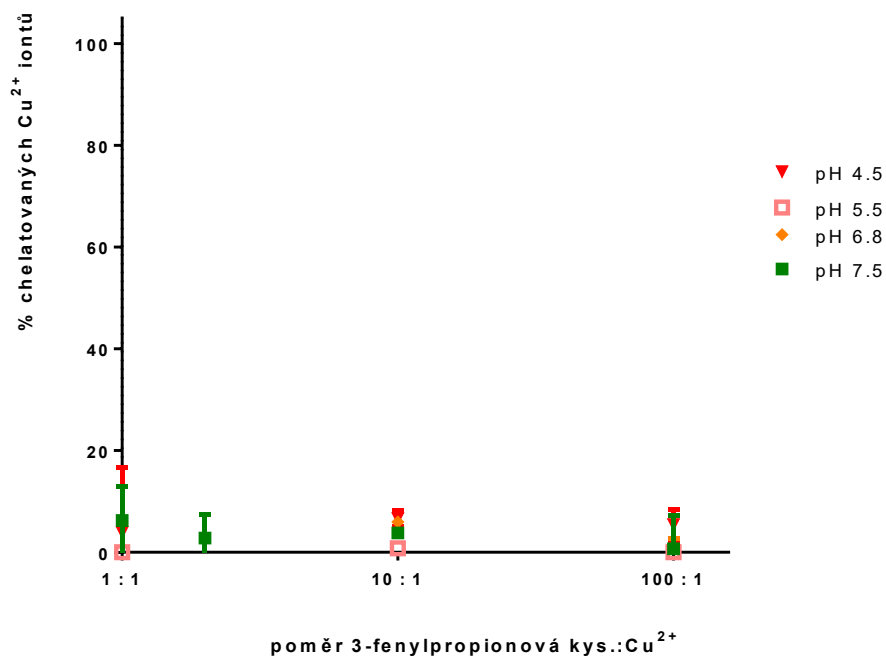
Obrázek 22: Konfidenční intervaly pH 7.5

5.4 Chelatační aktivita fenypropionových kyselin – bathocuproin

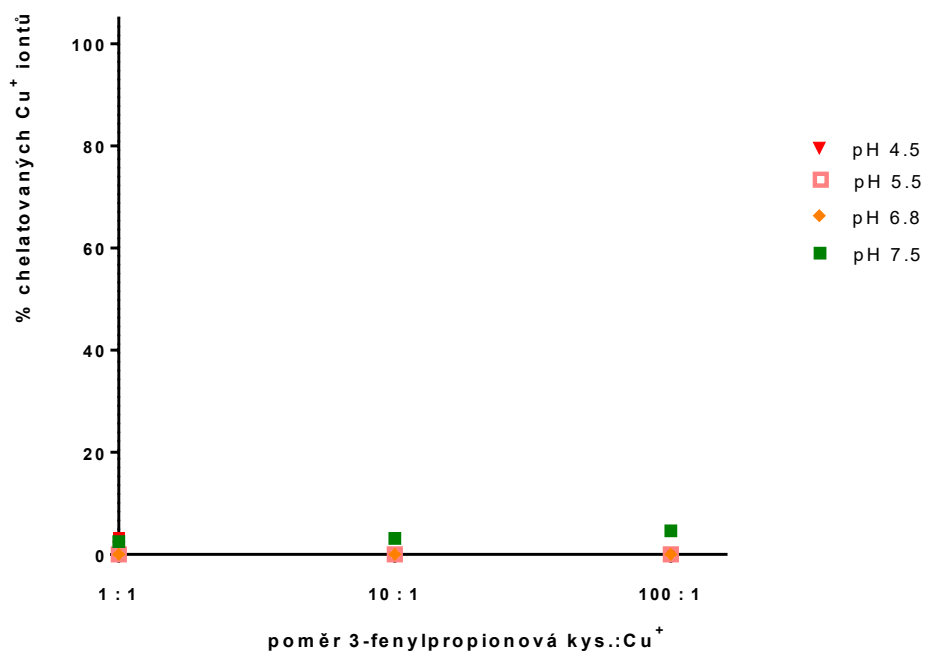
V experimentální části byla provedena i metoda s bathocuproinem, který chelatuje jen Cu^+ a vytváří s mědí stabilnější komplexy v širokém rozmezí pH.²² V případě stanovení chelatace Cu^{2+} iontů je součástí postupu tedy i redukce měďnatých iontů na mědné za pomoci hydroxylaminu (HA), u stanovení chelatace Cu^+ iontů se také HA podává, aby byly ionty mědi udrženy v redukovaném stavu. Postup je tedy lehce odlišný. U stanovení chelatace Cu^+ iontů byl hydroxylamin přidán před přidáním samotných Cu^+ iontů. Naopak u stanovení chelatace Cu^{2+} iontů byl hydroxylamin přidán až po přidavku mědi z důvodu redukce nezreagovaných Cu^{2+} iontů.²³

V grafech této metody je opět na ose Y v procentech vyjádřena schopnost kyseliny chelatovat Cu^{2+} či Cu^+ ionty a na ose X poměr koncentrací konkrétní kyseliny a Cu^{2+} či Cu^+ iontů. Různými barvami jsou opět odlišeny i jednotlivé pH (4.5, 5.5, 6.8 a 7.5). Žádná z testovaných látek nebyla schopna významně chelatovat ionty mědi ani při měření v čase 0 (výsledky nezobrazeny) ani v čase 5 minut (Obr. 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 a 31).

5.4.1 3-fenylpropionová kyselina

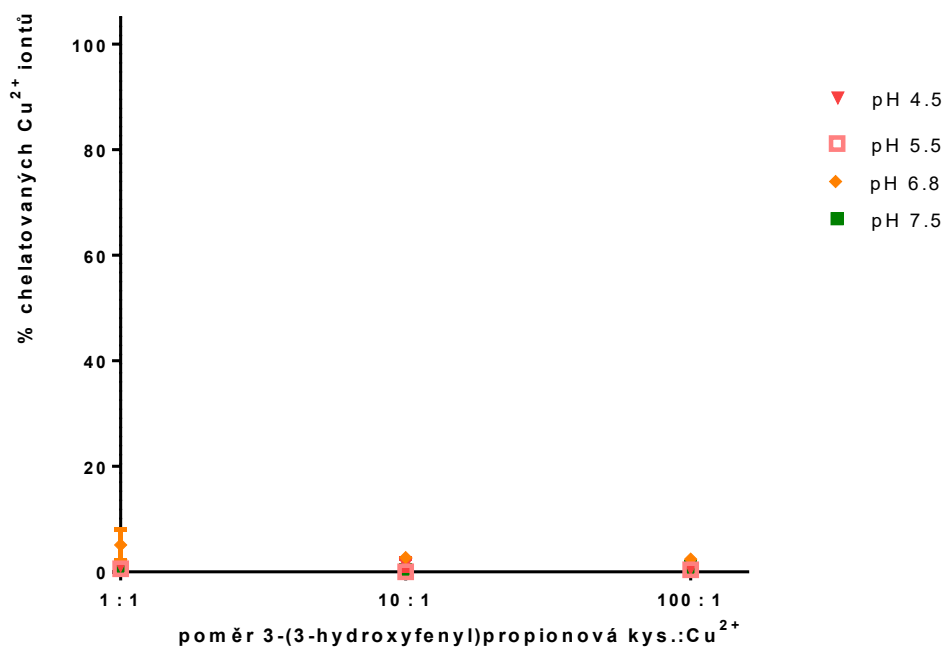


Obrázek 23: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-fenylpropionové kyseliny na Cu²⁺ - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

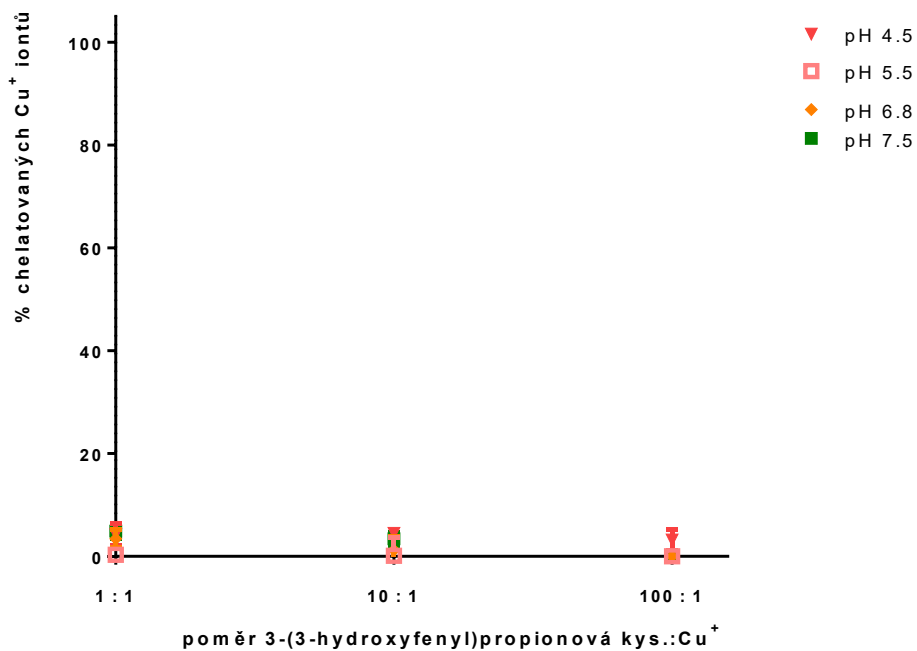


Obrázek 24: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-fenylpropionové kyseliny na Cu⁺ - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

5.4.2 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina

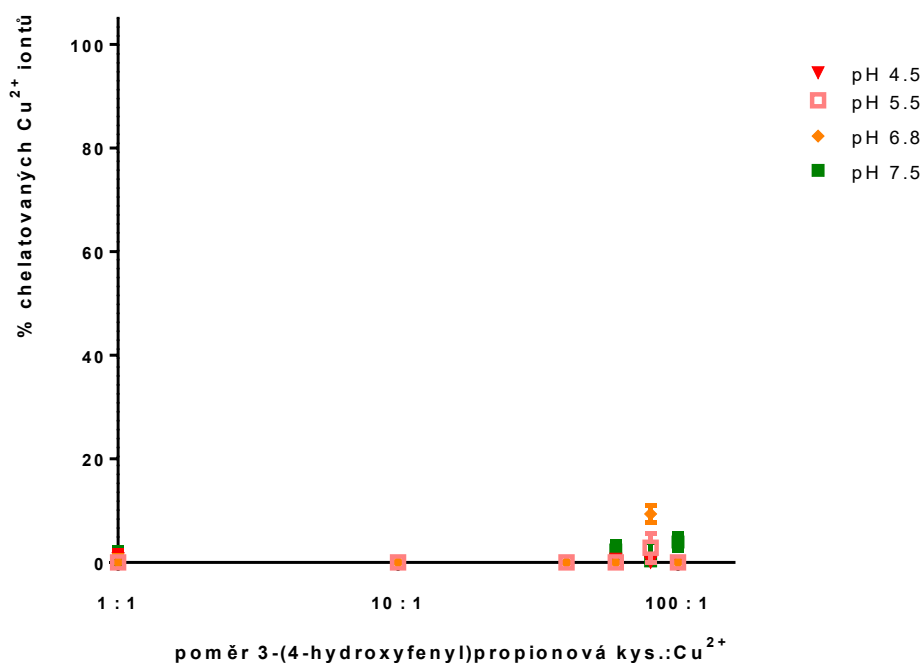


Obrázek 25: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu^{2+} - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

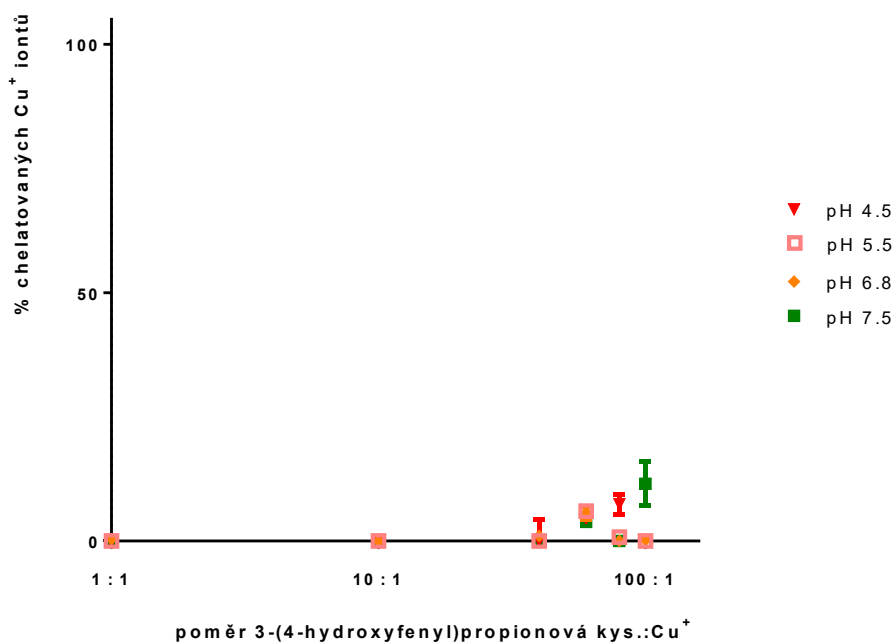


Obrázek 26: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu^{+} - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

5.4.3 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina

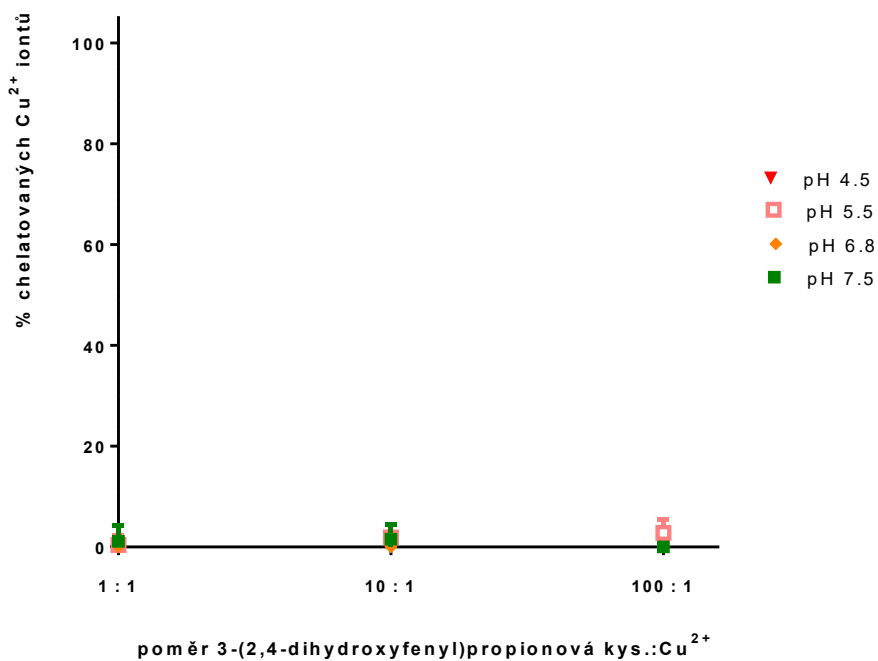


Obrázek 27: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(4-hydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu²⁺ - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

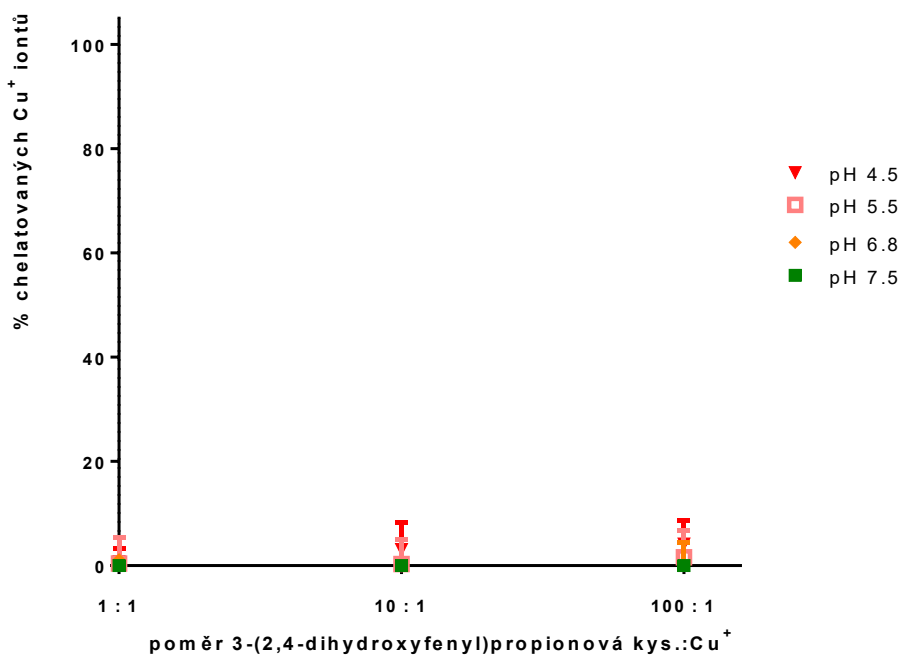


Obrázek 28: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(4-hydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu⁺ - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

5.4.4 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

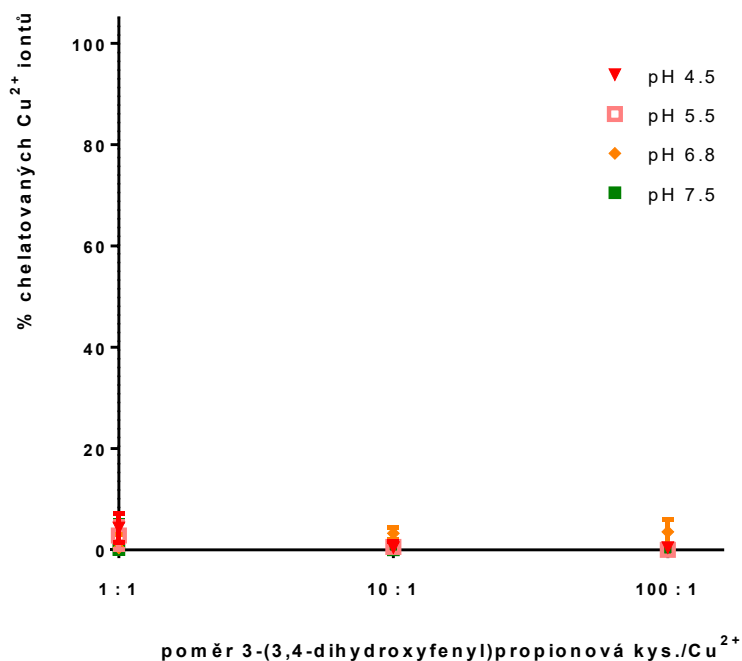


Obrázek 29: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu²⁺ - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

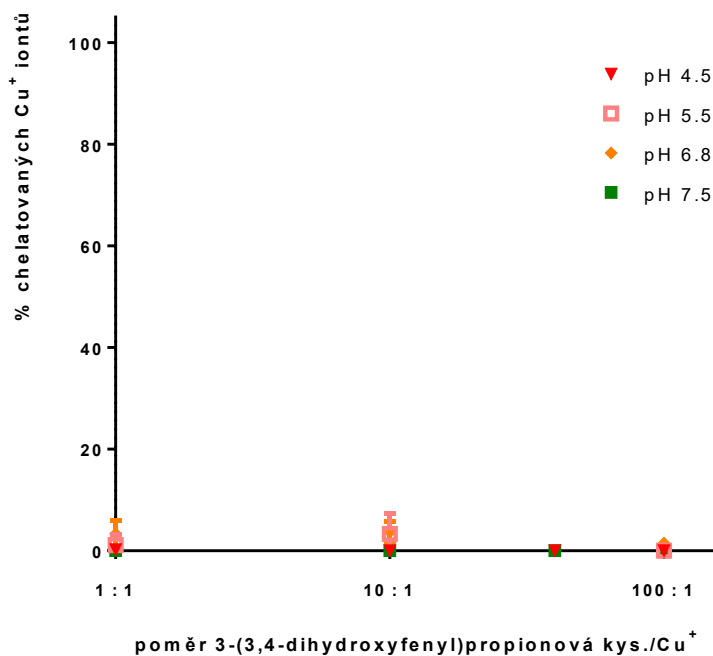


Obrázek 30: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu⁺ - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

5.4.5 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina

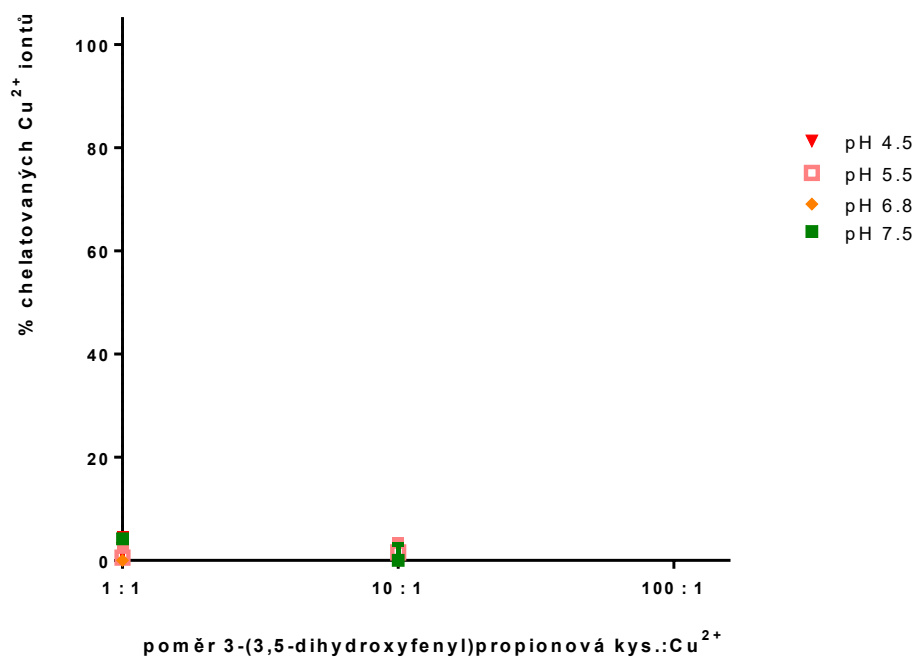


Obrázek 31: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu^{2+} - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

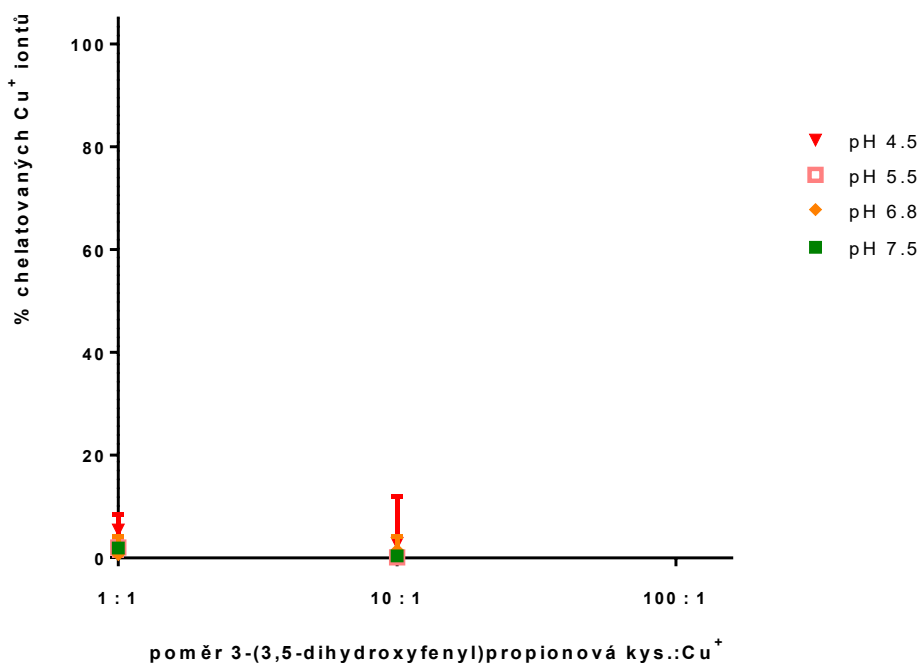


Obrázek 32: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu^{+} - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

5.4.6 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina



Obrázek 33: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu^{2+} - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.



Obrázek 34: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na Cu^{+} - bathocuproin. Zobrazeny jsou jen výsledky po 5 minutách.

6 Diskuze

Fenylpropionové kyseliny spolu s celou řadou jiných látek patří do skupiny fenolových sloučenin, které mohou vykazovat antioxidační a protizánětlivé účinky a také na základě svých vlastností mohou předcházet některým kardiovaskulárním onemocněním.²⁸

Některé látky ze skupiny fenolových sloučenin (např. flavonoidy) také mohou vykazovat chelatační účinky. Schopnost chelatovat měď je v dnešní době používána zejména jako léčba při přetížení organismu toxickým kovem (například u Wilsonovy choroby).²¹

Téměř všechny flavonoidy mohou vykazovat měď-chelatační aktivitu. Konkrétně flavonoidy, které obsahují hydroxylovou skupinu v poloze 3 (popřípadě v poloze 5) v kombinaci s karbonylovou skupinou v poloze 4 a dvojnou vazbou v poloze 2-3 (kempferol, 3-hydroxyflavon), projevují velmi silnou měď-chelatační aktivitu a to zejména při nižších pH, při kterých vykazují dokonce silnější měď-chelatační aktivitu než klinicky používaný Cu-chelátor trientin.²³ Další specifickou skupinou flavonoidů jsou isoflavonoidy. Některé isoflavonoidy (genistein, biochanin A, prunetin) také vykazují měď-chelatační účinky, což bylo prokázáno pomocí již dříve naměřených výsledků na naší fakultě.⁵⁰

Cílem této diplomové práce bylo zjistit měď-chelatační schopnosti šesti fenylpropionových kyselin, konkrétně 3-fenylpropionové, 3-(3-hydroxyfenyl)propionové, 3-(4-hydroxyfenyl)propionové, 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové, 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové a 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny. Měď-chelatační schopnosti byly zjišťovány při různých pH pomocí dvou spektrofotometrických metod, kdy v první metodě byl použit jako indikátor hematoxylin (HEM) a v druhé disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny (bathocuproin, BCS).

Měď-chelatační schopnosti těchto kyselin byly vyhodnoceny na základě vytvoření komplexu mezi $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ ionty a hematoxylinem či BCS.

Nejprve jsem u všech šesti stanovovaných kyselin měřila měď-chelatační účinky pomocí metody s hematoxylinem. Tato metoda se používá zejména

pro prvotní zjištění jejich chelatačních schopností. Hematoxylin vytváří s ionty mědi komplexy, které jsou v porovnání s komplexy s BCS méně stabilní, a celkově metoda s hematoxylinem vystupuje jako méně kompetitivní. Při stanovení chelatace Cu^{2+} iontů s hematoxylinem se fenylpropionové kyseliny měřily při pH 5.5, 6.8 a 7.5, neboť tato metoda není vhodná pro použití ve velmi kyselém prostředí (pH 4.5).²²

Naměřené výsledky při stanovení s hematoxylinem ukázaly, že téměř všechny testované fenylpropionové kyseliny chelatovaly Cu^{2+} ionty až při vyšších koncentracích, což je zobrazeno na Obr. 14, 15, 16, 17, 18 a 19 (str. 44-47). Na základě vyhodnocení konfidenčních intervalů lze vidět, že kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová vykazovala při pH 5.5 stejnou chelatační aktivitu jako ostatní testované kyseliny (Obr. 20, str. 48). Při pH 6.8 a 7.5 vykazovala výrazně vyšší chelatační potenciál (viz Obr. 21 a 22, str. 48-49).

Kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová jako jediná z testovaných látek obsahovala ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny s katecholovým uspořádáním a při našem testování s hematoxylinem byla tato kyselina nejsilnější chelatační látkou. Také při stanovení chelatačních a redukčních vlastností iontů železa byla nejsilnějším chelatačním i redukčním činidlem.⁵¹

3-fenylpropionová kyselina při vyšších pH vykazovala větší chelatační aktivitu měďnatých iontů (u metody s hematoxylinem i BCS) než ostatní propionové kyseliny (vyjma 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny). Je možné, že se zde může odrážet vliv redukce měďnatých iontů, zejména to lze pozorovat u pH 6.8 při hematoxylinové metodě, kde je její chelatace vyšší než u všech kyselin (s výjimkou kyseliny 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové). Při pH 7.5 je to obdobné, avšak chelatační aktivita všech testovaných látek je nižší. Je tu pozorovatelný bezvýznamný vliv dihydroxyskupin a dokonce u pH 5.5 žádný vliv hydroxyskupin.

Následně byla pro ověření chelatace u všech šesti fenylpropionových kyselin použita metoda s bathocuproinem jak s Cu^{2+} , tak i s Cu^{+} ionty. Na rozdíl od hematoxylinu bathocuproin s mědí vytváří stabilnější komplexy v širším rozmezí pH (4.5, 5.5, 6.8 i 7.5). Jedná se totiž o specifický indikátor.²²

Stanovení měď-chelatačních schopností pomocí bathocuproinu ukázalo, že žádná z testovaných fenylpropionových kyselin nebyla schopna chelatovat ionty

mědi z více jak 10 %. 3-fenylpropionová kyselina byla schopna velmi málo chelatovat Cu^{2+} ionty, což je zobrazeno na Obr. 23 (str. 50), avšak u Cu^+ iontů nevykazovala téměř žádnou schopnost chelatace (viz Obr. 24, str. 50). Kyselina 3-(4-hydroxyfenyl)propionová vykazovala své měď-chelatační schopnosti (jak u Cu^{2+} , tak Cu^+ iontů) až při vysokých koncentracích (viz Obr. 27 a 28, str. 52), což je ve výsledku zanedbatelné. Ostatní fenylpropionové kyseliny, zobrazeny na Obr. 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33 a 34 (str. 51-55), nevykazovaly téměř žádnou měď-chelatační aktivitu. I při testování železo-chelatačních schopností fenylpropionové kyseliny (s výjimkou 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové) neprokázaly významný železo-chelatační potenciál.⁵¹

Je možné konstatovat, že přestože se při stanovení s hematoxylinem projeví měď-chelatační schopnosti 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny, dalo by se očekávat, že tato kyselina projeví své chelatační účinky i při stanovení s bathocuproinem, kde však žádný chelatační potenciál prokázán nebyl. Pro ověření strukturní závislosti chelatačního potenciálu by však bylo zapotřebí větší skupiny testovaných látek a také u těchto látek změřit redukční aktivitu.

Závěrem diskuze je také důležité zmínit, že vlivem lidského metabolismu může docházet k přeměně složitějších fenolových sloučenin, které vykazují měď-chelatační aktivitu, na látky strukturně jednodušší, které již zmíněnou aktivitu mít nemusí, či naopak. Například z kvercetinu, jenž vykazuje vysoký měď-chelatační potenciál, vzniká vlivem lidské mikroflóry 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina, která významnější měď-chelatační aktivitu nevykazuje, což bylo prokázáno v této diplomové práci.^{43, 52}

7 Závěr

V této diplomové práci jsem testovala měď-chelatační schopnosti šesti fenylpropionových kyselin (3-fenylpropionové, 3-(3-hydroxyfenyl)propionové, 3-(4-hydroxyfenyl)propionové, 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové, 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové a 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny) pomocí dvou jednoduchých spektrofotometrických metod. V jednotlivých metodách jsem použila hematoxylin či bathocuproin jako indikátor a měření se provádělo v prostředí o různém pH (4.5, 5.5, 6.8 a 7.5).

Nejprve jsem stanovovala fenylpropionové kyseliny pomocí metody s hematoxylinem. Naměřené a do grafu zpracované výsledky prokázaly, že pouze 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina vykazuje měď-chelatační aktivitu i při nižších koncentracích. Ostatní fenylpropionové kyseliny nevykazovaly významné chelatační schopnosti.

Při druhé stanovované metodě s bathocuproinem žádná z testovaných fenylpropionových kyselin nevykazovala významnou měď-chelatační aktivitu.

Z výsledků je možné usoudit, že pro významnější měď-chelatační potenciál je potřeba, aby daná fenylpropionová kyselina měla ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny v sousedních polohách, jak bylo možné vidět u 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny.

8 Použitá literatura

1. Bertinato J., L'Abbé M. R.: Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15, 316-322 (2004).
2. Gaetke L. M., Chow C. K.: Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147-163 (2003).
3. Lutsenko S.: Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Current Opinion in Chemical Biology* 14, 211-217 (2010).
4. Festa R. A., Thiele D. J.: Copper: An essential metal in biology. *Current Biology* 21, R887-R883 (2011).
5. Waggoner D. J., Bartnikas T. B., Gitlin J. D.: The Role of Copper in Neurodegenerative Disease. *Neurobiology of Disease* 6, 221-230 (1999).
6. Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D.: Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57, 386-398 (2003).
7. Puig S., Thiele D. J.: Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 171-180 (2002).
8. Harada M., Sakisaka S., Terada K., Kimura R., Kawaguchi T., Koga H., Taniguchi E., Sasatomi K., Miura N., Suganuma T., Fujita H., Furuta K., Tanikawa K., Sugiyama T., Sata M.: Role of ATP7B in Biliary Copper Excretion in a Human Hepatoma Cell Line and Normal Rat Hepatocytes. *Gastroenterology* 118, 921-928 (2000).
9. Balamurugan K., Schaffner W.: Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on a tightrope. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, 737-746 (2006).
10. Brewer G. J.: Risks of Copper and Iron Toxicity during Aging in Humans. *Chemical Research in Toxicology* 23, 319-326 (2010).
11. Uriu-Adams J. Y., Keen C. L.: Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 268-298 (2005).
12. Scheiber I. F., Mercer J. F. B., Dringen R.: Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in Neurobiology* 116, 33-57 (2014).

13. Mercer J. F. B.: The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends in Molecular Medicine* 7, 64-69 (2001).
14. Bandmann O., Weiss K. H., Kaler S. G.: Wilson's disease and other neurological copper disorders. *The Lancet Neurology* 14, 103-113 (2015).
15. Miyajima H.: Genetic Disorders Affecting Proteins of Iron and Copper Metabolism: Clinical Implications. *Internal Medicine* 41, 762-769 (2002).
16. Bureš J., Horáček J., pořadatelé: *Základy vnitřního lékařství*, str. 360-363. Galén, Praha 2003.
17. Strausak D., Mercer J. F. B., Dieter H. H., Stremmel W., Multhaup G.: Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Research Bulletin* 55, 175-185 (2001).
18. Sigurdsson E. M., Brown D. R., Alim M. A., Scholtzova H., Carp R., Meeker H. C., Prelli F., Frangione B., Wisniewski T.: Copper Chelation Delays the Onset of Prion Disease. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 46199-46202 (2003).
19. Gupte A., Mumper R. J.: Copper chelation by D-penicillamine generates reactive oxygen species that are cytotoxic to human leukemia and breast cancer cells. *Free Radical Biology & Medicine* 43, 1271-1278 (2007).
20. Štípek S. a kolektiv: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*, str. 58-62. Grada Publishing, Praha 2000.
21. 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).
22. 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).
23. Říha M., Karlíčková J., Filipický 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).
24. Budimir A.: Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharmaceutica* 61, 1-14 (2011).

25. Noel J. P., Austin M. B., Bomati E. K.: Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 249-253 (2005).
26. Weisshaar B., Jenkins G. I.: Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 251-257 (1998).
27. Boz H.: p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *International Journal of Food Science and Technology* 50, 2323-2328 (2015).
28. Kim J. Y., Cho J., Lee K., Choi G., Kim S., Ham K., Moon J.: Change of Phenylpropanoic Acid and Flavonol Contents at Different Growth Stage of Glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Food Science and Biotechnology* 23, 685-691 (2014).
29. Liu Y., Li X., Cai K., Cai L., Lu N., Shi J.: Identification of benzoic acid and 3-phenylpropanoic acid in tobacco root exudates and their role in the growth of rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology* 93, 78-87 (2015).
30. Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants*, str. 240-255. Lavoisier Publishing Ing., Intercept Ltd., 2. vydání, Paris, Hampshire 1999.
31. Kang S., Choi O., Lee J., Hwang B. Y., Uhm T., Hong Y.: Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories* 11, 153-161 (2012).
32. Spilková J. a kolektiv: *Farmakognozie*, str. 95-120. Karolinum, Praha 2016.
33. Filipický T., Říha M., Macáková K., Anzenbacherová E., Karlíčková J., Mladěnka P.: Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging, metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 15, 415-431 (2015).
34. Mladěnka P., Říha M., Filipický T., Anzenbacher P., Hrdina R., Doseděl M., Najmanová I.: Cardiovascular Effects of Coumarins Besides their Antioxidant Activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 15, 830-849 (2015).
35. Ibdah M., Gang D. R.: Use of coupled ion mobility spectrometry-time of flight mass spectrometry to analyze saturated and unsaturated phenylpropanoic acids and chalcones. *Chemistry Central Journal* 8, 38-46 (2014).
36. Zhang S., Han L., Zhang H., Xin H.: *Chaenomeles speciosa*: A review of chemistry and pharmacology. *Biomedical Reports* 2, 12-18 (2014).

37. Sipkina N. Yu., Skorik Yu. A.: Detection and Determination of Some Phenolic and Cinnamic Acids in Plant Extracts. *Journal of Analytical Chemistry* 70, 1406-1411 (2015).
38. Jahodář L.: *FARMAKOBOTANIKA - semenné rostliny*, str. 84, 118, 154, 210. Karolinum, 3. vydání, Praha 2011.
39. Zhang L., Wang Y., Li D., Ho C., Li J., Wan X.: The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. *Food & Function* 7, 1273-1281 (2016).
40. Rechner A. R., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G. P., Moore K. P., Rice-Evans C. A.: The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology & Medicine* 33, 220-235 (2002).
41. Fu W., Oriel P.: Degradation of 3-phenylpropionic acid by *Haloferax* sp. D1227. *Extremophiles* 3, 45-53 (1999).
42. Narayana K. J., Prabhakar P., Vijayalakshmi M., Venkateswarlu Y., Krishna P. S.: Biological activity of phenylpropionic acid isolated from a terrestrial Streptomycetes. *Polish Journal of Microbiology* 56, 191-197 (2007).
43. Najmanová I., Pourová J., Vopršálová M., Pilařová V., Semecký V., Nováková L., Mladěnka P.: Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Molecular Nutrition & Food Research* 60, 981-991 (2016).
44. Zhao N., Yang G., Zhang Y., Chen L., Chen Y.: A new 9,10-dihydrophenanthrene from *Dendrobium moniliforme*. *Natural Product Research* 30, 174-179 (2016).
45. Yang J., Kondratyuk T. P., Jermihov K. C., Marler L. E., Qiu X., Choi Y., Cao H., Yu R., Sturdy M., Huang R., Liu Y., Wang L., Mesecar A. D., van Breemen R. B., Pezzuto J. M., Fong H. H. S., Chen Y., Zhang H.: Bioactive Compounds from the Fern *Lepisorus contortus*. *Journal of Natural Products* 74, 129-136 (2011).
46. Lee M., Park Y. B., Moon S., Bok S. H., Kim D., Ha T., Jeong T., Jeong K., Choi M.: Hypocholesterolemic and antioxidant properties of 3-(4-hydroxyl)propanoic acid derivatives in high-cholesterol fed rats. *Chemico-Biological Interactions* 170, 9-19 (2007).

47. Khatib S., Nerya O., Musa R., Tamir S., Peter T., Vaya J.: Enhanced Substituted Resorcinol Hydrophobicity Augments Tyrosinase Inhibition Potency. *Journal of Medicinal Chemistry* 50, 2676-2681 (2007).
48. Cho J., Kim J. Y., Lee Y. G., Lee H. J., Shim H. J., Lee J. H., Kim S., Ham K., Moon J.: Four New Dicafeoylquinic Acid Derivatives from Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and Their Antioxidative Activity. *Molecules* 21, 1097-1109 (2016).
49. Marklund M., Landberg R., Andersson R., Aman P., Kamal-Eldin A.: Alkylresorcinol Metabolism in Swedish Adults Is Affected by Factors Other Than Intake of Whole-Grain Wheat and Rye. *The Journal of Nutrition* 142, 1479-1486 (2012).
50. Horňasová V.: *Diplomová práce*. Měď-chelatační vlastnosti isoflavonoidů. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2015.
51. Mísař J.: *Rigorózní práce*. Interakce fenypropionových kyselin se železem. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2016.
52. Jeřábková M.: *Diplomová práce*. Chelatace mědi s flavonoly. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2014.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Kamila Zemanová

Školitel: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce fenylpropionových kyselin s mědí

Měď je základní stopový prvek, který je nezbytný pro náš organismus. Má významný vliv na správnou funkci důležitých orgánů a jako prostetická skupina hraje významnou roli při přenosu elektronů u hlavních enzymatických drah. Na druhou stranu, nadbytek či nedostatek mědi v lidském organismu může způsobit řadu onemocnění.

Fenylpropionové kyseliny jsou skupina látek, které mohou mít antioxidační, protizánětlivé i protinádorové účinky a podílejí se na vylučování volných radikálů a reaktivních forem kyslíku.

V této diplomové práci jsem testovala měď-chelatační aktivitu šesti fenylpropionových kyselin při různých pH pomocí spektrofotometrický metod za použití hematoxylinu a disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny jako indikátorů.

Nejvyšší chelatační potenciál vykazala 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina, avšak pouze při použití hematoxylinu.

KLÍČOVÁ SLOVA: Měď, Fenylpropionové kyseliny, Antioxidanty, Chelatační aktivita, Hematoxylin, Bathocuproin

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Kamila Zemanová

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of Thesis: Interaction of phenylpropionic acids with copper

Copper is an essential trace element which is essential for our body. It has a significant effect on the correct functioning of important organs and it plays an important role in the transfer of electrons at the major enzymatic pathways as a prosthetic group. On the other hand, excess or deficiency of copper in the human body can cause many diseases.

Phenylpropionic acids are group of substances which can have antioxidant, anti-inflammatory and anticancer effects. They are involved in the scavenging of free radicals and reactive oxygen species.

In this diploma thesis, I tested copper chelating activity of six phenylpropionic acids at different pHs by spectrofotometric methods using a hematoxylin and a bathocuproinedisulfonic acid disodium salt as an indicator.

3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid showed the highest chelating potential but only using a hematoxylin.

KEYWORDS: Copper, Phenylpropionic acids, Antioxidants, Chelating activity, Hematoxylin, Bathocuproin