

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**ŽELEZO-CHELATAČNÍ VLASTNOSTI EXTRAKTŮ  
PLODŮ Z RŮZNÝCH VARIET BEZU ČERNÉHO**

**BARBORA GOROVÁ**

**Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2017**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za poskytnuté rady, připomínky, materiály a pomoc při sestavování této diplomové práce. Zároveň také děkuji PharmDr. Michalu Říhovi, Ph.D. za pomoc při sestavování experimentální části této práce a pracovníkům Katedry farmakologie a toxikologie za možnost vykonání diplomové práce na této katedře a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Děkuji také doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za zpracování extraktů a své rodině za veškerou podporu během studia.

Tato diplomová práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (projekt P303/12/G163).

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

BARBORA GOROVÁ

## Obsah

ABSTRAKT .....	7
ABSTRACT .....	8
1. ÚVOD .....	9
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	11
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
3.1 Železo .....	12
3.1.1 Význam železa v lidském organismu .....	12
3.1.2 Vstřebávání železa .....	13
3.1.3 Recirkulace železa obsaženého v erythrocytech .....	14
3.1.4 Zásoby železa .....	15
3.1.5 Regulace železa .....	15
3.2 Patologické stavy spojené s železem .....	16
3.2.1 Nemoci spojené s nedostatkem železa .....	16
3.2.2 Nemoci spojené s nadbytkem železa v organismu .....	17
3.2.3 Toxicita železa .....	19
3.3 Železo-chelatační terapie .....	21
3.3.1 Požadované vlastnosti chelátorů .....	22
3.3.2 Příklady chelátorů .....	24
3.3.3 Volba chelátoru .....	27
3.3.4 Nové terapeutické indikace železo-chelatační terapie .....	27
4. Anthokyany .....	28
4.1 Chemická struktura .....	29
4.2 Farmakokinetika .....	30
4.3 Biologické účinky anthokyanů .....	31
4.3.1 Antioxidační aktivita .....	31
4.3.2 Interakce s kovy .....	32
4.3.3 Poruchy očí .....	32
4.3.4 Metabolické poruchy .....	32
4.3.5 Antimikrobní aktivita .....	33

4.3.6	Neurodegenerace.....	33
4.3.7	Protizánětlivé účinky .....	33
4.3.8	Antikarcinogenní aktivita .....	33
4.4	Bez černý .....	33
4.4.1	Obsahové látky.....	34
4.4.2	Biologické účinky.....	35
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	36
5.1	Materiál, chemikálie a přístroje .....	36
5.1.1	Materiál.....	36
5.1.2	Chemikálie.....	36
5.1.3	Testované extrakty.....	37
5.1.4	Používané přístroje .....	38
5.2	Metody.....	39
5.2.1	Příprava zásobních roztoků.....	39
5.2.2	Zkouška pro Fe <sup>2+</sup> ionty.....	39
5.2.3	Zkouška pro Fe <sup>3+</sup> ionty.....	39
5.2.4	Kalibrace Fe <sup>2+</sup> iontů .....	40
5.2.5	Absorpční spektra .....	40
5.2.6	Chelatace Fe <sup>2+</sup> iontů .....	41
5.2.7	Chelatace celkového železa při pH 4.5.....	42
5.2.8	Výpočet chelatační aktivity .....	43
5.2.9	Statistická analýza .....	43
6.	Výsledky.....	44
6.1	Kalibrační křivka železnatých iontů.....	44
6.2	Absorpční spektra testovaných extraktů .....	44
6.2.1	Absorpční spektra 'Aurea'.....	46
6.2.2	Absorpční spektra 'Dana' .....	48
6.2.3	Absorpční spektra 'Haschberg' .....	50
6.2.4	Absorpční spektra 'Heidegg 13' .....	52
6.2.5	Absorpční spektra 'Korsør' .....	54
6.2.6	Absorpční spektra 'Pregarten'.....	56
6.2.7	Absorpční spektra 'Riese aus Voßloch' .....	58
6.2.8	Absorpční spektra 'Samdal'.....	60

6.2.9	Absorpční spektra 'Samyl' .....	62
6.2.10	Absorpční spektra 'Weihenstephan' .....	64
6.3	Kvantitavní analýza železo-chelatační účinnosti extraktů bezu černého.....	66
7.	DISKUSE .....	78
8.	ZÁVĚR .....	81
9.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	82
10.	SEZNAM TABULEK .....	83
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	83
12.	POUŽITÁ LITERATURA.....	85

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Kandidát:** Barbora Gorová

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

**Název diplomové práce:** Železo-chelatační vlastnosti extraktů plodů z různých variet bezu černého

Anorganické železo je hlavním potravním zdrojem železa u lidí. V organismu se účastní mnoha biochemických reakcí a poruchy metabolismu železa mohou vést k různým chorobám spojenými s nedostatkem či nadbytkem železa v těle. Jednou z možností léčby nadbytku železa je podání chelátorů železa.

Bez černý, *Sambucus nigra* L. (Adoxaceae), je po staletí používán jako tradiční medicína. Plody bezu černého jsou bohatým zdrojem anthokyanů s cyanidinovým aglykonem jako jejich hlavní součástí. Různé variety bezu černého se mohou lišit svými chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Anthokyany mohou interagovat s kovy v gastrointestinálním traktu a tvořit cheláty, nicméně dat týkajících se těchto interakcí je velmi málo. Hlavním cílem této diplomové práce bylo analyzovat interakce železa s extrakty bezu černého, jako bohatého a levného zdroje anthokyanů s aglykonem cyanidinem.

Deset ethanolických extraktů různých variet bezu černého bylo testováno *in vitro* na interakci s železem v různých (pato)fyzilogicky významných pH podmínkách (4.5-7.5). Pro kvantitativní porovnání byla použita spektrofotometrická metoda založená na indikátoru ferrozinu.

Všechny extrakty byly schopny chelatovat železo, avšak byly zde výrazné rozdíly mezi jednotlivými extrakty, které mohou způsobit odlišný biologický účinek. Se vzrůstajícím pH se chelatační aktivita zvyšovala u všech extraktů. Extrakt 'Haschberg' byl nejvíce účinným chelátorem železa, a to jak železnatých, tak i železitých iontů.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** bez černý, extrakt, plod, anthokyanin, cyanidin, chelatace, železo

# ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacology and Toxicology**

**Candidate:** Barbora Gorová

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

**Title of thesis:** Iron-chelating properties of fruit extracts of various elderberries

Inorganic iron is the major food source of iron in humans. It plays role in many biochemical reactions. Thus, iron metabolism disorders can lead to different diseases associated with lack of iron or iron overload. One of the possible treatment modalities of the latter represents the administration of iron chelators.

Elderberry, *Sambucus nigra* L. (Adoxaceae), has been used in traditional medicine. The fruits of elderberry are a rich source of cyanidin-based anthocyanins as the main component. There are important differences, both in chemical and physical properties between several cultivars of elderberry. Anthocyanins might interact with metals in the gastrointestinal tract by formation of chelates. However, data on metal interactions with anthocyanins are sparse. The main aim of this study was to perform the analysis of interaction of iron with elderberry fruit extracts as a rich and cheap source of anthocyanins with cyanidin as the aglycon.

In this *in vitro* study ten elderberry fruit extracts were tested for iron chelating activities under different (patho)physiologically relevant pH conditions. Spectrophotometric method based on ferrozine as an indicator was used for the quantitative comparison.

All extracts were able to chelate iron, however, there were marked differences between extracts from different varieties which might be transformed in dissimilar biological effect. It was found that chelation activity of all tested extracts was increased with increasing pH. The extract of 'Haschberg' was the most potent iron chelator, both of ferrous and ferric ions.

**KEYWORDS:** elderberry, extract, fruit, anthocyanin, cyanidin, chelation, iron



# 1. ÚVOD

Výzkum zaměřený na problematiku volných radikálů naznačil, že potrava bohatá na antioxidanty může hrát důležitou roli v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a neurodegenerativních chorob. Proto přírodní antioxidanty a barviva přítomná v potravě přitahují pozornost díky své bezpečnosti a potenciálním výživným a terapeutickým efektem (Duymuş et al., 2014).

Bez černý, *Sambucus nigra* L. (Adoxaceae), je běžně divoce rostoucí keř vyskytující se v Evropě, částech Asie a Afriky. Obvykle kvete od května do července a jeho plody bezinky dozrávají během srpna a září. Oloupané bobule byly po staletí používány jako tradiční medicína a v některých *in vitro* testech vykazují pozitivní dopad na lidské zdraví. Historicky byly květy bezu černého používány k léčbě bolesti, otoků, zánětů, k navození diurézy, ke snížení pocení a jako expektorans. Potenciálně příznivý vliv na zdraví je spojen s obsahem flavonoidů, fenolických kyselin, různých organických kyselin, prvků (draslík, vápník, fosfor, hořčík) a vitamínů. Vzhledem k pozitivním vlastnostem na lidský organismus se bez černý hojně využívá v průmyslu k výrobě potravin (koláče, želé, zmrzliny, jogurty, marmelády) a k výrobě tekutin (sirupy, čaje, vína, džusy). Navzdory příznivým účinkům nejsou k dispozici spolehlivá klinická data, která by tyto příznivé účinky potvrdila. Neloupané plody a další části rostliny (listy, kůra, semena) obsahují lektiny a kyanogenní glykosid sambunigrin, který je hydrolyzován gastrointestinálním traktem na volný kyanid. Ten může navodit nauzeu, zvracení a další nežádoucí účinky zahrnující brnění a ztuhlost. Z tohoto důvodu jsme se v této diplomové práci zaměřili na extrakty loupaných plodů (Veberic et al., 2008; Ulbricht et al., 2014; Senica et al., 2016; Silva et al., 2017; Duymuş et al., 2014; Mladěnka et al., 2016).

V Evropě se vyskytuje mnoho variet bezu černého, z nichž nejčastěji vyskytující se je varieta 'Haschberg', ze které se sklízí bobule. Různé variety bezu černého se mohou lišit svými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, jako je vzhled, aroma či chuť. Pro interakci s biologickým systémem je však nejdůležitější jejich chemické složení. Určitou experimentální výhodou bezu černého oproti extraktům jiných bobulovitých plodů je vysoká koncentrace anthokyanů (anthokyaninů) s cyanidinovým aglykonem jako jeho hlavní součástí. Pro srovnání, množství cyanidin zahrnujících anthokyanů může být 800 mg ve 100 g bobulí bezu černého a v některých varietách ještě více. Ve stejném množství

bobulí je jen 25-100 mg kvercetinu, přibližně 20 mg proanthokyanů a 20 mg fenolických kyselin (Veberic et al., 2008; Ulbricht et al., 2014; Senica et al., 2016; Silva et al., 2017; Duymuş et al., 2014; Mladěnka et al., 2016).

Díky svým chemickým vlastnostem mohou anthokyaniny interagovat s kovy v gastrointestinálním traktu (GITu) a tvořit cheláty. Dat, ohledně interakcí kovů s anthokyaniny je velmi málo v porovnání s ostatními fenoly. Přitom anorganické železo je hlavním potravním zdrojem železa u lidí. V organismu se účastní mnoha biochemických reakcí a poruchy metabolismu železa mohou vést k různým chorobám spojenými s nedostatkem či nadbytkem železa v těle (Mladěnka et al., 2005).

## 2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit interakce železa s extrakty z plodů bezu černého jako bohatého a levného zdroje anthokyanů v příslušných (pato)fyzilogicky relevantních pH podmínkách<sup>1</sup>:

- a) Stanovením schopnosti testovaných extraktů ('Samyl', 'Samdal', 'Aurea', 'Dana', 'Haschberg', 'Pregarten', 'Heidegg 13', 'Korsør', 'Riese aus Voßloch', 'Weihestephan') bezu černého chelatovat železnaté ionty v různých pH podmínkách: 4.5; 5.5; 6.8; 7.5 a železité ionty v prostředí o pH 4.5
- b) Porovnáním chelatační účinnosti testovaných extraktů mezi sebou

---

<sup>1</sup> Různé pH podmínky mohou mít různý (pato)fyzilogický význam, např. acidóza je propojená se zánětlivými procesy zahrnujícími akutní infarkt myokardu a nádory. pH se také liší v různých biologických kompartmentech (žaludek, lysozomy). Nejkyselejší zvolené pH bylo 4.5, které je potvrzeno v lysozomech, což jsou orgány důležité pro transport železa. Další dva kyselé pH (5.5; 6.8) byly zvoleny k napodobení stavu ischémie, kde je známo, že železo se účastní poškození tkáně (*Mladěnka et al., 2011*).

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Železo

Železo je přechodný kov, jehož chemický symbol Fe vychází z latinského názvu *ferrum*. Železo je nezbytné pro naprostou většinu živých buněk (*Faa a Crisponi, 1999; Andrews, 2005*).

Vzhledem k tomu, že je železo přechodný prvek, resp. má poslední slupku obsazenou elektrony pouze neúplně, může se vyskytovat v různých oxidačních stavech (od -2 do +6). Přirozeně se vyskytuje ve formě železnatých ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nebo železitých ( $\text{Fe}^{3+}$ ) iontů.  $\text{Fe}^{2+}$  na vzduchu podléhá oxidaci na  $\text{Fe}^{3+}$ . Rozpustnost železa a jeho reaktivita je závislá na pH, kdy rychlá spontánní chemická oxidace železa probíhá při neutrálním pH, zatímco při nízkém pH je pomalá. Ionty železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ) jsou velmi málo rozpustné, což je příčinou nízké biodostupnosti železa v neutrálním pH oproti kyselému pH, ve kterém dochází k jeho redukci na vstřebatelné  $\text{Fe}^{2+}$  (*Ilbert a Bonnefoy, 2012*).

#### 3.1.1 Význam železa v lidském organismu

Železo je jedním z nejdůležitějších stopových prvků v lidském organismu. Obsah železa v lidském těle se liší podle pohlaví. Tělo dospělého člověka obsahuje 35-45 mg železa na kilogram váhy. Ženy před menopauzou mají menší zásoby železa v důsledku krevních ztrát vlivem menstruace (*Emerit et al., 2001*).

Asi 65 % železa je vázáno na hemoglobin, 10 % je součástí svalových vláken (jako myoglobin), cytochromů a součástí enzymů obsahujících železo. Přibližně 20-30 % železa je vázáno na železo zásobní proteiny – feritin a hemosiderin (*Fraga a Oteiza, 2002*), a asi 3-4 mg cirkulují v plasmě vázané na transferin (*Crisponi a Remelli, 2007*). Některé sloučeniny obsahují i železo vázané na atom síry, jako např. akonitáza, což je klíčový režim citrátového cyklu.

Nejdůležitější rolí železa je schopnost odevzdávat a přijímat elektrony, což je konverze mezi železnatými a železítými formami. Tato užitečná vlastnost železa se oxidovat a redukovat může být za určitých podmínek nebezpečná, jelikož železo je také známo tvorbou volných radikálů (*Andrews, 2000*). Jeho další důležitá role zahrnuje

transport kyslíku (ve formě hemu jako kofaktoru v hemoglobinu a myoglobinu) a enzymatický přenos elektronů v cytochromech, ribonukleotidreduktáze, kataláze a peroxidáze (Andrews, 2005). Je tedy důležité pro buněčné dýchání, proliferaci a diferenciaci a pro regulaci genové exprese. Uplatňuje se také v imunitním systému a je součástí NADPH-oxidázy potřebné k obraně proti mikrobům (Lüllmann et al., 2012).

Hlavním zdrojem železa v naší potravě jsou maso, játra, ledviny, vaječný žloutek, zelenina, ovoce a zejména luštěniny. V běžné stravě je zakomponováno přibližně 15-20 mg železa, z čehož tělo absorbuje asi 1-2 mg železa denně, což vyváží ztráty železa vzniklé odlupováním buněk střevní sliznice, menstruačním nebo jiným krvácením. (Hynie, 2001). Ztráty železa činí u mužů asi 1 mg/d a u žen až 2 mg/d. Zvýšené nároky na příjem železa mají děti, adolescenti, těhotné (druhý a třetí trimestr) a kojící ženy (Silbernagl a Lang, 2001; Camashella 2017; Sheftel et al., 2012).

Lidský organismus má velmi limitovanou schopnost vylučovat železo, tedy postrádá efektivní cestu k ochraně buněk a tkání před jeho přetížením. Proto je regulován především jeho příjem (Sedláčková a Racek, 2009). Nadměrné množství železa může toxicky poškodit buňky tvorbou kyslíkových radikálů, naopak jeho nedostatek může zastavit buněčný růst a vést až k buněčné smrti (Faa a Crisponi, 1999; Andrews, 2005).

### **3.1.2 Vstřebávání železa**

Metabolismus železa je regulován tak, aby ho bylo dostatek pro hemopoézu a zároveň tak, aby se nikde nevyskytovalo nevázané ve dvoumocné formě (železnaté ionty mají schopnost redukovat kyslík na superoxidový radikál, viz kapitola Toxicita železa). Jeho regulace probíhá jak na buněčné, tak na systémové úrovni.

Železo přijímané potravou se vyskytuje v různých formách. Jako trojmocné  $Fe^{3+}$ , které se střevní sliznicí resorbovat nemůže (soli  $Fe^{3+}$  jsou nevstřebatelné); jako dvojmocné  $Fe^{2+}$ , které je v zásadě resorbovatelné (soli  $Fe^{2+}$ ) a také jako železo vázané v hemu (=hemové železo, např. z příjmu masa, ryb). Hemový komplex s železem se po perorálním příjmu resorbuje obzvláště dobře. K absorpci železa dochází hlavně v duodenu (Lüllmann et al., 2012).

**Železo vázané v hemu ( $\text{Fe}^{2+}$ )** má svůj speciální protein transportující hem v apikálních membránách enterocytů – HCP (heme carrier protein). Po endocytóze těchto komplexů se  $\text{Fe}^{2+}$  uvolní z hemu speciálním enzymem hemoxygenázou. Přebytečný  $\text{Fe}^{2+}$  je navázán na buněčný feritin (v trojmocné formě), a slouží tak jako intracelulární pool železa. Železo je z enterocytu uvolňováno do krve exportérem zvaným ferroportin (nachází se i v membráně makrofágů a hepatocytů) ve formě  $\text{Fe}^{2+}$ . Takto vyloučené železo je ihned oxidováno hefestinem a vázáno na apotransferin, který obstarává transport Fe plazmou. Transferin (=apotransferin + 2  $\text{Fe}^{3+}$ ) se dostává prostřednictvím transferinových receptorů endocytózou do erytroblastů i do buněk jater, placenty, aj. Po odevzdání Fe cílovým buňkám je apotransferin znovu k dispozici pro přijetí Fe ze střeva a z makrofágů (*Sedláčková a Racek, 2009; Lüllmann et al., 2012; Silbernagl, Lang, 2001*).

**Nehemové železo ( $\text{Fe}^{3+}$ )** se může resorbovat pouze jako  $\text{Fe}^{2+}$ , takže musí dojít k jeho redukci v kyselém prostředí žaludku a v duodenu enzymem ferireduktázou nebo za účasti redukčních činidel přítomných v potravě (např. askorbová kyselina, cystein, histidin). Takto zredukované  $\text{Fe}^{2+}$  se poté naváže na dvoumocný transportér kovů (DMT1 = divalent metal transporter), který přenesení  $\text{Fe}^{2+}$  přes apikální membránu do cytosolu.  $\text{Fe}^{2+}$  pak v cytosolu – spolu se železem pocházejícím z hemu - působením ferroportinu opět enterocyty opouští (*Lüllmann et al., 2012; Sedláčková a Racek, 2009*).

Za normálních okolností je všechno nehemové železo v oběhu vázáno na transferin, jehož saturace vazebných míst se pohybuje okolo 30 %. Při nadbytku železa v organismu a obsazení všech vazebných míst transferinu se v organismu objeví „volné železo“ (NTBI – NonTransferin-Bound Iron), obvykle ve formě  $\text{Fe}^{3+}$  vázané na citrát (*Sedláčková a Racek, 2009*).

### 3.1.3 Recirkulace železa obsaženého v erytrocytech

Erytrocyty mají průměrnou životnost cca 120 dní. Po této době jsou vychytávány makrofágy retikuloendotelového systému (RES). Uvnitř makrofágů dochází k degradaci erytrocytů a uvolnění hemoglobinu. Hemoglobin je dále degradován na hem a globin. Z hemu se pomocí hemoxygenázy uvolní železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ), které pak tvoří intracelulární pool.

Rovněž hemoglobin z intravaskulárně hemolyzovaných erytrocytů je zpracován makrofágy RES. V plazmě se váže na přenašeč haptoglobin a do buňky je přenesen pomocí receptoru CD136. Železo je pak z hemu uvolněno pomocí hemoxygenázy. Železo je z makrofágů exportováno feroportinem, naváže se na transferin a je znovu využito pro erytropoézu (*Sedláčková a Racek, 2009*).

### 3.1.4 Zásoby železa

Játra jsou největší zásobárnou železa v organismu. Přebývajícím železem je v nich ukládáno ve formě feritinu a hemosiderinu. Malá část železa je uložena jako biologicky aktivní labilní intracelulární pool (*Sedláčková a Racek, 2009*).

Feritin, neboli skladovací molekula železa v buňce, který se nachází ve střevní sliznici, játrech, kostní dřeni, erytrocytech a plazmě tvoří „kapsu“ pro 4500 iontů  $\text{Fe}^{3+}$ . Představuje tak rychle mobilizovatelnou rezervu železa (okolo 600 mg). Zatímco Fe z hemosiderinu se uvolňuje obtížněji (250 mg Fe v makrofázích jater a kostní dřeni) (*Silbernagl a Lang, 2001; Sedláčková a Racek, 2009*).

### 3.1.5 Regulace železa

**Enterální resorpce** je regulována negativní zpětnou vazbou – resorbuje se vždy jen tolik železa, kolik je ho opravdu zapotřebí. Kontrolujícím faktorem je množství feroportinu, které je k dispozici pro export železa z enterocytů. Množství feroportinu je regulováno hepcidinem, který zvyšuje anebo snižuje počet feroportinových jednotek, které jsou k dispozici. Na tomto principu funguje i tzv. slizniční blok – ochrana před perorální otravou železem (*Lüllmann et al., 2012*).

Při nedostatku Fe je slizniční translace feritinu inhibována vazbou Fe-regulačního proteinu IRP 1 (iron regulatory protein 1) na feritinou mRNA, zatímco vazbou na mRNA transferinového receptoru 1 dojde k jeho stabilizaci, resp. k vyššímu příjmu železa do buňky.

## **3.2 Patologické stavy spojené s železem**

### **3.2.1 Nemoci spojené s nedostatkem železa**

Téměř miliarda lidí na světě trpí anémií z nedostatku železa (sérové  $Fe < 0,4 \text{ mg/l}$ ). Nedostatek železa tlumí syntézu hemoglobinu, kdy vzniká hypochromní mikrocytární anémie (sideropenická anémie, tj. anémie z nedostatku železa). Erytrocyty těchto pacientů jsou méně červené (obsahují méně hemoglobinu) a jejich velikost je menší, než velikost normálních erytrocytů (*Sheftel et al., 2012*).

Na základě etiologie a patofyziologie rozeznáváme absolutní a relativní nedostatek železa založený na laboratorních a klinických výsledcích. V zásadě může nedostatek železa ovlivnit i jiné tkáně/orgány než pouze erythropoézu, a to kosterní svalstvo, srdce a mozek. Často jsou zmiňovány jako příznaky anémie únava, svalová slabost, snížená fyzická výkonnost a zhoršení kognitivních funkcí, které mohou být následkem nedostatku železa v mozku/svalech (*Camashella, 2017*).

#### **Hlavní příčiny nedostatku železa mohou být:**

- a) ztráta krve – krvácení v GITu, silné menstruační krvácení
- b) narušení recyklace Fe: tato forma anémie se objevuje u chronických infekcí. Při těchto stavech je sice dostatek železa v organismu, ale železo je uvězněné uvnitř makrofágů a nemůže být uvolněno kvůli zánětlivým mediátorům
- c) nízký příjem železa – malnutrice (nedostatečný příjem železa ve stravě), vegetariáni, vegani. Vyskytuje se hlavně ve třetím světě
- d) narušení resorpce Fe v důsledku: achlorhydrie (atrofická gastritida, gastrektomie), malabsorpce při chorobách horních oddílů tenkého střeva nebo obsahuje-li potrava složky vážící Fe (fytáty v obilí a zelenině, tříslovina v čaji, šťavelany, aj.)
- e) defekt apotransferinu – ten však bývá vzácný
- f) léky navozený – inhibitory protonové pumpy,  $H_2$  blokátory, antikoagulantia, aspirin, nesteroidní protizánětlivé léky

(*Silbernagl a Lang, 2001; Camashella 2017; Sheftel et al., 2012*).



Cílem léčby železem je normalizovat hodnoty hemoglobinu a doplnit vyčerpané tkáňové zásoby železa. Přípravky železa se podávají většinou perorálně. Doba léčby je přibližně 2-3 měsíce a nesmí přestat ani při normalizaci hodnot hemoglobinu, protože je nutné doplnit také zásoby železa v organismu. Podávají se dvojmocné soli jako síran železnatý (*ferrosi sulfas*), fumaran železnatý (*ferrosi fumaras*), glukonan železnatý (*ferrosi gluconas*) nebo chlorid železnatý (*ferrosi chloridum*).

Absorpci železa podporuje kromě vitamínu C i současné podávání vitamínu B<sub>6</sub>. Asi u 10 % léčených se mohou vyskytnout nežádoucí účinky terapie železem jako pálení žáhy, nauzea, tlak v žaludku, zvracení, nechutenství, průjem a u starších pacientů spíše zácpa. Pro injekční aplikaci lze použít i trojmocné přípravky železa. Jediným rozumným důvodem pro injekční aplikaci je naprostá nesnášenlivost orální terapie (Hynie, 2001). Tato terapie může být spojená s rizikem předávkování a následným ukládáním železa ve tkáních (hemosideróza). Vazebná kapacita transferinu pro železo je omezená a volné Fe<sup>3+</sup> je toxické. Proto se používají takové komplexy Fe<sup>3+</sup>, které buď odevzdávají Fe<sup>3+</sup> přímo transferinu, anebo které fagocytózou pohltí makrofágy, takže se železo dostane do feritinových zásob (Lüllman, Mohr, Hein, 2012).

### 3.2.2 Nemoci spojené s nadbytkem železa v organismu

Vzhledem k limitované schopnosti lidského těla vyloučit železo může dojít k předávkování železem. Předávkování železem může být výsledkem dlouhodobé hyperabsorpce železa pocházejícího ze stravy nebo přebytkem železa podávaného parenterálně (krevní transfuze u některých typů anémií) nebo kombinací obou způsobů. Sekundární přetížení železem se vyvíjí u pacientů závislých na transfuzích, např. u talasemií, aplastické anémie a myelodysplastickém syndromu.

**Talasemie** jsou skupiny dědičně podmíněných krevních poruch způsobené poruchou syntézy jednoho nebo více hemoglobinových řetězců ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , a  $\epsilon$ ), což vede k jejich abnormální struktuře. Různé typy talasemií mohou způsobit odlišně závažné patologické stavy, které se mohou projevit mírnými či asymptomatickými anémiemi nebo anémiemi závažnými, které mohou vést k smrti ( $\alpha$ -talasemie major). Talasemičtí pacienti vyžadují celoživotní léčení krevními transfuzemi; ty však ale vedou k rapidnímu

nárůstu Fe, jelikož každá jednotka transfuze krve obsahuje 200-250 mg železa (1 ml červených krvinek obsahuje přibližně 1 mg železa), které nemůže být vyloučeno. Vzhledem k tomu, že toto železo pochází z červených krvinek, retikuloendoteliální makrofágy jsou první, které se nasytí železem. Poté teprve dochází k přetížení železem v hepatocytech a dalšími parenchymatických buňkách. Když se hodnoty železa zvýší, železo vázající kapacita transferinu se překročí a ne-transferinová frakce železa v plasmě generuje volné radikály. Jediná možnost léčby sekundárního přetížení železem je podání železo-cheletačnických látek, jako je např. deferoxamin (*Sheftel et al., 2012*).

Jsou však známy i další formy talasemií, které nevyžadují pravidelné krevní transfuze, tzv. **ne-transfuzně-dependentní talasemie**. Ty tvoří další spektrum různých anémií, které jsou charakterizovány zvýšenou absorpcí železa vlivem neefektivní erythropoézy, kde patří talasemie intermedia (*Porter et al., 2017; Kontoghiorghes et al., 2017*).

Nejčastější dědičnou poruchou ovlivňující homeostázu Fe v Evropě je dědičná **hemochromatóza (HH)**. Je to autosomálně recesivní porucha, kdy se železo kumuluje v tkáních parenchymatických buněk a poškozuje tak některé orgány. Makrofágy jsou ušetřeny před kumulujícím se železem, alespoň v raných stádiích choroby. Výrazná kumulace železa je pozorována až po čtyřicátém roce především v játrech, ale také ve slinivce, hypofýze, srdci, kloubech a kůži. To vede ke kožní hyperpigmentaci a klinickým komplikacím jako je artritida, bolest kloubů, hypogonadismus, diabetes mellitus, jaterní fibróza, cirhóza, hepatocelulární karcinom a/nebo srdeční selhání.

HH je geneticky heterogenní nemoc. Ve většině případů je způsobena mutací na HFE (high iron Fe) genu, který je lokalizován na 6. chromozomu a poškozuje transferinový receptor a reguluje i expresi hepcidinu. Pokud došlo k mutaci HFE, střeva dostávají silný transferinový signál, že tělo má nedostatek železa. To vede k maximální absorpci železa z požitých potravy a nadbytku železa ve tkáních. Existují pacienti s mutací HFE, u kterých se nevyskytují klinické projevy nadbytku železa, ale také pacienti, kteří mají nadbytek železa, ale normální HFE genotyp. Možné je, že HFE způsobený nadbytek železa může být spojen s hepcidinovou signální drahou. Obecně totiž potlačení hepcidinové sekrece vede ke zvýšenému vstřebávání železa u všech forem hemochromatózy (*Papanikolaou a Pantopoulos, 2005*).

**Juvenilní hemochromatóza** je charakterizována kumulací železa způsobenou mutací genu pro hemojuvelin nebo pro hepcidin. Klinické příznaky se obvykle objeví před třicátým rokem života (*Camashella et al., 2002*). Na rozdíl od typické HH popsané výše, ovlivňuje obě pohlaví stejně, kdežto typická HH se vyskytuje častěji u mužů (*Papanikolaou et al., 2002*).

Případy **akutní toxicity** železem jsou vzácné a převážně spojené s poškozením GITu, jejíž výsledkem může být až hemoragická nekróza a pokud není léčena, může být fatální (*Sheftel et al., 2012*).

### **Nadbytek železa v CNS**

Byly popsány vážné neurodegenerativní poruchy spojené se špatnou regulací metabolismu Fe v CNS (centrální nervové soustavě) (*Ponka, 2004*). Vysoké koncentrace železa byly nalezeny v mozku pacientů trpících Parkinsonovou či Alzheimerovou chorobou, ale také vzácnější Huntigtonovou chorobou (*Papanikolaou a Pantopoulos, 2005*).

### **Nadbytek železa a rakovina**

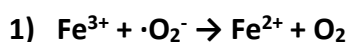
Železo samo o sobě sice nemá karcinogenní účinky, ale nadbytek železa je spojen s vysokým rizikem karcinogeneze. Částečným potvrzením toho je komplikace HH, kdy dochází k rozvoji hepatocelulárního karcinomu, který postihuje asi 30 % pacientů s patologickou akumulací železa v parenchymatických tkáních. Je dokázáno, že nadbytek železa narušuje redoxní rovnováhu buňky a vytváří oxidativní stres, který reguluje signální dráhy spojené s maligní transformací. Domnívá se, že železem indukovaný chronický oxidativní stres může vést k mutacím a kritickému omezení DNA reparačních genů (*Papanikolaou a Pantopoulos, 2005*).

### **3.2.3 Toxicita železa**

Železo za aerobních podmínek může poškodit tkáň vznikem volných radikálů, které napadají membrány buněk, proteiny a DNA. Jak již bylo zmíněno výše, ionty železa cirkulují v plasmě vázány na transferin a hromadí se buňkách v jejich zásobní formě – feritinu; v červených krvinkách jako hemoglobin, ve svalech jako myoglobin. Ve zdravém

organismu by se tedy nemělo vyskytovat „volné železo“<sup>2</sup>. Může se ale stát, že při nadbytku železa se transferin nasytí a železo se pak nemá kam navázat a zůstane v organismu jako „volné železo“. I velmi malé množství „volného železa“ se může účastnit Fentonovy (reakce č. 2), resp. Haberovy-Weissovy (reakce č. 3) chemické reakce, která je důsledkem toxicity železa. Ta vede k vytvoření hydroxylového radikálu ( $\cdot\text{OH}$ ) ze superoxidu ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) a peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), jež se souhrnně nazývají jako reaktivní kyslíkové meziprodukty ROIs (reactive oxygen intermediates).

Superoxid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) převádí železité ionty na železnaté a ty reagují s peroxidem vodíku za vzniku hydroxylových radikálů:



Druhá uvedená reakce je známá jako Fentonova reakce, kdy v přítomnosti  $\text{Fe}^{2+}$  dochází k redukci peroxidu vodíku a k vzniku zmíněného hydroxylového radikálu. Celý průběh reakce může být shrnut v již zmiňované Haberově-Weissově reakci. Superoxid reaguje s peroxidem vodíku v přítomnosti železa, což vede ke vzniku molekulárního kyslíku, hydroxylového radikálu a anionu hydroxidu:

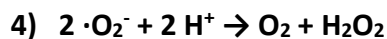


Aby mohlo dojít ke vzniku hydroxylového radikálu, musí být splněny tyto dvě podmínky: přítomnost volného železa a přítomnost ROIs. NADPH-oxidáza může tvořit superoxid jako výsledek zánětu způsobeného neutrofily a makrofágy. Mnoho tkání obsahuje xantinoxidázu, enzym, který je také známý pro tvorbu superoxidu a peroxidu vodíku. Superoxid je také produkován dýchacím řetězcem v mitochondriích. Obecně tedy všechny infekční, zánětlivé procesy a nemoci zahrnující ischemii vedou k oxidačnímu stresu, ve kterém hraje hlavní roli buď „volné železo“ nebo nadprodukce ROIs během zánětlivých reakcí (*Emerit et al., 2001*).

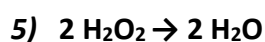
---

<sup>2</sup> Volné železo – železo s alespoň jedním volným vazebným místem, nebo obsazené snadno rozpustným ligandem. Za normálních podmínek má železo vyvázaných všech šest vazebných míst a tudíž nemůže katalyzovat redoxní reakce a produkovat hydroxylový radikál.

Superoxid je nestálý a podléhá spontánnímu rozkladu nebo mnohem rychlejšímu rozkladu superoxidodismutásoy na peroxid vodíku a molekulární kyslík:



Peroxid vodíku je následně přeměněn za katalýzy glutathionperoxidázy na vodu a molekulární kyslík:



(Mladěnka et al., 2006; Fraga a Oteiza, 2002; Emerit et al., 2001; Papanikolaou a Pantopoulos, 2005)

Prevence poškození buněk způsobená produkcí ROIs může být efektivně dosažena antioxidanty, což jsou obecně látky schopné chránit před oxidací. Volné radikály jsou v aerobních organismech přítomny jako výsledek normálního metabolismu kyslíku. Jak bylo popsáno výše, železo, zejména železnaté ionty jsou schopné spouštět oxidaci a rozklad peroxidu. Proto antioxidant může být různá látka, která:

- a) chelatuje železnaté ionty a chrání železo před reakcí s kyslíkem či peroxidy nebo chelatuje i železité ionty a udržuje ho v jeho redoxním stavu, které dělá železo neschopné redukovat molární kyslík
- b) vycytává již vytvořené radikály, nezávisle na tom, jestli pochází na železe závislých reakcích nebo ne (Fraga a Oteiza, 2002)

### **3.3 Železo-chelatační terapie**

Cílem železo-chelatační terapie je zabránit kumulaci nadbytečného železa a komplikací spojených s nadbytkem železa jako jsou hepatická, endokrinologická a kardiologická dysfunkce (Junqueira et al., 2013). 71 % úmrtnost na kardiologické onemocnění díky nakumulovanému železu v myokardu je závažná komplikace přetížení železem u  $\beta$ -talasemie. Abychom se vyhnuli závažným komplikacím způsobenými nadbytkem železa, je důležité snížit „volné železo“ v plasmě a odstranit přebytek železa (Xiao et al., 2015).

Chelátory jsou schopny navázat ionty kovů (železa, mědi) a drasticky snížit jejich reaktivitu (Rodrigues et al., 2015). Konečný komplex je ve vodě rozpustný, v důsledku

čehož může vstoupit do krevního oběhu a může být vyloučen močí či žlučí bez poškození organismu (Kochhar et al., 2015).

### 3.3.1 Požadované vlastnosti chelátorů

Železo má koordinační číslo 6, což znamená, že jeho centrální atom může na sebe navázat až šest ligandů a tvořit osmistěnný chelát. Ligandy mohou být klasifikované podle počtu donorových atomů, kterými vytváří koordinační vazbu s centrálním atomem kovu. Dělí se tedy na dvojjvazné, trojjvazné a šestivazné.

Stabilita komplexu je vyjádřena počtem navázaných chelatačních kruhů tvořících výsledný komplex; čím větší počet chelatačních kruhů ve výsledném komplexu, tím větší stabilita komplexu. Standardně používaný parametr ke srovnání účinnosti chelátorů v biologických podmínkách je pFe hodnota. Tato hodnota je definována, jako záporný logaritmus koncentrace volného  $\text{Fe}^{3+}$  v roztoku, kde smísíme chelátor v koncentraci  $10^{-5}$  M a železo v koncentraci  $10^{-6}$  M v prostředí o pH 7.4. Srovnání ligandů za takto stanovených podmínek je výhodné, jelikož hodnota pFe započítává protonizační účinky ligandu a denticitu (počet atomů v jednom ligandu, který se váže na centrální atom v koordinačním komplexu). Nicméně v mnoha situacích toto srovnání nemusí být objektivní. Hodnota koncentrace železa v plasmě a jiných tekutinách je sice daná, to se ale může měnit; za patologických podmínek se výrazně zvyšuje. Stejně tak, když vezmeme v potaz množství vyloučeného železa za den ( $>0,5$  mg/kg váhy), dostaneme negativní Fe bilanci u pacientů závislých na transfuzích. Navíc, když vezmeme v potaz klinicky používanou denní dávku různých chelátorů, odpovídající koncentrace se liší od  $10^{-3}$  do  $10^{-5}$  v závislosti na způsobu podání, absorpci a metabolických vlastnostech. Na první pohled, díky chelatačním schopnostem ligandu, může být definice pFe užitečná, ale v reálných (tj. komplexních) biologických podmínkách není její znalost dostatečná pro predikci dávkování (Crisponi a Remelli, 2007).

Chelátory železa mohou být navrženy jak pro železnaté ionty, tak pro železité ionty. Ligandy preferující železnaté ionty zahrnují „mírné“ donory elektronů, např. dusík zahrnující ligandy jako je 2,2'-bipyridyl a 1,10-fenantrolin. I když jsou tyto látky mnohem více selektivní pro  $\text{Fe}^{2+}$  než pro  $\text{Fe}^{3+}$ , mají také afinitu pro další biologicky

důležité dvoumocné kovy jako je měď ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a zinek ( $\text{Zn}^{2+}$ ). Ligandy, preferující železité ionty např. oxyaniony a katecholáty jsou obecně preferenčně selektivní k trojmocným kovům jako je hliník ( $\text{Al}^{3+}$ ) a galium ( $\text{Ga}^{3+}$ ), které nejsou až tak důležité pro živé buňky, proto je železo  $\text{Fe}^{3+}$  v praxi výhodnějším cílem pro syntézu nových chelátorů. Další výhodou vysoké afinity  $\text{Fe}^{3+}$  chelátorů je, že za aerobních podmínek chelatují i  $\text{Fe}^{2+}$  díky usnadněné autooxidaci na  $\text{Fe}^{3+}$  (Harris, 1973).

### **Rozhodující znaky pro klinické použití chelátorů**

- a) **Lipofilita a molekulová hmotnost** – aby dosáhl chelátor svého farmakologického efektu, musí být schopný dostat se do cíle v dostatečné koncentraci. Důležitá je jeho schopnost účinně se absorbovat gastrointestinálním traktem a projít biologickými membránami, aby se dostal do cílových orgánů jako jsou např. játra. Tři hlavní faktory ovlivňují schopnost látky volně pronikat lipidovou membránou – lipofilita, ionizace a molekulová hmotnost. Aby bylo dosaženo co největší absorpce, měl by být chelátor dostatečně rozpustný v tucích ( $\log P_{\text{water/octanol}} > -0,7$ ), což usnadní penetraci gastrointestinálním traktem. Na druhou stranu, pokud by byl chelátor až moc rozpustný v tucích, mohl by proniknout přes hematoencefalickou bariéru a placentu, což by zvětšilo jeho toxicitu (Tilbrook, 1998). Permeabilita membrány je také ovlivněna nábojem. Neionizované molekuly penetrují membrány mnohem rychleji, než ionizované molekuly (Liu a Hider, 2002). Molekulová hmotnost je další kritický faktor, který ovlivňuje absorpci. Abychom dosáhli  $>70\%$  absorpce po perorální aplikaci, molekulová hmotnost chelátoru by pravděpodobně měla být  $<500$ . Tento hmotnostní limit omezuje výběr chelátoru a můžeme prakticky vyloučit šestivazné ligandy jako potenciální chelátory (například deferoxamin a jiné siderofory). Paradoxně EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) s malou molekulovou hmotností 292 je příliš malá na to, aby plně chelatovala železo, čímž usnadňuje potenciální toxicitu železa (Tilbrook, 1998). Pro vstřebávání jsou tedy nejvhodnější dvojjazné a trojjazné ligandy (Yokel et al., 1995).
- b) **Vlastnosti chelátoru** – metabolické vlastnosti chelátorů také hrají důležitou roli a rozhodují o jejich účinnosti a toxicitě. Je důležité zajistit, aby se chelátor nepřeměnil v organismu v metabolity, které by postrádaly schopnost vázat

železo. Tyto vlastnosti by nevyhnutelně vyžadovaly podání vyšší dávky chelátoru, což by zvyšovalo riziko navození toxicity. Chelátory postrádající esterové a amidové vazby jsou pravděpodobně více odolnější metabolickým reakcím (*Liu a Hider, 2002*).

- c) **Toxicita** – toxicita spojována s chelátory železa vychází z mnoha faktorů, které zahrnují: inhibici železa obsahujících metaloenzymů, nedostatečná selektivita ke kovům, která může vést k nedostatku ostatních fyziologicky důležitých kovů, jako je  $Zn^{2+}$  a redoxní cyklení Fe komplexů mezi  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ , čímž se tvoří volné radikály (*Liu a Hider, 2002*).

### 3.3.2 Příklady chelátorů

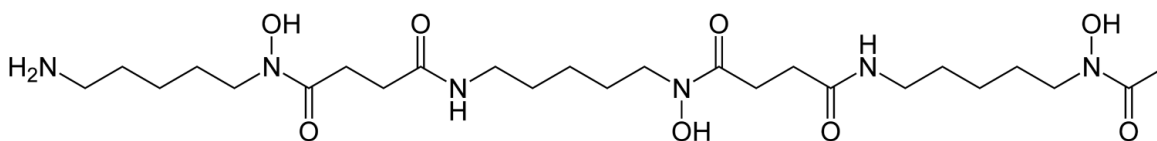
#### 3.3.2.1 DEFEROXAMIN

Deferoxamin (Obr. 1) byla první šestivazná chelatační látka, která byla představena pro klinické použití v roce 1960 a v roce 1982 byla schválena FDA (Food and Drugs Administration). Je to netoxický chelátor železa pocházející z mikroorganismu *Streptomyces pilosus*, který je schválen pro dlouhodobou železo-chelatační terapii  $\beta$ -talasemie a jiných nemocí spojených s nadbytkem železa. Má vysokou molekulovou hmotnost a krátký biologický poločas, tudíž vyžaduje subkutánní nebo intravenózní aplikaci (v případě akutní intoxikace železem). Navrhovaná dávka je 40-50 mg/kg za den alespoň 5x týdně po dobu 8-10 hodin. Deferoxamin je vylučován hlavně močí, ačkoliv u některých pacientů může dosáhnout až 40 % exkrece stolicí.

I když je léčba deferoxaminem efektivní, dlouho trvající infuze jsou časově náročné pro pacienty, bolestivé pro děti a finančně nákladné pro pojišťovny. Terapie deferoxaminem má často negativní dopad na kvalitu života pacientů. Na dávce závislé nežádoucí účinky deferoxaminem jsou vizuální a sluchová neurotoxicita u chronické léčby a bolest břicha, průjem, nauzea, zvracení a hypotenze u léčby akutních stavů. Subkutánní podání může mít za následek zarudnutí a svědění v místě podání infuze. Může se projevit i systémová alergická reakce a anafylaxe požadující změnu chelátoru. Naštěstí většina nežádoucích účinků je reversibilní. Terapie deferoxaminem zvyšuje



riziko nakažení mukormykózou, cholerou a morem (*Borgna-Pignatti a Marsella, 2015; Mobarra et al., 2016; Nurchi et al., 2016*).



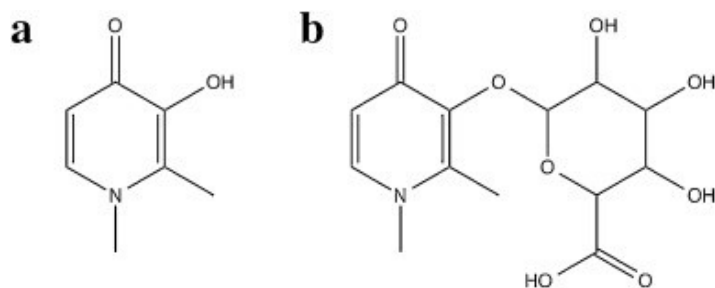
**Obrázek 1 DEFEROXAMIN**

Zdroj: *Nurchi et al., 2016 (převzato)*

**3.3.2.2 DEFERIPRON**

Deferipron (Obr. 2a) je perorální chelátor železa, který je vhodnou volbou pro pacienty s nedostatečnou odpovědí na jiné chelátory železa, jako jsou deferasirox a deferoxamin. V porovnání s deferoxaminem a deferasiroxem se deferipron ukazuje jako nedostatečně účinný v kontrole nadbytečného železa u talasemie. Jeho účinnost je sporná. Mezi nežádoucí účinky patří zvýšené hodnoty jaterních enzymů, gastrointestinální potíže a artralgie. Nejzávažnějšími nežádoucími účinky spojenými s léčbou deferipronem jsou agranulocytóza a neutropenie, které jsou však reverzibilní po přerušení terapie.

Doporučené denní dávkování deferipronu je 75-100 mg/kg ve třech subdávkách. Deferipron je dobře absorbován ze střeva a maximální koncentrace v plasmě dosáhne za 45 minut po pozření. Jeho plasmatický poločas je přibližně 2-3 hodiny. Je vylučován močí během 3-4 hodin po metabolizaci v játrech. Hlavní metabolit je glukuronid (Obr. 2b), který zablokuje 3-hydroxylovou skupinu a tento metabolit je tedy neschopný vázat železo. Proto se také musí podávat 3x denně, aby se předešlo transformaci v nechelující glukuronidovou formu. Ačkoli je deferipron možno podávat v monoterapii, často se používá v kombinaci s deferoxaminem (*Borgna-Pignatti a Marsella, 2015; Mobarra et al., 2016; Nurchi et al., 2016*).



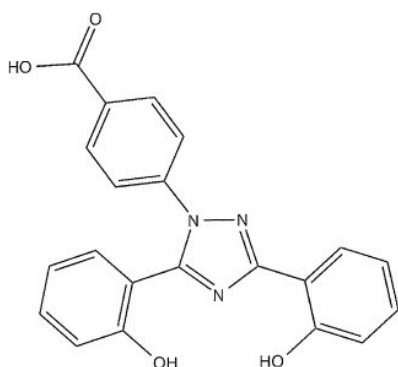
**Obrázek 2 DEFERIPRON**

Vzorec Deferipronu (a) a jeho glukuronidovaného metabolitu (b).

Zdroj: Nurchi et al., 2016 (převzato)

### 3.3.2.3 DEFERASIROX

Deferasirox (Obr. 3) je trojvazný chelátor s vysokou afinitou pro železo a nízkou afinitou pro měď a zinek. Deferasirox je schválený pro léčbu hemosiderózy. Podává se perorálně 1x denně, nejčastěji ráno v různé dávce od 10-40 mg/kg, která závisí na míře přetížení železem při podávání transfuzí. Deferasirox je absorbován ze střeva, kdy maximální koncentraci v plasmě dosáhne za 4-6 hodin a jeho biologický poločas je přibližně 14-16 hodin, což umožňuje právě dávkování 1x denně. Exkrece probíhá hlavně stolicí. Nejčastější nežádoucí účinky při terapii deferasiroxem jsou bolesti břicha, nauzea, zvracení, průjem, kožní vyrážky a oční potíže. Tyto nežádoucí účinky se častěji vyskytují u starších pacientů, kteří mají predispozice k renálním/hepatickým onemocněním, myelodysplastickému syndromu a k nízkému počtu krevních destiček. Při terapii by měly být monitorovány hladiny kreatininu, trasamináz a bilirubinu. Terapie deferasiroxem totiž může vést k renální dysfunkci, metabolické acidóze, hypokalémii a hypofosfátemii (Borgna-Pignatti a Marsella, 2015; Mobarra et al., 2016; Nurchi et al., 2016).



**Obrázek 3 DEFERASIROX**

Zdroj: Nurchi et al., 2016 (převzato)

### 3.3.3 Volba chelátoru

Volba chelátoru závisí na různých faktorech, jako jsou preference pacientů, adherence k terapii, dostupnost chelátoru, cena, toxicita a místo nadbytku železa. Pro pacienty, kteří již prošli chelatační terapií a dobře ji snášeli, není důvod ke změně chelátoru.

Výzkum pro syntézu nových chelátorů pracuje např. s hydroxypyridinony, čtyřvaznými deriváty kyseliny 'kojic' (KA – kojic acid) a ve zkoušení je také přírodní siderofor desferrithiocin (*Nurchi et al., 2016*).

### 3.3.4 Nové terapeutické indikace železo-chelatační terapie

#### 3.3.4.1 Akutní respirační distresový syndrom – ARDS

ARDS je akutní zánětlivý plicní syndrom charakterizovaný vysokou mortalitou, která může být výsledkem mnoha nesouvisejících původců, jako jsou sepse, aspirace žaludečního obsahu, polytrauma, hyperoxie a otrava léky, či jinými chemickými látkami. Postižení plic je výsledkem zánětlivého procesu, který vede k hypoxemii, hyperkapnii, acidóze, zvýšené permeabilitě alveolární buněčné membrány a plicnímu edému. Kyslíkové radikály, produkováné aktivovanými polymorfonukleárními leukocyty, jsou vždy přítomny v postižené plíci. Tyto radikály hrají významnou roli ve vývoji plicního zranění tím, že destruuje integritu alveolární buněčné membrány. Prospěch železo-chelatační terapie byl prokázán v mnoha experimentech. Tyto experimenty ukázaly, že železo-chelatační terapie může předcházet poškození tkání volnými radikály vedoucího k vývoji ARDS a selhání dýchání (*Faa a Crisponi, 1999*).

#### 3.3.4.2 Ischémie myokardu

Téměř všechny otevřené srdeční operace jako kardiopulmonární bypass zahrnují omezenou dobu, kdy dochází k tzv. aortickému „cross clamping“<sup>3</sup>, který iniciuje

---

<sup>3</sup> Aortic cross clamp je chirurgický instrument používaný v kardiologii, kdy se chytne aorta svorkou a separuje se systémová cirkulace od výtoku krve ze srdce. Používá se např. v léčbě koarktace aorty.

ischémii; situaci, která podporuje tvorbu volných radikálů. Terapie deferoxaminem vedla ke zlepšení zotavení u psů a králíků (Faa a Crisponi, 1999).

### **3.3.4.3 Malárie**

Malárie neboli hemolytická horečka je považována podle Světové zdravotnické organizace (WHO) za hlavní zdravotní problém. Ovlivňuje více než 200 milionů lidí a zabije více než 1 milion lidí ročně. Malárie je způsobena pěti druhy plasmodií: *plasmodium falciparum*, *vivax*, *ovale*, *knowlesi* a *malariae*. Malárie je přenášena z osoby na osobu po kousnutí samičky komárem z rodu *Anopheles*. Plasmodia jsou obligátní parazité, kteří se vyvíjí v lidských erythrocytech a potřebují železo pro jejich život. Železo je požadováno pro enzymy důležité pro proliferaci plasmodií. Navzdory tomu, že se plasmodia vyvíjí v erythrocytech, tedy v místech bohatých na železo, vykazují pozoruhodnou citlivost na chelátory železa (Faa a Crisponi, 1999).

## **4. ANTHOKYANY**

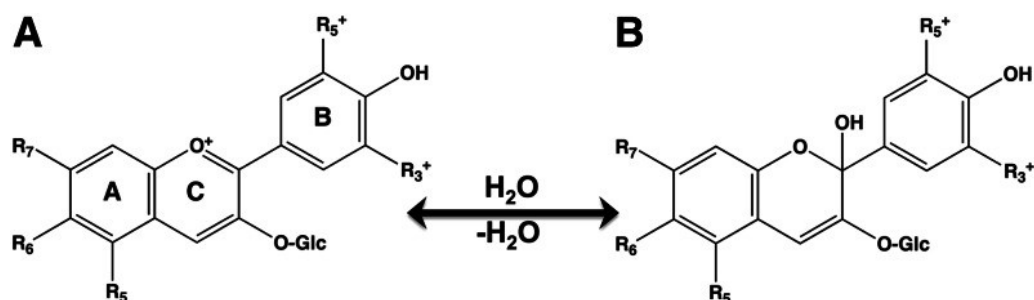
Anthokyany (z řečtiny *anthos* = květ a *kyanos* = modrý) tvoří velkou a pravděpodobně nejvýznamnější skupinu ve vodě rozpustných rostlinných pigmentů. Patří do široce rozšířené skupiny flavonoidních polyfenolů, které jsou zodpovědné za modré, fialové a červené zbarvení plodů, které hraje významnou roli v lákání zvířat, což umožňuje rozprášení semen a tím i k jejich rozšíření na různá místa. Tím, že absorbují světlo, chrání rostlinu před ultrafialovým zářením.

Anthokyany jsou součástí běžné stravy, zejména v červených, modrých nebo fialových plodech ovoce a zeleniny (broskve, černý bez, borůvky, černý rybíz, hroznové víno, švestky, třešně, fazole, ředkvičky, červená cibule). Vyskytují se taky v již zpracovaných produktech jako je např. víno, džusy, jogurty a želé. V poslední době se staly velice důležitými, jelikož nahrazují umělá potravinová barviva. Květy a plody představují největší zdroj anthokyanů, ale vyskytují se také v listech, kůře a semenech. Denní příjem anthokyanů se liší podle stravovacích návyků. Nejvyšší konzumace byla nalezena v Itálii (středomořská strava), kde příjem anthokyanů činil u žen 44,1 mg/den a u mužů 64,9 mg/den, zatímco v Nizozemí spotřeba u mužů činila pouze 19,8 mg/den a u žen 24,59 mg/den (Zamora-Ros et al., 2011).

Mnoho studií spojuje tyto sloučeniny s antioxidačními, protizánětlivými a protirakovinotvornými vlastnostmi. Ty ale musí být potvrzeny v klinickém testování na zvířatech a lidech. Potenciální farmakologické vlastnosti různých bioaktivních sloučenin jsou nyní testovány v *in vitro* a *in vivo* modelech (Smeriglio et al., 2016).

#### 4.1 Chemická struktura

Anthokyaniny jsou polyhydroxy a polymethoxy 2-fenylbenzopyryliové deriváty tvořené jádrem nazývaným anthokyanidin (aglykon) vázaným na různé cukry (glukosa, galaktosa, xylosa, arabinosa, fruktosa, rhamnosa) připojené k pozici C3, C5 nebo C7. Glykosylace přispívá k rozpustnosti ve vodě. V závislosti na pH mohou měnit barvu; při nízkém pH=1 se vyskytují v červené barvě, (Obr. 4A). avšak se zvyšujícím pH se červená barva vytrácí a v prostředí v o pH 7.5-8 jsou fialově-modré (Obr. 4B) a při pH >8 jsou žlutozelené.



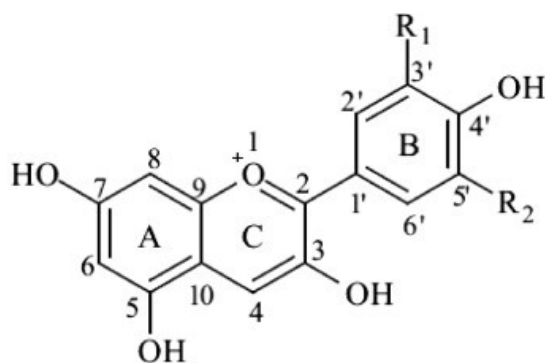
**Obrázek 4** Vliv pH na změny barev anthokyanů

Na Obr. 4 je znázorněna chemická struktura anthokyanů v kyselém pH prostředí (A) – červená barva a fialovo-modrá barva, když se pH blíží k neutralitě (pH 7) (B). Různé anthokyaniny mohou mít různé substituenty (R) v pozici C5, C6 a C7 kruhu A a v pozici C3\* a C5\* kruhu B.

Zdroj: Barnes et al., 2013 (převzato)

Je známo více než 600 druhů anthokyanů a toto číslo se stále zvětšuje. V přírodě se běžně vyskytují anthokyanidiny jako je pelargonidin, peonidin, cyanidin, malvidin, petunidin a delphinidin (Obr. 5). Z nich jsou nejrozšířenější tři glykosylované nemethylované anthokyanidiny (cyanidin, pelargonidin, delphinidin). Jednotlivé anthokyaniny se mezi sebou liší v závislosti na methylaci, počtu hydroxylových skupin, na povaze a počtu cukrů, pozici, kde jsou cukry připojeny a na množství alifatických či

aromatických kyselin připojených k cukrům v molekule. Tyto variace ovlivňují schopnost antioxidantů. Nejrozšířenější v přírodě vyskytující se forma je 3-O-glykosidová nebo 3,5-di-O-glykosidová forma (Smeriglio et al., 2016; Kong et al., 2008; Castañeda-Ovando et al., 2009).



Name	R1	R2
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	H
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH

**Obrázek 5 Porovnání chemické struktury anthokyanidinů**

Zdroj: Wang, Stoner, 2008 (převzato)

## 4.2 Farmakokinetika

Ve vodě vysoce rozpustné anthokyany jsou charakterizovány malou absorpcí pasivní difúzí v porovnání s anthokyanidiny, které jsou více hydrofobní a u kterých je možná pasivní difúze přes epitel mukózy. Z tohoto důvodu anthokyany pro absorpci potřebují specifický transportní mechanismus, který by transportoval glykosidy přes střevní stěnu nebo musí být hydrolyzovány na jejich aglykon v tenkém střevě specifickými enzymy (Manach et al., 2005; Kay, 2006). Je známo, že anthokyany jsou hydrolyzovány intestinální mikroflórou a spontánně degradovány na monomerní fenolické kyseliny a aldehydy. Tyto metabolity mohou přispívat k biodostupnosti anthokyanů a mohou být zodpovědné za jejich účinky na lidský organismus (Smeriglio et al., 2016).

### **4.3 Biologické účinky anthokyanů**

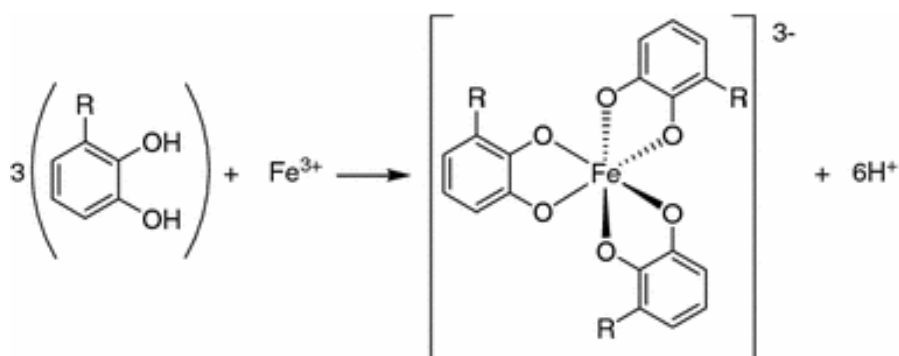
Mnoho *in vitro* a *in vivo* studií navrhuje, že anthokyany mohou pozitivně ovlivňovat lidské zdraví v léčbě chronických nemocí. Byla zaznamenána korelace mezi přísunem anthokyanů v potravě a antidiabetickým a antiobezitním účinkem. Tyto látky mohou být užitečné také jako antioxidanty, neuroprotektiva, protizánětlivé látky, kardioprotektiva a mohou tedy hrát roli v prevenci a zabránění vývoje rakoviny, diabetu mellitu a artritidy (Wang a Stoner, 2008).

#### **4.3.1 Antioxidační aktivita**

Fenolická struktura anthokyanů je zodpovědná za jejich přímou antioxidační aktivitu, resp. schopnost neutralizovat ROIs; jako superoxid, singletový kyslík, peroxid, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Anthokyany vykazují antitoxický a antikarcinogenní účinek snížením tvorby ROIs enzymy (xantinoxidasa, NADPH oxidasa, lipoxigenasa), přímou neutralizací ROIs, stimulací exprese detoxifikačních enzymů, snížením tvorby oxidativních aduktů s DNA, inhibicí mutageneze vyvolané přírodními toxiny a karcinogeny a snížením buněčné proliferace modulací transdukčních signálních drah. Ačkoliv většina protektivních účinků anthokyanů je spojována s úbytkem ROIs, anthokyany fungují také jako chelátory kovů (měď, železo) (viz kapitola Interakce s kovy). Antioxidační aktivita anthokyanů je závislá na přítomnosti hydroxylové skupiny v pozici 3 na C kruhu a dvou hydroxy skupin v *ortho* poloze na B kruhu, i když sousední hydroxylové skupiny v pozici 5 a 7 v kruhu A mohou nahradit v antioxidační aktivitě hydroxylové skupiny na kruhu B. Hydroxylové skupina v polohách 3' a 4' kruhu B představují ideální uspořádání, jelikož jejich interakce s ROIs vede ke vzniku stabilního radikálu. Methylace 4' hydroxy skupiny je spojená se sníženou aktivitou, ale methylace jiných pozic kruhu B nemusí mít na aktivitu žádný dopad. Obecně antioxidační aktivita je vyšší u anthokyanidinů (aglykony) než u anthokyanů (glykosidy) a platí, že antioxidační aktivita se snižuje s množstvím navázaných cukrů. Anthokyanidiny a anthokyany prokázaly vyšší antioxidační aktivitu než vitamín C a E (Mladěnka et al., 2010; Wang, Stoner, 2008, Castañeda-Ovando et al., 2009).

### 4.3.2 Interakce s kovy

Další antioxidační mechanismus anthokyanů může vycházet z jejich interakce s kovy, hlavně se železem a/nebo mědí. Interakce anthokyanů s *o*-dihydroxylovými skupinami na kruhu B s kovem vede ke vzniku chelátu (anthokyan-kov, Obr. 6), kdy se kov naváže na strukturu anthokyanu nebo dojde k redukci kovu. Anthokyan chelatují železo prostřednictvím kyslíkových atomů. Anthokyan redukující železité ionty musí mít alespoň 2 hydroxylové skupiny v ortho pozici kruhu B (*Mladěnka et al., 2010; Castañeda-Ovando et al., 2009*).



**Obrázek 6** Obecný vznik železo-polyfenol osmistěnného komplexu

Zdroj: Perron a Brumaghim, 2009 (převzato)

### 4.3.3 Poruchy očí

Benefity anthokyanů na zrak byly popsány jako jedny z prvních zdravotních účinků flavonoidů. Anthokyany podporovaly noční vidění interakcí s rhodopsinem a jeví se jako bezpečné, a tedy slibné v léčbě glaukomu a jiných zrakových poruch (*Smeriglio et al., 2016*).

### 4.3.4 Metabolické poruchy

Ovoce a zelenina jsou zdroji mnoha molekul antioxidantů, které mohou snížit riziko metabolických poruch, jako jsou obezita a diabetes mellitus 2. typu tím, že regulují hladinu glukózy v krvi nebo indukují produkci inzulínu  $\beta$ -buňkami pankreatu. Molekuly anthokyanů interagují s adiponektinem, jedním z nejdůležitějších adipocytokinů, který snižuje syntézu lipidů v játrech a zvyšuje insulinovou citlivost v adipocytech, čímž snižuje množství tělesného tuku (*Smeriglio et al., 2016*).



#### **4.3.5 Antimikrobní aktivita**

Anthokyaniny mohou způsobit strukturální poškození buněk bakterií, čímž poškodí integritu buněčné stěny a destabilizaci cytoplazmatické membrány a vnitřního matrix vedoucího ke kondenzaci buněčného materiálu. Anthokyaniny mohou také inhibovat extracelulární mikrobiální enzymy tím, že ovlivňují mikrobiální metabolismus, který vede ke snížení dostupnosti substrátů požadovaných pro růst mikrobů (*Smeriglio et al., 2016*).

#### **4.3.6 Neurodegenerace**

Anthokyaniny mohou mít příznivý efekt na pokles kognitivní a s věkem spojené neurodegenerace zvýšením uvolňování dopaminu v mozku. Mohou příznivě ovlivňovat paměť působením na hippocampus a stimulací neurogenese (*Smeriglio et al., 2016*).

#### **4.3.7 Protizánětlivé účinky**

Cyanidin prokázal inhibiční efekt na cyklooxygenázu 1 (COX-1) a cyklooxygenázu 2 (COX-2) (*Smeriglio et al., 2016*).

#### **4.3.8 Antikarcinogenní aktivita**

Antikarcinogenní vlastnosti byly testovány výhradně *in vitro*, kdy bylo zaznamenáno zpomalení buněčného cyklu, navození apoptózy, zabránění angiogeneze a inhibice DNA. Anthokyanidiny byly popsány jako více potentní oproti neanthokyanovým flavonoidům. Anthokyanidiny byly zhodnoceny jako lepší inhibitory buněčné proliferace než anthokyaniny. Zdá se, že i metabolity anthokyanů mají protikarcinogenní vlastnosti, paradoxně z důvodu prooxidační aktivity (*Smeriglio et al., 2016*).

### **4.4 Bez černý**

Bez černý, (*Sambucus nigra L.*), je opadavý keř rozšířený téměř na každém kontinentě světa. Krémově žluté květy a zářivé fialovo-černé bezinky byly po staletí užívány v lidovém léčitelství na léčbu zácpy, ke zvýšení diurézy, jako expektorans, k léčbě infekcí horních dýchacích cest a neuropatických bolestí (např. nervové záněty trojklaného nebo sedacího nervu). Pro léčbu těchto potíží pacienti několikrát denně

popíjeli bezinkový džus nebo bezinkový čaj. Odvary se dají připravit ze sušených bezinek stojících 10 minut ve studené vodě, poté se směs postupně zahřívá, krátce povaří a nechá se 10 minut odstát a zfiltrovat nebo povařením sušených květů. Květy a plody se využívají v medicíně. Listy byly používány do koupelí a kůra se používala jako diuretikum, laxativum či emetikum. Kůra, listy, semena a nepovažené nebo nezralé plody obsahují kyanogenní glykosid sambunigrin, který je velmi toxický, neboť se rozkládá na chemicky reaktivní kyanovodík (HCN). Množství sambunigrinu klesá při dozrávání a zralé plody již sambunigrin neobsahují. Sambunigrin je možné rozložit enzymaticky nebo ve slabě kyselém pH, čímž tepelná úprava bezu černého nepůsobí žádné potíže. Oproti tomu nejvíce bioaktivní složky, jako jsou anthokyany, jsou relativně nestálé a rozkládají se při zahřívání. Tepelně zpracované potraviny jsou tedy považovány za méně zdraví prospěšné než korespondující čerstvé analogy. Fialovo-černá barva plodů je způsobena přítomnými anthokyany. Bez černý obsahuje flavonoidy, které mají různé biochemické a farmakologické vlastnosti u kterých byl zjištěn přínos v léčbě chřipky, sinusitidy a bronchitidy. Nicméně nejsou k dispozici dobře provedené klinické studie na lidech, které by tyto benefity potvrdily. V lékopise je uvedena droga *Sambuci nigrae flos* a plody-bezinky jako *Sambuci fructus*. Bez černý se používá také jako přírodní barvivo v průmyslu k zabarvení vína, želé a marmelád (Senica et al., 2016; Silva et al., 2017; Ulbricht et al., 2014; Dodáková et al., 2008; Vlachoianis et al., 2010).

#### 4.4.1 Obsahové látky

Obsah látek v bezu černém závisí na mnoha faktorech: varietě, stupni zralosti a také na environmentálních a klimatických podmínkách. Bez černý je považován za dobrý zdroj proteinu a aminokyselin. Aminokyseliny mohou být volné nebo v konjugované formě. Ze šestnácti v plodech nalezených aminokyselin je 7 exogenní povahy (tělo je není schopno syntetizovat, takže musí být přijímány potravou) a relativně exogenní povahy (tělo je schopno je syntetizovat z ostatních aminokyselin). V plodech a listech je 9 aminokyselin. Lipidy jsou hlavně v semenech, kde podíl oleje byl stanoven na 22,4 %. Přítomny jsou také mastné kyseliny jako je kyselina linolenová, olejová a linolová. Obsah sacharidů v plodech je 18,4 %, z čehož 7,4 % je vláknina (pektin, pektinová kyselina, hemicelulosa). Dále obsahuje cukry (nejčastěji ve formě glukosy a fruktosy), vitamíny (vitamíny skupiny B, A, tokoferoly, vitamín C), minerály (K, Ca, Fe, Mg, P, Na, Zn, Cu, Mn,

Se, Cr, Ni, Cd), organické kyseliny (hlavně kyselina citronová), kyanogenní glykosidy (hlavní zástupce je sambunigrin) a třísloviny. Bez černý obsahuje látky s vysokou biologickou aktivitou; primárně polyfenoly jako flavonoly (kvercetin, kempferol, isorhamnetin, rutin), fenolické kyseliny (deriváty kyseliny kávové, kyselina chlorogenová a ferulová), proanthokyanidiny a již zmíněné anthokyany. Anthokyany bezu černého jsou deriváty odvozené od aglykonu cyanidinu, ostatní anthokyany jsou pouze ve stopovém množství. Přítomné jsou hlavně: cyanidin 3-glukosid (C3G), cyanidin 3-sambubiosid (C3S), cyanidin 3-sambubiosid-5-glukosid (C3S5G), cyanidin 3,5-diglukosid (C3,5-DIG), cyanidin 3-rutinosid (C3R), pelargonidin 3-glukosid (P3G), pelargonidin 3-sambubiosid (P3S) a delphinidin 3-rutinosid (D3R). Přítomnost jednotlivých anthokyanů se může lišit. Dominantním anthokyanem bezu černého je cyanidin 3-glukosid, ale jeho přítomnost závisí na varietě (*Senica et al., 2016; Sidor a Gramza-Michałowska, 2014; Dodáková et al., 2008*).

#### **4.4.2 Biologické účinky**

Konzumace plodů má příznivý vliv na antioxidační aktivitu (zvyšují aktivitu antioxidačních enzymů v krevní plasmě) a schopnost vázat volné radikály. Flavonoid rutin má příznivý efekt na stěnu žil a vlasečnic, kdy zvyšuje jejich odolnost vůči lámavosti. Na pokusech s experimentálními zvířaty byl zjištěn pozitivní vliv na hladinu lipidů v plasmě a snížení rizika obezity (hlavně cyanidin 3-glukosid). Zkoumá se také vliv účinku anthokyanů na diabetes mellitus. Anthokyany mají také antivirovou (chřipka A, B, herpes viry), antibakteriální, antifungální, antialergickou a protizánětlivou aktivitu. Ve formě emulzí byl zaznamenán příznivý efekt jako protekce před UV zářením (*Dodáková et al., 2008; Spilková, 2015; Sidor a Gramza-Michałowska, 2014*).

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Materiál, chemikálie a přístroje

#### 5.1.1 Materiál

- Mikrotitrační destičky (BRAND GMBH + CO KG, Německo)
- Automatické pipety o různém objemu (BRAND GMBH + CO KG, Německo)
- Vícekanálové pipety o různém objemu (Biohit)
- Zkumavky-15ml s uzávěrem (Biofil), Eppendorf zkumavky 1,5ml

#### 5.1.2 Chemikálie

Použité chemikálie kromě výjimek zmíněných v závorce byly získány od výrobce Sigma-Aldrich (Darmstadt, Německo)

- Chlorid železitý hexahdrát  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Síran železnatý heptahdrát  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- DMSO (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Hydroxylamin chlorid (HA;  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ )
- Ferrozine – /sodná sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové kyseliny/
- 96 % ethanol (Penta, Chrudim, Česká Republika)
- Octan sodný ( $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ )
- Kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina (HEPES)
- sodná sůl HEPES
- Destilovaná voda byla připravena za pomoci Milli-Q RG (Merck Millipore, USA).

Měření byla provedena v 15 mM pufrch, kdy acetátové pufrы byly použity pro pH 4.5 a 5.5, zatímco HEPES pufrы pro pH 6.8 a 7.5.

### 5.1.3 Testované extrakty

Všechny extrakty byly připraveny na Katedře farmakognozie. Ve stručnosti: Plody různých variet bezu černého byly získány, pokud není uvedeno jinak, z genebanky Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o., což zahrnovalo:

- 3 variety z Dánska ('Korsør', 'Samdal', 'Samyl')
- 2 variety z Německa ('Riese aus Voßloch', 'Weihestephan')
- 3 variety z Rakouska ('Haschberg', 'Heidegg 13', 'Pregarten')
- 1 varieta ze Slovenska (Dana)
- Varieta Aurea pochází z Ovocné a okrasné školky Litomyšl

Plody byly ručně sklizeny v září roku 2013, kdy došlo ihned ke zmrazení a byly skladovány v polyethylenových sáčcích v mrazícím boxu o teplotě -18 °C. Anthokyany byly extrahovány z plodů 0,5 % kyselinou fosforečnou, extrakt byl sorbován na kolonu pryskyřice, balasty byly vymyty vodou a anthokyany byly získány promytím 95 % ethanolem. Stanovení celkového obsahu anthokyanů v extraktech (Tabulka 1) bylo dosaženo spektrofotometrickou metodou měřením absorbance v různém pH prostředí, kdy se porovnávala plocha pod křivkou extraktů s plochou pod křivkou standardu (cyanidin 3-glukosid), která byla stanovena za stejných podmínek (*Giusti a Wrolstad, 2001; Polášková et al., 2015*). Toto stanovení obsahu bylo poté využito k ředění extraktů v samotném experimentu železo-chelatačních vlastností. Obsah jednotlivých anthokyanů a anthokyanidinů byl také ověřen využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), kdy byly v extraktech identifikovány tyto látky: delphinidin, cyanidin, pelargonidin, malvidin, peonidin, cyanidin 3-glukosid a cyanidin 3,5-diglukosid.

**Tabulka 1 Koncentrace anthokyanů (vyjádřená jako cyanidin 3-glukosid) v extraktu.**  
*Data jsou zobrazena jako průměr ± SD.*

Plody bezu-varieta	C <sub>extraktu</sub> (mg/ml)
'Aurea'	0.52 ± 0.00
'Dana'	0.87 ± 0.09
'Haschberg'	0.67 ± 0.03
'Heidegg 13'	1.39 ± 0.03
'Korsør'	1.09 ± 0.10
'Pregarten'	0.69 ± 0.03
'Riese aus Voßloch'	1.61 ± 0.03
'Samdal'	2.02 ± 0.05
'Saml'	2.12 ± 0.12
'Weihenstephan'	1.35 ± 0.04

#### 5.1.4 Používané přístroje

- Analytické váhy KERN ABT120- 5DM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Třepačka pro zkumavky IKA VORTEX GENIUS 3 (IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA MS 3 digital (IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., USA)

## 5.2 Metody

### 5.2.1 Příprava zásobních roztoků

- Ferrozin (sodná sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové kyseliny,  $M_w=492,5$  g/mol) – 5 mM v destilované vodě)
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $M_w=278,02$  g/mol) – 5mM v destilované vodě – zásobní roztok  $\text{Fe}^{2+}$ , na pracovní roztok (250 $\mu\text{M}$ ) naředěno opět destilovanou vodou
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $M_w=270,3$  g/mol) - 5mM v destilované vodě – zásobní roztok  $\text{Fe}^{3+}$ , na pracovní roztok (250 $\mu\text{M}$ ) naředěn vždy čerstvý destilovanou vodou těsně před pipetováním do destičky
- HA ( $M_w=69,49$  g/mol) – 10 mM v destilované vodě
- Roztoky testovaných látek – ethanolické extrakty různých variet bezu černého byly zředěny 96 % ethanolom na koncentrace (0,1; 0,05; 0,01; 0,005 a 0,001 mg/ml)

### 5.2.2 Zkouška pro $\text{Fe}^{2+}$ ionty

Dle standardního operačního postupu byla provedena kontrola pro železnaté ionty. Do 2 jamek mikrotitrační destičky se napipetovalo 100  $\mu\text{l}$  DMSO, 50  $\mu\text{l}$  připraveného zásobního roztoku železnatých iontů (250  $\mu\text{M}$ ) a 50  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku ferrozinu (5 mM). Absorbance byla měřena ihned při vlnové délce 562 nm. Pokud se hodnoty absorbance pohybovaly v rozmezí  $1.0 \pm 0.05$ ; roztok vyhovoval a byl použit k dalšímu měření.

### 5.2.3 Zkouška pro $\text{Fe}^{3+}$ ionty

Dle standardního operačního postupu byla provedena kontrola pro železitě ionty. Do 2 jamek mikrotitrační destičky se napipetovalo 100  $\mu\text{l}$  DMSO, 50  $\mu\text{l}$  připraveného zásobního roztoku železitých iontů (250  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{l}$  hydroxylaminu (10 mM) a přidá se 50  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku ferrozinu (5 mM). Absorbance byla měřena

ihned při vlnové délce 562 nm. Pokud se hodnoty absorbance pohybovaly v rozmezí  $1.0 \pm 0.1$ ; roztok vyhovoval a byl použit k dalšímu měření.

#### 5.2.4 Kalibrace $\text{Fe}^{2+}$ iontů

Před zahájením kalibrace byly ze zásobního roztoku  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5 mM) připraveny vodné roztoky železnatých solí o koncentracích 75, 150, 250, 500 a 750  $\mu\text{M}$ .

Vlastní experiment (viz Tabulka 2): Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  destilované vody. Poté byla přidána **žádaná koncentrace železnatých iontů v objemu 50  $\mu\text{l}$**  (pro  $c=0$  bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  destilované vody). V dalším kroku se přidalo 50  $\mu\text{l}$  ferrozínového roztoku do poloviny jamek (x), zatímco do druhé poloviny jamek bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  destilované vody (x). Absorbance byla změřena při vlnové délce 562 nm.

Z naměřených hodnot byla poté sestrojena kalibrační křivka (viz kapitola Výsledky – kalibrační křivka).

**Tabulka 2 Schéma rozložení na mikrotitrační destičce při měření kalibrační křivky  $\text{Fe}^{2+}$  iontů**

	kontrola - přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 0 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 75 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 150 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 250 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 500 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 750 \mu\text{M}$
ferrozin	x	x	x	x	x	x
slepé vzorky	x	x	x	x	x	x

#### 5.2.5 Absorpční spektra

Nejdříve byla proměřena absorpční spektra extraktů v rozsahu vlnových délek 300-800 nm. Do 2 jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o požadovaném pH (4.5, 5.5, 6.8). Poté bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku jednotlivých extraktů o



koncentraci 0,1 mg/ml. Dále bylo přidáno do jedné jamky 50  $\mu$ l roztoku železnaté soli o koncentraci 250  $\mu$ l, zatímco do druhé jamky byla přidána voda jako slepý vzorek. Postup při měření absorpčního spektra při pH 7.5 byl stejný jako předchozí, ale navíc se provedlo další měření, kdy se před přidáním roztoku železnaté soli či vody přidalo 50  $\mu$ l HA o koncentraci 10 mM, aby se zabránilo oxidaci železnatých iontů. Posledním krokem bylo měření spektra ve spektrofotometru.

### 5.2.6 Chelatace $\text{Fe}^{2+}$ iontů (Tabulka 3)

Extrakt byly smíchány s železnatými ionty v různých poměrech za různých podmínek (pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5).

**Postup v prostředí o pH 4.5, 5.5, 6.8 (verze A) nebo v prostředí o pH 7.5 (verze B):** Na mikrotitrační destičku bylo do všech určených jamek napipetováno 150  $\mu$ l pufru o pH 4.5, 5.5, 6.8 (verze A) nebo o pH 7.5 (verze B). Do testovaných jamek bylo přidáno 50  $\mu$ l extraktu o žádané koncentraci. Do kontrolních jamek bylo přidáno stejné množství rozpouštědla (ethanolu), koncentrace extraktu je zde tedy nulová. Ve verzi B bylo přidáno do všech určených jamek 50  $\mu$ l HA (10 mM). Poté bylo do všech určených jamek přidáno 50  $\mu$ l roztoku železnaté soli o koncentraci 250  $\mu$ M. Destička byla přikryta a vložena do třepačky po dobu 2 minut. Po protřepání bylo důležité zkontrolovat možné vzniklé bubliny. Pokud vznikly, bylo nutné je pipetou odstranit. V další fázi bylo přidáno do jedné poloviny jamek 50  $\mu$ l ferrozínového roztoku o koncentraci 5mM a do druhé poloviny jamek 50  $\mu$ l destilované vody (slepé vzorky). Absorbance byla ihned změřena při vlnové délce 562 nm. Po 5 minutách se měření absorbance opakovalo při vlnové délce 562 nm.

**Tabulka 3 Schéma rozložení na mikrotitrační destičce při měření chelatace  $Fe^{2+}$  iontů.**  
 Zelená barva značí testovací jamky s chelátorem, modrá barva kontrolní jamky s rozpouštědlem, **F** jamku s ferrozinem a **V** jamku s destilovanou vodou.

Koncentrace chelátoru	0,1 mg/ml	0,05 mg/ml	0,01 mg/ml	0,005 mg/ml	0,001 mg/ml	Kontrola – ethanol
Ferrozine – testované vzorky	F	F	F	F	F	F
	F	F	F	F	F	F
Voda – slepé vzorky	V	V	V	V	V	V
	V	V	V	V	V	V

## 5.2.7 Chelatace celkového železa při pH 4.5

Extrakty byly smíchány s železitými ionty v různých poměrech v prostředí o pH 4.5. K redukci železitých iontů na železnaté se použil roztok HA.

### 5.2.7.1 Postup

Na mikrotitrační destičku bylo do všech určených jamek napipetováno 150  $\mu$ l pufru o pH 4.5. Do testovaných jamek bylo přidáno 50  $\mu$ l extraktu o žádané koncentraci. Do kontrolních jamek bylo přidáno stejné množství rozpouštědla. Poté byl připraven ze základního roztoku čerstvý 250  $\mu$ M roztok železité soli, který byl přidán v objemu 50  $\mu$ l do všech určených jamek. Destička byla přikryta a vložena do třepačky po dobu 2 minut. Dále bylo do všech jamek přidáno 50  $\mu$ l HA a destička byla vložena do třepačky na 1 minutu. V další fázi bylo přidáno do jedné poloviny jamek 50  $\mu$ l ferrozínového roztoku o koncentraci 5 mM a do druhé poloviny jamek 50  $\mu$ l destilované vody (slepé vzorky). Absorbance byla ihned změřena při vlnové délce 562 nm. Po 5 minutách se měření absorbance opakovalo při vlnové délce 562 nm.

### 5.2.8 Výpočet chelatační aktivity

Chelatační aktivita byla vypočítána z naměřených hodnot absorbancí.

Procento chelatovaného železa (%) se vypočítalo jako 100 % - podíl rozdílu absorbancí vzorků s extraktem ( $\Delta A$ ) a průměru absorbancí při nulové koncentraci chelátoru ( $\Delta_0$ , chelatace je zde 0 %) (**Rovnice 1**).

Rozdíl absorbancí ( $\Delta A$ ) se získal, když se od absorbance směsi s ferrozinem ( $A_f$ ) odečetl průměr absorbancí slepého vzorku ( $A_{V1}$ ,  $A_{V2}$ ), kde byla místo ferrozinu přidána voda. (**Rovnice 2**). *Analogický postup byl použit pro  $\Delta_0$ .*

$$(1) \% = (1 - (\Delta A / \Delta_0)) * 100$$

$$(2) \Delta A = A_f - \frac{1}{2} (A_{V1} + A_{V2})$$

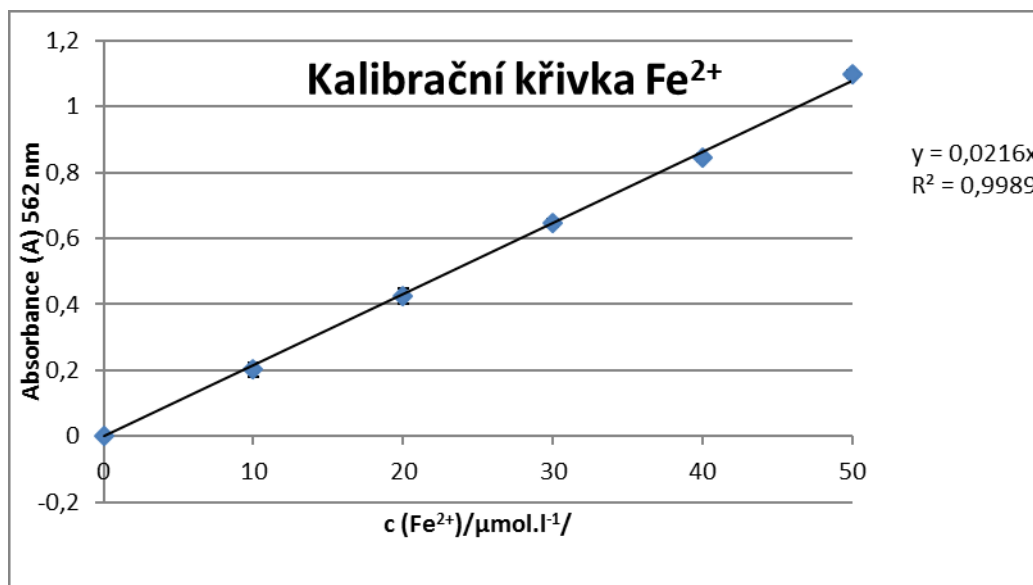
### 5.2.9 Statistická analýza

Výpočty byly provedeny v programu MS EXCEL. Grafy zobrazující chelatační účinnost jednotlivých extraktů v různých pH prostředích byly vytvořeny za použití programu GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, USA). Pro porovnání chelatační účinnosti jednotlivých extraktů byla nejdříve zjištěna matematická závislost mezi množstvím chelatovaného kovu a cyanidinu v extraktu metodou lineární regrese a pro porovnání pak využit test ANOVA s Tukey mnohonásobným porovnávacím testem. Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1 Kalibrační křivka železnatých iontů

Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka železnatých iontů (Obr. 7), ze které je patrná velmi dobrá lineární závislost ( $R^2 = 0,9989$ ) mezi koncentrací železnatých iontů  $c(\text{Fe}^{2+})$  a absorbancí při vlnové délce 562 nm (A).



Obrázek 7 Kalibrační křivka železnatých iontů

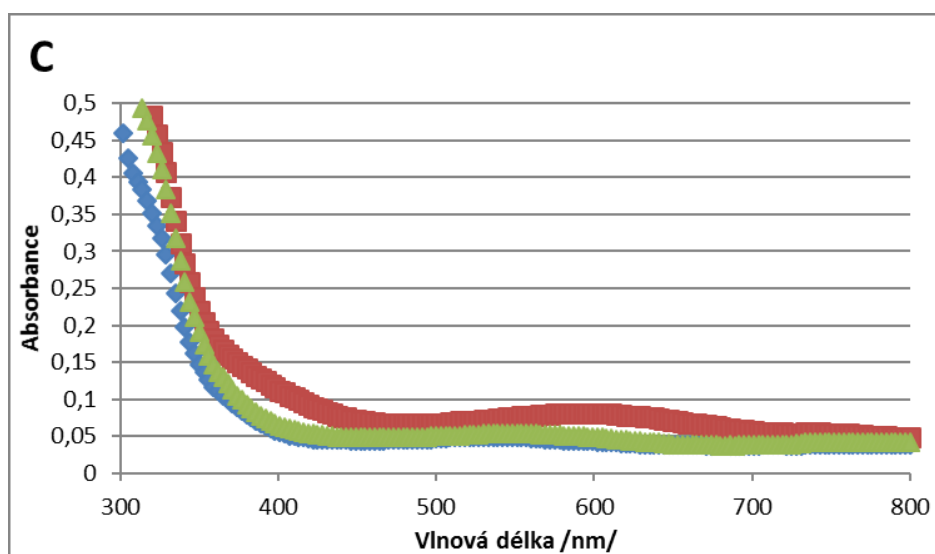
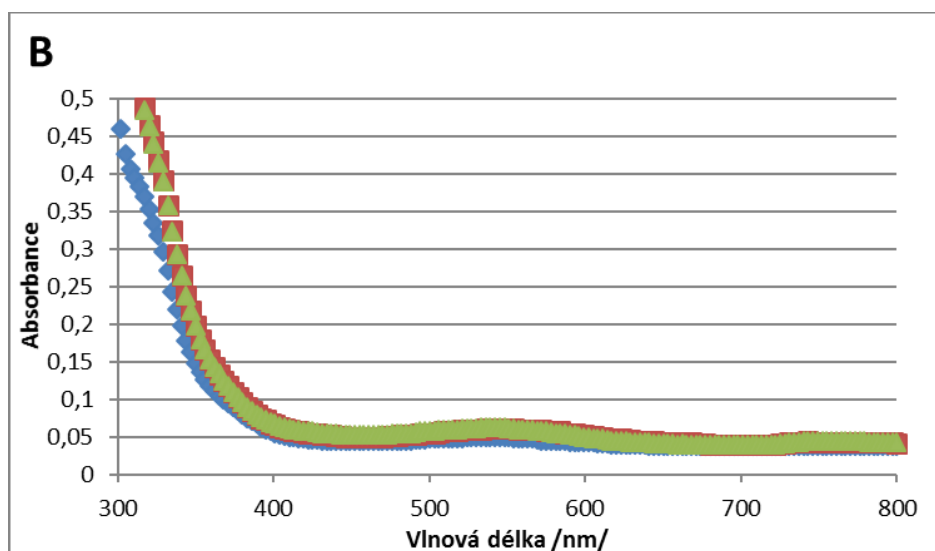
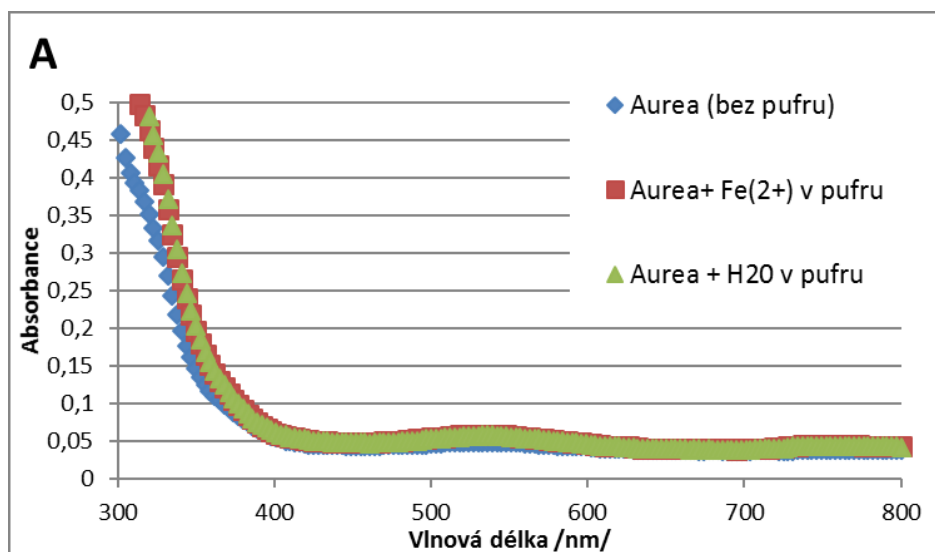
### 6.2 Absorpční spektra testovaných extraktů

Vzhledem k plánovanému typu stanovení chelatačních schopností daných látek, bylo nejdříve nutné proměřit spektra extraktů, aby bylo zamezeno interferenci se spektrofotometrickým stanovením. Ve všech případech byla finální koncentrace testovaných extraktů 0.02 mg/ml a iontů železa 50  $\mu\text{M}$ . Pro porovnání je vždy zobrazeno i spektrum extraktu bez přídavku pufru. Při pH 7.5 bylo porovnání spekter i v přítomnosti nebo absenci HA (ve finální koncentraci 50  $\mu\text{l}$ ). Následující obrázky (Obr. 8-27) ukazují vždy porovnání spektra extraktu bez a s železnatými ionty.

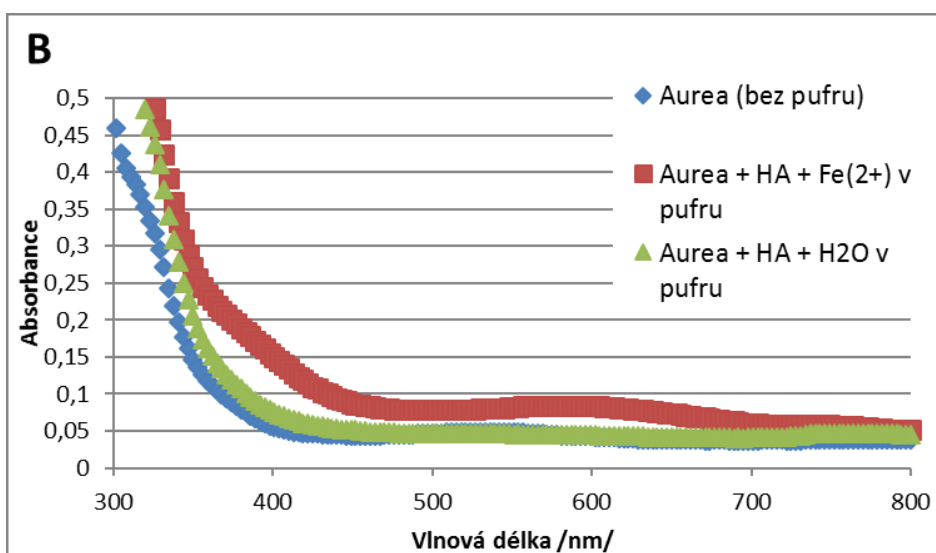
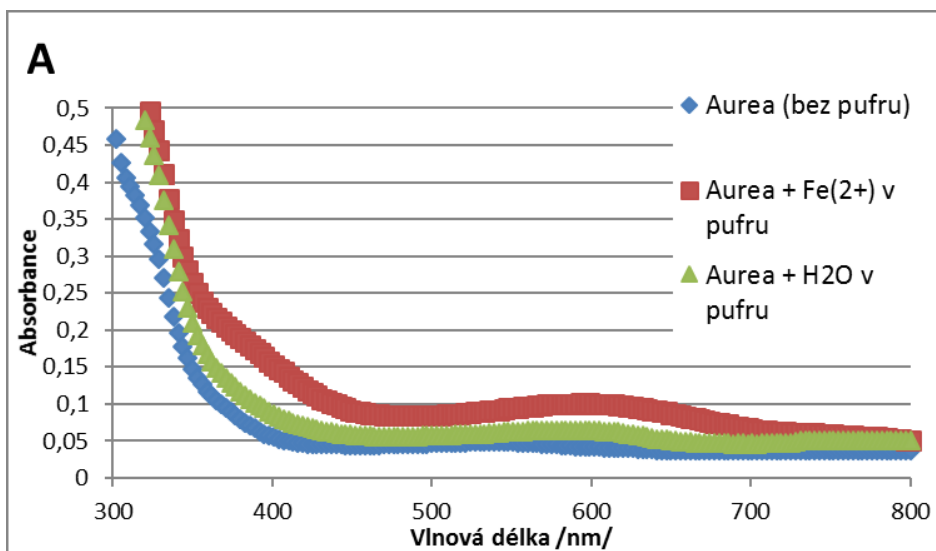
Experimenty ukázaly, že při pH 4.5 a 5.5 se komplex téměř netvoří (Obr. 8A,B; 10 A,B; 12 A,B; 14 A,B; 16 A,B; 18 A,B; 20 A,B; 22 A,B; 24 A,B, 26 A,B). Je známo, že chelatace, na které se podílí katecholický kruh B, je výrazná hlavně v neutrálním prostředí pH 6.8 a 7.5 (Mladěnka et al., 2010).

V souladu s tímto předpokladem můžeme i v našich výsledcích pozorovat posun absorpčního maxima extraktu z důvodu tvorby komplexu s železnatými ionty (Obr. 8C, 9A, 10C, 11A, 12C, 13A, 14C, 15A, 16C, 17A, 18C, 19A, 20C, 21A, 22C, 23A, 24C, 25A, 26C, 27A). Přídavek HA v pH 7.5 částečně snížil tvorbu komplexu (Obr. 9B, 11B, 13B, 15B, 17B, 19B, 21B, 23B, 25B, 27B).

### 6.2.1 Absorpční spektra 'Aurea'

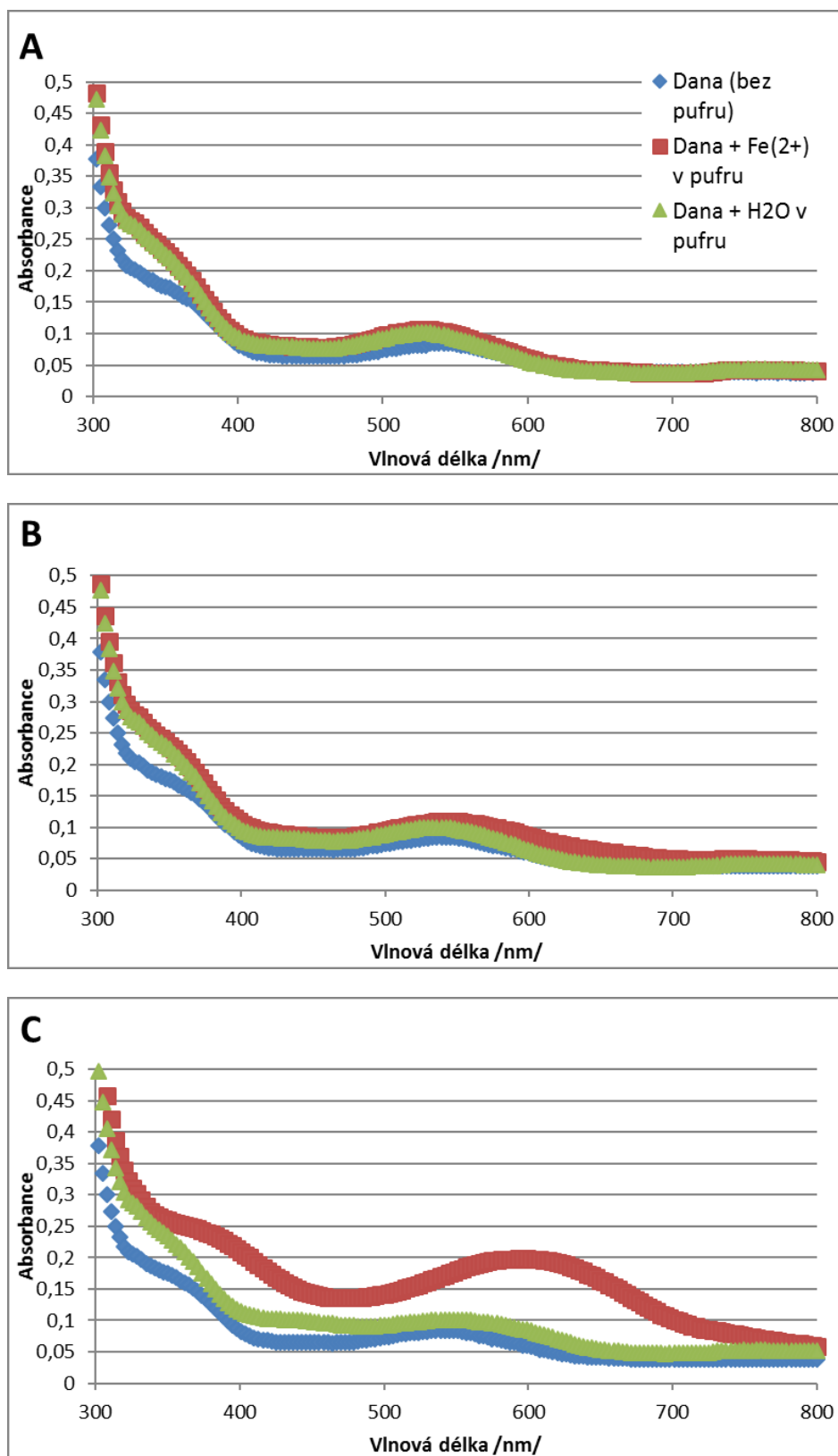


**Obrázek 8** Absorpční spektra extraktu 'Aurea' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)



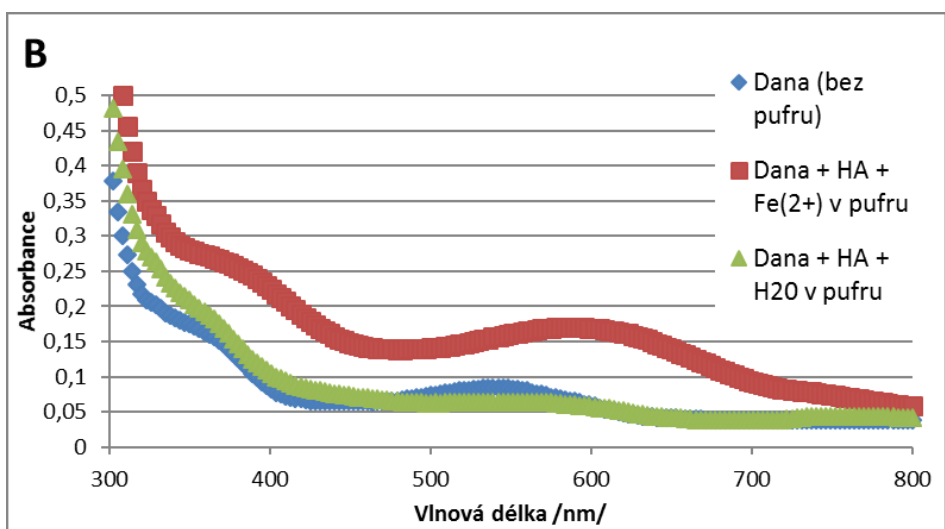
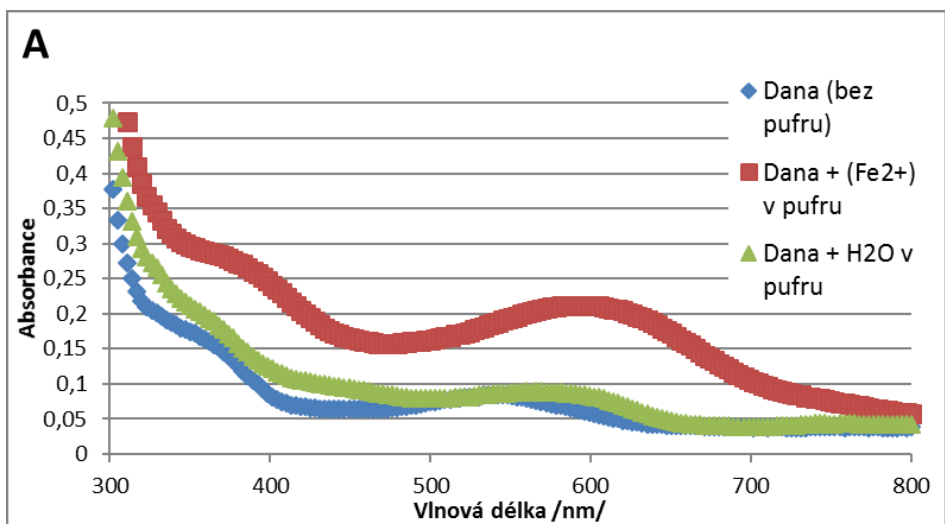
**Obrázek 9** Absorpční spektra extraktu 'Aurea' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

## 6.2.2 Absorpční spektra 'Dana'



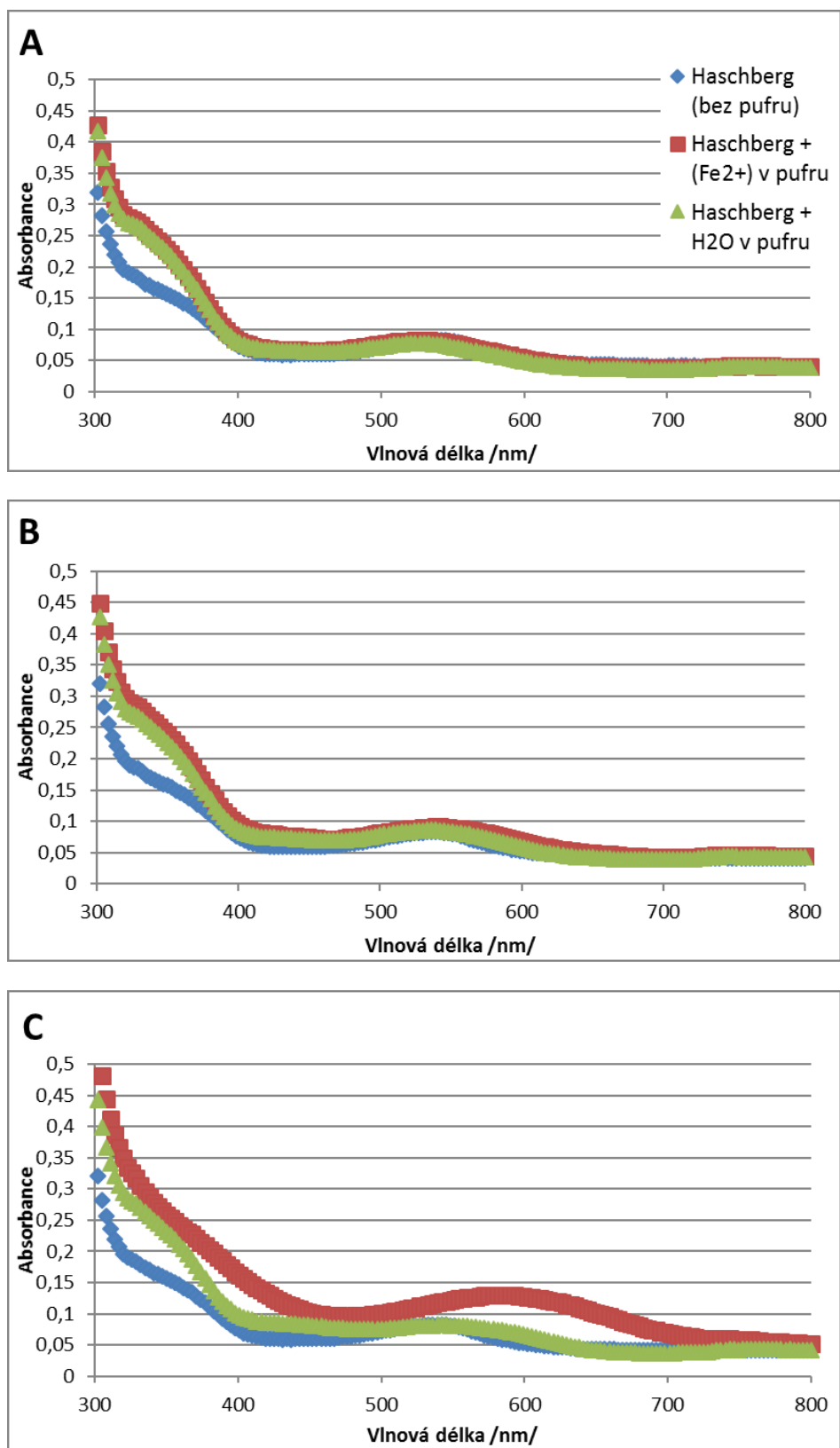
Obrázek 10 Absorpční spektra extraktu 'Dana' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)



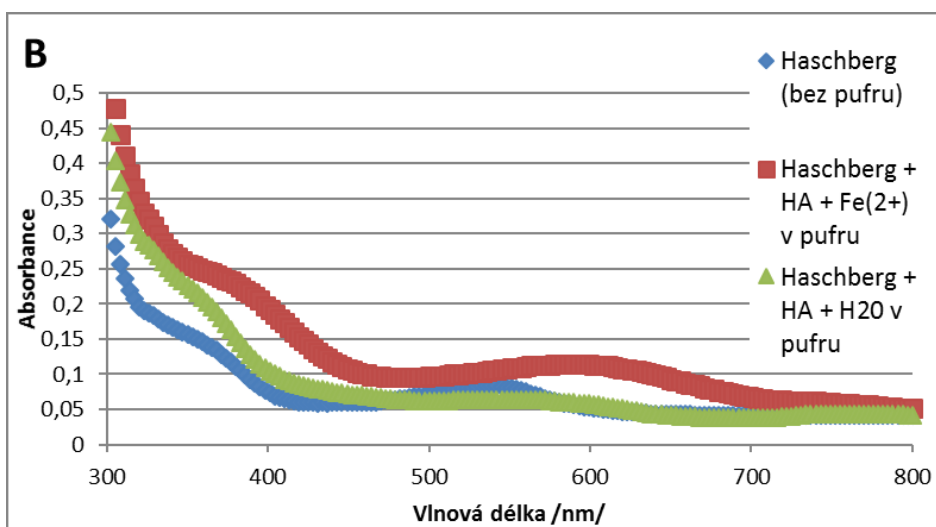
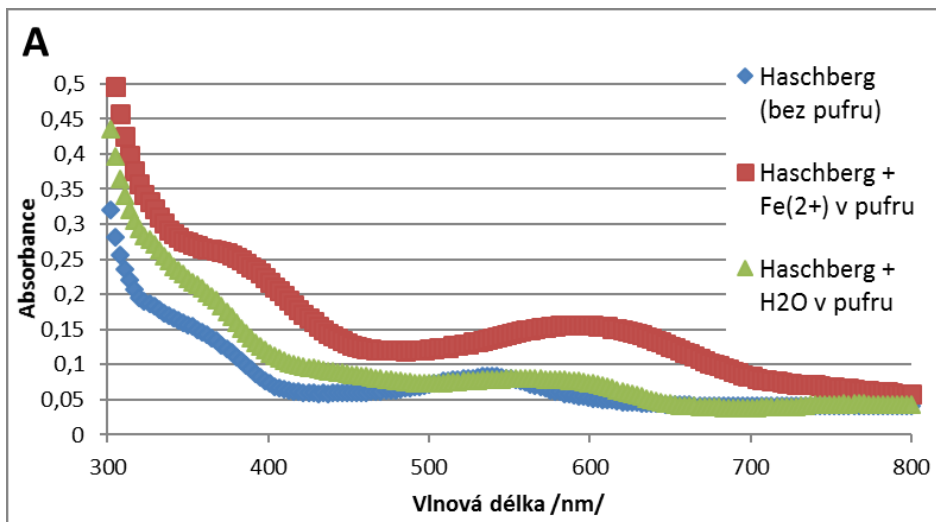


**Obrázek 11** Absorpční spektra extraktu 'Dana' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

### 6.2.3 Absorpční spektra 'Haschberg'

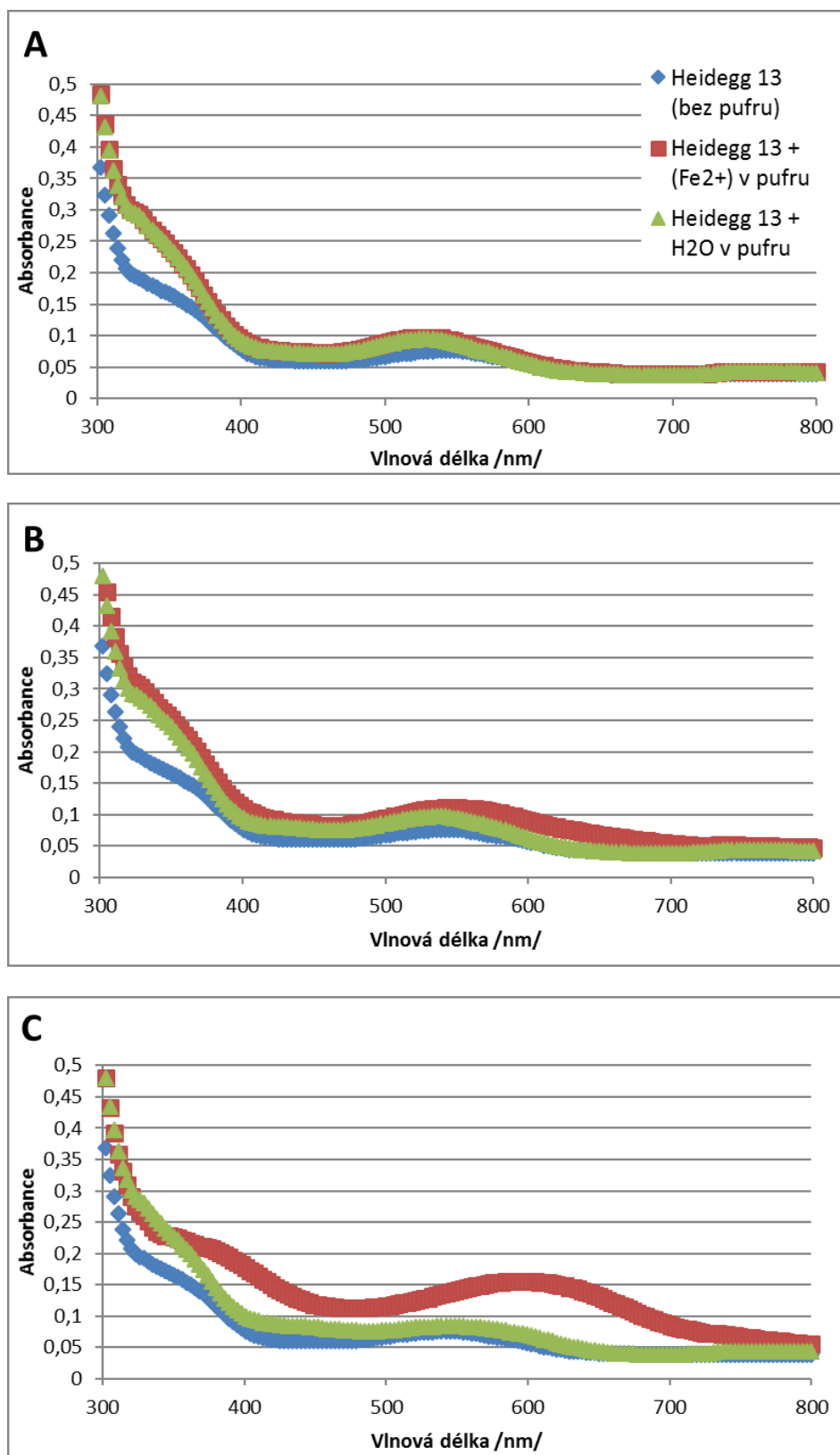


Obrázek 12 Absorpční spektra extraktu 'Haschberg' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)

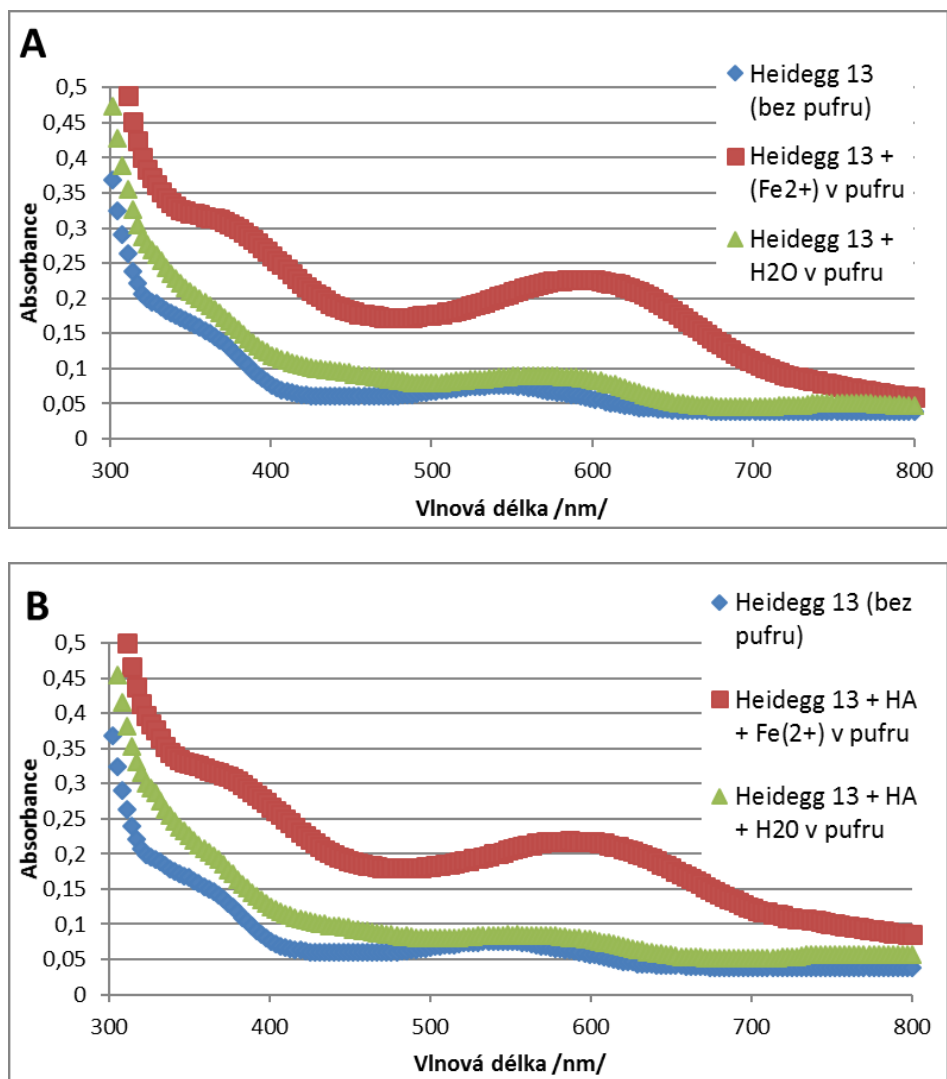


**Obrázek 13** Absorpční spektra extraktu 'Haschberg' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

## 6.2.4 Absorpční spektra 'Heidegg 13'

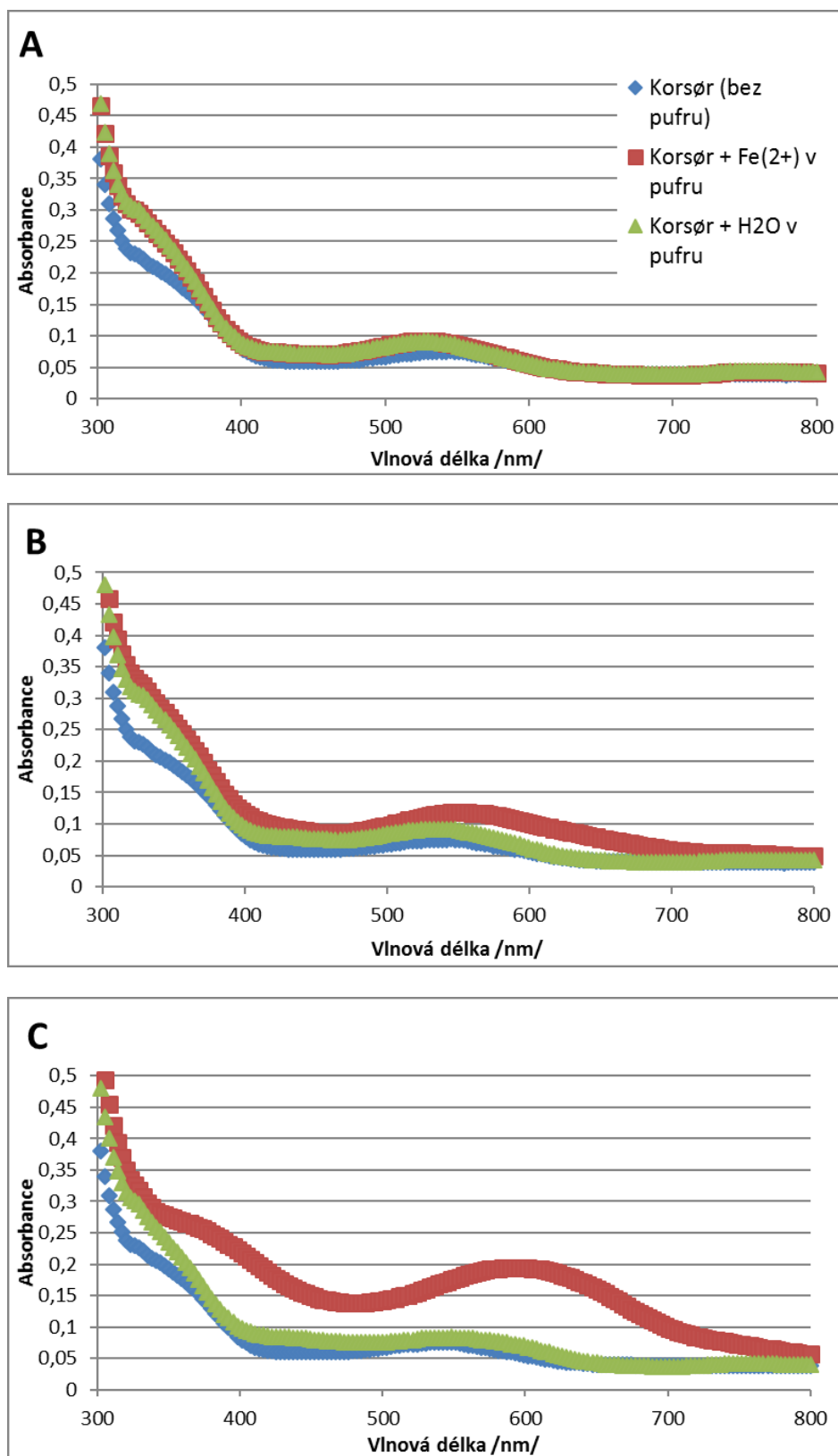


Obrázek 14 Absorpční spektra extraktu 'Heidegg 13' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)

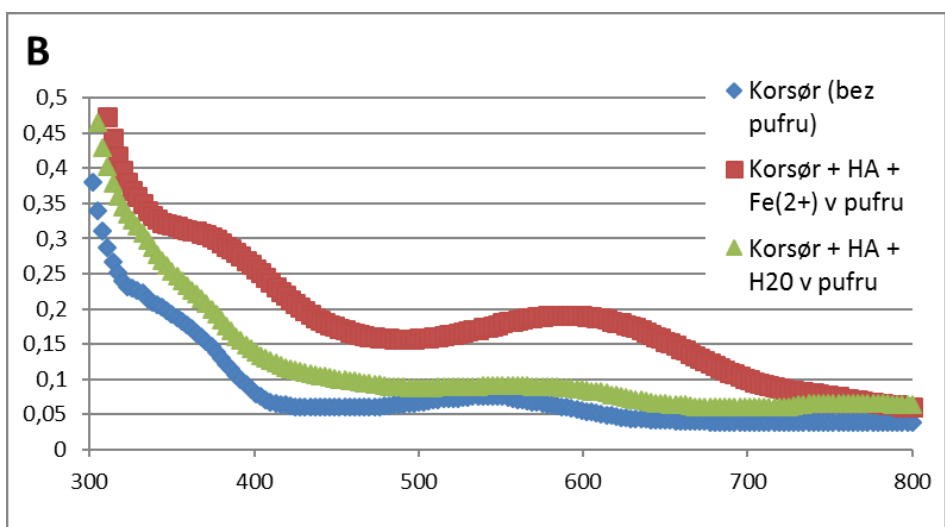
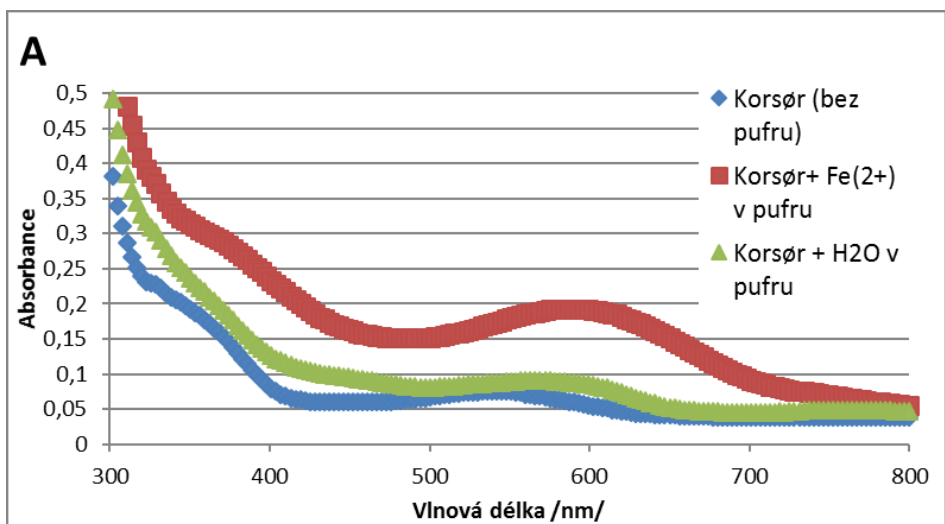


**Obrázek 15** Absorpční spektra extraktu 'Heidegg 13' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

## 6.2.5 Absorpční spektra 'Korsør'

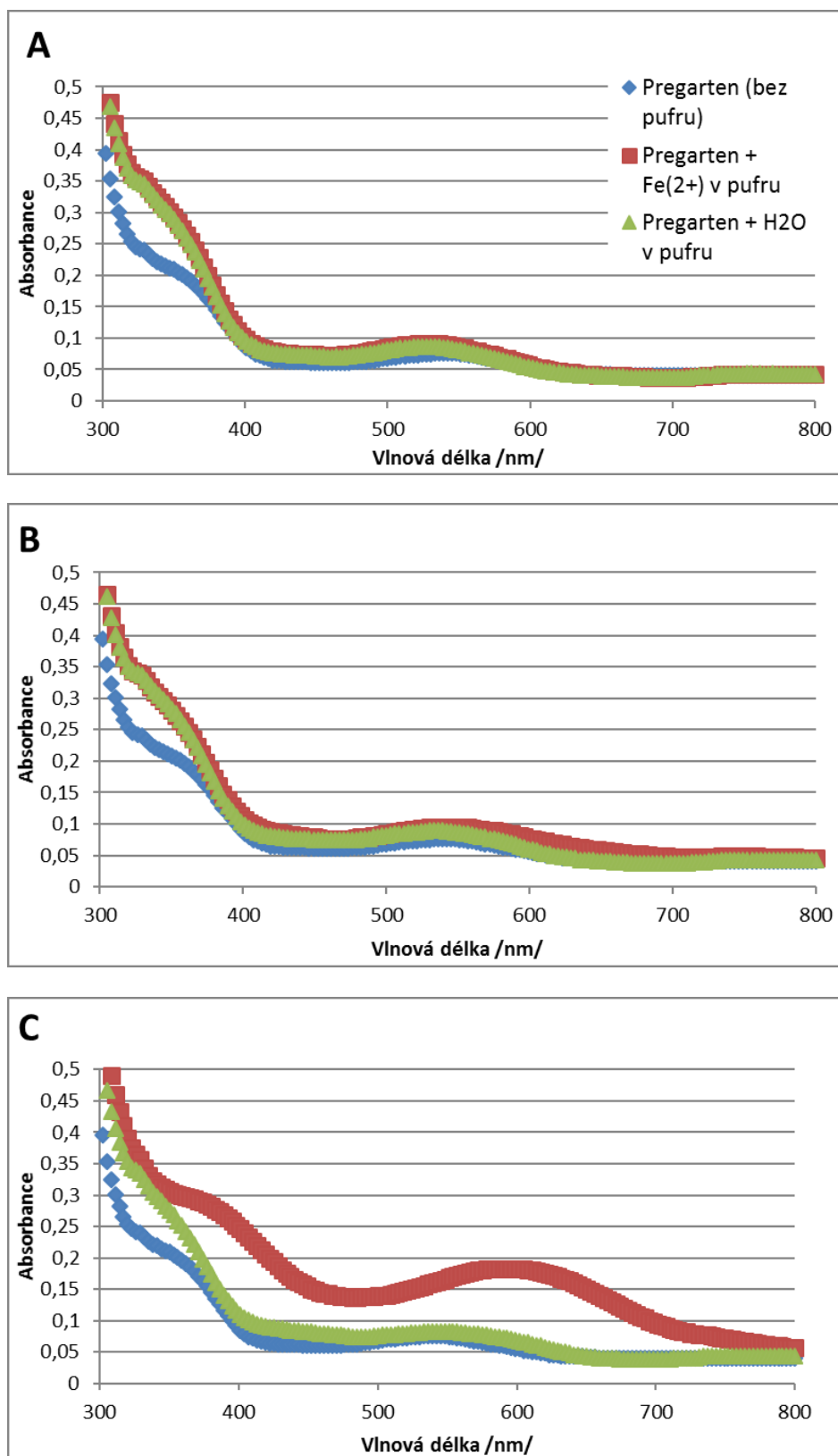


Obrázek 16 Absorpční spektra extraktu 'Korsør' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)



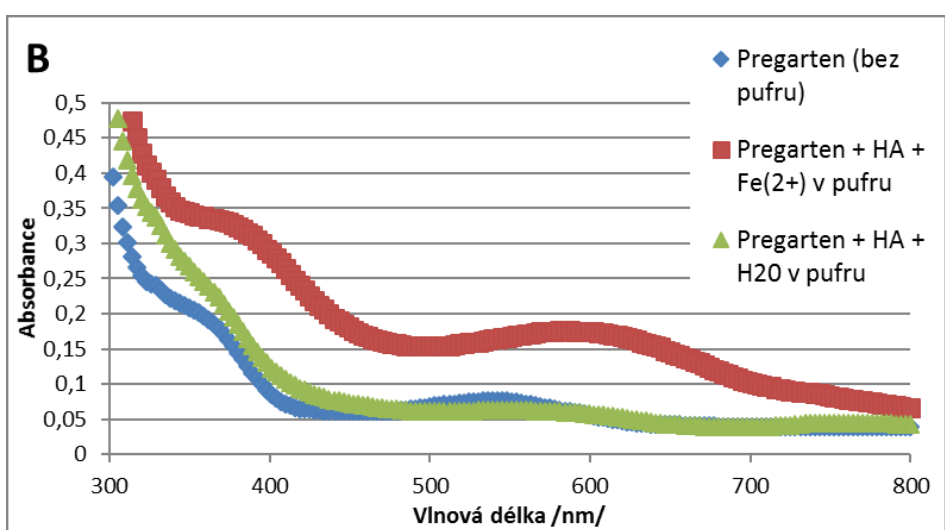
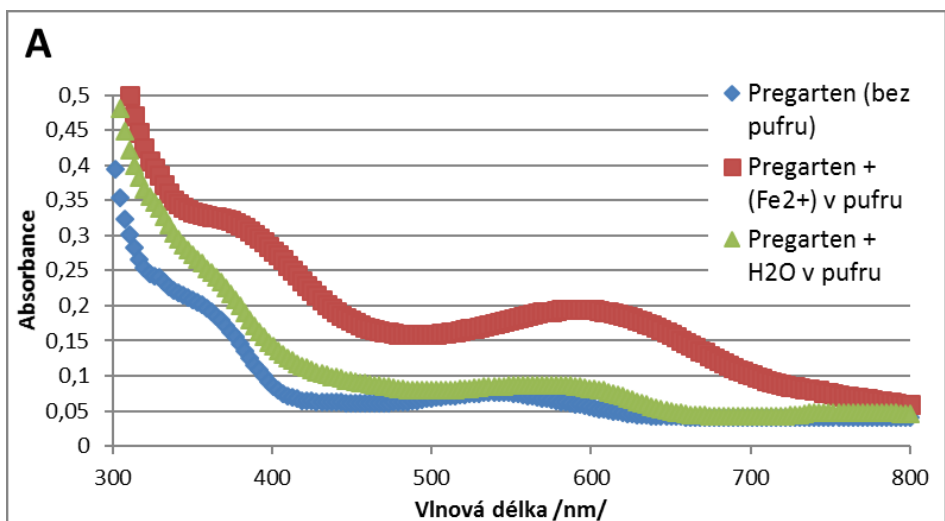
**Obrázek 17** Absorpční spektra extraktu 'Korsør' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

## 6.2.6 Absorpční spektra 'Pregarten'



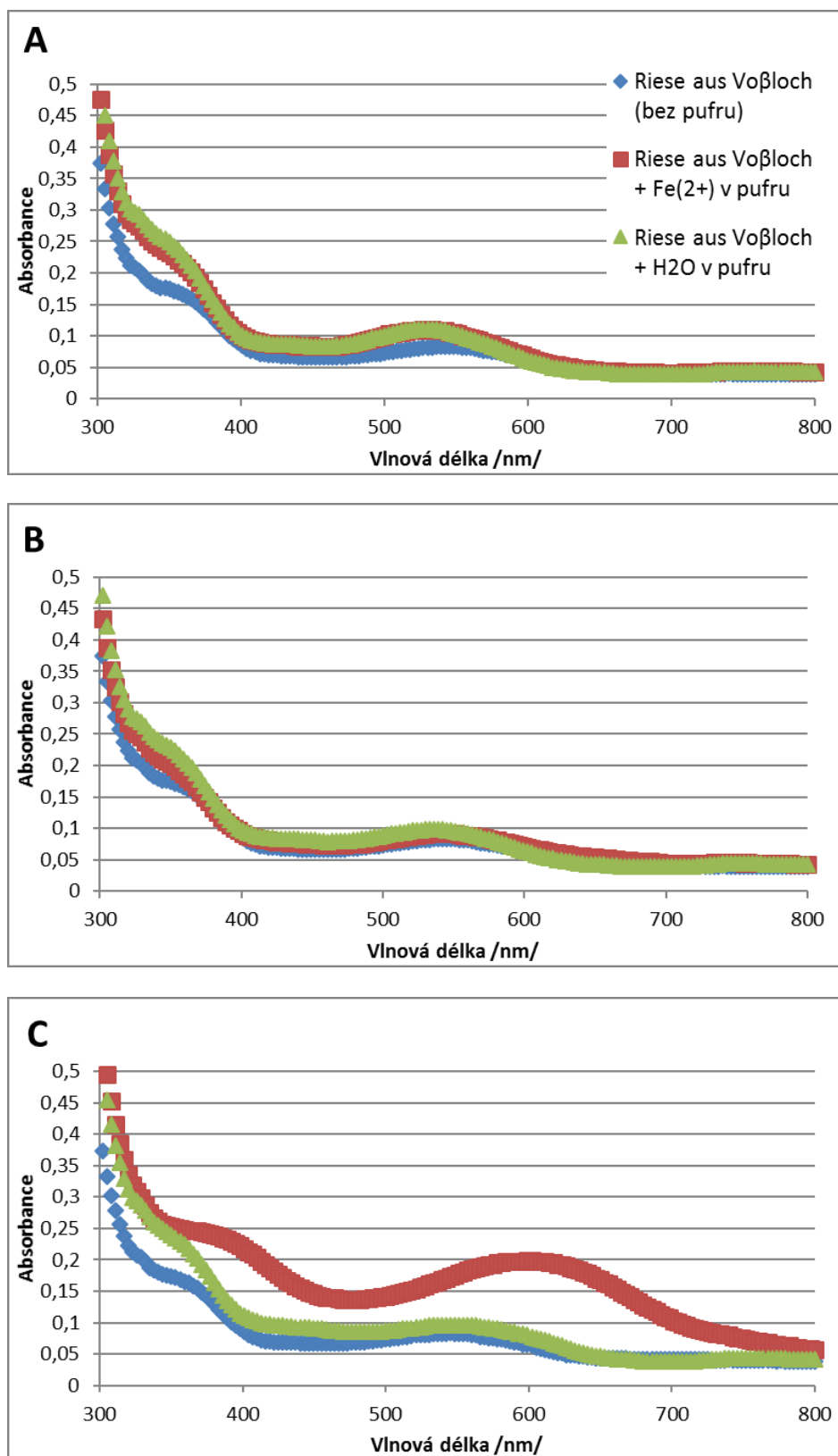
Obrázek 18 Absorpční spektra extraktu 'Pregarten' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)



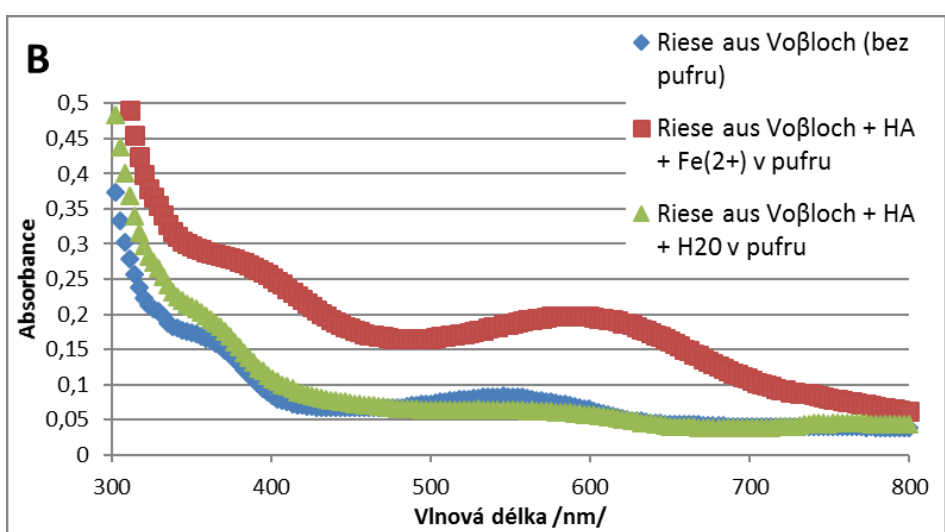
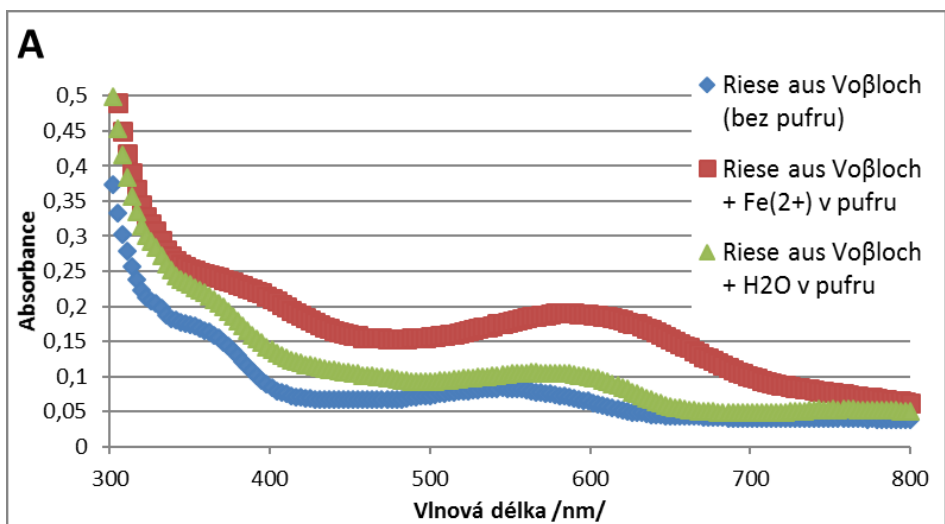


**Obrázek 19** Absorpční spektra extraktu 'Pregarten' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

## 6.2.7 Absorpční spektra 'Riese aus Voßloch'

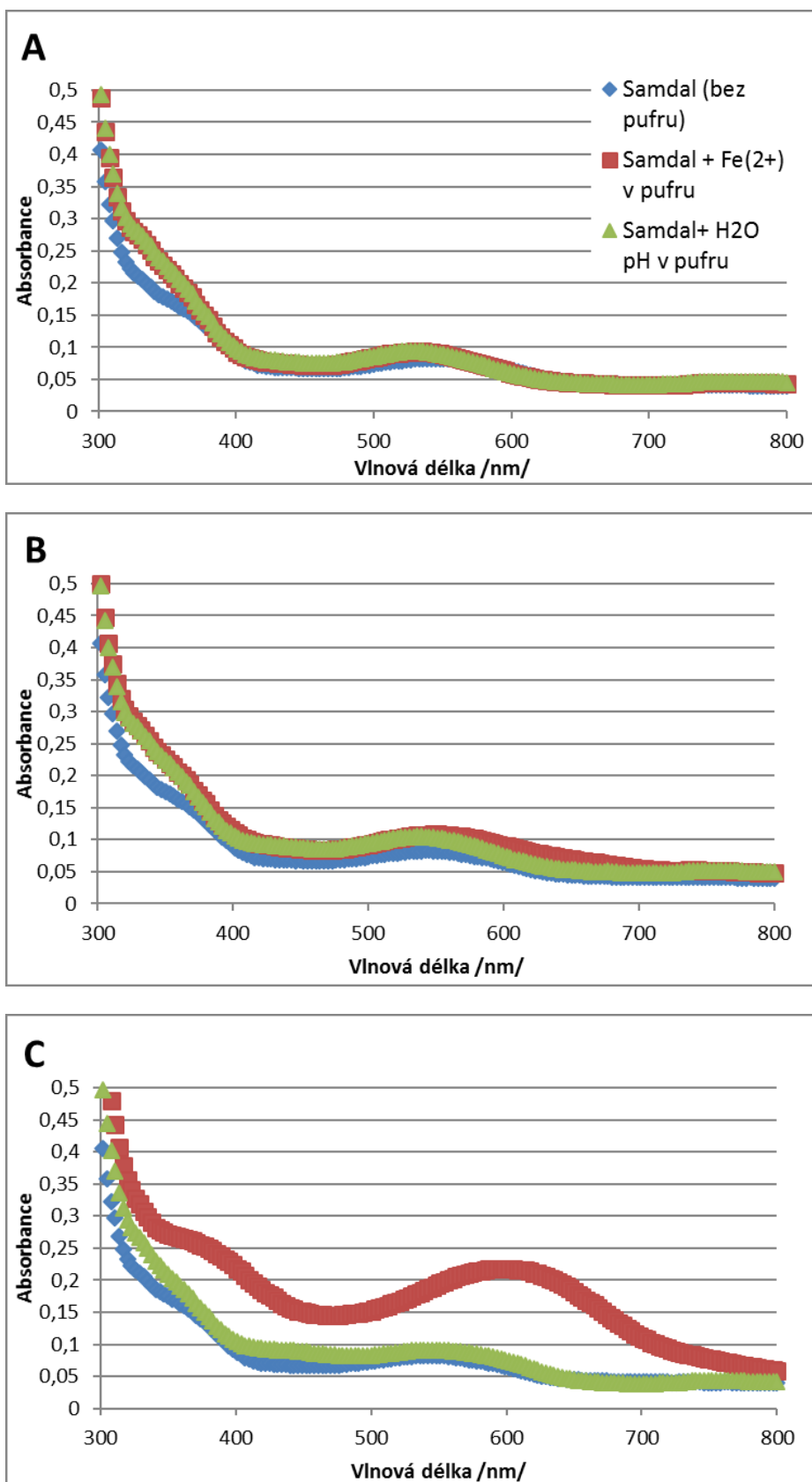


Obrázek 20 Absorpční spektra extraktu 'Riese aus Voßloch' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)

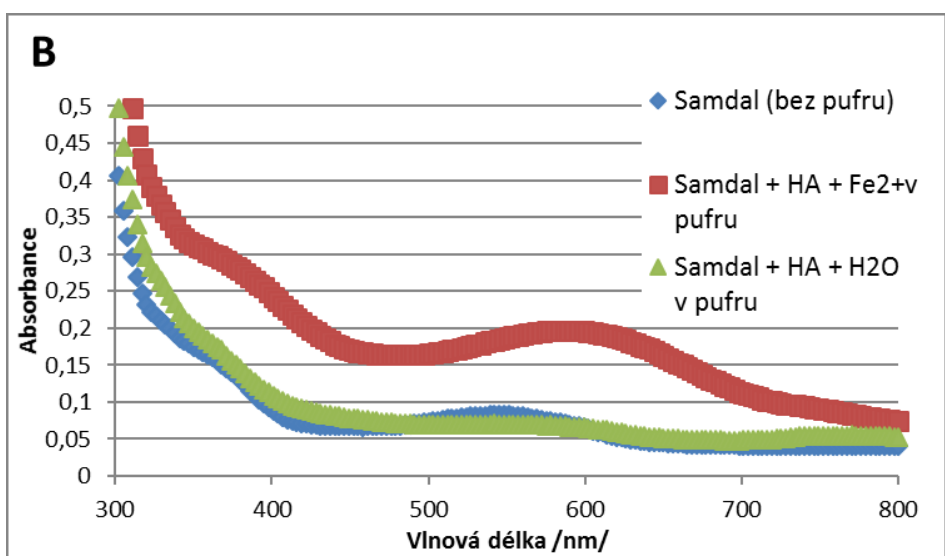
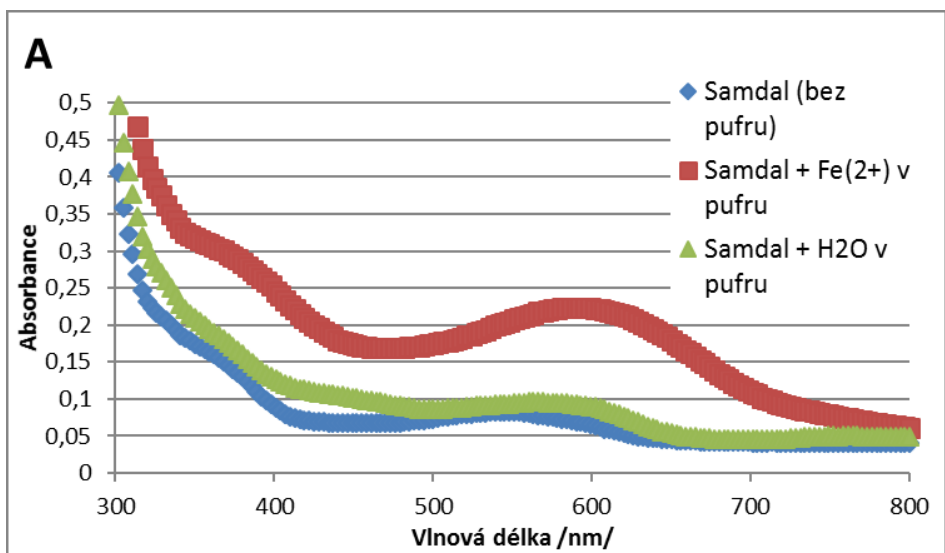


**Obrázek 21** Absorpční spektra extraktu 'Riese aus Voßloch' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

## 6.2.8 Absorpční spektra 'Samdal'

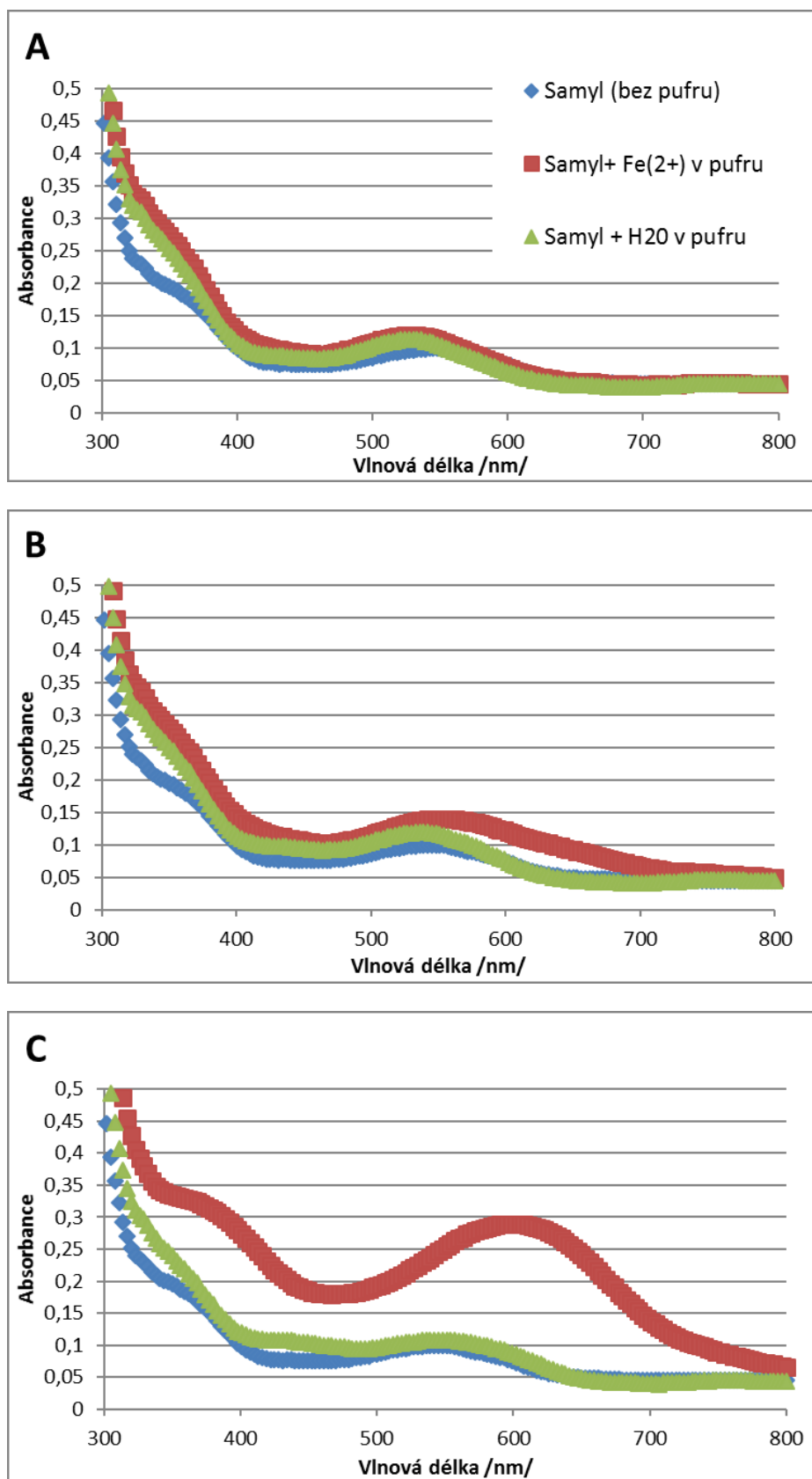


Obrázek 22 Absorpční spektra extraktu 'Samdal' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)

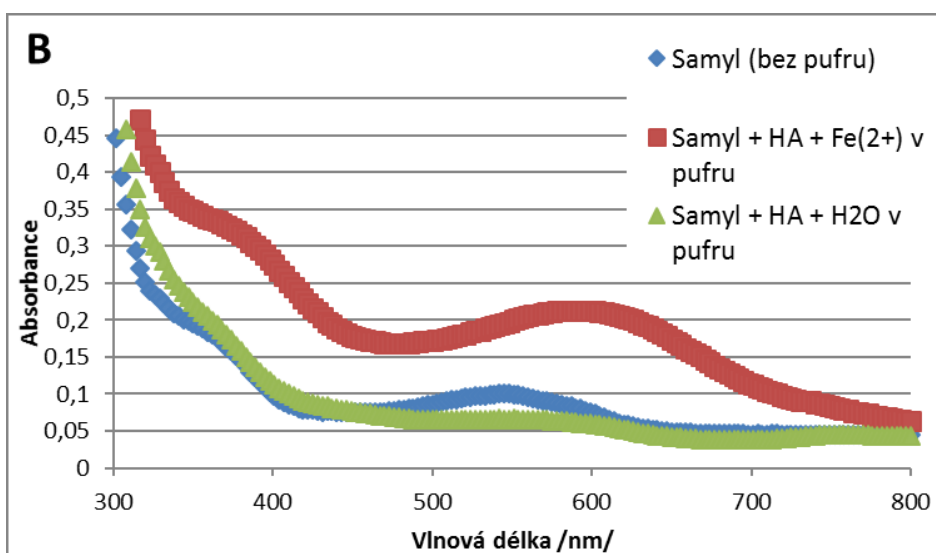
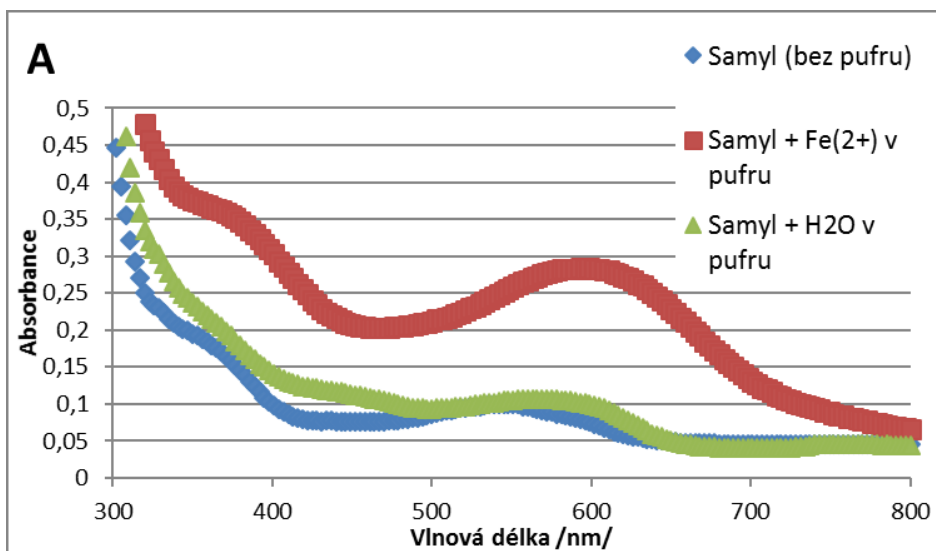


**Obrázek 23** Absorpční spektra extraktu 'Samdal' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

## 6.2.9 Absorpční spektra 'Samyl'

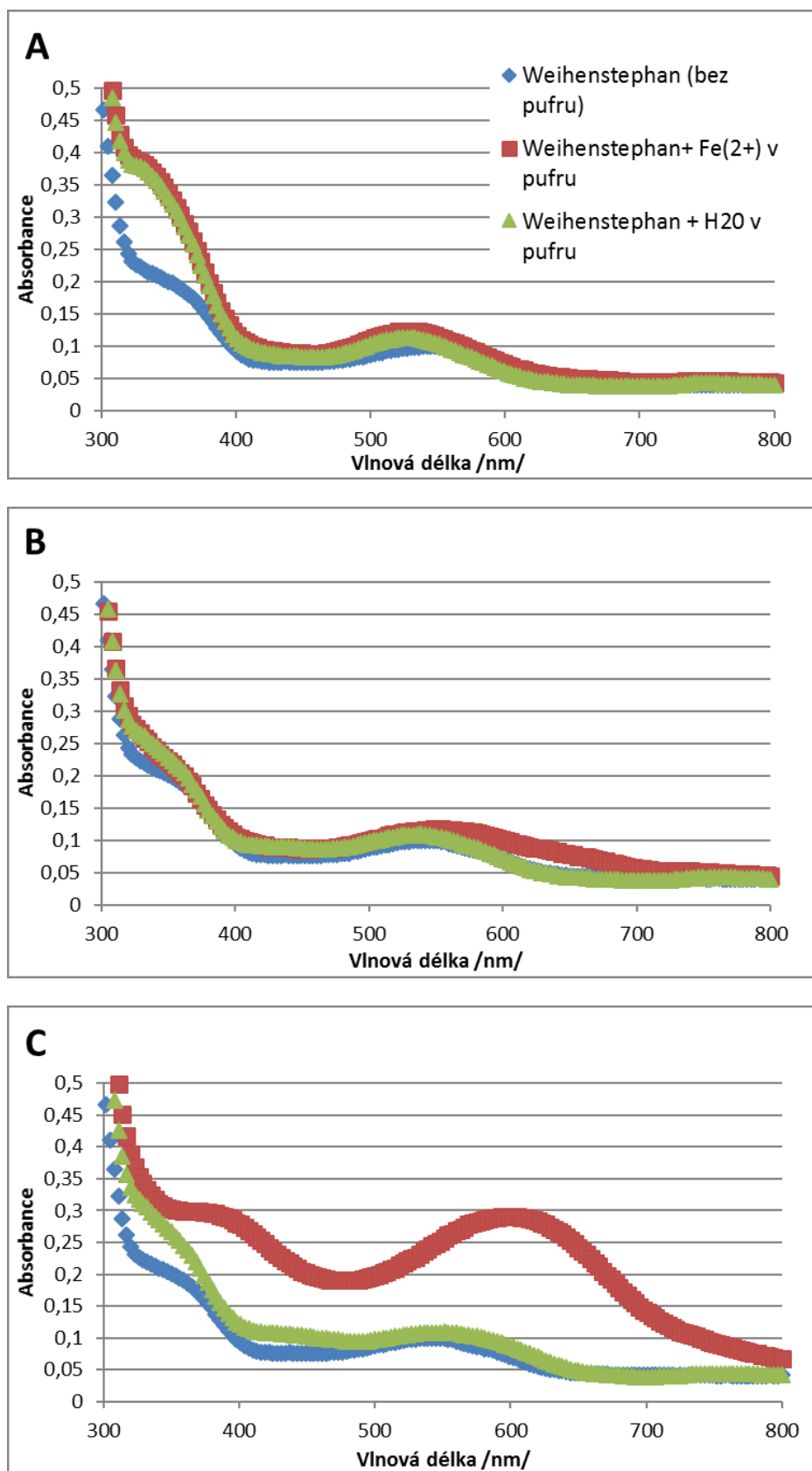


Obrázek 24 Absorpční spektra extraktu 'Samyl' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)



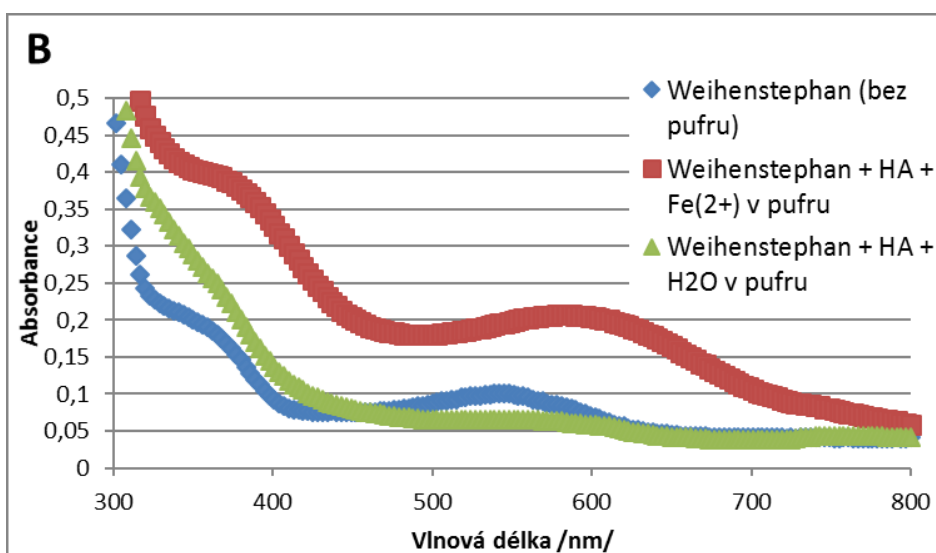
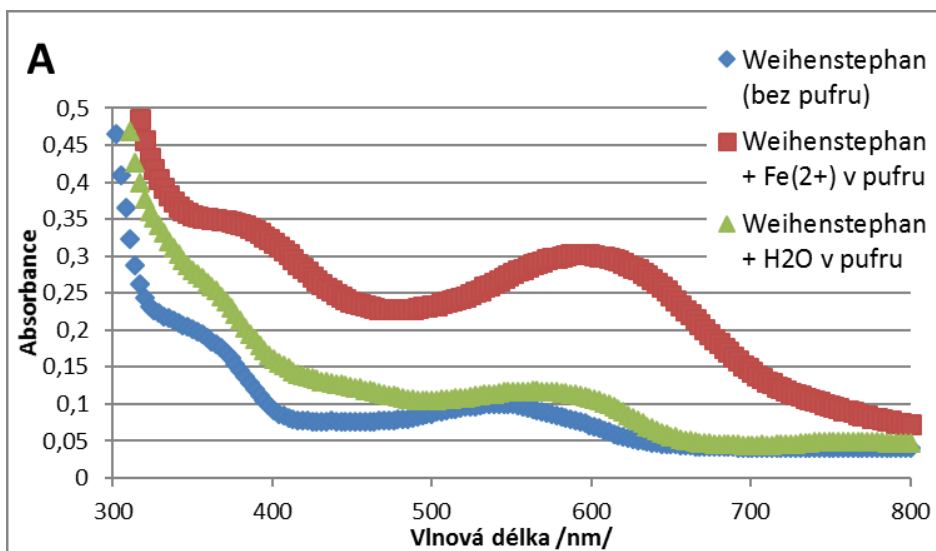
**Obrázek 25** Absorpční spektra extraktu 'Samyl' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

## 6.2.10 Absorpční spektra 'Weihenstephan'



Obrázek 26 Absorpční spektra extraktu 'Weihenstephan' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)





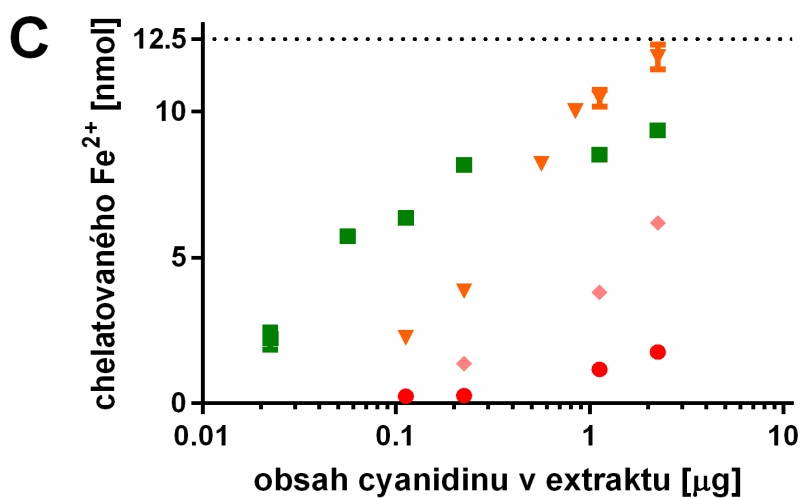
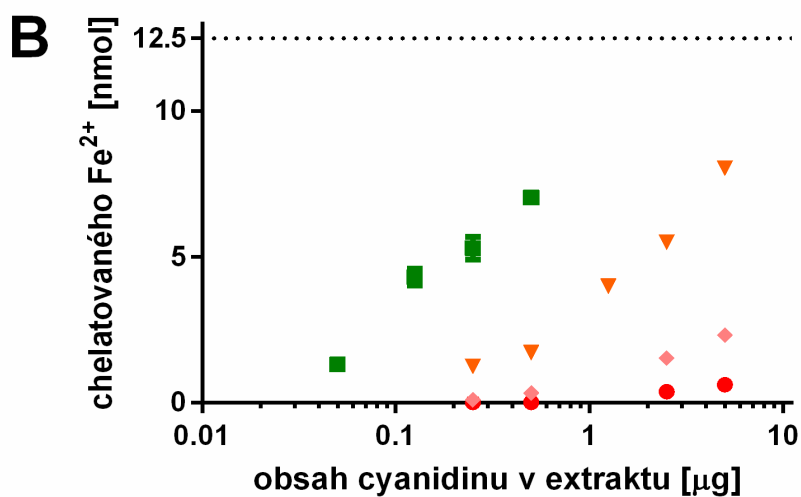
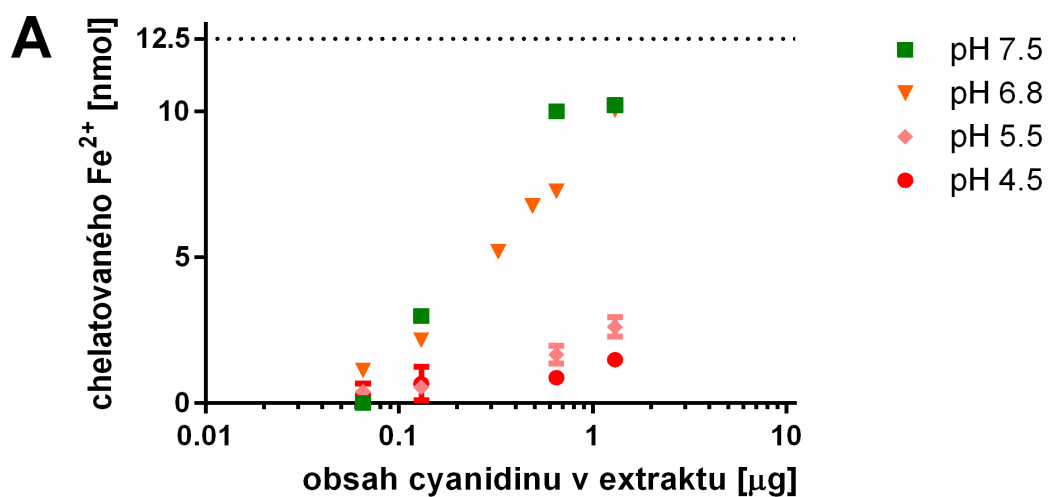
**Obrázek 27** Absorpční spektra extraktu 'Weihenstephan' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)

### **6.3 Kvantitavní analýza železo-chelatační účinnosti extraktů bezu černého**

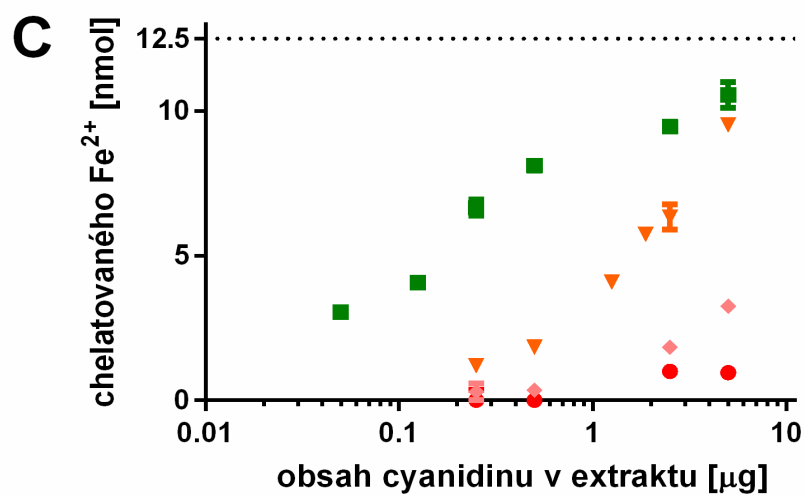
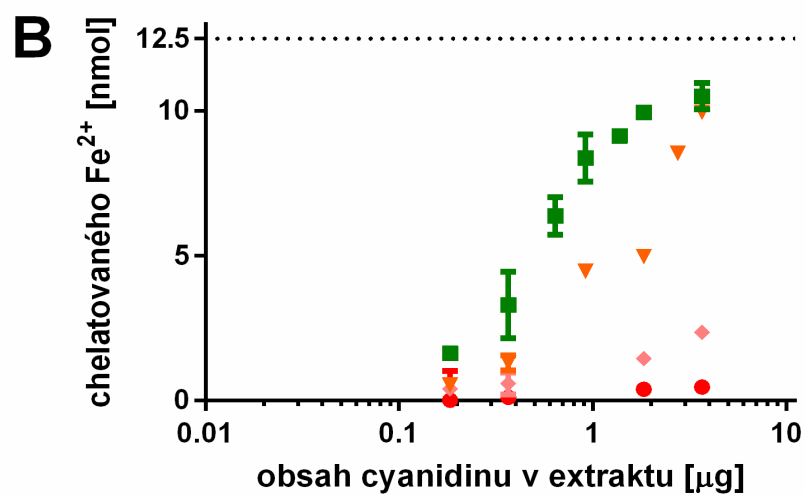
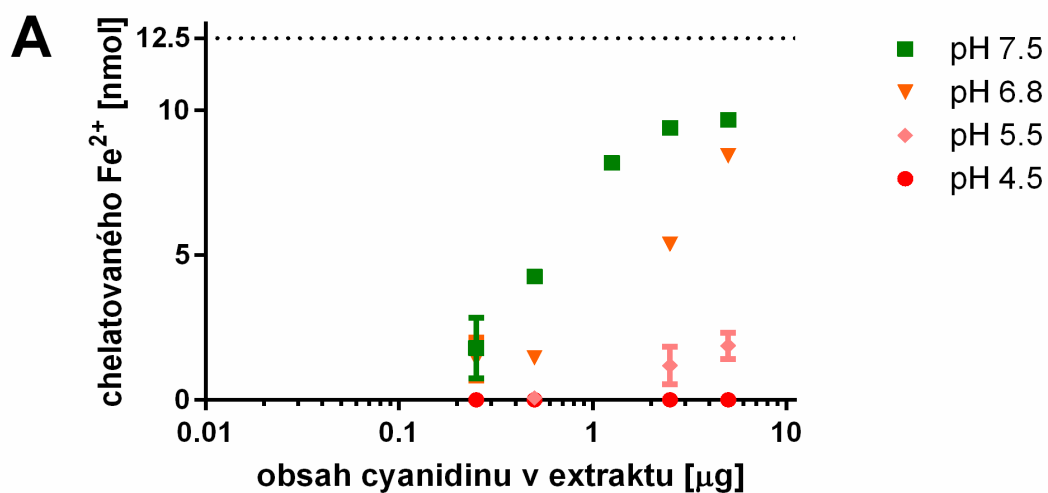
Železo-chelatační účinnost byla testována *in vitro* v prostředí o různém pH a v různých koncentračních poměrech extraktů bezu černého s kationty železa.

Z naměřených hodnot byly sestrojeny grafy železo-chelatační účinnosti extraktů pro železnaté kationty v prostředí o pH 4.5, 5.5, 6.8 a 7.5 (Obr. 28 – 31) a pro celkové železo pouze v pH 4.5 v důsledku limitace metody (Obr. 32 – 35).

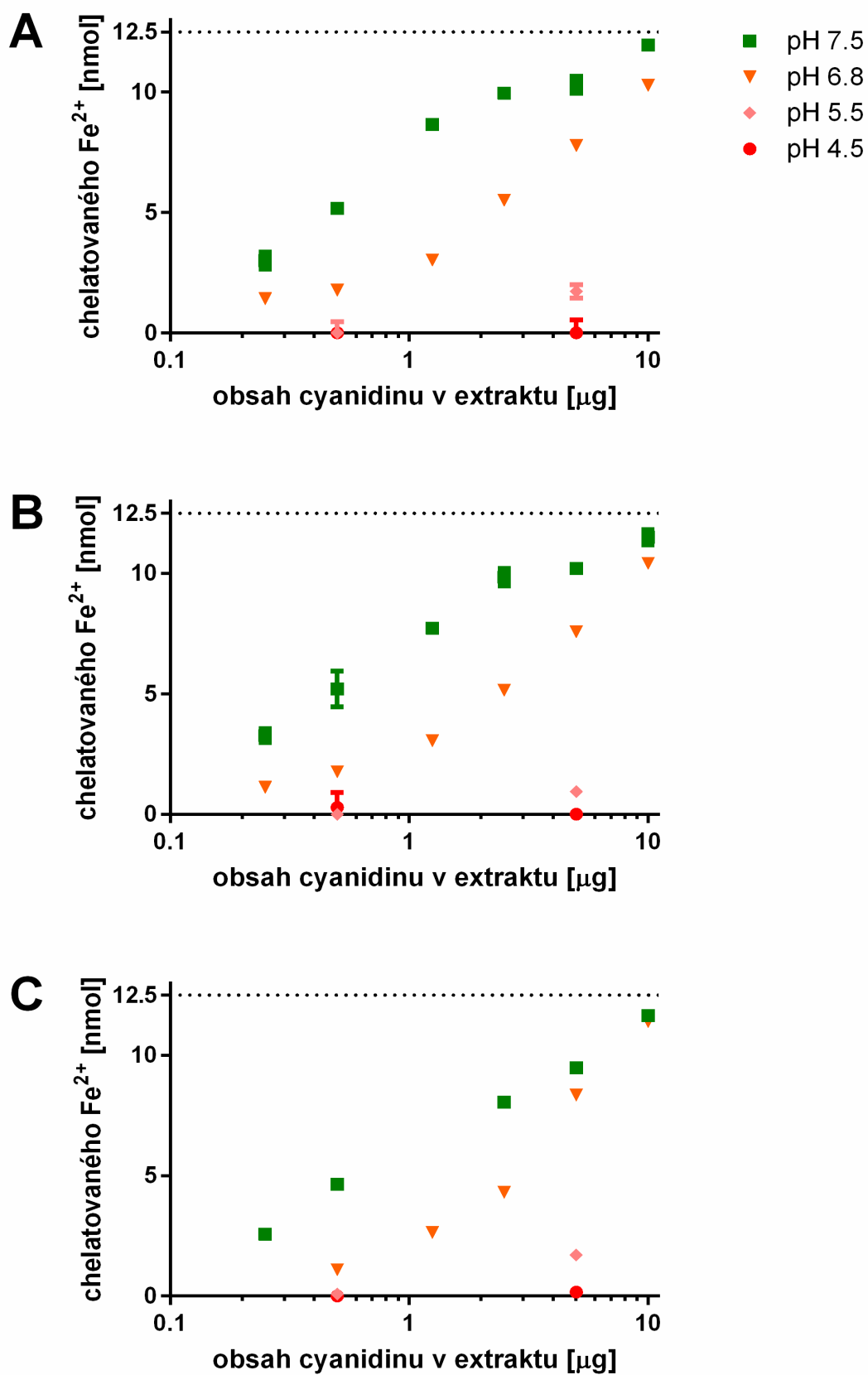
Porovnání chelatace železnatých iontů je zobrazeno na Obr. 36 a 37A. Pro snadné porovnání byla stanovena účinnost chelatace 1 µg extraktu a vzhledem k vysoké účinnosti při pH 7.5 bylo toto stanovení také provedeno u 0,1 µg. Porovnání chelatace celkového železa je zobrazeno na Obr. 37B. Statistické porovnání účinnosti jednotlivých extraktů je zobrazeno v Tabulce 4.



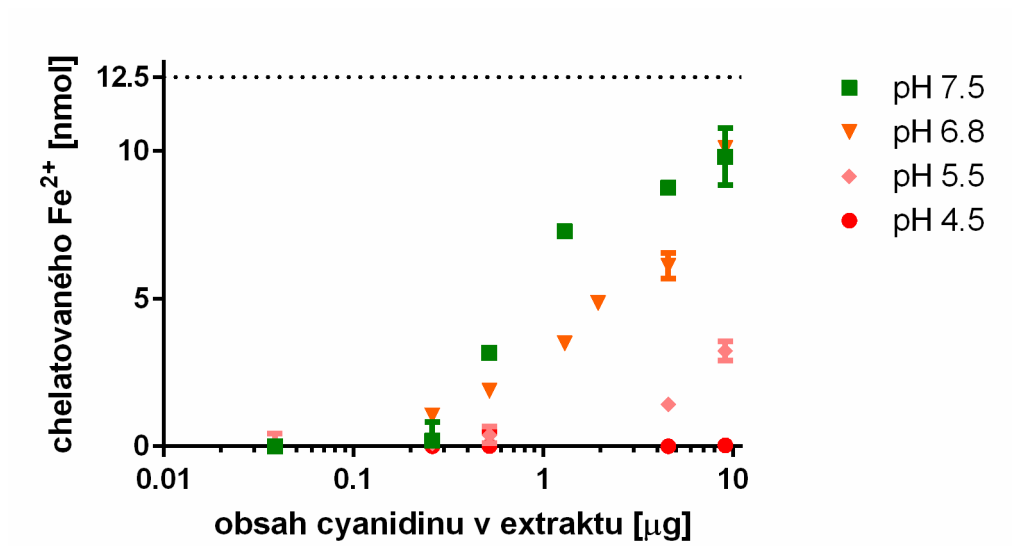
Obrázek 28 Chelatace železnatých kationtů testovanými extrakty 'Aurea' (A), 'Dana' (B) a 'Haschberg' (C)



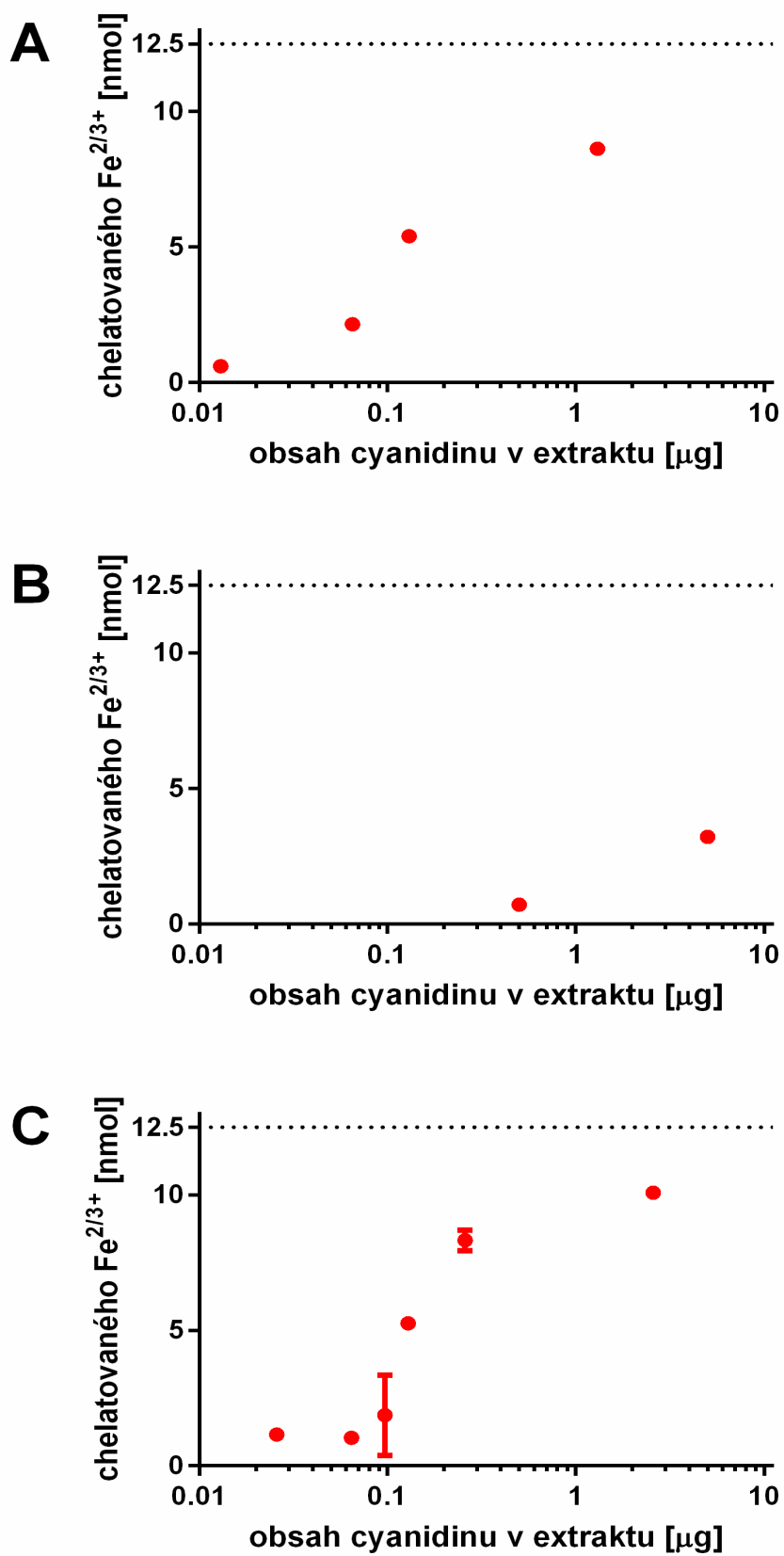
Obrázek 29 Chelatace železných kationtů testovanými extrakty 'Heidegg 13' (A), 'Korsør' (B) a 'Pregarten' (C)



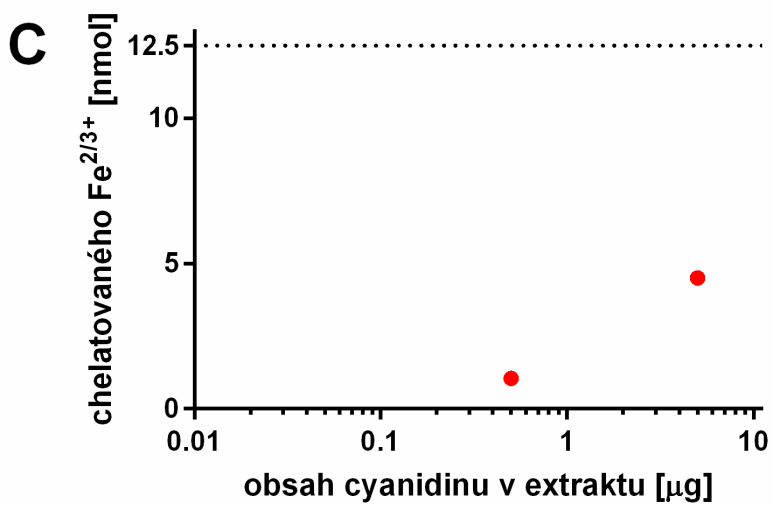
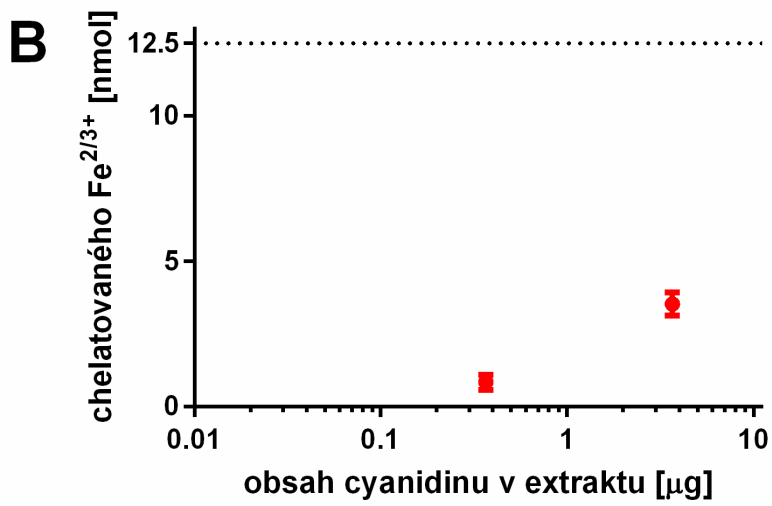
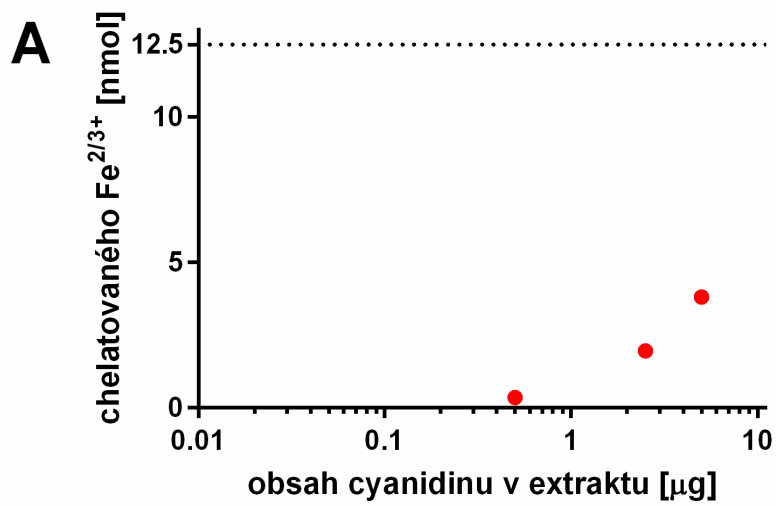
Obrázek 30 Chelatace železných kationtů testovanými extrakty 'Riese aus Voßloch' (A), 'Samdal' (B) a 'Samyl' (C)



**Obrázek 31** Chelatace železnatých kationtů testovaným extraktem 'Weihenstephan'

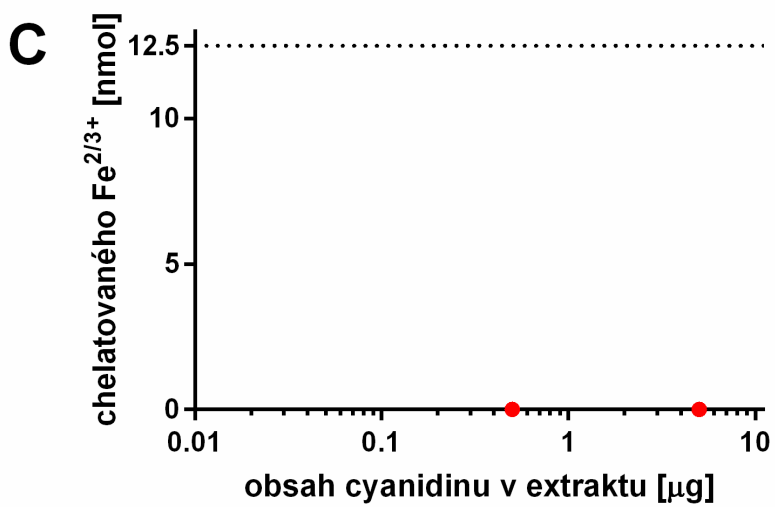
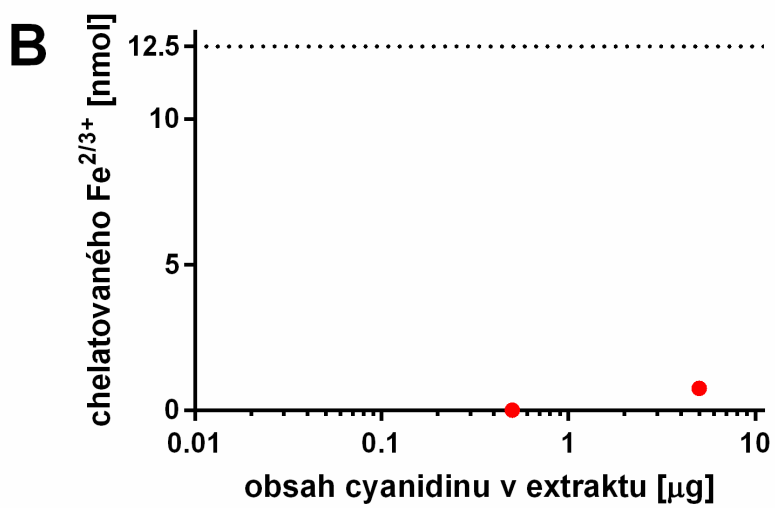
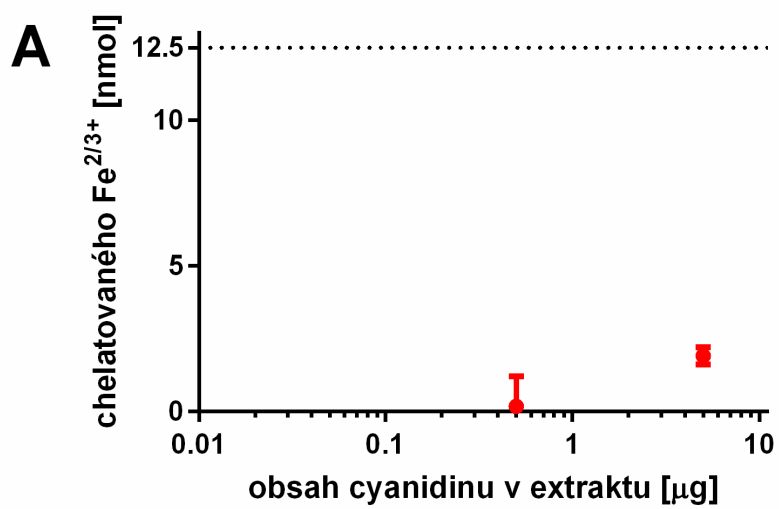


Obrázek 32 Chelatace celkového železa v prostředí o pH 4.5 testovanými extrakty 'Aurea' (A), 'Dana' (B) a 'Haschberg' (C)

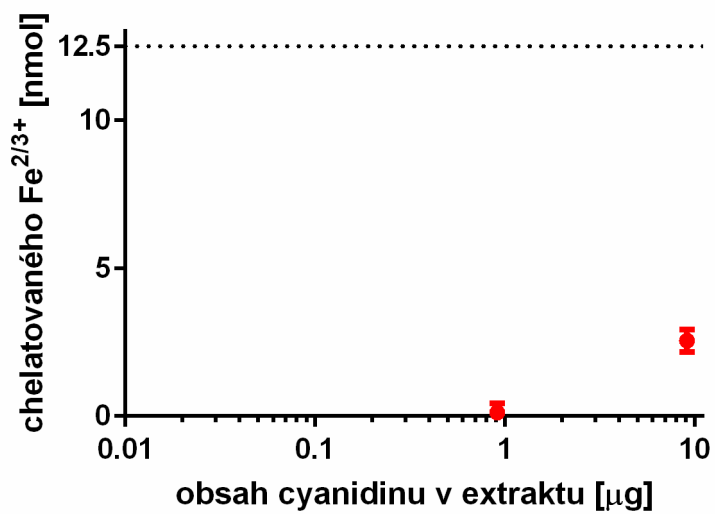


Obrázek 33 Chelatace celkového železa v prostředí o pH 4.5 testovanými extrakty 'Heidegg 13' (A), 'Korsør' (B) a 'Pregarten' (C)

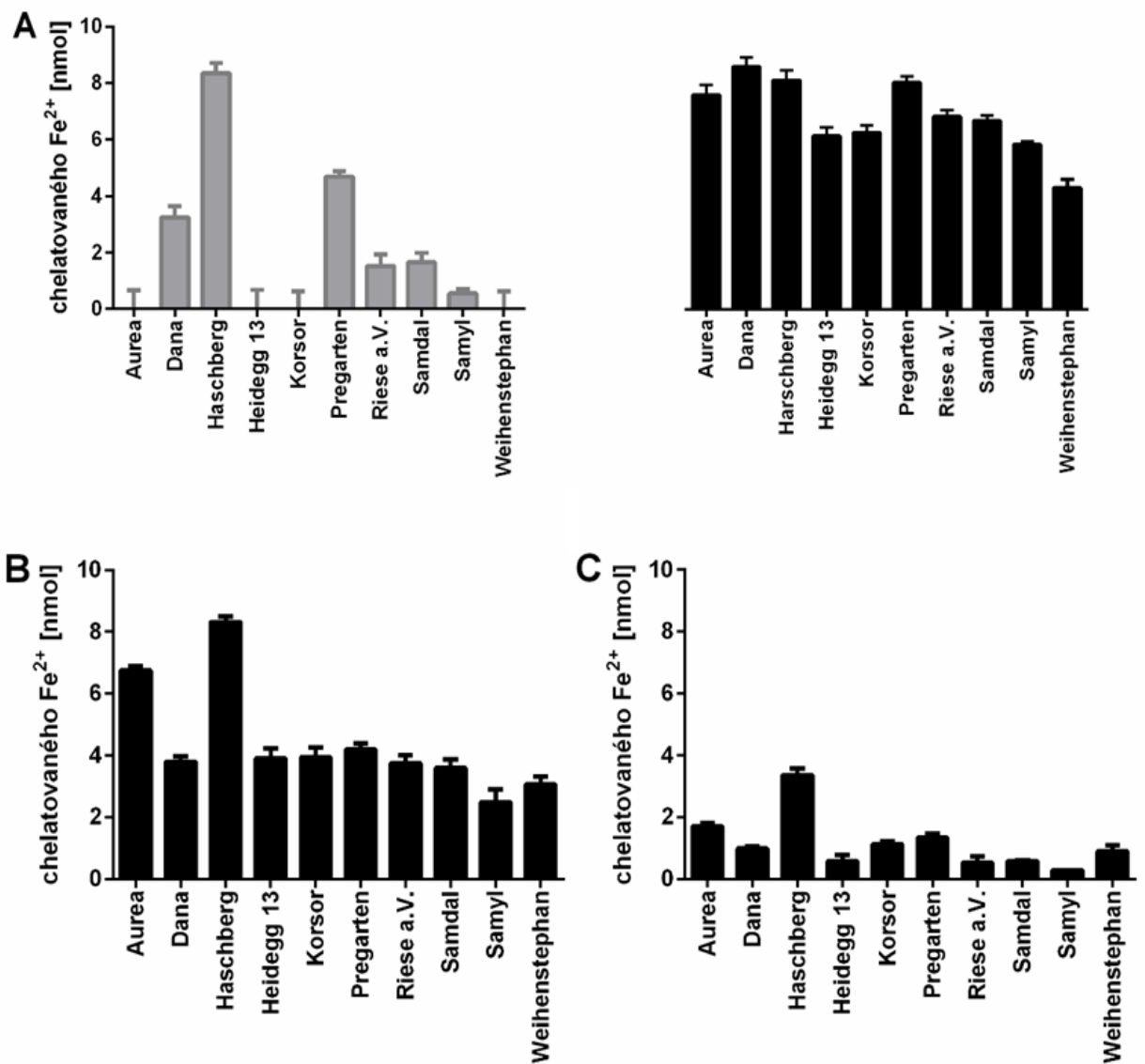




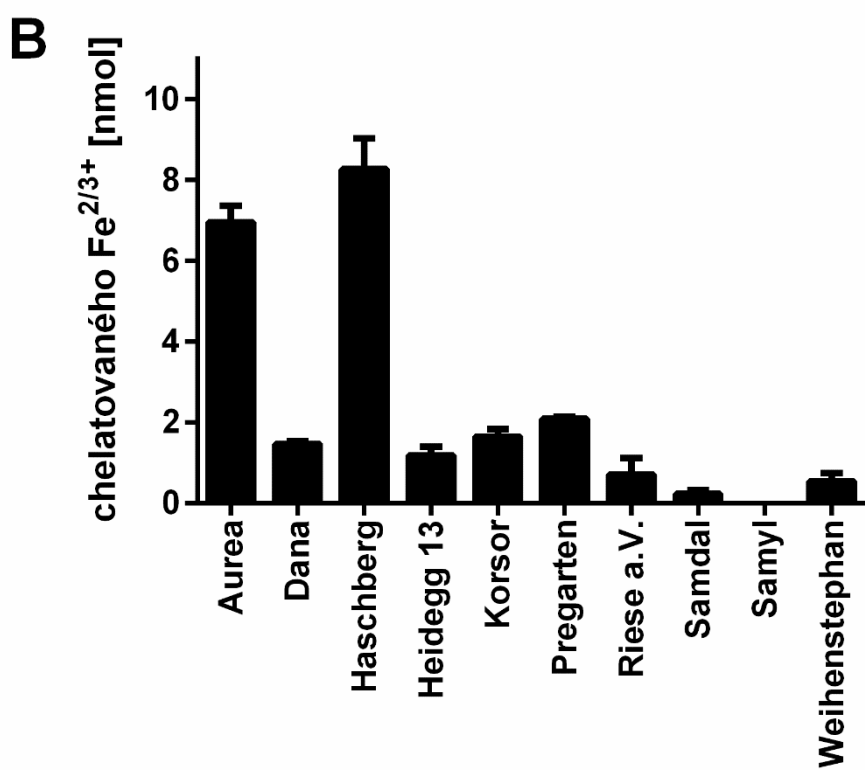
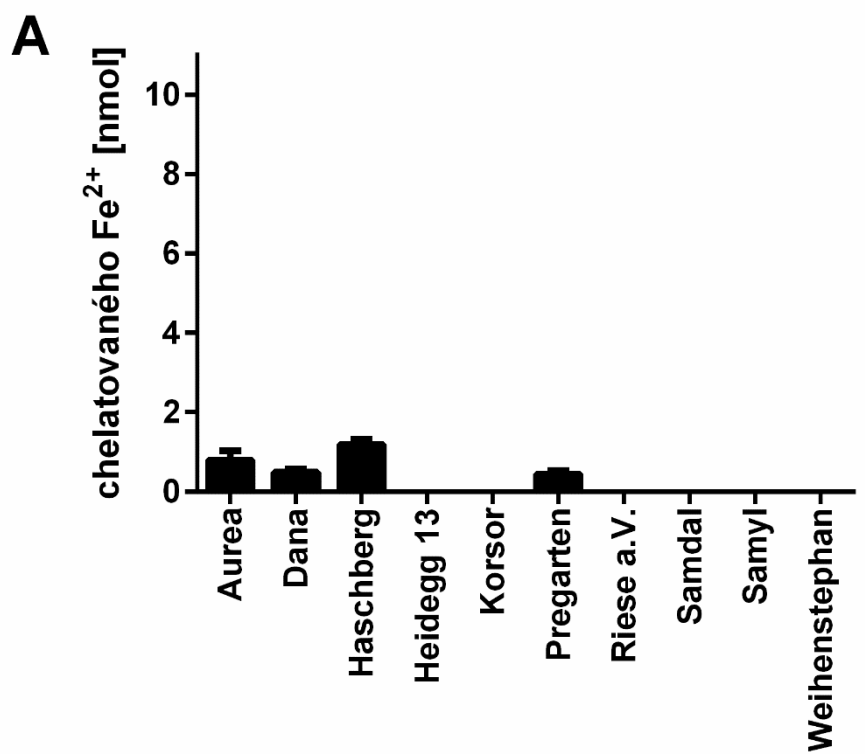
Obrázek 34 Chelatace celkového železa v prostředí o pH 4.5 testovanými extrakty 'Riese aus Voßloch' (A), 'Samdal' (B) a 'Samyl' (C)



**Obrázek 35** Chelatace celkového železa v prostředí o pH 4.5 testovaným extraktem 'Weihenstephan'



**Obrázek 36** Srovnání účinnosti jednotlivých extraktů bezu černého cheltovat železnaté kationty v pH 7.5 (A), 6.8 (B) a 5.5 (C). Černé sloupce znázorňují výsledky pro 1 µg cyanidinu v extraktu, zatímco šedé pro 0,1 µg.



Obrázek 37 Srovnání účinnosti jednotlivých extraktů bezu černého v pH 4.5 chelatovat železnaté kationty (A) a celkové železo (B)

**Tabulka 4 Porovnávání testovaných extraktů statistickou analýzou**

Tukey test mnohonásobného porovnávání	pH 7.5 (Fe <sup>2+</sup> , 0.1 µg)	pH 7.5 (Fe <sup>2+</sup> , 1 µg)	pH 6.8 (Fe <sup>2+</sup> , 1 µg)	pH 5.5 (Fe <sup>2+</sup> , 1 µg)	pH 4.5 Fe <sup>2+/3+</sup> , 1 µg)
Aurea vs. Dana	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Aurea vs. Haschberg	p<0.001	ns	p<0.001	p<0.001	p<0.05
Aurea vs. Heidegg 13	ns	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Aurea vs. Korsor	ns	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Aurea vs. Pregarten	p<0.001	ns	p<0.001	ns	p<0.001
Aurea vs. Riese a.V.	p<0.001	p<0.01	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Aurea vs. Samdal	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Aurea vs. Samyl	ns	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Aurea vs. Weihenstephan	ns	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Dana vs. Haschberg	p<0.001	ns	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Dana vs. Heidegg 13	p<0.001	p<0.001	ns	p<0.05	ns
Dana vs. Korsor	p<0.001	p<0.001	ns	ns	ns
Dana vs. Pregarten	p<0.001	ns	ns	ns	ns
Dana vs. Riese a.V.	p<0.001	p<0.001	ns	p<0.05	ns
Dana vs. Samdal	p<0.001	p<0.001	ns	ns	ns
Dana vs. Samyl	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	ns
Dana vs. Weihenstephan	p<0.001	p<0.001	p<0.01	ns	ns
Haschberg vs. Heidegg 13	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Haschberg vs. Korsor	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Haschberg vs. Pregarten	p<0.001	ns	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Haschberg vs. Riese a.V.	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Haschberg vs. Samdal	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Haschberg vs. Samyl	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Haschberg vs. Weihenstephan	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Heidegg 13 vs. Korsor	ns	ns	ns	p<0.01	ns
Heidegg 13 vs. Pregarten	p<0.001	p<0.001	ns	p<0.001	ns
Heidegg 13 vs. Riese a.V.	p<0.001	p<0.01	ns	ns	ns
Heidegg 13 vs. Samdal	p<0.001	ns	ns	ns	ns
Heidegg 13 vs. Samyl	ns	ns	p<0.001	ns	ns
Heidegg 13 vs. Weihenstephan	ns	p<0.001	p<0.001	ns	ns
Korsor vs. Pregarten	p<0.001	p<0.001	ns	ns	ns
Korsor vs. Riese a.V.	p<0.001	p<0.05	ns	p<0.01	ns
Korsor vs. Samdal	p<0.001	ns	ns	p<0.05	ns
Korsor vs. Samyl	ns	ns	p<0.001	p<0.001	p<0.05
Korsor vs. Weihenstephan	ns	p<0.001	p<0.001	ns	ns
Pregarten vs. Riese a.V.	p<0.001	p<0.001	ns	p<0.001	ns
Pregarten vs. Samdal	p<0.001	p<0.001	p<0.05	p<0.001	p<0.05
Pregarten vs. Samyl	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.01
Pregarten vs. Weihenstephan	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.05	p<0.05
Riese a.V. vs. Samdal	ns	ns	ns	ns	ns
Riese a.V. vs. Samyl	p<0.05	p<0.001	p<0.001	ns	ns
Riese a.V. vs. Weihenstephan	p<0.001	p<0.001	p<0.01	ns	ns
Samdal vs. Samyl	p<0.05	p<0.001	p<0.001	ns	ns
Samdal vs. Weihenstephan	p<0.001	p<0.001	p<0.05	ns	ns
Samyl vs. Weihenstephan	ns	p<0.001	p<0.05	p<0.01	ns

Porovnávaná data vychází z Obr. 36 a 37. n.s. – statisticky nevýznamné.

## 7. DISKUSE

Anthokyany jsou zástupci rostlinných pigmentů, které jsou široce rozšířené v barevném ovoci či rostlinách. Vykazují antioxidační působení, a proto mohou přispívat k prevenci kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny či zánětlivých procesů. Jednoznačné důkazy ale zatím chybí. Plody bezu černého, lidově známé jako bezinky, jsou známé vysokým obsahem anthokyanů (*Nakajima et al., 2004*).

Na rozdíl od dalších fenolických látek se v případě anthokyanů nevyskytuje dostatek informací popisujících jejich interakce s kovy, což je zdůvodnitelné nižším zájmem o jejich studium vzhledem k vysoké ceně čistých anthokyanů, jejich nízké biologické dostupnosti, a tedy i dosažitelným koncentracím v plasmě (*Perron a Brumaghim, 2009; Smeriglio et al., 2016; Vlachoianis et al., 2010*).

Na druhou stranu jejich interakce s kovy v trávicím traktu může být důležitá vzhledem k tomu, že mohou ovlivnit vstřebávání železa či mědi. Nedávná studie potvrdila předpoklad, že polyfenoly mohou potlačit či podpořit vstřebávání železa v závislosti na jejich chemické struktuře díky jeho chelataci a/nebo redukci (*Hart et al., 2015*).

Hlavním cílem této diplomové práce bylo srovnání železo-chelatačních schopností deseti variet bezu černého v odlišných (pato)fyzilogicky relevantních pH podmínkách (4.5, 5.5, 6.8 a 7.5). Bez černý byl vybrán pro jeho vysoký obsah anthokyanů, který je limitován hlavně na jeden aglykon – cyanidin.

Anthokyany jsou polyfenolické látky strukturálně blízké flavonoidům. I z tohoto hlediska mohou obsahovat podobné funkční skupiny potřebné pro chelataci kovů. Anthokyany se ale od flavonoidů liší významným rozdílem, což je absence 4-keto skupiny. Z tohoto důvodu, dvě možné chelatační skupiny flavonoidů (3-hydroxy-4-keto nebo 5-hydroxy-4-keto) nejsou k dispozici. Tudíž v případě cyanidinu jediná možná chelatační poloha je dihydroxylová skupina kruhu B (Obr. 5) (*Kasprzak et al., 2015; Mladěnka et al., 2016; Smeriglio et al., 2016*).

Pro zjištění chelatační účinnosti byla využita spektrofotometrická ferrozinová metoda. Ferrozin je specifický indikátor, který tvoří purpurové komplexy s železnatými ionty v absorpčním maximu vlnové délky 562 nm. Tato metodika také sloužila k měření celkového železa ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) v prostředí o pH 4.5. Jelikož je ferrozin schopný tvořit komplexy pouze s  $\text{Fe}^{2+}$  ionty, muselo být k roztoku přidáno redukční činidlo HA, který zredukoval  $\text{Fe}^{3+}$  ionty na měřitelné  $\text{Fe}^{2+}$  ionty. U vyšších pH je redukce železitých iontů neúplná a metodiku tak nelze využít pro kvantitativní stanovení chelatace (Mladěnka et al., 2010). HA byl také použit u stanovení chelatace  $\text{Fe}^{2+}$  iontů v prostředí o pH 7.5, kde bez jeho přídavku dochází k spontánní oxidaci  $\text{Fe}^{2+}$  iontů.

Extrakty bezu černého s obsahem potenciálních chelátorů železa tvoří v závislosti na pH komplex s  $\text{Fe}^{2+}$  ionty a po přídavku indikátoru ferrozinu do roztoku, kdy na sebe ferrozin naváže nezchelatované  $\text{Fe}^{2+}$ , se stanoví nepřímo množství chelátoru, které vytvořilo komplex s  $\text{Fe}^{2+}$ . Dochází zde tak ke kompetici dvou chelátorů, tj. indikátoru a testovaného chelátoru, o železo. Proto k měření absorbance došlo ihned po přidání ferrozinu (čas 0) a pět minut poté. Ferrozin v čase 0 pravděpodobně reaguje s volným nezchelatovaným železem nebo může vyvázat železo z již vzniklého, méně stabilního chelátu s testovanou látkou, ale není schopen odstranit železo ze stabilního komplexu silného chelátoru železa. Během pětiminutového intervalu může proběhnout kompetice testované látky a ferrozinu, a tak lze porovnáním měření v čase 0 a 5 minut odhadnout stabilitu tvořeného komplexu (Stokey, 1970; Mladěnka et al., 2010).

Chelatační aktivita může být hodnocena ze dvou hledisek a to, množstvím zchelatovaného železa (např. v nmol) nebo poměrem testované látky k iontům železa. V našem případě byla železo-chelatační aktivita porovnána v množství extraktu odpovídajícího 1  $\mu\text{g}$ , resp. 0,1  $\mu\text{g}$  cyanidinu v extraktu. Vzhledem k charakteru experimentu, kdy se testoval extrakt, nebylo použito vyjádření v poměru molárních koncentrací.

Z výsledků je zřejmé, že se stoupajícím pH se účinnost jednotlivých extraktů chelatovat železnaté kationty zvyšuje (Obr. 36A,B,C; 37A), což je dáno pravděpodobně tím, že v zásaditějším prostředí dochází jednodušeji k deprotonizaci hydroxylových skupin katecholického kruhu B, což znamená jednodušší tvoření komplexů s  $\text{Fe}^{2+}$  či  $\text{Fe}^{3+}$  ionty (Perron a Brumaghim, 2009).

V prostředí o pH 7.5 vykazovaly nejvyšší chelatační účinnost u  $\text{Fe}^{2+}$  iontů extrakty 'Haschberg' a 'Pregarten' zatímco extrakt 'Weihestephan' byl nejméně účinný chelátor těchto iontů (Obr. 36A). Pořadí chelátorů se ale lišilo podle množství. V množství 0,1  $\mu\text{g}$  cyanidinu v extraktu bylo pořadí extraktů následující (seřazeno sestupně od nejúčinnějšího chelátoru): 'Haschberg' > 'Pregarten' > 'Dana' > 'Samdal' > 'Riese aus Voßloch' > 'Samyl' = 'Heidegg 13' = 'Korsør' = 'Aurea' = 'Weihestephan' (Obr. 36A), zatímco v množství 1  $\mu\text{g}$  byl nejúčinnějším chelátorem  $\text{Fe}^{2+}$  iontů extrakt 'Dana' a pořadí bylo následující: 'Dana' > 'Haschberg' = 'Pregarten' > 'Aurea' > 'Riese aus Voßloch' = 'Samdal' > 'Heidegg 13' = 'Korsør' = 'Samyl' > 'Weihestephan' (Obr. 36A).

V prostředí o pH 6.8 byl v množství 1  $\mu\text{g}$  cyanidinu v extraktu nejúčinnějším chelátorem  $\text{Fe}^{2+}$  iontů opět extrakt 'Haschberg', poté účinnost klesala v pořadí: 'Haschberg' > 'Aurea' > 'Pregarten' > 'Korsør' = 'Heidegg 13' = 'Riese aus Voßloch' = 'Dana' = 'Samdal' > 'Weihestephan' > 'Samyl' (Obr. 36B), zatímco v množství 0,1  $\mu\text{g}$  nebyl žádný z extraktů schopen významně chelatovat  $\text{Fe}^{2+}$  (Obr. 28 – 31, vzhledem k malé chelataci nebyla provedena ani statistická analýza).

V prostředí o pH 5.5 účinnost extraktů chelatovat  $\text{Fe}^{2+}$  výrazně poklesla. Extrakt 'Haschberg' byl jednoznačně nejúčinnější. Pořadí extraktů bylo následující: 'Haschberg' > 'Aurea' > 'Pregarten' > 'Korsør' > 'Dana' = 'Weihestephan' > 'Heidegg 13' = 'Riese aus Voßloch' = 'Samdal' > 'Samyl' (Obr. 36C).

V prostředí o pH 4.5 byla chelatace  $\text{Fe}^{2+}$  iontů zanedbatelná (Obr. 37A), nicméně tři extrakty byly účinné v chelataci celkového železa ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) ve stejném pH prostředí 4.5. Opět byl nejúčinnějším chelátorem extrakt 'Haschberg' následován extraktem 'Aurea'. Chelatační aktivita byla také nalezena v extraktech 'Dana', 'Korsør', 'Heidegg 13' a 'Pregarten'. Ostatní extrakty nebyly významně účinnými chelátory (Obr. 37B).

Vzhledem k tomu, že všechny testované extrakty byly zředěny na stejnou koncentraci anthokyanů, nebyly očekávány tak velké rozdíly ve schopnosti chelatovat železo. Obzvláště výrazný rozdíl byl nalezen mezi nejúčinnějším extraktem 'Haschberg' a většinou ostatních extraktů. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je účast minoritních komponent v extraktech na chelataci. Toto vysvětlení je pravděpodobné i vzhledem ke kvalitativním rozdílům v chelatační účinnosti extraktů u pH 7.5. Je možné, že některé minoritní látky výrazně změnilo pořadí zejména při vyšší koncentraci extraktu.



## 8. ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na schopnost různých variet bezu černého chelatovat železnaté a železité ionty v různém pH prostředí pomocí spektrofotometrie. Pro tuto práci byly vybrány tyto variety bezu černého: 'Aurea', 'Dana', 'Haschberg', 'Heidegg 13', 'Korsør', 'Pregarten', 'Riese aus Voßloch', 'Samdal', 'Samil' a 'Weihestephan'.

Zjistili jsme, že všechny extrakty bezu černého jsou schopné chelatovat železo, což může být významné pro absorpci železa v gastrointestinálním traktu. Na druhou stranu byly pozorovány výrazné rozdíly v chelatační aktivitě mezi jednotlivými extrakty různých variet bezu černého, což může způsobit odlišný biologický účinek.

Nejúčinnějším chelátorem železnatých iontů byl extrakt 'Haschberg', který byl také nejúčinnější v případě chelatace celkového železa.

Měření chelatační aktivity probíhalo v různých pH prostředích a z naměřených výsledků je patrné, že se chelatační aktivita zvyšovala se zvyšujícím se pH, kdy pH 7.5 bylo neoptimálnější.

## 9. POUŽITÉ ZKRATKY

<b>A</b>	Absorbance
<b>ARDS</b>	Akutní respirační distresový syndrom
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DMT1</b>	Dvoumocný transportér kovů z anglického divalent metal transporter
<b>GIT</b>	Gastrointestinální trakt
<b>HA</b>	Hydroxylamin chlorid
<b>HFE</b>	High iron Fe gen
<b>HH</b>	Dědičná hemochromatóza z anglického hereditary hemochromatosis
<b>NADPH-oxidáza</b>	Nikotinamidadeninukleotidfosfát-oxidáza
<b>RES</b>	Retikuloendotelový systém
<b>ROIs</b>	Reaktivní formy kyslíku z anglického reactive oxygen intermediates
<b>UV/VIS</b>	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie

## 10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Koncentrace anthokyanů (vyjádřená jako cyanidin 3-glukosid) v extraktu.....	38
Tabulka 2 Schéma rozložení na mikrotitrační destičce při měření kalibrační křivky Fe <sup>2+</sup> iontů .	40
Tabulka 3 Schéma rozložení na mikrotitrační destičce při měření chelatace Fe <sup>2+</sup> iontů.....	42
Tabulka 4 Porovnávání testovaných extraktů statistickou analýzou .....	77

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 DEFEROXAMIN .....	25
Obrázek 2 DEFERIPRON.....	26
Obrázek 3 DEFERASIROX .....	26
Obrázek 4 Vliv pH na změny barev anthokyanů .....	29
Obrázek 5 Porovnání chemické struktury anthokyanidinů .....	30
Obrázek 6 Obecný vznik železo-polyfenol osmistěnného komplexu.....	32
Obrázek 7 Kalibrační křivka železnatých iontů.....	44
Obrázek 8 Absorpční spektra extraktu 'Aurea' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C).....	46
Obrázek 9 Absorpční spektra extraktu 'Aurea' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B).....	47
Obrázek 10 Absorpční spektra extraktu 'Dana' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C) .....	48
Obrázek 11 Absorpční spektra extraktu 'Dana' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B) .....	49
Obrázek 12 Absorpční spektra extraktu 'Haschberg' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C). 50	
Obrázek 13 Absorpční spektra extraktu 'Haschberg' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B) .....	51
Obrázek 14 Absorpční spektra extraktu 'Heidegg 13' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C) 52	
Obrázek 15 Absorpční spektra extraktu 'Heidegg 13' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B) .....	53
Obrázek 16 Absorpční spektra extraktu 'Korsør' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C) .....	54
Obrázek 17 Absorpční spektra extraktu 'Korsør' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B).....	55
Obrázek 18 Absorpční spektra extraktu 'Pregarten' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C)..	56
Obrázek 19 Absorpční spektra extraktu 'Pregarten' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B) 57	
Obrázek 20 Absorpční spektra extraktu 'Riese aus Voßloch' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C) .....	58
Obrázek 21 Absorpční spektra extraktu 'Riese aus Voßloch' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B) .....	59
Obrázek 22 Absorpční spektra extraktu 'Samdal' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C).....	60
Obrázek 23 Absorpční spektra extraktu 'Samdal' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B)....	61
Obrázek 24 Absorpční spektra extraktu 'Samyl' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C) .....	62
Obrázek 25 Absorpční spektra extraktu 'Samyl' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B).....	63
Obrázek 26 Absorpční spektra extraktu 'Weihenstephan' v prostředí o pH 4.5 (A), 5.5 (B) a 6.8 (C) .....	64
Obrázek 27 Absorpční spektra extraktu 'Weihenstephan' v prostředí o pH 7.5 bez HA (A) a s HA (B).....	65
Obrázek 28 Chelatace železnatých kationtů testovanými extrakty 'Aurea' (A), 'Dana' (B) a 'Haschberg' (C) .....	67

Obrázek 29 Chelatace železnatých kationtů testovanými extrakty 'Heidegg 13' (A), 'Korsør' (B) a 'Pregarten' (C) .....	68
Obrázek 30 Chelatace železnatých kationtů testovanými extrakty 'Riese aus Voßloch' (A), 'Samdal' (B) a 'Samyl' (C) .....	69
Obrázek 31 Chelatace železnatých kationtů testovaným extraktem 'Weihenstephan' .....	70
Obrázek 32 Chelatace celkového železa v prostředí o pH 4.5 testovanými extrakty 'Aurea' (A), 'Dana' (B) a 'Haschberg' (C).....	71
Obrázek 33 Chelatace celkového železa v prostředí o pH 4.5 testovanými extrakty 'Heidegg 13' (A), 'Korsør' (B) a 'Pregarten' (C).....	72
Obrázek 34 Chelatace celkového železa v prostředí o pH 4.5 testovanými extrakty 'Riese aus Voßloch' (A), 'Samdal' (B) a 'Samyl' (C).....	73
Obrázek 35 Chelatace celkového železa v prostředí o pH 4.5 testovaným extraktem 'Weihenstephan' .....	74
Obrázek 36 Srovnání účinnosti jednotlivých extraktů bezu černého chelatovat železnaté kationty v pH 7.5 (A), 6.8 (B) a 5.5 (C).....	75
Obrázek 37 Srovnání účinnosti jednotlivých extraktů bezu černého v pH 4.5 chelatovat železnaté kationty (A) a celkové železo (B).....	76

## 12. POUŽITÁ LITERATURA

1. Andrews N. Molecular control of iron metabolism. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2005;18(2):159-169. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521692604001276>
2. Barnes S, Prasain J, Kim H. In Nutrition, Can We "See" What Is Good for Us? *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2013;4(3):327-334. Dostupné z: <http://advances.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/an.112.003558>
3. Borgna-Pignatti C, Marsella M. Iron Chelation in Thalassemia Major. *Clinical Therapeutics*. 2015;37(12):2866-2877. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291815011510>
4. Camaschella C, Roetto A, De Gobbi M. Juvenile hemochromatosis. *Seminars in Hematology*. 2002;39(4):242-248. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0037196302500676>
5. Camaschella C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Reviews*. 2017, in press. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X16300789>
6. CastañedaA-Ovando A, Pacheco-Hernandéz M, Páez-Hernandéz ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009;113(4):859-871. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608010674>
7. Crisponi G, Remelli M. Iron chelating agents for the treatment of iron overload. *Coordination Chemistry Reviews*. 2008;252(10-11):1225-1240. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854507003177>
8. Český lékopis 2009, Praha: Grada, 2009
9. Dadáková E, Vrchatová N, Chmelová Š. Květenství bezu černého - Bohatý zdroj rutinu a chlorogenové kyseliny. *Léčivé rostliny*. 2008;02:56-57.
10. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2001;55(6):333-339. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332201000683>
11. Fraga C. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 2002;180(1):23-32. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X02003797>
12. Gavino F, Crisponi G. Iron chelating agents in clinical practice. *Coordination Chemistry Reviews*. 1999;184(1):291-310. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854599000569>
13. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001;1.2.1-1.2.13.
14. Harris DC. Facilitation of Fe(II) autoxidation by Fe(3) complexing agents. *Biochimica et biophysica acta*. 1973;329(1):156-158.

15. Hart JJ, Tako E, Kochian LV, Glahn RP. Identification of Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Polyphenols That Inhibit and Promote Iron Uptake by Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(25):5950-5956. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b00531>
16. Hynie S. *Farmakologie v kostce*. Druhé přepracované vydání. Praha: Triton, 2001.
17. Ilbert M, Bonnefoy V. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2013;1827(2):161-175. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272812010407>
18. Junqueira FP, Fernandes JL, Cunha GM, et al. Right and left ventricular function and myocardial scarring in adult patients with sickle cell disease: a comprehensive magnetic resonance assessment of hepatic and myocardial iron overload. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*. 2013;15(1):83. Dostupné z: <http://jcmr-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/1532-429X-15-83>
19. Kasprzak MM, Erxleben A, Ochocki J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Advances*. 2015;5(57):45853-45877. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA05069C>
20. Kochhar H, Leger ChS, Leitch HA. Durable Red Blood Cell Transfusion Independence in a Patient with an MDS/MPN Overlap Syndrome Following Discontinuation of Iron Chelation Therapy. *Case Reports in Hematology*. 2015;253294:1-7. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/crihem/2015/253294/>
21. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 2003;64(5):923-933. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942203004382>
22. Kontoghiorghes G, George J, Kontoghiorghes ChN. Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016;10:465-481. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/efficacy-and-safety-of-iron-chelation-therapy-with-deferoxamine-deferi-peer-reviewed-article-DDDT>
23. Liu ZD, Hider RC. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. *Medical research reviews*. 2002;22(1):26-64.
24. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4. Praha: Nakladatelství Grada, 2012:140.
25. Mladěnka P, Macáková K, Filipický T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, Silvestri IP, Hrdina R, Saso L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011;105(5):693-701. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013411000316>
26. Mladěnka P, Říha M, Martin J, Gorová B, Matějček A, Spilková J. Fruit extracts of 10 varieties of elderberry (*Sambucus nigra* L.) interact differently with iron and copper. *Phytochemistry Letters*. 2016;18:232-238. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390016302294>

27. Mladěnka P, Šimůnek T, Hübl M, Hrdina R. The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radical Research*. 2009;40(3):263-272. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10715760500511484>
28. Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;49(6):963-975. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089158491000362X>
29. Mobarra N, Shanaki M, Ehteram H, Nasiri H, Sahmani M, Saeidi M, Goudarzi M, Pourkarim H, Azad M. A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*. 2016;10(4):239-247. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5139945/>
30. Nakajima J, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M, Saito K. LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2004;5:241-247. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2004/469084/abs/>
31. Nurchi VM, Crisponi G, Lachowicz JI, Medici S, Peana M, Zoroddu MA. Chemical features of in use and in progress chelators for iron overload. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2016;38:10-18. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X16300906>
32. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005;202(2):199-211. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X0400314X>
33. Papanikolaou G, Papaioannou M, Politou M, Vavatsi N, Kioumi A, Tsiatsiou P, Marinaki P, Laukopoulos D, Christakis JI. Genetic Heterogeneity Underlies Juvenile Hemochromatosis Phenotype: Analysis of Three Families of Northern Greek Origin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2002;29(2):168-173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107997960290553X>
34. Perron NR, Brumaghim JL. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2009;53(2):75-100. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12013-009-9043-x>
35. Polášková A, Spilková J, Matějček A, Studená H. Factors affecting the actual yield of active substances from anthocyanin-rich berries. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comeniana*. 2015;62:31-40.
36. Ponka P. Hereditary Causes of Disturbed Iron Homeostasis in the Central Nervous System. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1012:267–281.
37. Porter JB, Cappellini MD, Kattamis A, Viprakasit V, Musallam KM, Zhu Z, Taher AT. Iron overload across the spectrum of non-transfusion-dependent thalassaemias: role of erythropoiesis, splenectomy and transfusions. *British Journal of Haematology*. 2017;176(2):288-299. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.14373>

38. Porter JB, Huehns ER, Hider RC. The development of iron chelating drugs. *Baillière's Clinical Haematology*. 1989;2(2):257-292. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0950353689800186>
39. Rodrigues S, Almeida A, Viriato D, Antunes M. Real-World Evidence of Iron Chelation Therapy In Transfusion-Dependent Mds Patients: A Portuguese Hospital Registry. *Value in Health*. 2015;18(7):A659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098301515044666>
40. Sedláčková T, Racek J. Metabolismus železa a jeho regulace. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. 2009;38(1):17–23.
41. Senica M, Stampar F, Veberic R, Mikulic-Petkovsek M. Processed elderberry (*Sambucus nigra* L.) products: A beneficial or harmful food alternative? *LWT - Food Science and Technology*. 2016;72:182-188 Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381630247X>
42. Sheftel AD, Mason AB, Ponka P. The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2012;1820(3):161-187. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416511001851>
43. Sidor A, Gramza-Michałowska A. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *Journal of Functional Foods*. 2015;18:941-958. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464614002400>
44. Silbernagl S, Lang F. *Atlas patofyziologie člověka*. První české vydání. Praha: Nakladatelství Grada, 2001:38.
45. Silva P, Ferreira S, Nunes FM. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) by-products a source of anthocyanins and antioxidant polyphenols. *Industrial Crops and Products*. 2017;95:227-234. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669016306872>
46. Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research*. 2016;30:1265–1286.
47. Spilková J. Bez černý - tradiční léčivá rostlina ve světle nových poznatků. *Liečivé rostliny*. 2015;52(1):16-18.
48. Stookey LL. Ferrozine — a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical chemistry*. 1970;42:779–781.
49. Tilbrook GS. Iron chelators for clinical use. *Metal ions in biological systems*. 1998;35:691-730.
50. Ulbricht C, Basch E, Cheung L, Goldberg H, Hammerness P, Isaac R, Khalsa KPS, Romm A, Rychlik I, Varghese M, Weissner W, Windsor RC, Wortley J. An Evidence-Based Systematic Review of Elderberry and Elderflower (*Sambucus nigra*) by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of Dietary Supplements*. 2014;11(1):80-120. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19390211.2013.859852>



51. Veberic R, Jakopic J, Stampar F, Schmitzer V. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*. 2009;114(2):511-515. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608011710>
52. Vlachojannis JE, Cameron M, Chrubasik S. A systematic review on the sambuci fructus effect and efficacy profiles. *Phytotherapy Research*. 2010;4:1–8.
53. Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*. 2008;269(2):281-290. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383508003960>
54. Xiao W, Beibei F, Guangsi S, Yu J, Wen Z, Xi H, Youjia X. Iron overload increases osteoclastogenesis and aggravates the effects of ovariectomy on bone mass. *Journal of Endocrinology*. 2015;226(3):121-134. Dostupné z: <http://joe.endocrinology-journals.org/lookup/doi/10.1530/JOE-14-0657>
55. Yokel RA. Influence of lipophilicity on the bioavailability and disposition of orally active 3-hydroxypyridin-4-one metal chelators. *Drug metabolism and disposition*. 1995;23(10):1178-1180.
56. Zamora-Ros R, Knaze V, Luján-Barroso L, et al. Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *British Journal of Nutrition*. 2011;106(07):1090-1099. Dostupné z: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0007114511001437](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114511001437)