

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové



Katedra farmakologie a toxikologie

STANOVENÍ STECHIOMETRIE DEHYDROSILYBINU A S MĚDÍ

Diplomová práce

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

Konzultant: doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D.

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

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování vedoucímu práce doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za trpělivost a vstřícnost při konzultacích a cenné odborné rady, kterými mi pomohl k sepsání předkládané práce. Rovněž bych chtěla poděkovat konzultantce doc. Ing. Kateřině Valentové, Ph.D. za věcné připomínky, náměty a rady. Dále bych chtěla poděkovat Marii Carmen Catapano, MSc. za pomoc při experimentálním měření v laboratoři. V neposlední řadě patří mé poděkování grantové agentuře ČR (projekt č. 18-00121S), grantové agentuře Karlovy Univerzity (projektč. 1080217 C) a katedře farmakologie a toxikologie za poskytnutí laboratoře k naměření výsledků pro tuto diplomovou práci.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Kateřina Klimková

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

Konzultant: doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení stechiometrie dehydrosilybinu A s mědí

Silymarin, extrakt semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*), je hojně využívané registrované volně dostupné léčivo, které je doporučováno na řadu onemocnění jater. Jako jednu z komponent obsahuje flavonolignan 2,3-dehydrosilybin A, který má ve své struktuře vhodné vazebné místo pro kovy. Obecně mohou flavonolignany právě vzhledem ke svým strukturním předpokladům interagovat v gastrointestinálním traktu s přechodnými kovy za tvorby komplexů, čehož lze využít při ochraně před nadměrným množstvím kovu v organismu. Cílem této *in vitro* studie bylo analyzovat interakci 2,3-dehydrosilybinu A s mědí, která jako kofaktor enzymů podílejících se na správné činnosti organismu zastává roli nepostradatelného prvku lidského organismu, nicméně při zvýšené hladině může v organismu působit toxicky. Stechiometrie, jedna z nejvýznamnějších charakteristik komplexu, byla zjištěna UV-Vis spektrofotometrií ve čtyřech (pato)fyziologických pH podmínkách (4,5; 5,5; 6,8; 7,5) pomocí dvou nekompetitivních metod: Jobovou metodou a komplementární metodou. Tyto metody se vzájemně liší svými principy. Při Jobově metodě se udržuje celková molární koncentrace dvou reaktantů konstantní, zatímco molární koncentrační poměry těchto dvou reaktantů se průběžně mění. Během komplementární metody se konstantní udržuje molární koncentrace mědi, přičemž molární koncentrace látky se mění. Bylo zjištěno, že 2,3-dehydrosilybin A je středně aktivní chelátor Cu^{2+} , s nimiž tvořil komplexy o výsledné stechiometrii 2:1 či 3:1, flavonolignan: Cu^{2+} . Stechiometrie 2:1 se v závislosti na podmínkách měnila v důsledku nadbytku testované látky ve stechiometrii 3:1. Oproti tomu Cu^+ ionty nebyly 2,3-dehydrosilybinem A vázány za žádných testovaných podmínek. Tyto *in vitro* výsledky mohou v budoucnu sloužit jako podklad pro bližší charakteristiku testování účinku 2,3-dehydrosilybinu A na absorpci mědi v buněčných kulturách *in vitro* a v *in vivo* podmínkách.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Kateřina Klimková

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

Consultant: Assoc. Prof. Kateřina Valentová, Ph.D.

Title of Thesis: Determination of the stoichiometry of the copper complexes with dehydrosilybin A

Silymarin, the standardized extract of the milk thistle (*Silybum marianum*), is a widely used approved over-the-counter drug that is recommended for a number of liver diseases. Silymarin contains as one of its components 2,3-dehydrosilybin A, which has an appropriate metal binding site in its structure. In general, flavonolignans, due to their structure, can interact with transition metals in the gastrointestinal tract by forming complexes. This property can be useful for the protection against excessive amounts of metals in the body. The aim of this *in vitro* study was to analyse the interaction of 2,3-dehydrosilybin A with copper, which plays a crucial role in the organism as a cofactor of many enzymes. Although being an essential element, it can, however, be toxic at elevated levels. Stoichiometry, as one of the most important characteristics of the complex, was determined by UV-Vis spectrophotometry in four (patho)physiological pH conditions (4.5; 5.5; 6.8; 7.5) using two non-competitive methods: the Job's Method and the Complementary method. Principles of the methods are different. In the Job's method the concentration of both components is changing, while total concentration is constant. During the complementary approach the molar concentration of chelator is changing while the concentration of metal is kept constant. 2,3-Dehydrosilybin A was found to be a moderately active Cu^{2+} chelator. The final stoichiometry was 2:1 or 3:1, flavonolignan: Cu^{2+} . The 2:1 stoichiometry was changing depending on the conditions due to the excess of the tested substance in the 3:1 stoichiometry. In contrast, Cu^+ ions were not bound by 2,3-dehydrosilybin A in none of the tested conditions. These *in vitro* results could be used in the future as a basis for a more detailed characterization of the effect of 2,3-dehydrosilybin A on the absorption of copper in cell cultures at *in vitro* level and *in vivo* conditions.

Obsah

1	Seznam zkratek	1
2	Úvod.....	2
3	Teoretická část	3
3.1	Fyziologický význam mědi v organismu	3
3.2	Farmakokinetika mědi v organismu	5
3.3	Homeostáza mědi	7
3.4	Měď a oxidační stres	7
3.5	Patofyziologie mědi	8
3.5.1	Nedostatek mědi v lidském organismu	8
3.5.2	Nadbytek mědi v lidském organismu	9
3.6	Chelatace a chelatační terapie	12
3.6.1	Klinicky využívané chelátory mědi	12
3.6.2	Vlastnosti chelátorů	15
3.7	Flavonoidy a flavonolignany.....	17
3.8	Silybum marianum	17
3.8.1	Obsahové látky extraktu semen	18
3.8.2	Biologické účinky extraktu	19
3.8.3	Nežádoucí účinky a toxicita.....	22
3.8.4	Léčivé přípravky s obsahem <i>Silybum marianum</i>	23
3.8.5	2,3-Dehydrosilybin A.....	23
4	Cíl práce.....	24
5	Experimentální část.....	25
5.1	Materiály a přístroje	25
5.1.1	Chemikálie	25
5.2	Pracovní postupy	25
5.2.1	Příprava roztoků.....	25
5.2.2	Kalibrace iontů mědi.....	26
5.2.3	Ionty mědi a pH prostředí	27
5.2.4	Stanovení absorpčních maxim DHSA a komplexu DHSA s mědí	27
5.2.5	Stanovení molárních absorpčních konstant	28
5.2.6	Jobova metoda	29
5.2.7	Komplementární metoda.....	29
5.2.8	Matematická a statistická analýza.....	31
6	Výsledky	34
7	Diskuze	48
8	Závěr	51
9	Zdroje.....	52

1 Seznam zkratek

ATP7A	ATPasa zodpovědná za vyloučení mědi z enterocyty
ATP7B	ATPasa zodpovědná za vyloučení mědi z hepatocyty
BCS	disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny
DHSA	2,3- dehydrosilybin A
D-pen	D-penicilamin
EDTA	ethylendiamintetraacetát
GSH	glutathion
hCTR	lidský transportér pro měď
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
MT	metallothionein
ROS	reaktivní formy kyslíku (z anglického „reactive oxygen species“)
SOD	superoxiddismutasa
TTM	tetrathiomolybdenan amonný
TYR	tyrosinasa
UV-Vis	ultrafialovo-viditelná
WD	Wilsonova choroba (z anglického Wilson's disease)

2 Úvod

Měď je třetím nejhojněji zastoupeným stopovým prvkem v lidském organismu. Jako nezbytný kofaktor enzymů se podílí na řadě důležitých metabolických procesů, mezi které patří buněčné dýchání, biosyntéza neurotransmiterů, aktivace peptidových hormonů, vychytávání volných radikálů či zesíťování elastinu, kolagenu a keratinu. Je nezbytná také pro homeostázu železa, účastní se procesu koagulace a angiogeneze (Tümer a Møller, 2010).

Měď může existovat v oxidovaném a redukovaném stavu, přičemž právě reverzibilní přeměna mezi těmito dvěma stavy je základem mnoha významných enzymatických reakcí. Navzdory své důležité roli však tato reakce může být také důvodem toxicity mědi při její zvýšené hladině. Redukovaná měď je schopna potencovat Fentonovou reakci, jejímž výsledkem je produkce volných radikálů, které mají škodlivé účinky na organismus (Tümer a Møller, 2010; Pham et al, 2013).

Dehydrosilybin A je jeden z flavonolignanů vyskytujících se vedle hlavní komponenty silybinu v silymarinovém komplexu, což je standardizovaný extrakt semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*), užívající se tradičně k léčbě jaterních a žlučnickových onemocnění jako jsou hepatitida či cirhóza a k ochraně jater před otravou chemikáliemi a přírodními toxiny (Morazzoni a Bombardelli, 1995; Šimánek et al, 2000). Vedle hepatoprotektivního účinku si silymarin získal pozornost také díky antioxidační, protinádorové či chemoprotektivní aktivitě, která je odrazem jeho schopnosti inhibovat toxický účinek mnoha chemikálií. Díky tomu má potenciál využití jako adjuvans při léčbě chemoterapeutiky. Další slibné aktivity jsou hypocholesterolemická, kardioprotektivní či neuroprotektivní (Gažák et al, 2007).

V současnosti je extraktu věnována velká pozornost, neboť je hojně užíván v podobě výživových doplňků, ale také jako schválený léčivý přípravek k podpurné léčbě toxického poškození jater, chronického zánětlivého onemocnění jater nebo při jaterní cirhóze.

Samotné flavonolignany jsou díky své struktuře schopny interagovat s kovy tvorbou komplexů. Toho lze využít při ochraně před nadměrným množstvím mědi v organismu, zejména ve spojitosti se zmíněnou Fentonovou reakcí k ochraně organismu před škodlivými volnými radikály. Jedna z nejdůležitějších charakteristik komplexu je stechiometrie, jež nebyla doposud u flavonolignanů ostropestřce příliš prozkoumána.

3 Teoretická část

3.1 Fyziologický význam mědi v organismu

Měď je po železe a zinku třetím nejhojněji zastoupeným stopovým prvkem organismu. Pro zdraví a správný rozvoj lidského těla je důležitý optimální nutriční příjem mědi. Doporučená denní dávka mědi je 0,9 mg. Její zvýšený příjem (1,0 – 1,3 mg) je potřeba především během těhotenství a laktace. Množství 2-3 mg je považováno za bezpečné a zabraňuje deficitu mědi, více než 5 mg je pak považováno za toxické. Mezi potraviny s vysokým obsahem mědi patří mořské plody, vnitřnosti, obiloviny a luštěniny, oříšky, některé ovoce (např. citrón, rozinky, kokosový ořech, papája či jablka), rajčata, červené maso a houby. Tabulka 1 uvádí 10 potravin s nejvyšším obsahem mědi (Collins et al, 2010; Trumbo et al, 2001; Squitti et al, 2014).

Tab. 1: 10 potravin s nejvyšším obsahem mědi

<i>Potravina</i>	<i>Obsah mědi (mg/100 g)</i>
Játra (telecí)	15
Ústřice	1-8
Sezamová semínka	4,1
Kakao	3,8
Oříšky (kešu)	2,2
Mořské plody (kalamáry)	2,1
Slunečnicová semínka	1,8
Sušená rajčata	1,4
Dýně	1,4
Sušená bazalka	1,4

Upraveno dle: Squitti et al, 2014

Měď se podílí na správném vývoji a funkci nervového a kardiovaskulárního systému, je zásadní pro reprodukci a imunitní systém, také pro kůži a kosti. Je nezbytným kofaktorem enzymů podílejících se na řadě důležitých metabolických procesů, mezi které patří buněčné dýchání, biosyntéza neurotransmiterů, aktivace peptidových hormonů, vychytávání volných radikálů či zesíťování elastinu, kolagenu a keratinu. Je nezbytná také pro produkci melaninu. Má významný vliv na organismus také proto, že je důležitá pro homeostázu železa, účastní se procesu koagulace a angiogeneze. Enzymy zodpovědné za tyto procesy shrnuje Tab. 2 (Tümer a Møller, 2010; Tegoni et al, 2014).

Tab. 2: Shrnutí vybraných metabolických procesů a kuproenzymů, které je katalyzují

<i>Metabolické procesy</i>	<i>Enzymy</i>
Buněčné dýchání	<i>cytochrom-c-oxidasa</i>
Biosyntéza neurotransmiterů	<i>dopamin-β-hydroxylasa</i>
Aktivace peptidových hormonů	<i>peptidyl-α-aminová monooxygenasa</i>
Vychytávání volných radikálů	<i>superoxid-dismutasa</i>
Zesíťování elastinu a kolagenu	<i>lysyloxidasa</i>
Zesíťování keratinu	<i>sulphydryloxidasa</i>
Produkce melaninu	<i>tyrosinkinasa</i>
Homeostáza železa	<i>ceruloplasmin a hephaestin</i>

V organismu může měď existovat ve dvou oxidačních stavech, jako Cu^+ a Cu^{2+} , přičemž právě reverzibilní přeměna mezi těmito dvěma stavy je základem mnoha významných enzymatických reakcí. Oxidovaný (Cu^{2+}) a redukovaný (Cu^+) kation mědi vykazují rozdílné vlastnosti. Za laboratorních podmínek není Cu^+ stálý ve vodném prostředí a je lehce oxidován na Cu^{2+} . Standardní redukční potenciál tohoto páru $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ je 0,153 V, což svědčí o nízké tendenci Cu^{2+} být redukován (Tegoni et al, 2014).

3.2 *Farmakokinetika mědi v organismu*

Absorpce

Měď z potravy je absorbována zejména v horní části tenkého střeva. Pro transport přes apikální membránu do enterocyty musí být nejdříve zredukována z Cu^{2+} na Cu^+ . Mezi enzymy zodpovědné za redukci mědi patří cytochrom b železnato/měďnatá reduktasa, metaloreduktasa STEAP 2 a cytochrom b reduktasa 1.

Měď je poté do enterocyty transportována v redukované formě převážně prostřednictvím energeticky nezávislého lidského transportéru hCTR1 (human copper transporter 1) s vysokou afinitou pro měď. Vedle tohoto transportéru se v menší míře na transportu mědi podílejí také CTR2 transportér s nízkou afinitou a pravděpodobně také DMT1 (divalent metal transporter) a skupina ZIP transportérů pro zinek a železo (zinc-regulated and iron-regulated transporter-like proteins).

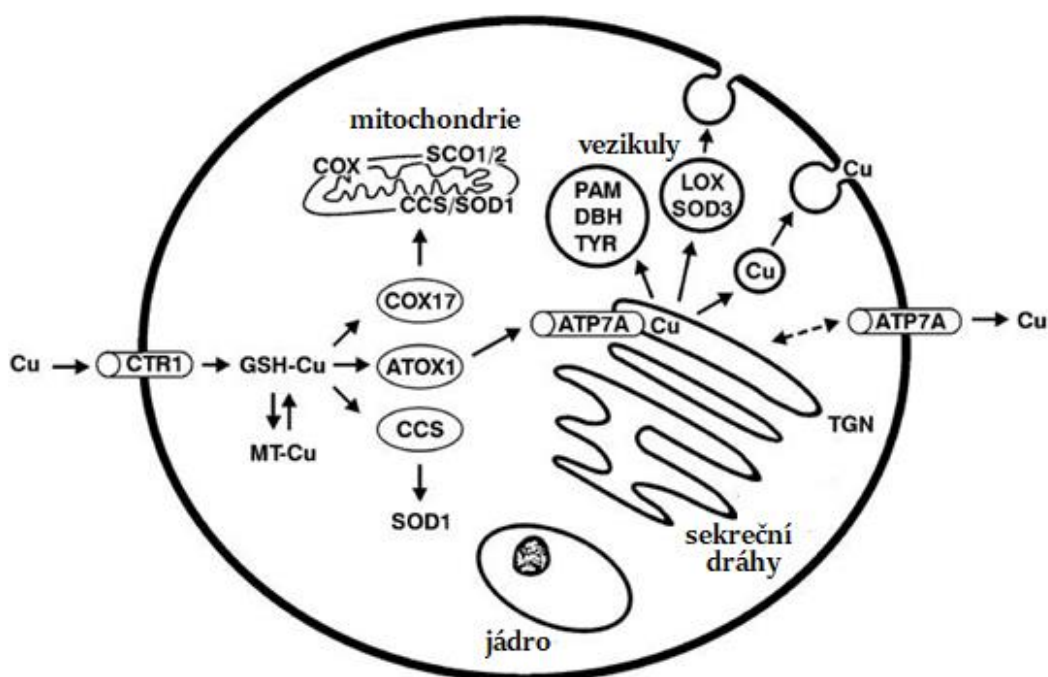
Uvnitř enterocyty je měď vázána na proteinové chaperony, které dopravují měď k ostatním organelám buňky. Přebytková měď je v buňkách pevně vázána mj. metallothioneiny (MT), které brání její absorpci do cirkulace. Z enterocyty se měď následně dostává pomocí speciální ATPasy ATP7A do intersticiální tekutiny a poté do portální krve (Devi et al, 2016; Collins et al, 2010; Tumer a Moller, 2010; Tegoni et al, 2014; Squitii et al, 2014; Guerinot et al, 2000).

Distribuce a eliminace

Z portální cirkulace se měď vázaná ve formě Cu^{2+} na α -makroglobulin nebo albumin transportuje do jater, která jsou centrálním orgánem pro zásobování a homeostázu mědi. Dvnitř hepatocyty vstupuje opět díky hCTR1 transportéru po redukci na Cu^+ . Uvnitř buňky v cytoplasmě je měď opět vázána na malé proteiny jako je MT či glutathion nebo na chaperony specifické pro měď. Hladina volné mědi je tedy opět minimální, a díky tomu je buňka chráněna před toxickým účinkem volných iontů mědi.

Stejně jako v enterocyty, tak i v hepatocyty spočívá úloha chaperonů v přenosu mědi do různých organel buňky. Chaperon COX17 transferuje měď k mitochondriím, aby mohla být inkorporována do cytochrom-c-oxidasy, CCS chaperon transferuje měď v cytosolu nebo k mitochondriím pro superoxiddismutasu 1 (odtud anglický název copper chaperone for superoxide dismutase). Chaperon ATOX1 (antioxidant 1) je protein transportující měď k jaterní ATPase ATP7B přítomné na membráně Golgiho aparátu, která je zodpovědná za inkorporaci mědi do ceruloplasminu (CP) a jiných kuproproteinů.

Z jater je měď ve vazbě na ceruloplasmin sekretována do krve a krví se transportuje do ostatních tkání, např. do ledvin či mozku. Nadměrné množství mědi stimuluje translokaci ATP7B z Golgiho aparátu do kanálků membrány hepatocytu umožňující sekreci mědi ve vazbě na MT do žluči, což je hlavní exkrekční cesta mědi. Fyziologická exkrece močí je zanedbatelná. Schematicky znázorňuje osud mědi v buňce Obr. 1 (Devi et al, 2016; Collins et al, 2010; Bhattacharjee et al, 2017; Tümer a Møller, 2010; Squitti et al, 2014).



Obr. 1: Schematické znázornění transportu mědi buňkou. Měď vstupuje do buňky hCTR transportérem. V cytoplazmě je vázána na glutation (GSH), metalothioneiny (MT) nebo chaperony doručující měď k dalším organelám. Chaperon COX17 dodává měď k cytochrom-c-oxidase (COX), CCS superoxididismutase (SOD1) a ATOX1 ji transportuje k ATPase ATP7A, jež dodává měď peptidyl- α -aminové monooxydase (PAM), dopamin β -hydroxylase (DBH), tyrosinase (TYR), lisyloxidase (LOX) a superoxididismutase (SOD3). ATP7A je také zodpovědná za transport mědi z buňky. V játrech roli ATP7A zastává ATP7B.

Upraveno dle: Tümer a Møller, 2010

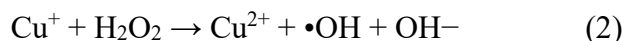
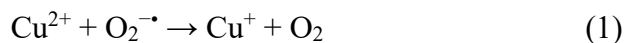
3.3 Homeostáza mědi

Navzdory své esenciální roli v enzymatických reakcích, může redoxní aktivita mědi vést k produkci volných radikálů se škodlivým účinkem na organismus. Předpokládá se, že abnormální koncentrace nevázané mědi uvnitř buňky je zodpovědná za oxidační stres a vzniklé radikály jsou zodpovědné za poškození DNA buňky. Z toho důvodu tělo disponuje komplexním mechanismem kontrolujícím příjem, distribuci, využití a exkreci mědi. Tato pečlivá regulace homeostázy mědi je životně důležitá pro všechny živé organismy (Tümer a Møller, 2010; Tegoni et al, 2014).

Volné ionty mědi se v těle prakticky nevyskytují. Jejich koncentrace se odhaduje na 10^{-13} mol/l v krvi. Převážně je měď v krvi vázána na ceruloplasmin, albumin a histidin. Ceruloplasmin je hlavní měď vázající protein v séru. Měď vázána na albumin je v rovnováze s mědí vázanou na aminokyselinu histidin a tyto dvě formy pravděpodobně vytváří pufrovací systém zodpovědný za dostatek mědi v tkáních, stejně jako ochranu před toxicitou mědi (Tümer a Møller, 2010).

3.4 Měď a oxidační stres

Volná měď se může v organismu účastnit tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS, „reactive oxygen species“), způsobující poškození různých biologických struktur, a to dvěma mechanismy. Prvním z nich je mědí katalyzovaná Fentonova reakce. Měďnaté ionty v přítomnosti superoxidového aniontového radikálu nebo reduktantu, jako je například GSH či askorbová kyselina, mohou být zredukovány na měďné (rovnice (1)). Měďné ionty jsou schopné katalyzovat tvorbu ROS během rozkladu peroxidu vodíku Fentonovou reakcí (rovnice 2, Aruoma et al, 1991; Prousek, 1995; Barbusinski, 2009):



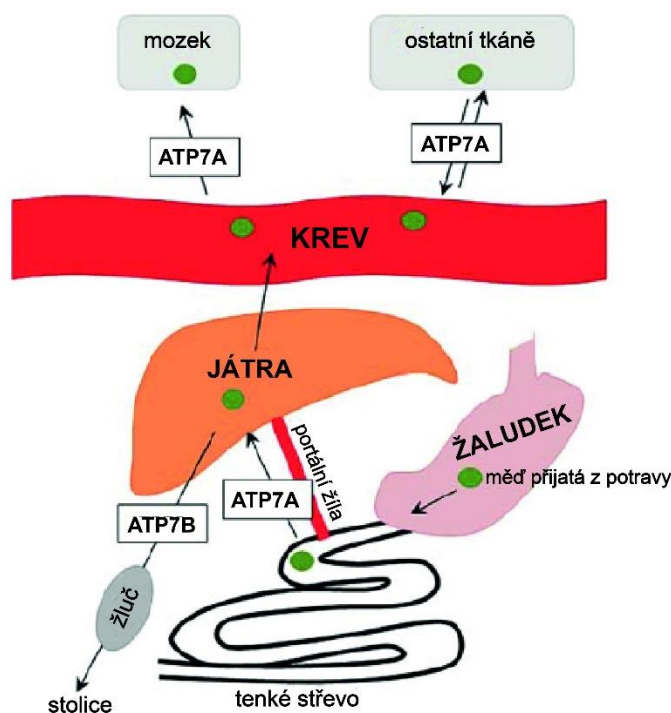
Vzniklý hydroxylový radikál je extrémně reaktivní a může reagovat prakticky s jakoukoliv biologickou molekulou v blízkém okolí. Například odtržením vodíku zanechávající uhlíkový radikál může tvořit třeba lipidový radikál z nenasycených mastných kyselin. Prostřednictvím ROS je měď také schopna způsobit trhliny v řetězci DNA či oxidaci bází (Jomova a Valko, 2011).

Měď může indukovat oxidační stres ještě druhým mechanismem. Expozice

zvýšené hladině mědi významně snižuje hladiny glutathionu, který je substrátem několika enzymů neutralizujících ROS a mimo to je velice silným buněčným antioxidantem přítomným v buňkách v milimolárních koncentracích. Podílí se na metabolismu a detoxikaci mědi. Její nízké volné hladiny udržuje chelatací (Jomova a Valko, 2011).

3.5 Patofyziologie mědi

Poruchy homeostázy mědi mohou vést k rozvoji různých onemocnění. Neaktivita ATPasy ATP7A je spojena se selháním transportu mědi do krevního oběhu, a tím dochází k systémovému nedostatku mědi nazývanému Menkesova choroba. Genetická mutace inaktivující ATP7B pak vede k selhání exkrece mědi, jejímž výsledkem je akumulace mědi v játrech, mozku a dalších orgánech, zvaná Wilsonova choroba. Roli těchto ATPas znázorňuje Obr. 2 (Bhattacharjee et al, 2017).



Obr. 2: Schématické znázornění rolí ATPas v regulaci a distribuci mědi přijaté z potravy
Upraveno dle: Tegoni et al, 2014

3.5.1 Nedostatek mědi v lidském organismu

Dědičný deficit mědi

Menkesova choroba (MD) je dědičné onemocnění vázané na X chromozom,

proto je většina pacientů mužského pohlaví. Choroba je způsobená mutacemi v genu ATP7A. Tento výše zmíněný protein pro transport mědi je široce exprimován v lidských tkáních a umožňuje mědi vstoupit z enterocyty do krevního řečiště a exportovat přebytečnou měď z buňky. Mutace ATP7A zabraňují absorpci mědi na střevní úrovni, a tím způsobují nedostatečnou dodávku mědi do enzymů v ostatních tkáních. Měď se tak hromadí hlavně v tenkém střevě a ledvinách, zatímco mozek a další tkáně mají neobvykle nízké hladiny (Tümer a Møller 2010, 2010; Bertini and Rosato, 2008; Kaler et al, 1994).

Projevy nemoci se odvíjejí od následné nedostatečné aktivity enzymů obsahujících měď (takzvaných „kuproenzymů“). Sníženou funkcí CP dochází k anemii a neutropenii. Pokles v aktivitě lysyl-oxidasy vede k nedostatečné syntéze kolagenu, a tím ke změnám na kostech a cévní stěně. Narušené funkce cytochrom-c-oxidasy, dopamin β-hydroxylasy a SOD1 mají za následek degeneraci neuronů a demyelinizaci mozkové tkáně (Masopust a Průša, 2004).

Mezi charakteristické rysy onemocnění patří opožděný mentální vývoj a růst, zahrnující neobvyklé řídké a šedavé vlasy s kudrlinkou (nazývané “kinky” nebo “steely hair”), mentální retardaci a slabý svalový tonus, později nahrazený spasticitou, záchvaty křečí a slabostí končetin. Četné jsou cévní, urogenitální a skeletální abnormality včetně spontánních zlomenin způsobených generalizovanou osteoporózou. Mezi pozdní projevy choroby patří slepota, subdurální hematom a selhání dýchání. Většina pacientů umírá před třetím rokem života kvůli infekci, vaskulárním komplikacím nebo samotné neurologické degeneraci (Tümer a Møller, 2010). Účinná léčba onemocnění neexistuje, ale včasné parenterální či subkutánní doplnění mědi ve vazbě na histidin může napravit některé z neurologických příznaků (Tümer a Møller, 2010).

Získaný deficit mědi

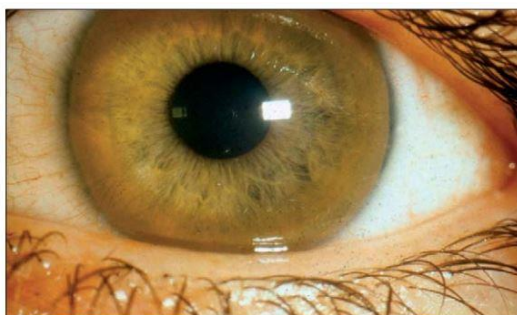
Nedostatečný nutriční příjem mědi se může jak u kojenců, tak u dospělých projevit změnami na kostech, anemií či neutropenií (Masopust a Průša, 2004).

3.5.2 Nadbytek mědi v lidském organismu

Nejčastější příčinou nadbytku mědi v organismu je Wilsonova choroba (WD). WD je autosomálně recesivní dědičné onemocnění způsobené mutací genu ATP7B kódujícího P-typ ATPasy. Tento transportér je exprimovaný zejména v játrech a jeho funkce spočívá v transmembránovém přenosu mědi v hepatocytech. Nedostatečná funkce ATP7B zapříčiňuje snížené vylučování mědi z hepatocyty do žluči a selhání inkorporace

mědi do CP s následnou akumulací mědi v játrech. Uvolnění volné mědi z těchto mědi nasycených hepatocytů do krevního oběhu vede k její kumulaci v jiných orgánech zejména mozku, ledvinách a rohovce, jež jsou následně hromaděním mědi poškozeny (Masopust a Průša, 2004; Roberts a Schilsky, 2008).

Typickým, i když ne ve všech případech se vyskytujícím, projevem akumulace mědi v rohovce je Kayserův-Fleischerův prstenec (Obr. 3), což je zlatohnědý proužek na rohovce. Hlavní klinické příznaky nemoci lze rozdělit na tři hlavní formy manifestace: jaterní, neurologické a psychiatrické. Jaterní příznaky mohou být velmi variabilní – od asymptomatických stavů s biochemickými abnormalitami až po akutní selhání jater. Nejdůležitější příznaky shrnuje Tab. 3 (Masopust a Průša, 2004; Roberts a Schilsky, 2008; Ala et al, 2007).



Obr. 3: Kayserův-Fleischerův prstenec – Zlatohnědé zbarvení na vnějším okraji rohovky jako projev akumulace mědi při Wilsonově chorobě

Převzato z: Ala et al, 2007

Současná terapie WD má za cíl snížit přetížení organismu mědi a jeho příznaky. Pro účinnou léčbu onemocnění je klíčová včasná diagnóza. Mezi léčiva onemocnění patří chelátory mědi, jako jsou D-penicilamin a trientin, jež jsou schopny na sebe navázat měď a zvýšit tak její vylučování z těla močí a tetrathiomolybdenan, který tvoří tripartitní komplex s mědí a proteiny buď ve střevě, kde brání absorpci mědi, nebo v systémovém řečišti, čímž znemožní volné mědi dostat se do buněk. Vedle chelátorů se v kombináční a udržovací léčbě často uplatňují soli zinku s minimem nežádoucích účinků. Zinek blokuje absorpci mědi ve střevě indukcí enterocytového metallothioneinu. U pacientů s WD bývají nízké sérové i hepatické hladiny vitamínu E, proto se tento antioxidant podává při terapii jako adjuvant. Pacienti by se měli, alespoň po první rok léčby, vyhnout potravinám s vysokým obsahem mědi. U pacientů s těžkým poškozením jater nereagujících na léčbu se uplatňuje transplantace jater (Ala et al, 2007; Wighelinkuizen et al, 2009; Roberts a Schilsky, 2008; Kodama et al, 2012).

Tab. 3: Manifestace Wilsonovy choroby

<i>Forma</i>	<i>Příznaky</i>
Jaterní	<ul style="list-style-type: none">• <i>Asymptomatická hepatomegalie</i>• <i>Isolovaná splenomegalie</i>• <i>Trvale zvýšené sérové hladiny aminotransferas (aspartátaminotransferasy a alaninaminotransferasy)</i>• <i>Steatóza a cirhóza jater</i>• <i>Akutní, chronická a autoimunitní hepatitida</i>• <i>Akutní selhání jater</i>
Neurologická	<ul style="list-style-type: none">• <i>Poruchy pohybu (třes, mimovolné pohyby)</i>• <i>Poruchy chůze a řeči, slintání</i>• <i>Rigidní dystonie</i>• <i>Migrenózní bolesti hlavy</i>• <i>Nespavost, záchvaty</i>
Psychiatrická	<ul style="list-style-type: none">• <i>Deprese</i>• <i>Psychózy, Neurózy</i>• <i>Poruchy osobnosti</i>
Ostatní	<ul style="list-style-type: none">• <i>Oční: Kayserův-Fleischerův prstenec, slunečnicové katarakty</i>• <i>Kardiomyopatie, dysrytmie</i>• <i>Renální abnormality – aminoacidurie, nefrolitiáza</i>• <i>Hypoparathyroidismus</i>• <i>Osteoporóza, artritida</i>• <i>Poruchy menstruace, opakované potraty, neplodnost</i>

Upraveno dle: Ala et al 2007, Roberts a Schilsky, 2008

Změna metabolismu mědi může být spojena s dalšími chronickými onemocněními, jako například diabetem nebo kardiovaskulárními chorobami včetně aterosklerózy. Pacienti s diabetem vykazují zvýšenou koncentraci mědi v plazmě, která může reagovat s glykovanými bílkovinami při tvorbě volných radikálů a zvýšit tak oxidační stres. V souladu s tím při přetížení mědi bývají pozorovány komplikace diabetu (např. hypertenze a retinopatie). Také interakce mezi mědí s homocysteinem je spojena s tvorbou volných radikálů vedoucí k oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou, což vede k progresi aterosklerózy (Squitti et al, 2014).

Zvýšenou hladinu mědi lze pozorovat také u specifických nádorových onemocnění, jako jsou například rakovina prsu, děložního čípku, vaječníků, plic, prostaty či žaludku a leukémie. Oxidační stres související se zvýšenou hladinou volné mědi vede k aktivaci několika faktorů zapojených do predispozice ke vzniku a progresi nádoru (např. zvýšený bazální metabolismus, mitochondriální mutace a aktivace cytokinů, Squitti et al, 2014).

Měď může hrát klíčovou roli také v patogenezi Alzheimerovy choroby (AD). Vedle tzv. "amyloidní kaskády", která je dosud nejpopulárnější hypotézou vzniku AD, může i mědí katalyzovaná Fentonova reakce a s ní spojený oxidační stres hrát klíčovou roli v poškození mozku. Měď je zodpovědná také za patologickou interakci s beta-amyloidovým proteinem, jejichž vazba může způsobit oxidační stres, produkci H_2O_2 a vznik beta-amyloidových plaků (Squitti et al, 2014).

Kromě AD jsou i jiná neurodegenerativních onemocnění (např. Parkinsonova choroba, choroby způsobené priony, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza) charakterizovány přítomností vysokého množství mědi v amyloidních placích v mozku naznačující podobný toxický efekt mědi ve všech těchto poruchách (Tegoni et al, 2014).

3.6 Chelatace a chelatační terapie

Chelatace má svůj původ v řeckém slově *chele*, označující klepeto, naznačující přilnavost a držení silným uchopením. Chelatační činidla jsou organické nebo anorganické sloučeniny schopné vázat ionty kovu za tvorby komplexu nazývaného chelát. Ve své struktuře obsahují vazebné atomy, tzv. "ligandy", tvořící koordinačně-kovalentní vazby. Nejčastějšími ligandy jsou atom síry, kyslíku a dusíku (Flora a Pachauri, 2010).

Chelatační činidla se terapeuticky využívají při léčbě intoxikace a přetížení

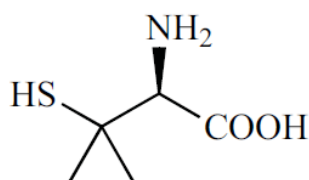
těžkými kovy. Chelatační látka je schopna na sebe navázat a vyloučit redoxně aktivní kov z organismu, zejména močí. Cílem chelatační terapie je zabránit nebo zvrátit zdravotní problémy osob vystavených vysokým hladinám kovů (Flora a Pachauri, 2010; Jomova a Valko, 2011).

Mezi nejstarší látky klinicky využívané při intoxikaci kovy patří 2,3-dimerkaptopropanol (známý také pod zkratkou BAL z anglického triviálního názvu British AntiLewisite), používající se zejména při intoxikaci rtutí, kadmiem či arsenem a ethylendiamintetraacetát (EDTA) s využitím při intoxikaci olovem. Limitací těchto antidot je nutnost parenterálního podání, jejich vlastní toxicita a redistribuce toxických kovů do mozku (Aaseth et al, 2015; Jomova a Valko, 2011).

3.6.1 Klinicky využívané chelátory mědi

Mezi nejznámější a nejrozšířenější chelatační činidla mědi, využívající se především v terapii WD, patří D-penicilamin (D-pen), trentin (triethyletetramin, trien) a tetrathiomolybdenan amonný (TTM, Tegoni et al, 2014).

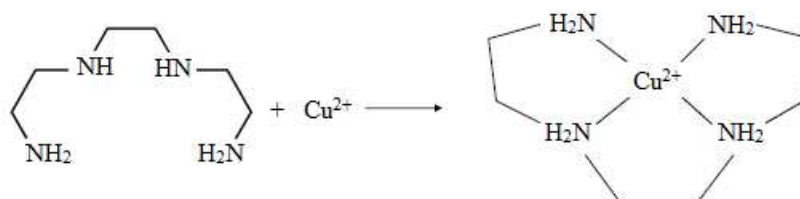
D-Penicilamin je aminokyselina cystein substituována dvěma methylovými skupinami. Za chelataci je zodpovědná volná sulfhydrylová skupina v postranním řetězci (Obr. 4). Je zajímavé, že jeho chelatační aktivita vůči mědi je relativně slabá (Říha et al, 2013), a tak není úplně jasné, jakým mechanismem dosahuje výrazné zvýšení exkrece mědi močí. Vedle tohoto exkrece účinku se také může u některých jedinců s WD uplatnit schopnost indukovat výše popsaný metallothionein, v podstatě endogenní chelátor obsahující ve velkém množství aminokyselinu cystein. Limitací D-pen jsou početné nežádoucí účinky, mezi které patří například hypersensitivní reakce spojené s horečkou a vyrážkou, hematologické poruchy zahrnující neutropenii, trombocytopenii či aplastickou anémii, nefrotický syndrom charakterizovaný proteinurií a v neposlední řadě poškození kůže. Společně s D-pen by měl být zejména u dětí, těhotných žen a pacientů s malnutricí doplňován pyridoxin, jelikož metabolismus tohoto vitamínu může být D-pen ovlivněn. Další nevýhodou je jeho hydrofilita bránící proniknout hematoencefalitickou bariérou. Navíc je u něj incidence neurologického zhoršení nejvyšší z používaných léčiv na WD. Z tohoto důvodu se připravují a testují lipofilnější deriváty ve snaze zvýšit distribuci chelátorů včetně vnitrobuněčné aktivity (Tegoni et al, 2014; Roberts a Schilsky, 2008; Ala et al, 2007).



Obr. 4: *Struktura D-penicilaminu*

Převzato z: Tegoni et al, 2014

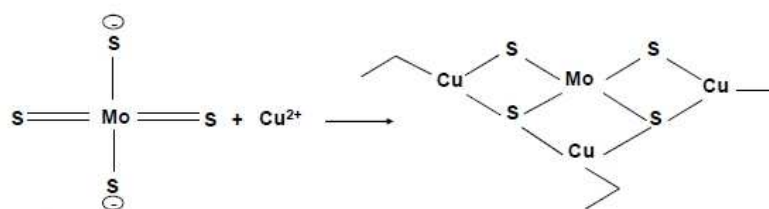
Alternativou v chelatační terapii při intoleranci D-pen je **trientin**, chemicky triethyltetraamin (Obr. 5), známý také pod zkráceným názvem trien. Je to chelátor s polyaminovou strukturou, který chelatuje měď tvorbou komplexu se čtyřmi atomy dusíku v planárním kruhu. Stejně jako D-pen působí zvýšené vylučování mědi močí. Při terapii trientinem je nutné se vyhnout podávání železa, s nímž tvoří toxický komplex. Mezi nepříliš časté nežádoucí účinky patří reversibilní sideroblastická anémie objevující se v důsledku podávání vysokých dávek a deficitního množství mědi (Tegoni et al, 2014; Roberts a Schilsky, 2008).



Obr. 5: *Trientin a tvorba komplexu s mědí*

Upraveno dle: Kodama et al, 2012

Tetrathiomolybdenan amonný (TTM) formuje tripartitní komplexy s ionty mědi a s proteiny (Obr. 6). Při podávání s jídlem formuje komplexy s mědí v potravě, a tím brání její absorpci. Naopak při podávání mezi jídly je léčivo absorbováno a tvoří komplexy s mědí a albuminem v krevním řečišti, čímž činí měď nedostupnou pro buňky. Tento komplex je metabolizován v játrech a exkretován do žluči. TTM bude pravděpodobně dobrou alternativou u pacientů s neurologickou formou WD, zatím ale není schválen Evropskou lékovou agenturou ani Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. Potenciální nežádoucí účinky zahrnují poruchy kostní dřeně či hepatotoxicitu (Tegoni et al, 2014; Ala et al, 2007; Roberts a Schilsky, 2008).



Obr. 6: Tetrathiomolybdenan a tvorba komplexu s mědí

Převzato z: Kodama et al, 2012

Vzhledem k limitacím dostupných chelátorů je stále potřeba hledat nové chelátory, které by našly uplatnění v chelatační terapii, jelikož pacienti čelí celoživotní potřebě léčiv a lékaři se často setkávají s non-adherencí. Ačkoliv probíhá v této oblasti intenzivní výzkum, klinické použití chelátorů je zatím omezeno především na WD. Jelikož je však porucha homeostázy mědi patrná v řadě dalších onemocnění, představují chelátory slibný terapeutický nástroj pro jejich léčbu. Například 8-hydroxychinoliny, zejména kliočinol, jsou neselektivní chelátory, u kterých bylo prokázáno, že mají pozitivní vliv na pacienty s Alzheimerovou nemocí a také *in vivo* na nádorech (Ala et al, 2007, Říha et al, 2013; Oliveri et al, 2012; Ritchie et al, 2013).

3.6.2 Vlastnosti chelátorů

Ačkoli je chelatace založena na jednoduché koordinační chemii, výzkum nových chelátorů a následné chelatační terapie, která odstraňuje specifický toxický kov z požadovaného místa v těle, vyžaduje integrovaný přístup. Optimální chelatace může být dosaženo díky kombinaci základních vlastností kovových iontů, chelatačních činidel i výsledného kovového komplexu. S ohledem na patofyziologii by při výzkumu nových chelátorů mědi měly být zohledňovány především tyto vlastnosti: afinita chelátoru, stabilita vytvořeného komplexu, různé pH podmínky prostředí, specifita a v neposlední řadě lipofilita chelátoru (Flora a Pachauri, 2010; Říha et al, 2013; Aaseth et al, 2015).

Aby bylo možné odstranit toxické ionty kovu z organismu, je potřeba, aby **afinita komplexotvorného činidla** k cílovému kovu byla vyšší než jeho afinita k jiným endogenním kovovým iontům, zejména těm, ke kterým jsou vázány v biologických molekulách (Aaseth et al, 2015).

Stabilitu komplexu, tedy schopnost udržet si ionty mědi silněji než přirozeně se vyskytující chelátory v organismu, ovlivňuje povaha chelatačního činidla. Zpravidla chelatační činidlo, které zaplní více koordinačních poloh iontu, poskytne komplex větší stability. Komplex by měl být samozřejmě netoxický (měl by kompletně pokrýt povrch

iontu během tvorby komplexu, a tím zabránit jeho účasti v reakcích katalyzovaných mědí, v nichž se tvoří ROS) a usnadnit vyloučení mědi z organismu, proto nás také zajímá jeho iontový náboj a metabolismus. Zatímco náboj chelátoru definuje jeho absorpci, distribuci a schopnost dosáhnout iontového kovu pro vazbu, iontový náboj komplexu rozhoduje o jeho případné intracelulární retenci, eliminaci ze specifického místa a vylučování z těla (Flora a Pachauri, 2010).

Významný vliv na tvorbu komplexu a jeho stabilitu má **pH prostředí**. Většina chelatačních činidel je nestabilní při nízkém pH, na druhou stranu při vysokých hodnotách pH mají kovy tendenci vytvářet nerozpustné hydroxidy, které jsou méně dostupné pro chelatační činidla. Tato vlastnost se stává významná v patologických stavech vedoucích k acidóze nebo alkalóze (Flora a Pachauri, 2010; Říha et al, 2013).

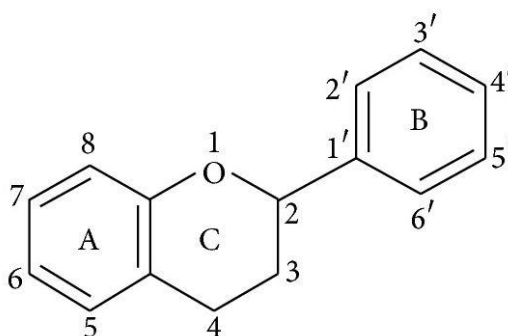
Žádoucí je **selektivní chelatace** iontů mědi a omezená interakce s jinými ionty. Neschopnost chelátoru selektivně chelatovat ionty mědi může vést ke ztrátě jiných esenciálních iontů z organismu (např. železa či zinku), což je jednou z vážných častých limitací použití chelátorů (Flora a Pachauri, 2010).

Lipofilita ovlivňuje penetraci chelátoru do buněk a centrálního nervového systému. Podstatné je, aby se chelátor transportoval přes fyziologické bariéry do kompartmentů, kde je iont kovu koncentrován (Flora a Pachauri, 2010).

V neposlední řadě by vedle chelatačních vlastností měla být ověřena i možná schopnost redukovat mednaté ionty na měďné, které mohou potencovat toxické reakce (Říha et al, 2013).

3.7 Flavonoidy a flavonolignany

Flavonoidy jsou širokou skupinou sekundárních metabolitů obsažených ve většině rostlin. Strukturálně jsou to hydroxylované polyfenolové sloučeniny obsahující ve své základní struktuře benzo- γ -pyron (Obr. 7). Ovoce a zelenina jsou hlavními zdroji flavonoidů v potravě, stejně jako čaj a víno. Díky pozitivnímu efektu na lidské zdraví, založenému zejména na antioxidační aktivitě, jejich dietní příjem v posledních letech vzrostl. Mezi flavonoidy patří poměrně malá podtřída sloučenin objevená poprvé v semenech rostliny *Silybum marianum* – flavonolignany. Flavonolignany jsou kombinací struktury flavonoidu a lignanu. Biosyntéza hlavních silymarinových flavonolignanů je oxidačním procesem katalyzovaným enzymem peroxidasou, během kterého se spojuje flavonoid taxifolin s fenylpropanoidem koniferylalkoholem (Bijak, 2017; Chambers et al, 2017; Biedermann et al, 2014; Kumar a Pandey, 2013).



Obr. 7: Základní struktura flavonoidu

Převzato z: Kumar a Pandey, 2013

3.8 *Silybum marianum*

Silybum marianum (ostropestřec mariánský) je léčivá rostlina z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*) původem z Asie a jižní Evropy, dnes však rozšířená po celém světě. Tradičně se používá již přes 2000 let k léčbě jaterních a žlučnickových onemocnění jako je hepatitida, cirhóza a k ochraně jater před otravou chemikáliemi a přírodními toxiny jako například uštknutí hadem, bodnutí hmyzem, otrava houbami či alkoholem. Existují dva druhy *Silybum marianum* - fialově kvetoucí, který obsahuje flavonolignany s hydroxylovou skupinou na uhlíku C-3, tzv. flavonolignanové taxifolinové deriváty a bíle kvetoucí druh s non-taxifolinovými flavonolignanovými

deriváty. Výzkum se (zatím) soustředí na fialově kvetoucí druh (Obr. 8). Aktivní komponentou rostliny je silymarin, oficiálně standardizovaný extrakt, získávající se ze semen (Křen a Valterová, 2005; Bahmani et al, 2015). Podle nových dat se ale ukazuje, že standardizace v případě silymarinu nezajišťuje zdaleka stejné složení (Chambers et al, 2017).



Obr. 8: *Silybum marianum*

Převzato z: Bahmani et al, 2015

3.8.1 Obsahové látky extraktu semen

Hrubý extrakt sušeného semene této rostliny obsahuje až 4% silymarinu. Silymarin obsahuje přibližně 70-80 % silymarinových flavonolignanů, z nichž hlavní komponentou je flavonolignan silybin, směs dvou diastereomerů A a B v poměru 1:1, vedle něhož se vyskytují flavonolignany jako isosilybin, dehydrosilybin, silychristin, isosilychristin, silydianin, a silymonin. Vedle flavonolignanů jsou obsaženy v plodu ostropestřce další flavonoidy (jako například taxifolin, kvercetin, dihydrokaempferol, kaempferol, apigenin, naringin, eriodyktiol, a chrysoeriol), 5,7-dihydroxychromon, dehydrokoniferylalkohol, tokoferol, steroly (cholesterol, kampesterol, stigmasterol a sitosterol), cukry (arabinsosa, rhamnosa, xylosa a glukosa), proteiny a oleje s vysokým podílem mastných kyselin (linolová kyselina, olejová kyselina, palmitová kyselina), ačkoliv ty se většinou extrakcí petroletherem odstraňují a v extraktu nevyskytují (Křen a Valterová, 2005; Bahmani et al, 2015; Bijak, 2017; Chambers, 2017).

3.8.2 Biologické účinky extraktu

Příznivé účinky ostropestřce zahrnují vedle hlavního hepatoprotektivního a antioxidačního účinku také hypocholesterolemickou, nefroprotektivní, antikancerogenní, neuroprotektivní a kardioprotektivní aktivitu, prevenci insulinové rezistence či Alzheimerovy choroby. U silymarinu se i proto zkouší jeho využití u onemocnění jiných orgánů. Zdá se, že silybin je perspektivní také pro léčení problémů se slinivkou břišní a při vyrovnávání glykémie, léčbě plicních onemocnění a onemocnění ledvin, léčbě různých onemocnění prostaty včetně adenokarcinomu a v neposlední řadě v dermatologii a kosmetice (Křen a Valterová, 2005; Bahmani et al, 2015).

Antioxidační aktivita

Význam antioxidačního působení vyplývá z přítomnosti oxidačního stresu v řadě patologických procesů. Mezi mechanismy antioxidačního působení obecně patří potlačení tvorby ROS inhibicí enzymů katalyzujících jejich vznik (např.: mikrosomální monooxygenasa, glutathion-*S*-transferasa, mitochondriální sukcinyl oxidasa, NADH oxidasa), chelatace kovů účastnících se tvorby a propagace ROS a v neposlední řadě také přímé vychytávání ROS. Antioxidační účinek je různý v závislosti na struktuře – konfiguraci, substituci a celkovém počtu hydroxylových skupin a často je kombinací více mechanismů (Kumar a Pandey, 2013).

Nejdůležitější roli v mechanismu přímého vychytávání volných radikálů u flavonolignanů ostropestřce má 3-OH skupina napojena na 2,3-dvojnou vazbu. Bylo prokázáno, že silybin a jeho deriváty bez 2,3-dvojně vazby vykazují pouze nízkou schopnost vychytávat radikály na rozdíl od derivátů obsahující 2,3-dvojnou vazbu (např.: 2,3-dehydrosilybin, Trouillas et al, 2013).

Hepatoprotektivní účinky

Hepatoprotektivní aktivita silymarinu je založena na několika rozdílných principech. Klíčovým mechanismem hepatoprotektivního účinku je antioxidační působení vychytáváním volných radikálů a regulace intracelulární hladiny glutathionu. Mezi další patří stabilizace hepatocelulární membrány a regulace její permeability bránící vstupu hepatotoxickému agens do buňky, dále inhibice přeměny hvězdicovitých hepatocytů na myofibroblasty, tedy procesu, který je zodpovědný za depozici vláken kolagenu vedoucí k cirhóze a v neposlední řadě stimulace DNA polymerasy, která vede ke zvýšení syntézy ribosomální RNA a k přestavbě jaterních buněk.

Inhibice 5-lipooxygenasy, tedy inhibice produkce leukotrienů a volných radikálů v Kupfferových jaterních buňkách, má pozitivní vliv na zvětšená játra. Při onemocnění jater se uplatňuje stimulace tkáňové regenerace zvýšením syntézy proteinů, ribozomů a DNA (Bahmani et al, 2015; Kustrak, 2000).

Hepatoprotektivní účinek silymarinu byl sledován v mnoha studiích. Například během třítydenního podávání 420 mg/den silymarinového extraktu pacientům s akutní virovou hepatitidou A nebo B, se normalizovala hladina bilirubinu u 40 % pacientů (11 % u kontrolní skupiny) a hladina aspartátaminotransferasy u 82 % (52 % u kontrolní skupiny, kdy bylo podáno placebo), čímž byl prokázán pozitivní účinek silymarinu v léčbě akutní hepatitidy (Mahady et al, 2001).

Byl pozorován také vliv na chronickou perzistující hepatitidu, kdy podávání silipidu (komplex silybinu s fosfatidylcholinem) po dobu 3 měsíců vedlo k poklesu hladin aspartátaminotransferasy a alaninaminotransferasy v séru (Fraschini et al, 2002).

Mimo to byl sledován také třeba účinek silymarinu na prevenci poškození jater způsobeného psychotropními látkami. Po devadesátidenním léčení 800 mg/den silymarinu se zlepšila jaterní funkce a zredukovalo se lipoperoxidativní poškození jater, které vzniklo jako následek léčby butyrofenonem či fenothiaziny (Fraschini et al, 2002).

Hypolipimické účinky

U silymarinu byla pozorována schopnost snižovat hladinu cholesterolu, LDL a fosfolipidů transportovaných pomocí LDL u hyperlipidemických zvířat (Škottová a Krečman, 1998). Silymarin zlepšuje exkreci LDL, snižuje syntézu cholesterolu v jaterních buňkách, má pozitivní vliv v prevenci komplikací vysokého cholesterolu a redukuje formování aterosklerotických plátů u hypercholesterolemických zvířat (Škottová a Krečman, 1998). Klinická studie, během níž hypercholesterolemičtí pacienti konzumovali 420 mg silymarinu denně, prokázala schopnost silymarinu snížit cholesterol v krvi u těchto pacientů (Nassuato et al, 1992).

Prokázalo se, že silymarin podávaný spolu s dietou obsahující vysoký podíl cholesterolu zabraňuje rozvoji hypercholesterolemie a pozitivně ovlivňuje distribuci cholesterolu mezi plazmatickými lipoproteiny. Způsobuje snížení VLDL (very low density lipoprotein) a LDL, a naopak zvýšení HDL (high density lipoprotein). Pozorována byla také snížená citlivost LDL na oxidaci. Tyto výsledky nastiňují eventuální rozšíření indikace silymarinu jako hypocholesterolemika s LDL antioxidantním účinkem (Škottová et al, 1996).

Nefroprotektivní účinky

Nedávné studie odhalují, že silymarin hraje významnou roli v udržení zdravých nejenom jater, ale i ledvin. Silymarin se koncentruje v buňkách ledvin, kde zvýšením syntézy proteinů a nukleových kyselin pomáhá regeneraci těchto buněk. Silymarin může být účinný v prevenci předčasného úmrtí způsobeného nefropatií u diabetických pacientů. Ve většině případů je poškození ledvin následkem oxidačního stresu, zánětu či fibrózy, a příznivý vliv silymarinu je nejčastěji spojován právě s jeho antioxidačním a protizánětlivým účinkem (Rafieian-Kopaie a Nasri, 2012).

Antikancerogenní účinky

Tyto účinky silymarinu jsou odrazem jeho schopnosti inhibovat karcinogenní potenciál mnoha chemikálií. Příkladem je prokázaná schopnost silymarinu inhibovat kancerogenezi kůže vyvolanou benzoyl peroxidem či 12-*O*-tetradekanoylforbol-12-acetátem (Zhao et al, 1999; Zhao et al, 2000; Agarwal et al, 1994).

Mechanismus antikancerogenního působení zahrnuje také ovlivnění receptorů, které se účastní kancerogeneze a proliferace rakovinové buňky jako je receptorová modulace mitogeneze a signálních drah buňky, a také regulace buněčného cyklu (Křen a Walterová, 2005). Například v lidském karcinomu prostaty silymarin inhibuje mitogenní signální dráhy a pozměňuje regulátory buněčného cyklu (Zi a Agarwal, 1999), což vede k inhibici růstu a ke smrti rakovinných buněk prostaty nezávislých na androgenu (Bhatia a Agarwal, 2001).

V endotelových buňkách lidské pupečnickové žíly byla popsána anti-angiogenní aktivita silymarinu spojená se snížením vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (Jiang et al, 2000), který je v rámci angiogeneze exprimován rakovinovými buňkami (Dabagh a Randles, 2019). Stejná aktivita byla popsána v souvislosti s rakovinou vaječníku, kde se prokázala „down-regulace“ receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor, tedy receptoru zodpovědného za růst nádorových buněk (Gallo et al, 2003).

Silymarin jako adjuvantní terapie rakoviny

Jedno z nejslibnějších využití silymarinu může být jako adjuvans při chemoterapii nádorových onemocnění. Zde silymarin jako antioxidant chrání tkáň před oxidačním stresem vznikajícím během chemoterapie, zejména eliminuje jejich hepatotoxicitu (Ladas a Kelly, 2003).

Pozitivní účinek na hepatotoxicitu byl pozorován například u ženy

s promyelocytární leukémií léčené methotrexátem a 6-merkaptopurinem, jejíž terapie musela být opakovaně přerušena a dávky léčiv několikrát modifikovány kvůli jaterní toxicitě. Následné přidání 800 mg silymarinu k terapii vedlo k normalizaci hladin jaterních aminotransferáz a během 4 měsíců nebylo potřeba léčbu přerušovat (Invernizzi et al, 1993).

Nefroprotektivní účinek silybinu, hlavní složky silymarinu, byl prokázán během léčby cisplatinou (Bokemeyer et al, 1996). V kultivovaných buňkách epitelové výstelky renálních tubulů byla toxicita cisplatinu snížena kvercetinem, ale jiné testované flavonoidy (katechol, silybin, rutin) nebyly účinné (Kuhlmann et al, 1998). Na základě strukturální podobnosti se dá podobný účinek předpokládat u 2,3-dehydrosilybinu obsahující kvercetin ve své struktuře (Křen a Walterová, 2005).

Neuroprotektivní účinky

Silymarin může být užitečný při léčbě a prevenci některých neurodegenerativních a neurotoxických procesů. Účinně chrání dopaminergní neurony proti lipopolysacharidem indukované neurotoxicitě tím, že inhibuje aktivaci mikroglíí představující rezidentní makrofágovou populaci mozkových buněk. Stále rostou důkazy o tom, že aktivovaná mikroglie přispívá k neuropatologickým změnám u některých onemocnění CNS (roztřoušená skleróza, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, AIDS, demence). Silymarin rovněž inhibuje produkci zánětlivých mediátorů jako je tumor nekrotizující faktor- α a oxid dusnatý, a tím snižuje škodlivý dopad na dopaminergní neurony (Wang et al, 2002).

Dalším zajímavým pozorovaným účinkem je schopnost silymarinu zvýšit expresi hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) I, který je v neuronálních buňkách a buňkách neuroblastomu obvykle potlačen, což může vést k perzistentním virovým infekcím. Indukce molekul MHC I stimuluje imunitní systém, aby byl schopen rychle identifikovat intracelulární patogeny pomocí cytotoxických T-buněk a odstranit viry z centrálního nervového systému. Proto může být silymarin užitečný při léčbě encefalidity (Sakai et al, 2001).

3.8.3 Nežádoucí účinky a toxicita

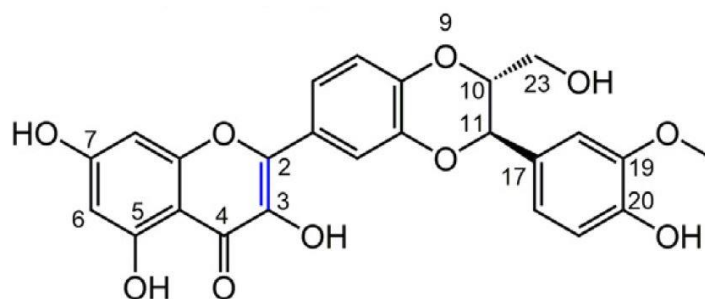
Silymarin je považován za bezpečný. Mezi nežádoucí účinky, jež se objevily ve velmi nízkých frekvencích, patří hypersenzitivní reakce, symptomy gastroenteritidy a jiné gastrointestinální potíže (Křen a Walterová, 2005).

3.8.4 Léčivé přípravky s obsahem *Silybum marianum*

Silybum marianum je složkou volně prodejných léčivých přípravků, mezi které patří Flavobion (potahované tablety obsahující 70 mg silymarinu) a Legalon (tvrdé tobolky obsahující 70 nebo 140 mg silymarinu), a také složkou léčivých přípravků na lékařský předpis – Lagosa (obalené tablety obsahující 150 mg silymarinu, <http://www.AISLP.cz>). Vedle toho je obsažen v širokém sortimentu doplňků stravy a jako sušená droga je součástí mnoha čajových směsí.

3.8.5 2,3-Dehydrosilybin A

Dehydrosilybin, derivát hlavní komponenty silymarinového extraktu silybinu, od něhož se liší přítomností 2,3-dvojnou vazbou, v přírodě existuje jako směs dvou enantiomerů - 2,3-dehydrosilybinu A a B, které se vzájemně liší konfigurací na uhlících C-10 a C-11. Hlavními strukturálními jednotkami silybinu jsou výše zmíněný taxifolin a konyferylalkohol. V jeho struktuře najdeme 5 hydroxylových skupin, z nichž 3 jsou fenolické povahy (Trouillas et al, 2008; Bijak, 2017; Sokolová et al, 2017). U 2,3-dehydrosilybinu A (Obr. 9) jsou to díky 2,3 dvojně vazbě 4 fenolické -OH skupiny.



Obr. 9: *Struktura 2,3-dehydrosilybinu A. 2,3-dvojná vazba představuje strukturální rozdíl od hlavní komponenty silymarinového komplexu silybinu (vyznačená modře).*

Převzato z: Tvrký et al, 2018

4 Cíl práce

Cílem této práce bylo analyzovat chelatační vlastnosti 2,3-dehydrosilybinu A (DHSA). Nejprve bylo nutné experimentálně zjistit, zda DHSA tvoří komplexy s Cu^+ a Cu^{2+} ionty a poté stanovit stechiometrii těchto komplexů dvěma nekompetitivními metodami za podmínek imitujících různé (pato)fyziologicky významné pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5).

5 Experimentální část

5.1 Materiály a přístroje

5.1.1 Chemikálie

DHSA byl poskytnut Laboratoří biotransformací Institutu mikrobiologie Akademie Věd ČR (konzultantem této DP), kde byl připraven oxidací silybinu A dle publikované metody (Pyszkova et al, 2016).

Kyselina chlorovodíková (37%), chlorid sodný, pentahydrát síranu měďnatého, chlorid měďný, 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethanesulfonová kyselina (HEPES), její sodná sůl, hydroxylamin hydrochlorid a disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Německo).

Methanol byl zakoupen od firmy J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Inc., USA). Ultračistá voda byla získána pomocí přístroje Milli-Q RG od firmy Merck Millipore (Massachusetts, USA).

Octanové pufrý (15 mM sodná sůl kyseliny octové a 27,3 a 2,7 mM kyselina octová, respektive) byly použity pro pH 4,5 a 5,5, zatímco HEPES pufrý (15 mM sodná sůl HEPES a 71,7 a 14,3 mM HEPES, respektive) pro pH 6,8 a 7,5.

5.1.2 Pomůcky a přístroje

Látky pro přípravu vzorků byly naváženy analytickými váhami KERN ALT-220 4NM (Kern, Německo).

Měření vzorků při kalibraci mědi probíhalo ve spektrofotometrických polystyrenových kyvetách. K měření vzorků pro stanovení tvorby komplexu a jeho stechiometrie byly použity UV-Vis kyvety.

Všechny vzorky byly měřeny pomocí UV-Vis spektrofotometru HELIOS GAMMA (ThermoScientific Inc., USA) vybaveného VisionLite softwarem 2.2 k zaznamenání absorpčních spekter. Výsledky byly zpracovány za pomoci počítačového programu Microsoft Excel.

5.2 Pracovní postupy

5.2.1 Příprava roztoků

Základní roztoky

Zásobní roztok Cu^+ (5 mM) byl připraven rozpuštěním CuCl ve vodném roztoku 0,1M

HCl a 1M NaCl v ultrazvukové vaně. Zásobní roztok Cu^{2+} 5 mM byl zhotoven rozpuštěním $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ přímo v destilované vodě stejně jako zásobní roztoky BCS (5 mM) a hydroxylamin hydrochloridu (100 mM, Říha et al, 2013).

Pracovní roztoky

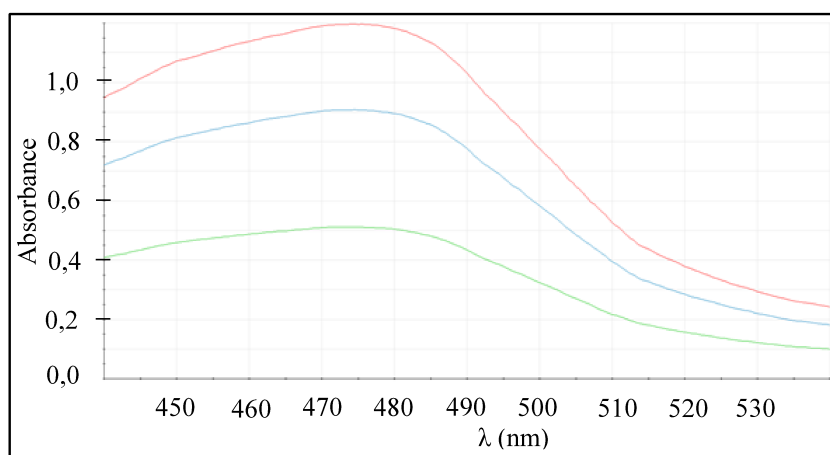
Roztoky testované látky byly připraveny rozpouštěním v methanolu – základní roztok obvykle o koncentraci 10 mM byl dále ředěn methanolem dle potřeby.

Pracovní roztoky mědi byly zhotoveny ředěním zásobních roztoků mědi vodou.

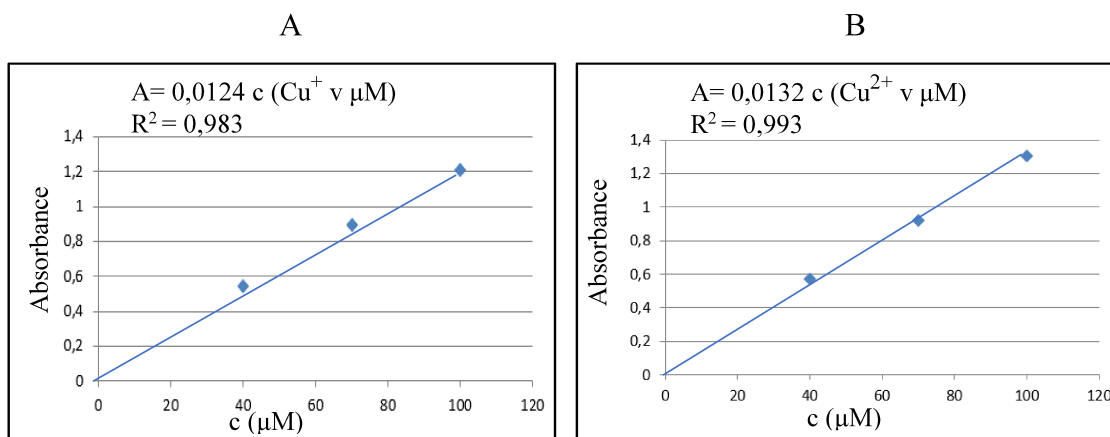
5.2.2 Kalibrace iontů mědi

Před každým experimentem byla koncentrace zásobních roztoků mědi ověřena za použití BCS. Princip této metodiky spočívá v tom, že BCS tvoří komplex s Cu^+ s absorpčním maximem při vlnové délce 484 nm. Tvorba komplexu lineárně závisí na koncentraci mědi (Říha et al, 2013). V případě Cu^{2+} je třeba tyto ionty nejdříve zredukovat na ionty měďné použitím hydroxylaminu. Hydroxylamin se používá i v případě zajištění redukčního prostředí u měďných iontů, aby byla zablokována jejich oxidace na ionty měďnaté.

Byly připraveny 3 vzorky obsahující BCS, hydroxylamin, ultračistou vodu a ionty mědi ve finálních koncentracích 40, 70 a 100 μM . Takto připravené vzorky se 1 minutu míchaly a následně se změřila jejich spektra v rozmezí 470-500 nm (Obr. 10). Z hodnot absorbancí v absorpčním maximu se sestavily a vyhodnotily kalibrační křivky (Obr. 11). Jako slepý vzorek byla použita ultračistá voda.



Obr. 10: Ilustrativní spektrum kalibrace Cu^+ BCS. Finální koncentrace mědi byla 40 μM (zelená křivka), 70 μM (modrá křivka) a 100 μM (červená křivka).



Obř. 11: A) Kalibrační křivka vyjadřující závislost naměřené absorbance na koncentraci Cu^+ . B) Kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci Cu^{2+} .

5.2.3 Ionty mědi a pH prostředí

Stechiometrie komplexu se vždy stanovovala při 4 různých fyziologicky i patofyziologicky významných pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5).

K zabránění oxidace Cu^+ iontů bylo vždy v pufru přítomno redukční činidlo hydroxylamin ve výsledné koncentraci 5 mM (Catapano et al, 2017).

5.2.4 Stanovení absorpčních maxim DHSA a komplexu DHSA s mědí

Jako první byla změřena absorpční spektra DHSA v rozmezí 220-800 nm a byla zjištěna vlnová délka absorpčního maxima testované látky ($\lambda_{s,max}$) ve všech čtyřech pH podmínkách. Stejný postup následoval pro zjištění vlnové délky absorpčního maxima komplexu DHSA s mědí ($\lambda_{c,max}$). Toto bylo provedeno změřením spekter v různých koncentračních poměrech (od 1:6 do 1:15, testovaná látka: měď). Posun absorpčního spektra, a tedy rozdíl vlnových délek absorpčních maxim DHSA a směsi DHSA s mědí, znamená pravděpodobnou tvorbu komplexu. Slepý vzorek byl složený z pufru a metanolu (použitý v experimentu jako rozpouštědlo DHSA) v poměru 2:1 (pufr : metanol). Každý vzorek byl měřen nejméně dvakrát (Catapano et al, 2018).

5.2.5 Stanovení molárních absorpčních konstant

Ke stanovení stechiometrie komplexu byly použity dvě nekompetitivní metody: Jobova metoda a komplementární metoda. Pro komplementární metodu byly ještě vypočítány molární absorpční konstanty podle Lambertova-Beerova zákona (rovnice 3). Podle něj pro absorbanci platí:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l \quad (3),$$

kde c = koncentrace absorbující látky, ε = molární absorpční koeficient látky, l = tloušťka vrstvy, přes kterou prochází záření (Ďoubal a Horáčková, 2000).

Tloušťka vrstvy 1 cm byla vždy stejná a rovnici lze tedy zjednodušit dosazením konstanty k (rovnice 4)

$$A = c \cdot k \quad (4)$$

Pro absorbanci čisté látky pak analogicky platí (rovnice 5 a 6):

$$A_s = c_s \cdot \varepsilon_s \cdot l \quad (5)$$

$$A_s = k_s \cdot l \quad (6)$$

a pro absorbanci komplexu (rovnice 7 a 8):

$$A_C = (c_{s_0} - c_s) \cdot \varepsilon_C \cdot l \quad (7)$$

$$A_C = (c_{s_0} - c_s) \cdot k_C \quad (8),$$

kde koncentrace komplexu je vyjádřena jako rozdíl počáteční (tedy do směsi přidané) koncentrace testované látky (c_{s_0}) a koncentrace nezreagované látky na konci (c_s).

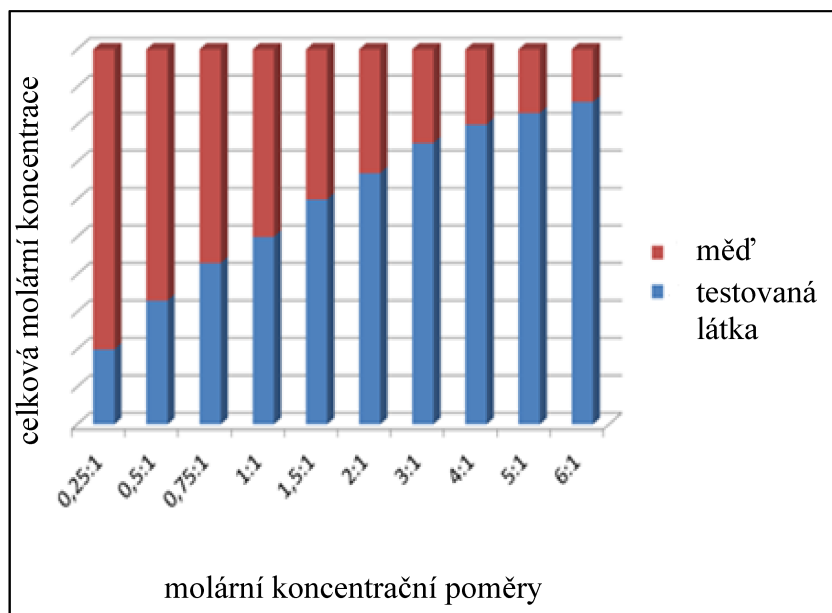
Pro zjištění stechiometrie se jako první stanoví molární absorpční koeficienty látky změřením absorbance při několika koncentracích, po přidání mědi k látce se pak zvolí stejný postup i pro komplex. U komplexu se využívá přídavek vysokého nadbytku mědi, který zajistí, že všechna testovaná látka zreaguje na komplex. Při znalosti molárních absorpčních koeficientů, respektive jejich analogicky výše definovaných konstant, je pak možné sestavit teoretické přímky nejvíce pravděpodobných stechiometrií a provést jejich porovnání s reálně naměřenými daty (Filipský et al, 2013).

5.2.6 Jobova metoda

První z metod, která byla použita a dodnes se široce používá ke stanovení stechiometrie, je Jobova metoda. Jedná se jednoduchou analytickou metodu, během níž se udržuje celková molární koncentrace dvou reaktantů konstantní, zatímco molární koncentrační poměry těchto dvou reaktantů se v sérii vzorků průběžně mění (Job, 1928).

Princip spočívá v tom, že nejvyšší množství komplexu bude vytvořeno za ideálních podmínek. Za takových podmínek poměr koncentrací odpovídá stechiometrii komplexu. Naopak, v podmínkách odlišných od těchto ideálních, bude přebytek buď kovu, nebo testované sloučeniny, které nemohou tvořit komplex, protože druhá složka v reakci chybí (Catapano et al, 2017).

Prakticky byly vodné roztoky Cu^{2+} po dobu dvou minut míchány s roztokem testované látky (koncentrace od 80 do 14 μM) v různých poměrech DHSA : měď (od 0,25:1 do 6:1, Obr. 12) ve všech pH a následně byla ihned změřena absorpční spektra. Slepý vzorek byl složen z pufru a metanolu v poměru 2:1.



Obr. 12: Poměry znázorňující provedení Jobovy metody

5.2.7 Komplementární metoda

V porovnání s Jobovou metodou se během komplementární metody průběžně mění celková molární koncentrace dvou reaktantů, zatímco konstantní se udržuje molární

koncentrace kovu (Filipský et al, 2013).

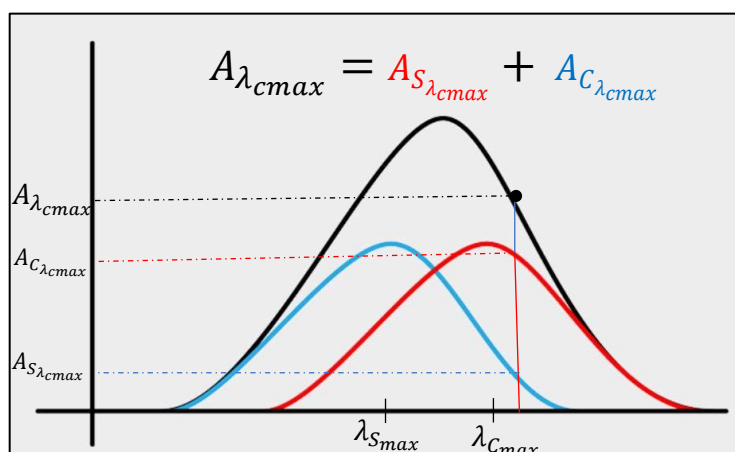
Reálně naměřená absorbance vzorku obsahující látku a kov ($A_{\lambda_{cmax}}$) je v důsledku aditivní vlastnosti absorbance složena z absorbance vytvořeného komplexu ($A_{C_{\lambda_{cmax}}}$) a absorbance části látky, která zůstala nezreagovaná ($A_{S_{\lambda_{cmax}}}$) (rovnice 9 a Obr. 13):

$$A_{\lambda_{cmax}} = A_{C_{\lambda_{cmax}}} + A_{S_{\lambda_{cmax}}} \quad (9).$$

Je-li teoreticky absorbance komplexu dostatečná ($A_{C_{\lambda_{cmax}}} > 0,1$), a zároveň absorbance látky $A_{S_{\lambda_{cmax}}}$ nulová, tak naměřená absorbance $A_{\lambda_{cmax}}$ se rovná absorbanci komplexu $A_{C_{\lambda_{cmax}}}$ (rovnice 10, Filipský et al, 2013):

$$A_{\lambda_{cmax}} = A_{C_{\lambda_{cmax}}} \quad (10).$$

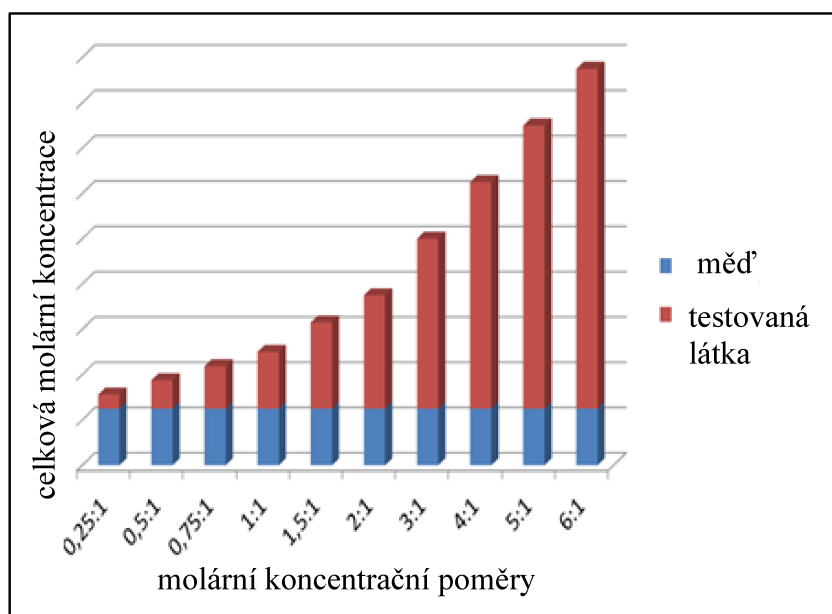
Jelikož molární koncentrace kovu je při komplementární metodě konstantní během série vzorků (Obr. 14), absorbance ze začátku roste v závislosti na tvorbě komplexu tak dlouho, dokud všechna testovaná látka nezreaguje s kovem a nevytvoří komplex. Právě v tomto bodě platí rovnice 8. Od tohoto bodu, kdy je všechn kov vyčerpán, absorbance $A_{\lambda_{cmax}}$ roste už jen v závislosti na nadbytku přidávané nezreagované látky $A_{S_{\lambda_{cmax}}}$ (Obr. 13, Filipský et al, 2013).



Obr. 13: Znáornění aditivní funkce absorbance. Naměřené absorpční spektrum (černá) je součtem absorpčního spektra nezreagované látky (modrá) a absorpčního spektra komplexu (červená).

Upraveno dle: Filipský et al, 2013

Prakticky byly během stanovování stechiometrie komplexu komplementární metodou vodné roztoky Cu^{2+} po dobu dvou minut míchány s roztokem testované látky v různých koncentračních poměrech DHSA : měď (od 0,25:1 do 6:1, Obr. 14) s konstantní koncentrací mědi (0,02 mM při pH 4,5 a 5,5 a 0,01 mM při pH 6,8 a 7,5). Slepý vzorek byl shodný s Jobovou metodou.



Obr. 14: Poměry znázorňující provedení komplementární metody

5.2.8 Matematická a statistická analýza

Všechna měření byla vždy prováděna nejméně dvakrát, a to s různými zásobními a pracovními roztoky.

Vyhodnocení Jobovy metody bylo provedeno pomocí maxima absorbance komplexu. Poměr DHSA : měď, kdy je naměřena nejvyšší absorbance při vlnové délce absorpčního maxima komplexu, odpovídá stechiometrii komplexu. Ten ve výsledném grafu odpovídá zlomu, kdy absorbance už dále neroste a naopak klesá.

V případě komplementární metody byly do grafu navíc naneseny teoretické křivky absorbance nejvíce pravděpodobných stechiometrií komplexů vypočítaných pomocí molárních absorpčních konstant DHSA a jeho komplexů s mědí v různých pH.

Molární absorpční konstanta komplexu k_c se využívá k výpočtu absorbancí při požadovaných koncentračních poměrech (rovnice 11) a k sestavení teoretické křivky komplexu znázorňující případ, kdy by byly přítomny, jak látka, tak kov, v ideálních

koncentracích pro tvorbu komplexu (Obr. 15).

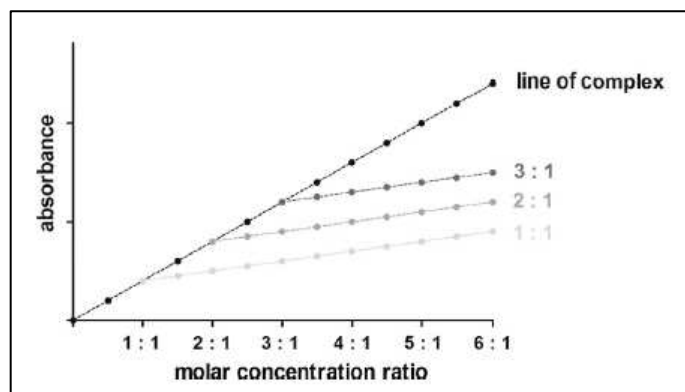
$$A_{Cal} = c_{DHSA} \cdot k_C \quad (11).$$

Koncentrace ve vzorci koresponduje s molárním koncentračním poměrem. Jelikož koncentrace mědi je vždy konstantní, pak molární koncentrační poměr 1:1 značený ve výsledných grafech 1 odpovídá $c(\text{Cu}) = c(\text{DHSA})$, molární koncentrační poměr 2:1 značený 2 odpovídá $c(\text{DHSA}) = 2 c(\text{Cu})$ atd.

Molární absorpční konstanta čisté látky k_s se využívá k výpočtu teoretických křivek jednotlivých stechiometrií. Například pro křivku znázorňující stechiometrii 1:1 (Obr. 15) se používá následující výpočet absorbance (rovnice 12), vycházející z předpokladu, že od vzorku s poměrem látka:kov = 1:1 již absorbance roste pouze v závislosti na přidávané nezreagované substanci (všechny kovy jsou již zchelatovány):

$$A = A_{1:1} + (c_{\text{přidávaný DHSA}} - c_{\text{DHSA při 1:1}}) \cdot k_s \quad (12).$$

Analogicky se sestaví ostatní teoretické křivky. Podobnost zanesených naměřených absorbancí s teoretickými křivkami (Obr. 15) pak odhaluje hledanou stechiometrii při různých molárních koncentračních poměrech (Filipský et al, 2013).



Obr. 15: Komplementární metoda V. Černá křivka znázorňuje absorbanci vytvořeného komplexu za předpokladu ideálních koncentrací látky a kovu. Světle šedá křivka odpovídá absorbanci komplexu o stechiometrii 1:1, šedá křivka představuje absorbance komplexu o stechiometrii 2:1 a tmavě šedá křivka ilustruje absorbance komplexu o stechiometrii 3:1.

Převzato z: Filipský et al, 2013

Všechna data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka vypočítaná podle

vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$, kde x je každá naměřená hodnota, \bar{x} vyjadřuje průměr všech naměřených hodnot a n vyjadřuje počet vzorků.

6 Výsledky

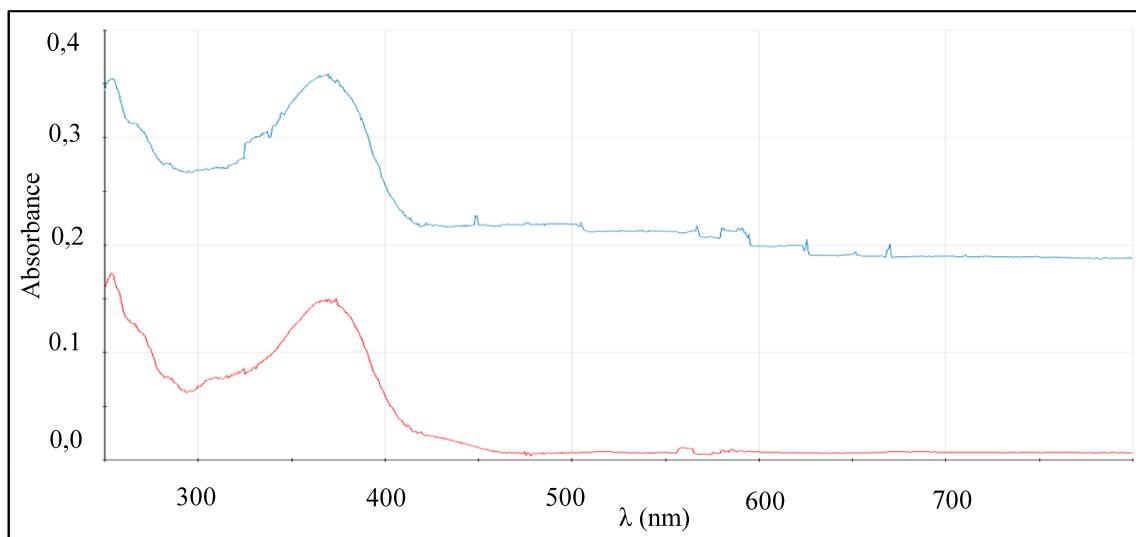
V prvním kroku bylo otestováno, zda dochází po přidání měďných nebo měďnatých iontů k DHSA ke změně absorpčního spektra. Posun absorpčního spektra totiž znamená pravděpodobnou tvorbu komplexu. V žádném případě po přidání měďných iontů nedošlo k posunu absorpčního maxima DHSA (Obr. 16-19, Tab. 4) a tvorba komplexu je tedy nepravděpodobná. Naopak po přidavku měďnatých iontů došlo ve všech pH k posunu absorpčního maxima DHSA (Obr. 20-23, Tab.5).

Tab. 4: Vlnové délky absorpčních maxim DHSA samotného a po přidání Cu^+ .

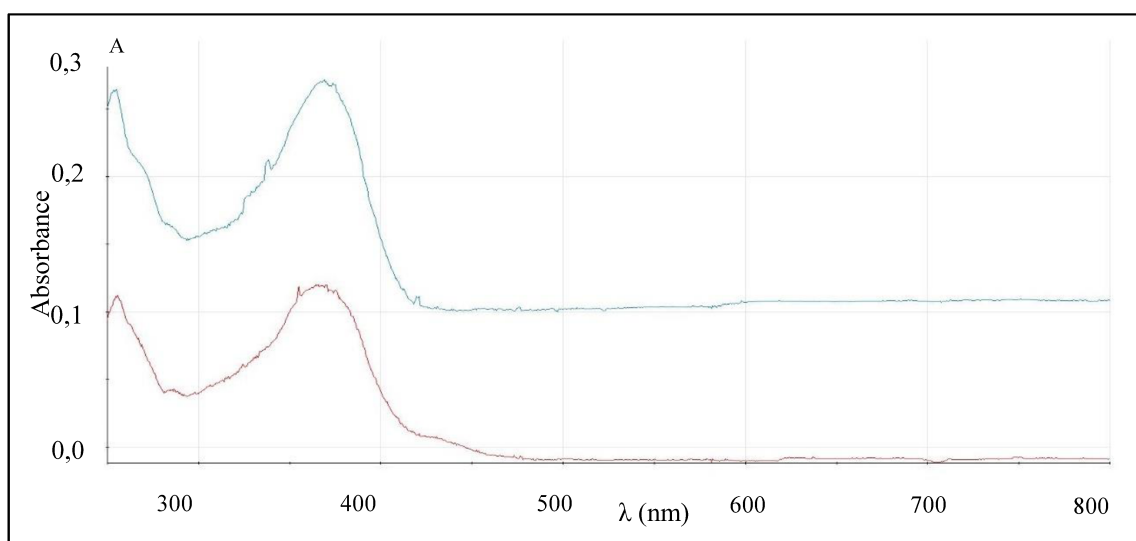
pH 4,5		pH 5,5		pH 6,8		pH 7,5	
DHSA	DHSA + Cu^+	DHSA	DHSA + Cu^+	DHSA	DHSA + Cu^+	DHSA	DHSA + Cu^+
369 nm	369 nm	369 nm	369 nm	369 nm	369 nm	369 nm	369 nm

Tab. 5: Vlnové délky absorpčních maxim DHSA samotného a po přidání Cu^{2+}

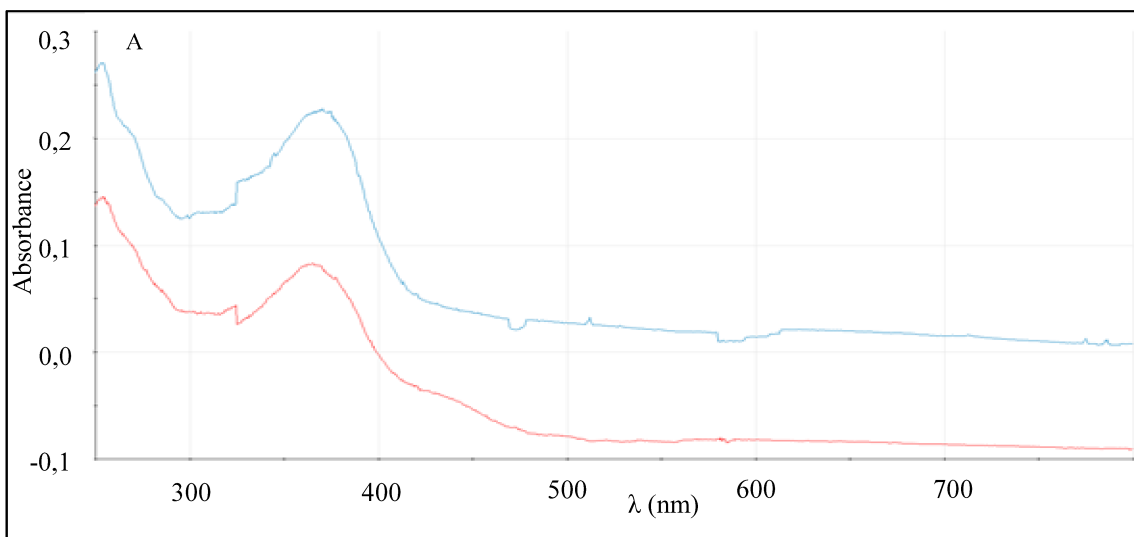
pH 4,5		pH 5,5		pH 6,8		pH 7,5	
DHSA	DHSA + Cu^{2+}	DHSA	DHSA + Cu^{2+}	DHSA	DHSA + Cu^{2+}	DHSA	DHSA + Cu^{2+}
369 nm	415 nm	369 nm	417 nm	369 nm	422,5 nm	369 nm	425 nm



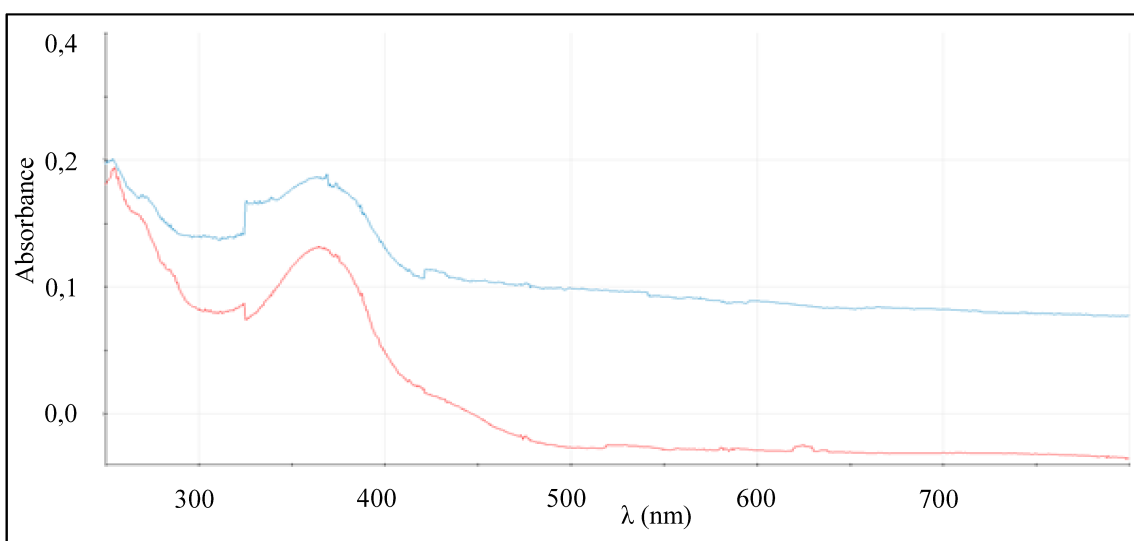
Obr. 16: Porovnání absorpčních spekter DHSA s a bez Cu^+ při pH 4,5. Absorpční spektra DHSA (modrá) a DHSA + Cu^+ (červená) s absorpčními maximy při 369 nm. Nedošlo k posunu absorpčního spektra a tvorba komplexu je tedy nepravděpodobná. Finální koncentrace DHSA byla $40 \mu\text{M}$, respektive $50 \mu\text{M}$. Koncentrace Cu^+ byla $500 \mu\text{M}$.



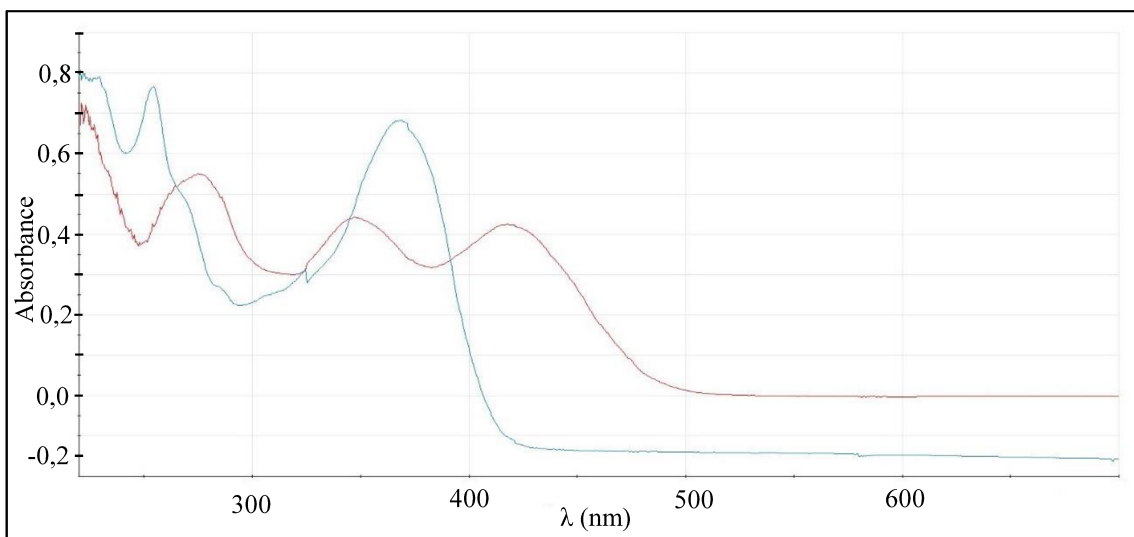
Obr. 17: Porovnání absorpčních spekter DHSA s a bez Cu^+ při pH 5,5. Absorpční spektra DHSA (modrá) a DHSA + Cu^+ (červená) s absorpčními maximy při 369 nm. Nedošlo k posunu absorpčního spektra a tvorba komplexu je tedy nepravděpodobná. Finální koncentrace DHSA byla $20 \mu\text{M}$, respektive $33 \mu\text{M}$. Koncentrace Cu^+ byla $500 \mu\text{M}$.



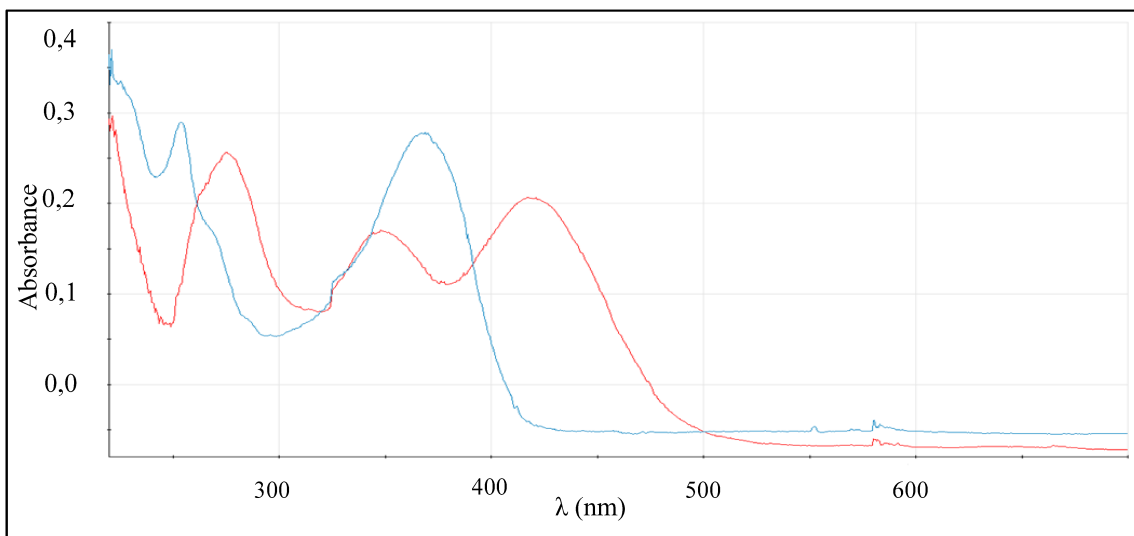
Obr. 18: Porovnání absorpčních spekter DHSA s a bez Cu^+ při pH 6,8. Absorpční spektra DHSA (modrá) a DHSA + Cu^+ (červená) s absorpčními maximy při 369 nm. Nedošlo k posunu absorpčního spektra a tvorba komplexu je tedy nepravděpodobná. Finální koncentrace DHSA byla v obou případech $50 \mu\text{M}$. Koncentrace Cu^+ byla $500 \mu\text{M}$.



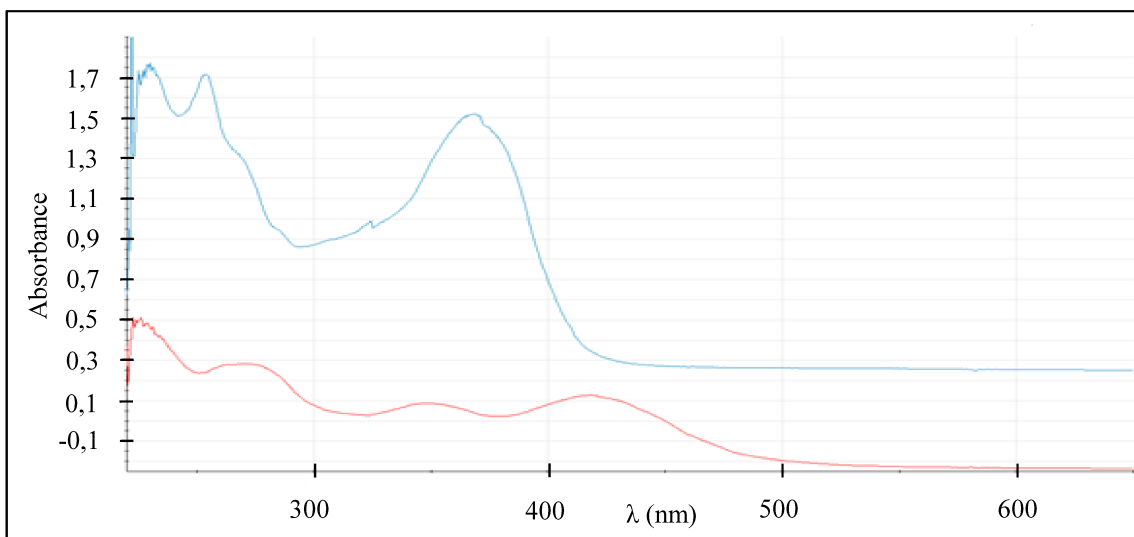
Obr. 19: Porovnání absorpčních spekter DHSA s a bez Cu^+ při pH 7,5. Absorpční spektra DHSA (modrá) a DHSA + Cu^+ (červená) s absorpčními maximy při 369 nm. Nedošlo k posunu absorpčního spektra a tvorba komplexu je tedy nepravděpodobná. Finální koncentrace DHSA byla $20 \mu\text{M}$, respektive $50 \mu\text{M}$. Koncentrace Cu^+ byla $500 \mu\text{M}$.



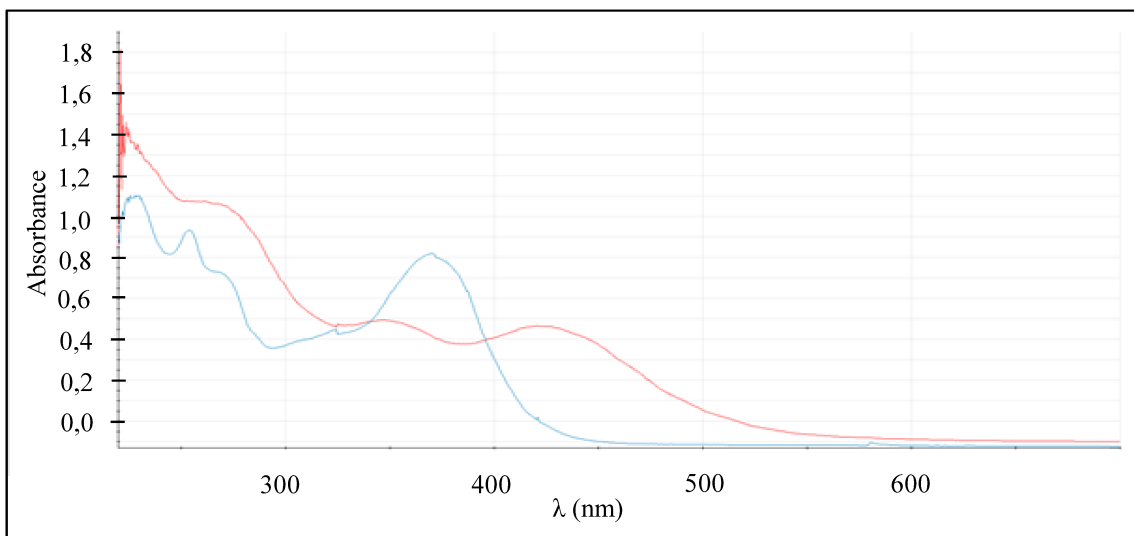
Obr. 20: Porovnání absorpčních spekter DHSA s a bez Cu^{2+} při pH 4,5. Absorpční spektra DHSA (modrá) s absorpčním maximem při 369 nm a DHSA + Cu^{2+} (červená) s absorpčním maximem při 417 nm. Posun absorpčního spektra značí tvorbu komplexu. Finální koncentrace DHSA byla $30 \mu\text{M}$, respektive $33 \mu\text{M}$. Koncentrace Cu^{2+} byla $500 \mu\text{M}$.



Obr. 21: Porovnání absorpčních spekter DHSA s a bez Cu^{2+} při pH 5,5. Absorpční spektra DHSA (modrá) s absorpčním maximem při 369 nm a DHSA + Cu^{2+} (červená) s absorpčním maximem při 417 nm. Posun absorpčního spektra značí tvorbu komplexu. Finální koncentrace DHSA byla $20 \mu\text{M}$, respektive $33 \mu\text{M}$. Koncentrace Cu^{2+} byla $500 \mu\text{M}$.



Obř. 22: Porovnání absorpčních spekter DHSA s a bez Cu^{2+} při pH 6,8. Absorpční spektra DHSA (modřá) s absorpčním maximem při 369 nm a DHSA + Cu^{2+} (červená) s absorpčním maximem při 422,5 nm. Posun absorpčního spektra značí tvorbu komplexu. Finální koncentrace DHSA byla 60 μM , respektive 33 μM . Koncentrace Cu^{2+} byla 500 μM .



Obř. 23: Porovnání absorpčních spekter DHSA s a bez Cu^{2+} při pH 7,5. Absorpční spektra DHSA (modřá) s absorpčním maximem při 369 nm a DHSA + Cu^{2+} (červená) s absorpčním maximem při 425 nm. Posun absorpčního spektra značí tvorbu komplexu. Finální koncentrace DHSA byla 60 μM , respektive 83 μM . Koncentrace Cu^{2+} byla 500 μM .

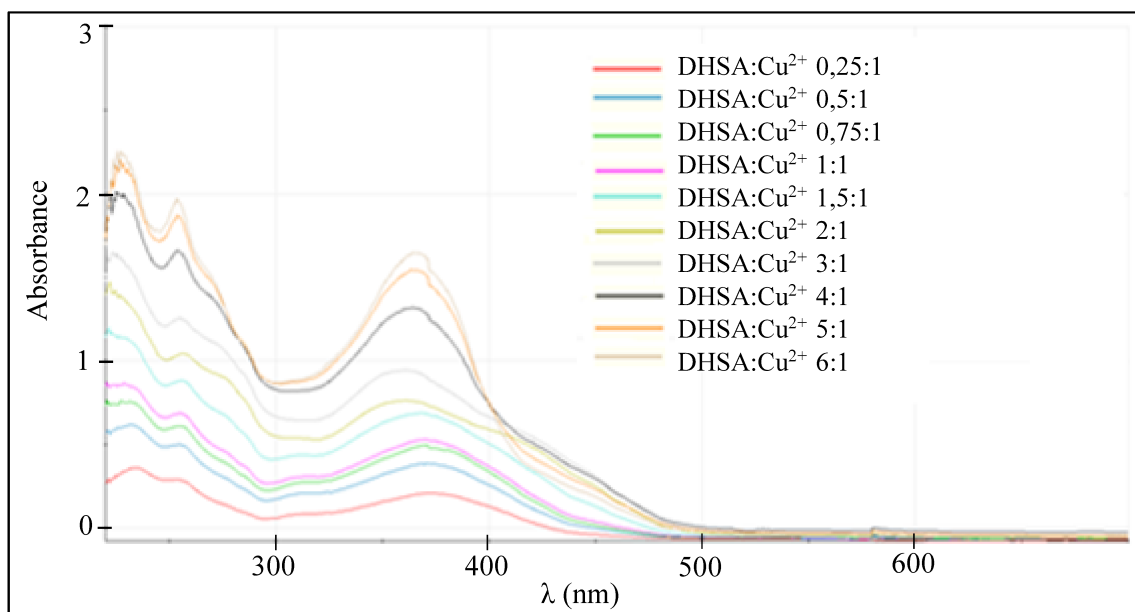
V druhém kroku byly zjišťovány stechiometrie komplexů DHSA s měďnatými ionty, a to pomocí dvou metodik. Při pH 4,5 ukázaly obě metodiky, že DHSA chelatuje s Cu^{2+} ionty při pH 4,5 v chelatačním poměru 2:1, který se při nadbytku DHSA mění na poměr 3:1, DHSA : Cu^{2+} (Obr. 24 a Obr. 25). Při pH 5,5 byl chelatační poměr stanoven Jobovou metodou na 2:1 měnící se při nadbytku v 3:1, zatímco komplementární metoda ukázala přímo na poměr 3:1 (Obr. 26 a Obr. 27). Při pH 6,8 a 7,5 byl chelatační poměr oběma metodami stanoven na 2:1 (Obr. 28-31). Všechny výsledné chelatační poměry při všech pH jsou shrnuty v Tab. 6.

S Cu^{1+} ionty nebyl stanoven chelatační poměr při žádném pH, protože jak bylo uvedeno, chelatace neproběhla (Obr. 16-19).

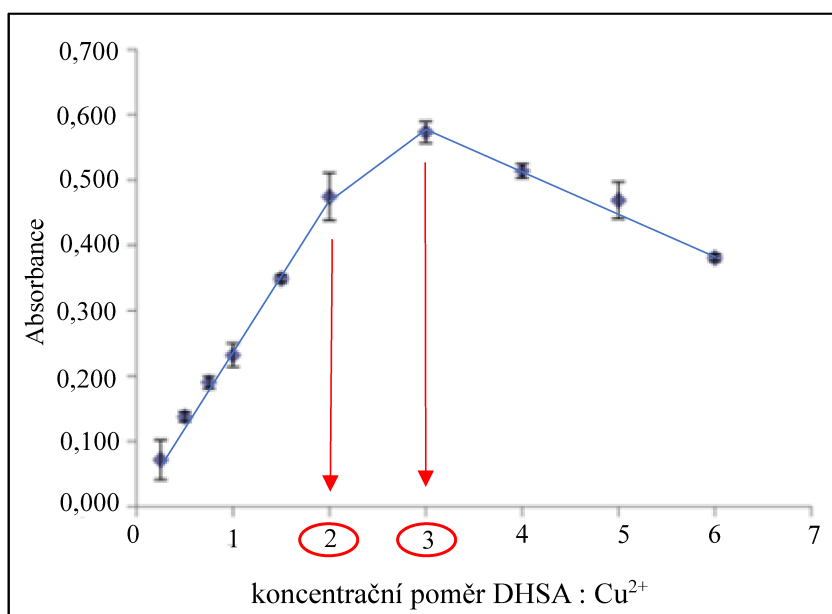
Tab. 6: Poměry, v kterých chelatuje DHSA s Cu^{2+} při jednotlivých pH.

DHSA + Cu^{2+}	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,8	pH 7,5
Jobova metoda	2:1 → 3:1	2:1 → 3:1	2:1	2:1
Komplementární metoda	2:1 → 3:1	3:1	2:1	2:1

A

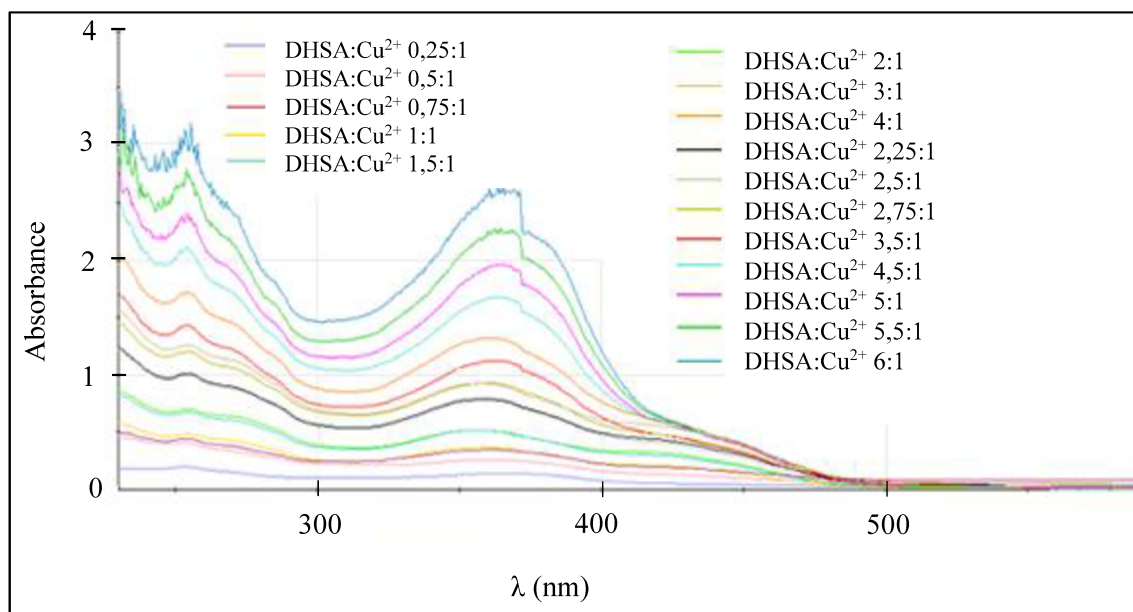


B

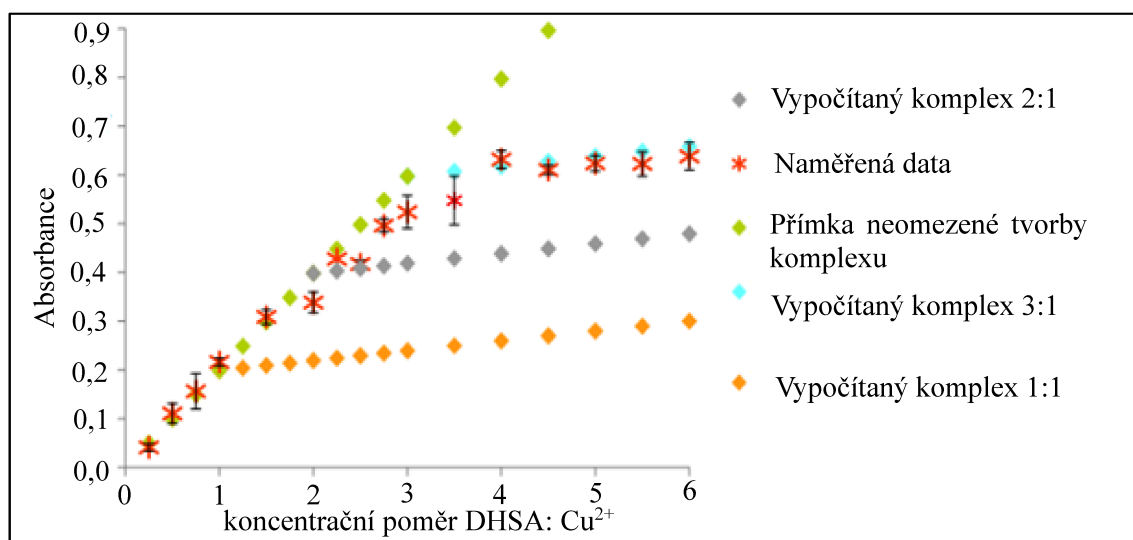


Obr. 24: Stanovení stechiometrie komplexu DHSA : Cu^{2+} při pH 4,5 pomocí Jobovy metody. A) Ilustrativní spektrum Jobovy metody. B) Vyhodnocení Jobovy metody. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka. Koncentrace Cu^{2+} se ve vzorcích měnila od 80 po 14 μM , zatímco koncentrace DHSA byla 20-86 μM . Graf naznačuje tvorbu komplexu 2:1, který se mění na 3:1.

A

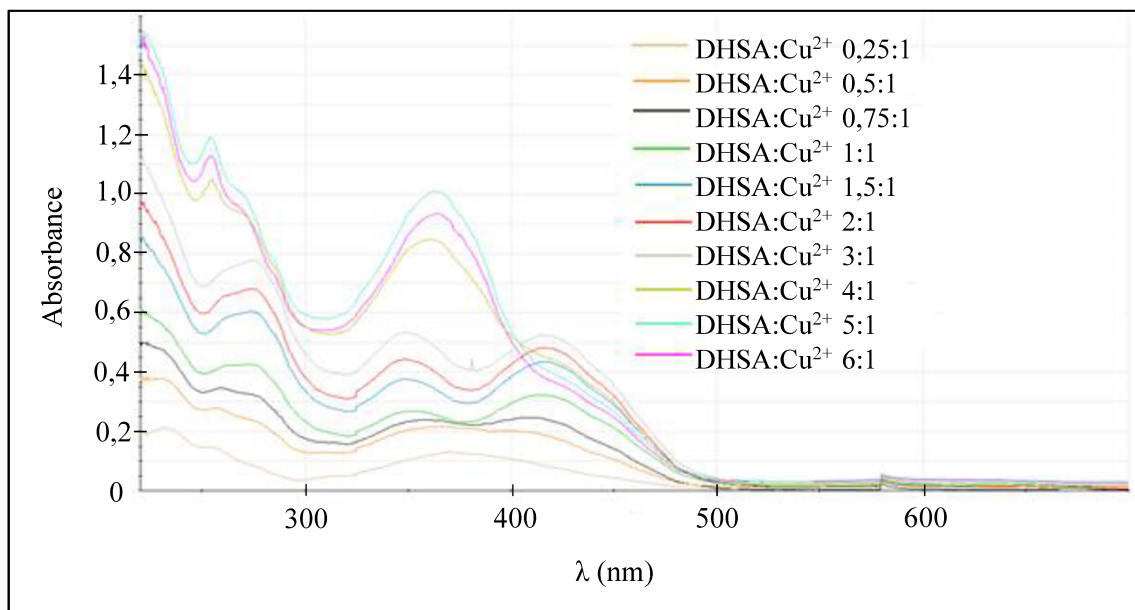


B

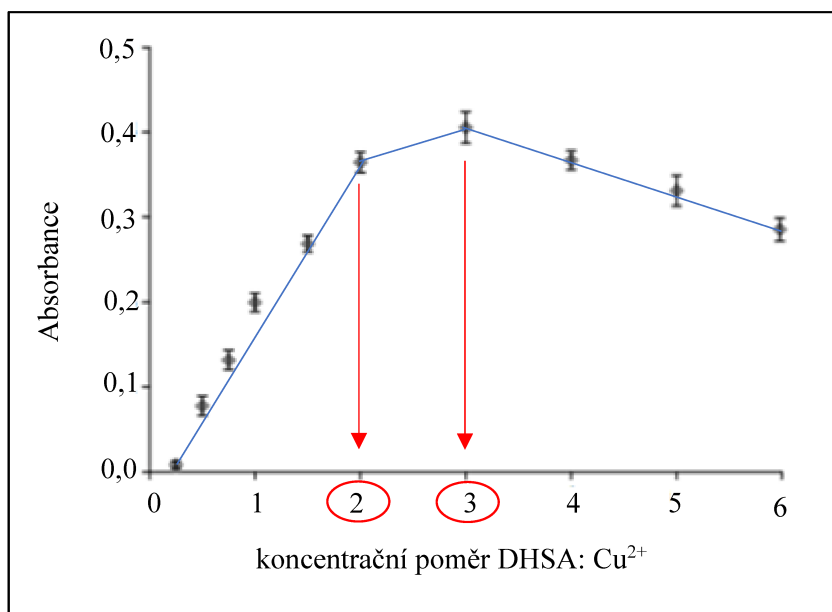


Obr. 25: Stanovení stechiometrie komplexu DHSA:Cu²⁺ při pH 4,5 pomocí komplementární metody. A) Ilustrativní spektrum komplementární metody. B) Vyhodnocení komplementární metody. Data jsou měřena při vlnové délce absorpčního maxima komplexu 415 nm a vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka. Koncentrace Cu²⁺ byla ve všech vzorcích 20 μ M, zatímco koncentrace DHSA se měnila od 5 do 120 μ M.

A

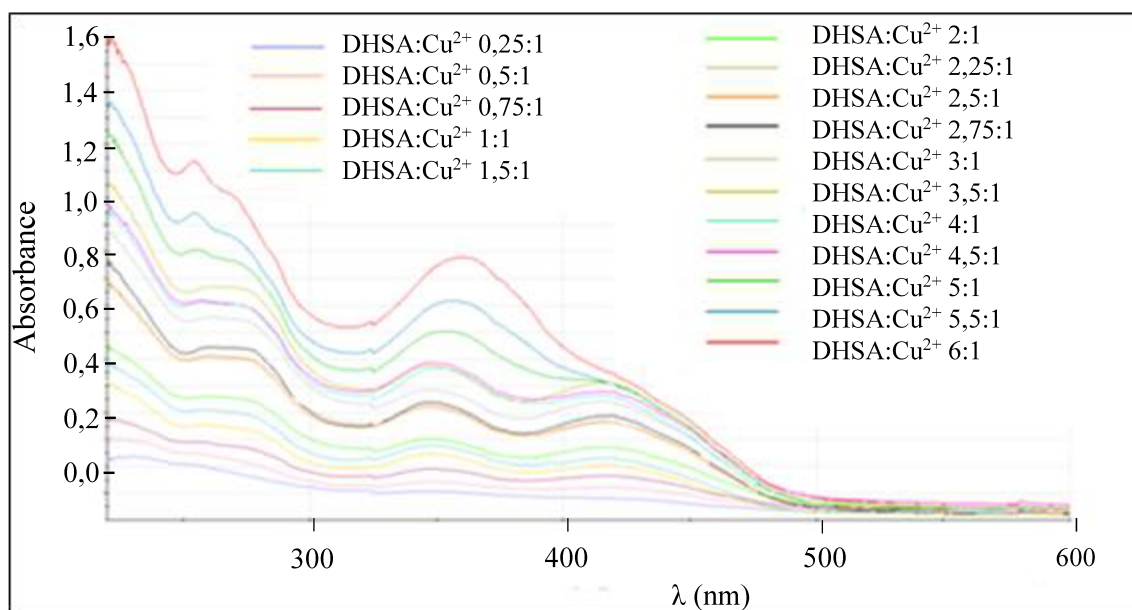


B

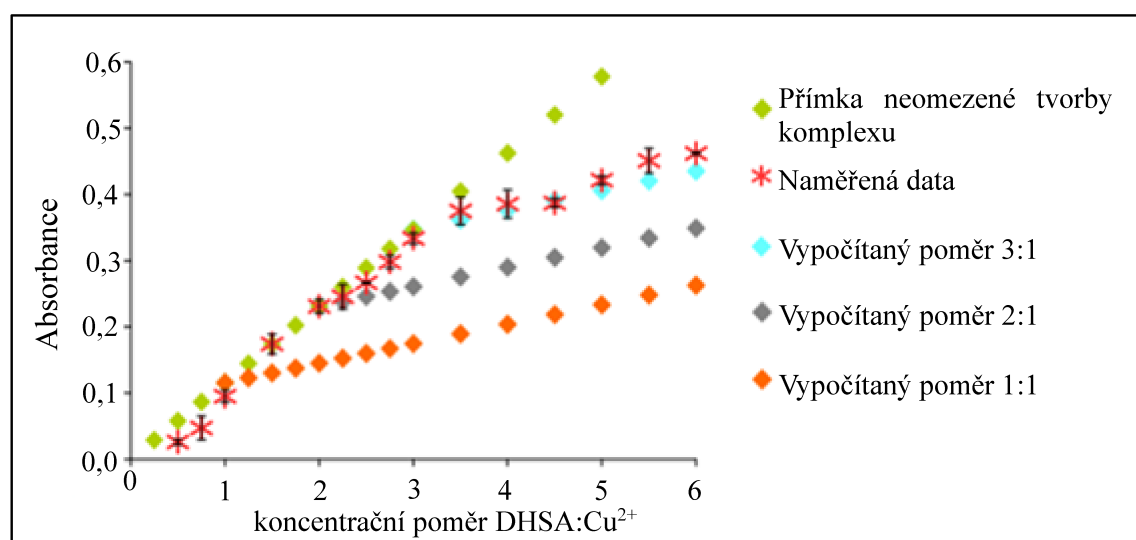


Obř. 26: Stanovení stechiometrie komplexu DHSA : Cu²⁺ při pH 5,5 pomocí Jobovy metody. A) Ilustrativní spektrum Jobovy metody. B) Vyhodnocení Jobovy metody. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Koncentrace Cu²⁺ se ve vzorcích měnila od 80 po 14 μM, zatímco koncentrace DHSA byla 20-86 μM. Graf ilustruje tvorbu komplexu 2:1, který se mění na 3:1.

A

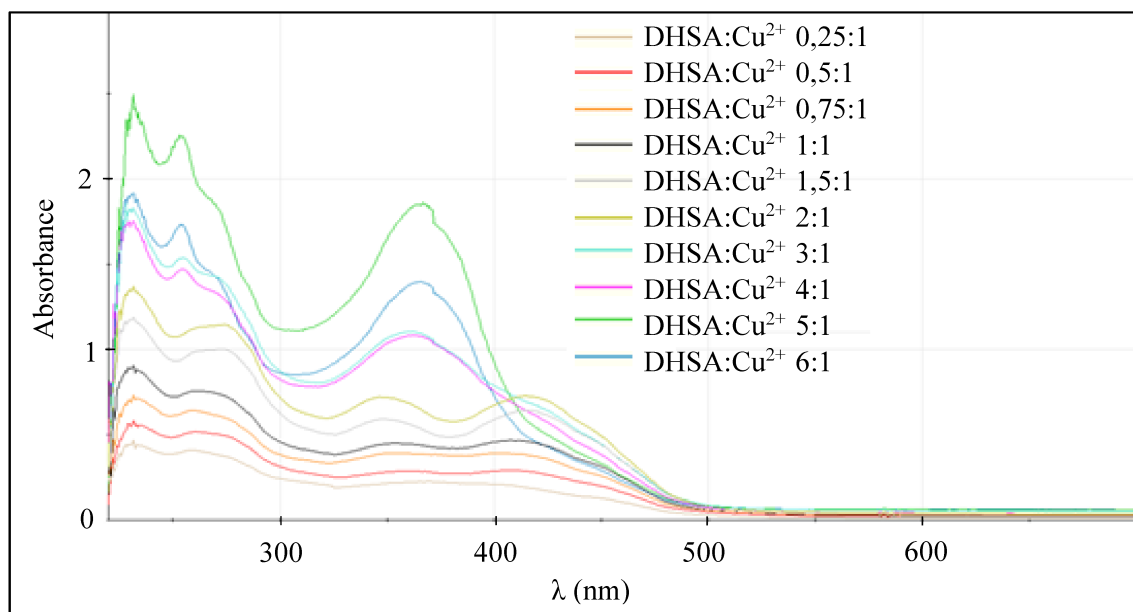


B

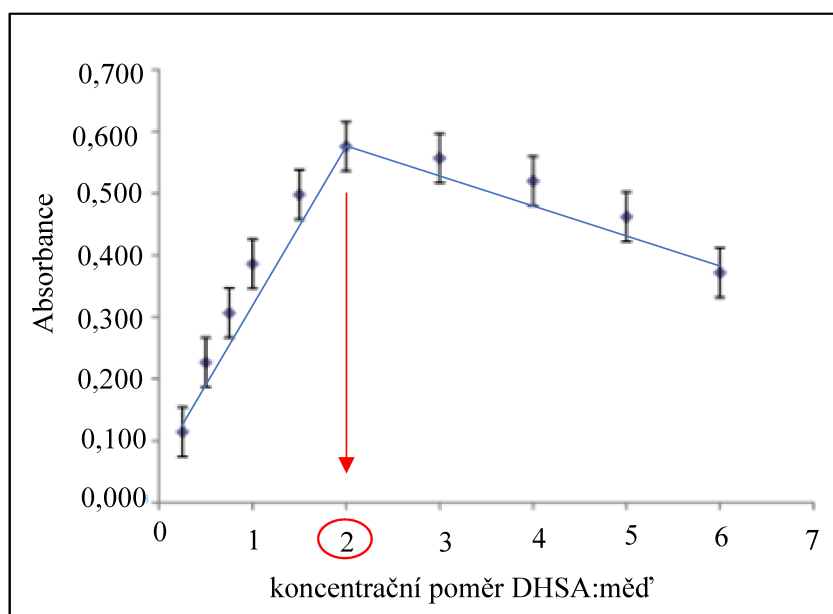


Obr. 27: Stanovení stechiometrie komplexu $\text{DHSA}:\text{Cu}^{2+}$ při $\text{pH } 5,5$ pomocí komplementární metody. A) Ilustrativní spektrum komplementární metody. B) Vyhodnocení komplementární metody. Data jsou měřena při vlnové délce absorpčního maxima komplexu 417 nm a vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka. Koncentrace Cu^{2+} byla ve všech vzorcích $20 \mu\text{M}$, zatímco koncentrace DHSA se měnila od 5 do $120 \mu\text{M}$.

A

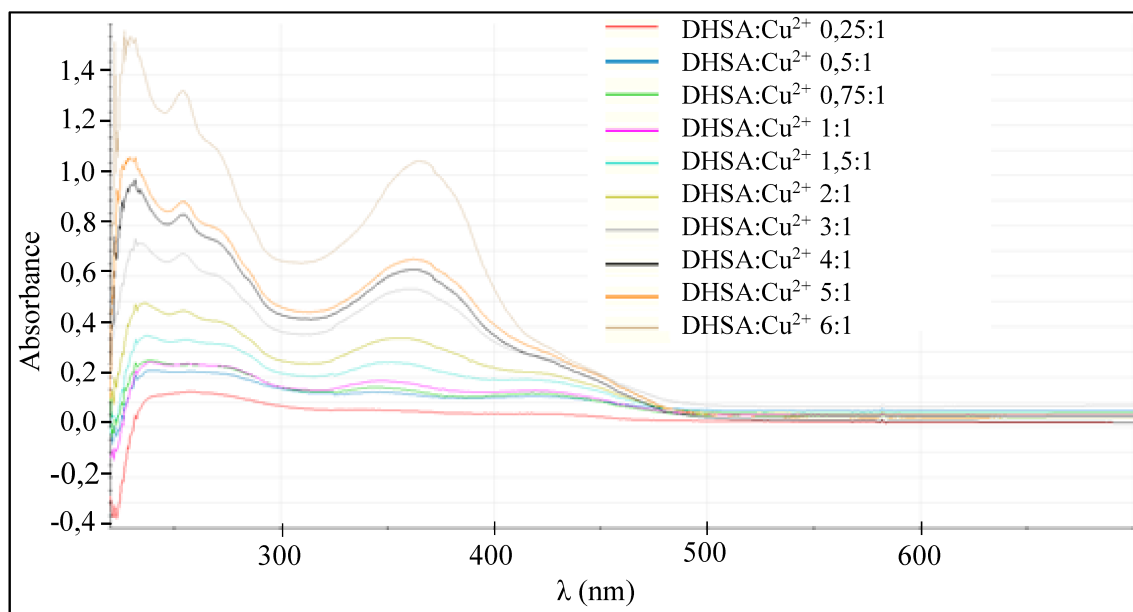


B

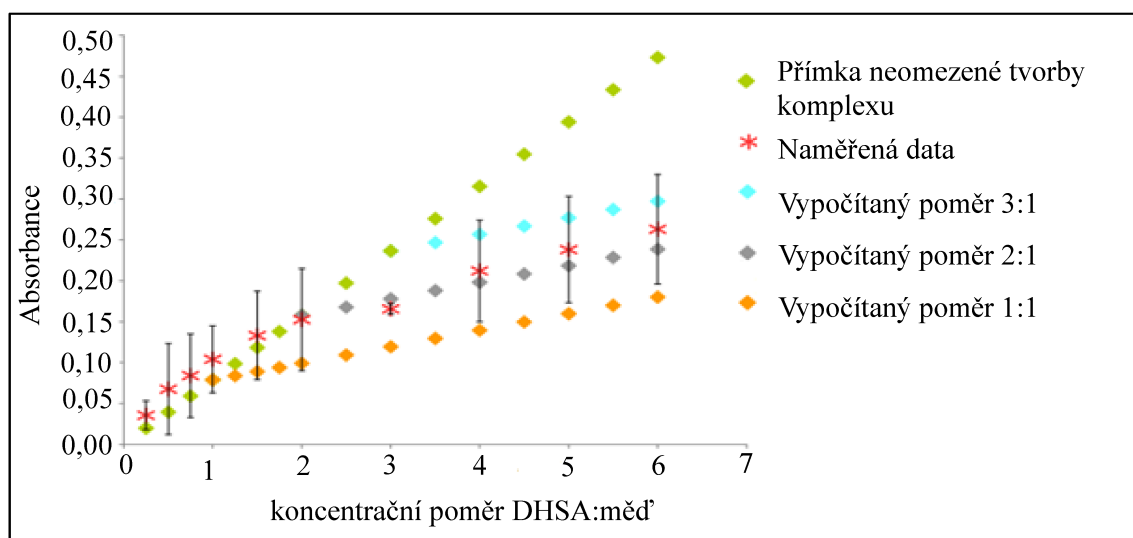


Obř. 28: Stanovení stechiometrie komplexu DHS:A : Cu^{2+} při pH 6,8 pomocí Jobovy metody. A) Ilustrativní spektrum Jobovy metody. B) Vyhodnocení Jobovy metody. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka. Koncentrace Cu^{2+} se ve vzorcích měnila od 80 po 14 μM , zatímco koncentrace DHS:A byla 20-86 μM . Graf ukazuje na tvorbu komplexu 2:1.

A

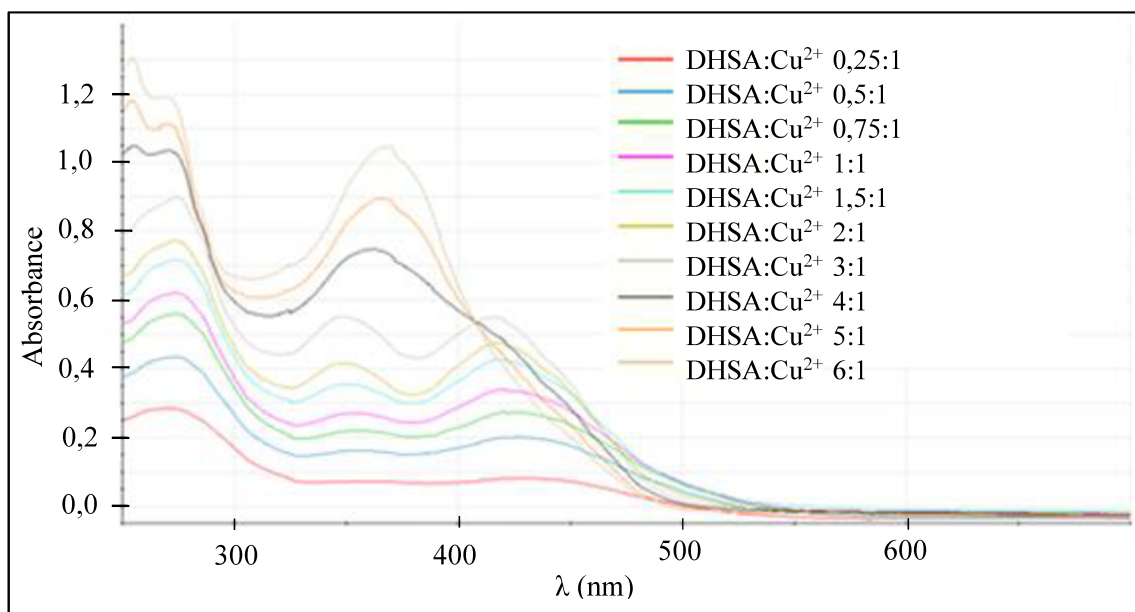


B

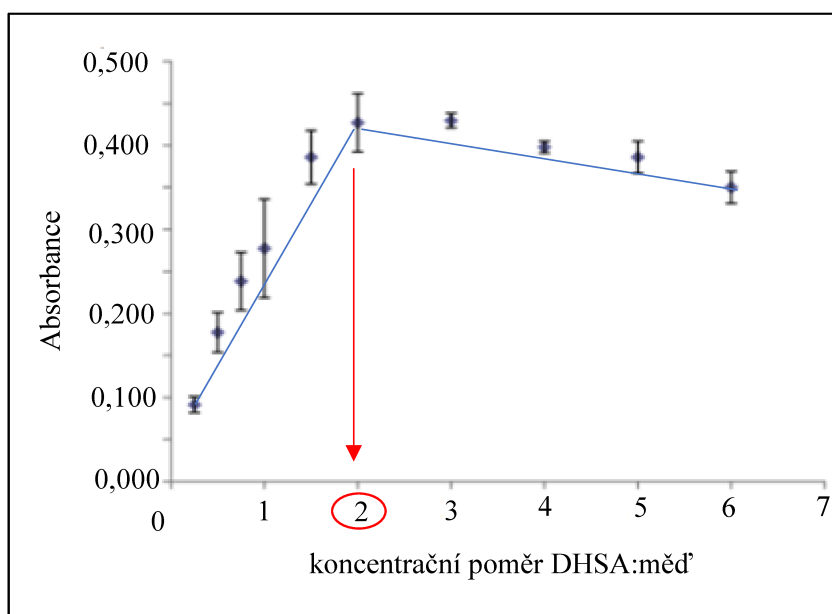


Obr. 29: Stanovení stechiometrie komplexu $\text{DHSA}:\text{Cu}^{2+}$ při pH 6,8 pomocí komplementární metody. A) Ilustrativní spektrum komplementární metody. B) Vyhodnocení komplementární metody. Data jsou měřena při vlnové délce absorpčního maxima komplexu 422,5 nm a vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka. Koncentrace Cu^{2+} byla ve všech vzorcích 10 μM , zatímco koncentrace DHSA se měnila od 3 do 60 μM .

A

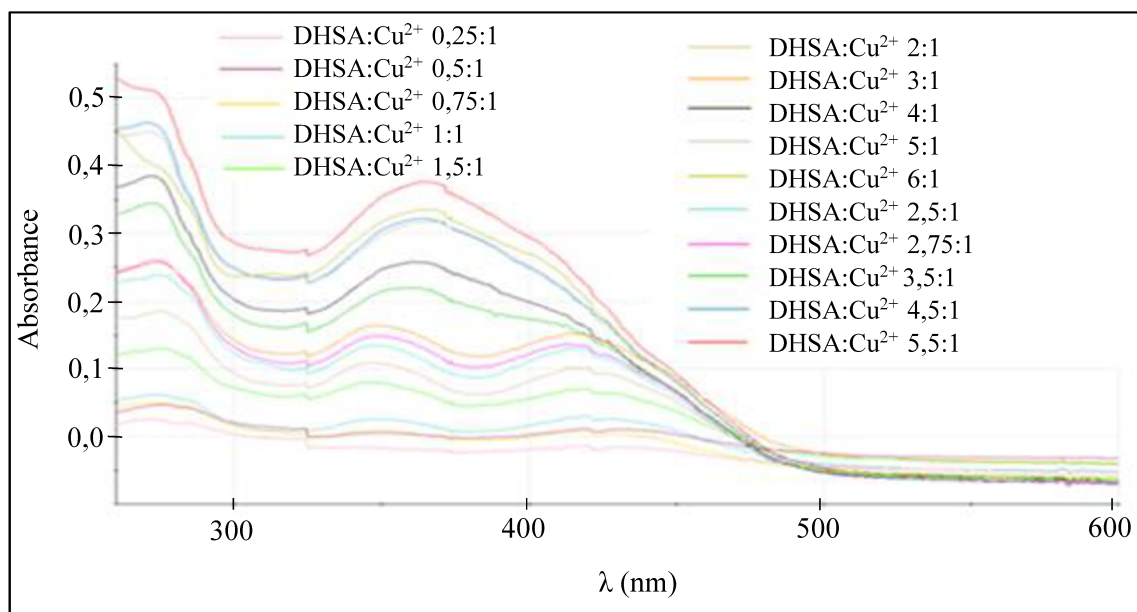


B

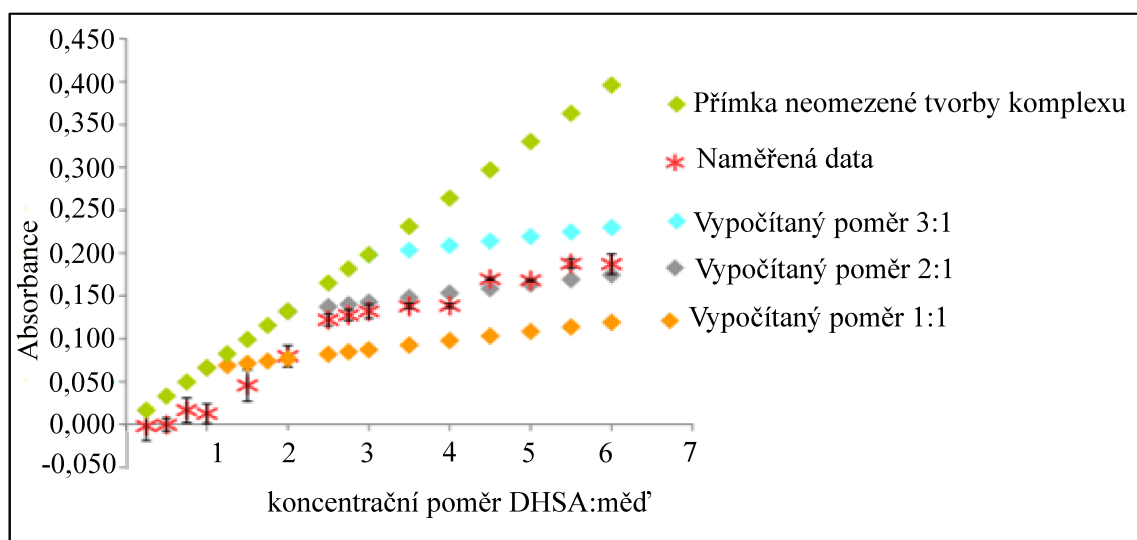


Obř. 30: Stanovení stechiometrie komplexu DHSA : Cu²⁺ při pH 7,5 pomocí Jobovy metody. A) Ilustrativní spektrum Jobovy metody. B) Vyhodnocení Jobovy metody. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Koncentrace Cu²⁺ se ve vzorcích měnila od 80 po 14 μM, zatímco koncentrace DHSA byla 20-86 μM. Graf značí tvorbu komplexu 2:1.

A



B



Obr. 31: Stanovení stechiometrie komplexu DHSA : Cu²⁺ při pH 7,5 pomocí komplementární metody. A) Ilustrativní spektrum komplementární metody. B) Vyhodnocení komplementární metody. Data jsou měřena při vlnové délce absorpčního maxima komplexu 425 nm a vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka. Koncentrace Cu²⁺ byla ve všech vzorcích 10 μ M, zatímco koncentrace DHSA se měnila od 3 do 60 μ M.

7 Diskuze

V současné době existuje jen omezené množství dostupných klinicky používaných chelátorů mědi využívaných v terapii nadměrného množství mědi v organismu, a proto je hledání nových látek v této oblasti stále žádoucí. DHSA přitahuje pozornost jako přírodní látka, která je součástí extraktu ostropestřce mariánského, jenž je v poslední době zkoumaný pro své mnohé možné pozitivní účinky na lidský organismus.

Výzkumem látek z ostropestřce mariánského a jejich interakcí s kovy se již některé studie zabývaly. Studie Borsari et al, 2001 je zaměřena na interakci silybinu (DHSA je jeho derivátem) s železem v nekompetitivních podmínkách a prokázala jeho chelatační aktivitu ve vztahu k železu. Existují i další studie podporující jeho potenciální využití v chelatační terapii při nadbytku železa. Například během studie Hutchinson et al, 2010 bylo zjištěno, že konzumace silybinu s jídlem, do kterého bylo přidáno železo, vede ke snížení postprandiální zvýšené hladině železa v séru ve srovnání s vodou a čajem u pacientů s dědičnou hemochromatózou. Silybin má tedy potenciál snížit vstřebávání železa.

Relevantních studií zabývajících se interakcí s mědí je však méně. Studie Zatloukalová et al, 2011 se zabývá tvorbou komplexu silybinu s mědí pomocí *ex situ* voltametrie. Nicméně stále není mnoho známo o možné chelataci ostatních silymarinových flavonolignanů, obzvláště v podobě čistých stereoizomerů. Proto byla tato práce zaměřena na analýzu stechiometrie komplexu, což je jedna z nejdůležitějších vlastností komplexu, jednoho z čistých stereoizomerů – DHSA.

Předpoklad chelatační aktivity DHSA vychází ze studie Říha et al, 2014, které definovala funkční chelatační skupiny základního flavonoidního jádra. Jedná se o hydroxy-skupiny (v polohách 3 nebo 5) a keto-skupinu v poloze 4. Měď je pak vázána jedním z těchto hydroxylů a zmíněnou keto skupinou.

Stechiometrie komplexu v této studii byla zjištěna dvěma nekompetitivními metodami. Využití dvou metod umožňuje potvrzení získaných výsledků. Vedle známé a oblíbené Jobovy metody byla použita komplementární metoda popsána poprvé ve studii Filipický et al, 2013. Tato metoda se v porovnání se standardní Jobovou metodou jeví výhodná zejména v případech slabších chelátorů. Oběma metodami byly pozorovány téměř totožné výsledky. Malý rozdíl byl pouze při pH 5,5, kde komplementární metodou byla zjištěna stechiometrie 3:1, zatímco při Jobově metodě byl výsledný poměr 2:1 měnící se v 3:1. Důvodem je rozdílný princip těchto dvou metod. Měnící se stechiometrie

se občas vyskytuje v důsledku nadbytku testované látky. Výsledné stechiometrie se také lišily v závislosti na testovaném pH prostředí. To bylo zvoleno tak, aby odpovídalo fyziologickým i patofyziologickým podmínkám (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Všechny hodnoty odpovídají hodnotám pH vyskytujícím se v gastrointestinálním traktu. Kyselé pH se navíc fyziologicky vyskytuje v různých tělesných kompartmentech, jako například lysozomech či žaludku. Patologická acidóza byla detekována při zánětlivých stavech včetně akutního infarktu myokardu (ischemie) a nádorů (Parolini et al, 2009; Ambrosio et al, 1987).

Výsledky této práce se staly součástí studie Tvrđý et al, 2018 zaměřující se na interakci izolovaných flavonolignanů s železem a mědí. V rámci této studie proběhlo navíc testování chelatace DHSA v kompetitivních podmínkách. Princip kompetitivních metod spočívá v kompetici s indikátory, které jsou silnými chelatačními činidly, o vazbu ke kovu. Tyto metody nám hodně napovídají o afinitě testované látky ke kovu vůči jiným chelatačním činidlům a stabilitě komplexu.

V mírně kompetitivních podmínkách DHSA prokázal největší chelatační aktivitu ze všech flavonolignanů a předpokládaná stechiometrie komplexu byla určena na 3:1 při pH 5,5 a na 2:1 při pH 6,8. Při pH 7,5 stechiometrie nebyla stanovena kvůli nízké afinitě chelátoru k mědi, respektive jeho neschopnosti udržet si tento kov v přítomnosti indikátoru hematoxylinu. V porovnání s touto prací byly tedy pozorovány obdobné výsledky s malými rozdíly při pH 5,5, kdy se při stanovení Jobovou metodou změnila stechiometrie z 2:1 na 3:1, a navíc bylo možné nekompetitivními metodami určit stechiometrii komplexu při pH 7,5. Obě metodiky lze tedy vhodně kombinovat, nekompetitivní metodiky jsou schopny určit tvorbu komplexu a kompetitivní ukázat, zda je tento komplex stabilní. V našem případě byla v silně kompetitivních podmínkách za použití indikátorů BCS chelatační aktivita DHSA nevýrazná a stechiometrie nebyly určeny vzhledem k neschopnosti DHSA udržet komplex s mědí v přítomnosti silného chelátoru. Proto lze DHSA považovat pouze za slabý až středně silný chelátor Cu^{2+} .

Kompetitivní metody se používají také pro hodnocení redukční aktivity vzhledem ke kovu. Redukční aktivita je důležitá pro komplexní pohled na konečný biologický efekt. Ten se odhaduje velmi obtížně, protože mnoho sloučenin obsahující flavonoidní jádro mohou mít redukční i chelatační aktivitu, což bylo prokázáno mimo jiné právě ve studii Tvrđý et al, 2018. V rámci studie se zjistila středně silná redukční aktivita DHSA vzhledem k mědi v porovnání s ostatními flavonolignany.

Při výzkumu nových chelátorů mědi nás také zajímá selektivita dané látky k iontům mědi, aby při terapeutickém použití nedocházelo k nežádoucím účinkům, jako je snížení množství jiných, pro organismus esenciálních iontů, mezi které patří

například ionty železa či zinku. Ve studii Tvrdý et al, 2018 byla prokázána afinita DHSA k iontům železa.

Ačkoliv tedy DHSA prokázal chelatační aktivitu vůči mědi, potenciál využití DHSA v terapii nadbytku mědi v organismu by mohla vyloučit jeho nedostatečná afinita a selektivita k těmto iontům a také redukční aktivita, která může způsobit přeměnu Cu^{2+} na Cu^+ , a tím potencovat toxickou Fentonovu reakci. Avšak i redukční aktivita by mohla nalézt terapeutické využití. Vzhledem k tomu, že se zdá, že mnoho zhoubných nádorů obsahuje zvýšené množství mědi, mohou být slabé chelátory vytvářející redoxně aktivní komplexy potencující Fentonovu reakci, a tím zesilující oxidační stres s následnou apoptózou nebo nekrózou nádorové buňky v budoucnosti vyzkoušeny jako protinádorová léčiva (Kurz et al, 2010).

Vzhledem ke smíšené chelatační a redukční aktivitě by bylo vhodné dále analyzovat aktivitu DHSA vůči mědi otestováním výsledného účinku na Fentonově reakci, abychom získali hlubší pohled na jeho potenciální účinky na lidský organismus.

8 Závěr

Během této práce bylo zjištěno, že testovaná látka 2,3-dehydrosilybin A je schopna chelatovat Cu^{2+} při pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5. Obě metody ke stanovení stechiometrie komplexu – Jobova metoda a Komplementární metoda nám umožnily pozorovat téměř totožné výsledky. Výsledný chelatační poměr DHSA : Cu^{2+} byl 3:1 nebo 2:1, měnící se v závislosti na některých podmínkách na 3:1. Oproti tomu schopnost chelatovat Cu^{+} nebyla pozorována za žádných testovaných podmínek pH.

Tyto *in vitro* výsledky mohou být v budoucnu použity pro bližší charakteristiku testování účinku silymarinového flavonolignanů DHSA na absorpci mědi v buněčných kulturách a *in vivo*. Pro bližší charakteristiku anti- nebo pro-oxidačních vlastností DHSA by bylo vhodné analyzovat chování komplexů DHSA s ionty mědi za podmínek mědi katalyzované Fentonovy reakce.

9 Zdroje

Aaseth J, Skaug MA, Cao Y, Andersen O. Chelation in metal intoxication—Principles and paradigms. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2015, 31:260–266

Agarwal R, Katiyar SK, Lundgren DW, Mukhtar H. Inhibitory effect of silymarin, an anti-hepatotoxic flavonoid, on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and mRNA in SENCAR mice. *Carcinogenesis* 1994, 15:1099–1103

Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet* 2007, 369:397-408

Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal* 1991, 273:601–604

Bahmani M, Shirzard H, Rafieain S, Rafieian-Kopaei M. *Silybum marianum*: Beyond hepatoprotection. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine* 2015, 292-301

Barbusinski K. Fenton reaction - controversy concerning the chemistry. *Ecological chemistry and engineering* 2009, 16:347–358

Bertini I, Rosato A. Menkes disease. *Cellular and Molecular. Life Sciences* 2008, 65:89-91

Bhatia N, Agarwal R. Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, genistenin and epigallocatechin 3-galate on epigenetic events in human prostate carcinoma DU145 cells. *The Prostate* 2001, 46:98–107

Bhattacharjee A, Chakraborty K, Shukla A. Cellular copper homeostasis: current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases. *Metallomics* 2017, 9:1376

Biedermann D, Vavříková E, Cvak L, Křen V. Chemistry of silybin. *Natural product Reports* 2014, 31:1138-1157

Bijak M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)-chemistry, bioavailability and metabolism. *Molecules* 2017, 22(11):1942

Bokemeyer C, Fels LM, Dunn T, Voigt W, Gaedeke J, Schmoll HJ, Stolte H, Lentzen H. Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity. *British Journal of Cancer* 1996, 74:2036–2041

Borsari M, Gabbi C, Ghelfi F, Grandi R, Saladini M, Severi S, Borella F. Silybin, a new-iron chelating agent, *Journal of Inorganic Biochemistry* 2001, 85:123–129

Catapano MC, Karličková J, Tvrđý V, Sharma S, Prasad A.K, Saso L, Chhillar A.K, Kuneš J, Pour M, Parmar V.S, Mladěnka P. Mono and dihydro coumarin derivatives: Copper chelation and reduction ability. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2018, 46:88-95

Catapano MC, Tvrđý V, Karličková J, Migkos T, Valentová K, Křen V, Mladěnka P. The Stoichiometry of isoquercetin complex with iron and copper is highly dependent on experimental conditions. *Nutrients* 2017, 9:1193

Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews* 2010, 68:133-147

Dabagh M, Randles A. Role of deformable cancer cells on wall shear stress-associated-VEGF secretion by endothelium in microvasculature. *Public Library of Science one* 2019, 14(2): e0211418

Devi SRB, Aloysius DM, Sulochana KN. Copper transporters and chaperones: Their function on angiogenesis and cellular signalling. *Journal of Biosciences* 2016, 41:487-496

Ďoubal S., Horáčková I. Biofyzika pro studenty farmacie, Karolinum, Praha, 2000:40-41

Filipský T, Říha M, Hrdina R, Vávrová K, Mladěnka P. Mathematical calculation of iron complex stoichiometry by direct UV-Vis spectrophotometry, *Bioorganic Chemistry* 2013, 49:1-8

Flora SJ, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2010, 7:2745–2788

Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clinical drug investigation* 2002; 22:51–65

Gallo D, Giacomelli S, Ferlini C et al. Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex IdB 1016, against human ovarian cancer. *European Journal of Cancer* 2003, 39:2403–2410

Gažák R, Walterová D, Křen V. Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. *Current Medicinal Chemistry* 2007, 14:315-338

Guerinot ML. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1465:190-198

<http://www.AISLP.cz>

Hutchinson C, Bomford A, Geissler CA. The iron-chelating potential of silybin in patients with hereditary haemochromatosis, *European Journal of Clinical Nutrition* 2010, 64:1239–1241

Chambers CS, Holečková V, Petrásková L, Biedermann D, Valentová K, Buchta M, Křen V. The silymarin composition...and why does it matter??? *Food Research International* 2017, 339-353

Invernizzi R, Bernuzzi S, Ciani D, Ascari E. Silymarin during maintenance therapy of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 1993, 78:340–341

Jiang C, Agarwal R, Lu JX. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: Inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, 276:371–378

Job P. Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution, et sur leur stabilité, *Annales de Chimie* 1928, 9:113–134

Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011, 283:65–87

Kaler SG, Gallo LK, Proud VK, Percy AK, Mark Y, Segal NA, Goldstein DS, Holmes CS, Gahl WA. Occipital horn syndrome and a mild Menkes phenotype associated with splice site mutations at the MNK locus. *Nature Genetics* 1994, 8:195-202

Kodama H, Fujisawa Ch, Bhadhprasit W. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanism, Diagnosis and Treatment. *Current Drug Metabolism* 2012; 13:237-250

Křen V, Walterová D. Silybin and silymarin – new effects and applications, *Biomedical Papers* 2005, 149(1):29-41

Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, Wagner M, Kohler H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Archives of Toxicology* 1998, 72:536–540

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal* 2013:162750

Kurz T, Eaton JW, Brunk UT. Redox activity within the lysosomal compartment: implications for aging and apoptosis, *Antioxidants & Redox Signaling* 2010, 13:511-523

Kustrak D. A dry fruit extract of milk thistle (*Silybum marianum* (L). Gaertn.) – A liver therapeutic. *Farmaceutski Glasnik* 2000; 56:183–187

Ladas EJ, Kelly KM. Milk thistle: Is there a role for its use as an adjunct therapy in patients with cancer? *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2003, 9:411–416

Mahady GB, Fong HH, Farnsworth NR. Botanical dietary supplements quality, safety and efficiency. Lissa: Swets and Zeitlinger Publishers 2001, 181–190

Masopust J, Průša R. *Patobiochemie metabolických drah*, Praha 2004, 155

Morazzoni P, Bombardelli E. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*), *Fitoterapia* 1995, 64:3

Nassuato G, Iemmolo RM, Strazzabosco M. Effect of silibinin on biliary lipid composition experimental and clinical study. *Journal of Hepatology* 1992; 12:290-295.

Ninh Pham A, Xing G, Miller CJ, Waite TD. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production, *Journal of Catalysis* 2013, 301:54–64

Oliveri V, Giuffrida ML, Vecchio G, Aiello C, Viale M. Gluconjugates of 8-hydroxyquinolines as potential anti-cancer prodrugs. *Dalton Transactions* 2012, 41:4530–4535

Pyszková M, Biler M, Biedermann K, Valentová A, Kuzma M, Vrba J et al. Flavonolignan 2,3-dehydroderivatives: Preparation, antiradical and cytoprotective activity. *Free Radical & Biological Medicines* 2016, 90:114-125

Rafieian-Kopaie M, Nasri H. Silymarin and diabetic neuropathy. *Journal of Renal Injury Prevention* 2012, 1:3-6

Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A et al. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Archives of Neurology* 2003, 60:1685–1691

Roberts EA a Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology* 2008, 47(6):2089-111

Říha M, Karličková J, Filipický T, Jahodář L, Hrdina R, Mladěnka P. *In vitro* copper-chelating properties of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 2014, 75:S21–S53

Říha M, Karličková J, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assesment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8- hydroxyquinolines, *Journal od Inorganic Biochemistry* 2013, 123:80-87

Sakai K, Li Y, Shirakawa T, Kitagawa Y, Hirose G. Induction of major histocompatibility complex class I molecules on human neuroblastoma line cells by a flavonoid antioxidant. *Neuroscience Letters* 2001, 298:127–130

Squitti R, Siotto M, Polimanti R. Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2014, 35: S40-S50

Šimánek V, Křen V, Ulrichová J, Vičar J, Cvak L. Silymarin: What is in the name...? An appeal for a change of editorial policy, *Hepatology* 2000, 32:442

Škottová N et al. New sights into the biological activities of silymarin. Grant č. PP-Z1/13/96. Olomouc: Lékařská fakulta Univerzita Palackého 1996

Škottová N, Krečman V. Dietary silymarin improves removal of low density lipoproteins by the perfused rat liver. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae* 1998, 141:39-40

Škottová N, Krečman V. Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. *Physiological Research* 1998, 47:1-7.

Tegoni M, Valensin D, Toso L, Remelli M. Copper chelators: chemical properties and bio-medical applications. *Current Medicinal Chemistry* 2014, 21:3785-3818

Trouillas P, Marsal P, Svobodová A et al. Mechanism of antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: A joint experimental and theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry* 2008, 112:1054-1063

Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: Vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association* 2001, 101:294-301

Tümer Z, Møller LB. Menkes disease. *European Journal of Human Genetics* 2010, 18:511-518

Tvrđý V, Catapano MC, Rawlik T, Karličková J, Biedermann D, Křen V, Mladěnka P, Valentová K. Interaction of isolated silymarin flavonolignans with iron and copper. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2018, 189:115–123

Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS, Hong JS, Jeng KCG. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *European Journal of Neuroscience* 2002, 16:2103–2112

Wiggelinkhuizen M, Tilanus MEC, Bollen CW, Houwen RHJ. Clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2009, 29:947-958

Zatloukalová M, Křen V, Gažák R, Kubala M, Trouillas P, Ulrichová J, Vacek J. Electrochemical investigation of flavonolignans and study of their interactions with DNA in the presence of Cu (II). *Bioelectrochemistry* 2011, 82:117–124

Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, Agarwal R. Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide- induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis* 2000, 21:811–816

Zhao J, Sharma Y, Agarwal RA. Flavonoid antioxidant, silymarin, affords significant inhibition against 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate-caused modulation of antioxidant and inflammatory enzymes, and cyclooxygenase 2 and interleukin-1a expression in SENCAR mouse epidermis: implications in the prevention of stage I tumor. *Molecular Carcinogenesis* 1999, 26:321–333

Zi X, Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1999, 96:7490–7495.