

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Med²-redukčné účinky derivátov xantén-3-ónov

Rigorózna práca

Vedúci rigorózneho práce: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Mgr. Nikola Kopková

Prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného, či rovnakého titulu“.

Dátum:

.....

podpis

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí doc. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D., ktorý ma trpezlivo viedol pri spracovávaní rigorózneho práce a som mu vďačná za metodické vedenie a cenné rady, ústretovosť a láskavosť.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Kandidát: Mgr. Nikola Kopková

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

Název diplomové práce: Med³-redukčné účinky derivátov xantén-3-ónov

Kľúčové slová: med³, redukcia, deriváty xantén-3-ónov, homeostáza

Med³ je ako stopový prvok prítomný vo všetkých tkanivách a je nevyhnutý pri bunkovom dýchaní, biosyntéze neurotransmiterov, pri vychytávaní reaktívnych foriem kyslíka, a taktiež je kofaktorom pre rôzne druhy enzýmov. Narušenie homeostázy medi môže viesť k poškodeniu pečene, CNS a tvorbe nádorov. Typickým príkladom poruchy rovnováhy medi sú Wilsonova a Menkesova choroba.

Deriváty xanténov sú biologicky aktívne zlúčeniny s možným širokým terapeutickým spektrom. Niektoré z týchto derivátov majú antitumorové, antipyretické, imunomodulačné, antioxidantné a iné pozitívne biologické aktivity.

Cieľom tejto práce bolo zistiť, či deriváty 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónov majú schopnosť redukovať katióny medi a prípadne zistiť vplyv rôznych substituentov na túto schopnosť. Ako metodika bola použitá spektrofotometrická metóda využívajúca batokuproindisulfónovú kyselinu ako indikátor. Testovaných bolo 10 zlúčenín pri rôznych hodnotách pH. Ukázalo sa, že všetky testované zlúčeniny majú v drvivej väčšine schopnosť redukovať med³naté ióny a to pri všetkých hodnotách pH už pri pomere menšom ako 1:1 (xantén: med³). Najvyššia schopnosť redukcie medi bola pozorovaná v prípade derivátu 4'-trifluorometylu. Vplyv ďalších substituentov bol variabilný a tiež závisel na pH prostredí.

Záverom možno povedať, že všetky deriváty 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónov redukovali med³. Táto schopnosť bola do určitej miery modifikovaná vplyvom substituentov na benzénovom kruhu v polohe 9.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Candidate: Nikola Kopková, MSc

Consultant: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, PharmD., Ph.D.

Title of diploma thesis: Copper reducing properties of a series of xanthen-3-ones

Key words: copper, reduction, xanthen-3-one, homeostasis

Copper is present as a trace element in all tissues and is essential in cellular respiration, in the biosynthesis of neurotransmitters, for the scavenging of reactive oxygen species, and is also a cofactor for various enzymes. Disruption of homeostasis can lead to liver and CNS damage, and tumor formation. Typical examples of an imbalance in copper homeostasis represents Wilson and Menkes disease.

Xanthen derivatives are biologically active compounds with a possible broad therapeutic spectrum. Some of these derivatives have antitumor, antipyretic, immunomodulatory, antioxidant and other positive biological activities.

The aim of this work was to determine whether 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-one derivatives have the ability to reduce cupric ions and possibly to detect the effect of various substituents on this ability. As a methodology, a spectrophotometric method based on bathocuproindisulfonic acid as an indicator was used. Ten compounds were tested at different pH values. All tested compounds have been shown to have the ability to reduce copper ions and most of them even at a ratio of less than 1: 1 (xanthen: copper) at all pH. The highest copper reduction ability was observed in the case of the 4'-trifluoromethyl derivative. The influence of other substituents was variable and also dependent at pH of the environment.

In conclusion, all 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-one derivatives reduced copper. This ability was modified to some extent by substituents on the benzene ring in position 9.

OBSAH

Zoznam skratiek	7
1 Úvod	8
2 Meď a jej funkcie v organizme	9
2.1 Kinetika meďi v organizme	10
2.2 Choroby spôsobené meďou.....	13
2.2.1 Menkesova choroba	15
2.2.2 Wilsonova choroba	17
2.2.3 Huntingtonova choroba.....	19
2.3 Deriváty xantén-3-ónov	21
3 Experimentálna časť	25
3.1 Cieľ práce	25
3.2 Materiály a metodika	26
3.2.1 Použité chemikálie	26
3.2.2 Prístroje	27
3.3 Postup.....	27
3.3.1 Príprava zásobných roztokov	27
3.3.2 Príprava testovacích roztokov	27
3.3.3 Meranie kalibračnej krivky	28
3.3.4 Redukcia meďnatých (Cu^{2+}) iónov v pufrí.....	28
3.4 Matematicko – štatická analýza	29
4 Výsledky	30
5 Diskusia	41
6 Záver	43
7 Zoznam použitej literatúry	44

Zoznam skratiek

AA – kyselina arachidonová

ALS – amyotropná laterálna skleróza

ATP7a – meď transportujúci proteín; „Menkesov proteín”

ATP7b – meď transportujúci proteín; „Wilsonov proteín”

BCS – disodná soľ batokuproindisulfónovej kyseliny

COX – cyklooxygenáza

CTR1 – selektívny transportér medi (z anglického copper transporter 1)

DMSO – dimetylsulfoxid

HA – hydroxylamin hydrochlorid

SOD – superoxiddismutáza

TxA₂ – tromboxán A₂

1 Úvod

Meď je základný stopový prvok, ktorého funkcia v živých systémoch je založená predovšetkým na jeho schopnosti meniť sa medzi dvoma oxidačno-redukčnými stavmi, meďným a meďnatým. Enzýmy, ktoré ich obsahujú, tzv. kuproenzýmy, sa podieľajú na mnohých životne dôležitých procesoch, ako je napríklad dýchanie buniek, eliminácia reaktívnych foriem kyslíka a biosyntéza neurotransmitérov a spojivového tkaniva (Říha et al. 2014). Metabolizmus medi v ľudskom tele je zložitý a nie je úplne objasnený. Jej homeostáza je však starostlivo regulovaná, pretože neviazané ióny medi sa podieľajú na tvorbe kyslíkatých radikálov, ktoré následne spôsobujú poškodenie rôznych biologických štruktúr. Typickým príkladom poruchy homeostázy medi je Wilsonova choroba. Narušenie homeostázy medi je spojené tiež s rôznymi patologickými stavmi vrátane neurodegeneratívnych chorôb a nádorov.

Štúdiom prírodných a syntetických derivátov xanténov sa vedci zaoberajú už niekoľko rokov. Ich pozoruhodný biologický potenciál je dôvodom syntézy mnohých nových derivátov, ktoré môžu mať využitie v modernej terapii niektorých ochorení. Deriváty xanténu sú biologicky aktívne zlúčeniny so širokým terapeutickým spektrom. Niektoré z týchto derivátov majú antitumorové, antipyretické, imunomodulačné, antioxidantné a iné pozitívne biologické aktivity. V posledných rokoch sa o tieto zlúčeniny prejavil zvýšený záujem hlavne pri liečbe niektorých zriedkavých chorôb.

2 Med' a jej funkcie v organizme

Med', ako stopový prvok, tvorí len 0,007 % zemskej kôry v organizme dospelého človeka sa nachádza 1,4-2,1 mg/kg medi. Aj preto je med' nenahraditeľným katalytickým a štrukturálnym kofaktorom, ktorý poháňa široké spektrum dôležitých biochemických procesov, ktoré sú nevyhnutné pre život (Kim et al. 2008).

V biologických systémoch sa ióny medi vyskytujú v dvoch redoxných stavoch: Cu^{1+} (redukovaný) a Cu^{2+} (oxidovaný) (Maksymiec, 1996). Táto redoxná aktivita je kľúčová pre mnohé enzymatické reakcie, ktoré sú dôležité nie len v rôznych biochemických bunkových procesoch, ale aj v regulačných funkciách a v rôznych organizmoch od mikróbov cez rastliny až po cicavce (Kim et al. 2008).

Med' zohráva dôležitú úlohu aj v ľudskej fyziológii. Nerovnováha medi ovplyvňuje vývoj srdca, CNS, funkciu pečene, metabolizmus lipidov, imunitu a rezistenciu voči chemoterapeutickým liečivám (Lutesenko, 2010). Je nevyhnutná pre normálny rast a vývoj, pretože je potrebná pre mnohé biologické procesy vrátane bunkového dýchania. Navyše mnohé ľudske patológie ako napríklad Alzheimerová choroba, neutropénia, kardiomyopatia a rakovina, sú úzko spojené s defektom metabolizmu medi. Existuje tiež niekoľko monogénnych porúch spôsobených poruchami metabolizmu medi napr. Menkesova a Wilsonová choroba (Medina et al. 2019). Pacienti s týmito chorobami majú ťažké zdravotné komplikácie, často so smrteľnými následkami (Frisk et al. 2017).

V priebehu vývoja všetky organizmy využívali redoxné vlastnosti medi a železa ako kofaktora alebo štrukturálneho determinantu proteínov. Biochémia medi umožňuje fotosyntetickým organizmom využiť slnečnú energiu a premeniť ju na organickú energiu a kyslík, ktorý umožňuje existenciu všetkých nefotosyntetických foriem života. Energia organického pôvodu, ktorá sa uvoľňuje v procese bunkového dýchania počas metabolizmu cukrov, aminokyselín a mastných kyselín sa ukladá vo forme ATP. Táto energia sa následne používa na riadenie nespočetných biologických procesov, ako sú napr. enzýmom katalyzované biosyntetické procesy (Nevitt et al. 2012).

2.1. Kinetika medi v organizme

Medzi najbohatšie zdroje medi v potrave patria mäkkýše a morské živočích, a rôzne druhy orechov. Do rastlín môže meď vstúpiť cez koreňovú sústavu alebo cez listy. Jediným spôsobom akým meď môže vstupovať do ľudského organizmu je cez tráviaci trakt. Výnimkou je prechod medi pokožkou cicavcov, ktorý je možný pri aplikácii mastí obsahujúcich vysoké koncentrácie jej kationov (Linder a Azam, 2019). Ako bolo spomenuté vyššie, meď je nevyhnutný prechodný kov potrebný na aktivitu viacerých enzýmov cicavcov (Tab. 1).

Tabuľka 1 Proteíny závislé od medi

Enzým	Funkcia
Cu,Zn- superoxiddismutáza (SOD)	Antioxidant
Cytochróm c-oxidáza	Mitochondriálne dýchanie
Tyrozínáza	Produkcia melanínu
Lyzyoxidáza	Zosieťovanie kolagénu a elastínu
Ceruloplazmín	Ferooxidáza
Hepaestín	Vylučovanie železa z čreva
Dopamín β-hydroxyláza	Produkcia katecholamínov
Peptidylglycín-α-amidujúca monooxygenáza (PAM)	Spracovanie neuropeptidov a peptidových hormónov

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Shim a Harris, 2003

Superoxiddismutáza obsahujúca meď a zinok (Cu,Zn-SOD, tiež SOD-1) je enzým s antioxidantným účinkom slúžiaci na odstránenie superoxidových radikálov za vzniku peroxidu vodíka. Cu,Zn-SOD predstavuje 1 % z celkových bielkovín bunky. Je zaujímavé, že genetické defekty tohto enzýmu môžu byť spojené s amyotropnou laterálnou sklerózou (ALS). Oxidáza cytochrómu c je nevyhnutná na mitochondriálne dýchanie. Tyrozínáza je potrebná na výrobu melanínu. Nedostatok lyzyoxidázy sa prejavuje laxnosťou kolagénu aj pokožky, a odráža poruchu zosieťovania kolagénu a elastínu. Oxidázy ceruloplazmín a hepaestín sú proteíny obsahujúce meď, ktoré regulujú účinnosť transportu železa. Dopamín β-hydroxyláza je dôležitá pri syntéze katecholamínov. Peptidylglycín-α-amidujúca monooxygenáza (PAM) je potrebná pri spracovaní neuropeptidov a peptidových hormónov (Shim a Harris, 2003).

Meď sa z potravy ľahko absorbuje a jej dominantným skladovacím orgánom je pečeň. Prebytočná meď je vylúčená žľou a eliminovaná stolicou. Voľné katióny medi sa zriedka vyskytujú *in vivo*, pretože by sa mohli podieľať na tvorbe kyslíkových radikálov. Meď je obsiahnutá vo viacerých špecifických vnútrobunkových chaperónoch, ktoré zabezpečujú transportnú funkciu medzi jednotlivými časťami buniek. Dodnes nebol identifikovaný žiaden špecifický chaperón, ktorý je zodpovedný za transport medi z tráviaceho traktu do pečene. Predpokladá sa, že meďnaté katióny interagujú s molekulami albumínu resp. histidínu a následné sú prostredníctvom krvného riečiska transportované do príslušných tkanív alebo sa ukladajú v pečeni (Shim a Harris, 2003).

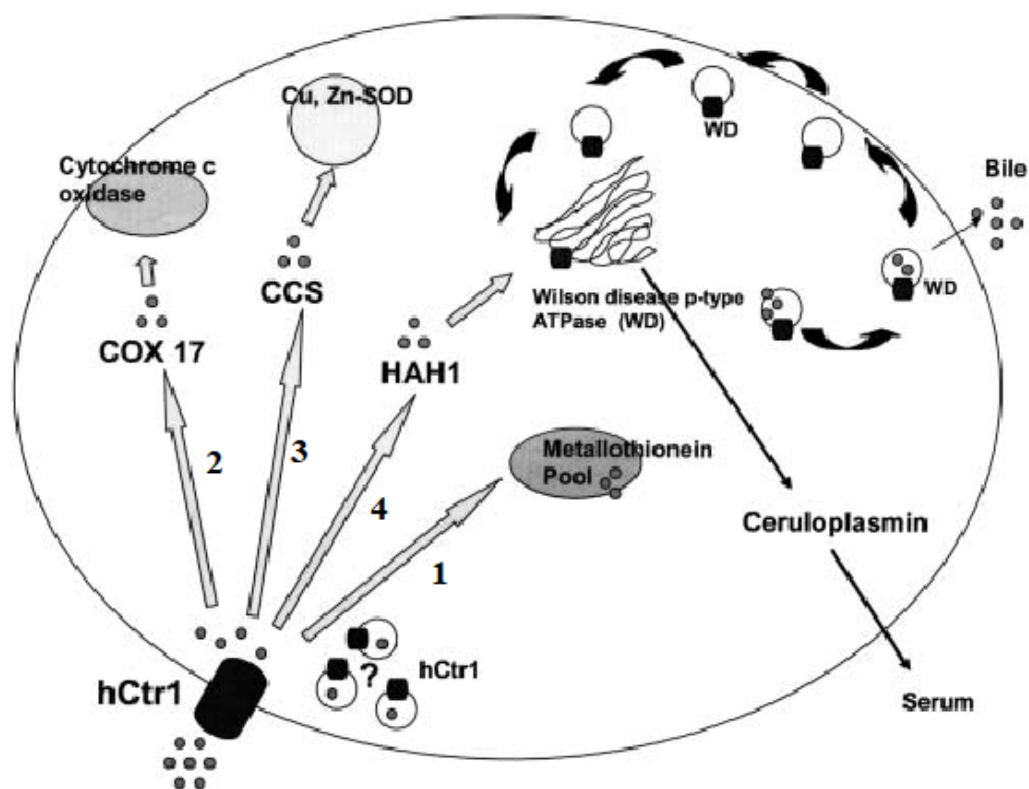
Štúdiom kvasiniek boli prvýkrát identifikované špecifické gény, ktoré sú zodpovedné za kódovanie proteínov regulujúcich príjem medi. Proteíny CTR1 a CTR2, ktoré vykazujú vysokú afinitu k vychytávaniu iónov medi boli po prvýkrát izolované z pívnej kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) (Turski a Thiele, 2009). Následne sa zistila prítomnosť CTR1 u myší a u človeka. U cicavcov zabezpečujú proteíny CTR1 a CTR2 primárne transport medi do čriev, pričom CTR1 sa podieľa predovšetkým na transporte medi z prijatej potravy (Gutfilet et al. 2018).

Transportér CTR1 zohráva kľúčovú úlohu pri naviazaní medi. V bunkách sa CTR1 nachádza v plazmatickej membráne a vo vnútrobunkových vezikulách. V pečeni, obličkách, placentе a mliečnej žľaze sa nachádza predovšetkým na bazolaterálnej strane plazmatickej membrány (Lutsenko, 2010).

CTR1 môže ovplyvňovať koncentráciu medi v sére. Fyziologické stavy, ktoré zvyšujú metabolické nároky medi, môžu zvýšiť upreguláciu proteínu CTR1. V niektorých bunkových líniách naznačuje intracelulárna vezikulárna distribúcia CTR1, že tento transportér nielenže transportuje meď do bunky, ale taktiež sa podieľa na intracelulárnej distribúcii tohto prechodného kovu. Akonáhle je meď intracelulárna, zúčastňuje sa na jednom zo štyroch možných metabolických procesov (viď Obr. 1):

1. naviazanie sa na tioneín (proteín lokalizovaný na Golgiho aparáte, so schopnosťou viazať ťažké kovy)
2. presun do mitochondrie na inkorporáciu do cytochrómvej oxidázy prostredníctvom chaperónu medi COX17
3. väzba na CCS (chaperón medi pre SOD) na dodanie do vznikajúcej Cu,Zn-SOD
4. dodanie medi do jednej z ATPáz (ATP7a/ATP7b) pomocou proteínu HAH1 (presun do ATPázy Wilsonovej choroby typu P), ktoré transportujú meď do novo syntetizovaných kuproproteínov a na export z bunky.

Lokalizačné štúdie ATPázy Wilsonovej choroby typu P ukazujú redistribúciu ATPázy z Golgiho aparátu do vezikulárneho kompartmentu, ktorý v prostredí s vysokou koncentráciou medi, migruje von smerom k žľčovému epitelu. Tento proces umožňuje vylučovanie prebytočnej medi prostredníctvom žlče (Shim a Harris, 2003).



Obrázok 1 Model využitia medi v hepatocyte (Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Shim a Harris, 2003).

Meď vstupuje do hepatocyту viazaného na albumín alebo histidín a prechádza bunkou cez transportný proteín medi CTR1, ktorý sa nachádza na plazmatickej membráne a taktiež je prítomný v samostatnom intracelulárnom vezikulárnom kompartmente. Akonáhle je meď vo vnútri hepatocyту, zúčastňuje sa jedného zo štyroch možných procesov, zatiaľ čo prebytočná meď sa vylúči žľčou.

2.2 Choroby spôsobené meďou

Pre správne fungovanie ľudského organizmu sú nevyhnutné optimálne regulačné prostriedky na udržanie homeostázy medi (Turnlund, 1998). Odhaduje sa, že optimálny denný príjem medi u zdravého dospelého človeka sa pohybuje v rozmedzí 0,6-1,6 mg. Narušenie homeostázy medi bolo pozorované u niektorých pacientov s rakovinou, avšak poruchy súvisiace s jej nesprávnym metabolizmom môžu byť nielen získané, ale aj zdedené (Gutfilen et al. 2018).

Deficit katiónov medi v organizme môže viesť k metabolickým abnormalitám, ktoré sú spôsobené predovšetkým stratou funkcií proteínov obsahujúcich Cu^{+x} . Nadbytok medi môže viesť k neregulovanej oxidácii proteínov, lipidov a iných bunkových zložiek, čoho dôsledkom môže byť degradácia rôznych tkanív. V uplynulom desaťročí bol na základe dedičných porúch metabolizmu medi objasnený pôvod viacerých genetických ochorení. Zdedené poruchy metabolizmu medi, spôsobujúce jej nedostatok alebo nadbytok v mozgu, môžu ovplyvňovať správne fungovanie centrálného nervového systému (Madsen a Gitlin, 2007).

Meď je prítomná v celom mozgu, pričom najvýraznejšie je zastúpená v bazálnych gangliách, hipokampe, mozočku v synaptických membránach a v bunkách kortikálneho pyramidálneho systému. Enzýmy v centrálnom nervovom systéme, pre ktorých funkciu sú katióny medi esenciálne sú tyrozináza, ceruloplazmín, dopamín β -hydroxyláza a cytochrómová oxidáza. Meď môže byť preto priamo alebo nepriamo zapojená v patogenéze početných neurologických ochorení, vrátane Alzheimerovej choroby, amyotrofickej laterálnej sklerózy, Huntingtovej choroby, Menkesovej choroby, Parkinsonovej choroby, Wilsonovej choroby, priónovej choroby a syndrómu okcipitálneho laloku (Desai a Kaler, 2018).

Tabuľka 2 Neurologické ochorenia zahŕňajúce metabolizmus medi

Choroba	Charakteristika	Neurónový efekt
Alzheimerova choroba	Mutácie v amyloidnom prekurzorovom proteíne spôsobujú geneticky túto chorobu. Starecká demencia a zmeny správania. Najčastejšie vo veku 65 rokov.	Akumulácia amyloidného plaku. Samoagregačné plaky a neurofibrilárne spletence. Súvisí s bunkovým oxidačným stresom.
Amyotrofická laterálna skleróza	Nárast mutácií v Cu/Zn superoxidoch spôsobuje malé percento prípadov. Progresívna svalová slabosť na začiatku dospelosti.	Degenerácia horných a dolných motorických neurónov. Smrť v dôsledku zlyhania dýchania.
Huntingtova choroba	Autozomálne dominantné dedičné ochorenie. Dospievajúci alebo dospelí. Závažná porucha pohybu.	Polyglutamínový triplet v proteíne huntingtínu. Prooxidačné aktivity. Nigrostriatálna neurodegenerácia.
Menkesova choroba	X-viazaný recesívny gén. Nesprávna absorpcia a distribúcia medi. Problémy so spojivovými tkanivami.	Progresívna cerebrálna atrofia. Dysmyelinizácia. Abnormality intrakraniálnych ciev.
Parkinsonova choroba	Primárna pohybová porucha. Bradykinéza/akinéza. Svalová rigidita/tremor.	Smrť dopaminergných neurónov. Akumulácia intracelulárnych inklúzií.
Wilsonova choroba	Autozomálne recesívne. Frekvencia nosičov 1 z 90. Klinická prezentácia. Hepatické verzus neurologické. Ovplyvnené vekom.	Predispozícia akumulácie medi v bazálnych gangliách. Strata neurónov a degenerácia dutiny.
Priónová choroba	Transmisívna neurodegeneratívna choroba. Spongiformná encefalopatia.	Výsledok modifikovaných PrP: PrP ^{Sc} a PrP ^{PM} . Možná nežiadúca metalácia PrP s Mn namiesto Cu.
Syndróm okcipitálneho laloku	Mierny alelický variant Menkesovej choroby. Symptómy disautónomie. Problémy so spojivovými tkanivami.	Mierna mozgová atrofia. Mierne myelinizácie.

Zdroj: vlastné spracovanie podľa Desai a Kaler, 2018

2.2.1 Menkesova choroba

Nízka sérová meď pôvodne naznačila, že ochorenie Menkes je jednoduchým syndrómom nedostatku medi v sekundárnom štádiu intestinálnej malabsorpcie medi. Avšak akumulácia medi v tkanivách, ktoré nie sú v pečeni, poukázala na zložitejšie vysvetlenie pozorovaného nedostatku medi. Príznaky závažnej nedostatočnosti, sú väčšinou mozgového pôvodu, a spájajú sa s početnými systémovými poruchami. V mozgu sa nachádza niekoľko dôležitých enzýmov, ktoré vyžadujú meď a sú nepostačujúce kvôli zlej absorpcii medi a v klinickom obraze klasickej Menkesovej choroby dominujú neurologické príznaky (Horn et al. 2018).

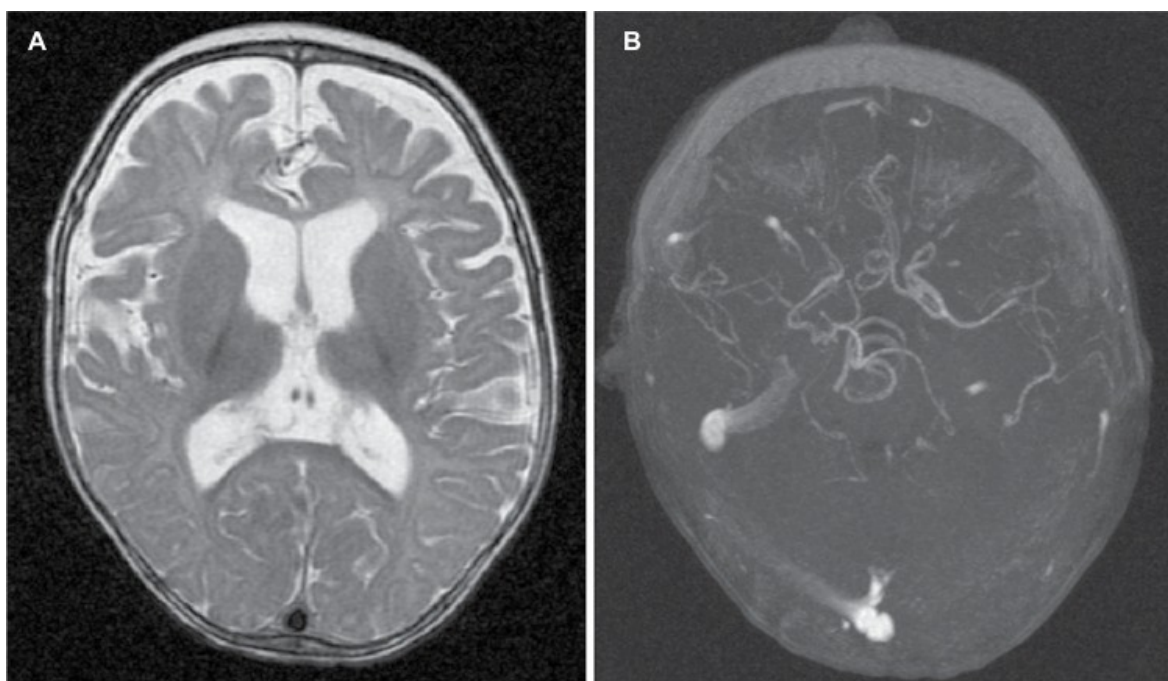
Menkesova choroba je neurogenetické ochorenie spôsobené mutáciou génu X, ktorá sa prejavuje spomalením rastu, krehkými vlasmi, hypopigmentáciou a neurónovou degeneráciou v dôsledku straty funkcie génu kódujúceho ATP7a (Madsen a Gitlin, 2007). Tento gén kóduje ATP-ázu P-typu transportujúcu meď, ktorý tvorí kovalentne fosforylovaný medziprodukt z prenosu gama-fosfátu ATP na špecifický aspartátový zvyšok v katalytickom mieste proteínu (Desai a Kaler, 2018).

Nedostatok génového produktu ATP7a-ázy vedie k abnormálnej bunkovej transportácii medi a zníženej aktivite mnohých enzýmov, ktoré sú závislé od medi (Ahmed a Hussain, 2017). Vzhľadom na značnú klinickú heterogenitu je ťažké predpovedať priebeh Menkesovej choroby. Včasná molekulárna diagnostika a vyhodnotenie vzťahov genotyp-fenotyp môže pomôcť vyhodnotiť prognózu pre novorodenca s Menkesovou chorobou a pomôcť odhadnúť liečbu. Malé množstvá funkčného proteínu ATP7a môžu umožniť miernejší Menkesov fenotyp a lepšiu prognózu liečby (Horn et al. 2018).

Ľudia s Menkesovou chorobou majú narušený transport medi skrz placentu, gastrointestinálny trakt a mozog. Cirkulujúce koncentrácie medi a ceruloplazmínu sú nízke a neurochemické koncentrácie ovplyvnené enzýmom medi (dopamin-hydroxylázou), sú abnormálne (Gubler et al. 1953). Znížená aktivita enzýmov závislých od medi je pravdepodobne hlavným faktorom poškodenia mozgu pri Menkesovej chorobe. Keďže meď je nekompetitívny antagonist *N*-metyl-*D*-aspartátového receptora môže plniť úlohu pri regulácii dráždivosti neurónov. Synaptická aktivácia *N*-metyl-*D*-aspartátového receptora vedie k rýchlemu a reverzibilnému obsadeniu ATP7a, čoho dôsledkom je spojenie medzi homeostázou medi a aktiváciou neurónov v mozgu. Napriek závažnému nedostatku medi majú pacienti s Menkesovou chorobou len zriedkavo hematologické prejavy. ATP7a zohráva dôležitú úlohu pri vývoji centrálnej nervovej sústavy, ktoré

môžeme pozorovať u pacientov Menkesovej choroby taktiež môže dôjsť k poruchám správania a k neurologickým a vývojovým abnormalitám.

Neurologické prvky sú prítomné už v rannom detstve. ATP7a slúži ako transportér medi vo vaskulárnych endoteliálnych bunkách, v epiteli sietnicového pigmentu formujúcich hematoencefalickú bariéru a preto je dôležitý pri distribúcii medi do mozgu. Pacienti s Menkesovou chorobou vykazujú progresívnu cerebrálnu atrofiu a oneskorenú myelinizáciu, ktoré je možné pozorovať na magnetickej rezonancii mozgu (Obr. 2) (Desai a Kaler, 2018).



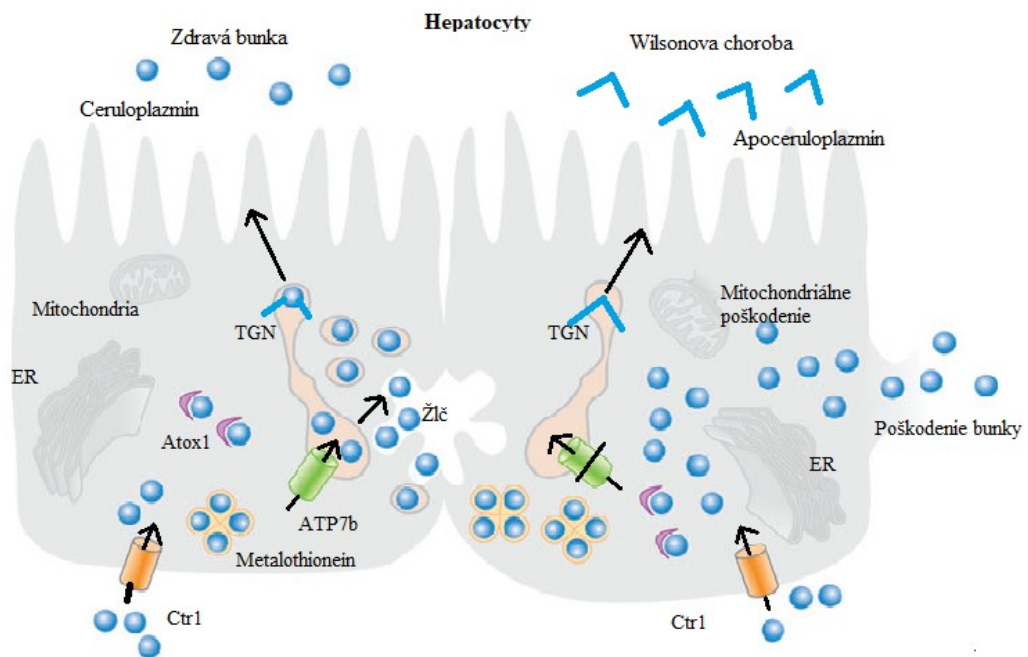
Obrázok 2 Rádiologické nálezy (Zdroj: Caicedo-Herrera et al. 2018).

Obrázok A: difúzna mozgová atrofia, B: skrútenie mozgových krvných ciev

U pacientov s Menkesovou chorobou je systémová aplikácia medi neúčinná, pretože transport medi do mozgu je závislý na ATP7a (Madsen a Gitlin, 2007). Ako najúčinnšie sa ukázalo podávanie komplexu medi a histidínu, ktorý zvyšuje koncentráciu medi v krvi čím sa pacienti dožívajú vyššieho veku. Na druhej strane, neliečení pacienti väčšinou umierajú v priebehu 3 rokov od diagnostikovania tejto choroby (Desai a Kaler, 2018).

2.2.2 Wilsonova choroba

Wilsonova choroba je autozomálna recesívna porucha vedúca k cirhóze pečene a progresívnej degenerácii bazálnych ganglií v dôsledku zmeny funkcie génu ATP7b. Pri tejto chorobe dochádza k strate funkcie ATP7b (Madsen a Gitlin, 2007; Obr. 3). Hoci sa uskutočnilo niekoľko pokusov výskum korelácie genotyp-fenotyp u pacientov s Wilsonovou chorobou nevedol k jasnej asociácii medzi genotypom a klinickou prezentáciou. Na rozdiel od Menkesovej choroby, kde je u každého pacienta identifikovaná len jedna mutácia, vo väčšine prípadov pacientov postihnutých Wilsonovou chorobou sú heterozygoty, dve rôzne mutácie na každej alele, čo komplikuje prognózu genotyp-fenotypu Wilsonovej choroby. Štúdia na dánskej kohorte Wilsonovej choroby (inšpirovaná úspešnou genotypovo-fenotypovou koreláciou), u pacientov s nedostatkom fenylalanínhydroxylázy naznačila, že mutácia ATP7b by mohla byť funkčne dominantnou (Horn et al. 2018).



Obrázok 3 Patogenéza Wilsonovej choroby (Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Madsen a Gitlin, 2007).

Teoretické porovnanie zdravej bunky a bunky s Wilsonovou chorobou. Transport medzi *trans*-Golgiho sieti (TGN) je znázornený ako proces vnútrobunkovej homeostázy

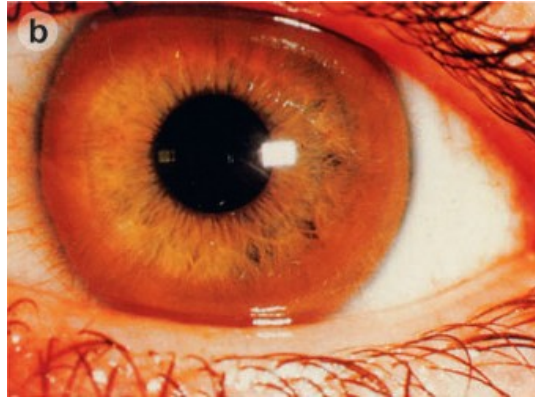
ATP7b. Výsledkom dysfunkcie je akumulácia medi v cytozole s pridruženým bunkovým poškodením.

Hoci ATP7b sa nachádza vo viacerých oblastiach mozgu, pri Wilsonovej chorobe dochádza k akumulácii medi v extrahepatálnych a hepatálnych tkanivách, ktorý je spôsobený jej nadmernou akumuláciou z plazmy (Madsen a Gitlin, 2007). Strata ATP7b vedie k produkcii apoceruloplazmínu, ktorý sa v plazme rýchlo degraduje, čo má za následok zníženú kapacitu prenosu medi (Desai a Kaler, 2018). Ceruloplazmín je feroxidáza, ktorá obsahuje viac ako 95 % medi prítomnej v plazme. Tento proteín je syntetizovaný v hepatocytoch a vylučovaný do plazmy. Znížená sérová koncentrácia ceruloplazmínu je charakteristickým indikátorom pri Wilsonovej chorobe (Madsen a Gitlin, 2007).

Súčasne dochádza k zníženému vylučovaniu medi do žlče, to vedie k akumulácii medi a poškodeniu pečene, a v konečnom dôsledku k preťaženiu extrahepatálnych tkanív med'ou (Desai a Kaler, 2018).

Takmer polovica pacientov trpiacich Wilsonovou chorobou má príznaky neuropsychiatrického ochorenia. Hoci tieto neurologické príznaky môžu byť na začiatku nepatrné, bez spolupráce pacientov môžu viesť k vážnym parkinsonovým príznakom v dôsledku nahromadenia medi v bazálnych gangliách. Neurodegenerácia Wilsonovej choroby vychádza priamo z akumulácie medi, no presné mechanizmy bunkového poškodenia nie sú známe. Pozorované boli bežné psychiatrické symptómy od problémov správania až po psychózy (Madsen a Gitlin, 2007).

V prípade Wilsonovej choroby sa okrem pečene a mozgu môže med' akumulovať aj v oku. Patologický znak, Kayserov-Fleischerov kruh, je prstencová sedimentácia medi na okraji rohovky (Obr. 4). Med' sa môže hromadiť aj v šošovke a spôsobiť „slnečnicový“ šedý zákal. U približne 95 % pacientov s neurologickými príznakmi sa prejavil Kayser-Fleischerov kruh, zatiaľ čo poškodenie pečene sa prejavilo u 65 % pacientov (Desai a Kaler, 2018).

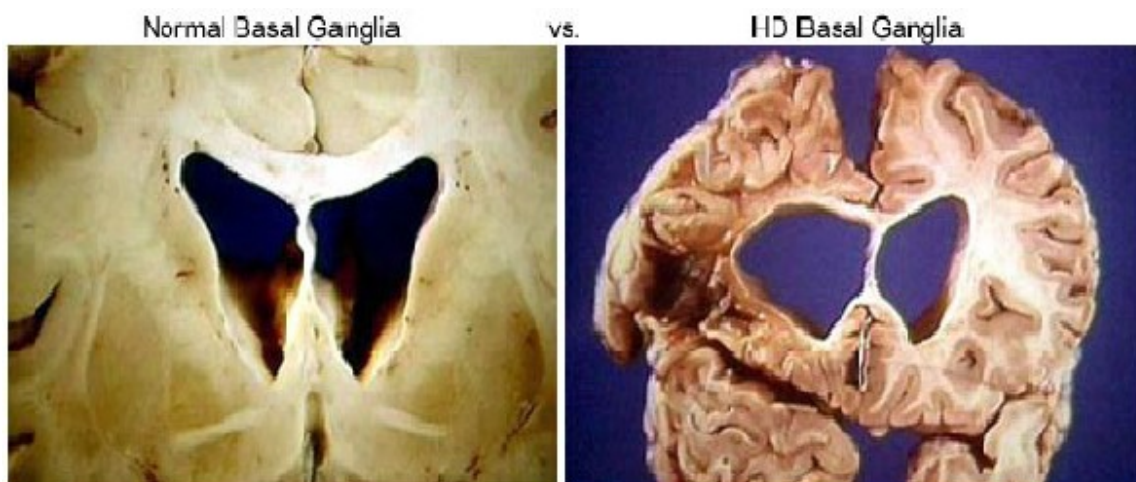


Obrázok 4 Akumulácia medi v oku, prítomný aj Kayserov-Fleischerov kruh (Zdroj: Madsen a Gitlin, 2007).

Tieto abnormality bez neuropatických korelácií sú výsledkom akumulácie medi v mozgu. Perorálne chelatačné činidlá medi sú účinné na obnovenie homeostázy medi u mnohých pacientov s Wilsonovou chorobou (Madsen a Gitlin, 2007).

2.2.3 Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba je neurodegeneratívna genetická porucha na 4. chromozóme DNA. Genetickou mutáciou vzniká tzv. huntingtínový proteín. Ochorenie je charakteristické poruchou pohybu, psychiatrickými príznakmi a kognitívnou dysfunkciou (Xiao a Fan, 2013). Príbuzní pacientov s touto genetickou poruchou trpia veľkou záťažou, pretože pacienti majú zmenené sociálne správanie a dochádza aj k zhoršeniu medziľudských vzťahov. Dochádza k poškodeniu neurónov, k zmenšeniu a zníženiu funkcie mozgu, ako aj k degeneratívnym zmenám v mozgovej kôre (Obr. 5).



Obrázok 5 Vplyv Huntingtonovej choroby na bazálne gangliá (Zdroj: Liou, 2010).

Bazálne gangliá ľudského mozgu a vplyv Huntingtonovej choroby na jeho štruktúru. Mozog postihnutý Huntingtonovou chorobou má zväčšené mozgové komory v porovnaní so zdravým mozgom v dôsledku nekrózy nervových buniek.

Priebeh ochorenia sa u pacientov líši a môže mať niekoľko štádií:

1. štádium: pacient je bez zmeny správania sa vzťahu k práci ako aj v rodinnom živote
2. štádium: pacient je schopný vykonávať každodenné činnosti
3. štádium: pacient potrebuje pomoc pri každodennej činnosti a nie je schopný pracovať
4. štádium: pacient je schopný žiť v domácom prostredí, ale je nesamostatný
5. štádium: pacient je odkázaný na pomoc odborníkov.

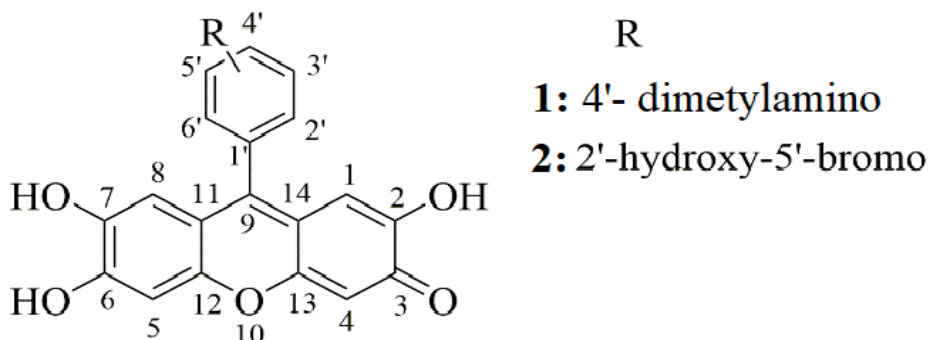
Na diagnózu Huntingtonovej choroby sa využíva priamy genetický test, najčastejšie polymerázovou reťazovou reakciou merajúcou dĺžku repetícií génu pre huntingtinový proteín na každej alele (Necpál a Patarák, 2013).

Akumulácia medi v striate pacientov s Huntingtonovou chorobou je známa niekoľko rokov, ale príčina ešte nebola objasnená. Hromadenie medi v mozgu by mohlo mať za následok interakciu s väzobnými miestami s nízkou afinitou rôznych biomolekúl. Zistilo sa, že interakcie medi s proteínmi sa podieľajú aj na patogenéze Alzheimerovej choroby a Parkinsonovej choroby. V prípade polyglutamínových chorôb vrátane Huntingtonovej choroby sa takéto interakcie neuvádzajú. Prítomnosť medi by však mohla vyvolať zmenu konformácie mutantného huntingtínu, agregáciu a/alebo redoxnú aktivitu, čo by bolo podobné ako interakcie *beta*-amyloidu s meďou, ktorá indukuje *beta*-amyloidovú oligomerizáciu, o ktorej sa predpokladá, že prispieva k patogenéze Alzheimerovej choroby (Fox et al. 2007).

2.3 Deriváty xantén-3-ónov

Prírodné a syntetické deriváty xanténov sú známe biologickou aktivitou vrátane antitumorovej, antipyretickej, antimalaritickej, antimikrobiálnej, antioxidantnej a hepatoprotektívnej (Završnik et al. 2013). V dôsledku rozmanitej štruktúry a možnému terapeutickému využitiu v medicíne si deriváty xantén-3-ónov získali pozornosť odbornej verejnosti a mnohých výskumných skupín po celom svete (Xiong et al. 2018). Je známe, že oxidačný stres priamo súvisí s niektorými chorobami (ateroskleróza, Alzheimerová choroba, rakovina, proces starnutia, degenerácia centrálného nervového systému), pri ktorých sa antioxidantné zlúčeniny, akými sú xantény, môžu stať dôležitými v prevencii alebo liečbe týchto ochorení (Veljović et al. 2015).

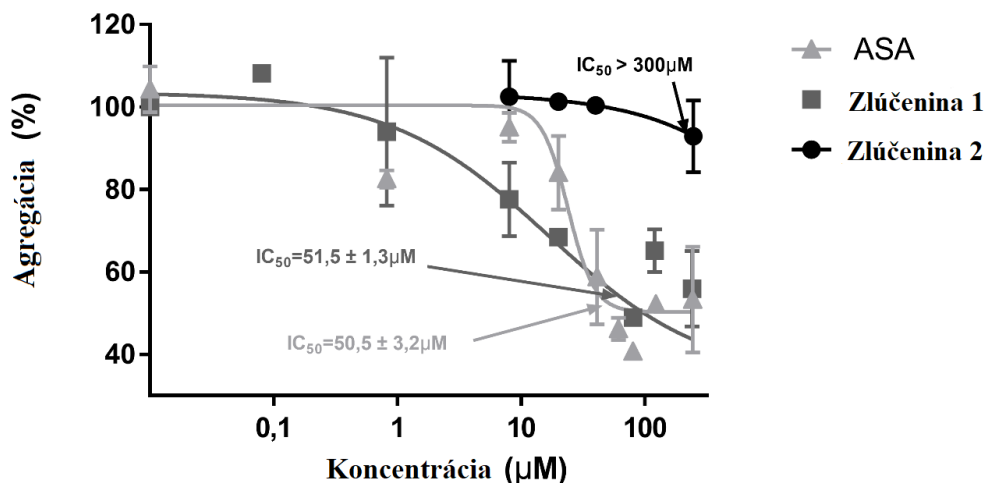
V štúdií Applovej et al. (2018) je popísaná syntéza niekoľkých derivátov xantén-3-ónov s protidoštičkovou aktivitou. Najvyššia biologická aktivita bola pozorovaná v prípade 9-(4'-dimetylaminofenyl)-2,6,7-trihydroxy-xantén-3-ón (**1**, Obr. 6), ktorého protidoštičková aktivita bola založená na antagonizme na receptoroch tromboxánu A₂. Ukázalo sa, že **1** spolu so zlúčeninou 9-(2'-hydroxy-5'-bromofenyl)-2,6,7-trihydroxy-xantén-3-ónom (**2**) boli aktívne aj pri agregácii indukovanej kolagénom (Obr. 6).



Obrázok 6 Chemická štruktúra dvoch najaktívnejších derivátov xantén 3-ónov (Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Applová et al. 2018).

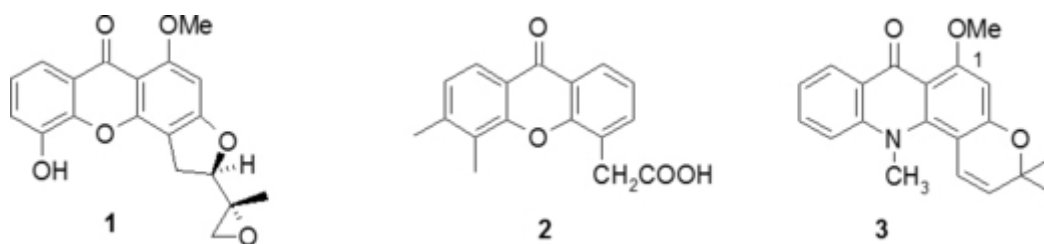
V prípade agregácie indukovanej kolagénom vykazovala vyššiu aktivitu zlúčenina **1**, zatiaľ čo zlúčenina **2** bola aktívnejšia pri inhibícii agregácie indukovanej AA. Kolagénom indukovaná dráha je spojená s TxA₂, preto je pravdepodobné, že liek antagonizujúci účinok TxA₂ by mohol blokovat' agregáciu indukovanú kolagénom. Doteraz nebola objasnená silnejšia inhibícia aktivácie krvných doštičiek AA zlúčeninou **2** v porovnaní so zlúčeninou **1** aj napriek jej vyššiemu antagonickému efektu na tromboxánových receptoroch. Zlúčenina **1** vykazovala porovnateľný alebo dokonca lepší účinok ako klinicky používaná kyselina acetylsalicylová s odlišným mechanizmom účinku.

Protidoštičková liečba je zameraná okrem iného na inhibíciu agregácie krvných doštičiek. Keďže pacienti s ischemickou chorobou srdca majú pri akútnom infarkte myokardu zvýšené množstvo tromboxánových A₂ receptorov, táto potenciónálna zlúčenina pôsobiaca ako antagonist a týchto tromboxánových receptorov by mohla byť potenciónálnym liekom.



Obrázok 7 Vplyv zlúčenín na agregáciu krvných doštičiek indukovanú kolagénom (Zdroj: Applová et al. 2018). Krivky závislosti koncentrácie dvoch najaktívnejších zlúčenín 1,2. Údaje sú uvedené ako priemer ± SD.

Viacere xantén-3-óny vykazujú potenciál pre vývoj nových liečiv. Ďalším významným derivátom xantén-3-ónom, ktorý je podrobovaný protinádorovým klinickým skúškam je psorospermín (Obr. 8-1). Ide o antileukemické činidlo izolované z koreňov a kôry tropickej africkej rastliny *Psorospermum febrifugum* a kyselina dimetylxantenón-4-octová (DMXAA, Obr. 8-2), ktorá spôsobuje rýchly vaskulárny kolaps a nekrózu nádorov. Psorospermín bol objavený pri štúdiu vzťahu medzi štruktúrou a účinkom analógov kyseliny flavónovej a kyseliny octovej. Prírodné dehydroxantóny (artobiloxantón a xantóny), ako je gaudichaudión A, sú tiež účinnými antileukémickými činidlami. Významné protinádorové vlastnosti dehydrofuranoxantón psorospermínu a alkaloidu akronycínu (lineárne tricyklické kruhové systémy so štvrtým oksyločeným kruhom), povzbudili výskum izosterických derivátov xantónu akronycín, ktoré boli dokonca účinnejšie ako samotný akronycín. Zistilo sa, že deriváty akronycínu (Obr. 8-3) s metoxyskupinou v polohe 1 sú vysoko nerozpustné a nezlepšujú celkovú aktivitu (Palmeira et al. 2010).



Obrázok 8 Chemická štruktúra derivátov xantónov (Zdroj: vlastné spracovanie podľa Palmeira et al. 2010). **1:** psorospermín **2:** kyselina dimetylxantenón-4-octová (DMXAA) **3:** alkaloid akronycín

Xantóny s prenylovými jednotkami, spojenými v kruhu alebo ako funkčná skupina s otvoreným reťazcom sprostredkujú dôležité biologické činnosti týkajúce sa veľkého množstva cieľov s terapeutickou hodnotou. Zistilo sa, že v niektorých prípadoch prítomnosť prenylových postranných reťazcov zvýšila aktivitu v porovnaní s ich neprenylovanými analógmi (Palmeira et al. 2010).

Mnoho prírodných produktov zohráva dôležitú úlohu antioxidantov a predstavujú prekursorov pre vývoj nových látok. Najmä polyfenoly sú dlhodobo uznávané pre svoje schopnosti zachytávať voľné radikály v bunkách (Ndhkala et al. 2010).

Ukázalo sa, že aj deriváty xantónov pôsobia ako chelátory kovov, zachytávače voľných radikálov a inhibítory peroxidácie lipidov (Cidade et al. 2017). V tejto práci bola zdôraznená antioxidantná aktivita jednoduchých okysličených xantónov akými sú vicinálne dioly. Potrebný je ďalší výskum na posúdenie potenciálu 1, 2-dihydroxyxantónov.

Prírodné glykozidy flavonoidov a xantónov sú známe biologickou aktivitou, pri ktorej zohráva dôležitú úlohu glykozidická funkčná skupina (Alves et al. 2019). Bolo preukázané, že acetylovaný flavonoidový glykozid pripravený syntézou má silný inhibičný účinok na rast gliómových buniek. Na základe týchto poznatkov sa predpokladá, že acetylované xantónové glykozidy by mohli pôsobiť ako silné inhibítory rastu gliómových buniek a začlenené do prolipozómov by mohli umožniť prienik do hematoencefalickej bariéry, čím by sa zabránilo hydrolyze esterázami. V závere bolo potvrdené, že xantón (3,6-bis(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-glukopyranozyl xantón) sa úspešne včlenil do lipozómov, pričom bola zachovaná inhibičná aktivita proti bunkovým líniam glioblastómu. Tento výsledok potvrdil, že xantóny môžu byť v budúcnosti potencionálnym liekom pri liečbe niektorých typov nádorov.

Je tiež dôležité zdôrazniť, že protidoštičkové účinky môžu zvýšiť protinádorový účinok. Je dobre známe, že nádorové bunky potrebujú väčšie množstvo železa a medi

a preto sú citlivejšie na účinok chelatačných činidiel. Obzvlášť redukcia medi alebo železa môžu viesť k zvýšeniu protinádorového účinku. Z tohto dôvodu bol študovaný vplyv týchto zlúčenín na redukciu medi (Mladěnka et al. 2020).

3 Experimentálna časť

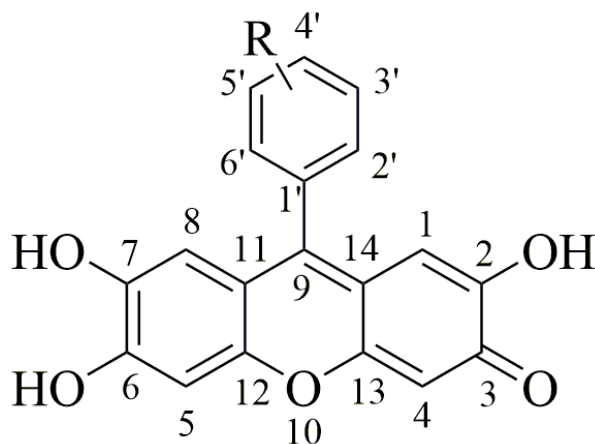
3.1 Cieľ práce

Cieľom rigorózneho štúdia práce bol štúdium interakcií syntetických derivátov 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónov s meďnatými iónmi pri rôznych hodnotách pH (4,5; 5,5; 6,8; 7,5). Okrem zistenej miery schopnosti redukovať meď, ďalším cieľom bol aj vplyv chemickej štruktúry na redukciu týchto iónov pri rôznych hodnotách pH.

3.2 Materiály a metodika

3.2.1 Použité chemikálie

Pentahydrát síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), chlorid meďný (CuCl), dimetylsulfoxid (DMSO), hydroxylamin hydrochlorid (HA), disodná soľ batokuproindisulfónovej kyseliny (BCS), acetátové tlmivé roztoky o pH 4,5 a 5,5 (vytvorené z kyseliny octovej a octanu sodného v ultračistej vode, koncentrácie soli boli 15 mM, koncentrácie voľnej kyseliny boli dopočítané pre odpovedajúce pH), tlmivé roztoky o pH 6,8 a 7,5 boli pripravené z kyseliny 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]etansulfónovej (HEPES) a jej sodnej soli, koncentrácie soli boli 15 mM. Použité chemikálie boli zakúpené od Sigma-Aldrich (Nemecko). Testované látky - deriváty 2,6,7- trihydroxyxantén-3-ónov (vid' Obr. 9) boli pripravené synteticky na Univerzite v Sarajeve (Prof. Kemal Duric).



Obrázok 9 Základná štruktúra derivátov 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónov.

- 1: 3',4'-dihydroxy
- 2: 2'-hydroxy-3'-metoxy
- 3: 3',5'-dimetoxy-4'-hydroxy
- 4: 3'-metoxy-5'-nitro-4'-hydroxy
- 5: 4'-etoxy
- 6: 3'-bromo
- 7: 2'-chloro-6'-fluoro
- 8: 4'-dimetylamino
- 9: 4'-trifluorometyl
- 10: 4'-acetylamino

3.2.2 Prístroje

- Spektrofotometer na meranie absorbancie SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Analytické váhy KERN ABT120-5DM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Trepačka pre skúmavky IKA[®] VORTEX GENIUS 3 (IKA[®] - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)
- Trepačka pre mikrotitračné doštičky IKA[®] MS 3 digital (IKA[®] - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)

3.3 Postup

3.3.1 Príprava zásobných roztokov

- 5 mM roztok meďnatých iónov (Cu^{2+}) boli pripravené rozpustením pentahydrátu síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $M_w = 249,69$ g/mol) v ultračistej vode
- 5 mM roztok chloridu meďného (CuCl) bol pripravený rozpustením CuCl ($M_w = 98,99$ g/mol) vo vodnom roztoku 0,1 M HCl a 1 M NaCl. Najprv bolo pripravené rozpúšťadlo zmiešaním 442 μl 32% HCl ($M_w = 36,46$ g/mol, 1 liter = 1,16 kg) a 44558 μl ultračistej vody. Následne sme v 0,1 M HCl rozpustili NaCl ($M_w = 58,44$ g/mol) na 1 M roztok. CuCl sme rozpustili v pripravenom rozpúšťadle v ultrazvukovom kúpeli.
- 100 mM roztok hydroxylamínu hydrochloridu (HA) bol pripravený rozpustením hydroxylamínu ($M_w = 69,49$ g/mol) v ultračistej vode a následne zriedený na koncentráciu 10 mM ultračistou vodou.
- 5 mM roztok BCS bol pripravený rozpustením disodnej soli batokuproindisulfónovej kyseliny ($M_w = 564,54$ g/mol) v ultračistej vode.

3.3.2 Príprava testovaných roztokov

Základné roztoky testovaných zlúčenín boli pripravené rozpustením v DMSO (zvyčajne 10 mM) a následné riedené v DMSO podľa potreby na požadovanú koncentráciu.

3.3.3 Meranie kalibračnej krivky (Tab. 3)

- Do všetkých testovaných jamiek mikrotitračnej doštičky bolo pipetou pridané 150 μl tlmivého roztoku.
- Následne bolo do všetkých jamiek pridaných 50 μl 1 mM roztoku HA.
- Do testovacích jamiek bolo pridané 50 μl roztoku meďnatých iónov príslušnej koncentrácie a do kontrolných jamiek bolo pridané 50 μl vody.
- Doštička bola 1 minútu na trepačke.
- Následne bolo do prvej polovice jamiek pridaných 50 μl roztoku BCS (x) a do druhej polovice jamiek bolo pridaných 50 μl vody (x).
- Absorbancia pri vlnovej dĺžke 484 nm bola meraná okamžite a po 5 minútach.
- Z nameraných hodnôt bola zostrojená kalibračná krivka.

Tabuľka 3 Kalibračná krivka meďnatých iónov

	c (Cu^{2+})					
	0 μM	50 μM	100 μM	150 μM	200 μM	250 μM
Jamky s indikátorom						
Slepé vzorky						

3.3.4 Vlastný experiment - redukcia meďnatých (Cu^{2+}) iónov pri rôznych hodnotách pH

- Do mikrotitračnej doštičky bolo pridaných 100 μl príslušného tlmivého roztoku (pH 4,5; 5,5; 6,8 alebo 7,5)
- Do testovaných jamiek bolo pridané 50 μl roztoku testovanej látky v rôznych koncentráciách, rozpúšťadlo (DMSO) a do kontrolných jamiek bolo pridané 50 μl 1 mM roztoku HA (pH 6,8, 7,5). V prípade pH 4,5 a 5,5 to bol 10 mM roztok HA.
- Do všetkých jamiek bolo pridané 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iónov.
- Mikrotitračná doštička bola miešaná 2 minúty.
- Následne bolo pridané 50 μl 5 mM roztoku disodnej soli batocuproindisulfónovej kyseliny (BCS) do jamiek (x) a vody do jamiek (x) (vid'. Tab. 4).
- Absorbancia pri vlnovej dĺžke 484 nm bola meraná okamžite a po 5 minútach.

Tabuľka 4 redukcia med'natých iónov

	Roztok testovanej látky c_1	Roztok testovanej látky c_2	Roztok testovanej látky c_x	Rozpúšťadlo	Kontrolné jamky (HA)
Jamky s indikátorom					
Slepé vzorky					

3.4 Matematicko – štatistická analýza

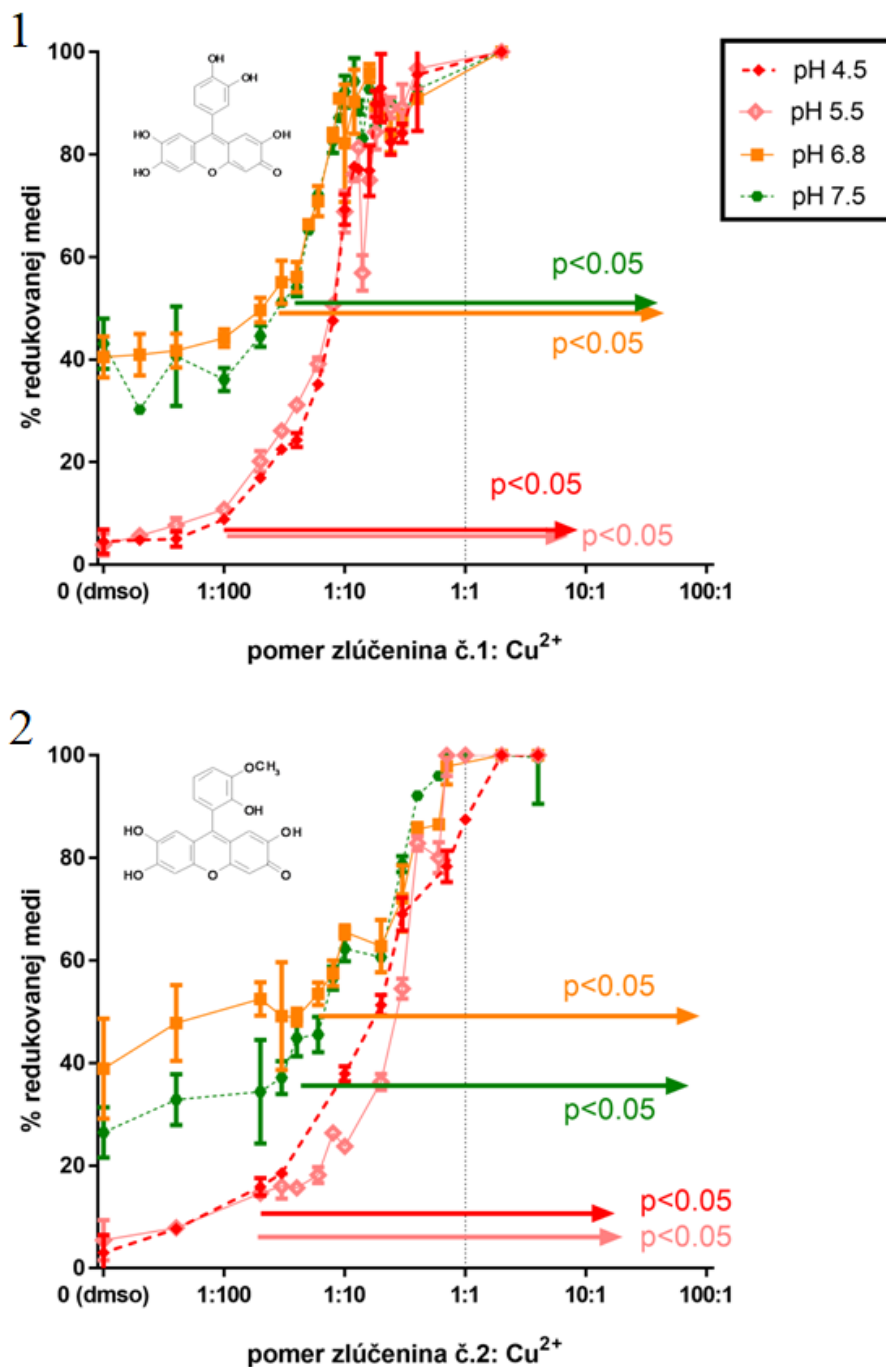
Namerané výsledky boli spracované ako priemer \pm smerodajná odchýlka, ktorá bola vypočítaná na základe vzťahu

$$\partial = \frac{\sqrt{(x_1-x)^2 + (x_2-x)^2 + \dots + (x_n-x)^2}}{n-1}$$

kde ∂ je smerodajná odchýlka, x je priemerná hodnota, x_1 je hodnota prvej položky, x_2 je hodnota druhej položky, x_n je hodnota poslednej položky, n je počet položiek. Čím je hodnota smerodajnej odchýlky nižšia, tým bližšie sú namerané hodnoty okolo strednej hodnoty. Naopak, čím je hodnota smerodajnej odchýlky vyššia, tým sú odklony od priemeru výraznejšie. Rozdiely redukčných potenciálov sa porovnali prípravou redukčných priamok s 95 % konfidenčnými intervalmi. Pri stanovení štatistických postupov bol použitý MS Excel a GraphPad Prism verzia 6 pre Windows (GraphPad Software, USA).

4 Výsledky

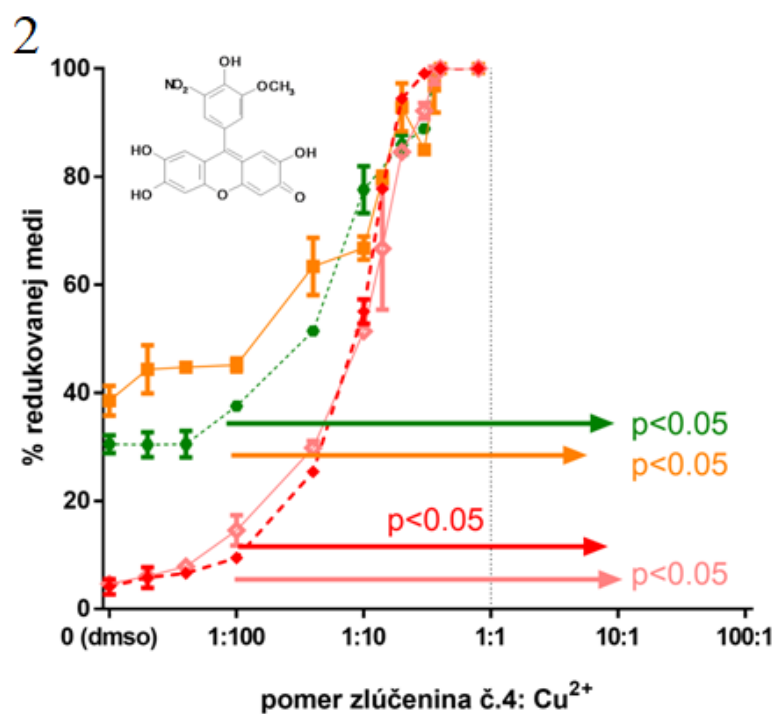
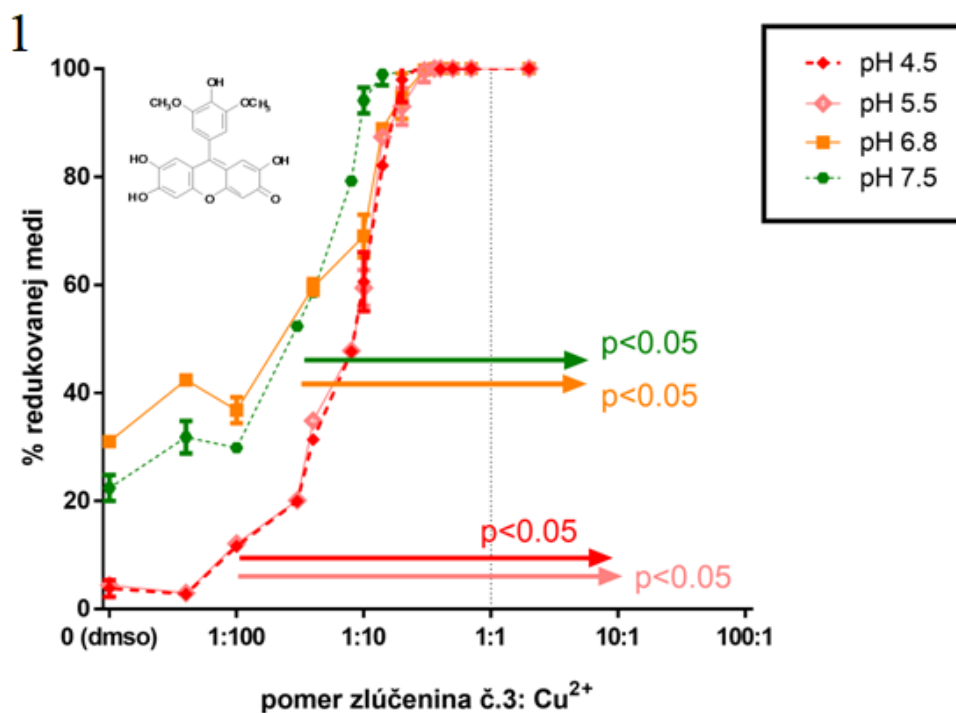
Na obrázkoch 10–14 sú znázornené redukčné krivky testovaných látok. Vo všetkých prípadoch sa ukázalo, že došlo k redukcii meďnatých iónov a navyše táto redukcia bola aj kompletná, tzn. zredukované bolo 100 % medi. Na obrázkoch 15–18 je znázornené porovnanie meď-redukčnej účinnosti pri rôznych hodnotách pH. Grafické zhrnutie výsledkov je na obrázku 19.



Obrázok 10 Redukcia medi derivátmi xantén-3-ónov

1: 3',4'-dihydroxy derivát pri hodnotách pH 6,8 a 7,5 redukoval med' už pri nižších pomeroch, pričom prakticky kompletná redukcia medi bola dosiahnutá už pri pomere 1:10. Pri hodnotách pH 4,5 a 5,5 pri pomere 1:10 bolo zredukovaných približne 70 % medi, ale kompletná redukcia bola dosiahnutá pri vyšších pomeroch.

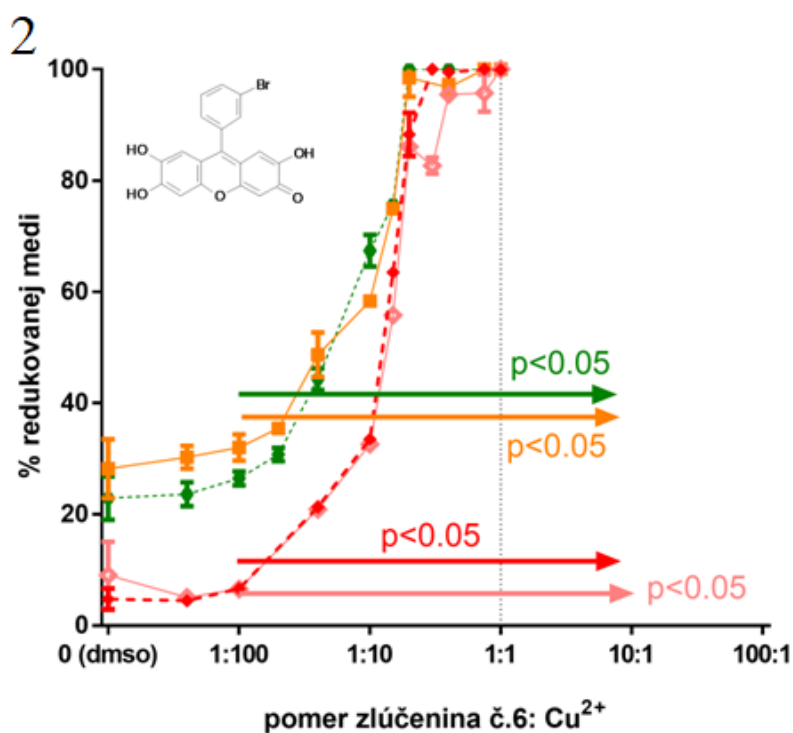
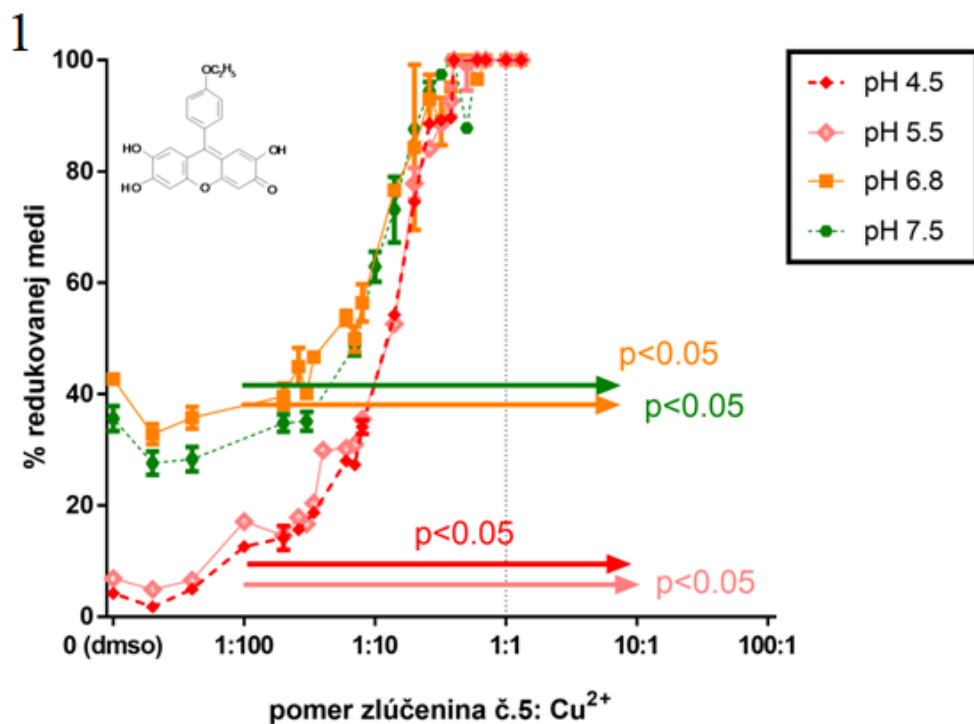
2: 2'-hydroxy-3'-metoxy derivát redukoval med' v pomere 1:1 pri hodnotách pH 5,5-7,5 prakticky úplne. Pri hodnote pH 4,5 bolo v pomere 1:1 zredukovaných cca 85 % medi.



Obrázok 11 Redukcia medi derivátmi xantén-3-ónov

1: 3',5'-dimetoxy-4'-hydroxy derivát redukoval meď na 100 % pri všetkých hodnotách pH pri pomere nižšom ako 1:1.

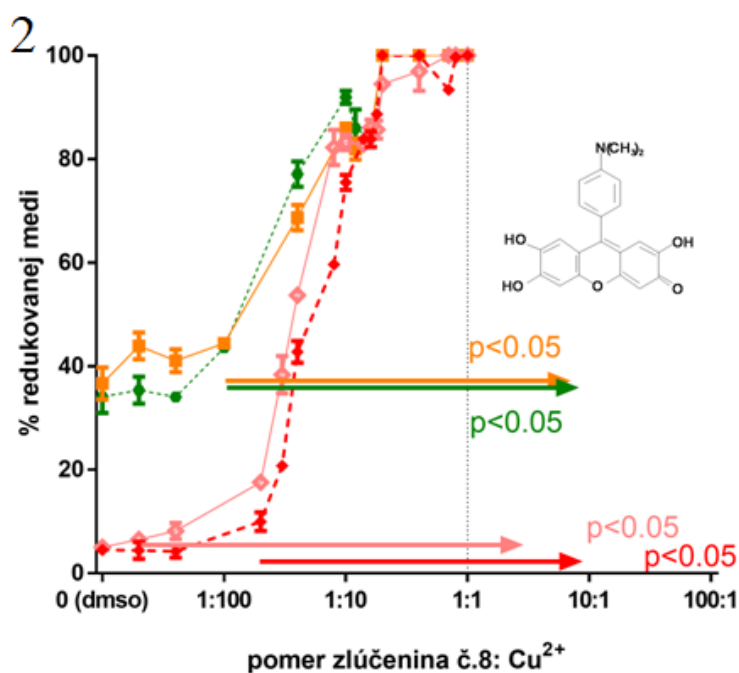
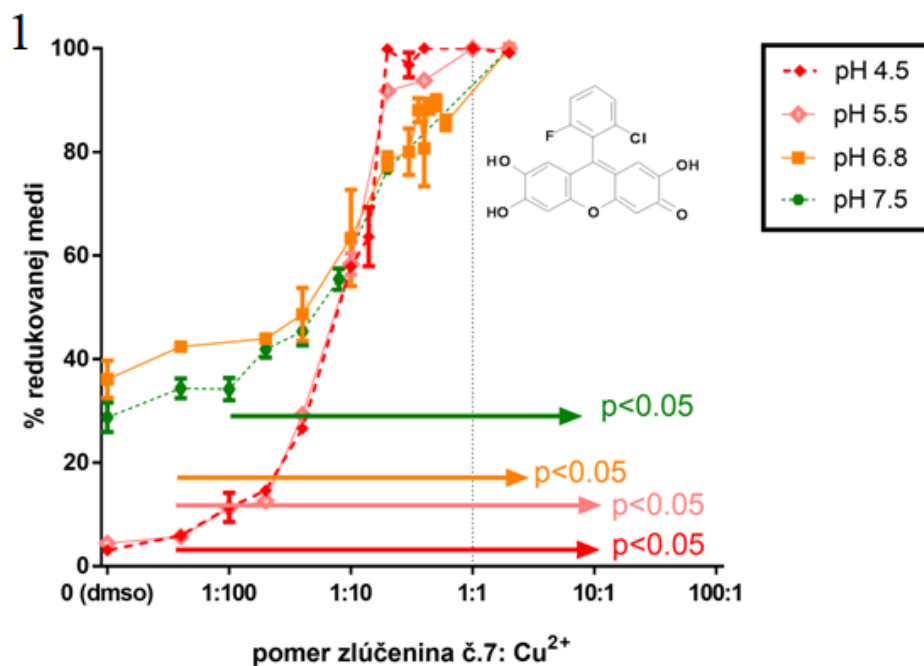
2: 3'-metoxy-5'-nitro-4'-hydroxy tento derivát zredukoval 100 % medi v pomere 1:1 pri všetkých hodnotách pH.



Obrázok 12 Redukcia medi derivátmi xantén-3-ónov

1: 4'-etoxy derivát preukázal 100 % účinnosť redukovať meďnaté ióny pri všetkých hodnotách pH pri pomere 1:1.

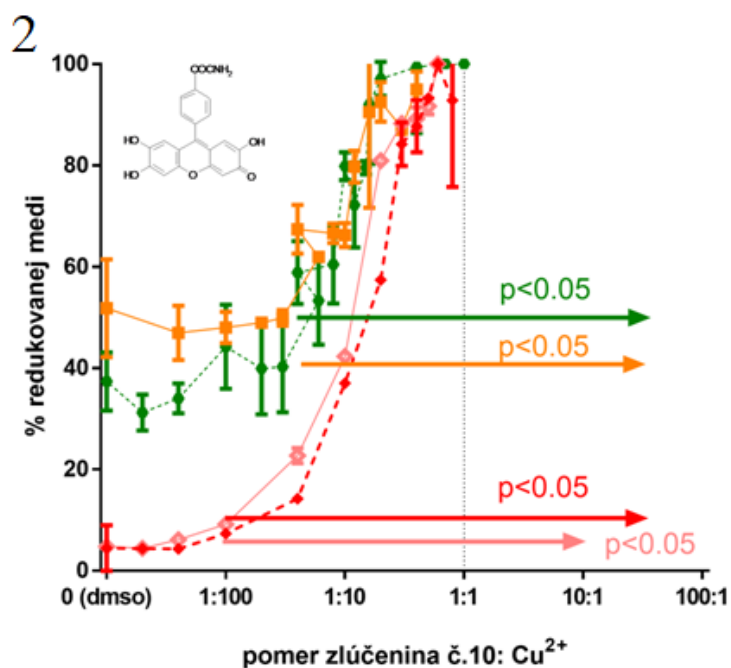
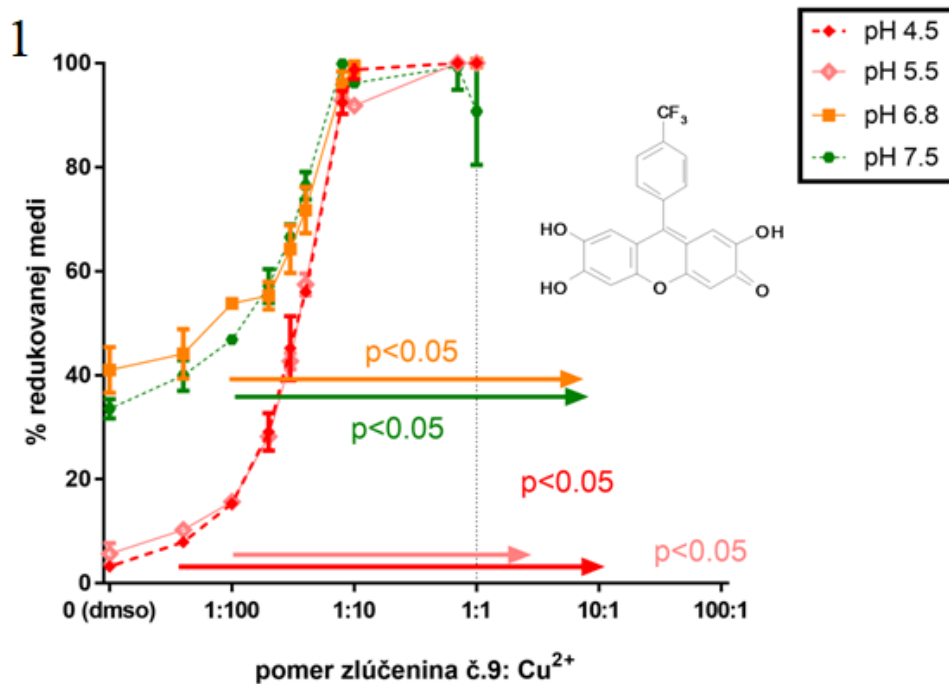
2: 3'-bromo derivát bol schopný zredukovať všetky meďnaté katióny už pri pomere 1:10 pri všetkých hodnotách pH.



Obrázok 13 Redukcia medi derivátmi xantén-3-ónov

1: **2'-chloro-6'-fluoro** derivát redukoval meď pri pomere 1:1 pri hodnotách pH 5,5 a 4,5 úplne. Pri hodnote pH 4,5 bolo 100 % medi zredukovaných aj pri nižšej koncentrácii.

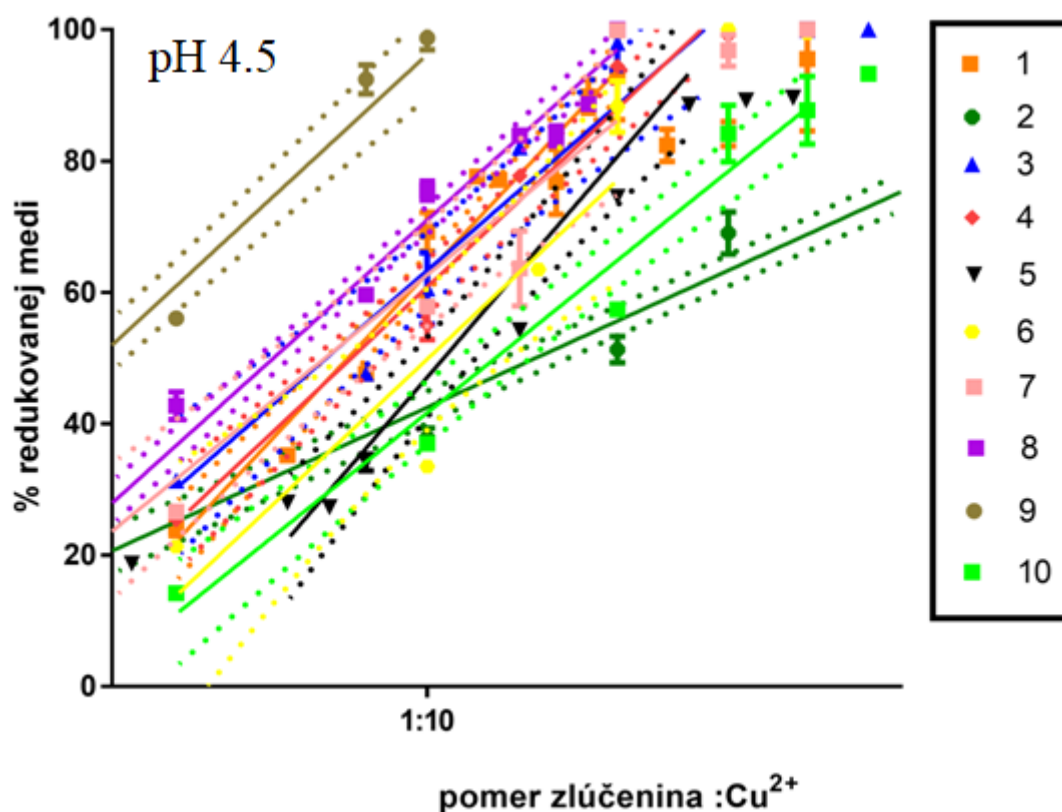
2: **4'-dimetylamino** derivát preukázal tiež vysokú schopnosť redukovat' meďnaté katióny. Už pri pomeroch výrazne nižších ako 1:1 bola redukováaná všetká meď.



Obrázok 14 Redukcia medi derivátmi xantén-3-ónov

1: 4'-trifluorometyl derivát účinne redukoval katióny medi pri všetkých hodnotách pH. Pri všetkých hodnotách pH došlo prakticky ku kompletnej redukcii pri pomere nižšom ako 1:10.

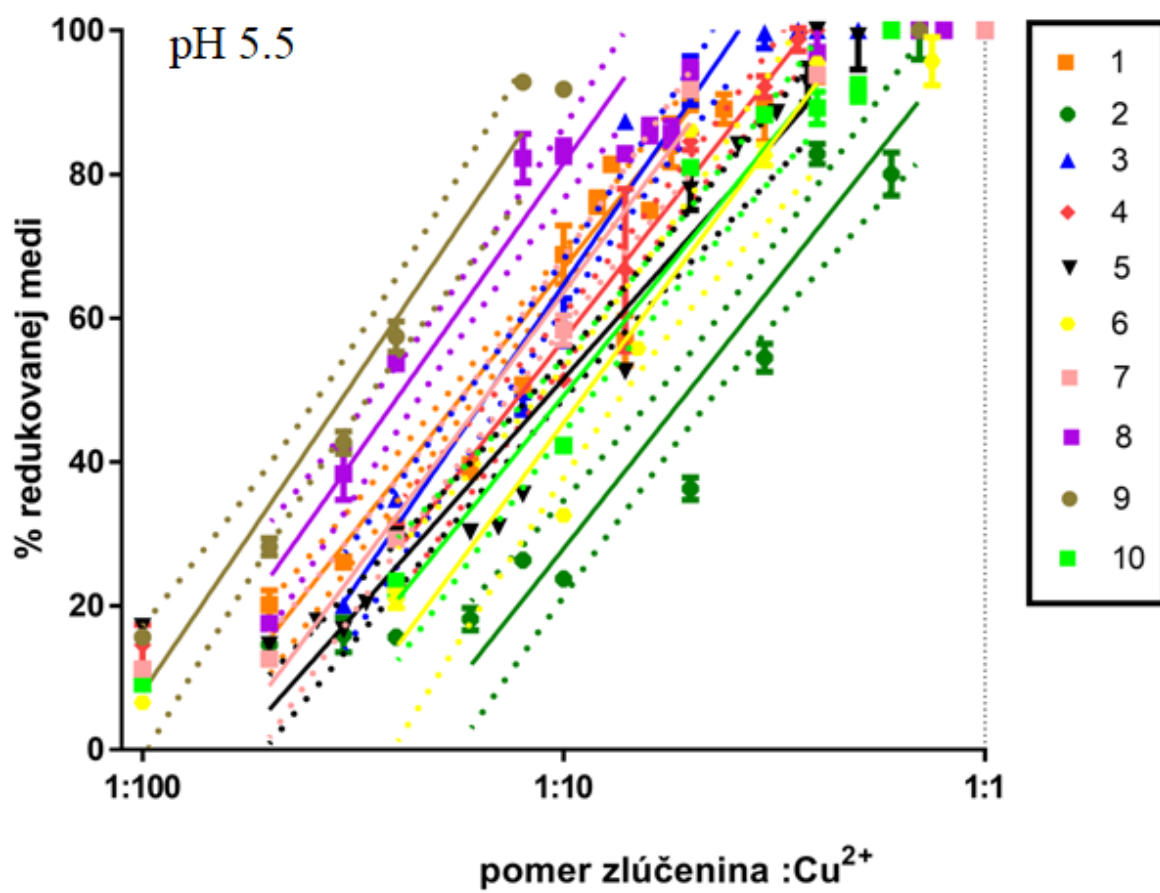
2: 4'-acetylamino derivát najúčinnejšie redukoval meď pri hodnote pH 7,5, ale aj pri nižších pH došlo ku kompletnej redukcii medi, aj keď pri vyšších pomeroch.



Obrázok 15 Porovnanie derivátov xantén-3-ónov redukovať meď pri hodnote pH 4,5. Graf zobrazuje priamky závislosti redukcie medi na pomere testovanej látky k nej vyznačenými 95 % konfidenčnými intervalmi.

- 1: 3',4'-dihydroxy
- 2: 2'-hydroxy-3'-metoxy
- 3: 3',5'-dimetoxy-4'-hydroxy
- 4: 3'-metoxy-5'-nitro-4'-hydroxy
- 5: 4'-etoxy
- 6: 3'-bromo
- 7: 2'-chloro-6'-fluoro
- 8: 4'-dimetylamino
- 9: 4'-trifluorometyl
- 10: 4'-acetylamino

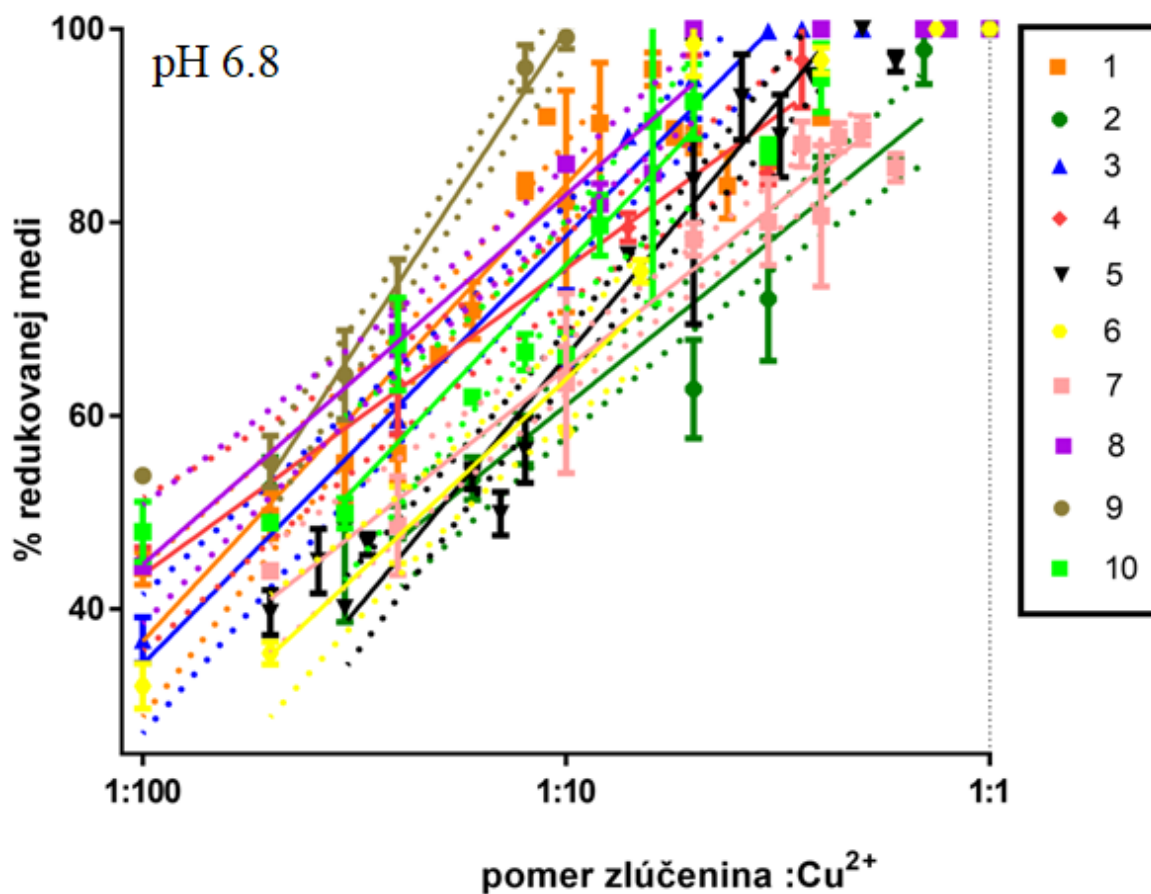
100 % účinnosť redukcie meďnatých katiónov pri hodnote pH 4,5 v pomere 1:10 bola pozorovaná v prípade derivátu 4'-trifluorometylu. Zvyšné deriváty boli schopné redukovať Cu^{2+} ióny pri vyšších koncentráciách. Úplná redukcia bola dosiahnutá v prípade derivátov 3',5'-dimetoxy-4'-hydroxy; 3'-bromo; 2'-chloro-6'-fluoro a 4'-dimetylamino.



Obrázok 16 Porovnanie derivátov xantén-3-ónov redukovať meď pri hodnote pH 5,5. Graf zobrazuje priamky závislosti redukcie medi na pomere testovanej látky k nej vyznačenými 95 % konfidenčnými intervalmi.

Legenda odpovedá Obr. 15.

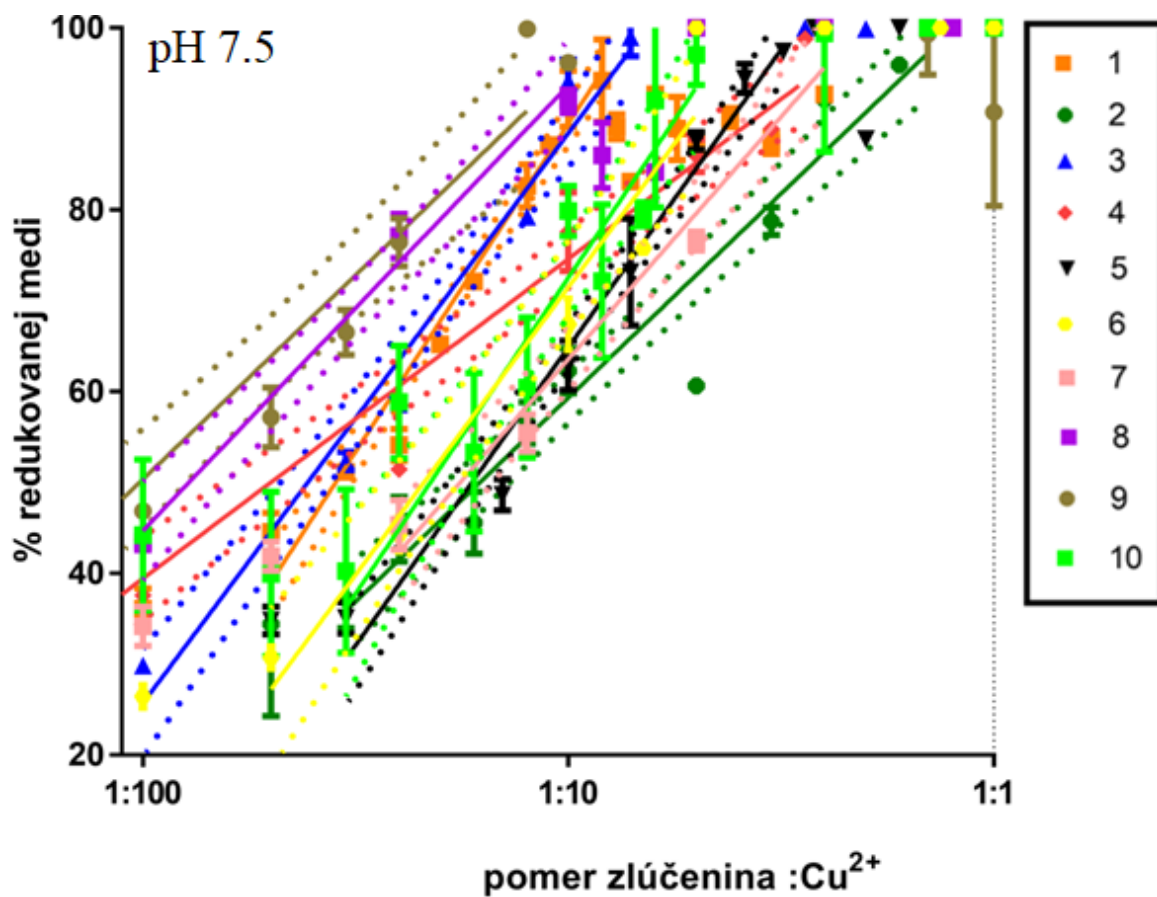
Pri hodnote pH 5,5 sa väčšina testovaných zlúčenín ukázali ako účinné a dokázali redukovať meďnaté kationy úplne (cca 90-100 %).



Obrázok 17 Porovnanie derivátov xantén-3-ónov redukovať meď pri hodnote pH 6,8. Graf zobrazuje priamky závislosti redukcie medi na pomere testovanej látky k nej vyznačenými 95 % konfidenčnými intervalmi.

Legenda odpovedá Obr. 15.

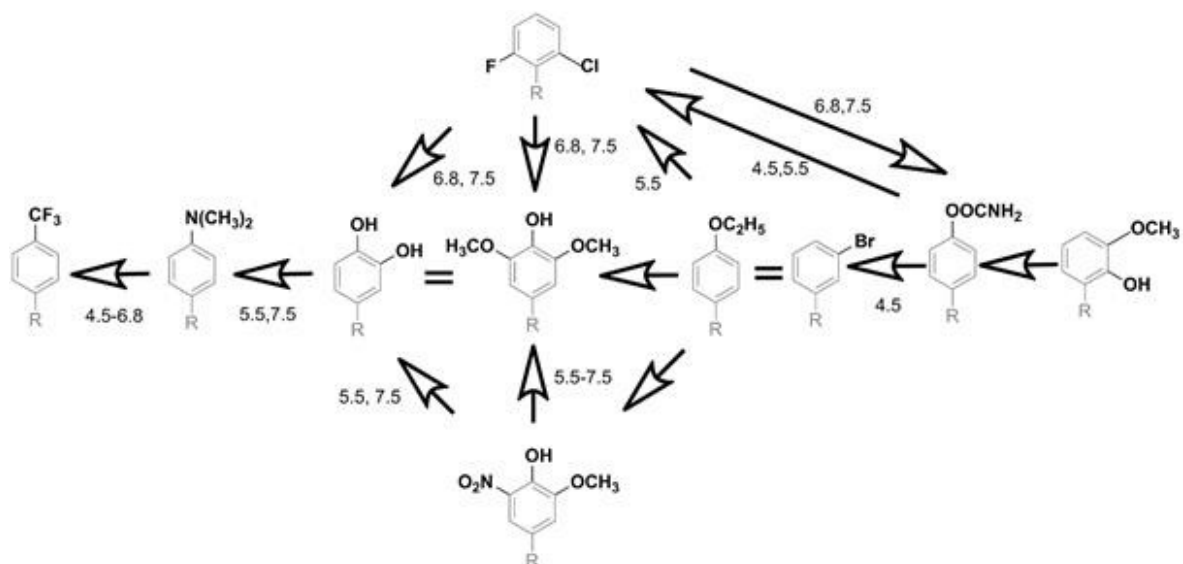
Pri hodnote pH 6,8 vykazoval najvyššiu účinnosť pri redukcii Cu^{2+} kationov derivát 4'-trifluorometyl.



Obrázok 18 Porovnanie derivátov xantén-3-ónov redukovať meď pri hodnote pH 7,5. Graf zobrazuje priamky závislosti redukcie medi na pomere testovanej látky k nej vyznačenými 95 % konfidenčnými intervalmi.

Legenda odpovedá Obr. 15.

Pri hodnote pH 7,5 vykazovali najvyššiu účinnosť, redukcie katiónov medi 4'-trifluorometyl a 4'-acetylamino.



Obrázok 19 Súhrn rozdielov redukcie medzi testovanými zlúčeninami

Smer šípok znázorňuje aktívnejší derivát. Čísla pri šípkach predstavujú hodnoty pH, pri ktorých boli rozdiely pozorované.

5 Diskusia

Deriváty xantén-3-ónov sa do predmetu záujmu dostali nedávno pre svoju biologickú aktivitu a vplyv na ľudský organizmus. Doposiaľ bolo zistené, že rôzne substituenty zohrávajú v aktivite týchto zlúčenín veľmi dôležitú úlohu.

Izoflavonoidy, ktoré majú podobnú štruktúru ako študované deriváty xantén-3-ónov, ukázali veľmi dobrú schopnosť redukovať mednaté katióny pri hodnotách pH od 4,5-7,5. Redukčné schopnosti izoflavonoidov závisia od koncentrácie, tzn. nárast účinnosti s rastúcou koncentráciou. Prítomnosť voľnej 4'-hydroxylovej skupiny na B-kruhu bola dôležitým faktorom pri redukcii mednatých katiónov. Samostatná metoxy- skupina pravdepodobne znížila redukčný potenciál, ale dve susedné metoxy-skupiny mali vyšší redukčný účinok. Prítomnosť voľnej 7-hydroxylovej skupiny na A-kruhu nemala vo všeobecnosti žiaden, alebo mala veľmi nízky potenciál redukovať med'. Prítomnosť 6-metoxylovej a 7-hydroxylovej skupiny na A-kruhu môže za určitých podmienok mierne zvýšiť redukčný potenciál. Prítomnosť voľnej 5-hydroxylovej skupiny nesúvisel s redukciou medi, ale naopak s jej chelataciou. Taktiež aj hodnota pH mala vplyv na redukciiu medi, čím vyššia hodnota pH tým väčšia redukčná schopnosť (Karlíčková et al. 2015).

Rozdiely v schopnosti redukovať izoflavonoidy v porovnaní s našimi testovanými látkami sú výrazné. Izoflavonoidy schopné chelatacie mednatých iónov síce redukovali med', ale neboli schopné kvantitatívne redukovať med' prítomnú v roztoku (Karlíčková et al. 2015). V našom prípade boli xantén-3-óny vo všetkých prípadoch a za všetkých študovaných hodnotách pH schopné redukovať prakticky vždy všetku med' (Obr. 10-14) a to za všetkých študovaných podmienok už v pomere 1:1, alebo aj pri nižších pomeroch (tzn. menej chelátorov bolo schopné chelatovať vyššie množstvo medi). Z výsledkov môže vyplývať: 1) vybrané izoflavonoidy sú silnejšími chelátormi medi, pretože neumožňujú redukovať všetku med', 2) izoflavonoidy sú slabšími redukčnými činidlami v porovnaní s nami študovanou skupinou xantén-3-ónov. Výsledky a zistenia z tejto práce ako aj rozširujúceho výskumu boli publikované v Mladěnka et al. 2020. Nové experimenty ukázali, že deriváty xantén-3-ónov sú slabými chelátormi. Zistilo sa, že chelatujú med' v prítomnosti mierne kompetitívneho prostredia hematoxylinu, no nie sú schopné chelatacie v silne kompetitívnom prostredí BCS. Na druhej strane je vhodné uviesť, že podobne sa správajú aj izoflavonoidy (Karlíčková et al. 2015).

Na základe našich zistení možno konštatovať, že substitúcia fenylového jadra má vplyv na redukciu medi. Ako vhodná sa javí poloha meta. Zistilo sa, že prítomnosť elektrón donorového substituentu v meta- polohe fenylového jadra zvyšuje schopnosť redukovať meďnaté katióny. Väčšina substituentov sa vyznačuje kladným mezomérnym efektom okrem derivátov č. 4,7,9, v ktorých -NO₂ skupina, -F skupina a -CF₃ skupina vykazujú záporný mezomérny efekt. Indukčný efekt je u všetkých substituentov záporný. 4'-trifluorometyl bol pri optimálnom pH schopný zredukovať meď najefektívnejšie a to aj pri nízkej koncentracii na 100 % (Obr. 14). Ako najmenej výhodná sa javí substitúcia fenylového jadra v polohe para a orto. Zatiaľ nie je objasnený vplyv mezomerného efektu a polohy jednotlivých substituentov na redukciu medi. Ide o pomerne nové zlúčeniny, ktoré ešte nie sú dobre preštudované. Napriek tomu možno povedať, že tieto zlúčeniny sa vyznačujú dobrou schopnosťou redukovať meď a môžu byť preto použité pri liečbe niektorých ochorení.

Zvýšené hladiny medi boli pozorované pri rôznych druhov rakoviny (prsníka, kŕčka maternice, vaječníkov, pľúc, prostaty, žalúdka a leukémie). Zistilo sa, že zvýšená koncentrácia medi v sére súvisí s liekovou rezistenciou pri liečbe rakoviny. Pacienti, u ktorých bola liečba liekmi neefektívna mali o 130-160 % viac medi v sére, ako pacienti s úspešnou liečbou (Kalinowski et al. 2016). Antiproliferatívny účinok bol zistený aj u derivátov xantén-3-ónov (Lemos et al. 1975). Antiproliferatívny účinok sa znížil ak deriváty xantén-3-ónov obsahovali hydroxy- alebo metoxy- skupinu. Naopak prítomnosť halogénových substituentov (chlór, fluór a bróm) zvýšila antiproliferatívny účinok (Veljović et al. 2019). Vyššie uvedené výsledky skupiny Mladěnka et al. 2020 poukázali na zaujímavý paradox: napriek tomu, že nami študované zlúčeniny sú silné redukčné činidlá meďnatých iónov, vplyv najúčinnšieho z nich (trifluormetyl derivát) na nádorové bunky v prítomnosti toxických koncentracii medi bol paradoxne ochranný. Využitie tejto zlúčeniny v terapii nádorov nie je pravdepodobné. Pozornosť môže byť zameraná na štúdium chorôb spojených s poruchou homeostázy medi, či už lokálne (vyššie uvedené neurodegeneratívne choroby) alebo systémovo (Wilsonova choroba).

6 Záver

Predmetom rigorózneho štúdia bolo schopnosť derivátov 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónov redukovať kationy medi. Zistilo sa, že redukčnú aktivitu vykazujú všetky testované zlúčeniny a boli medzi nimi pozorované určité rozdiely. Ako najúčinnější redukovať Cu^{2+} kationy sa ukázal derivát 4'-trifluorometyl, ktorý pri nízkej koncentrácii redukoval med' úplne a to za všetkých pH podmienok.

7 Zoznam použitej literatúry

Ahmed MI, Hussain N. Neuroimaging in Menkes disease. *Journal of Pediatric Neurosciences* 2017; 12(4): 378-382

Alves A, Correia-da-Silva M, Nunes C, Campos J, Sousa E, Silva PMA, Bousbaa H, Rodrigues F, Ferreira D, Costa PC, Pinto M. Discovery of a New Xanthone against Glioma: Synthesis and Development of (Pro)liposome Formulations. *Molecules* 2019; 24(3): 409

Applová L, Veljović E, Muratović S, Karličková J, Macáková K, Završnik D, Saso L, Durić K, Mladěnka P. 9-(4'-dimethylaminophenyl)-2,6,7-trihydroxy-xanthone-3-one is a potentially novel antiplatelet drug which antagonizes the effect of thromboxane A₂. *Medicinal Chemistry* 2018; 14(2): 200-209

Caicedo-Herrera G, Candelo E, Pinilla J, Vidal A, Cruz S, Pachajoa HM. Novel *ATP7A* gene mutation in a patient with Menkes disease. *The Application of Clinical Genetics* 2018; 11: 151–155

Cidade H, Rocha V, Palmeira A, Marques C, Tiritan ME, Ferreira H, Lobo JS, Almeida IF, Sousa ME, Pinto M. In *silico* and in *vitro* antioxidant and cytotoxicity evaluation of oxygenated xanthone derivatives. *Arabian Journal of Chemistry* 2017; 13(1): 17-26

Desai V, Kaler SG. Role of copper in human neurological disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2008; 88(3): 855S– 8S

Fox JH, Kama JA, Lieberman G, Chopra R, Dorsey K, Chopra V, Volitakis I, Cherny RA, Bush AI, Hersch S. Mechanisms of Copper Ion Mediated Huntington's Disease Progression. *PLOS ONE* 2007; e334

Frisk JMH, Kjellén L, Kaler SG, Pejler G, Öhrvik H. Copper Regulates Maturation and Expression of a MITF:Tryptase Axis in Mast Cells. *The Journal of Immunology* 2017; 199(12): 4132–4141

Gubler CJ, Lahey ME, Cartwright GE, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism. The transportation of copper in blood. *The Journal of Clinical Investigation* 1953; 32(5): 405–414

Gutfilen B, Souza SAL, Valentini G. Copper-64: a real theranostic agent. *Development and Therapy* 2018; 12: 3235–3245

Horn N, Mollerb LB, Nurchic VM, Aaseth J. Chelating principles in Menkes and Wilson diseases Choosing the right compounds in the right combinations at the right time. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2008; 190(2019): 98–112

Kalinowski DS, Stefani CH, Toyokuni S, Ganz T, Anderson GJ, Subramaniam NV, Trinder D, Olynyk JK, Chua A, Jansson PJ, Sahni S, Lane DJR, Merlot AM, Kovacevic Z, Huang MLH. Redox cycling metals: Pedaling their roles in metabolism and their use in the development of novel therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016; 1863(2016): 727–748

Karlíčková J, Macáková K, Říha M, Teixeira Pinheiro LM, Filipický T, Horňasová V, Hrdina R, Mladěnka P. Isoflavones Reduce Copper with Minimal Impact on Iron *In Vitro*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015; 2015: 437381

Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology* 2008; 4(3): 176-185

Lemos A, Gomes AS, Loureiro JB, Brandão P, Palmeira A, Pinto MMM, Saraiva L, Sousa ME. Synthesis, Biological Evaluation, and In Silico Studies of Novel Aminated Xanthones as Potential p53-Activating Agents. *Molecules* 2019; 24: 1975

Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *American Society for Clinical Nutrition* 1996; 63: 797S-811S

Liou S. The Basic Neurobiology of Huntington's Disease. [online]. 2010. Huntington's Outreach Project, Dostupné na: <https://hopes.stanford.edu/the-basic-neurobiology-of-huntingtons-disease-text-and-audio/>. Dátum prístupu: 04.02.2020

Lutsenko S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Current Opinion in Chemical Biology* 2010; 14: 211–217

Madsen E, Gitlin JD. Copper and Iron Disorders of the Brain. *Annual Review of Neuroscience* 2007; 30: 317–37

Maksymiec W. Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 1996; 34(3): 321-342

Medina JJM, Nasob LG, Pérezc AL, Rizzic A, Okulika NB, Valcarceld M, Saladod C, Ferrerb EG, Williams PAM. Synthesis, characterization, theoretical studies and biological (antioxidant, anticancer, toxicity and neuroprotective) determinations of a copper(II) complex with 5-hydroxytryptophan. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019; 111: 414-426

Mladěnka P, Karličková J, Hrubša M, Veljović E, Muratović S, Carazo A, Mali AS, Špirtović-Halilović S, Saso L, Pour M, Durić K. Interaction of 2,6,7-trihydroxy-xanthene-3-ones with iron and copper, and biological effect of the most active derivative on breast cancer cells and erythrocytes. *Applied sciences* 2020; 10(14): 4846

Ndhhlala AR, Moyo M, Van Staden J. Natural Antioxidants: fascinating or mythical Biomolecules?. *Molecules*. 2010; 15(10): 6905-6930

Necpál J, Patarák M. Neuropsychiatrický pohľad na Huntingtonovu chorobu. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie* 2013; 109(4): 438–445

Nevitt T, Öhrvik H, Thiele JD. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1823(9): 1580–1593

Palmeira A, Paiv A, Sousa E, Seca H, Almeida GM, Lima RT, Fernandes MX, Pinto M, Vasconcelos MH. Insights into the In Vitro Antitumor Mechanism of Action of a New Pyranoxanthone. *Chemical Biology and Drug Design* 2010; 76: 43–58

Říha M, Karličková J, Filipický T, Macáková K, Rocha L, Bovicelli P, Silvestri IP, Saso L, Jahodář L, Hrdina R, Mladěnka P. In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *The Royal Society of Chemistry* 2014; 4(62): 32628–32638

Shim H, Harris ZL. Genetic Defects in Copper Metabolism. *The Journal of Nutrition* 2003; 133: 1527S–1531S

Turnlund JR. Human whole-body copper metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 67: 960S–4S

Turski ML, Thiele DJ. New Roles for Copper Metabolism in Cell Proliferation, Signaling, and Disease. *Journal of biological chemistry* 2009; 284(2): 717–721

Veljović E, Špirtović-Halilović S, Muratović S, Zulj LV, Roca S, Trifunović S, Osmanović A, Završnik D. 9-Aryl Substituted Hydroxylated Xanthen-3-ones: Synthesis, Structure and Antioxidant Potency Evaluation. *Croatia Chemica Acta* 2015; 88(2): 121-127

Veljović E, Špirtović-Halilović S, Muratović S, Osmanović A, Haverić S, Haverić A, Hadžić M, Salihović M, Malenica M, Šapčanin A, Završnik D. Antiproliferative and genotoxic potential of xanthen-3-one derivatives. *Acta Pharm.* 2019; 69(2019): 683–694

Xiao G, Fan Q, Wang X, Zhou B. Huntington disease arises from a combinatorial toxicity of polyglutamine and copper binding. *PNAS* 2013; 110(37): 14995–15000

Xiong Z, Zhang X, Li Y, Peng X, Fu J, Guo J, Xie F, Jiang Ch, Lin B, Liu Y, Cheng M. Syntheses of 12H-benzo[a]xanthen-12-ones and benzo[a]acridin-12(7H)-ones through Au(I)-catalyzed Michael addition/6-endo-trig cyclization/aromatization cascade annulation. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2018; 16: 7361–7374

Završnik D, Veljović E, Bajrović A, Vrankić M, Gržeta B, Osmanović A, Špirtović-Halilović S., Muratović S. Thermal and Crystallographic Characteristics of Synthesized Xanthen-3-one Derivatives. *Bulletin of Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 2013; 40: 31-34