

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

---

RIGORÓZNÍ PRÁCE

***IN VITRO* STANOVENÍ MĚĎ-CHELATAČNÍCH VLASTNOSTÍ  
ČISTÝCH LÁTEK IZOLOVANÝCH ZE SILYMARINU**

*IN VITRO* ASSESSMENT OF COPPER-CHELATING PROPERTIES OF ISOLATED PURE  
COMPOUNDS FROM SILYMARIN

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

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

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

Hradec Králové, říjen 2019

Mgr. Martina Vítková

#### Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, poskytnuté materiály a pomoc při vypracování této rigorózní práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Kateřině Valentové, Ph.D. za odborné připomínky při psaní této práce a také jejím kolegům z Mikrobiologického ústavu AV ČR za poskytnutí látek pro moje testování.

Tato práce vznikla za grantové podpory GA ČR 170/60/860531.

Prohlášení:

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

V Hradci Králové, říjen 2019

Mgr. Martina Vítková

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	7
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	8
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	9
3.1	Měď v lidském organismu .....	9
3.1.1	Fyziologická úloha mědi v organismu .....	10
3.1.2	Homeostáza mědi v organismu .....	12
3.1.3	Absorpce mědi .....	12
3.1.4	Transport mědi v organismu .....	13
3.1.5	Intracelulární distribuce a metabolismus mědi .....	13
3.1.6	Uvolňování mědi z buněk a její exkrece z těla .....	13
3.1.7	Měď v potravinách a doporučená denní dávka .....	13
3.1.8	Patologické projevy nadbytku mědi v organismu .....	14
3.1.9	Způsoby léčby nadbytku mědi v organismu .....	16
3.1.10	Nedostatek mědi v organismu .....	17
3.2	Chelatace kovů v terapii .....	18
3.3	Ostropestřec mariánský ( <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.) .....	18
3.3.1	Zařazení a popis rostliny .....	18
3.3.2	Lékopisné vlastnosti .....	20
3.3.3	Využití .....	20
3.3.4	Flavonolignany .....	21
3.3.5	Obsahové látky .....	21
3.3.6	Izolace obsahových látek .....	25
3.3.7	Aktuální využití silymarinu ve farmakoterapii .....	31
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	32
4.1	Pomůcky .....	32

4.2	Přístroje.....	32
4.3	Chemikálie .....	32
4.4	Testované látky.....	33
4.5	Metodika.....	34
4.5.1	Příprava základních roztoků .....	34
4.5.2	Příprava pracovních roztoků.....	35
4.5.3	Příprava vzorků testovaných látek.....	35
4.5.4	Kontrolní zkouška roztoků iontů mědi .....	36
4.5.5	Kalibrace měďnatých iontů.....	36
4.5.6	Chelatace iontů mědi hematoxylinem.....	37
4.5.7	Chelatace měďných iontů BCS.....	38
4.5.8	Chelatace měďnatých iontů BCS .....	40
4.5.9	Statistická analýza.....	42
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKOVÁ ČÁST .....</b>	<b>43</b>
5.1	Kalibrační křivka.....	43
5.2	Stanovení chelatace měďnatých iontů hematoxylinem.....	44
5.3	Stanovení chelatace měďnatých iontů bathokuproinem.....	49
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>ZDROJE .....</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>PŘEHLED OBRÁZKŮ .....</b>	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>PŘEHLED TABULEK.....</b>	<b>70</b>

## SEZNAM ZKRATEK

ATP - adenosintrifosfát

BAL - 2,3-dimerkaptopropanol

BCS - disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny

CNS - centrální nervová soustava

COX17 - cytochrom-c-oxidasa chaperon

DMF - dimethylformamid

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina

HA - hydroxylamin hydrochloridu

HEM - hematoxylin

MeOH - methanol

NMDA - *N*-methyl-D-asparagová kyselina

RNA - ribonukleová kyselina

THF - tetrahydrofuran

# 1 ÚVOD

Měď je stopový prvek, který hraje nezastupitelnou roli v živých organismech. Je důležitým činitelem pro správný průběh fyziologických procesů. V lidském těle je součástí enzymů, které se účastní mitochondriálního dýchání, absorpce železa, vychytávání volných radikálů a tvorbě elastinu. Je však nezbytné, aby rovnováha mědi v organismu zůstala neporušená. Porucha homeostázy mědi v organismu vede k rozvoji Wilsonovy choroby, Menkesovy choroby, Alzheimerovy choroby, prionovému onemocnění nebo vyšší náchylnosti organismu k infekcím, zánětům a rakovině.

Chelatace se využívá v medicíně při intoxikacích různými kovy. Při této metodě se na chelatační činidlo vážou ionty kovů z postižených tkání. Metoda chelatace mědi se v praxi zatím používá jen při Wilsonově chorobě, kde se jako chelatační činidlo využívá trientin nebo D-penicilamin. Tyto látky však mají neblahé nežádoucí účinky. Proto se hledají další slibné látky schopné chelatace mědi.

Jako potenciálně vhodné látky se jeví flavonolignany získávané z rostliny *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Flavonolignany jsou složeny z lignanu a flavonoidu. Jedná se o sekundární metabolity rostlin. U flavonoidů již byla schopnost chelatace mědi prokázána. Na základě podobnosti struktury flavonoidů s flavonolignany lze předpokládat schopnost chelatace i u těchto sloučenin.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo provést *in vitro* stanovení účinnosti chelatace měďnatých a měďných iontů u čistých látek získaných ze silymarinu a některých jejich metabolitů (sulfátů) vznikajících při jejich metabolismu v lidském organismu. Konkrétně šlo o tyto látky: silybin A, silybin B, silybin A-20-sulfát, silybin B-20-sulfát, 2,3-dehydrosilybin A+B (racemát 2,3-dehydrosilybinu), 2,3-dehydrosilybin-20-O-sulfát, 2,3-dehydrosilybin-7,20-O-disulfát, silychristin, silychristin-19-O-sulfát, 2,3-dehydrosilychristin. Testování proběhlo při hodnotách pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5.



### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Měď v lidském organismu

Měď je chemický prvek s protonovým číslem 29. Je to nejen významný kov anorganické chemie, ale také se účastní řady důležitých procesů v živých organismech. Řadí se mezi prvky biogenní, tedy nepostradatelné pro lidský organismus. Biogenní prvky se dále dělí na makrobiogenní s procentuálním obsahem v organismu větším než 1 % (C, O, H, N, Ca, P), mikrobiogenní s procentuálním obsahem 0,05 až 1 % (S, K, Mg, Na, Cl) a stopové prvky, jejichž procentuální zastoupení v živém organismu je menší než 0,05 % (Cu, Zn, Mn, I, Co, Fe, F, Al, tabulka 1). Měď tedy řadíme mezi stopové prvky. <sup>[1][2]</sup>

Tabulka 1: Rozdělení biogenních prvků

	procentuální obsah	prvky
makrobiogenní	> 1 %	uhlík, kyslík, vodík, vápník, fosfor
mikrobiogenní	0,05 – 1 %	síra, draslík, sodík, chlór, hořčík
stopové prvky	< 0,05 %	měď, zinek, mangan, jód, kobalt, železo, fluor, hliník

V lidském organismu se měď nachází ve dvou formách, v redukované formě jako měďný a v oxidované formě ve většině případů jako měďnatý kationt. Zatímco redukovaný stav má afinitu k thiolové a thioetherové skupině (například aminokyselina cystein a methionin), oxidovaný stav má afinitu ke kyslíkové nebo imidazolové skupině (například aminokyselina histidin a glutamová kyselina). Tyto ionty mědi se účastní širokého spektra interakcí s proteiny, čímž řídí různé struktury a biochemické pochody. V průběhu přeměny mezi oxido-redukčními stavy mědi se může vytvořit hydroxylový radikál, který je vysoce reaktivní a je zodpovědný za peroxidaci lipidů v membránách, přímou oxidaci proteinů a rozštěpení DNA a RNA molekul. Může tedy dojít k poškození

genetické informace a buněčných struktur, což se poté projeví jako rakovina, onemocnění nervového systému anebo jako stárnutí organismu. <sup>[3][4]</sup>

Měď má schopnost přijímat a odevzdávat elektrony a je tedy důležitým činitelem oxidačně-redukčních procesů a podílí se na vychytávání nebezpečných volných radikálů z lidského organismu. Volné radikály obsahují nepárový elektron, díky čemuž jsou tyto částice velice reaktivní. Mezi typické zástupce řadíme hydroxylový radikál, superoxid a oxid dusnatý. Tyto částice mají negativní působení na organismus. Svou přílišnou reaktivitou poškozují buněčné struktury. <sup>[1]</sup>

Měď dokáže vytěsňovat jiné kovy z jejich vazby v metaloproteinech. Typickým příkladem je zinek. To může mít za následek buď poškození správné funkce proteinu nebo inhibici enzymové aktivity proteinu. <sup>[3]</sup>

Množství mědi v lidském organismu je velmi nízké, i přesto se jedná o nezbytný prvek pro správnou funkci organismu. Její množství je ovlivněno věkem, pohlavím a složením potravy. Nachází se téměř v každé buňce lidského organismu, zejména v mozku, centrální nervové soustavě, játrech a srdci. Množství mědi v organismu je řízeno zejména její exkrecí. <sup>[5]</sup>

Nedostatek mědi u lidí je poměrně vzácná záležitost. Metabolismus mědi je narušen při Wilsonově chorobě, Menkesově chorobě, při zánětu a v průběhu těhotenství. Může se také podílet na vzniku některých neurodegenerativních onemocnění jako například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a Huntingtonova choroba. <sup>[5]</sup>

V séru se nacházejí dvě hlavní formy mědi. Jedna forma se váže na ceruloplasmin a druhá forma je reverzibilně vázaná na albuminy. Měď obsahuje také kuproenzymy cytochrom-c-oxidasa a monoaminoxidasa. <sup>[6]</sup>

### 3.1.1 Fyziologická úloha mědi v organismu

V buňkách je měď součástí některých enzymů. Tyto enzymy se nazývají kuproenzymy. Jsou to katalytické kofaktory mnoha enzymatických reakcí. Účastní se mitochondriálního dýchání, absorpce železa, vychytávání volných radikálů a tvorby elastinu. Patří mezi ně například cytochrom-c-oxidasa, 2-furoat-CoA dehydrogenasa, tyrosinasa, superoxiddismutasa, atd. <sup>[6]</sup>

### Cytochrom-c-oxidasa

Cytochrom-c-oxidasa katalyzuje redukci molekulárního kyslíku na vodu, čímž generuje elektrický potenciál, ze kterého mitochondrie vytváří energii. Ta je skladována v molekulách ATP. Přenáší též proton z vnitřní strany membrány na vnější. Cytochrom-c-oxidasa je umístěna v mitochondriální membráně. Má čtyři redoxně aktivní místa pro kov – dvě pro hem a dvě pro měď. [4]

### Cu/Zn superoxiddismutasa

Tento enzym přeměňuje superoxid na peroxid pro další využití. Mutace genu pro tento enzym pravděpodobně způsobuje amyotrofickou laterální sklerózu. Jedná se o důležitý antioxidant. [4]

### Metallothionein

Metallothionein na sebe váže bivalentní ionty kovů (kromě železa). Stará se tak o vychytávání iontů kovů z buněk, které se tam vyskytují v nadbytku. Zabraňují tak jejich toxickým účinkům na organismus. Většinou na sebe váže zinek, měď a kadmium, méně často rtuť, stříbro a nikl. Nejpevněji se váže měď, která je schopná ostatní kovy z této vazby vytěsnit. [4]

### Ceruloplasmin

Kromě transportu mědi do buněk a její exkrece je úkolem tohoto polypeptidu oxidace železnatého kationtu na železitý. Jedná se tedy o feroxidasa. Železité ionty se váží na protein transferrin, který je nezbytný pro krvetvorbu. Při závažném nedostatku mědi se v plasmě nenachází žádný nebo téměř žádný ceruloplasmin potřebný pro tuto přeměnu. Nedostatek aktivní feroxidasy způsobuje hromadění železa v játrech. Koncentrace ceruloplasminu stoupá při zánětu nebo infekci. [4]

### Lysyloxidasa

Další kuproenzym lysyloxidasa je důležitý při zesíťování kolagenu s elastinem, což pomáhá udržovat elasticitu a integritu pojivové tkáně v srdci a v cévních stěnách. Při jeho nedostatku je také ohrožen vývoj kostry. [4]

Dalšími kuproenzymy jsou dopamin- $\beta$ -monooxidasa, která katalyzuje přeměnu neurotransmiteru dopaminu na noradrenalin. Enzym tyrosinasa je potřebný při tvorbě pigmentu melaninu. [2][6]

Měď má také důležité antimikrobiální, antibakteriální a fungicidní účinky. Bylo prokázáno, že aktivované makrofágy dokáží akumulovat měď uvnitř fagozomu, což je intracelulární kompartment, který vycytává a zneškodňuje útočící mikroby. Za tuto schopnost je zodpovědný protein ATP7A, což je transmembránový protein, který přenáší přes membránu ionty mědi. [3]

### 3.1.2 Homeostáza mědi v organismu

Lidské tělo obsahuje přibližně 100 – 150 mg mědi, některé zdroje uvádí množství nižší než 100 mg. Homeostáza mědi je řízena proteiny jako je glutathion, metallothionein, či měď transportující P-ty ATPasy. Asi polovina přijaté mědi se ukládá v játrech, kde se váže na bílkoviny ceruloplasmin a albumin. Tyto bílkoviny transportují měď na cílové místo. Nejvíce mědi je obsaženo v kostech a svalech, zatímco nejvyšší koncentrace je v játrech, mozku, ledvinách a v srdci. Rozdíl mezi fyziologickým a toxickým množstvím mědi v organismu je velice malý. Proto je důležité, aby v těle byla neustále udržována homeostáza mědi. To se děje hlavně prostřednictvím exkrece mědi. [7]

Hospodaření s mědí a dalšími kovy v těle řídí protein metallothionein. Jeho produkce je závislá na příjmu těchto kovů s potravou. Funkce tohoto proteinu spočívá v zabránění absorpce kovů, pokud je jich v těle nadbytek, vazbou na svoji strukturu. Chrání tak buňky před potenciálním poškozením těmito kovy. [8]

### 3.1.3 Absorpce mědi

Měď se absorbuje do těla přes sliznici žaludku a zejména přes sliznici tenkého střeva, odkud je portální žilou odváděna do jater. 55 – 75 % mědi je absorbováno a aktivně recyklováno přes trávicí trakt. Transport přes kartáčovitý lem zahrnuje na energii nezávislé saturabilní přenašeče a difuzi. Ve slizničních buňkách je měď skladována v cytosolu vázaná na glutathion, metallothionein nebo proteiny podobných velikostí. Tyto proteiny chrání buňky před toxicitou mědi. V játrech se většina mědi váže na protein ceruloplasmin, který slouží jako přenašeč do cílových tkání. [5]

### 3.1.4 Transport mědi v organismu

V plasmě portální krve a ve střevních tekutinách jsou speciální proteiny, které mají vysokou specifickou afinitu vázat měď. Albuminy váží měď pomocí tří aminokyselin a jejich N konců. I když albumin představuje nejčastější typ plasmatického proteinu, váže na sebe pouze 10 – 12 % mědi. Většinu vazeb s mědí tvoří ceruloplasmin a makroglobulin. Po vazbě na ceruloplasmin v plasmě je měď připravena na přestup do tkání. Albumin, transcuprein a Cu-dihistidin jsou také možnými přenašeči mědi pro tkáň. Ukázalo se však, že tkáň preferují měď vázanou na ceruloplasmin. [4]

### 3.1.5 Intracelulární distribuce a metabolismus mědi

Volná měď je transportována do cílových molekul pomocí speciálních proteinů chaperonů, se kterými měď tvoří komplexy. Po přestupu přes kartáčovitý lem enterocytů je většina mědi dopravena do Golgiho aparátu na P-typ ATPasy (v enterocytu je to ATP7A nebo MNK (protein, jehož původní funkce je poškozena při Menkesově chorobě), v játrech ATP7B nebo WND (protein, jehož původní funkce je poškozena při Wilsonově chorobě)). Chaperony transportují měď na Cu/Zn superoxididismutasu v cytoplasmě, která chrání buňky před volnými radikály, zatímco COX17 transportuje měď do mitochondrií, kde je potřebná pro cytochrom-c-oxidazu, což je terminální enzym dýchacího řetězce. Glutathion přenáší měď pro metallothionein a některé další enzymy. Hlavním přenašečem mědi v séru je protein ceruloplasmin, který je syntetizován v játrech. U pacientů s aceruloplasminémií se měď váže na transcuprein. [4]

### 3.1.6 Uvolňování mědi z buněk a její exkrece z těla

Většina mědi se před exkrecí z těla musí vrátit z tkání do jater. To se děje pomocí plasmatických přenašečů transcuprein, albumin a ceruloplasmin. Primární dráha pro exkreci mědi z těla přes hepatocyty je žlučí. Malá část je vylučována močí a potem. [4]

### 3.1.7 Měď v potravinách a doporučená denní dávka

U mědi existuje malé rozmezí mezi optimální dávkou a dávkou pro intoxikaci. V České republice byla doporučená denní dávka stanovena pro ženy na 1,5 mg, pro muže

a těhotné ženy na 2 mg, pro děti 0,3 – 0,6 mg, nad 8 let 0,8 mg a u kojících žen na 1,8 – 2,2 mg. Maximální denní dávka by neměla přesáhnout 5 mg. Tyto hodnoty se však v jednotlivých státech světa liší. <sup>[9]</sup>

Měď obsahují běžné potraviny, například játra, brambory, fazole, hrách, hřiby, špenát, ovesné vločky (tabulka 2). Doplnky stravy obsahují měď ve formě oxidu nebo síranu. Nejvyšší vstřebatelnosti dosahuje ve formě laktátu. <sup>[7]</sup>

Tabulka 2: Vybrané potraviny s orientačním obsahem mědi <sup>[10]</sup>

	µg/g		µg/g
Mořské ryby	2,0 – 3,0	Zelenina	0,3 – 3,0
Sladkovodní ryby	0,3 – 3,0	Ovoce	0,4 – 1,5
Drůbež	0,5 – 3,0	Luštěniny	3,0 – 7,0
Játra	4,6 – 6,7	Bílá mouka	0,6
Oříšky	6,0 – 37,0	Obilky a semena	3,0 – 8,0
Otruby	15,0	Klíčky	6,0
Sladká voda	0,001 – 0,0001	Brambory	2,1

### 3.1.8 Patologické projevy nadbytku mědi v organismu

Při předávkování se nadbytek mědi hromadí v játrech a vyvíjí se cirhóza. Dále nadbytek mědi poškozuje tubuly ledvin a dochází ke zvýšenému vylučování aminokyselin, peptidů a glukosy. Pro člověka je příjem 1 g mědi toxický a projevuje se nauzeou, pocením, třesem a úzkostí. <sup>[7]</sup>

#### Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je multifaktoriální onemocnění, které je podmíněno genetickými faktory a faktory vnějšího prostředí. Jedná se o neurodegenerativní onemocnění mozku, při kterém se usazují amyloidní plaky, čímž dochází k poškození nervových synapsí a axonů. I když neexistuje přímá souvislost mezi Alzheimerovou chorobou a mědí, vyskytují se při tomto onemocnění zvýšené koncentrace mědi a zinku v extracelulárních placích a intracelulárních neurofibrilárních klubkách. Při tomto onemocnění byly nalezeny zvýšené koncentrace mědi v mozkomíšním moku. <sup>[11]</sup>

### Menkesova choroba

Menkesova choroba je dědičné recesivní onemocnění vázané na chromosom X. Jedná se o velice vzácnou poruchu metabolismu mědi, která postihuje zhruba 1 člověka z 250000, přičemž typickými pacienty jsou děti mužského pohlaví. Příčinou je mutace genu MNK kódujícího ATP7A (transportující  $\text{Cu}^{2+}$ ). Důsledkem je porucha transportu mědi a hromadění mědi v buňkách, která vede k deficitu mědi v tkáních. Klinické projevy jsou dány nedostatečnou aktivitou kuproenzymů. Mezi projevy patří hypopigmentace, abnormality vlasů, kostí, vaskulárního systému, volná kůže, hypotermie, hypoglykémie, mentální retardace, snížený svalový tonus, potíže s příjmem potravy, anémie, osteoporóza. Většina pacientů umírá do tří let věku. Dodávání mědi zmírňuje příznaky v mozku, avšak biologická dostupnost do pojivové tkáně je nedostatečná. <sup>[11]</sup>

### Wilsonova choroba

Wilsonova choroba je autosomálně recesivní dědičné onemocnění, které se projevuje jako porucha transportu mědi. Dochází k hromadění mědi v játrech a mozku a snížení její exkrece. Dochází k poškození jaterních buněk, CNS a k hemolytické anémii. Jedná se o defekt genu WND pro transportní protein ATP7B, který je za fyziologických podmínek zodpovědný za vazbu mědi na protein apoceruloplasmin a za její vylučování do žluči. V játrech měď produkuje volné radikály, které poškozují hepatocyty a poté také další orgány. Zmíněný defekt je dále zodpovědný za sníženou exkreci mědi, což má za následek její hromadění v těle. Symptomy jsou nespecifické. Mohou se projevovat jaterními nebo neurologickými změnami. Většina nemocných v období dospívání přichází s nějakou jaterní dysfunkcí. Symptomy se však mohou projevit až ve věku kolem 50 let. Tito nemocní mají tremor, psychické změny, extrapyramidový syndrom, anémii, poruchu koagulace, cirhózu, portální hypertenzi, jaterní selhání, hormonální poruchy, poruchy růstu. Tyto příznaky jsou způsobeny nahromaděním mědi v bazálních gangliích, což má za následek degeneraci a ztrátu neuronů. Typickým, lehce rozpoznatelným příznakem nemoci je hnědé zbarvení rohovky, které se nazývá Kaiser-Fleischerovy prsteny. <sup>[11][12]</sup>

### Prionová onemocnění

Mezi tato onemocnění patří Creutzfeld-Jakobova nemoc, kuru, Gertsman-Straussler-Scheinkerova nemoc a fatální familiární insomnie. Příčinou těchto

onemocnění je protein prion, který má schopnost na sebe vázat měď. Bylo prokázáno, že takto navázaná měď stabilizuje prion a způsobuje jeho zvýšenou infekčnost. Tento protein se vyskytuje v neuronech a skeletárním svalstvu. [4]

#### Zánět, infekce, rakovina

Při těchto patologických stavech bylo zjištěno, že koncentrace mědi a ceruloplasminu v séru stoupají. Studiemi bylo dokázáno, že snížením biologické dostupnosti mědi zpomaluje růst tumorů, což je pravděpodobně způsobeno inhibicí angiogenese. [4]

Měď je taky spojována se zvýšenou četností agregace proteinu  $\alpha$ -synukleinu v Lewyových buňkách. Dále měď taky podporuje agregaci zmnožených CAG tripletů. [3]

### 3.1.9 Způsoby léčby nadbytku mědi v organismu

#### Wilsonova choroba

Léčba Wilsonovy nemoci spočívá v chelatační terapii zaměřenou na mobilizaci mědi z postižených orgánů a zvýšení její exkrece z těla močí. Prvním používaným chelatačním činidlem byl 2,3-dimerkaptopropanol. Klinické zlepšení však bylo pozorováno až při dlouhodobém užívání. Intramuskulární podání bylo velice bolestivé a vyskytovaly se toxické nežádoucí účinky. Dalším používaným chelatačním činidlem, které se používá v terapii dodnes je D-penicilamin, který je možné podávat perorálně. Je více účinný a má méně nežádoucích účinků. Standardní dávka pro dospělé osobu je 500 mg dvakrát denně. Léčba je celoživotní a dokáže zvýšit exkreci mědi močí. U některých pacientů mohou neurologické symptomy zcela vymizet a jaterní funkce jsou v normálu. Mezi nežádoucí účinky v počátcích léčby patří horečka, nechutenství a mírné snížení počtu leukocytů. Při dlouhodobém užívání se mohou projevit nežádoucí účinky na imunitní systém a v pojivové tkáni. Při léčbě neurologických potíží se v počátku léčby symptomy mohou zhoršit. V případech, kdy se terapie D-penicilaminem neosvědčí a rozvíjí se toxické účinky této léčby, jsou alternativou další chelatační činidla jako trientin, tetrathiomolybdát. Další možností je zinek, který na rozdíl od chelatačních činidel podporuje vylučování mědi do stolice. Zinek má schopnost indukovat syntézu proteinu metallothioneinu, který má vyšší afinitu k mědi než k zinku a napomáhá tak vychytávat nadbytečnou měď z těla. Tento protein váže na sebe měď, a tak znemožní její



vstřebávání ve střevě a vede ke zvýšenému obsahu mědi ve stolici u pacientů léčených zinkem. Výhodou terapie zinkem je její nízká toxicita. Pro pacienty s akutním jaterním selháním je potřebná transplantace jater. <sup>[12][13]</sup>

#### Menkesova choroba

Jelikož je při Menkesově chorobě vstřebávání mědi ze střeva velice nízké, musí být léčba těchto pacientů parenterální. Měď může být podávána ve formě chloridu, sulfátu, EDTA nebo albuminu. Nejlepších účinků však dosahuje ve formě histidinu. Byla pozorována normalizace hladiny mědi, ceruloplasminu, dopaminu a noradrenalinu v séru po tříměsíční terapii. <sup>[12][13]</sup>

#### Alzheimerova choroba

Alzheimerovu chorobu je momentálně možné léčit inhibitory acetylcholinesterasy jako je donepezil, rivastigmin, galantamin anebo memantin, což je antagonist receptorů pro kyselinu *N*-methyl-D-aspartamovou (NMDA). Jedná se však jen o symptomatickou léčbu, která neřeší progresivní neurodegeneraci. Tato léčba má vliv jen na zlepšení paměti a kognitivních funkcí. Volné radikály jsou zodpovědné za progresi této nemoci. Proto se výzkum soustředí na antioxidační aktivity sloučenin použitelných v terapii. Jako standard se používá trolox, což je analog vitamínu E. <sup>[14]</sup>

#### 3.1.10 Nedostatek mědi v organismu

I nedostatek mědi s sebou nese určité patologické poruchy funkce organismu. Příčina tohoto nedostatku může být způsobena nedostatečným příjmem mědi z potravy. Nedostatek příjmu mědi v průběhu těhotenství vede k strukturálním malformacím zárodku. Pokud nedojde k samovolnému potratu, má dítě poškození nervové a imunitní soustavy. Nedostatek mědi má za následek zvýšení množství volných radikálů, což vede ke zvýšenému oxidačnímu poškození lipidů, DNA a proteinů. Dále dochází ke snížení aktivity cytochrom-*c*-oxidasy, což má za následek sníženou tvorbu ATP, k poškození metabolismu glukosy, zvýšení cholesterolu a triglyceridů v séru. Bylo také prokázáno, že při deficitu mědi vzniká hypertrofická kardiomyopatie. <sup>[15]</sup>

## 3.2 Chelatace kovů v terapii

Chelatace je proces, při kterém se váže ligand na centrální atom, kterým je nejčastěji kov, na dvou a více místech najednou. Vzniká koordinálně kovalentní vazba, jejíž síla je závislá na povaze zúčastněných prvků a prostorovém uspořádání. Takto vzniklé sloučeniny se nazývají komplexní sloučeniny. <sup>[20]</sup>

Metoda chelatace je používána v terapii pro odstranění nadbytečného množství kovů z organismu. Tato chelatační činidla jsou schopná vazby s ionty kovů, mobilizují jejich přesun z tkání do žluči nebo moči a poté z těla ven. K tomu je potřeba, aby chemická afinita činidla k atomu kovu byla vyšší než chemická afinita kovu k molekulám, které jsou tělu vlastní. Dále je potřeba aby chelatační činidlo nebylo pro tělo toxické a je vhodné, aby k tvorbě vazby mezi kovem a chelátorem došlo dostatečně rychle a také aby vyloučení tohoto komplexu z těla bylo co možná nejrychlejší. Metoda je používána při otravách kovy, k léčbě revmatoidní artritidy, Wilsonovy nemoci nebo Menkesovy choroby. <sup>[16][48]</sup>

Mezi první chelatační činidla, která se používala v terapii, patří BAL (2,3-dimerkaptopropanol) a EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina). Mezi nevýhody těchto sloučenin patří parenterální podání, jejich vlastní toxicita a tendence redistribuce toxických kovů do mozku. Stále ještě probíhá hledání nových netoxických chelatačních činidel. Nadějnými kandidáty jsou polyfenoly, například flavonoidy a flavonolignany, jejichž bohatým zdrojem je ostropestřec mariánský. <sup>[48]</sup>

## 3.3 Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)

### 3.3.1 Zařazení a popis rostliny

**Říše:** Rostliny (*Plantae*)

**Oddělení:** Krytosemenné (*Magnoliophyta*)

**Třída:** Vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

**Řád:** Hvězdnicotvaré (*Asterales*)

**Čeleď:** Hvězdnicovité (*Asteraceae*)

**Rod:** Ostropestřec (*Silybum*)

**Druh:** Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) <sup>[21]</sup>

Jedná se o jedno- či dvouletou bylinu, původem ze Středomoří, vyskytující se přirozeně v jižní Evropě. Přirozeně se vyskytuje na území Středomoří, na jihu Ruska, na severu Afriky, v Malé a Přední Asii a na Kanárských ostrovech. Pěstuje se v Evropě, Argentíně, Číně. Ostropestřec potřebuje pro svůj růst teplé prostředí a suchou půdu. Může dorůstat do výšky až tří metrů. Většinou však dosahuje 0,9 až 1,8 metru. [21][22][23]

Tento statný bodlák patří do čeledi hvězdnicovité. Listy jsou střídavé, objímavé, tuhé s bílými skvrnkami na žilnatině; spodní listy jsou v přizemní růžici. Kvete od července do září, květy tvoří purpurově zbarvené vejcovité úbory. Listy a listeny zákrovu mají špičaté žluté bodliny. Plodem jsou lesklé, hnědě skvrnitě, snadno opadající nažky, které nesou bílý chmýr. Plody jsou obvykle 5 – 8 mm dlouhé a 2 – 3 mm široké. Vůni mají po kakau, chuť je nahořklá. Účinnou látkou jsou flavonolignany označované jako silymarin (silymarinový komplex). Minimální obsah je 1,5 % silymarinu. [19][21][22][23]



Obrázek 1: *Silybum marianum* (L). Gaertn. © [25]

### 3.3.2 Lékopisné vlastnosti

Český lékopis uvádí dvě oficiální drogy – *Silybi mariani extractum siccum raffinatum et normatum* (Ostropestřecový extrakt suchý čištěný a standardizovaný) a *Silybi mariani fructus* (Plod ostropestřece mariánského).<sup>[25]</sup>

*Silybi mariani extractum siccum raffinatum et normatum* je suchý čištěný a standardizovaný extrakt vyrobený z drogy *Silybi mariani fructus*. Je to žlutohnědý amorfni prášek. Obsahuje 90 % až 110 % jmenovitého obsahu silymarinu, vyjádřeno jako silibinin ( $C_{25}H_{22}O_{10}$ ; Mr = 482,4).<sup>[25]</sup>

*Silybi mariani fructus* je chmýru zbavený zralý plod druhu *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Obsahuje nejméně 1,5 % silymarinu, vyjádřeno jako silibinin ( $C_{25}H_{22}O_{10}$ ; Mr = 482,4), počítáno na vysušenou drogu.<sup>[25]</sup>

### 3.3.3 Využití

Bylo provedeno několik klinických studií, které prokázaly účinek ostropestřece v léčbě jaterních poruch zahrnující akutní virovou hepatitidu, chronickou hepatitidu, jaterní nemoci způsobené alkoholem, cirhózu a toxické poškození jater. Do vodného extraktu přechází jen velice malé množství silymarinu, proto čaje nemají význam v léčbě jaterních onemocnění. Používají se pouze jako podpůrná léčba při potížích s močovým měchýřem.<sup>[27]</sup>

Tradičně se droga užívá v rozdrcené formě na přípravu čaje, dále se také zpracovává do pevných nebo tekutých forem pro perorální podání. Terapeutickými indikacemi drogy jsou symptomatická úleva od zažívacích obtíží, pocitu plnosti, špatného trávení, pro podporu jaterních funkcí. Dávkování pro dospělého je 3 – 5 g rozdrcené drogy na 100 ml vařící vody 2 – 3 × denně před jídlem. Pro práškovanou drogu je to 300 – 600 mg 2 – 3 × denně a u suchého extraktu v 96% ethanolu je to 200 mg. Podávání dětem a mladistvým do 18 let se nedoporučuje pro nedostatek informací. Bezpečnost v průběhu těhotenství a kojení nebyla zkoumána. Mezi nežádoucí účinky s neznámou frekvencí projevu patří lehké gastrointestinální obtíže jako sucho v ústech, nevolnost, žaludeční obtíže, průjem, bolest hlavy, alergické reakce.<sup>[28]</sup>



Obrázek 2: *Silybi mariani fructus* © [28]

#### 3.3.4 Flavonolignany

Lignany jsou látky, které mají společné fenylypropanovou jednotku v jejich molekule. Obecně mají lignany obrannou roli, konkrétně antifungální a antibakteriální účinky. Dělí se do čtyř skupin na lignany, neolignany, „oligomery“ a norlignany. Do této skupiny sloučenin se také navíc zahrnují lignoidy, někdy nazývané hybridní lignany. Právě sem patří flavonolignany, které mají smíšený biosyntetický původ, vznikají spojením flavonoidu s lignanem. Flavonolignany z ostropestřece mariánského vznikají radikálovou reakcí z taxifolinu a konyferylalkoholu mají hepatoprotektivní účinky. Droga může být identifikována mikroskopicky, dále pomocí TLC, spektrofotometricky nebo pomocí HPLC. Existují tři strukturní typy flavonolignanů: 1,4-benzodioxanový typ (silybin), benzoxolanový typ (silychristin) a modifikovaný benzoxolanový typ (silydianin). [35][36]

#### 3.3.5 Obsahové látky

Silymarin je extrakt z rostliny *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (ostropestřec mariánský). Hlavními složkami jsou flavonolignany, které díky své polyhydroxylované struktuře a nízké biodostupnosti jsou schopné ovlivňovat kinetiku mědi a železa v gastrointestinálním traktu. Flavonolignany jsou složeny z lignanu a flavonoidu.

Hlavními flavonolignany jsou silybin (syn. silibinin), isosilybin, silychristin a silydianin. Kromě silydianinu existují všechny jako diastereoisomery. Silymarin také obsahuje flavonoid taxifolin. Hlavní složkou silymarinu je silybin, který je zastoupen v největší míře a jeho izolace ze směsi je nejjednodušší. Je mu (zřejmě nesprávně) přisuzována většina blahodárných účinků silymarinu. Je to směs dvou diastereoisomerů, silybinu A a silybinu B, které jsou obsaženy přibližně v ekvimolárním poměru. Zatím pouze u 2,3-dehydrosilybinu byla prokázána schopnost chelátovat měď a železo. Silybin A, silybin B a silychristin A měly tento účinek nižší až nulový. Oba enantiomery 2,3-dehydrosilybinu vykazovaly tuto aktivitu stejně. Dalšími obsahovými látkami jsou lipidy (linolová, olejová a palmitová kyselina), steroly (cholesterol, kampesterol a stigmasterol), slizy, cukry aminy a saponiny. <sup>[18][27]</sup>

Systémová absorpce silymarinu je pouze kolem 1 %, a proto silymarin pravděpodobně působí hlavně v gastrointestinálním traktu. Pro schopnost interakce složek silymarinu s mědí je nejprve potřeba, aby došlo k redukci mědi před její absorpcí v tenkém střevě anebo k tvorbě chelátu. Možným místem pro chelataci flavonolignanů je část molekul obsahující 3-hydroxy-4-keto-5-hydroxy skupiny. Je ale velký rozdíl mezi planární molekulou (nesaturovaná 2,3 vazba) a neplanární molekulou (saturovaná 2,3 vazba), kde u saturované vazby nedochází jednoduše k chelataci. Proto je 2,3-dehydrosilybin z dosud testovaných látek nejúčinnějším chelátorem mědi. <sup>[18]</sup>

Po perorálním podání podstupuje silybin enterohepatální cirkulaci. Poločas biliární eliminace je přibližně 3 – 4 hodiny. 3 – 8 % silybinu podaného perorálně je vyloučeno v nezměněné podobě močí, 80 % je glukuronidováno nebo sulfatováno a vyloučeno žlučí. 20 – 40 % silybinu ze žluči je reabsorbováno zpět a zbytek je vyloučen z těla stolicí. Studie ukázaly, že silybin inhibuje cytochromy CYP 2D6, CYP 2E1, CYP 3A4, CYP 2C9 a CYP 2C8. *In vitro* bylo zjištěno, že silybin se metabolizuje pomocí CYP 2C8 na *O*-demethylovaný silybin a mono- a dihydroxy-silybin. Během II. fáze biotransformace silybinu se tvoří mono- a diglukuronidy silybinu a taky monosulfáty a diglukuronidy sulfátu silybinu. Podle experimentu je silybin glukuronidován na třech hydroxylových skupinách (C-5, C-7 a C-20), kdežto v lidském organismu jen na C-7 a C-20. Glukuronidy silybinu jsou poté transportovány žlučí do střeva, kde bakteriální enzymy odštěpí cukr z molekuly a uvolní aglykony silybinu, které mohou být znova absorbovány.

<sup>[23][24]</sup>

Účinek silymarinu je zejména dán jeho antioxidační aktivitou, kterou má díky tomu, že ovlivňuje aktivitu enzymů jako je superoxid dismutasa, katalasa, glutathion peroxidasa a glutathion reductasa. Jeho antioxidační aktivita je dána i neenzymaticky. Zvyšuje hladinu  $\alpha$ -tokoferolu,  $\beta$ -karotenu a askorbátu. Prokázáno bylo snížení peroxidace lipidů, kdy dochází k poškození buněčných membrán volnými radikály. Silymarin inhibuje tvorbu prozánětlivých látek jako jsou tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ , leukotrieny a prostaglandiny. Dále bylo prokázáno, že silymarin stabilizuje membrány jaterních buněk a zabraňuje tak průniku toxických látek do intracelulárního prostoru a zároveň podporuje eliminaci toxinů z buněk. [19]

Silymarin má mnoho blahodárných účinků na lidský organismus. *In vitro* testy i testy na zvířatech potvrdily hepatoprotektivní účinky silymarinu. *In vitro* byly potvrzeny antikancerózní účinky proti rakovině prostaty, prsu, děložního čípku, tlustého střeva a plic. Mezi další účinky silymarinu patří antioxidační účinky, schopnost vylučovat volné radikály, regulovat obsah glutathionu v buňkách. Také stabilizuje buněčné membrány a reguluje permeabilitu buněčné stěny. Dále se účastní syntézy ribosomální RNA a napomáhá regeneraci jaterních buněk. Silymarin se jeví jako potenciálně vhodný pro léčbu a prevenci metabolického syndromu, který zahrnuje inzulínovou rezistenci, vysoký krevní tlak a vysoký cholesterol. [17][30]

Studie prokázaly vliv silymarinu na plasmatický cholesterol. Po perorálním podávání extraktu silymarinu došlo k významnému poklesu hladiny cholesterolu v plasmě. Silybin inhibuje HMG-CoA reductasu, podporuje vazbu LDL cholesterolu na hepatocyty a snižuje obsah cholesterolu v játrech. [31][34]

Dle studií na potkanech silychristin A dokáže významně snižovat hladinu glukosy, dále zvyšuje sekreci inzulínu a upravuje funkci  $\beta$  buněk Langerhansových ostrůvků. Navíc ještě silychristin A inhibuje  $\alpha$ -glukosidasu, která štěpí disacharidy a polysacharidy. [37]

V pokusu na králících bylo prokázáno, že silymarin má protektivní účinky proti šedému zákalu. [38]

Ukázalo se, že silymarin může mít jistý potenciál v léčbě multiorgánového selhání při sepsi. Bylo zjištěno, že dokáže redukovat oxidační poškození orgánů při sepsi, jelikož má antioxidační vlastnosti, dále inhibuje neutrofilní infiltraci a reguluje mediátory zánětu. [39]

Další slibné využití pro silymarin se naskýtá při transplantacích. Se svými imunosupresivními účinky dokáže inhibovat proliferaci T-lymfocytů. Provedená studie dokonce prokázala, že silymarin v koncentraci 100  $\mu$ M a 200  $\mu$ M měl vyšší schopnost inhibice T-buněk než klinicky používaný rapamycin. Další výhodou silymarinu je jeho nižší toxicita než ostatní látky používané pro imunosupresi. [40]

*In vitro* a také *in vivo* studie prokázaly možnost využití silybinu při léčbě rakoviny. Podle provedených testů má silybin antineoplastické účinky zahrnující účinek na rakovinu kůže, prsu, prostaty, čípku, plic, močového měchýře, střev a ledvin. Byly popsány účinky antikarcinogenní, protizánětlivé, byla pozorována inhibice buněčné proliferace, zvýšená apoptóza, snížená angiogeneze, blokace regulátorů buněčného cyklu, zvýšená exprese inhibitorů buněčného cyklu a inhibice transkripčních faktorů při velmi nízké toxicitě. Jelikož většina klinicky používaných látek v léčbě rakoviny má poměrně vysokou toxicitu, jeví se silybin jako látka s významným potenciálem pro terapii rakoviny. V testech byl zatím vyzkoušen v kombinaci s klinicky používanými látkami, přičemž tyto kombinace vykazovaly synergické účinky. [41]

Byl studován účinek silymarinu na hepatocelulární karcinom. *In vitro* testy prokázaly inhibici růstu nádorových buněk, zastavení buněčného cyklu, podporu apoptózy, inhibici angiogeneze a snížení invazivity. *In vivo* testy zkoumají účinek jak preventivní tak i terapeutický. Studie potvrzují ochranný vliv silymarinu na jaterní buňky. *In vivo* testy potvrdily, že silymarin snižuje denzitu žírných buněk a hladiny metaloproteináz v játrech a může tedy působit preventivně proti vzniku metastatického šíření hepatocelulárního karcinomu. [19]

*In vitro* testy na různých liniích lidského adenokarcinomu prokázaly snížení životaschopnosti nádorových buněk, zastavení buněčného cyklu a navození apoptosy. *In vivo* testy na potkanech prokázaly nižší výskyt prekancerotických změn v tlustém střevě a také sníženou incidenci a multiplicitu karcinomu po podávání silymarinu. [19]

Dále se ukázalo, že silymarin má preventivní vliv na vznik karcinomu v ledvinách vyvolaném *in vivo* podáváním nefrotoxické a kancerogenní látky myším. Současné podávání silymarinu vedlo ke snížení četnosti zánětu ledvin. [19]

Zajímavé jsou studie vlivu silybinu na karcinom prsu. *In vitro* byla pozorována inhibice tvorby metaloproteinasy-9, VEGF, epidermálního růstového faktoru, inhibice proliferace, podpora apoptózy a snížení rozvoje metastáz. Dále se ukázalo, že silybin



senzitivizuje chemorezistentní maligní buňky k terapii doxorubicinem, paklitaxelem a cisplatinou. <sup>[19]</sup>

*In vitro* testy na buňkách karcinomu prostaty ukázaly, že díky silymarinu dochází k snížené novotvorbě cév. <sup>[19]</sup>

Silymarin má fotoprotektivní účinky proti UVA. *In vitro* studie na lidských keratinocytech ozářených UVA zářením za současného podávání silymarinu ukázala zvýšení životaschopnosti buněk, snížení produkce reaktivních forem kyslíku a peroxidace membránových lipidů, snížení aktivace kaspáz a menší poškození DNA. Studie prokázaly účinek silybinu proti poškození fibroblastů způsobeného UVA zářením. Dále i 2,3-dehydrosilybin a silychristin vykazovaly tyto účinky. U ostatních obsahových látek byla tato aktivita nižší. <sup>[19][32]</sup>

Silymarin dále vykazuje neuroprotektivní účinky a to díky svým antioxidačním účinkům, kdy dochází k inhibici oxidačního stresu. Může být tedy použit pro léčbu neurodegenerativních nemocí jako Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba nebo mrtvice. Studie ukázaly, že silymarin upravuje hladinu dopaminu eliminací apoptózy v *substantia nigra* a chrání dopaminergní neurony. <sup>[33]</sup>

U silymarinu byly popsány nežádoucí účinky jako je bolest hlavy, zánět žaludku a střeva, dermatologické obtíže. Ve vyšších dávkách se objevil průjem. Důvodem je zvýšené vylučování žluči. Popsány byly i alergické reakce a jeden anafylaktický šok. Silymarin může zvyšovat toxicitu léků, které se konjugují s uridin difosfoglukuronosyl transferasou. <sup>[34]</sup>

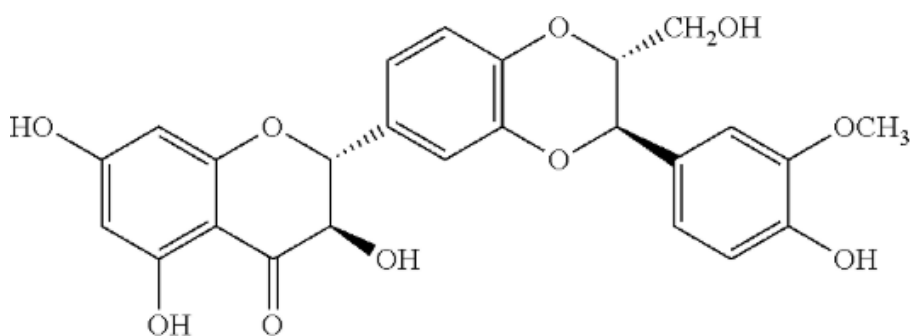
### 3.3.6 Izolace obsahových látek

Flavonolignany byly poprvé objeveny v semenech ostropestřece mariánského, vyskytují se však i v jiných rostlinách. Jako první z obsahových látek ostropestřece byl izolován silybin, který je považován za hlavní složku silymarinu. <sup>[42][43][44]</sup>

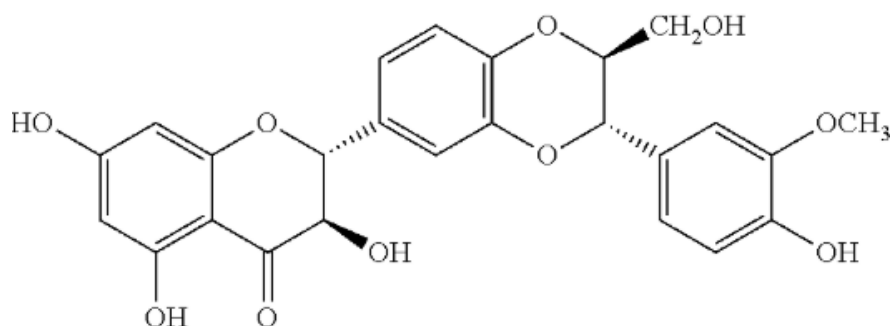
Pro izolaci silymarinu se semena nejprve vysuší a očistí. Poté se pomelou či lisují. Z takto zpracovaných semen jsou v Soxhletově extraktoru odstraněny tuky. Reziduum se vysuší vzduchem a extrahuje methanolem, ethanolem, acetonem či ethylacetátem v Soxhletově aparátu. Extrakt se odpaří do sucha a poté rekonstituuje v extrakčním činidle. Výsledný produkt se přefiltruje a odpaří; vzniklá suchá směs flavonolignanů se nazývá silymarin. <sup>[42][45]</sup>

Silybin se získává ze silymarinu pomocí extrakce methanolem. Silymarin dále obsahuje taxifolin, isosilybin A, isosilybin B a silydianin. V malé míře obsahuje silychristin B a isosilychristin. Kromě těchto látek silymarin také obsahuje kolem 30 % nedefinovaných polyfenolových látek často nazývaných jako polymerická frakce. Z bílé kvetoucí variety *Silybum marianum* byl izolován silandrin, isosilandrin, silymonin a silyamandin. <sup>[42]</sup>

Silybin se vyskytuje ve formě dvou diastereoizomerů, jejichž chemická reaktivita je velice podobná, a proto je jejich izolace velmi složitá. První možnou variantou pro separaci těchto diastereoizomerů je HPLC chromatografie. Jako reverzní fáze se použije oxid křemičitý s mobilní fází o složení methanol/voda/kyselina mravenčí v poměru 45:55:0,1. Tyto diastereoizomery je možné rozdělit také chemickou metodou a to navázáním stericky náročného substituentu v poloze sousedící se stereogenními centry C-10 a C-11 pro zvětšení sterického rozdílu mezi jednotlivými diastereoizomery. Poté se k rozdělení využije flash chromatografie. Třetí metodou pro rozlišení je chemicko-enzymatická metoda, kdy je silybin *O*-acetylován na pozici C-23 Novozymem 435 v acetonu pomocí vinylacetátu. Následuje alkoholýza, kterou vzniká silybin B a 23-*O*-acetylsilybin A. Produkty se rozdělí pomocí sloupcové chromatografie. <sup>[42]</sup>

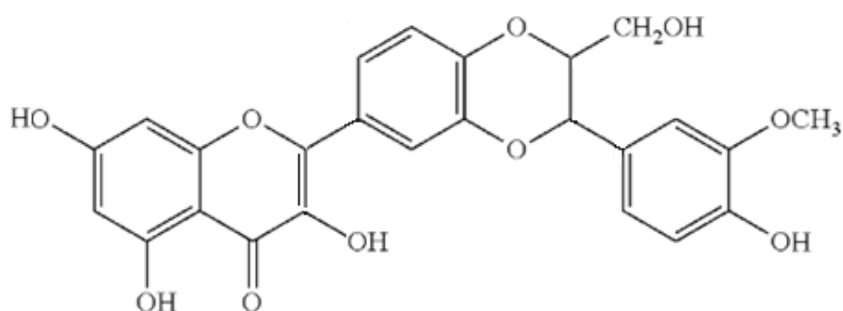


Obrázek 3: Silybin A



Obrázek 4: Silybin B

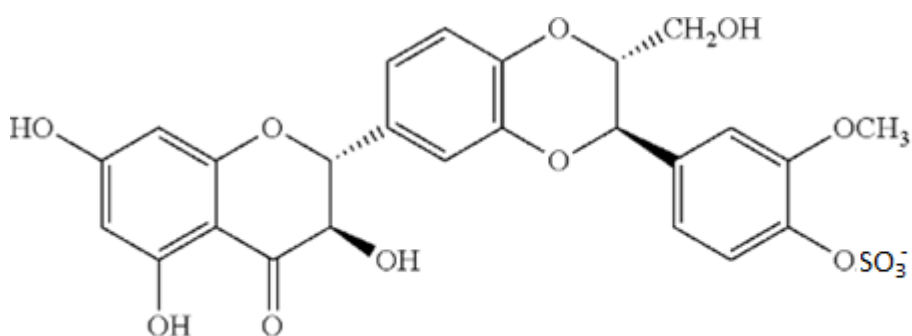
Přestože silybin obsahuje několik hydrofilních skupin, má převážně hydrofobní charakter a jeho rozpustnost ve vodě je nízká. Je téměř nerozpustný v polárních rozpouštědlech a nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech. Rozpustný je v polárních aprotických rozpouštědlech (aceton, DMF, THF, DMSO). Silybin obsahuje pět hydroxyskupin, které představují hlavní cíle pro tvorbu derivátů. Tři hydroxyskupiny jsou fenolické, jedna primárně a jedna sekundárně alkoholická. Hydroxyskupina na pozici C-5 je silně vázaná k sousední oxo skupině. Oxo skupina je v konjugaci s aromatickým kruhem a vystupuje jako donor volného elektronového páru pro hydroxyskupinu v pozici C-5. Primárně alkoholická skupina na pozici C-23 může být esterifikována a oxidována karboxylovou skupinou. Sekundárně alkoholická skupina na pozici C-3 může být oxidována na keton existující v enol formě umožňující vznik 2,3-dehydrosilybinu. <sup>[42]</sup>



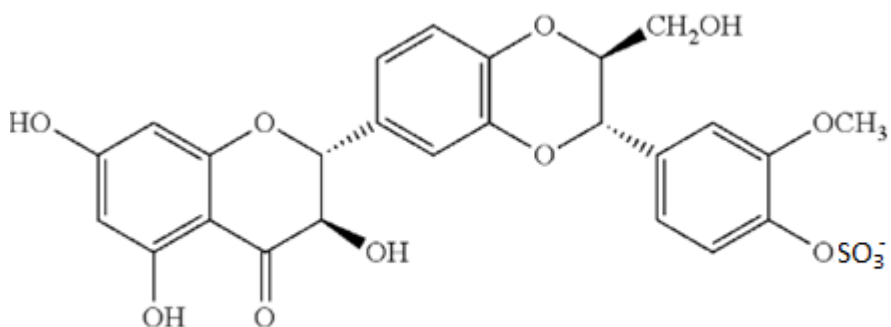
Obrázek 5: 2,3-Dehydrosilybin A+B

Silybin A-20-sulfát a silybin B-20-sulfát byly získány sulfatací silybinu pomocí buněk *E. coli*, do jejichž DNA byl zakomponován gen kódující potkaní sulfotransferasu AST IV. Tato metoda je však velice zdlouhavá, trvá několik dní. <sup>[43][42]</sup>

Výrazné zkrácení časové náročnosti bylo dosaženo další metodou, při níž došlo k sulfataci silybinu arylsulfotransferasou z bakterie *Desulfitobacterium hafniense*. Výslednými produkty byl silybin A-20-O-sulfát a silybin B-20-O-sulfát. Celý proces byl zkrácen na 4 – 6 hodin. <sup>[43]</sup>



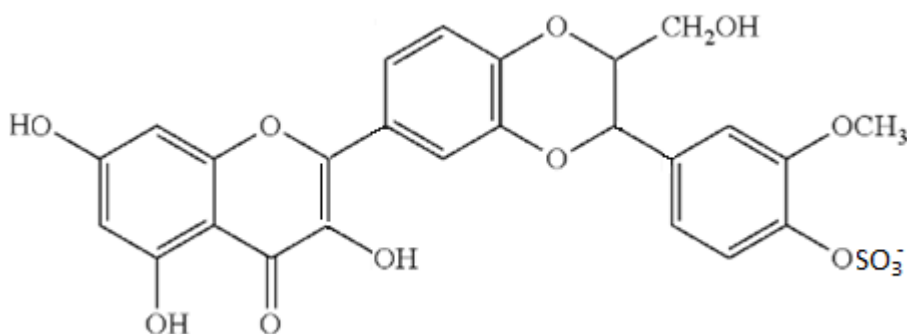
Obrázek 6: Silybin A-20-sulfát



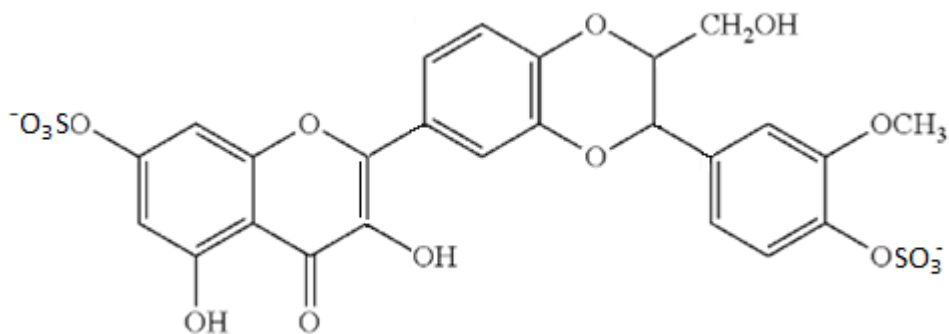
Obrázek 7: Silybin B-20-sulfát

Dehydrosilybin je nejdůležitějším oxidačním derivátem silybinu. Hydroxy skupina na pozici C-3 silybinu jednoduše oxiduje na keto skupinu a následuje enolizace. [42]

Také 2,3-dehydrosilybin může být sulfatován pomocí arylsulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense*. Celý proces trvá přibližně 18 hodin, přičemž sulfatace 2,3-dehydrosilybinu B je o něco rychlejší než u 2,3-dehydrosilybinu A. Výsledný produkt tohoto procesu je 2,3-dehydrosilybin-7,20-*O*-disulfát a taky monosulfát dehydrosilybinu v poloze 20. [43]

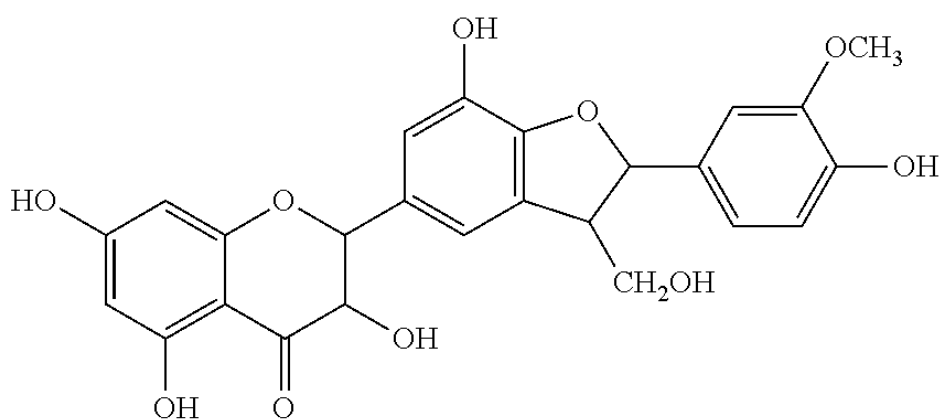


Obrázek 8: 2,3-Dehydrosilybin-20-*O*-sulfát



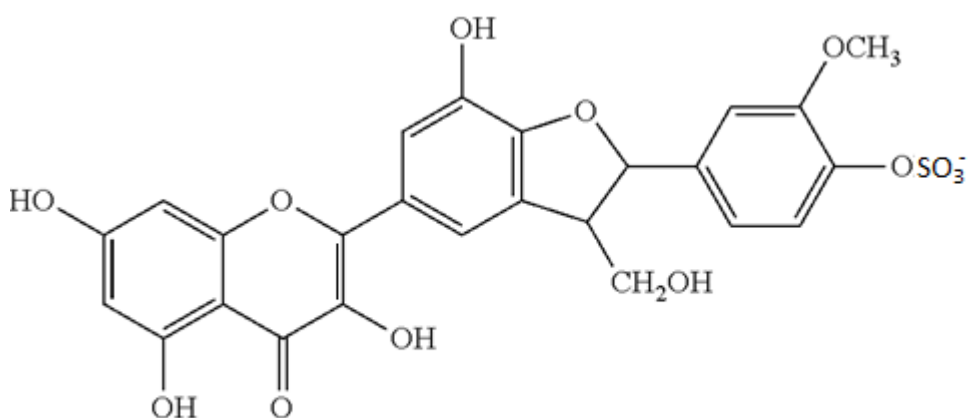
Obrázek 9: 2,3-Dehydrosilybin-7,20-*O*-disulfát

Silychristin byl izolován ze *Silybum marianum* (L.) Gaertn. pomocí LH-20 kolonové chromatografie. Silychristin izolovaný z přírodního materiálu se skládá ze dvou diastereoizomerů, kde převládá silychristin A. [46]



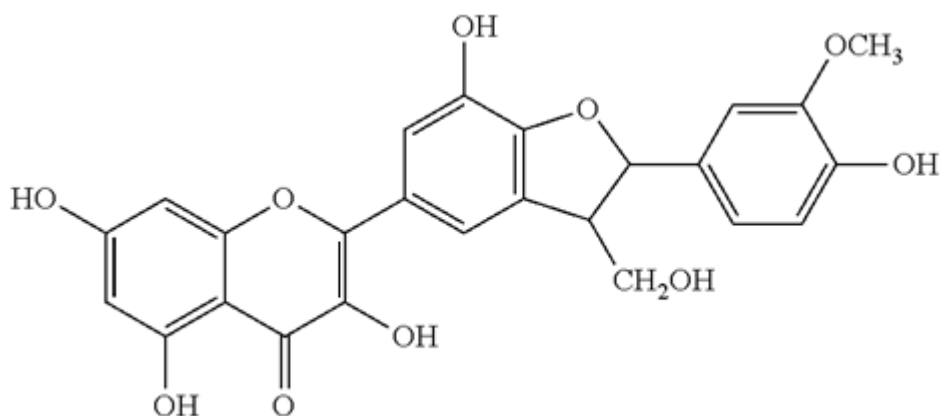
Obrázek 10: Silychristin

Sulfatace silychristinu opět probíhá za přítomnosti enzymu arylsulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense*. Hlavním produktem je silychristin-19-O-sulfát a ve stopovém množství vzniká dále například 2,3-dehydrosilychristin a jeho sulfát. [43]



Obrázek 11: Silychristin-19-O-sulfát

Metodou pro získání 2,3-dehydrosilychristinu je oxidace silychristinu v DMSO s přidáním triethylaminu při 60 °C. [46]



Obrázek 12: 2,3-Dehydrosilychristin

### 3.3.7 Aktuální využití silymarinu ve farmakoterapii

Silymarin je hlavním představitelem skupiny léčiv označovaných jako hepatoprotektiva. V pokusech na zvířatech byl prokázán jeho hepatoprotektivní účinek, pokud byl používán profylakticky. Zmírnil poškození hepatocytů hepatotoxickými látkami a redukoval riziko přechodu postižení do chronického stádia. Terapeutická účinnost u již vzniklého, především chronického onemocnění, nebyla ještě kontrolovanými klinickými studiemi jednoznačně prokázána. Příznivý účinek silymarinu byl prokázán u intoxikovaných pacientů muchomůrkou zelenou (*Amanita phalloides*), kdy se podává intravenózně přímo silybin v dávce 20 mg/kg hmotnosti pacienta. U pacientů s jaterním poškozením způsobeným nadměrnou konzumací alkoholu vedlo podávání silymarinu ke zlepšení jaterních funkcí a snížení morbidity. <sup>[47]</sup>

Silymarin se podává *per os*. Jeho koncentrace v jaterním parenchymu je vysoká, avšak v ostatních tkáních je nedostatečná. Řešením je podávání silymarinu společně s fosfatidylcholinem, který jeho systémovou koncentraci zvyšuje. <sup>[19]</sup>

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Pomůcky

- Automatické pipety o různém objemu (Brand)
- Vícekanálové pipety o různém objemu (Biohit)
- Mikrotitrační destičky (Brand)

### 4.2 Přístroje

- Analytické váhy KERN ABT 120-5DM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA MS 3 digital (IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germany)
- Třepačka pro zkumavky IKA VORTEX GENIUS 3 (IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germany)
- Laboratorní ultrazvuková vana K-2L (Kraintek, s. r. o., Podhájska, Slovensko)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

### 4.3 Chemikálie

- Chlorid měďný (CuCl, Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (HCl, Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný (NaCl, Sigma-Adrich)
- Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich)
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA, Sigma-Aldrich)
- Disodná sůl kyseliny bathokuproindisulfonové (BCS, Sigma-Aldrich)
- Hematoxylin (HEM, Sigma-Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Lach-Ner)
- Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)
- 15 mM acetátové pufrý o pH 4,5 a 5,5:



Kyselina octová (CH<sub>3</sub>COOH, Penta)

Octan sodný bezvodý (CH<sub>3</sub>COONa, Penta)

Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

- 15 mM HEPES pufrů o pH 6,8 a 7,5:
  - HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina, Sigma-Aldrich)
  - HEPES sůl (sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonové, Sigma-Aldrich)
  - Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Všechny používané látky byly v čistotě p. a.

#### 4.4 Testované látky

Silybin A

Silybin B

Silybin A-20-sulfát

Silybin B-20-sulfát

2,3-dehydrosilybin A+B (racemát 2,3-dehydrosilybinu)

2,3-dehydrosilybin-20-*O*-sulfát

2,3-dehydrosilybin-7,20-*O*-disulfát

Silychristin

Silychristin-19-*O*-sulfát

2,3-dehydrosilychristin

Všechny testované flavonolignany a jejich metabolity byly izolovány nebo syntetizovány v Laboratoři biotransformací Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky v Praze. Silybin byl izolován ze silymarinu (Liaoning Senrong Pharmaceutical, Panjin, China, batch No. 120501) suspenzí v methanolu a následnou filtrací za vzniku silybin A+B (49,8 % silybinu A a 48,0 % silybinu B). Tyto diastereoizomery

byly odděleny enzymaticky pomocí imobilizované lipasy B z *Candida antarctica* (Novozym 435, Novo-Nordisk, Copenhagen, Denmark). Postupnou acetylací a solvolýzou byl získán silybin A (99,2 %) a silybin B (99,0 %). Silychristin byl izolován ze silymarinu LH-20 chromatografií. 2,3-dehydroderiváty byly připraveny oxidací matečné sloučeniny. Sulfoderiváty byly připraveny pomocí aryl sulfotransferasy z bakterie *Desulfitobacterium hafniense*.

## 4.5 Metodika

### 4.5.1 Příprava základních roztoků

- **Základní roztok disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny (BCS) o koncentraci 5 mM**

Pro přípravu 5mM roztoku BCS bylo rozpuštěno vypočtené množství disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny ( $M_w = 564,54 \text{ g/mol}$ ) v ultračisté vodě.

- **Základní roztok měďnatých iontů ( $\text{Cu}^{2+}$ ) o koncentraci 5 mM**

Pro přípravu 5mM roztoku měďnatých iontů bylo rozpuštěno vypočtené množství pentahdrát síranu měďnatého ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ( $M_w = 249,69 \text{ g/mol}$ ) v ultračisté vodě. Tento roztok je stabilní při uchování v lednici.

- **Základní roztok hydroxylamin hydrochloridu (HA) o koncentraci 100 mM**

Pro přípravu 100mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu bylo rozpuštěno vypočtené množství HA ( $M_w = 69,49 \text{ g/mol}$ ) v ultračisté vodě.

- **Základní roztok hydroxylamin hydrochloridu (HA) o koncentraci 10 mM**

Pro přípravu 10mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu bylo rozpuštěno vypočtené množství HA ( $M_w = 69,49 \text{ g/mol}$ ) v ultračisté vodě.

- **Základní roztok hematoxylinu (HEM) o koncentraci 5 mM**

Pro přípravu 5mM roztoku hematoxylinu bylo rozpuštěno vypočtené množství HEM ( $M_w = 302,28 \text{ g/mol}$ ) v DMSO. Tento zásobní roztok se dá použít po dobu cca 5 hodin.

- **Základní roztok CuCl ( $\text{Cu}^+$ ) o koncentraci 5 mM**

Pro přípravu 5mM roztoku  $\text{Cu}^+$  bylo rozpuštěno vypočtené množství CuCl ( $M_w = 98,99 \text{ g/mol}$ ) v 0,1M vodného roztoku HCl a 1M NaCl. K rozpuštění CuCl je potřeba využít ultrazvukovou lázeň.

#### 4.5.2 Příprava pracovních roztoků

- **Roztok měďnatých iontů ( $\text{Cu}^{2+}$ ) o koncentraci 250  $\mu\text{M}$**

Pro přípravu 250 $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  bylo vypočtené množství základního roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  zředěno ultračistou vodou.

- **Roztok hematoxylinu o koncentraci 250  $\mu\text{M}$**

Pro přípravu 250 $\mu\text{M}$  roztoku hematoxylinu bylo vypočtené množství základního roztoku HEM zředěno DMSO. Roztok je stabilní maximálně 90 minut, poté je nutné ho připravit čerstvý.

- **Roztoky  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  o koncentraci 250  $\mu\text{M}$**

Pro přípravu 250 $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  bylo smícháno vypočtené množství  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  a zředěno DMSO.

#### 4.5.3 Příprava vzorků testovaných látek

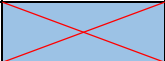
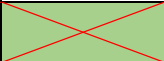
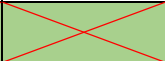
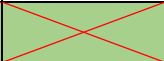
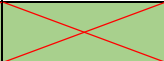
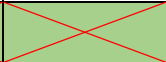
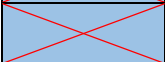
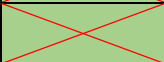
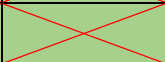
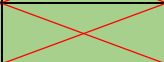
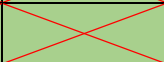
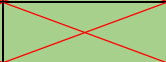
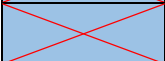
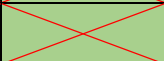
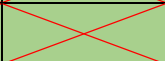
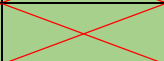
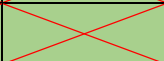
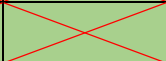
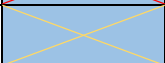
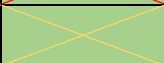
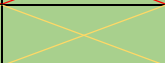
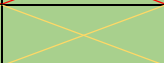


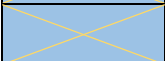





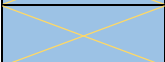





Pro přípravu roztoků testovaných látek, obvykle v koncentraci 10mM, bylo rozpuštěno vypočtené množství testované látky v DMSO. Další koncentrace byly naředěny podle potřeby jednotlivých měření.


#### 4.5.4 Kontrolní zkouška roztoků iontů mědi


Kontrolní zkouška roztoků iontů mědi se provádí vždy po přípravě základních roztoků, roztoků měďných a měďnatých před jejich prvním použitím. Roztoky musí být stabilní, uchovávají se v lednici a před jejich dalším použitím již není potřeba znovu provádět kontrolu. Kontrola byla provedena v mikrotitrační destičce, kdy bylo pod sebe do dvou jamek pipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru pH 7,5, pak 50  $\mu\text{l}$  1mM roztoku hydroxylaminu, 50  $\mu\text{l}$  0,25mM roztoku iontů mědi. Vše se nechalo míchat po dobu jedné minuty. Pak se přidalo 50  $\mu\text{l}$  5mM roztoku BCS. Po jedné minutě se změřila absorbance při 484 nm. Správně připravený roztok má mít absorbanci okolo 0,50 – 0,55.

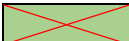
#### 4.5.5 Kalibrace měďnatých iontů


Pro zhotovení kalibrační křivky měďnatých iontů závislosti koncentrace na absorbanci  $\text{Cu}^{2+}$  byly nejprve připraveny základní roztoky potřebných koncentrací (5mM roztok BCS v ultračisté vodě, 5mM roztok  $\text{Cu}^{2+}$  v ultračisté vodě a 10mM roztok HA v ultračisté vodě). Poté byly připraveny vodné roztoky měďnatých solí o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250  $\mu\text{M}$ . Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o pH 6,8 a přidáno 50  $\mu\text{l}$  1mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu. Do testovacích jamek bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku měďnatých iontů určené koncentrace a 50  $\mu\text{l}$  ultračisté vody do kontrolních jamek. Destička byla ponechána míchat 1 minutu v třepačce pro mikrotitrační destičky. Do první poloviny jamek bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku BCS a 50  $\mu\text{l}$  ultračisté vody do druhé poloviny jamek. Ihned poté byla změřena absorbance ve spektrofotometru při vlnové délce 484 nm a podruhé v čase 5 minut. Hodnoty absorbance  $A$  naměřené při vlnové délce  $\lambda$  byly vloženy do tabulky a z naměřených výsledků byl vytvořen graf závislosti absorbance na koncentraci měďnatých iontů.

	Kontrola – přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) = 0$ $\mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) =$ $50 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) =$ $100 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) =$ $150 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) =$ $200 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) =$ $250 \mu\text{M}$
Jamky s indikátorem						
						
						
slepé vzorky						
						
						

 kontrolní jamka s ultračistou vodou bez iontů mědi s indikátorem

 kontrolní jamka s ultračistou vodou bez indikátoru

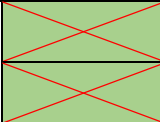
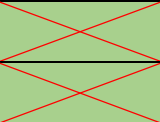
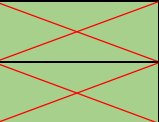
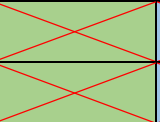
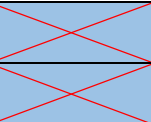
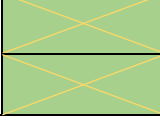
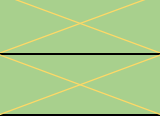
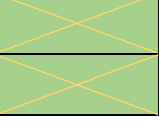
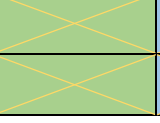
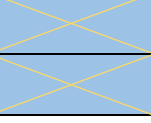
 testovací jamka s indikátorem

 testovací jamka bez indikátoru

#### 4.5.6 Chelatace iontů mědi hematoxylinem

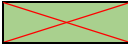
Nejprve byly připraveny základní roztoky – 5mM roztok  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ) v ultračisté vodě a 5mM roztok hematoxylinu v DMSO. Poté byly připraveny pracovní roztoky – 250  $\mu\text{M}$  roztok  $\text{Cu}^{2+}$  v ultračisté vodě a 250  $\mu\text{M}$  roztok hematoxylinu v DMSO a roztok testované látky – obvykle 10mM roztok testované látky v ultračisté vodě. Poté se přistoupilo k vlastnímu provedení experimentu. Testování proběhlo při třech hodnotách pH (7,5; 6,8; 5,5). Nejprve bylo napipetováno do všech předem určených jamek mikrotitrační destičky 150  $\mu\text{l}$  příslušného pufru. Poté bylo do všech jamek s pufrem přidáno 50  $\mu\text{l}$  250 $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$ . Do testovacích jamek bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky a do kontrolních jamek 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla. Destička byla ponechána intenzivně promíchat po dobu 2 minut v třepačce. Během tohoto protřepávání došlo v jamkách k tvorbě komplexu mezi  $\text{Cu}^{2+}$  a molekulami testované látky. Poté bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  250 $\mu\text{M}$  roztoku hematoxylinu do první poloviny jamek mikrotitrační destičky (tj. jamky s indikátorem nezreagované  $\text{Cu}^{2+}$ ) a 50  $\mu\text{l}$  DMSO do druhé poloviny jamek (tj. jamky se slepým vzorkem). Destička byla ponechána


promíchat na 3 minuty. Poté byla ihned, tzn. v čase 3 min a potom v čase 5 a 7 minut změřena ve spektrofotometru absorbance roztoků při 610 nm u pH 7,5; při 590 nm u pH 6,8 a při 595 nm u pH 5,5. Získané hodnoty byly zaznamenány do tabulky a z naměřených hodnot vytvořen graf.

	Roztok testované látky $c_1$	Roztok testované látky $c_2$	Roztok testované látky $c_3$	Roztok testované látky $c_x$	Kontrolní jamky ( $c=0$ )
Jamky s indikátorem					
slepé vzorky					

 kontrolní jamka s rozpouštědlem bez testované látky, s indikátorem

 kontrolní jamka s rozpouštědlem bez testované látky, bez indikátoru

 testovací jamka s testovanou látkou, s indikátorem

 testovací jamka s testovanou látkou, bez indikátoru

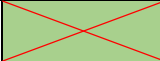
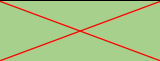
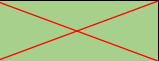
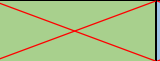
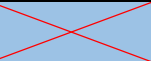
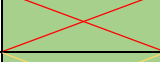
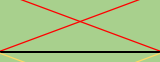
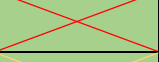
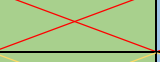
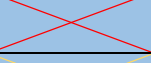





Konečný obsah jamek:

- 150  $\mu$ l pufru
- 50  $\mu$ l roztoku  $\text{Cu}^{2+}$
- 50  $\mu$ l roztoku testované látky nebo rozpouštědla
- 50  $\mu$ l hematoxylinu nebo DMSO

#### 4.5.7 Chelatace měďných iontů BCS

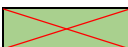
Nejprve byly připraveny základní roztoky – 5mM roztok  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ) v ultračisté vodě, 5mM roztok  $\text{CuCl}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ) v ultračisté vodě, 100mM roztok hydroxylamin hydrochloridu v ultračisté vodě a 5mM roztok disodné soli bathrokuproindisulfonové kyseliny v ultračisté vodě. Poté se přešlo k vlastnímu provedení experimentu. Testování proběhlo při čtyřech hodnotách pH (7,5; 6,8; 5,5; 4,5). Nejprve bylo napipetováno do všech předem určených jamek mikrotitrační destičky 100  $\mu$ l příslušného pufru. Poté

bylo do první poloviny jamek s pufrům přidáno 50  $\mu$ l 1mM HA a do druhé poloviny 10mM HA. Pak bylo do všech jamek přidáno 50  $\mu$ l 250 $\mu$ M roztoku  $\text{Cu}^+$  iontů v DMSO. Destička byla ponechána intenzivně míchat po dobu 1 minuty v třepačce. Do všech testovaných jamek bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku testované látky příslušné koncentrace nebo 50  $\mu$ l rozpouštědla do jamek kontrolních. Destička byla ponechána promíchat na dvě minuty v třepačce. Do poloviny jamek bylo přidáno 50  $\mu$ l 5mM roztoku disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny (tj. jamky s indikátorem nezreagovaného  $\text{Cu}^+$ ) a do druhé poloviny 50  $\mu$ l ultračisté vody (tj. jamky se slepým vzorkem). Poté byla ihned a znova po pěti minutách změřena absorbance ve spektrofotometru při vlnové délce 484 nm. Získané hodnoty byly zaznamenány do tabulky a z naměřených hodnot vytvořen graf.

	Roztok testované látky $c_1$	Roztok testované látky $c_2$	Roztok testované látky $c_3$	Roztok testované látky $c_x$	Kontrolní jamky ( $c=0$ )
Jamky s indikátorem					
slepé vzorky					
					

 kontrolní jamka s rozpouštědlem bez testované látky, s indikátorem

 kontrolní jamka s rozpouštědlem bez testované látky, bez indikátoru

 testovací jamka s testovanou látkou, s indikátorem

 testovací jamka s testovanou látkou, bez indikátoru

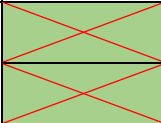
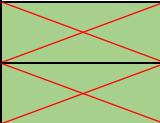
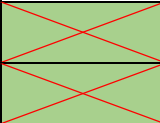
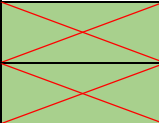
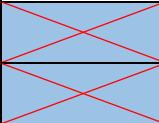
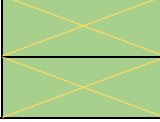
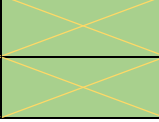
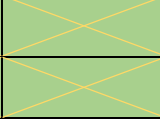
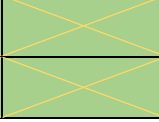
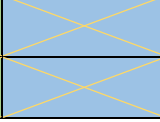
Konečný obsah jamek:

- 100  $\mu$ l pufru
- 50  $\mu$ l roztoku HA
- 50  $\mu$ l roztoku  $\text{Cu}^+$
- 50  $\mu$ l roztoku testované látky nebo rozpouštědla
- 50  $\mu$ l BCS nebo voda

#### 4.5.8 Chelatace měďnatých iontů BCS

Nejprve byly připraveny základní roztoky – 5mM roztok  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ) v ultračisté vodě, 5mM roztok  $\text{CuCl}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ) v ultračisté vodě, 100mM roztok hydroxylamin hydrochloridu v ultračisté vodě a 5mM roztok disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny v ultračisté vodě. Poté se přešlo k vlastnímu provedení experimentu. Testování proběhlo při čtyřech hodnotách pH (7,5; 6,8; 5,5; 4,5). Nejprve bylo napipetováno do všech předem určených jamek mikrotitrační destičky 100  $\mu\text{l}$  příslušného pufru. Do všech testovaných jamek bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky příslušné koncentrace nebo 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla do jamek kontrolních. Pak bylo do všech jamek přidáno 50  $\mu\text{l}$  250 $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v DMSO. Destička byla ponechána intenzivně míchat po dobu 2 minut v třepačce. Poté bylo do první poloviny jamek přidáno 50  $\mu\text{l}$  1mM HA (testování při pH 7,5 a 6,8) a do druhé poloviny 10mM HA (testování při pH 5,5 a 4,5). Destička byla ponechána promíchat na jednu minutu v třepačce. Do poloviny jamek bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  5mM roztoku disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny (tj. jamky s indikátorem nezreagovaného  $\text{Cu}^{2+}$ ) a do druhé poloviny 50  $\mu\text{l}$  ultračisté vody (tj. jamky se slepým vzorkem). Poté byla ihned a znova po pěti minutách změřena absorbance ve spektrofotometru při vlnové délce 484 nm. Získané hodnoty byly zaznamenány do tabulky a z naměřených hodnot byl vytvořen graf.




	Roztok testované látky $c_1$	Roztok testované látky $c_2$	Roztok testované látky $c_3$	Roztok testované látky $c_x$	Kontrolní jamky ( $c=0$ )
Jamky s indikátorem					
slepé vzorky					

 kontrolní jamka s rozpouštědlem bez testované látky, s indikátorem

 kontrolní jamka s rozpouštědlem bez testované látky, bez indikátoru

 testovací jamka s testovanou látkou, s indikátorem

 testovací jamka s testovanou látkou, bez indikátoru

Konečný obsah jamek:

- 100  $\mu$ l pufru
- 50  $\mu$ l roztoku HA
- 50  $\mu$ l roztoku  $\text{Cu}^{2+}$
- 50  $\mu$ l roztoku testované látky nebo rozpouštědla
- 50  $\mu$ l BCS nebo voda

#### 4.5.9 Statistická analýza

K provedení statistické analýzy mého měření byl použit program GraphPad Prism verze 7 pro Windows (GraphPad Software, USA). Výsledky byly zpracovány a vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka, která byla vypočítána podle vzorce

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

$\bar{x}$  je střední hodnota vzorku

$n$  je velikost vzorku

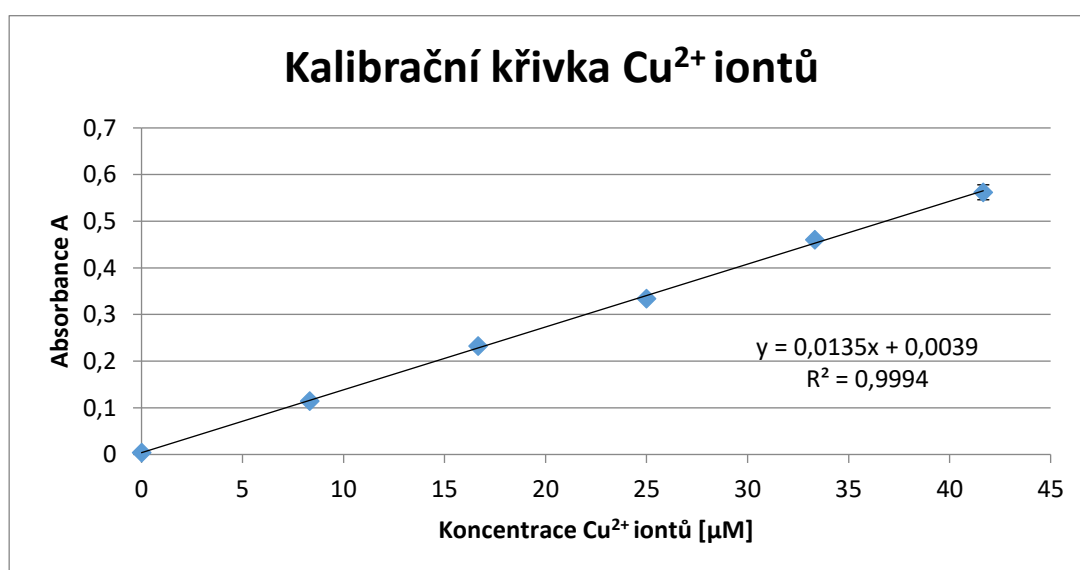
## 5 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

### 5.1 Kalibrační křivka

Z naměřených hodnot absorbancí při vlnové délce 484 nm v čase 5 minut a při pH 6,8 byla sestrojena kalibrační křivka, ve které je vyobrazena závislost absorbance na koncentraci měďnatých iontů. Tato závislost je lineární. Pro sestrojení křivky byly použity vodné roztoky měďnatých iontů o koncentracích 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  a 250  $\mu\text{M}$ .

Tabulka 3: Absorbance měďnatých iontů v čase 5 min

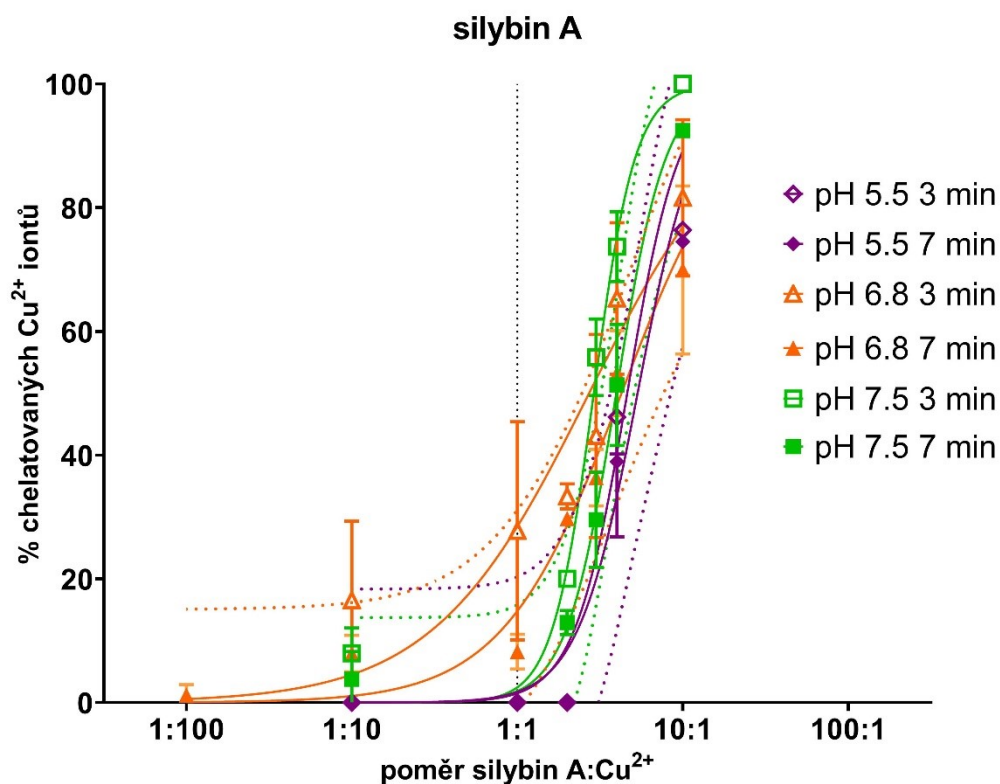
pH 6,8	5 min					
základní c [ $\mu\text{M}$ ]	0	50	100	150	200	250
finální c [ $\mu\text{M}$ ]	0	8,333333	16,66667	25	33,33333	41,66667
A + bathokuproin	0,036	0,145	0,265	0,371	0,499	0,582
	0,038	0,149	0,269	0,359	0,485	0,606
A - bathokuproin	0,034	0,029	0,038	0,031	0,032	0,034
	0,032	0,036	0,031	0,031	0,031	0,03
A rozdíl	0,003	0,1125	0,2305	0,34	0,4675	0,55
	0,005	0,1165	0,2345	0,328	0,4535	0,574
průměr	0,004	0,1145	0,2325	0,334	0,4605	0,562
SD	0,001	0,002	0,002	0,006	0,007	0,012



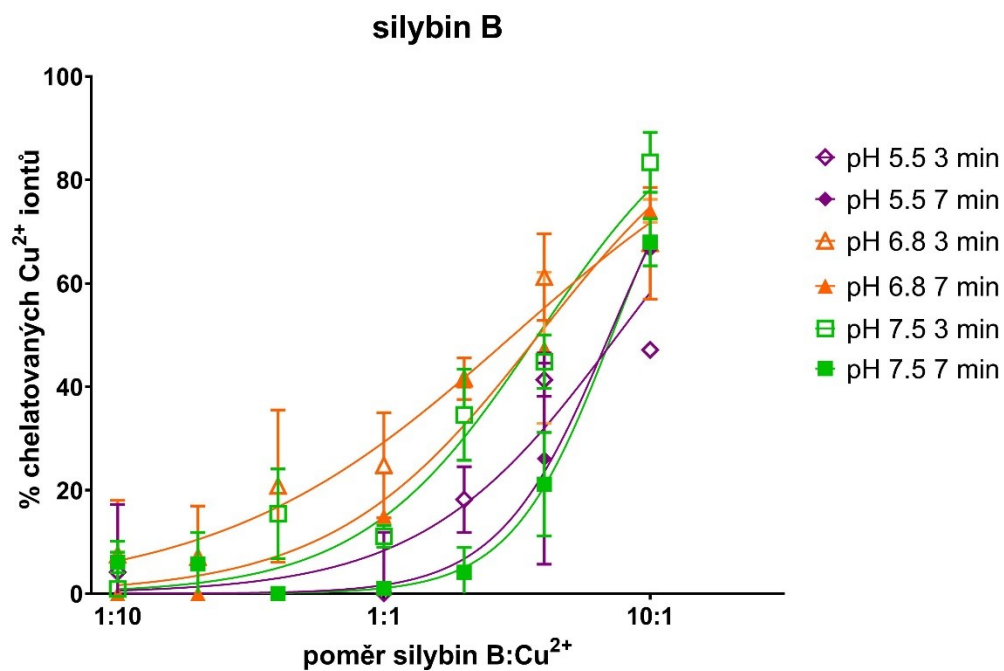
Obrázek 13: Kalibrační křivka měďnatých iontů

## 5.2 Stanovení chelatace měďnatých iontů hematoxylinem

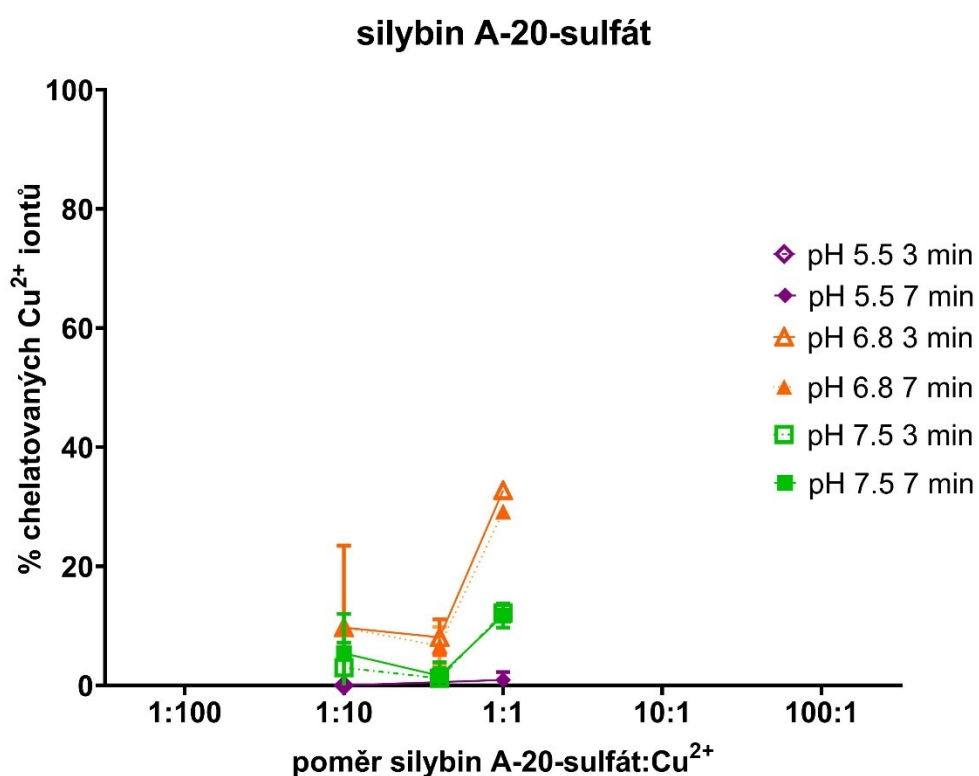
Obsahové látky *Silybum marianum* (L.) Gaernt. byly nejprve testovány *in vitro* hematoxylinovou metodou. Testování probíhalo při třech hodnotách pH (5,5; 6,8 a 7,5). Z naměřených hodnot byly vytvořeny grafy. Osa X představuje poměr koncentrací testované látky a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů, osa Y vyjadřuje v procentech schopnost testované látky cheltovat  $\text{Cu}^{2+}$  ionty. Různé hodnoty pH a časy jsou graficky odlišeny. Hematoxylinová metoda se používá pouze k počátečnímu orientačnímu ověření měď-chelatační aktivity. Hematoxylin tvoří s mědí méně stabilní komplexy a není dobře použitelný při nižším pH. Navíc v čase dochází ke konformačním změnám a hematoxylin se oxiduje na hematein. Proto se následně ještě provádí testování s bathrokuproinem, který má vysokou afinitu pro měď. Další výhodou je, že chelatuje měď i při nízkých hodnotách pH a vzniklý komplex je v čase stabilní. [49]



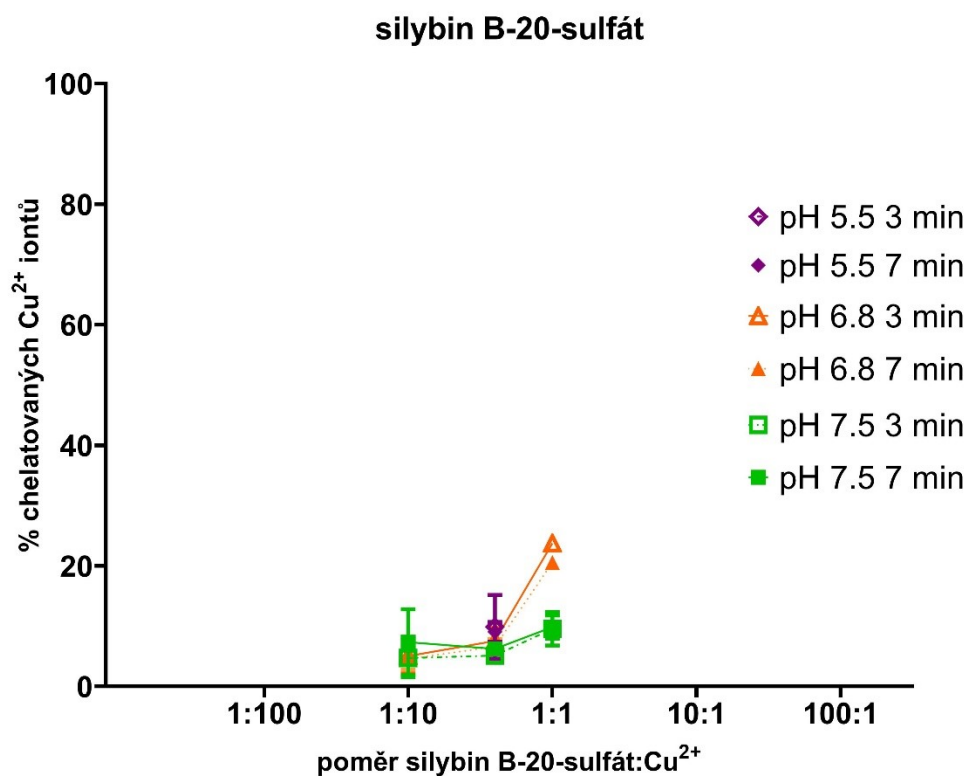
Obrázek 14: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin A (hematoxylinová metoda)



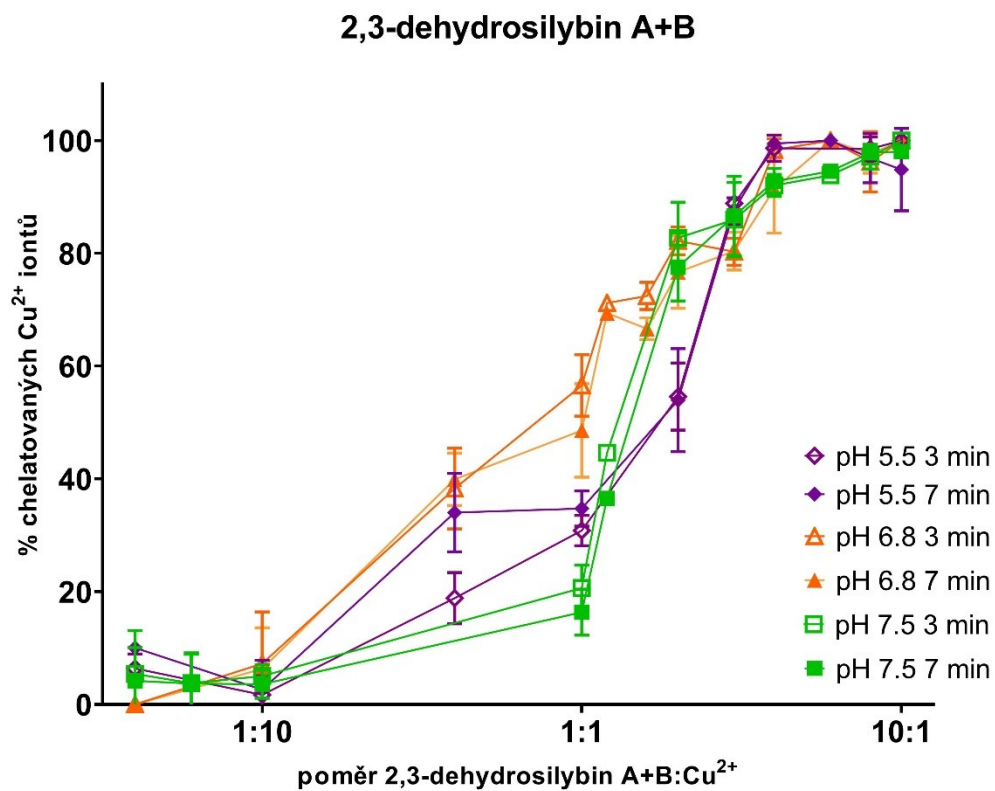
Obrázek 15: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin B (hematoxylinová metoda)



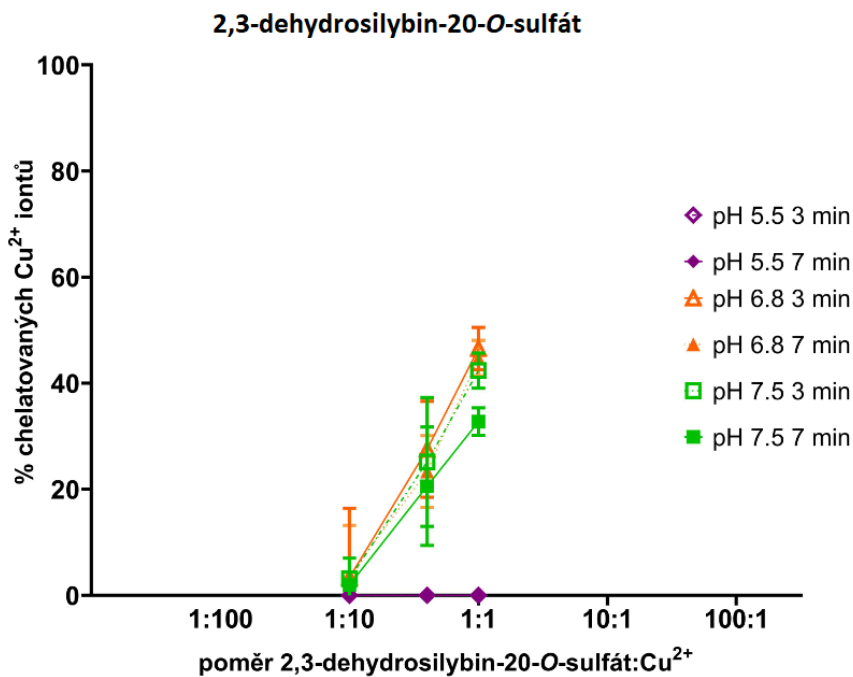
Obrázek 16: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin A-20-sulfát (hematoxylinová metoda)



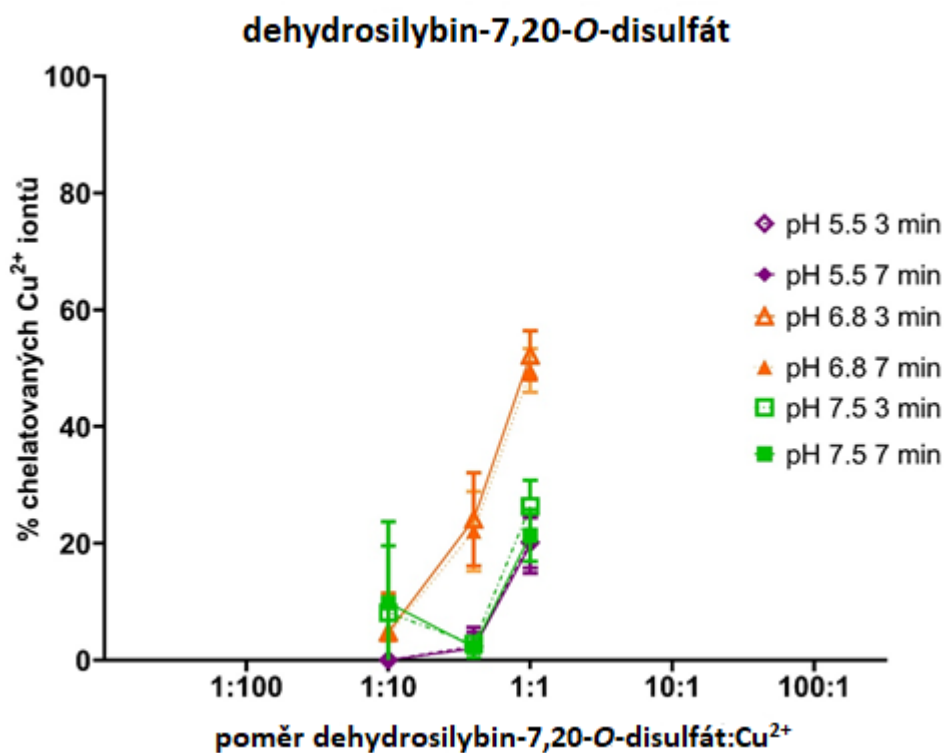
Obrázek 17: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin B-20-sulfát (hematoxylinová metoda)



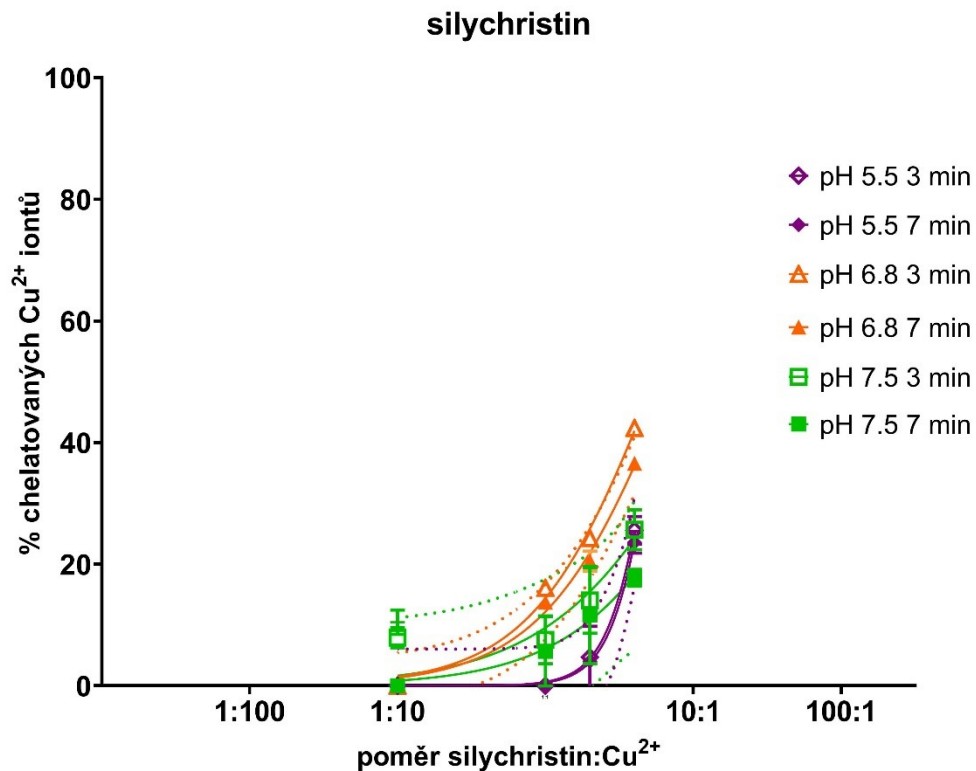
Obrázek 18: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity racemické směsi 2,3-dehydrosilybinu (hematoxylinová metoda)



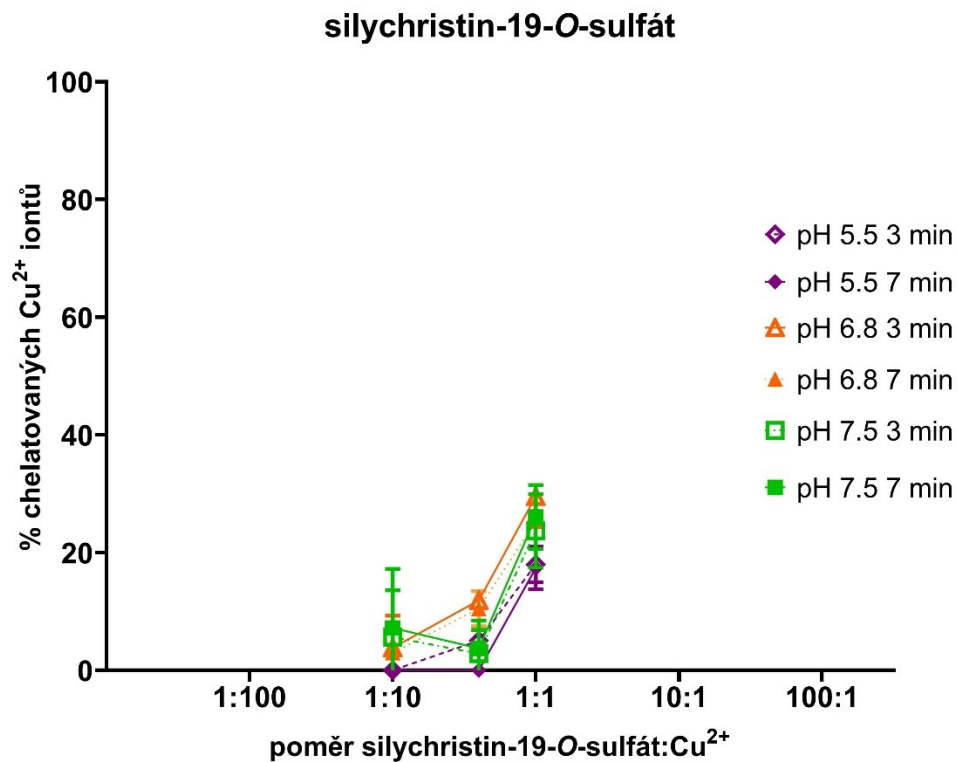
Obrázek 19: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilybin-20-O-sulfát (hematoxylinová metoda)



Obrázek 20: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky dehydrosilybin-7,20-O-disulfát (hematoxylinová metoda)

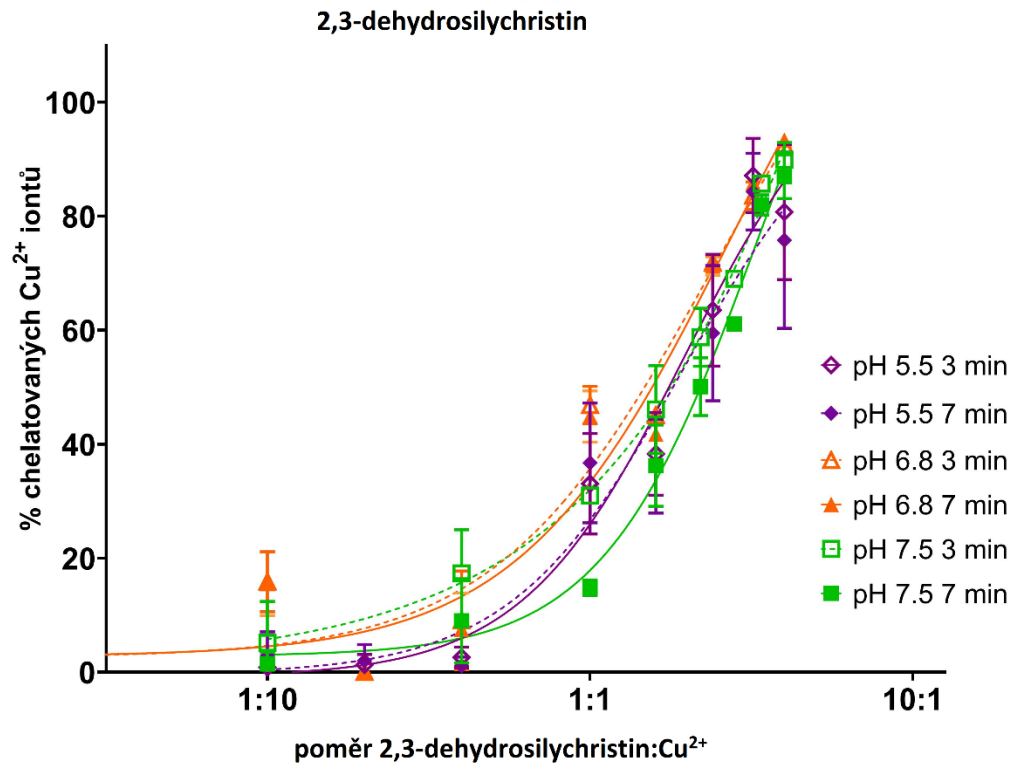


Obrázek 21: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silychristin (hematoxylinová metoda)



Obrázek 22: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silychristin-19-O-sulfát (hematoxylinová metoda)

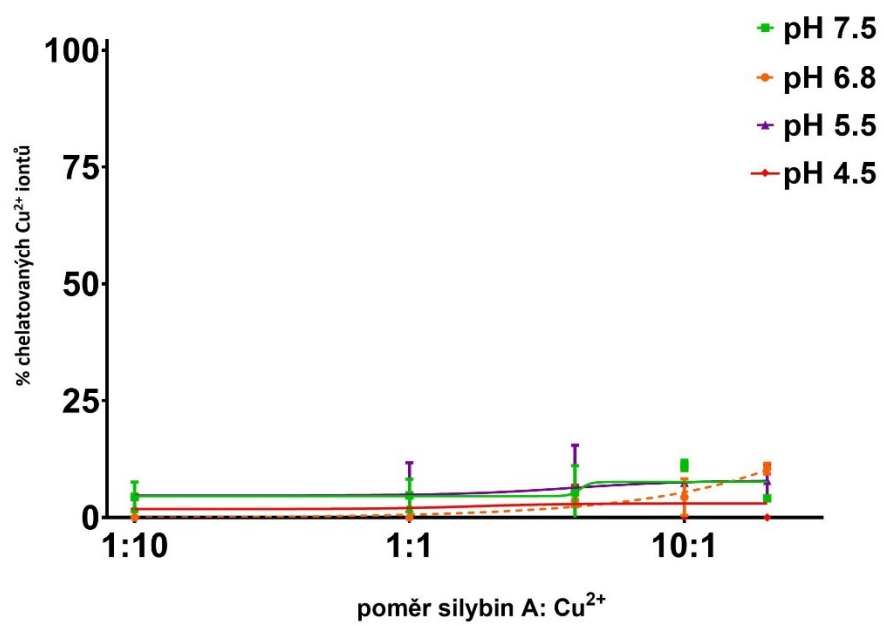
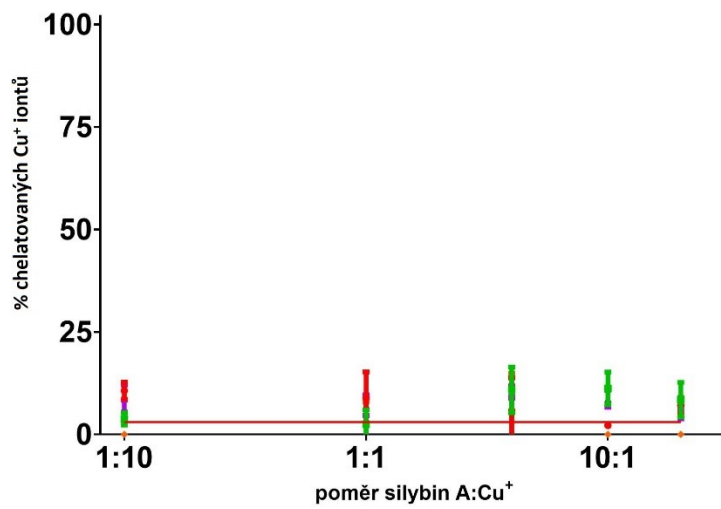




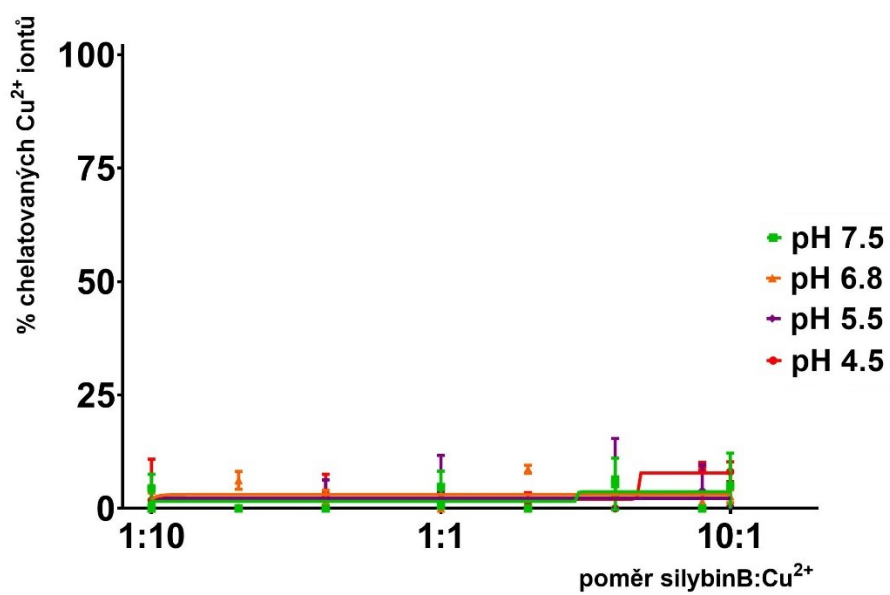
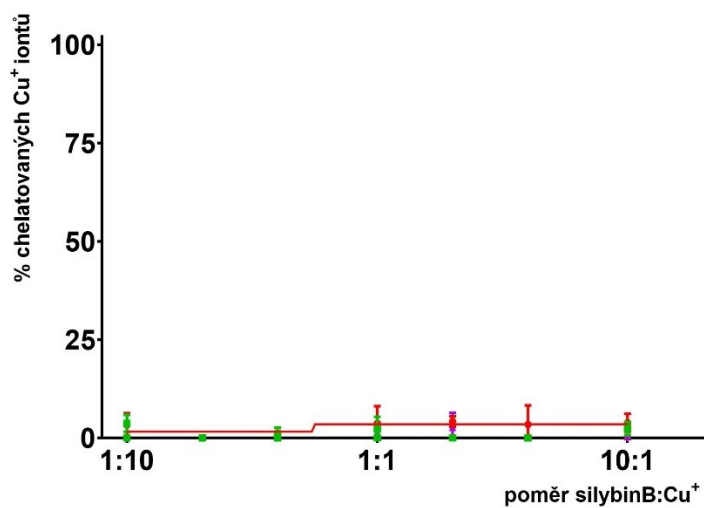
Obrázek 23: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilychristin (hematoxylinová metoda)

### 5.3 Stanovení chelatace měďnatých iontů bathokuproinem

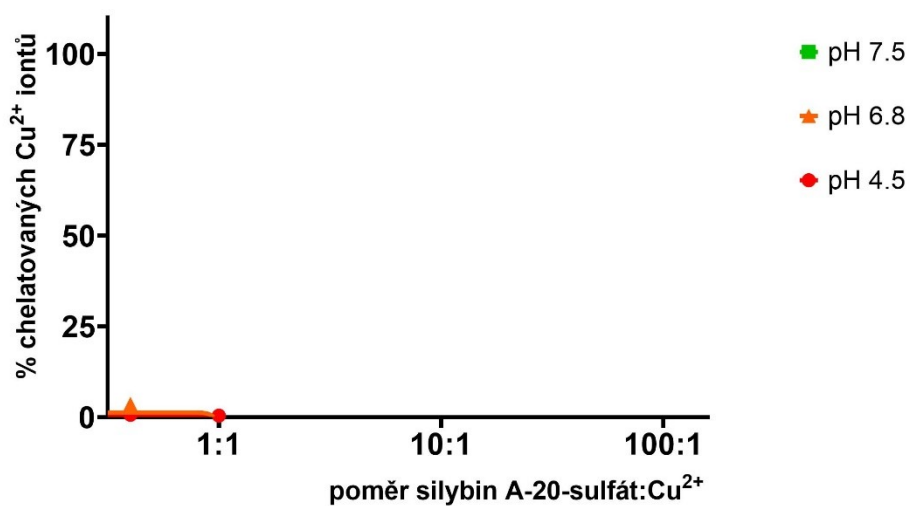
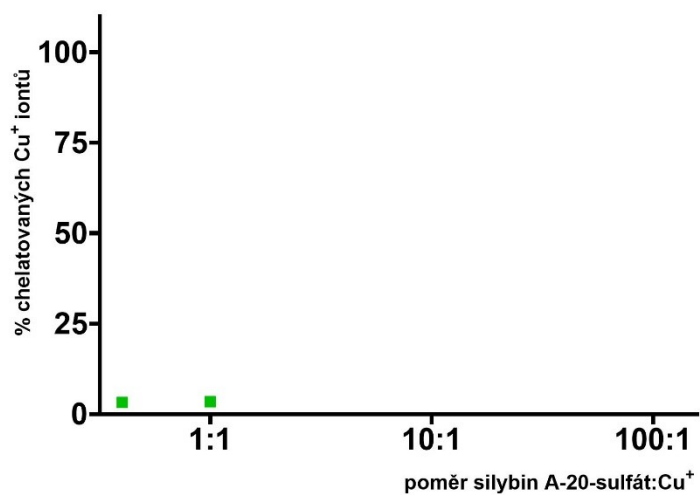
Po hematoxylinové metodě se provedlo testování bathokuproinem. Testování probíhalo při čtyřech hodnotách pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Z naměřených hodnot byly vytvořeny grafy. Osa X představuje poměr koncentrací testované látky a iontů mědi, osa Y vyjadřuje v procentech schopnost testované látky chelatovat ionty mědi. Různé hodnoty pH a časy jsou graficky odlišeny. Tato metoda je více kompetitivní, a proto ukáže jen látky, které chelatují měď efektivněji. Bathokuproin má vysokou aktivitu k měďným iontům a tvoří s nimi stabilní komplexy v širším rozmezí pH než hematoxylin (tedy i při pH 4,5). Bathokuproin se používá primárně pro stanovení měďných iontů. Pokud chceme stanovit měďnaté ionty, potřebujeme do reakce přidat vhodné redukční činidlo. V našem případě to byl hydroxylamin. <sup>[55]</sup>



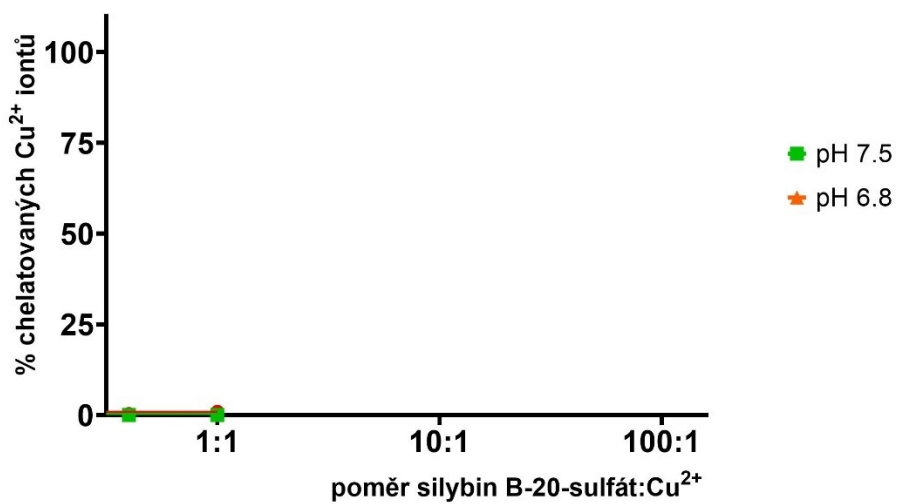
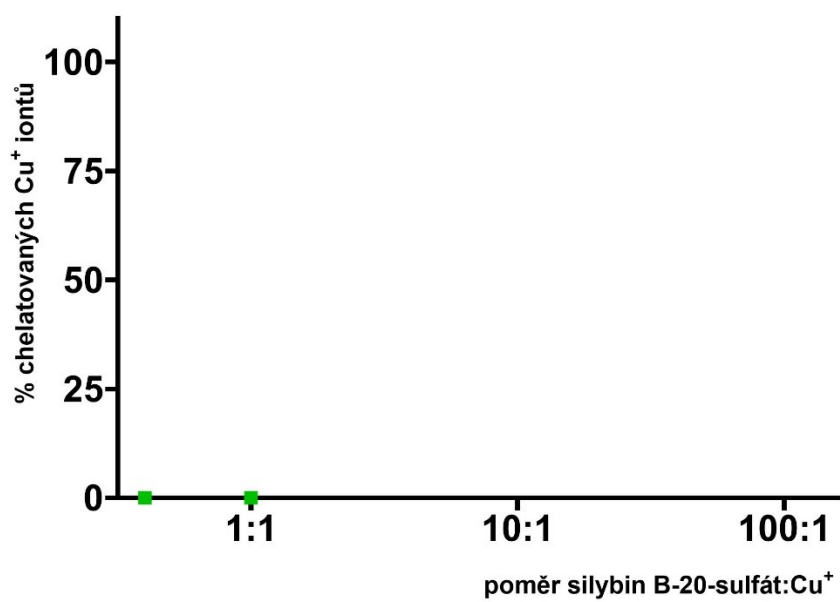
Obrázek 24: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin A (bathokuproinová metoda)



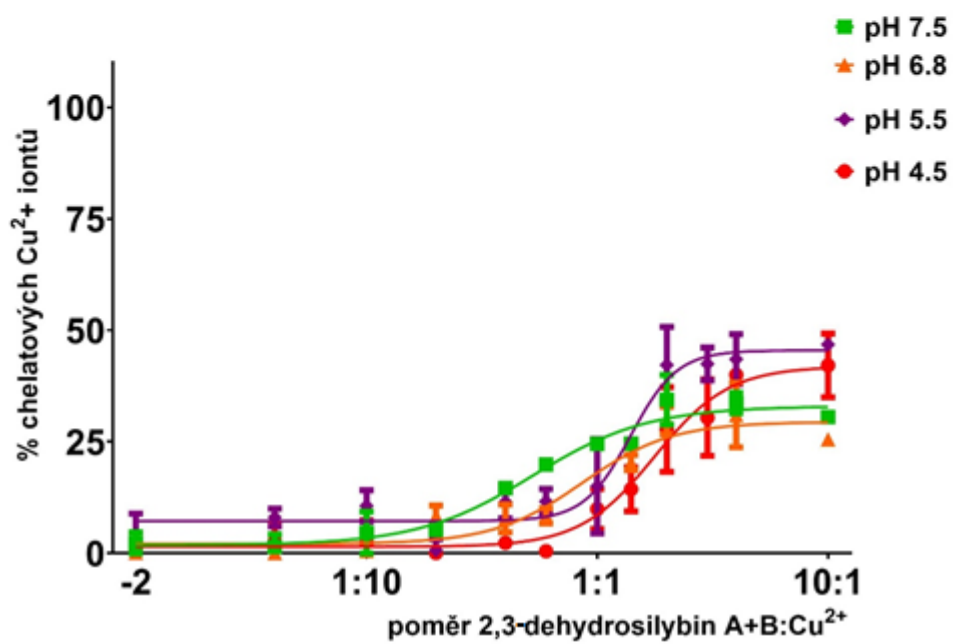
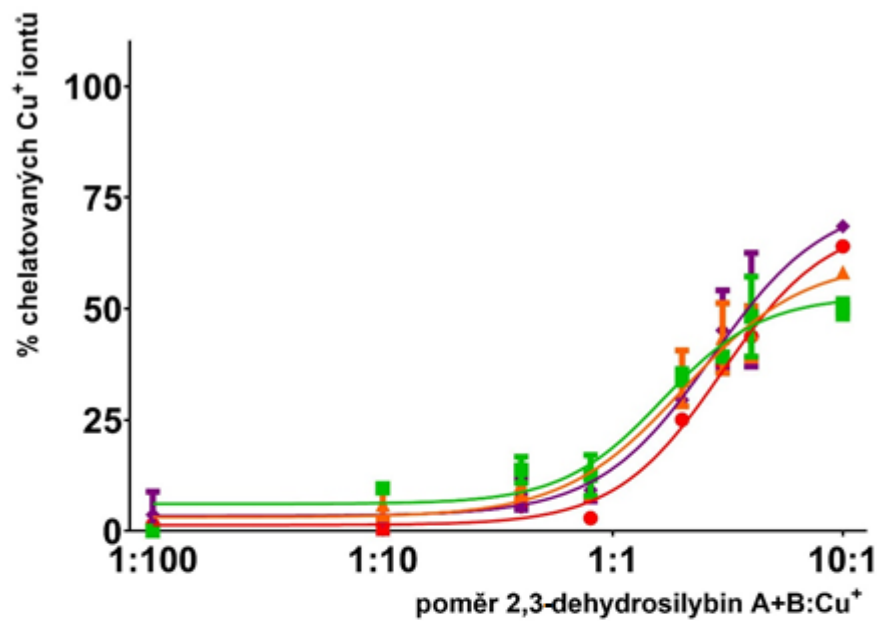
Obrázek 25: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin B (bathokuproinová metoda)



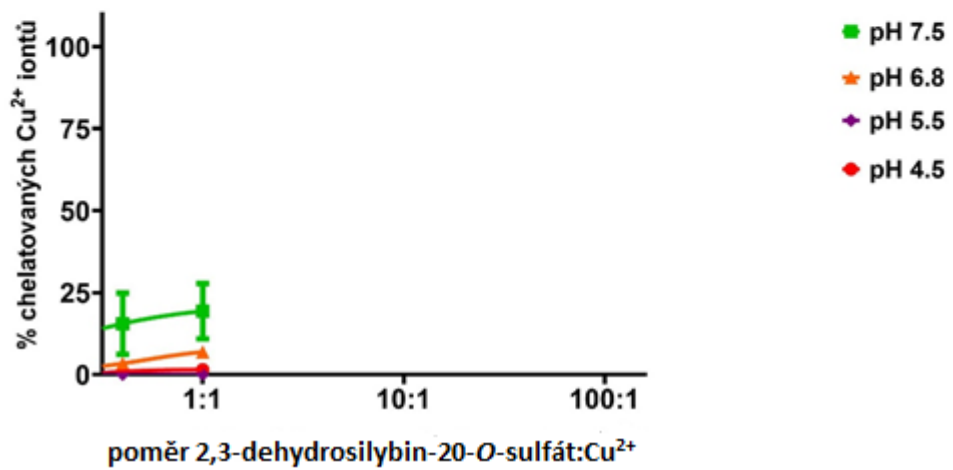
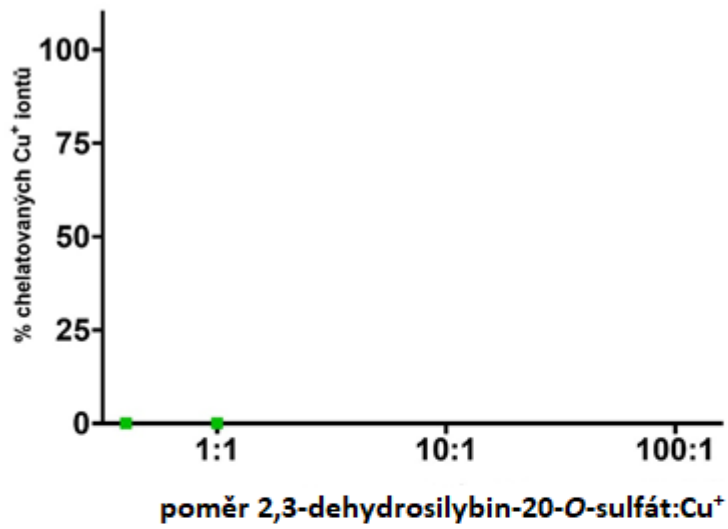
Obrázek 26: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin A-20-sulfát (bathokuproinová metoda)



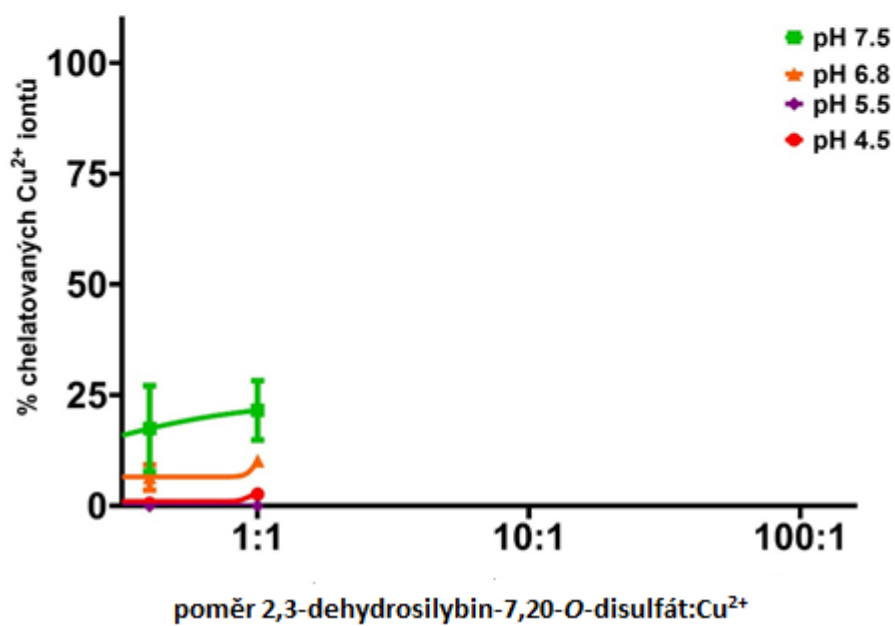
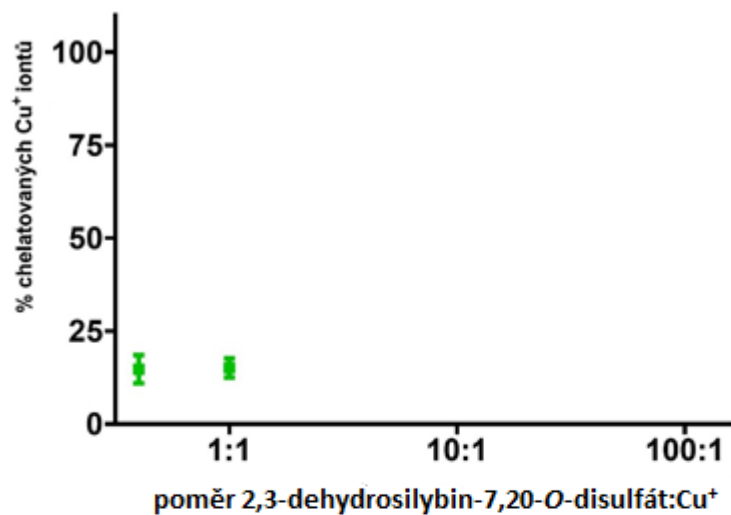
Obrázek 27: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin B-20-sulfát (bathokuproinová metoda)



Obrázek 28: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity racemické směsi 2,3-dehydrosilybinu (bathokuproinová metoda)

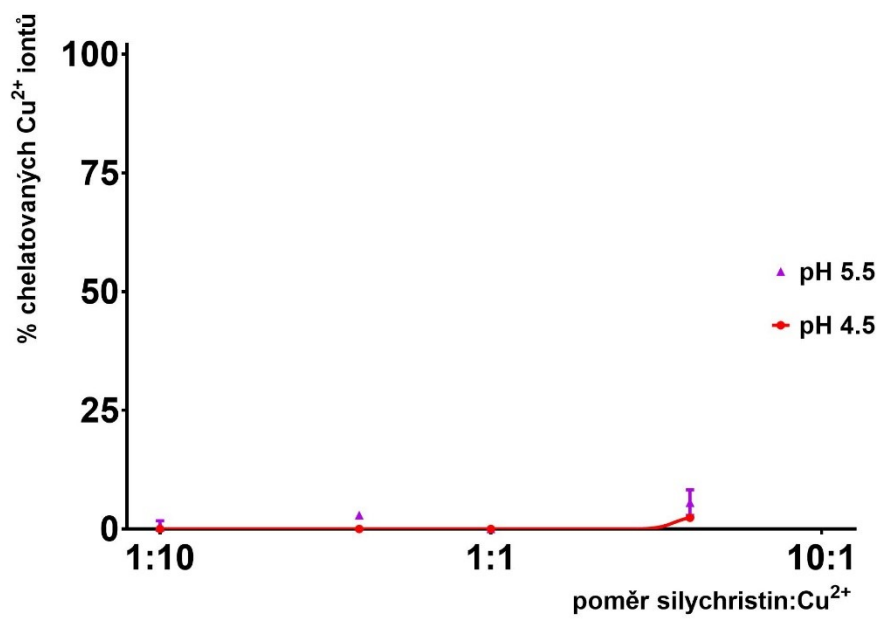
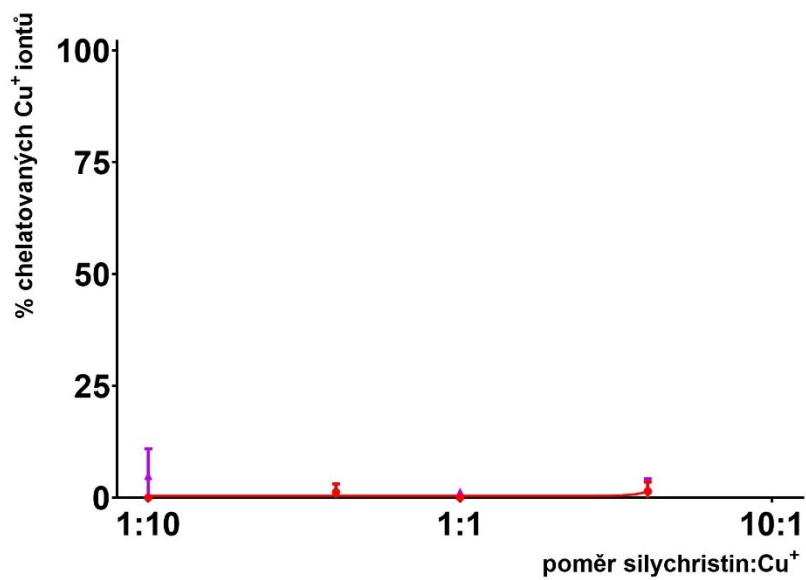


Obrázek 29: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilybin-20-O-sulfát (bathokuproinová metoda)

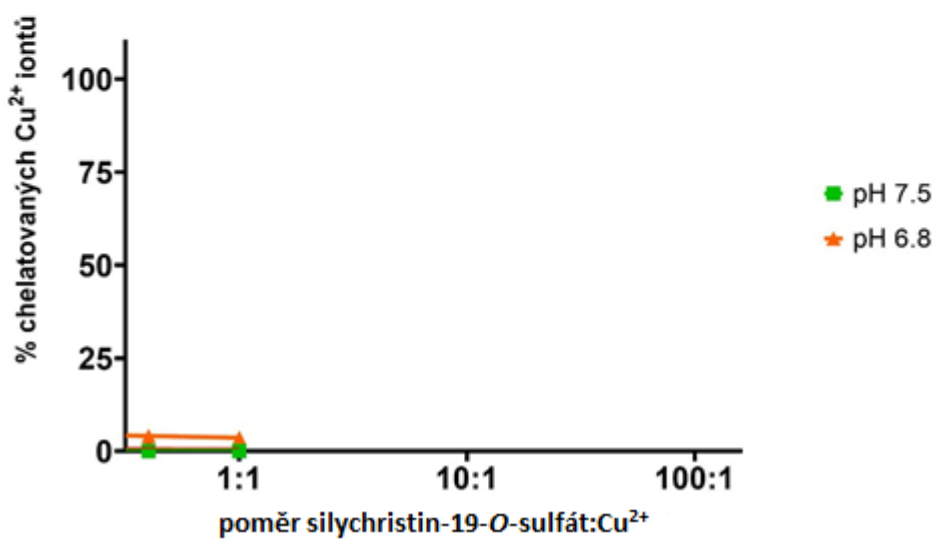
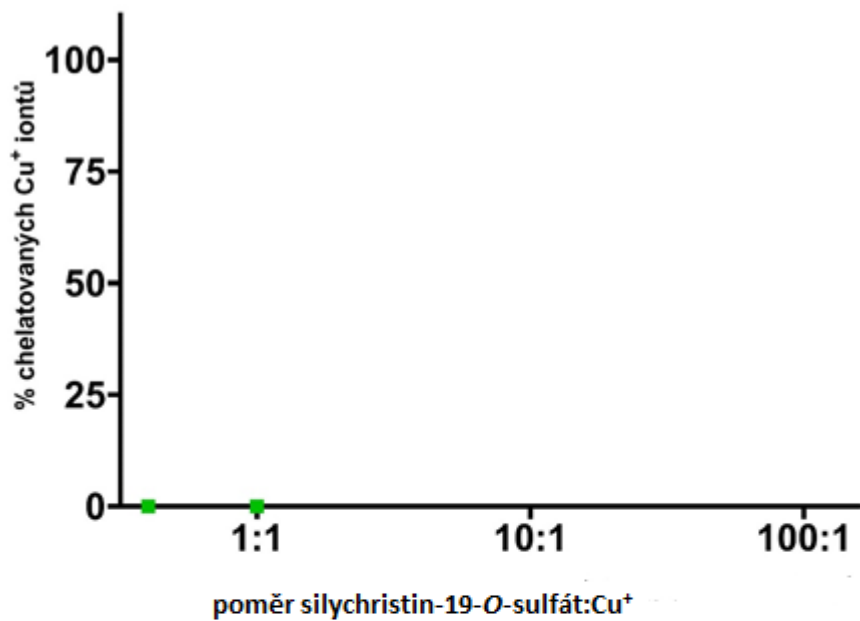


Obrázek 30: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilybin-7,20-O-disulfát (bathokuproinová metoda)

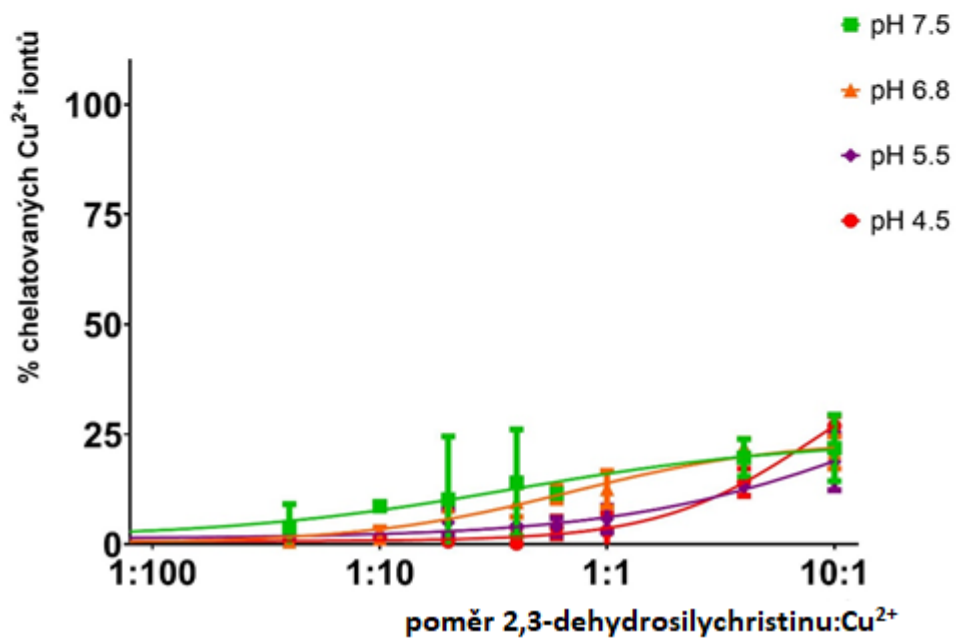
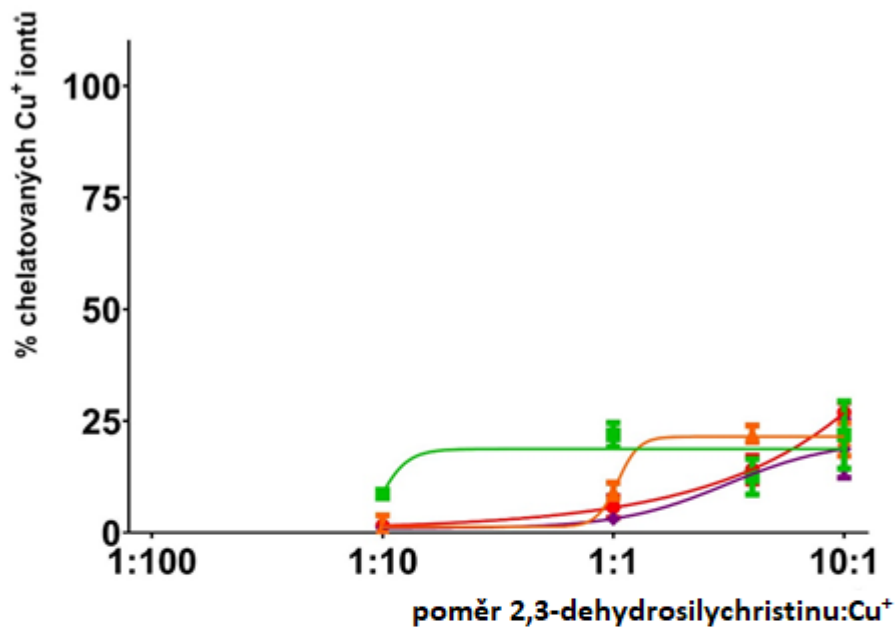




Obrázek 31: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silychristin (bathokuproinová metoda)



Obrázek 32: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silychristin-19-O-sulfát (bathokuproinová metoda)



Obrázek 33: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilychistin (bathokuproinová metoda)

## 6 DISKUZE

Zatímco chelatace železa přírodními látkami již byla prostudována několika *in vitro* a také *in vivo* studii, měď je teprve na počátku. A to nejen její chelatace, ale také přesné pochody metabolismu v organismu. <sup>[50][51][52]</sup>

Moje práce se zabývala studiem chelatačních účinků deseti látek ze skupiny flavonolignanů na měďné a měďnaté ionty. Cílem bylo zjistit, zda dané flavonolignany chelatují měď a na základě toho určit, které funkční skupiny jsou schopné tento děj ovlivňovat.

Flavonolignany jsou v organismu metabolizovány sulfatací, glukuronidací nebo methylací. Silybin A-20-sulfát, silybin B-20-sulfát, 2,3-dehydrosilybin-20-O-sulfát, 2,3-dehydrosilybin-7,20-O-disulfát, silychristin-19-O-sulfát jsou tedy potenciálními metabolity v organismu, které jsou produkovány při metabolizaci látek ze silymarinu. Tato hypotéza již byla prokázána na izolovaných lidských hepatocytech. Proto je potřeba považovat tyto sulfatované sloučeniny za autentické metabolity lidského organismu po podání silymarinu. <sup>[43][53]</sup>

K testování chelatačních účinků mědi byly v této práci použity dvě spektrofotometrické metody – pomocí indikátorů hematoxylinu a bathokuproinu. Tyto dvě látky tvoří s mědí komplexy, které lze poté detekovat spektrofotometricky dle rozdílů v absorbanci. Při stanovení měď-chelatačních účinků se využívá kompetice mezi testovanou látkou a indikátorem o ionty mědi. <sup>[54]</sup>

Nejprve byly vyhodnoceny výsledky testování s hematoxylinem, jelikož tato metoda je méně kompetitivní a ukáže nám i látky, které chelatují měď méně efektivně. Při pokusech bylo zjištěno, že všechny testované flavonolignany a také jejich sulfáty dokáží měď chelatovat. V mém testování se jako účinné chelátory mědi ukázaly být tyto látky: silybin A (obr. 15), silybin B (obr. 16), racemát 2,3-dehydrosilybinu (obr. 19) a 2,3-dehydrosilychristin (obr. 24), kde kromě silybinu B (obr. 16) tyto látky chelatovaly měď stoprocentně při jejich poměru s  $\text{Cu}^{2+}$  10:1. Jako nejefektivnější chelátor se jeví racemát 2,3-dehydrosilybinu, který při poměru 1:1 chelatoval přibližně z 20 % při pH 5,5; z 30 % při pH 7,5 a z 50 % při pH 6,8 (obr. 19). Ostatní testované látky měď také chelatovaly, ale v podstatně menší míře. Z výsledků vyplývá, že měď byla nejlépe

chelátována při hodnotě pH 6,8. 2,3-dehydrosilybin-20-*O*-sulfát při pH 5,5 měď nechelatoval vůbec (obr. 20).

Z výsledků provedeného testování vyplývá, že sulfatace schopnost chelatace mědi výrazně snižuje, zatímco dehydrokupina v poloze 2,3 chelataci zvyšuje.

Poté byla provedena metoda s bathokuproinem. Tato metoda je více kompetitivní, a proto ukáže jen látky, které chelatují měď efektivněji. Bathokuproin má vysokou aktivitu k měďným iontům a tvoří s nimi stabilní komplexy v širším rozmezí pH než hematoxylin (tedy i při pH 4,5). Bathokuproin se používá primárně pro stanovení měďných iontů. Pokud chceme stanovit měďnaté ionty, potřebujeme do reakce přidat vhodné redukční činidlo. V našem případě to byl hydroxylamin. <sup>[55]</sup>

Při testování bathokuproinem byly efektivními chelátory jen tyto látky: racemát 2,3-dehydrosilybinu (obr. 29) a 2,3-dehydrosilychristin (obr. 34). Racemát 2,3-dehydrosilybinu chelatoval měďné ionty až z 75 % a měďnaté ionty jen z 50 % (obr. 29), zatímco 2,3-dehydrosilychristin chelatoval jak měďné, tak i měďnaté ionty z 25 % (obr. 34). Se zvyšujícím se koncentračním poměrem se zvyšuje procento chelatace. Ostatní látky chelatovaly měď podstatně méně. Silybin A a silybin B pouze přibližně z 5 % (obr. 25, obr. 26), 2,3-dehydrosilybin-20-*O*-sulfát a 2,3-dehydrosilybin-7,20-*O*-disulfát chelatovaly měďnaté ionty pouze v poměru 1:1 při pH 7,5 přibližně z 20 % (obr. 30, obr. 31) a ostatní testované látky nechelatovaly vůbec.

Testy s bathokuproinem potvrdily, že dvojná vazba v poloze 2,3 je nejdůležitější strukturou pro chelataci. <sup>[56]</sup>

Je známo, že důležitým strukturním prvkem flavonolignanů pro chelataci mědi je 3-hydroxy-4-keto-5-hydroxy skupina. Z mého testování vyplývá, že pokud je vazba 2,3 nenasycená, dochází k chelataci mědi snadněji. Navázání sulfoskupiny v místě 7 chromonu naopak chelataci snižuje. Navázání sulfoskupiny na hydroxyskupinu fenylu v poloze 4 vedlo také ke snížení schopnosti chelatace. <sup>[56]</sup>

Jak již bylo dokázáno v dřívějších pracích, sulfatace snižuje antioxidační aktivitu flavonolignanů. Stejně tak se snižuje i schopnost chelatace iontů mědi, k čemuž dospěly výsledky mé práce. <sup>[43]</sup>

Jak je z našich získaných výsledků patrné, je třeba provést další testování látek, které se jeví potenciálně využitelné.

## 7 ZÁVĚR

Moje rigorózní práce se zabývala *in vitro* stanovením měď-chelatačních vlastností deseti vybraných látek: 5 ze skupiny flavonolignanů (silybin A, silybin B, racemát 2,3-dehydrosilybinu, silychristin a 2,3-dehydrosilychristin) a 5 jejich metabolitů (silybin A-20-sulfát, silybin B-20-sulfát, 2,3-dehydrosilybin-20-*O*-sulfát, 2,3-dehydrosilybin-7,20-*O*-disulfát, silychristin-19-*O*-sulfát). Flavonolignany byly izolovány ze silymarinu, který se získává z rostliny *Silybum marianum* (L.) Gaertn. čeledi *Asteraceae*. Pro tato stanovení byla použita spektrofotometrická metoda, která představuje rychlou a levnou metodu měření. Konkrétně byly použity dva způsoby měření. Prvním byla hematoxylinová metoda, která je schopná podat informaci, zda daná látka měď chelatuje. Druhým způsobem byla bathokuproinová metoda, která je průkaznější než první zmíněná (jedná se o více kompetitivní metodu).

Nejprve byla provedena hematoxylinová metoda, kterou nelze použít pro kyselé prostředí (tedy využity pufrů 5,5; 6,8 a 7,5). Všechny testované flavonolignany prokázaly schopnost chelátovat měď. Nejefektivnějšími chelátory byly silybin A, silybin B, racemát 2,3-dehydrosilybinu a 2,3-dehydrosilychristin.

Poté byla provedena bathokuproinová metoda, kterou lze použít ve všech námi využívaných pufrách (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Zde schopnost chelatace prokázaly pouze racemát 2,3-dehydrosilybinu a 2,3-dehydrosilychristin.

Důležitým strukturním prvkem pro schopnost chelatace mědi je 3-hydroxy-4-keto-5-hydroxy skupina. Je však velký rozdíl mezi planární molekulou (s nenasycenou 2,3 vazbou) a neplanární molekulou (s nasycenou 2,3 vazbou). Dle provedeného testování má silnější chelatační vlastnosti planární molekula s nenasycenou 2,3 vazbou.

[18]

Žádná z testovaných látek však neprokázala při testech s bathokuproinem vyšší účinnost chelatace než klinicky používaný trientin. [56]

Testování sulfátů nebylo prozatím těmito metodami prováděno, je to pilotní průzkum. Je nutné provést další testy s jinými koncentracemi.

## 8 ZDROJE

- [1] Encyclopedia Britannica. [online]. [cit. 2018-10-28]. Dostupné <https://www.britannica.com/science/copper>
- [2] Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.: *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum, 2011, 548. ISBN 9788024614144.
- [3] Festa R. A., Thiele D. J.: Copper: An essential metal in biology. *Current biology* 21(21), 877-883 (2011). ISSN 09609822.
- [4] Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D.: Trace elements in human physiology and pathology. *Copper. Biomed Pharmacother* 57(9), 386-398. ISSN 0753-3322.
- [5] Turnlund J. R.: Human whole-body copper metabolism. *The American Journal Of Clinical Nutrition* 67(5), 960-964 (1998). ISSN 00029165.
- [6] Angelova M., Asenova S., Nedkova V., Koleva-Kolarova R.: Copper in the human organism. *Trakia Journal of Science* 9(1), 88-98 (2011). ISSN 1313-3551.
- [7] Institut Galenus. [online]. [cit. 2018-11-02]. Dostupné <https://www.galenus.cz/clanky/vyziva/mineraly-med>
- [8] CIBA Foundation Symposium, Evered D., Lawrenson G.: *Biological Roles of Copper*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1980, 354. ISBN 9780470718308.
- [9] Výživová doporučení. [online]. [cit 2019-02-10]. Dostupné <https://el.lf1.cuni.cz/p59615930/>
- [10] Duša F.: Studium hladiny mědi vzájemných proteinů a metalothioneinu u pacientů se zhoubnými nádory. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2008.
- [11] Strausak D., Mercer J. F. B., Dieter H., Stremmel W., Multhaup G.: Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Research Bulletin* 55(2), 175-185 (2001). ISSN 03619230.
- [12] DiDonato M., Sarkar B.: Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1360(1), 3-16 (1997). ISSN 09254439.
- [13] Sarkar B.: Treatment of Wilson and Menkes Diseases. *Chemical Reviews* 99(9), 2535-2544 (1999). ISSN 00092665.

- [14] Yang X., Cai P., Liu Q. *et al.*: Novel 8-hydroxyquinoline derivatives targeting  $\beta$ -amyloid aggregation, metal chelation and oxidative stress against Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 26(12), 3191-3201 (2018). ISSN 14643391.
- [15] Uriu-Adams J. Y., Keen C. L.: Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspect of Medicine* 26(4-5), 268-298 (2005). ISSN 00982997.
- [16] Aneni E. C., Ecsolar E., Lamas G. A.: Chronic Toxic Metal Exposure and Cardiovascular Disease: Mechanisms of Risk and Emerging Role of Chelation Therapy. *Current Atherosclerosis Reports* 18(12), 81 (2016). ISSN 15346242.
- [17] Vahabzadeh M., Amiri N., Karimi G.: Effects of silymarin on metabolic syndrome: a review. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture* 98(13), 4816-4823 (2018). ISSN 10970010.
- [18] Tvrdý V., Catapano M. C., Rawlik T. *et al.*: Interaction of isolated silymarin flavonolignans with iron and copper. *Journal of Inorganic Biochemistry* 189, 115-123 (2018). ISSN 01620134.
- [19] Rudá-Kučerová J.: Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) jako podpůrný fototerapeutický prostředek v onkologii. *Klinická onkologie* 30(6), 426-432 (2017). ISSN 18025307.
- [20] Wax P.M.: Current Use of Chelation in American Health Care. *Journal of Medical Toxicology* 9(4), 303-307 (2013). ISSN 15569039.
- [21] Jahodář L.: *Farmakobotanika*. Praha: Karolinum, 2011, 278. ISBN 978-80-246-2015-2.
- [22] Spilková J., Martin J., Siatka T.: *Farmakognozie*. Praha: Karolinum, 2016, 346. ISBN 9788024632643.
- [23] Bijak M.: Silybin, A Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) – Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules* 22(11), 1942-1953 (2017). ISSN 14203049.
- [24] Opletal L.: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita. Nutraceutika. Sekundární metabolismy rostlin*, 3. svazek. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2016, 698. ISBN 978-80-246-2084-8.



- [25] *Český lékopis 2017*, 4. díl. Praha: Grada Publishing, 2017, 4904. ISBN 859-404-924-045-6.
- [26] Online atlas of the British and Irish flora. [online]. [cit 2018-11-07]. Dostupné <https://www.brc.ac.uk/plantatlas/plant/silybum-marianum>.
- [27] Veitch N. C., Smith M., Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D.: *Herbal Medicines 4th Edition*. London: Pharmaceuticals Press Editorial, 2013, 813. ISBN 978-0857110350.
- [28] EMA [online]. [cit 2018-11-25]. Dostupné <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/silybi-mariani-fructus>
- [29] PharmaWiki. [online]. [cit 2018-11-25]. Dostupné [https://www.pharmawiki.ch/wiki/media/Mariendistel\\_D2.jpg](https://www.pharmawiki.ch/wiki/media/Mariendistel_D2.jpg)
- [30] Pubchem. [online]. [cit 2018-11-10]. Dostupné <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31553#section=Top>
- [31] Jelodar G., Rafiee B., Moosavi S. H.: Silymarin extract improved plasma homocysteine, lipids and liver enzymes in hyperhomocysteinemic non-alcoholic steatohepatitis. *Physiology and Pharmacology*, 19(2), 139-145, (2015). ISSN 17350581.
- [32] Svobodová Rajnochová A., Gabrielová E., Ulrichová J. *et al.*: A pilot study of the UVA-photoprotective potential of dehydrosilybin, isosilybin, silychristin, and silydianin on human dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research* 311(6), 477-490 (2019). ISSN 03403696.
- [33] Ullah H., Khan H.: Anti-Parkinson Potential of Silymarin: Mechanistic Insight and Therapeutic Standing. *Frontiers in Pharmacology* 9, 422 (2018). ISSN 1663-9812.
- [34] Kumar T., Larokar Y. K., Iyer S. K., Kumar A., Tripathi D.K.: Phytochemistry And pharmacological activities of *Silybum marianum*. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* 1(3), 124-133 (2011). ISSN 22496084.
- [35] Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, 2nd edition. Intercept, 1999, 279-293. ISBN 9781898298632.
- [36] Nagy M., Grančai D., Mučaji P.: *Farmakognózia. Biogenéze prírodných látok*. 1. vydání. Vydavateľství Osveta, 2011, 136. ISBN 978-80-8063-368-4.

- [37] Qin N., Hu. X., Li S., Wang J., Li Z. *et al.*: Hypoglycemic effect of silychristin A from *Silybum marianum* fruit via protecting pancreatic islet b cells from oxidative damage and inhibiting a-glucosidase activity *in vitro* and in rats with type 1 diabetes. *Journal of Functional Foods* 38, 168-179 (2017). ISSN 1756-4646.
- [38] Kabir, F., Fattahian H., Riazi-Esfehani M., Veshkini A., Vazir B.: The Protective Role of Silymarin on Selenite-Induced Cataract in Rabbit Model. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 20(1), 143-147 (2014). ISSN 13006045.
- [39] Toklu H. Z., Akbay T. T., Velioglu-Ogunc A. *et al.*: Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. *The Journal Of Surgical Research* 145(2), 214-22 (2008). ISSN 00224804.
- [40] Almasi E., Gharagozloo M., Eskandari N., A. Almasi A., Sabzghabae A. M.: Inhibition of apoptosis and proliferation in t cells by immunosuppressive silymarin. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 16(2), 107-119 (2017). ISSN 17355249.
- [41] Cheung C. W. Y., Gibbons N., Johnson D. W., Nicol D. L.: Silibinin - A Promising New Treatment for Cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 10(3), 186-195 (2010). ISSN 18715206.
- [42] Biedermann D., Vavříková E., Cvak L., Křen V.: Chemistry of silybin. *Royal society of chemistry* 31, 1138-1157 (2014). ISSN 02650568.
- [43] Valentová K., Purchartová K., Rydlová R., Roubalová R., Biedermann D. *et al.*: Sulfated metabolites of flavonolignans and 2,3-dehydroflavonolignans: Preparation and properties. *International journal of molecular sciences* 19(8), 2349 (2018). ISSN 1661-6596.
- [44] Chambers Ch. S., Valentová K, Křen V.: "Non-Taxifolin" Derived Flavonolignans: Phytochemistry and Biology. *Current Pharmaceutical Design* 21(38), 5489-5500 (2015). ISSN 1381-6128.
- [45] Arampatzis D. A., Karkanis A. C., Tsiropoulos N. G.: Silymarin content and antioxidant activity of seeds of wild *Silybum marianum* populations growing in Greece. *Annals of Applied Biology* 174(1), 61-73 (2018). ISSN 0003-4746.
- [46] Biedermann D., Buchta M., Holečková V., Sedlák D., Valentová K. *et al.*: Silychristin: Skeletal alterations and biological activities. *Journal of natural products* 79(12), 3086-3092 (2016). ISSN 0163-3864.

- [47] Suchopár J., Valentová Š., Šimek R.: *Compendium. Léčiva používaná v podmínkách ČR*. Praha: Panax, 2018, 1200. ISBN 9788090280670.
- [48] Aasetha J., Skaug M. A., Caoc Y., Andersend O.: Chelation in metal intoxication—Principles and paradigms. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 31, 260-266 (2015). ISSN 0946672X.
- [49] Sedlářová L.: Standardizace metodiky pro *in vitro* stanovení chelatace mědi. *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2013.
- [50] Macáková K., Mladěnka P., Filipský T., Říha M., Jahodář L. *et al.*: Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food chemistry* 135, 2584-2592 (2012). ISSN 0308-8146.
- [51] Karlíčková J., Macáková K., Říha M., Pinheiro L. M. T., Filipský T. *et al.*: Isoflavones reduce copper with minimal impact on iron *in vitro*. *Oxidative medicine and cellular longevity* (2015). ISSN 1942-0900.
- [52] Filipský T., Říha M., Macáková K., Anzenbacherová E., Karlíčková J., Mladěnka P.: Antioxidant Effects of Coumarins Include Direct Radical Scavenging, Metal Chelation and Inhibition of ROS-Producing Enzymes. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 15(5), 415-431 (2015). ISSN 1568-0266.
- [53] Vrba J., Papoušková B., Roubalová L., Zatloukalová M., Biedermann D. *et al.*: Metabolism of flavonolignans in human hepatocytes. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 152, 94-101 (2018). ISSN 0731-7085.
- [54] Horňasová V.: Měď-chelatační vlastnosti isoflavonoidů. *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2015.
- [55] Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Hrdina R., Mladěnka P.: Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 123, 80-87 (2013). ISSN 0162-0134.
- [56] Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Rocha L. *et al.*: *In vitro* evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advances* 4(62), 32628-32638 (2014). ISSN 2046-2069.

## 9 PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Silybum marianum</i> (L). Gaertn. © [25].....	19
Obrázek 2: <i>Silybi mariani fructus</i> © [28] .....	21
Obrázek 3: Silybin A.....	26
Obrázek 4: Silybin B.....	27
Obrázek 5: 2,3-Dehydrosilybin A+B.....	27
Obrázek 6: Silybin A-20-sulfát .....	28
Obrázek 7: Silybin B-20-sulfát.....	28
Obrázek 8: 2,3-Dehydrosilybin-20-O-sulfát.....	29
Obrázek 9: 2,3-Dehydrosilybin-7,20-O-disulfát.....	29
Obrázek 10: Silychristin .....	30
Obrázek 11: Silychristin-19-O-sulfát.....	30
Obrázek 12: 2,3-Dehydrosilychristin .....	31
Obrázek 13: Kalibrační křivka měďnatých iontů .....	43
Obrázek 14: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin A (hematoxylinová metoda).....	44
Obrázek 15: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin B (hematoxylinová metoda).....	45
Obrázek 16: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin A-20-sulfát (hematoxylinová metoda).....	45
Obrázek 17: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin B-20-sulfát (hematoxylinová metoda).....	46
Obrázek 18: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity racemické směsi 2,3-dehydrosilybinu (hematoxylinová metoda).....	46
Obrázek 19: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilybin-20-O-sulfát (hematoxylinová metoda).....	47
Obrázek 20: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky dehydrosilybin-7,20-O-disulfát (hematoxylinová metoda).....	47
Obrázek 21: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silychristin (hematoxylinová metoda).....	48

Obrázek 22: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silychristin-19- <i>O</i> -sulfát (hematoxylinová metoda) .....	48
Obrázek 23: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilychristin (hematoxylinová metoda) .....	49
Obrázek 24: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin A (bathokuproinová metoda) .....	50
Obrázek 25: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin B (bathokuproinová metoda) .....	51
Obrázek 26: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin A-20-sulfát (bathokuproinová metoda) .....	52
Obrázek 27: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silybin B-20-sulfát (bathokuproinová metoda) .....	53
Obrázek 28: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity racemické směsi 2,3-dehydrosilybinu (bathokuproinová metoda) .....	54
Obrázek 29: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilybin-20- <i>O</i> -sulfát (bathokuproinová metoda) .....	55
Obrázek 30: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilybin-7,20- <i>O</i> -disulfát (bathokuproinová metoda) .....	56
Obrázek 31: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silychristin (bathokuproinová metoda) .....	57
Obrázek 32: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky silychristin-19- <i>O</i> -sulfát (bathokuproinová metoda) .....	58
Obrázek 33: Grafické zobrazení měď-chelatační aktivity látky 2,3-dehydrosilychristin (bathokuproinová metoda) .....	59

## 10 PŘEHLED TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení biogenních prvků.....	9
Tabulka 2: Vybrané potraviny s orientačním obsahem mědi <sup>[10]</sup> .....	14
Tabulka 3: Absorbance měďnatých iontů v čase 5 min.....	43

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Mgr. Martina Vítková

Vedoucí: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

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

Název rigorózní práce:

## ***In vitro* stanovení měď-chelatačních vlastností čistých látek izolovaných ze silymarinu**

Měď patří mezi mikroelementy. Je důležitá v řadě enzymatických reakcí, ovlivňuje krvetvorbu, metabolismus cukrů, tvorbu kostní hmoty a funkci nervového systému. Porucha homeostázy mědi v organismu vede k rozvoji Wilsonovy choroby, Menkesovy choroby, Alzheimerovy choroby nebo prionového onemocnění. Chelatační činidla váží na sebe nadbytečnou měď z tkání při chelataci.

Předmětem této rigorózní práce bylo *in vitro* stanovení účinnosti chelatace měďnatých a měďných iontů u vybraných čistých látek získaných ze silymarinu a některých sulfátů vznikajících jako metabolity v organismu. Testování bylo provedeno dvěma spektrofotometrickými metodami – pomocí hematoxylinu (k orientačnímu zjištění, zda je testovaná látka schopná chelatovat měď) a bathokuproinu (představuje více kompetitivní podmínky pro chelataci mědi) při různých hodnotách pH.

U hematoxylinové metody chelatovaly měďnaté a měďné ionty všechny testované látky. U bathokuproinové metody vykázaly nejvyšší chelatační účinek 2,3-dehydrosilybin A+B a 2,3-dehydrosilychristin.

**Klíčová slova:** silymarin, flavonolignany, měď, chelatace, hematoxylin, bathokuproin

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Mgr. Martina Vítková

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

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

Title of Thesis:

### ***In vitro* assessment of copper-chelating properties of isolated pure compounds from silymarin**

Copper is a trace element. Copper is important in many enzymatic reactions, for haemopoiesis, sugar metabolism, bone formation and for the nervous system. Disorder of copper homeostasis in organism will lead to Wilson disease, Menkes disease, Alzheimer's disease or Prion disease. Chelation agent binds redundant copper from tissues during chelation.

The subject of this thesis was to *in vitro* designate effectivity of chelation cupric and cuprous ions by selected pure compounds isolated from silymarin and sulphates which are arised in organism as a metabolite. I used two spectrophotometric methods – hematoxylin method (to detect if the compound chelate copper) and bathocuproin method (more competitive assay) at various pH levels.

All tested compounds chelated cupric and cuprous ions in hematoxylin method. 2,3-dehydrosilybin A+B and 2,3-dehydrosilychristin had the highest chelation effect in bathocuproin method.

**Keywords:** silymarin, flavonolignans, copper, chelation, hematoxylin, bathocuproin