

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky



INTERAKCE ALKALOIDŮ S PŘECHODNÝMI KOVY I.

INTERACTIONS OF ALKALOIDS WITH TRANSITION METALS I.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Kateřina Macáková, Ph. D.

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

V Hradci Králové dne

Poděkování

Velice ráda bych v první řadě poděkovala své vedoucí práce Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, vstřícnost, a především za cenné informace při zpracování diplomové práce a za rady při experimentálním měření v laboratoři, tvorbu grafů a poskytnutí materiálů k dané problematice.

Mé poděkování patří také celému kolektivu katedry Farmaceutické botaniky za jejich kolegiální, propůjčení laboratoře a za možnost naměření výsledků pro mou diplomovou práci. Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu SVV 260 412.

Obsah

Abstrakt	7
Abstract	8
1. Použité zkratky.....	9
2. Úvod.....	11
3. Cíl práce.....	13
4. Teoretická část.....	14
4.1. Měď.....	14
4.1.1. Měď jako chemický prvek.....	14
4.1.2. Měď jako stopový prvek.....	14
4.2. Funkce mědi v lidském těle.....	16
4.3. Metabolismus mědi.....	22
4.4. Toxicita mědi.....	23
4.5. Deficit mědi.....	25
4.6. Nemoci spojené s nadbytkem mědi.....	26
4.7. Nemoci spojené s nedostatkem mědi.....	27
4.8. Neurodegenerativní onemocnění spojené s mědí.....	28
4.9. Další onemocnění spojené s mědí.....	30
5. Chelatace mědi.....	32
6. Redukce mědi.....	34
7. Alkaloidy.....	35
8. Experimentální část.....	44
8.1. Materiál.....	44
8.1.1. Používané přístroje.....	44
8.1.2. Pracovní pomůcky.....	44
8.1.3. Používané chemikálie.....	44

8.1.4.	Testované látky.....	45
8.2.	Metody	47
8.2.1.	Příprava základních roztoků	47
8.2.2.	Kontrola připravených základních roztoků mědi.....	48
8.2.3.	Kalibrace měďnatých iontů	49
8.2.4.	Chelatace měďnatých iontů v pufru.....	50
8.2.5.	Chelatace měďných iontů v pufru	52
8.2.6.	Chelatace měďnatých iontů v DMSO	53
8.2.7.	Chelatace měďných iontů v DMSO.....	55
8.2.8.	Chelatace měďnatých iontů hematoxylinem v pufru.....	56
8.2.9.	Redukce měďnatých iontů v pufru	58
8.2.10.	Redukce měďnatých iontů v DMSO	59
9.	Výsledky	62
9.1.	Kalibrační křivka	62
9.2.	Měď-chelatující účinky alkaloidů	63
9.2.1.	Stanovení chelatace mědi pomocí HEM.....	63
9.2.2.	Stanovení chelatace mědi pomocí BCS	63
9.3.	Měď-redukující účinky alkaloidů	64
9.3.1.	Alkaloidy aporfinového typu	64
9.3.2.	Alkaloid morfinanového typu	66
9.3.3.	Alkaloidy pavinanového typu	67
9.3.4.	Alkaloidy spirobenzylisochinolinového typu	68
10.	Diskuze	70
10.1.	Měď-chelatační aktivita	71
10.2.	Měď-redukující aktivita	72
11.	Závěr	82

12.	Použitá literatura.....	83
13.	Seznam tabulek	91
14.	Seznam reakcí.....	91
15.	Seznam obrázků	91

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Radka Rzepecká

Školitel: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce alkaloidů s přechodnými kovy I.

Měď je jedním ze základních stopových prvků, který je nezbytný pro správnou funkci organismu. Měď je v lidském těle součástí mnoha enzymů, které ovlivňují nejrůznější metabolické procesy. Je důležité, aby hladina mědi v těle byla regulována, neboť její deficit nebo naopak nadbytek vede k nejrůznějším patologickým stavům.

Alkaloidy jsou sekundární metabolity rostlin, které se vyznačují četnými biologickými aktivitami. V této diplomové práci byla proměřena měď-chelatační a měď-redukční aktivita jedenácti isochinolinových alkaloidů: boldinu, isokorydinu, (+)-bulbokapninu, (+)-korydinu, glaucinu, (-)-sinoakutinu, (-)-kalifornidinu, (-)-escholtzinu, platycerinu, (-)-fumaricinu, a (+)-parfuminu. Aktivita alkaloidů byla proměřena při čtyřech (pato)fyzilogických hodnotách pH ověřenou spektrofotometrickou metodou s použitím dvou indikátorů: disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové a hematoxylinu. Na základě výsledků byly odvozeny vztahy mezi strukturou a účinkem.

Z naměřených výsledků vyplývá, že ani jedna z testovaných látek nevykazovala měď-chelatující účinky. Naopak měď-redukující aktivitu vykazovaly všechny testované látky. Ze vztahu mezi strukturou a aktivitou vyplývá, že s rostoucím počtem hydroxylových skupin ve skeletu alkaloidu měď-redukující aktivita roste. Nejvyšší aktivitu vykazoval alkaloid boldin, který ve struktuře obsahuje dvě hydroxylové skupiny. Naopak nejnižší aktivitu vykazovaly alkaloidy, které hydroxylovou skupinu v molekule postrádají (kalifornidin, escholtzin, glaucin).

Klíčová slova: alkaloidy, měď, chelatace, redukce

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Radka Rzepecká

Supervisor: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Title of Thesis: Interactions of alkaloids with transition metals I.

Copper is one of the essential trace elements that are necessary for the proper functioning of the organism. Copper is a significant component of many enzymes that affect various metabolic processes in the human body. It is important that the level of copper in the body is regulated because its deficit or excess lead to a variety of pathological conditions.

Alkaloids are secondary plant metabolites that are distinguished by numerous biological activities. In this thesis the copper-chelating and copper-reducing activity of eleven isoquinoline alkaloids was measured: boldine, isocorydine, (+)-bulbocapnine, (+)-corydine, glaucine, (-)-sinoacutine, (-)-californidine, (-)-escholtzine, platycerine, (-)-fumaricine, and (+)-parfumine. Alkaloid activity was measured at four (patho) physiological pH values by a verified spectrophotometric method using two indicators: bathocuproinedisulfonic acid disodium salt and hematoxylin. Based on the results, structure-effect relationships were derived.

The results show that none of the tested substances was able to chelate copper ions. In contrast, all the alkaloids show copper reducing activity. The structure-activity relationship suggests that as the number of hydroxyl groups in the alkaloid skeleton increases, its reducing activity increases. The highest activity shows alkaloid boldin, which contains two hydroxyl groups in the structure. On the other hand, the lowest activity show alkaloids which lack the hydroxyl group in the molecule (californidine, escholtzin, glaucin.)

Key words: alkaloids, copper, chelation, reduction

1. Použité zkratky

AD	Alzheimerova choroba (z angl. Alzheimer's disease)
AChE	Acetylcholinesteráza
AIDS	Z anglického Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATP	Adenosintrifosfát
ATP7A	Gen kódující adenosintrifosfatázu typu A u Menkesovy choroby
ATP7B	Gen kódující adenosintrifosfatázu typu B u Wilsonovy choroby
BCS	Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové
CNS	Centrální nervový systém
CTR1	Transportní protein (z angl. copper transporter 1)
CYP	Cytochrom
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	Transportní protein (z angl. divalent metal transporter 1)
DNA	Kyselina deoxyribonukleová (z angl. deoxyribonucleic acid)
DTPA	Kyselina diethylentriaminpentaoctová
D1	Dopaminový receptor 1
D2	Dopaminový receptor 2
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
HA	Hydroxylamin hydrochlorid
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě (z angl. high density lipoprotein)
HEM	Hematoxylin

LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. low density lipoprotein)
MAO-B	Monoaminoxidáza B
MD	Menkesova choroba (z angl. Menkes disease)
PD	Parkinsonova choroba (z angl. Parkinson's disease)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SOD	Superoxiddismutáza
TEPA	Tetraethylenpentamin
WD	Wilsonova choroba (z angl. Wilson's disease)

2. Úvod

Měď je jedním ze základních stopových prvků, který můžeme nalézt v lidském těle. Společně s železem a zinkem patří mezi tři nejdůležitější esenciální mikroprvky. Přestože se v lidském těle nachází v nepatrném množství (desítky mg), je zcela nezbytná pro správnou funkci všech fyziologických a biochemických procesů v lidském organismu. Je kofaktorem mnoha metaloenzymů jako např. monoaminoxidázy, superoxiddismutázy, feroxidázy, lisyloxidázy, cytochrom-c-oxidázy a dalších, které v těle zaujímají velmi důležitou roli. Tyto metaloenzymy vykonávají v organismu nejrůznější funkce, mezi které můžeme zařadit antioxidační aktivitu, účast při buněčném dýchání, biosyntézu neurotransmiterů, správnou pigmentaci, zesílení kolagenu a keratinu, ovlivnění hematopoézy a srážení krve. [1]

Pro správnou funkci organismu je důležité, aby byl zajištěn pravidelný a dostatečný příjem mědi v potravě. Stejně jako i u ostatních prvků je důležitá regulace hladiny mědi, neboť nerovnováha může vést k závažným zdravotním komplikacím. Nedostatek mědi není tak častý, avšak pokud nastane, dochází ke snížení aktivity kuproenzymů. [1] Můžeme se setkat také s vrozenou poruchou spojenou s deficitem mědi, tzv. Menkesova choroba. Na druhou stranu se můžeme setkat i s vyšší koncentrací mědi v organismu, která se v těle ukládá a působí toxicky, neboť katalyzuje vznik volných kyslíkových radikálů, které poškozují organismus vlivem oxidačního stresu. Stejně tak existuje i vrozené onemocnění spojené s nadbytkem mědi, tzv. Wilsonova choroba. Měď hraje roli i v dalších onemocněních, např. má význam u rakoviny, diabetu, kardiovaskulárních onemocněních a v neposlední řadě u neurodegenerativních onemocněních, jako je Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba. U pacientů s Alzheimerovou chorobou byla zjištěna zvýšená koncentrace mědi v mozku, která se podílí na vzniku oxidačního stresu a tvorbě volných radikálů prostřednictvím Fentonovy reakce, především hydroxylového radikálu, který je vysoce toxický a způsobuje další poškození neuronů, což vede k zhoršování nemoci. Podobně u Parkinsonovy choroby měď potencuje tvorbu volných radikálů, které poté interagují s proteiny a nukleovými kyselinami a vytváří komplex s α -synukleinem, čímž dochází k tvorbě tzv. Lewyho tělísek v mozku. Vzhledem k patologii obou onemocnění, jsou předmětem výzkumu sloučeniny, které by vykazovaly aktivitu antioxidační, tzn. zhašely singletové kyslíky a aktivitu chelatační, tzn. vytvářely by s mědí pevné komplexy, které by byly vyloučeny z organismu a tím by došlo ke snížení hladiny mědi v organismu. Z tohoto důvodu se tato diplomová práce zabývá

vybranou skupinou alkaloidů, u kterých byla proměřena jejich měď-chelatační a měď-redukční aktivita, jakožto potenciální možnost v léčbě daných onemocnění. [1, 2]

3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo změřit měď-redukující účinky a chelataci měďných a měďnatých iontů u vybraných alkaloidů. Konkrétně se jednalo o isochinolinové alkaloidy čtyř podskupin – aporfinové (boldin, isokorydin, bulbokapnin, korydin, glaucin), morfinanové (sinoakutin), pavinanové (kalifornidin, escholtzin, platycerin) a spirobenzylisochinolinové (fumaricin a parfumin). Alkaloidy byly proměřovány ve čtyřech prostředích s rozdílnými hodnotami pH (4.5, 5.5, 6.5 a 7.5). Na základě zjištěných výsledků a sestavených grafů bylo cílem odvodit vztahy mezi strukturou látek a jejich aktivitou.

4. Teoretická část

4.1. Měď

Měď je jedním z biogenních prvků, které můžeme nalézt v lidském organismu. Přítomnost mědi je v organismu nezbytná pro správnou funkci fyziologických procesů.

4.1.1. Měď jako chemický prvek

Měď je jedním z ušlechtilých kovových prvků, které nalezneme v periodické tabulce prvků. Chemická značka mědi je Cu, latinsky Cuprum. Patří do skupiny přechodných prvků 4. periody a I. B skupiny. Elektronová konfigurace mědi je $[Ar] 3d^{10} 4s^1$. Měď se může vyskytovat v široké škále oxidačních stavů (Cu^+ , Cu^{2+} , Cu^{3+}). [3] Nejčastěji se jedná o sloučeniny s oxidačním stavem Cu^+ nebo Cu^{2+} . [4] Ryzí měď se v přírodě nachází jen velmi vzácně. Nacházíme ji převážně ve sloučeninách, nejčastěji se jedná o sulfidy (např. chalkopyrit), oxidy (např. kuprit) a uhličitany (např. malachit). [5] Měď nacházíme také v organismech zvířat a také v lidském těle, proto se řadí mezi biogenní prvky.

Jedná se o ušlechtilý kov červenohnědé barvy, který je měkký, kujný a tažný. Vyznačuje se vysokou elektrickou a tepelnou vodivostí. [6] Hustota mědi je $8,94 \text{ g/cm}^3$. Na stupni tvrdosti podle Mohsovy stupnice má měď tvrdost 3. Je relativně dobře odolná vůči korozi na vzduchu. [3] Vlivem kyslíku, oxidu uhličitého a vzdušné vlhkosti se pokrývá tenkou vrstvou zeleného uhličitanu měďnatého $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$, který je známý pod názvem měděnka, která vytváří ochrannou vrstvu proti dalším procesům koroze. [5]

4.1.2. Měď jako stopový prvek

Měď je jedním z esenciálních stopových prvků, které nalezneme v lidském těle. [7] Měď v lidském těle můžeme nalézt ve dvou oxidačních formách (Cu^+ a Cu^{2+}). Většina mědi se nachází v druhém oxidačním stavu Cu^{2+} . [2] Stopové prvky, které ač nejsou nositeli energie, jsou nezbytnou složkou naší stravy. Stopové prvky tvoří v organismu jen 0,01 % všech atomů. [8] Nedostatek minerálů nebo stopových prvků může v těle vést k poruše základních fyziologických procesů a funkcí. Nedostatek nemusí být nezbytně spojován s nedostatečnou výživou, ale může se jednat o poruchu fyziologických procesů v organismu, např. špatné vstřebávání v důsledku poruchy motility gastrointestinálního traktu. [9]

Nejzastoupenějším stopový prvkem v lidském organismu je železo, na druhém místě je zinek a měď svou četností zaujímá třetí místo. [7] Jelikož se jedná o esenciální prvek, tzn. lidské tělo si jej neumí vytvořit, je nutné měď do těla dodávat pomocí vhodné potravy. Potraviny obvykle obsahují malé množství mědi, vyšší množství můžeme najít ve vybraných potravinách. V potravinách najdeme měď většinou navázanou do organických komplexů, nejčastěji se vyskytuje ve vazbě na aminokyseliny, peptidy a organické kyseliny. [10] Hlavními zdroji mědi v potravě jsou játra a jiné vnitřnosti, maso, mořské plody, ořechy, kakao, hrozny, pomeranče, jahody, maliny, borůvky, ovesné vločky, brambory, luštěniny, špenát apod. [7, 10, 11] (Tabulka 1)

Tabulka 1- Průměrný obsah Cu ve vybraných potravinách (v mg/kg) - převzato z [20]

Potravina	Průměrný obsah mědi v mg/kg
Mléko plnotučné	0,3
Sýr ementál	1,3
Vejsce	0,3
Fazole	10
Hrách	9
Kukuřičné zrno	2
Brambory	11
Hovězí a vepřové maso	1,5
Játra hovězí	36
Mrkev a špenát	0,8 a 5
Kapusta a rajčata	0,7 a 0,9
Mouka žitná	6
Mouka pšeničná hrubá	2
Ovesné vločky	7
Hříby	10

Průměrné množství mědi v organismu se pohybuje v rozmezí 80–100 mg. Přibližně 90 % mědi se nachází v tkáních a zbylých 10 % v plasmě a krevních elementech. Koncentrace mědi v lidském organismu není stálá. Závisí na věku, pohlaví, demografických podmínkách. Vyšší hladiny nalezneme u žen a nižší u mužů. Koncentrace se také zvyšuje u mužů s rostoucím věkem, ale k tomuto ději u žen nedochází. U mužů, kteří kouří naopak dochází k snižování koncentrace mědi. U mužů se koncentrace mědi v krvi pohybuje v rozmezí 0,614 až 0,970 mg/l. U žen se pohybuje v rozmezí 0,694 až 1,030 mg/l. [1] Demografické rozdíly jsou způsobeny rozdílným obsahem mědi v půdě a potravinách. Také se liší obsah v jednotlivých orgánech a tkáních. Nejvyšší koncentrace mědi dosahuje v játrech, která slouží jako depotní orgán, dále v mozku, centrální nervové soustavě, v ledvinách a srdci. [10, 12]

Denní spotřeba mědi se pro dítě uvádí 0,3 - 0,6 mg. U žen kolem 1,5 mg a u mužů kolem 2 mg. Zvýšená spotřeba mědi je u těhotných a kojících žen, kde denní spotřeba je kolem 2 mg. V tomto období v některých případech nelze požadované dávky dosáhnout jen mědi z potravy, proto se mědi doplňuje podáváním nutričních doplňků s vyšším obsahem mědi. [10]

4.2. Funkce mědi v lidském těle

Mědi nacházíme v každé buňce lidského těla. Jedná se o prvek, který je zcela nezbytný pro správnou funkci mnoha fyziologických a biochemických pochodů, které probíhají v lidském organismu. Její nedostatek nebo naopak nadbytek vede k poruchám základních funkcí a ústí v různá onemocnění. Mědi hraje důležitou roli v metabolických procesech člověka, a to především jako kofaktor celé řady metaloenzymů. Pro řadu metaloenzymů je přítomnost mědi zcela nezbytná, u jiných metaloenzymů je nepřítomnost mědi důsledkem snížení jejich aktivity. Podílí se na katalýze celé řady životně důležitých enzymatických procesů – buněčné dýchání, biosyntéza neurotransmiterů a peptidových hormonů, ochrana proti volným radikálům, zesílení kolagenu a keratinu. Dále je její přítomnost nezbytná pro homeostázu železa, kde ovlivňuje hematopoézu a podílí se na srážení krve. Podílí se také na angiogenezi, má význam při tvorbě vlasů, pigmentu, termoregulaci, účastní se imunitních reakcí a na úrovni CNS se podílí na tvorbě myelinu v nervové tkáni. [1, 2]

Příklady kuproenzymů, u kterých je mědi funkční komponentou, jsou cytochrom c oxidáza, lysyl oxidáza, ferroxidáza, superoxid dismutáza, tyrosináza, dopamin beta-

monoxygenáza, 2-furoát-CoA dehydrogenáza, diaminooxidáza, katechol oxidáza, D-galaktozooxidáza, L-ascorbatoxidáza, peptidylglycine monoxygenáza, flavonol-2,4-dioxygenáza, peptidylglycine monoxygenáza a mnoho dalších. [2] V následujícím přehledu je uveden přehled vybraných kuproenzymů a jejich charakteristika a funkce.

Cytochrom c oxidáza

Jedná se o enzymatický transmembránový komplex se složitou stavbou. Strukturně se skládá z 8–13 podjednotek, které obsahují hem a měďnaté ionty jako prostetické skupiny, které slouží jako tzv. redoxní centra. Prostetickými skupinami jsou zde dva hemy (α a α_3) a dvě měďnatá centra (Cu_A a Cu_B). [13] Cytochrom c oxidáza je lokalizována na vnitřní straně membrány mitochondrií. Svojí významnou funkci plní na konci dýchacího řetězce, kde dochází k redukci molekulárního kyslíku O_2 na vodu H_2O . [1] Další funkcí cytochrom c oxidázy je vytváření elektrochemického potenciálu, který je využíván mitochondriemi k vytvoření energie, která je poté skladována ve formě ATP. [2]

Předpokládá se, že cytochrom α a první atom mědi Cu_A slouží k přenosu elektronů, které jsou uvolněné při oxidaci železa z cytochromu c z oxidačního stavu Fe^{2+} na Fe^{3+} . Cytochrom α a první atom mědi Cu_A jsou součástí vazebného místa cytochrom c oxidázy pro cytochrom c. Úkolem cytochromu α_3 a druhého atomu mědi Cu_B je mezi sebe připoutat molekulu kyslíku a přenést na ni postupně čtyři uvolněné elektrony. Molekula kyslíku se do mitochondrie dostane difúzí z cytosolu. Vzniklý anion kyslíku O^{2-} je velmi nestabilní a okamžitě dochází ke vzniku vody pomocí okolních protonů. [14]

Lysyl monoaminooxidáza

Lysyl monoaminooxidáza je klíčovým enzymem, který se podílí na zesíťování proteinů pojiva. Je důležitý pro tvorbu a řetězení kolagenu a elastinu. [1] Lysyl monoaminooxidáza je enzym, který oxiduje substrát za zapojení kyslíku. Jako první dochází k deaminaci dvou lysinových zbytků, kde na místě dusíků vzniknou dvě aldehydové skupiny a ty poté spolu reagují. Přes řadu složitých reakcí vznikne cyklická pyridinová struktura podobná desmosinům elastinu. Tím, že dochází k vzniku příčných vazeb, získá kolagenní fibrila vysokou pevnost. Pomáhá udržovat integritu a pružnost pojivové tkáně v srdci a cévním systému. Podílí se při

výstavbě kostí, mineralizaci kostí. Má důležitý význam pro pevnost, pružnost a ohebnost vláknitých bílkovin pojivové tkáně. [2, 14]

Ferroidázy

Do této skupiny jsou řazeny dva enzymy obsahující měď, ceruloplasmin (feroxidáza I) a feroxidáza II, které katalyzují oxidaci železnatých iontů Fe^{2+} na ionty železité Fe^{3+} . Tyto dva enzymy jsou napojeny na protein transferin, který je zodpovědný za transport červených krvinek a za tvorbu krve. [2]

Ceruloplasmin je α_1 -glykoprotein o velikosti cca 130 kDa, který obsahuje šest atomů mědi. [15] Jde o metaloprotein modré barvy, který slouží jako transportní protein mědi v krvi. Přenáší až 90 % cirkulující mědi. Je zodpovědný za dodávání mědi do buněk a vylučování mědi z těla. [1] Fyziologická hodnota ceruloplasminu je 0,2 – 0,4 g/l (u těhotných žen až 0,85 g/l). [16] Je syntetizovaný především v játrech, v menší míře v makrofázích a lymfocytech. Jeho syntéza je ovlivněna hormony. Zvýšená estrogenní aktivita vede ke zvýšené hladině ceruloplasminu. V těhotenství může hodnota stoupnout až na trojnásobek. Zvýšený je také u žen užívající hormonální antikoncepci. [15]

Důležitou funkci ceruloplasmin plní v metabolismu železa a při jeho vazbě na transferin. Jde o jeho oxidázovou aktivitu, kdy katalyzuje oxidaci železnatých iontů Fe^{2+} na ionty železité Fe^{3+} . Díky této funkci spolupracuje s transferinem, který může přenášet ionty železa pouze v této formě. [2] Ceruloplasmin je také jedním z pozitivních reaktantů akutní fáze. Působí pravděpodobně jako ochranný faktor, který inhibuje účinek sérové histaminázy. [15, 17] Zvýšená hladina ceruloplasminu se vyskytuje během patologických stavů, jako je např. zánětlivý proces, některé infekce, neoplazie, leukémie a Hodgkinův lymfom. Snížené hladiny se naopak vyskytují během nefrotického syndromu, exudativní enteropatie a při malabsorpci. [16, 17, 18] Ceruloplasmin funguje také jako antioxidant. Účastní se likvidace volných radikálů z těla tím, že usnadňuje katalytické oxidační procesy při odstraňování volných radikálů. [2]

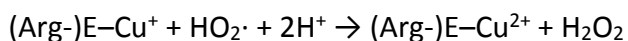
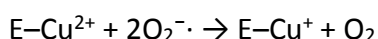
Superoxid dismutáza (SOD)

Superoxid dismutáza, známá také pod názvem hemokuprein nebo erytrokuprein, je kuproenzym, který působí jako antioxidant. Katalyzuje přeměnu superoxidových radikálů na méně toxický peroxid vodíku, čímž se podílí na ochraně organismu. Jedná se o nejčastěji se objevující radikály v organismech. [1, 2] Superoxidové radikály vznikají jedoelektronovou redukcí kyslíku. Vznikají při autooxidaci např. flavinů, hydrochinonů, katecholaminů, thiolů, tetrahydropterinů a hemoproteinů. K jejich vzniku také dochází při mnohých enzymatických reakcích, které probíhají v organismu, např. katalytickým účinkem xanthinoxidázy, lipoxygenázy, cyklooxygenázy a také při fotosyntéze v chloroplastech. Superoxidy samy o sobě příliš reaktivní a škodlivé nejsou, ale jejich nebezpečí spočívá v tom, že z nich mohou vznikat jiné mnohem škodlivější a reaktivnější formy kyslíku, jako např. hydroxylový radikál, peroxynitrit a další. Peroxid vodíku, který vzniká musí být dále také odstraněn. Je redukován jinými antioxidantními enzymy (katalázou a peroxidázami) na vodu. [19]

Existují tři formy SOD, které se mezi sebou liší kofaktorem. Kofaktorem je vždy atom kovu podílející se na katalytickém účinku enzymu.

- 1) Mn^{2+} SOD, jedná se o formu SOD, která má podjednotky o molekulové hmotnosti 23 kDa. Vyskytuje se ve formě dimeru nebo tetrametu. Každá podjednotka na sebe váže jeden atom kovu. [19]
- 2) Fe^{2+} SOD, jedná se o formu SOD, která má podjednotky o molekulové hmotnosti 23 kDa podobně jako forma Mn^{2+} SOD. Vyskytuje se v dimerické formě. Každá podjednotka na sebe váže jeden atom kovu. [19]
- 3) Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD, jedná se o formu SOD, která má celkovou molekulovou hmotnost 32 kDa. Vyskytuje se ve formě dimeru. Struktura se zcela odlišuje od struktur Mn^{2+} SOD či Fe^{2+} SOD, které si jsou velmi podobné. Každá podjednotka obsahuje oba atomy kovů. Měď slouží jako redoxní centrum a zinek vykazuje strukturální úlohu. [19]

Vlastní reakční mechanismus probíhá podle uvedeného schématu (Reakce 1):



Reakce 1- Přeměna superoxidových radikálů na peroxid vodíku – převzato z [19]

Atom Cu^{2+} je v molekule redukován první molekulou superoxidu na Cu^+ . Další molekula superoxidu je pak v protonizované formě (proton získá z argininu v blízkosti aktivního centra) schopna znovu zoxidovat Cu^+ na Cu^{2+} a regenerovat tak původní formu enzymu. V této druhé reakci dochází ke vzniku molekuly peroxidu vodíku. [19]

Aktivita toho enzymu je pro správný chod organismu zcela zásadní. Snížená aktivita $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD vede k těžkému postižení motorických neuronů v mozkové kůře, míše a vede k onemocnění, které je známo pod názvem amyotrofická laterální skleróza. Naopak zvýšená aktivita $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD je důsledkem celé řady tzv. onemocnění z volných radikálů, kdy zvýšená tvorba superoxidu vede k zvýšení syntézy enzymu. K tomu dochází např. u nemocných se sklerotickým postižením cév, revmatoidní artritidou, Alzheimerovou chorobou apod. [19]

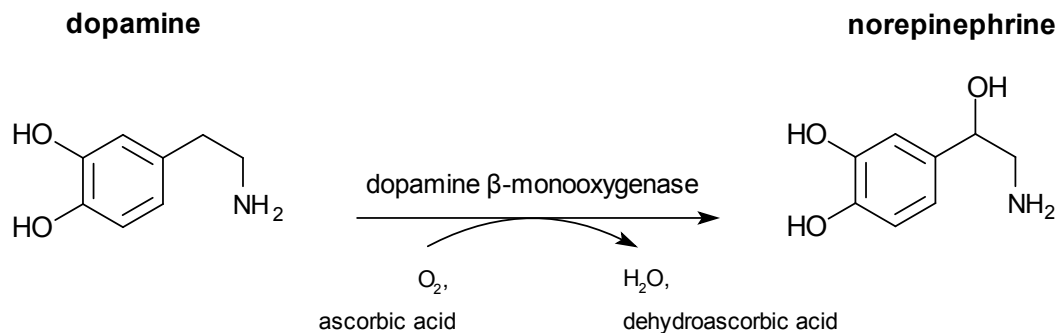
Tyrosináza

Tyrosináza je transmembránový kuproenzym, který je potřeba k tvorbě melaninového pigmentu. [1] Melanin hraje roli v pigmentaci vlasů, očí a kůže. [2] Je to směs nerozpustných eumelaninů a feomelaninů, které jsou společně s bílkovinou uzavřeny v melanocytech, které leží mezi buňkami bazální vrstvy epidermis. V cytoplazmě mají melanosomy, které tvoří pigment melanin. Tyrosinové metabolity jsou výchozími zdroji k tvorbě kožního a očního pigmentu melaninu. Syntéza melaninu začíná hydroxylací tyrosinu, který je vytvořen z aminokyseliny fenylalaninu, na dopu a dále oxidací na dopachinon. Oba tyto kroky katalyzuje enzym tyrosináza. [20, 21]

Nízká aktivita tyrosinázy vede k nedostatečné tvorbě melaninu, která je typická pro albinismus. Naopak vážným onemocněním způsobené nadprodukcí melaninu je melanoblastom. [20, 21]

Dopamin - β - monoxygenáza

Dopamin - β - monoxygenáza je kuproenzym, který je nepostradatelný při syntéze noradrenalinu a adrenalinu z neurotransmiteru dopaminu, který je jejich prekurzorem. [2] K této přeměně dochází v nadledvinkách. Aby tato přeměna proběhla, je nutná přítomnost čtyř základních substrátů: dopaminu, dopamin - β - monoxygenázy, kyseliny askorbové a kyslíku O_2 . [1] (Reakce 2)



Reakce 2- Syntéza noradrenalinu (norepinefrinu) z dopaminu – převzato z [22]

Krevní srážecí faktory V, VIII

Krevní srážecí faktor V, nazývaný také proakcelerin nebo labilní faktor, je protein koagulačního systému, který není enzymaticky aktivní, ale funguje jako kofaktor. [23] Vlivem působení trombinu je faktor V nejdříve aktivován a po delší expozici opět inaktivován. Aktivovaný faktor V (faktor Va) je kofaktorem faktoru Xa a spolu s vápenatými ionty Ca^{2+} a fosfolipidy aktivují faktor II (protrombin) na trombin (faktor IIa). Trombin poté štěpí cirkulující fibrinogen na fibrinové monomery, které spolu polymerizují a vytvářejí krevní sraženinu. [15]

Nedostatek faktoru V vede ke krvácivým stavům, které způsobují zvýšený sklon k trombóze. Mutace faktoru V, tzv. Leidenská mutace, je geneticky podmíněná záměna aminokyseliny argininu za glutamin v pozici 506 faktoru V. [15]

Krevní srážecí faktor VIII, nazývaný také antihemofilický faktor A, je protein koagulačního systému, který je stejně jako faktor V enzymaticky neaktivní a funguje jako kofaktor. Je syntetizovaný v játrech a v krvi cirkuluje v komplexu s Von Willebrandovým faktorem. Z této vazby se faktor VIII uvolní při kontaktu s negativně nabitými fosfolipidovými

povrchy a faktor VIII je aktivován na faktor VIIIa působením trombinu (faktor IIa) nebo faktoru Xa. Aktivovaný faktor VIIIa tvoří komplex s faktorem IXa. Poté v kombinaci s membránovými fosfolipidy a vápenatými ionty Ca^{2+} aktivuje faktor X na faktor Xa. [15, 23]

Dysfunkce faktoru VIII nebo jeho nedostatek se klinicky projevuje jako hemofilie A. Pro správný chod hemostázy je potřebná alespoň 25% koncentrace faktoru VIII. Jestliže hladina klesne pod 5 %, objevují se klinické příznaky (krvácení po lehčím poranění). U pacientů s hladinou mezi 1–5 % má choroba mírnější průběh, u pacientů s hladinou pod 1 % má choroba průběh těžký. [15] Existuje také určitá souvislost s hladinou faktoru VIII a krevním skupinovým systémem ABO. U jedinců s krevní skupinou 0 nalezneme nižší hladiny faktoru VIII než u jedinců s krevní skupinou A, B nebo AB. [23]

4.3. Metabolismus mědi

Metabolismus mědi je přísně koordinovaný proces, který probíhá na intracelulární i intercelulární úrovni. Zahrnuje procesy intestinální absorpce, distribuce, eflux z buněk a jeho vylučování žlučovými cestami. [1]

Denní příjem mědi se pohybuje okolo 2 – 5 mg. [2] Účinnost vstřebávání se pohybuje v rozmezí 12 – 50 % z obsahu mědi v potravě. [7] Absorpce mědi závisí na chemické formě, ve které se měď vyskytuje. Jestliže se nachází ve vysoce rozpustných sloučeninách mědi, poté se vstřebává snadno. Naopak jestliže jsou přítomny faktory, které inhibují absorpci mědi na úrovni střevního lumen, dochází k snížení její celkové biologické dostupnosti, a to vede k snížení její intraluminární rozpustnosti nebo dochází ke kompetitivní interakci s transportním proteinem mědi přes sliznici. [1] Mezi složky, které negativně ovlivňují absorpci mědi patří: vláknina, fytát, vitamín C, fruktóza, železo, zinek, kadmium. Poslední dva uvedení zástupci patří mezi nejsilnější kompetitivní inhibitory mědi. Tyto složky ovlivňují absorpci jen když jsou přijímány ve vysokých dávkách (vláknina >50 g/den, vitamín C > 1500 mg/den). Při příjmu normálního množství není vstřebávání mědi ovlivněno. Naopak při příjmu vysokého množství bílkovin (> 100 g/den) se biologická dostupnost mědi zvyšuje. [1, 7]

Měď je vstřebávána hlavně v horní části duodena a z menší části v žaludku. V této části je vstřebáno 10 – 50 % mědi. [7] Vstřebávání v tenkém střevě probíhá buď difúzí nebo pomocí transportních proteinů 1-DMT1 nebo 1-CTR1. Protein 1-DMT1 je bivalentní kovový

transportér, který váže železo a jiné bivalentní kovy, mezi které patří např. měď a mangan. Afinita mědi k tomuto transportéru je relativně nízká. Protein 1-CTR1 je specifický transportér pro Cu^{2+} ionty a hraje klíčovou roli v procesu absorpce. [1] Po vstupu mědi do buňky stěvní sliznice se váže na bílkovinu metalothionein, která reguluje rychlost transportu mědi z buněk do vnitřního prostředí. [7] O vazbu na tuto bílkovinu měď soutěží se zinkem a jestliže je na bílkovinu navázána, je transportována do krve. V krvi je měď vázána na krevní bílkoviny, především na albumin, kde je vázána přes aminodusík a imidazolový dusík histidinu. Dále může být vázána na transkuprein a nízkomolekulární ligandy. Takto vázaná měď je rychle vychytávána játry a v menší míře ledvinami. [7] V játrech je buď zabudována do jaterních enzymů, nebo je zabudována do ferroxidázy ceruloplasminu. Měď, která je vázána na ceruloplasmin je uvolňována do krve a přenášena k buňkám, které na svém povrchu obsahují specifické receptory pro ceruloplasmin. Po navázání na tyto specifické receptory je měď z vazby uvolněna a vstupuje do buněk. [7] Ceruloplasmin uvolňovaný do krevní plazmy oxiduje plazmatické železnaté ionty Fe^{2+} na ionty železité Fe^{3+} . Ceruloplasmin váže přibližně 93 % plazmatické mědi. Do tkání je z ceruloplasminu uvolňováno jen malé množství mědi. Ceruloplasmin, který je již opotřebovaný je v játrech odbourán a působením P-tytu ATPázy ATP7B je měď pevně navázána na proteiny a je vylučována především žlučí do gastrointestinálního traktu (70 %) a poté odchází stolicí ven z těla. Žlučí se vylučuje ve formě špatně vstřebatelných komplexů. Zbýlých 30 % je buď neabsorbovaná měď nebo měď z deskvamačních slizničních buněk. Menší množství mědi může být znovu reabsorbováno ve střevě. Denně se stolicí vyloučí přibližně 1,2 mg mědi. Menší část je vyloučena močí, kdy je vyloučeno pouze 1 – 2 % absorbované mědi. [1, 7, 24, 25, 26]

4.4. Toxicita mědi

Přestože je měď nepostradatelným esenciálním prvkem lidského organismu, může být také potenciálně nebezpečná a její nerovnováha může vést k celé řadě zdravotních problémů. S akutní a chronickou intoxikací se setkáváme relativně zřídka, jde hlavně o důsledky nehody, pracovního úrazu, znečištění životního prostředí nebo vrozené metabolické poruchy. [1]

Akutní expozice

Denní příjem mědi se pohybuje okolo 2 – 5 mg, což několikanásobně převyšuje doporučenou denní dávku. [2] Taková dávka mědi však není pro tělo toxická a tělo se s ní dokáže vypořádat. Problém může nastat, když je měď přijímaná ve velmi vysokém množství, např. při požití nad 250 mg mědi současně, poté se měď projevuje jako tzv. kovový jed, který vyvolává vážné zdravotní problémy, podobně jako jiné těžké kovy (rtuť, olovo). Tato dávka nevratně zastavuje působení jinak prospěšných a důležitých enzymů. [27] K akutní otravě mědi může dojít také při pití většího množství pitné vody, která je kontaminovaná vysokým obsahem mědi (3 – 6 mg/l) nebo při vdechování mědi ve formě aerosolu nebo jemného prachu. [1, 7] Je však důležité si uvědomit, že každý člověk je individuální a hranice množství přijaté mědi se u každého může lišit. U některých citlivějších jedinců, může být funkce nenávratně poškozena i při dávce 10 mg. [27] Světová zdravotnická organizace WHO dospěla k závěru, že smrtelná perorálně podaná dávka solí mědi je přibližně 200 mg mědi na kilogram tělesné hmotnosti. [28]

Nadbytek mědi se projevuje zvracením, průjmy, podrážděním žaludku, nevolností, křečemi, bolestmi hlavy, tachykardií, respiračními obtížemi, hemolytickou anémií, masivním gastrointestinálním krvácením. Nejvíce jsou poškozeny játra a ledviny, kde může dojít k nenávratnému poškození. [1, 27]

Chronická expozice

Chronická otrava může být vyvolána pitím pitné vody s vysokým obsahem mědi (měděné vodovodní potrubí) nebo jídlem připravovaným v měděném nádobí. Chronický nadměrný přísun mědi se v první řadě projevuje iritací zažívacího traktu se zvracením a průjmy. Následné vysoké koncentrace mohou vést až k jaterní cirhóze s epizodami hemolýzy a poruchami imunitního systému. [7] Mezi doprovodné příznaky chronické intoxikace patří poškození renálních tubulů, mozku a dalších orgánů. Poškození může být až v takové míře, že postupuje až do kómatu, jaterní nekrózy, cirkulačního kolapsu až k smrti. [1] K ukládání mědi dochází, jestliže dieta dlouhodobě obsahuje 200 – 500x více mědi, než je její doporučená denní dávka. [7]

Existuje také genetická porucha metabolismu mědi, tzv. Wilsonova choroba, při které se v těle vyskytuje nadbytek mědi (viz. kapitola 4.6.).

4.5. Deficit mědi

S klinicky závažným nedostatkem mědi se u člověka setkáváme velmi zřídka. Pestrá strava, kterou člověk přijímá, zcela pokryje denní potřebu. Příčina nedostatku může být buď v nedostatečném dietním příjmu mědi (tzv. primární nedostatek mědi) nebo z nedostatečné absorpce přijaté mědi (tzv. sekundární nedostatek mědi). [1] Jak již bylo výše zmíněno, existují některé složky potravin, které mohou absorpci mědi snížit tím, že soutěží s vazebným místem na proteinu (zinek, kadmium, vitamín C atd.) Existují skupiny lidí, u kterých se s potenciálním rizikem nedostatku mědi můžeme setkat. Mezi takové skupiny patří např. novorozenci s nízkou porodní váhou, kojenci vyživovaní nevhodnou umělou výživou (např. kravským mlékem), podvyživené děti, těhotné a kojící matky, pacienti odkázání na totální parenterální podávání výživy, jedinci s poruchou vstřebávání živin nejrůznějšího původu (např. syndrom malabsorpce), diabetici, alkoholici, pacienti s AIDS, vegetariáni a vegani. [1, 5, 26]

Mezi příznaky nedostatku mědi v organismu patří poruchy srdečního rytmu, těžká únava, malátnost, vysoký krevní tlak, třesavka, horečka, bolesti hlavy, anémie, leukopenie, neutropenie, abnormality kostní dřeně, osteoporóza, lámavé vlasy a kosti, zvýšená hladina LDL-cholesterolu (naopak hladina HDL-cholesterolu je snižena), poruchy pigmentace, poruchy chuti, poruchy mozkových funkcí, zpomalení mentálního vývoje, poruchy růstu, zvýšená náchylnost k infekcím, snížená tvorba inzulinu a porucha glukozové tolerance. [1, 7, 27] Deficit mědi v těhotenství může vést k závažným strukturálním malformacím, neurologickým a imunologickým abnormalitám u potomků. [1]

Existuje také vrozená porucha metabolismu mědi, tzv. Menkesova choroba (viz. kapitola 4.7.).

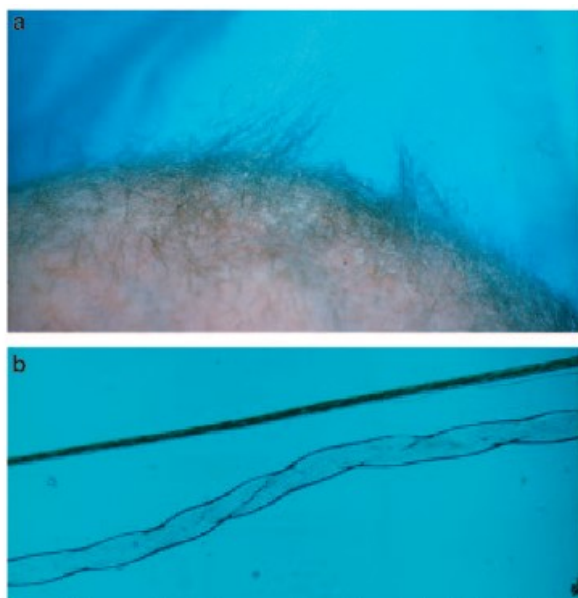
4.6. Nemoci spojené s nadbytkem mědi

Mezi vrozené poruchy, které jsou spojené s nadbytkem mědi patří Wilsonova choroba (WD). Wilsonova choroba neboli hepatolentikulární degenerace je dědičná, autozomálně recesivní porucha způsobená mutací genu ATP7B v oblasti 13. chromozomu (13q14.3), který je zodpovědný za změnu v transportu mědi, za poruchu exkrece mědi žlučí a za inkorporaci mědi do ceruloplasminu. [16, 29] Dochází k sníženému vylučování mědi do žluči a v důsledku toho se volná měď hromadí primárně v játrech a sekundárně v mozku, ledvinách. [16, 29] K manifestaci onemocnění dochází především v období pozdní adolescence a časně dospělosti (mezi 15. – 25. rokem života). Incidence nemoci se odhaduje na 1/30 000. [29] Existuje několik forem nemoci. Nejčastější je neurologická forma, jaterní forma a vzácně psychiatrická forma. [30] Projevy se liší dle jednotlivých forem. Mezi projevy můžeme zařadit akutní hepatitidu, jaterní cirhózu, změny chování, změny osobnosti, poruchy nálad, úzkosti, maniodeprese, třes, zhoršení řeči. Mezi další příznaky choroby můžeme zařadit ledvinové kameny, hemolytickou anémii, endokrinologické poruchy, osteoporózu, kataraktu a Kayser-Fleischerův prstenec. [16, 29, 30] Kayser-Fleischerův prstenec je typickým projevem ukládání mědi v rohovce. Jde o hnědozlatý nesouvislý prstenec, který je těžko pozorovatelný pouhým okem. [29]

Možností, které se využívají při léčbě Wilsonovy choroby je více. V terapii se užívá medikamentózní léčba, která vede ke zvýšenému vylučování mědi močí nebo stolicí. Farmakoterapie musí být podávána trvale a nesmí být přerušena. [29] První látkou, která se využívá je penicilamin. Penicilamin je chelatační činidlo, které pomocí tvorby chelátu s mědí odstraňuje reverzibilní depozita mědi z tkání. Nevýhodou penicilaminu je častý výskyt vedlejších účinků. Alternativou při léčení Wilsonovy choroby je podávání zinku. Zinek v buňkách střevní sliznice indukuje syntézu metalothioneinu, který s vysokou afinitou váže měď. Dochází ke snížení resorpce mědi ze střeva a zvýšenému vylučování mědi stolicí. [29] V porovnání s penicilaminem je zinek lépe snášen a minimálně se objevují závažné vedlejší účinky. [29, 31] Další možností, která se využívá v léčbě je chirurgická léčba transplantací jater. Důležitou součástí léčby je také snížení obsahu mědi v potravinách a pitné vodě. [29] Díky účinné terapii je prognóza pacientů dobrá. [29, 31]

4.7. Nemoci spojené s nedostatkem mědi

Mezi vrozené poruchy, které jsou spojené s deficitem mědi patří nejzávažnější forma nemoci Menkesova choroba (MD) a její nejmírnější forma tzv. occipital horn syndrome. [32] Většina pacientů vykazuje klasickou závažnou formu nemoci, u 10 - 15 % pacientů jsou pozorovány mírnější fenotypy. [31] Incidence této vzácné poruchy je přibližně 1/300 000. [32] Menkesova choroba, známá také pod názvy trichopoliodystrophia, „kinky-hair“ syndrom, je recesivně dědičná, multisystémová, letální choroba, která je vázána na chromozóm X. [16] Je narušen metabolismus mědi, který je způsoben mutací genu ATP7A. [32] Mutace vede k neschopnosti střevních buněk přenášet měď přes serózní membránu do krevní cirkulace a v důsledku toho se do enzymů inkorporuje pouze malé množství mědi. Mezi enzymy, které jsou postiženy patří např. dopamin – β – hydroxyláza, cytochrom c oxidáza, ceruloplasmin, superoxid dismutáza, tyrosináza atd. [16] Klinické projevy jsou důsledkem snížené aktivity těchto enzymů, ve kterých měď hraje důležitou roli. Onemocnění je charakterizováno těžce opožděným mentálním vývojem a růstem, skorbutickými změnami na kostech, zvracením, průjmy, sníženým svalovým tonusem, suchou kůží se šupinatou seboreickou dermatitidou. [16, 32] Charakteristickým znakem jsou vlasy, které mají vzhled tzv. pili torti (Obrázek 1). Vlasy jsou depigmentované, mají vzhled jako ocelová vlna a vlasová pochva je zkroucená („kinky“ nebo „steely hair“). [30]



Obrázek 1 - Charakteristické vlasy u pacientů s Menkesovou chorobou – převzato z [32]

Occipital horn syndrom, je charakterizován především odchylkami v tkáních s minimálním vlivem na neuropsychomotorický vývoj. Projevuje se postižením kostí, deformitami a exostózami, které se objevují především v oblasti okcipitálních úponů paraspinálních svalů (odtud pojmenování occipital horn). [31, 32]

Prognóza nemoci je vesměs nepříznivá, jelikož neexistuje léčba, která by nemoc zcela vyléčila. Léčba je především symptomatická a spočívá v parenterálním podávání mědi. Postižení umírají obvykle do tří let od narození. [31]

4.8. Neurodegenerativní onemocnění spojené s mědí

Nerovnováha některých kovových iontů (zejména Zn, Cu a Fe), hraje důležitou roli v progresi neurodegenerativních onemocněních, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, multisystémová atrofie, amyotrofická laterální skleróza a Creutzfeldt – Jakobova nemoc. Alzheimerova a Parkinsonova choroba jsou nejčastějšími s věkem související neurodegenerativní onemocnění, které souvisí s poruchou homeostázy zinečnatých Zn^{2+} a měďnatých Cu^{2+} iontů. [33]

Alzheimerova choroba (AD)

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění, které je charakterizováno progredujícími poruchami kognitivních funkcí, které jdou doprovázeny degenerací synapsí a značnými ztrátami neuronů v mozkové kůře a cholinergních bazálních jádrech. [33] V patologii této nemoci najdeme dvě základní charakteristiky. Dochází k vytváření senilních amyloidních plaků, okolo kterých dochází k postupnému odumírání neuronů. Jedná se o ložiska, kde došlo k vysrážení β -amyloidu. V těchto amyloidních placích byly naměřeny zvýšené koncentrace Cu, Zn, Fe. Dochází zde k interakci těchto kovů s β -amyloidním proteinem, což má za následek zvýšenou akumulaci a toxicitu tohoto peptidu. Druhou změnou jsou neurofibrilární klubka, kde dochází k vzniku abnormálního hyperfosforylovaného τ -proteinu. [33, 34, 35]

Pro pacienty s alzheimerovou chorobou je charakteristická snížená hladina mědi v mozku oproti zdravým jedincům, a naopak vyšší hladina mědi v séru (měď v plazmě nevázaná na ceruloplasmin). Zvýšené riziko vzniku alzheimerovy choroby je v přítomnosti

mutace genu ATP7B, podobně jako u Wilsonovy choroby. Pokud by to tak bylo, mohly by se k léčbě Alzheimerovy choroby používat chelatační látky, jako u Wilsonovy choroby. V minulosti se testovala léčba penicilaminem, který vytváří s mědí komplexy, které jsou poté vyloučeny močí z těla ven. Při léčbě bylo během 24 hodin vyloučeno více než 200 µg mědi, což je pětinasobně vyšší hodnota než při normálním vylučování. Avšak u některých pacientů docházelo k iatrogennímu zhoršení s neurologickými příznaky, které vznikly v důsledku redistribuce mědi a její zvýšené hladiny v mozku a krvi. Z tohoto důvodu byla léčba přerušena. [36]

Na chelátory, které by se v léčbě daly použít jsou kladeny velmi vysoké požadavky, např. jejich schopnost procházet mozkovou bariérou, nízká toxicita, jejich specifita. [37] V současnosti se výzkum soustředí na vývoj specifických chelátorů, u kterých by se omezily toxické vedlejší účinky. Mezi chelátory můžeme zařadit např. pyrolidin-dithiokarbamat, pyridinové deriváty, deriváty redukované Schiffovy báze, bis(hydrazid), bis(thiosemikarbazon), kliočinol a další deriváty 8-hydroxychinolinu. Ze studie vyplývá, že selektivita pro chelataci mědi se zvyšuje při použití tetradentát 2,2'-bis (8-aminochinolinu) ve srovnání s bidentátem 8-OH-chinolinu. V současné době se v terapii AD využívají 4 inhibitory acetylcholinesterázy (AChE) a Memantin, což je antagonist N-methyl-D-aspartátového receptoru. [37]

Parkinsonova choroba (PD)

Parkinsonova choroba je druhá nejčastěji se objevující neurodegenerativní porucha, která je spojena s rostoucím věkem. [33] Je spojena s úbytkem nervových buněk v substantia nigra, které jsou zodpovědné za produkci dopaminu. Klinicky je charakterizována čtyřmi základními příznaky, kterými jsou klidový třes, svalová rigidita, pomalý pohyb (bradykineze, akineze) a poruchami v držení těla (nestabilita). Kromě výše zmíněných příznaků pacienti vykazují autonomní dysfunkce, kognitivní abnormality, poruchy spánku, nálady. [38] V pokročilejší fázi se pacienti stávají závislími na pomoci ostatních při každodenních činnostech, jako je oblékání, krmení apod. Etiologie nemoci není přesně známá, ale podle nejnovějších studií hrají měďnaté a železité ionty v její etiologii určitou roli. U Parkinsonovy choroby má měď dvě role. Jako první je volná měď spojena se schopností iniciovat nebo dokonce potencovat tvorbu volných radikálů, jako katalyzátor ve Fentonově reakci, při které se relativně stabilní peroxid vodíku přemění na vysoce reaktivní hydroxylový radikál, který

poté reaguje s proteiny a nukleovými kyselinami. [39] Pro průběh Fentonovy reakce je důležité, aby měď fungovala jako katalyzátor musí se vyskytovat v oxidačním stavu +I a musí být volná. [38] Měď se také účastí oligomerace α -synukleinu a tvorby tzv. Lewyho tělísek, kde se předpokládá, že dochází k tvorbě komplexu mezi ionty mědi a cytosolickým proteinem α -synukleinem. [38, 40] Za druhé je měď kofaktorem důležitých antioxidačních enzymů, např. $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD, která oxidační stres redukuje. [39] U pacientů s Parkinsonovou chorobou jsou hladiny mědi v substantia nigra a jádru caudate snižené, a naopak je zde zvýšený obsah železa. [38]

Současná terapie, která spočívá v podávání dopaminového prekurzoru levodopy, agonistů dopaminu (např. pramipexol, bromokriptin), inhibitorů MAO B (selegilin) poskytují pouze symptomatickou úlevu. Nyní neexistuje žádná léčba, která by chorobu modifikovala. [38]

4.9. Další onemocnění spojené s mědí

Vzhledem k tomu, že měď, jak již bylo výše zmíněno se účastní oxidačního stresu v organismu, dá se předpokládat její vliv v mnoha různých patologických onemocnění, mezi která můžeme zařadit kardiovaskulární onemocnění, rakovinu, diabetes mellitus a také nemoci zmíněné již výše. [41]

Mezi jednu z hlavních příčin kardiovaskulárních onemocnění je řazena ateroskleróza, což je multifaktoriální onemocnění cévních stěn, při kterém dochází k ukládání lipidových plátů v subendoteliálním prostoru cévy. Jelikož měď se podílí na oxidačním stresu organismu vyvolaném reaktivními radikály, hraje také důležitou roli v kardiovaskulárních onemocněních, mezi které můžeme zařadit právě aterosklerózu, ischemickou chorobu srdeční, hypertenzi, kardiomyopatii, srdeční hypertrofii a městnavé srdeční selhání. Je silným katalyzátorem oxidace LDL cholesterolu a může být zapojena do modifikace LDL v aterogenní formu. U pacientů s hypertenzí byly nalezeny zvýšené hodnoty superoxidového radikálu a peroxidu vodíku, což odpovídá teorii, že oxidační stres vyvolaný reaktivními radikály hraje zásadní roli v patogenezi hypertenze. [41]

Měď má cytotoxické a genotoxické účinky na lidské buňky, je tedy schopna produkovat reaktivní radikály, které můžeme spojit s tvorbou tumorů na různé úrovni. Reaktivní radikály mohou způsobit jednovláknové nebo dvouvláknové zlomy, modifikace na purinových,

pyrimidinových a deoxyribosových bazích. Takové poškození DNA může vést k různým abnormalitám, které mohou být spojeny s karcinogenezí. Měď je tedy kofaktorem základních procesů, které mohou vést k angiogenezi tumoru. [41] U mnoha typů lidských tumorů byly v rakovinné tkáni nalezeny extrémně zvýšené hladiny mědi, jako příklad můžeme uvést lymfom, bronchogenní a hrtanové skvamocelulární karcinomy, karcinom děložního hrdla, prsu, žaludku a také karcinom plic. [42, 43] Zvýšená hladina mědi v séru také korelovala se stádiem a progresí nemoci u pacientů s kolorektálním karcinomem a karcinomem prsu. [43] Existuje hypotéza, že hladina mědi v séru může sloužit jako biomarker recidivy karcinomu a může na ni být měřena účinnost léčby. Naproti tomu, hladiny zinku, železa a selenu jsou u pacientů s rakovinou často nižší. [43] Nicméně prokazatelná souvislost mezi zvýšenou hladinou mědi a výskytem rakoviny nebyla nikdy potvrzena.

Diabetes mellitus (DM) je heterogenní chronické metabolické onemocnění, které se projevuje především hyperglykemií a glykosurií. DM můžeme rozdělit do tří základních skupin: gestační diabetes, který zjistíme poprvé v průběhu těhotenství, DM 1. typu, který je imunitního původu a DM 2. typu, na jehož vzniku se podílí mnoho faktorů, mezi které můžeme zařadit nezdravý životní styl, nedostatek fyzické aktivity, kouření atd. [44] Další možnou příčinou jeho vzniku je nedostatek nebo nevyváženost základních stopových prvků, které se účastní základních enzymatických procesů a mohou způsobit zhroucení antioxidantního systému a glukózovou intoleranci. Můžeme mezi ně zařadit měď, chrom, selen, vanad, zinek. [44] Oxidační stres v organismu působí na mnoha úrovních a může také poškodit β -buňky pankreatu. Jedná se o buňky slinivky břišní produkující hormon inzulin, který snižuje obsah glukózy v krvi. Nedostatek inzulinu, nebo jeho nedostatečný účinek vede k DM. β -buňky jsou vysoce citlivé na reaktivní formy kyslíku a dusíku, které mohou interagovat se substráty, které jsou zapojeny do inzulinové rezistence. [41] Mezi substráty můžeme zařadit např. dekarboxylázu kyseliny glutámové, což je hlavní antioxidant β -buněk, dále AMP-aktivovaná protein kináza a další signální molekuly. Aktivace signálních molekul může inhibovat transport glukózy, což vede k vzniku inzulinové rezistence. [45] Studie, které hodnotily enzymatické a neenzymatické markery oxidačního stresu v souvislosti s diabetem ukázaly, že aktivita superoxid dismutázy a peroxidace lipidů byla vyšší u diabetiků oproti zdravým pacientům. Celkově u pacientů s DM byly naměřeny vyšší hladiny mědi oproti zdravým kontrolám. [41]

5. Chelatace mědi

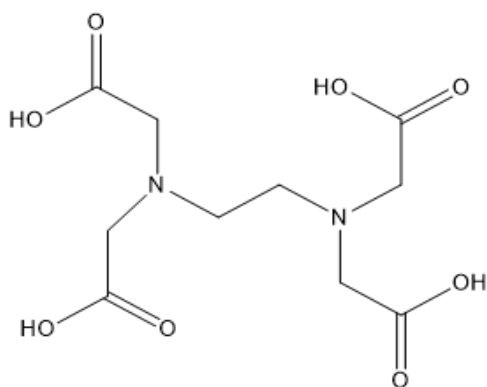
Chelatace je fyzikálně chemický proces, při kterém dochází k tvorbě vazeb mezi dvěma a více samostatnými vazebnými místy ligandu a jedním centrálním atomem. [46] Nejčastěji jde o vazbu organické sloučeniny na kationt kovu (měď, železo, vápník, atd). Při chelataci v lidském organismu dochází k tvorbě komplexu, který je poté z organismu vyloučen. [47] Termín je odvozen z řeckého výrazu chelé, které znamená klepeto. [46]

Chelatační látky jsou využívány v široké škále oborů. Pro nás je důležitý jejich význam v medicíně, kde se využívají ke zlepšení stavů, při kterých je organismus přetížen mědí nebo kdy dochází k akumulaci mědi v organismu. Klinicky používané chelátory se zaměřují na odstranění mědi nebo omezení její biologické dostupnosti. [48] Příkladem onemocnění, kde bylo využití chelátorů mědi úspěšné, je Wilsonova choroba, při které dochází k ukládání mědi v organismu. [48] Dalším příkladem použití chelátorů mědi je při léčbě Alzheimerovy choroby. U pacientů s Alzheimerovou chorobou nacházíme vyšší hladiny mědi v plazmě a nižší hladiny v mozku. Distribuce mědi v mozku je nevyvážená, protože v amyloidních placích se naopak vyskytuje zvýšené množství mědi. K léčbě se využívá kliočinol, který odstraňuje měď a zinek z amyloidních plaků. [49, 50] Chelatační terapie se také užívá při otravách toxickými kovovými ionty (např. olovem). Chelátory vážou toxické kovové ionty k sobě a vznikají složité struktury, které se snadno vylučují z těla (příkladem chelátoru je 2,3-dimerkaprol). [47, 48] Dále se chelatační látky využívají při odstranění železa při hemochromatózách. [48]

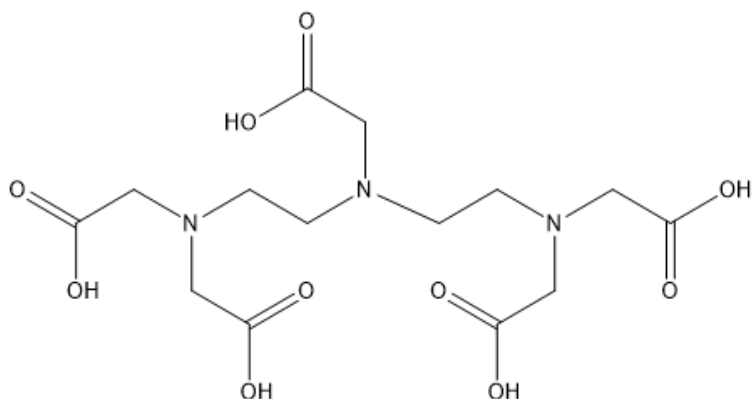
Chelatační látky využívané v terapii musí splňovat určitá kritéria. Musí mít vysokou afinitu pro toxický kov, nízkou afinitu k základním kovům, minimální toxicitu, musí být rozpustné v lipidech a musí být dobře absorbovatelné z gastrointestinálního traktu. Zatím neexistuje žádné chelatační činidlo, které by všechna požadována kritéria splňovalo. [47] Sloučeniny, které jsou zkoumány pro chelatační aktivitu, musí být navrženy tak, aby tvořily stabilní komplexy s ionty kovu (mědí). Je potřeba znát jejich chemickou strukturu. Znalost struktury vede k analýze interakce mezi ligandem a mědí. Podle toho jsou vybírány sloučeniny, které jsou využity k chelatační terapii. Např. ionty mědi preferují různé vazebné strukturální skupiny podle toho v jakém oxidačním stavu se vyskytují. Měď v oxidačním stavu Cu^+ tvoří komplexy s tetrahedrální, trigonální nebo lineární geometrickou strukturou. Měď v oxidačním stavu Cu^{2+} tvoří komplexy s čtvercově-rovinnými, trigonálními a čtvercovými pyramidami. [49]

Existují také chelátory mědi, které jsou schopné změnit oxidační stav mědi z Cu^{2+} na Cu^+ . Jak již bylo popsáno výše, proteiny, které se váží na Cu^{2+} se liší od proteinů, které váží Cu^+ . Jedním z potenciálních účinků chelátoru mědi je odstranit protein mědi Cu^{2+} z jednoho místa, převést ho na stav Cu^+ a poté ho přenést na protein, který tento oxidační stav mědi váže. Příkladem takového chelátoru je např. neocuproin, bathocuproin. [49]

Příklady využívaných chelátorů mědi, které mají vysokou afinitu k Cu^{2+} , jsou kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Obrázek 2) a kyselina diethylentriaminpentaoctová (DTPA) (Obrázek 3). Dalšími látkami jsou trientin, tetraethylenpentamin (TEPA), D-penicilamin, tetrathiomolybdenan, kliočinolin, neocuproin, bathocuproin a další. [49]



Obrázek 2- Vzorec kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA)



Obrázek 3- Vzorec kyseliny diethylentriaminpentaoctové (DTPA)

6. Redukce mědi

Redoxní reakce neboli oxidačně-redukční reakce jsou základními reakcemi mnoha biochemických cest v lidském organismu. Oxidace je chemická reakce, při které dochází ke ztrátě elektronů a ke zvyšování oxidačního čísla. Redukce je naopak reakce, při které dochází k získání elektronů a ke snižování oxidačního čísla. Oxidačním činidlem je chemická sloučenina, která může přijmout elektron. Redukčním činidlem je chemická sloučenina, která elektrony daruje. Oxidace a redukce probíhají vždy současně, jeden prvek se redukuje za oxidace prvku druhého. [51]

Přibližně 90 % mědi se v organismu vyskytuje ve formě vázané na proteiny nebo peptidy (ceruloplasmin, sérový albumin). [1] Zbývá měď se vyskytuje jako volná a můžeme ji nalézt ve dvou základních oxidačních stavech. Většina se nachází ve formě měďnatým iontů Cu^{2+} , protože v přítomnosti kyslíku se nestabilní měď v oxidačním stavu Cu^+ snadno oxiduje na ionty měďnaté Cu^{2+} . [52] Oxidace mědi je reverzibilní, protože v přítomnosti silných redukčních činidel se může redukovat zpět na měďné ionty. Mezi taková redukční činidla, která jsou schopná měďnaté ionty redukovat na měďné můžeme zařadit askorbát a snížené hladiny glutathionu. [52] Redukované měďné ionty jsou schopny katalyzovat tvorbu volných radikálů a tím zvyšovat riziko oxidačního stresu a tvorbu vysoce reaktivních forem kyslíku (ROS) prostřednictvím Fentonovy reakce (Reakce 3). Během Fentonovy reakce železnaté ionty Fe^{2+} nebo měďné ionty Cu^+ transformují slabý peroxid vodíku na hydroxylový radikál $\text{OH}\cdot$. [52, 53] Peroxid vodíku se v buňkách vyskytuje jako vedlejší produkt metabolismu kyslíku a je relativně neškodný, jelikož se vyskytuje v mikromolárních koncentracích. [53] Vzniklý hydroxylový radikál patří mezi jeden z nejreaktivnějších radikálů a může reagovat se všemi buněčnými kompartmenty. Může buňky poškodit např. oxidací proteinů, lipidů, mastných kyselin a nukleových kyselin, čímž se podílí na patogenezi stárnutí, karcinogenezi, na vzniku neurodegenerativních, autoimunitních, kardiovaskulárních a jiných onemocněních. [53, 54]



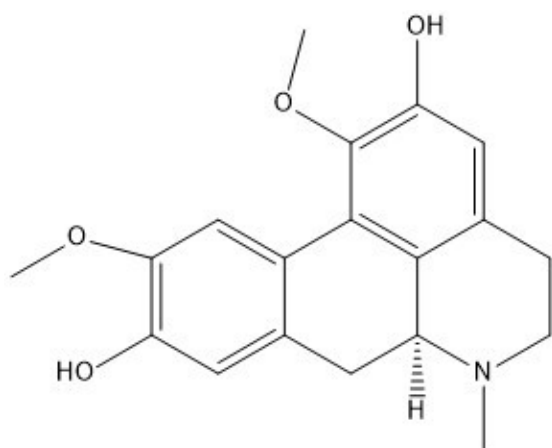
Reakce 3- Fentonova reakce

7. Alkaloidy

Alkaloidy jsou sekundární metabolity, které se vyskytují v rostlinách. Jsou to přírodní bioaktivní látky zásadité povahy, které ve své struktuře obsahují atom dusíku, který je buď alifatický nebo zabudován ve struktuře heterocyklu. V organismu se transformují na aktivní metabolity, které se vyznačují jistými biologickými aktivitami. Alkaloidy ve vyšších dávkách působí na organismus toxicky, ale při nízkých koncentracích se mohou využít k léčbě nejrůznějších onemocnění. Ve většině případů plní ochrannou funkci. [55] V experimentální části práce byly použity isochinolinové alkaloidy čtyř podskupin:

APORFINOVÉ ALKALOIDY – boldin, isokorydin, (+)-bulbokapnin, (+)-korydin, glaucin

BOLDIN

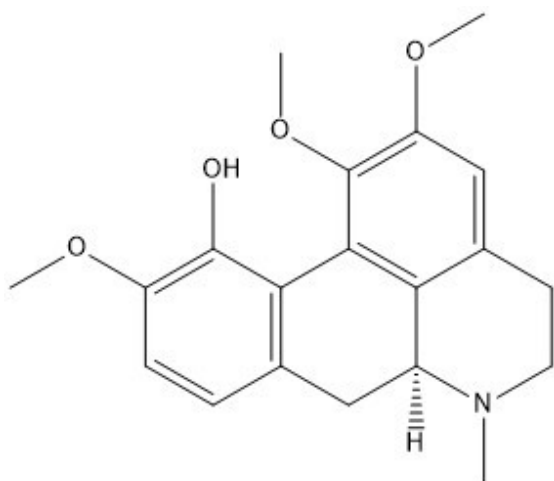


Obrázek 4 - Vzorec boldinu

Boldin je jedním z významných aporfinových alkaloidů, neboť jeho využití je díky širokému spektru účinků nesporné. [56] Mezi jeden z hlavních biologických účinků boldinu patří jeho antioxidační aktivita. Brání peroxidaci lipidů, poškození proteinů a působí jako scavenger volných radikálů. [56, 57] Působí také hepatoprotektivně na lidské jaterní buňky, které chrání proti mikrosomální peroxidaci lipidů. *In vitro* inhibuje oxidaci LDL, u experimentálních zvířat *in vivo* zpomaluje nástup aterosklerózy, vývoj diabetu a zpomaluje patogenezi tohoto onemocnění. [56, 57] Mezi další účinky boldinu patří schopnost bránit rozšíření živých organismů do lidského těla (virů, bakterií, prvoků, červů) a rozšíření metastáz zhoubných nádorů po lidském těle. [56] Uplatňuje se tedy jako antitumorové agens, např. je silně specificky cytotoxický na karcinom lidského hrtanu (HEp-2). [56, 57] Dále boldin hraje významnou roli v zánětlivých procesech, kde působí protizánětlivě, antipyreticky a je schopen

inhibovat ROS. [56, 57] Boldin ovlivňuje také serotoninový systém (5HT_{2A} receptory), kde v závislosti na podmínkách působí jako agonista nebo antagonist. [56] *In vivo* vykazuje dopaminergní aktivitu. Je známo, že boldin inhibuje acetylcholinesterázu a butylcholinesterázu, čímž stimuluje cholinergní systém a má potenciál v léčbě Alzheimerovy choroby. [56, 58] V důsledku interakce s adrenergními receptory má určité neuroleptické, antikonvulzivní a antinociceptivní účinky. [56] Dále blokuje vápníkové kanály na α -1 receptorech, kde působí jako kompetitivní antagonist. [56] Boldin ovlivňuje kardiovaskulární systém tím, že inhibuje tvorbu tromboxanu (TXA₂), čímž navozuje antitrombocytární účinek. [56] Má vliv také na trávicí soustavu organismu, kde zvyšuje sekreci žluči, má hepatoprotektivní účinky, chrání žaludeční mukózu před poškozením a má určitý prokinetický účinek. [56] Dále má antihyperglykemický účinek. [58] Na základně inhibiční aktivity boldinu vůči tyrosináze, lze boldin považovat za potenciální přírodní antipigmentační látku. [59] Základem všech účinků boldinu je hlavně jeho scavengerová a antioxidační aktivita, od kterých se odvíjí další účinky. [56]

ISOKORYDIN

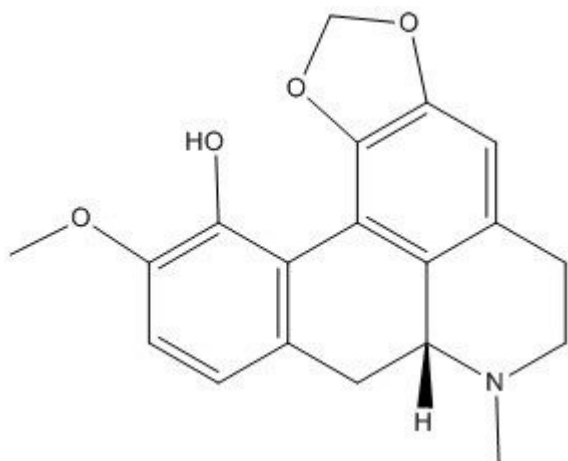


Obrázek 5 - Vzorec isokorydinu

Isokorydin se vyznačuje širokou škálou biologické aktivity. Mezi jeho účinky můžeme zařadit účinky vazodilatační, antiarytmické a antihypoxické. Dále se užívá pro své analgeticko-spazmolytické účinky v léčbě bolesti, která je způsobená křečemi žaludku, střeva, žlučníku či pankreatu. Isokorydin má také schopnost cílit na buňky, které se vyskytují v lidském

hepatocelulárním karcinomu a inhibovat jeho růst tím, že indukuje zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a indukuje apoptózu. Díky tomu se předpokládá, že isokorydin by mohl být potenciálním chemoterapeutickým činidlem pro léčbu karcinomu jater. [60]

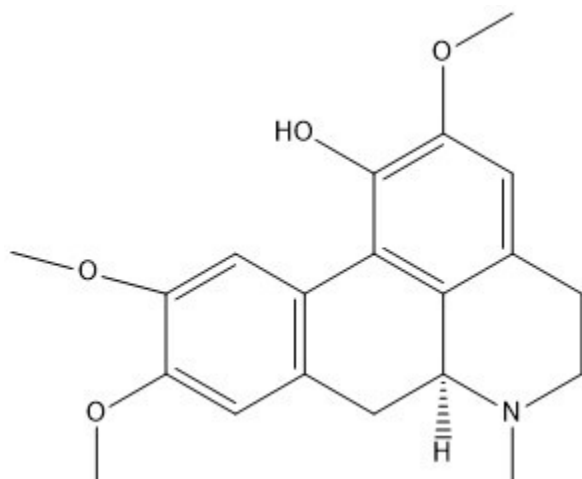
BULBOKAPNIN



Obrázek 6 – Vzorec bulbokapninu

Mezi vlastnosti bulbokapninu můžeme zařadit významnou schopnost inhibice acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy, která je závislá na dávce. [61] Bulbokapnin je také inhibítoem cytochromu CYP 3A4 a inhibítoem tyrosinhydroxylázy. [62, 63] V neposlední řadě je inhibítoem biosyntézy dopaminu, kde působí jako antagonist na D1 receptorech. [63] Vykazuje také antiperoxidační, neuroleptickou, antikonvulzivní a analgetickou aktivitu. [64]

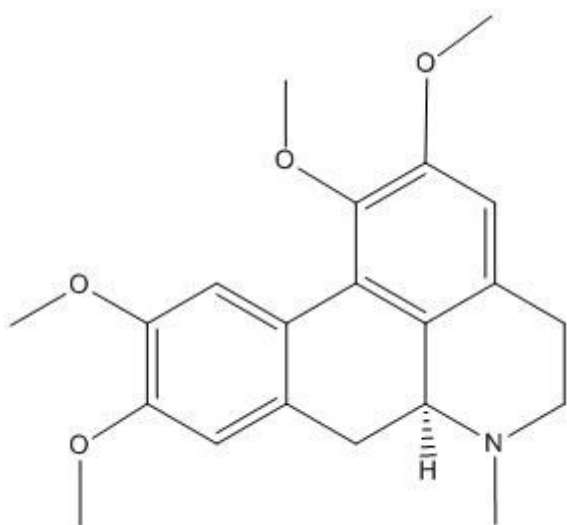
KORYDIN



Obrázek 7 - Vzorec korydinu

Korydin působí inhibičně na butyrylcholinesterázu, ale vůči acetylcholinesteráze je neaktivní. [61] Dále se ukázalo, že korydin má inhibiční účinky proti několika nádorovým onemocněním, např. proti leukémii P388 a L1210, melanomu B16, rakovině močového měchýře MBC2, adenokarcinomu tlustého střeva Colon C26 a potlačuje proliferaci lymfocytů vyvolanou mitogenem. [65]

GLAUCIN

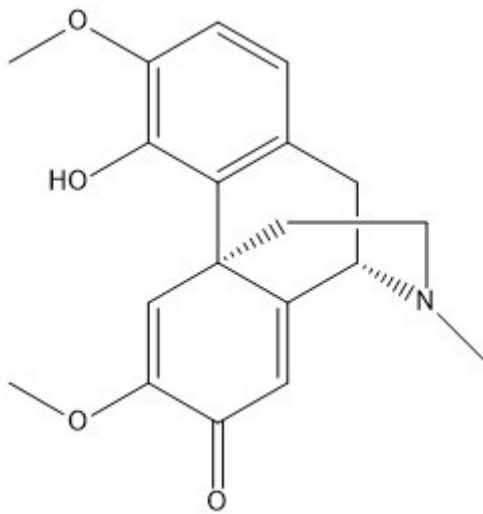


Obrázek 8 - Vzorec glaucinu

Stejně jako boldin vykazuje i glaucin antioxidační aktivitu, tím že inhibuje neenzymatickou peroxidaci lipidů (je schopen se oxidovat na dehydroaporphin nebo oxoaporphin). [56] Své uplatnění nachází také jako antitumorové agens. [56] Má neuroleptické, antikonvulzivní a antinociceptivní účinky v důsledku interakce s adrenergními receptory. [56] Dále má schopnost snižovat glykémii. [56] Působí také bronchodilatačně, jelikož glaucin je selektivní inhibitor fosfodiesterázy 4 v lidských bronších, snižuje spontánní i histaminem vyvolané napětí bronchů a působí jako antagonist na Ca²⁺ kanálech, čímž je zodpovědný za relaxaci bronchů. [66] Glaucin vykazuje také antitusické účinky stejně jako kodein a dextrometorfan. [67] Působí také antifungálně (proti *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* a *Epidermophyton floccosum*). [68] Působí slabou antidopaminergní aktivitou na D1 a D2 receptory a působí také jako inhibitor acetylcholinesterázy. [69, 70]

MORFINANOVÝ ALKALOID - (-)-sinoakutin

SINOAKUTIN

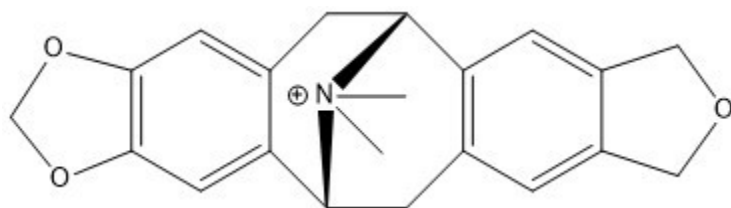


Obrázek 9 - Vzorec sinoakutinu

Sinoakutin je prekurzorem morfinu, působí jako parciální agonista kyseliny γ -aminomáselné a μ -opioidního receptoru aktivovaného G-proteinem a také jako parciální agonista na GABA/benzodiazepinovém receptorovém komplexu. [71, 72] Sinoakutin se také vyznačuje cytoprotektivní antioxidantní aktivitou, neboť chrání buňky před poškozením způsobeným peroxidem vodíku. [73]

PAVINANOVÉ ALKALOIDY – (-)-kalifornidin, (-)-escholtzin, platycerin

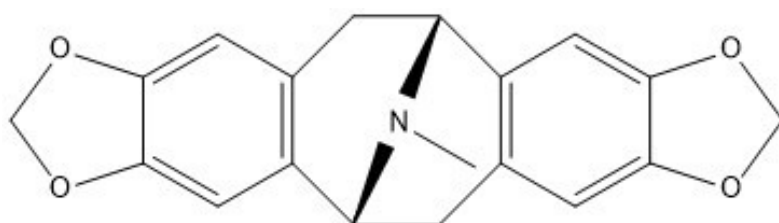
KALIFORNIDIN



Obrázek 10 - Vzorec kalifornidinu

Kalifornidin vykazuje dobrou inhibiční aktivitu vůči enzymu acetylcholinesteráze, která byla izolována z elektrického úhoře. Byly provedeny studie, kdy inhibiční aktivita kalifornidinu byla testována na erytrocytární acetylcholinesteráze, kde také vykazoval příznivou inhibiční aktivitu, avšak limitujícím faktorem k jeho použití je jeho charakter molekuly. Jelikož se jedná o kvartérní bázi, jeho přechod přes hematoencefalickou bariéru v mozku je omezený, proto se nepovažuje za perspektivní léčivo k terapii Alzheimerovy choroby. [74] Působí také jako inhibitor prolyl oligopeptidázy, která je spojena se schizofrenií, bipolární afektní poruchou a souvisejícími neuropsychiatrickými onemocněními. Z toho důvodu se kalifornidin zdá být perspektivní látkou pro vývoj nového léčiva k léčbě neuropsychických onemocnění, což je předmětem pro další studie. Kalifornidin se vyznačuje také sedativními, anxiolytickými a mírně analgetickými účinky. [74, 75, 76]

ESCHOLTZIN

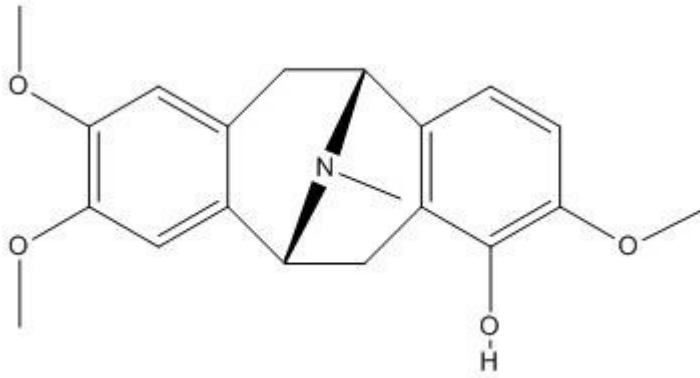


Obrázek 11 - Vzorec escholtzinu

Escholtzin stejně jako kalifornidin vykazuje sedativní, anxiolytické a mírně analgetické účinky. [74, 75] Escholtzin působí také jako silný inhibitor cytochromu CYP 3A4 *in vitro*. [74] Z tohoto důvodu je důležitá opatrnost při jeho současném používání a léčiv, které jsou metabolizovány právě přes CYP 3A4, neboť zde může docházet k interakci. Escholtzin vykazuje

pouze velmi malou až žádnou na dávce závislou inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze oproti standardu galanthaminu a proto escholtzin nelze považovat za potenciálně využitelný k terapii Alzheimerovy choroby. Escholtzin nevykazuje také žádnou antioxidační aktivitu. [77]

PLATYCERIN

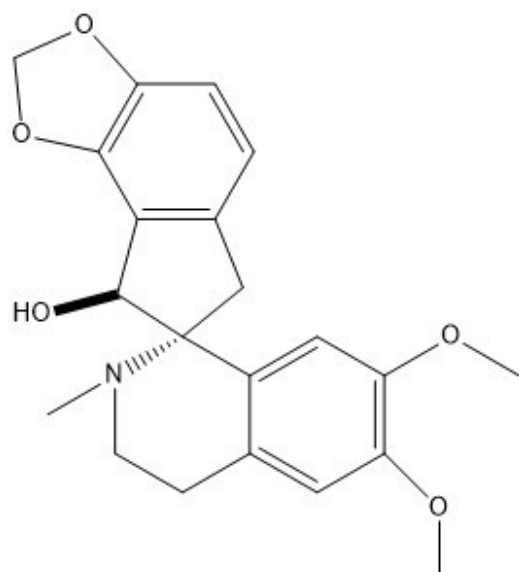


Obrázek 12 - Vzorec platycerinu

Platynerin byl testován na inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesteráze, butyrylcholinesteráze a prolyl oligopeptidáze. Ve všech studiích bylo prokázáno, že proti enzymům vykazuje velmi slabou inhibiční aktivitu. [76, 78]

SPIROBENZYLISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY - (-)-fumaricin, (+)-parfumin

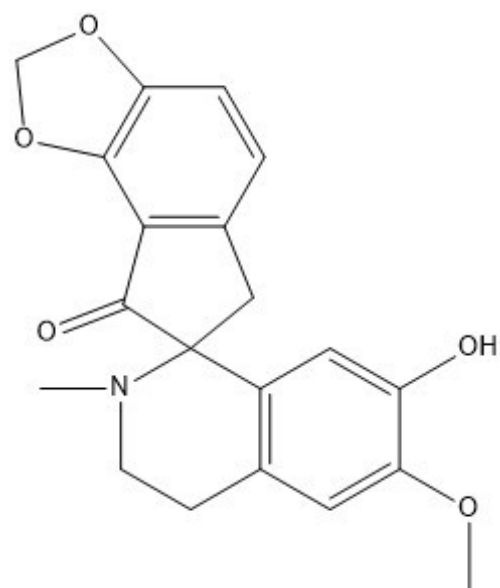
FUMARICIN



Obrázek 13 - Vzorec fumaricinu

Fumaricin byl testován na inhibiční aktivitu acetylcholinesterázy, butyrylcholinesterázy a prolyl oligopeptidázy, ale ve všech případech byla jeho inhibiční aktivita zanedbatelná. [79] Fumaricin vykazuje také antioxidační aktivitu. [80]

PARFUMIN



Obrázek 14 - Vzorec parfuminu

Parfumin působí jako selektivní inhibitor CYP 3A4 a nepatrně inhibuje také CYP 2D6. [62] Dále působí relaxačně na izolované myši ileum a snižuje srdeční frekvenci u izolovaného perfundovaného srdce potkana. Má mírné pozitivní inotropní účinky, ale při vyšších koncentracích působí účinkem negativně inotropním. [81] Parfumin vykazuje také antioxidační a antibakteriální aktivitu. [82]

8. Experimentální část

8.1. Materiál

8.1.1. Používané přístroje

Analytické váhy Kern ABT 120-5DM

Ultrazvuková lázeň Kraintek

Třepačka pro zkumavky a mikrozukavky IKA vortex Genius 3

Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA MS3 digital

Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Synergy HT multidetection microplate reader
BioTec

8.1.2. Pracovní pomůcky

96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem (Brand)

Automatické pipety různých objemů (Brand)

Vícekanálové pipety různých objemů (Biohit)

Zkumavky

Mikrozukavky

8.1.3. Používané chemikálie

Pokud není uvedeno jinak, všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich.

Dimethylsulfoxid (DMSO) Lachner $\geq 99,5\%$

Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) čistota neuvedena

Hematoxylin (HEM) certifikováno Biological Stain Commission

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina) $\geq 99,5\%$

HEPES sodná sůl $\geq 99,5\%$

Hydroxylamin hydrochlorid (HA) $\geq 99,5\%$

Chlorid měďný (CuCl) \geq 99%

Chlorid sodný (NaCl) \geq 99,5%

Kyselina chlorovodíková (HCl) \geq 32%

Kyselina octová (CH₃COOH) Penta \geq 99%

Octan sodný (CH₃COO⁻H⁺) \geq 99%

Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄·5H₂O) \geq 99%

8.1.4. Testované látky

Všechny testované látky byly izolovány na katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Pouze dvě látky, boldin a isokorydin, byly komerční a byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Čistota všech látek byla \geq 98 %. V experimentální části byly použity isochinolinové alkaloidy čtyř podskupin (aporfinové, morfinanové, pavinanové a spirobenzylisochinolinové):

První testovanou skupinou byly alkaloidy aporfinové. Tato skupina obsahovala 5 zástupců. (+)-Bulbokapnin a (+)korydin byly izolovány ze sušených hlíz dymnivky duté (*Corydalis cava*, Papaveraceae). [83] Boldin a isokorydin byly komerční. Posledním zástupcem byl glaucin, který byl izolován ze dřeva liliovníku tulipánokvětého (*Liriodendron tulipifera*, Magnoliaceae). [84] Jedná se o alkaloidy, které se běžně vyskytují u rostlin z čeledi Papaveraceae.

Druhou skupinou byly alkaloidy morfinanové. Jediným morfinanovým zástupcem, který byl použit v experimentální části byl (-)-sinoakutin. Jedná se o alkaloid, který se běžně vyskytuje u rostlin z čeledi Papaveraceae. Sinoakutin byl izolován ze sušených hlíz dymnivky duté (*Corydalis cava*, Papaveraceae). [83]

Třetí skupinou byly alkaloidy pavinanové, které byly zastoupeny 3 látkami. Prvním zástupcem byl (-)-kalifornidin, druhým zástupcem byl (-)-escholtzin. Oba alkaloidy byly izolovány ze sušených nadzemních částí a kořenů sluncovky kalifornské (*Eschscholzia californica*, Papaveraceae). [85] Poslední zástupce platycerin, byl izolován z nadzemních částí a kořenů pleskanky (*Argemone platyceras*, Papaveraceae). [86]

Poslední testovanou skupinou byly alkaloidy spirobenzylisochinolinové. V experimentální části práce byly použity 2 zástupci. Prvním zástupcem byl (-)-fumaricin a druhým zástupcem byl (+)-parfumin. Spirobenzylisochinolinové alkaloidy byly izolovány ze sušených nadzemních částí zemědělního léčivého (*Fumaria officinalis*, Papaveraceae). [87]

8.2. Metody

8.2.1. Příprava základních roztoků

Roztok měďnatých iontů 5mM

Roztok byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v destilované vodě. Molekulová hmotnost $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 249,69 g/mol.

Tento roztok byl dále zředěn na koncentraci 250 μM v DMSO.

Roztok měďných iontů 5mM

Roztok byl připraven rozpuštěním CuCl ve vodném roztoku 0,1M HCl a 1M NaCl . Molekulová hmotnost CuCl : 98,99 g/mol.

Rozpouštědlo pro CuCl bylo připraveno pomocí 0,1M roztoku HCl , ve kterém byl rozpuštěn NaCl na 1M roztok. 0,1M roztok HCl byl připraven rozpuštěním 442 μl 32% HCl v 44558 μl destilované vody.

Molekulová hmotnost HCl : 36,46 g/mol. Molekulová hmotnost NaCl : 58,44 g/mol.

Tento roztok byl dále zředěn na koncentraci 250 μM v DMSO.

Roztok hydroxylamin hydrochloridu 100mM

Roztok byl připraven rozpuštěním hydroxylamin hydrochloridu $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ v destilované vodě. Molekulová hmotnost $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$: 69,49 g/mol.

Roztok hydroxylamin hydrochloridu 10mM a 1mM

Roztok byl připraven naředěním zásobního roztoku hydroxylamin hydrochloridu 10mM.

Roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové 5mM

Roztok byl připraven rozpuštěním disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové v destilované vodě. Molekulová hmotnost BCS: 564,54 g/mol.

Roztok hematoxylinu 5mM

Roztok byl připraven rozpuštěním hematoxylinu v DMSO. Molekulová hmotnost hematoxylinu: 302,28 g/mol. Tento roztok je použitelný po dobu cca 5 hodin.

Tento roztok byl dále zředěn na koncentraci 250 μ M v DMSO. Zředěný roztok je použitelný po dobu 90 minut.

Roztok testované látky

Roztok byl připraven rozpuštěním testované látky v DMSO. Výchozí koncentrace obvykle byla 10mM. Dále byl roztok o koncentraci 10mM ředěn v DMSO na požadované koncentrace podle potřeby.

8.2.2. Kontrola připravených základních roztoků mědi

Kontrola základních roztoků mědi o koncentraci 5mM Cu²⁺ a Cu⁺ se provádí jako důkaz správnosti přípravy těchto roztoků. Vlastní kontrola roztoků se provádí ve dvou jamkách mikrotitrační destičky.

Postup kontroly základních roztoků Cu²⁺:

- 1) Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μ l pufru o pH 7.5.
- 2) Do testovacích jamek bylo napipetováno 50 μ l 1mM roztoku hydroxylaminu.
- 3) Následně bylo napipetováno 50 μ l 0,25mM roztoku Cu²⁺. Tento roztok byl získán zředěním 50 μ l základního roztoku měďnatých iontů 950 μ l superčisté vody.
- 4) Poté byla mikrotitrační destička 1 minutu míchána na třepačce.
- 5) Do testovacích jamek bylo přidáno 50 μ l 5mM roztoku BCS.
- 6) Před vlastním měřením absorbance bylo vyčkáno alespoň 1 minutu.
- 7) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a byla změřena absorbance při 484 nm. Roztok, který byl správně připravený měl absorbanci okolo 0,50 – 0,55.

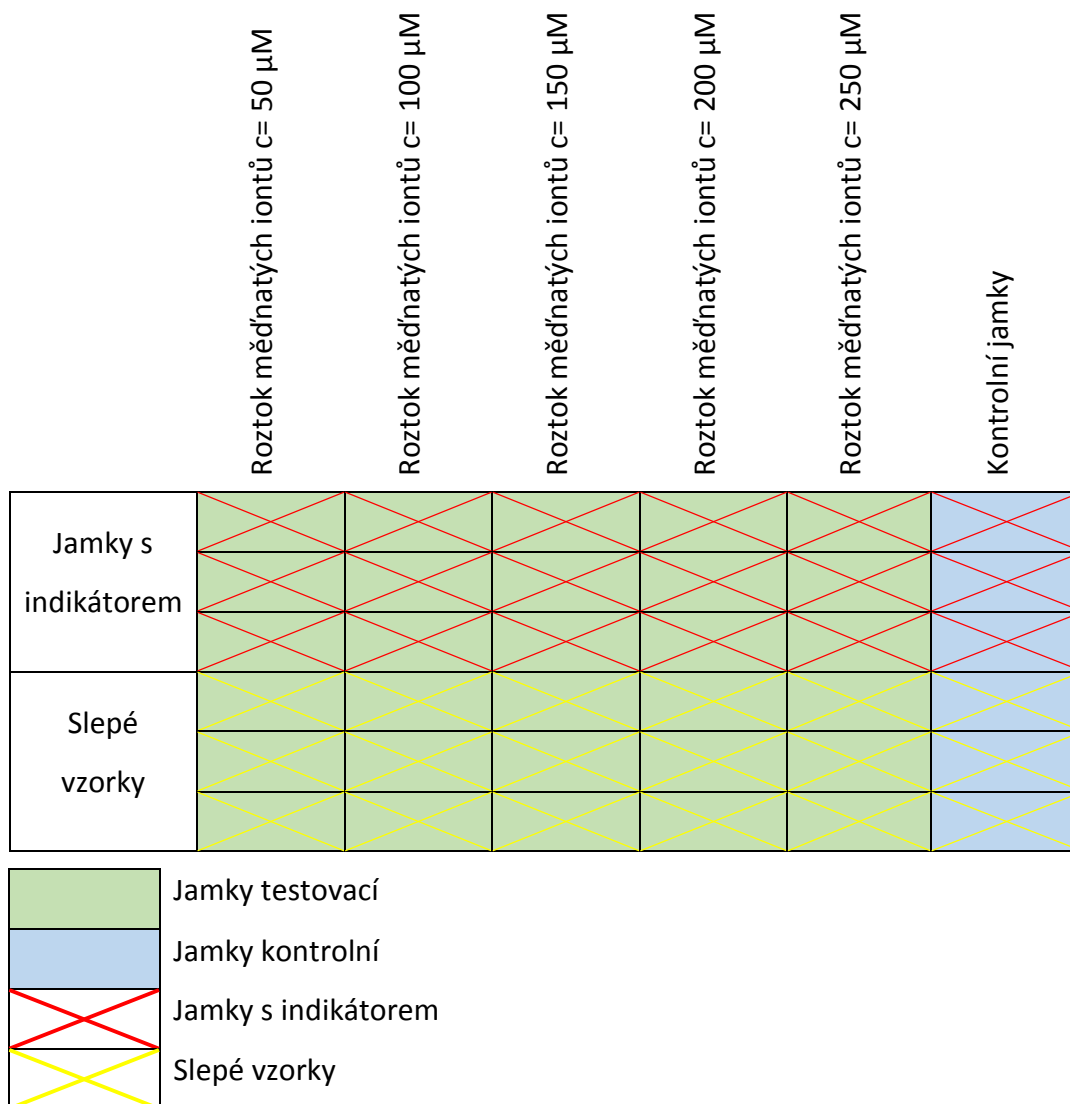
Postup kontroly základních roztoků Cu⁺:

- 1) Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μ l pufru o pH 7.5.
- 2) Do testovacích jamek bylo napipetováno 50 μ l 1mM roztoku hydroxylaminu.
- 3) Následně bylo napipetováno 50 μ l 0,25mM roztoku Cu⁺. Tento roztok byl získán zředěním 50 μ l základního roztoku měďnatých iontů 950 μ l superčisté vody.
- 4) Poté byla mikrotitrační destička 1 minutu míchána na třepačce.
- 5) Do testovacích jamek bylo přidáno 50 μ l 5mM roztoku BCS.
- 6) Před vlastním měřením absorbance bylo vyčkáno alespoň 1 minutu.

- 7) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a byla změřena absorbance při 484 nm. Roztok, který byl správně připravený měl absorbanci okolo 0,50 – 0,55.

8.2.3. Kalibrace měďnatých iontů

- 1) Vlastní provedení experimentu probíhalo podle níže uvedeného schématu (Obrázek 15), kde pro každou koncentraci měďnatých iontů bylo využito 6 jamek. Tři vrchní jamky obsahovaly indikátor (roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové). Spodní tři jamky, označované jako slepé, obsahovaly vodu. Kontrolní jamky neobsahovaly roztok měďnatých iontů dané koncentrace, ale destilovanou vodu.
- 2) Do všech jamek bylo napipetováno 150 μ l pufru o pH 6.8.
- 3) Následně bylo do všech jamek přidáno 50 μ l 1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu.
- 4) Dále bylo přidáno 50 μ l roztoku měďnatých iontů dané koncentrace do jamek testovacích. Do jamek kontrolních bylo přidáno 50 μ l destilované vody.
- 5) Mikrotitrační destička byla míchána 1 minutu na třepačce.
- 6) Do první poloviny jamek (tzn. první tři řady) bylo přidáno 50 μ l roztoku disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Do druhé poloviny jamek bylo přidáno 50 μ l destilované vody.
- 7) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a ihned byla změřena absorbance při 484 nm. Absorbance byla znovu změřena po 5 minutách (tzn. měření začalo v čase 4 minuty a 30 sekund).
- 8) Z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka.

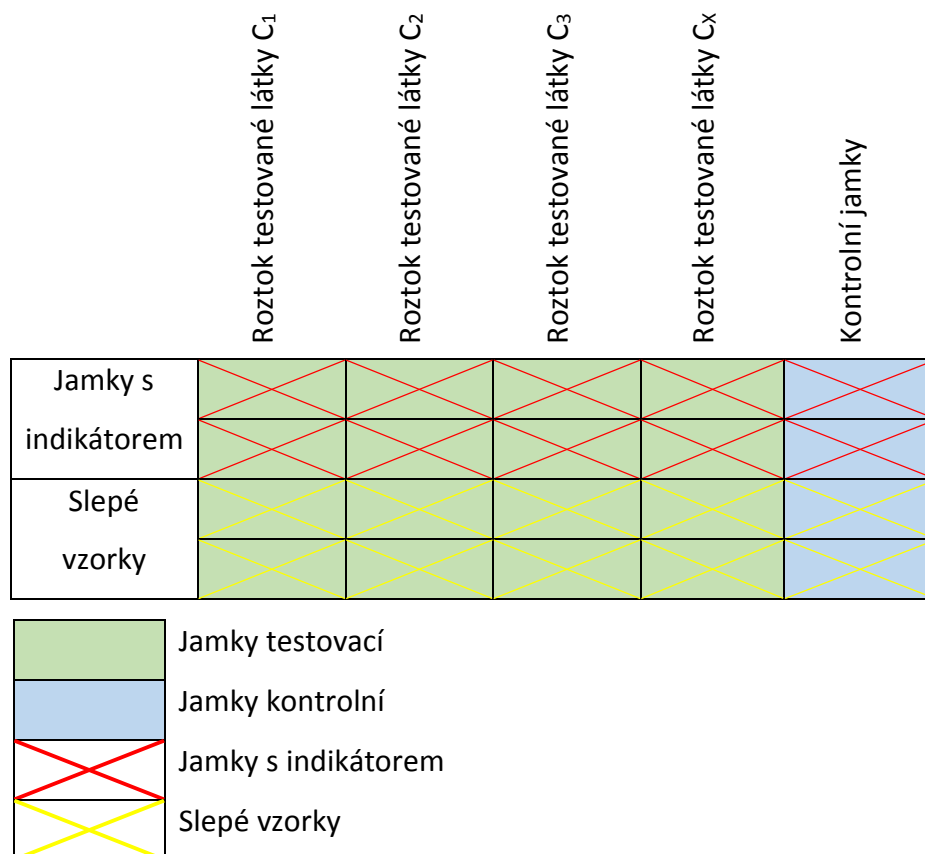


Obrázek 15- Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci měďnatých iontů

8.2.4. Chelatace měďnatých iontů v pufru

- 1) Vlastní provedení experimentu probíhalo podle níže uvedeného schématu (Obrázek 16), kde pro každou koncentraci testované látky byly využity 4 jamky. Dvě vrchní jamky obsahovaly indikátor (roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové). Spodní dvě jamky, označované jako slepé, obsahovaly vodu. Kontrolní jamky neobsahovaly roztok testované látky, ale rozpouštědlo.
- 2) Do všech jamek bylo napipetováno 100 μl příslušného pufru (7.5, 6.8, 5.5, 4.5).
- 3) Následně bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace do jamek testovacích. Do jamek kontrolních bylo přidáno 50 μl rozpouštědla.

- 4) Poté bylo do všech jamek přidáno 50 μ l 250 μ M roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO.
- 5) Mikrotitrační destička byla míchána 2 minuty na třepačce.
- 6) Dále bylo do všech jamek přidáno 50 μ l 1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu při pH 6.8 a pH 7.5. Při pH 4.5 a pH 5.5 bylo do všech jamek přidáno 50 μ l 10mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu.
- 7) Mikrotitrační destička byla míchána 1 minutu na třepačce.
- 8) Do první poloviny jamek (tzn. první dvě řady) bylo přidáno 50 μ l 5mM roztoku disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Do druhé poloviny jamek bylo přidáno 50 μ l vody.
- 9) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a ihned byla změřena absorbance při 484 nm. Absorbance byla znovu změřena po 5 minutách (tzn. měření začalo v čase 4 minuty a 30 sekund).



Obrázek 16- Schéma mikrotitrační destičky při chelataci měďnatých iontů v pufru

Konečný obsah jamky:

100 μl pufru (7.5, 6.8, 5.5, 4.5)

50 μl roztoku testované látky nebo rozpouštědla

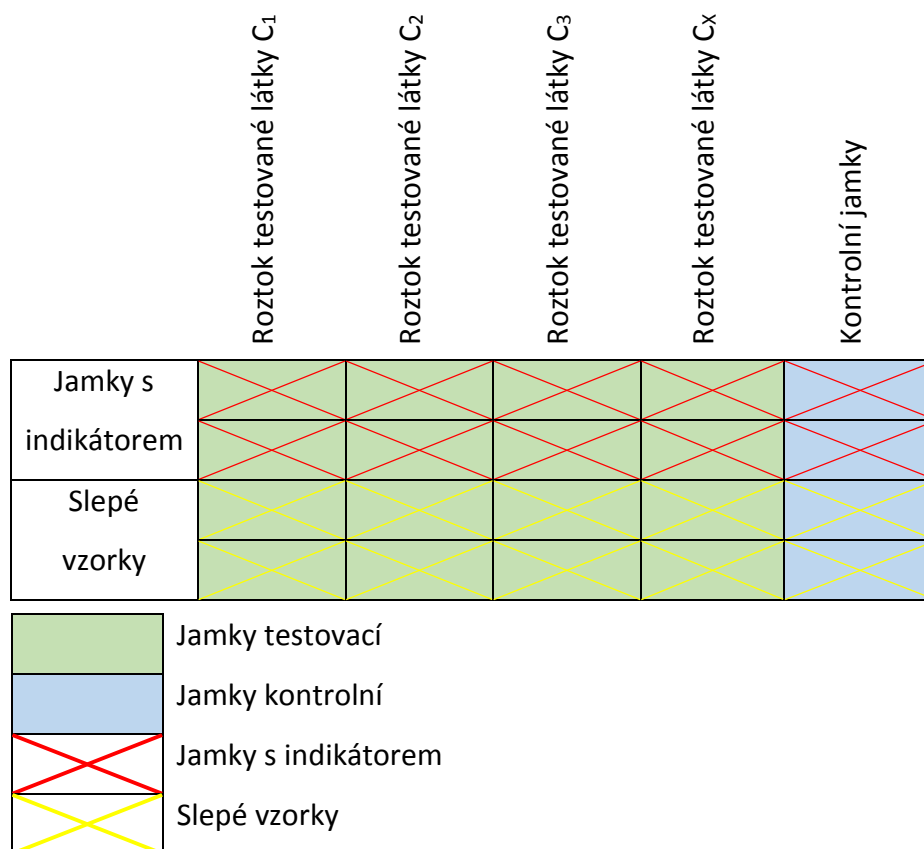
50 μl roztoku Cu^{2+} iontů

50 μl roztoku HA

50 μl roztoku BCS nebo vody

8.2.5. Chelatace měďných iontů v pufru

- 1) Vlastní provedení experimentu probíhalo podle níže uvedeného schématu (Obrázek 17), kde pro každou koncentraci testované látky byly využity 4 jamky. Dvě vrchní jamky obsahovaly indikátor (roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové). Spodní dvě jamky, označované jako slepé, obsahovaly vodu. Kontrolní jamky neobsahovaly roztok testované látky, ale rozpouštědlo.
- 2) Do všech jamek bylo napipetováno 100 μl příslušného pufru (7.5, 6.8, 5.5, 4.5).
- 3) Dále bylo do všech jamek přidáno 50 μl 1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu při pH 6.8 a pH 7.5. Při pH 4.5 a 4.5 bylo do všech jamek přidáno 50 μl 10mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu.
- 4) Následně bylo do všech jamek přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^+ iontů v DMSO.
- 5) Mikrotitrační destička byla míchána 1 minutu na třepačce.
- 6) Poté bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace do jamek testovacích. Do jamek kontrolních bylo přidáno 50 μl rozpouštědla.
- 7) Mikrotitrační destička byla míchána 2 minuty na třepačce.
- 8) Do první poloviny jamek (tzn. první dvě řady) bylo přidáno 50 μl 5mM roztoku disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Do druhé poloviny jamek bylo přidáno 50 μl vody.
- 9) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a ihned byla změřena absorbance při 484 nm. Absorbance byla znovu změřena po 5 minutách (tzn. měření začalo v čase 4 minuty a 30 sekund).



Obrázek 17- Schéma mikrotitrační destičky při chelataci mědných iontů v pufru

Konečný obsah jamky:

100 µl pufru (7.5, 6.8, 5.5, 4.5)

50 µl roztoku HA

50 µl roztoku Cu⁺ iontů

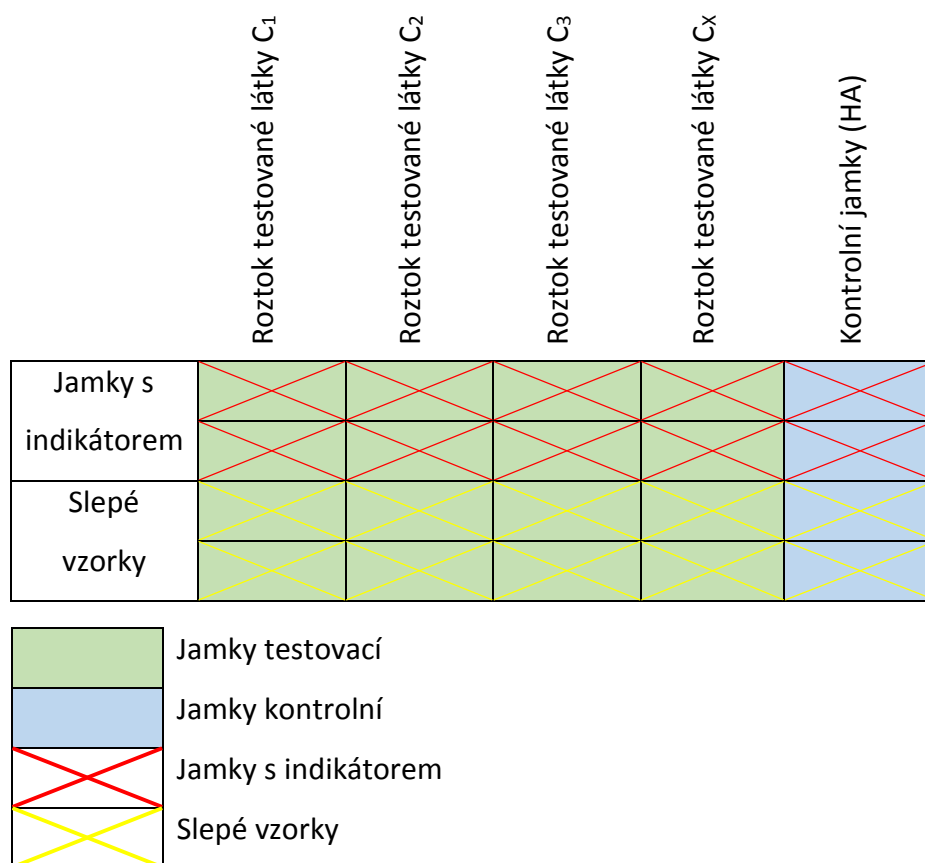
50 µl roztoku testované látky nebo rozpouštědla

50 µl roztoku BCS nebo vody

8.2.6. Chelatace měďnatých iontů v DMSO

- 1) Vlastní provedení experimentu probíhalo podle níže uvedeného schématu (Obrázek 18), kde pro každou koncentraci testované látky byly využity 4 jamky. Dvě vrchní jamky obsahovaly indikátor (roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové). Spodní dvě jamky, označované jako slepé, obsahovaly vodu. Kontrolní jamky neobsahovaly roztok testované látky, ale rozpouštědlo.

- 2) Bylo napipetováno 100 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace v DMSO do testovacích jamek. Do jamek kontrolních bylo napipetováno 100 μl rozpouštědla.
- 3) Následně bylo do všech jamek přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO.
- 4) Mikrotitrační destička byla míchána 2 minuty na třepačce.
- 5) Poté bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu.
- 6) Mikrotitrační destička byla míchána 1 minutu na třepačce.
- 7) Do první poloviny jamek (tzn. první dvě řady) bylo napipetováno 50 μl 5mM roztoku disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Do druhé poloviny jamek bylo napipetováno 50 μl vody.
- 8) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a ihned byla změřena absorbance při 484 nm. Absorbance byla znovu změřena po 5 minutách (tzn. měření začalo v čase 4 minuty a 30 sekund).



Obrázek 18- Schéma mikrotitrační destičky při chelataci měďnatých iontů v DMSO

Konečný obsah jamky:

100 μl roztoku testované látky v DMSO nebo DMSO

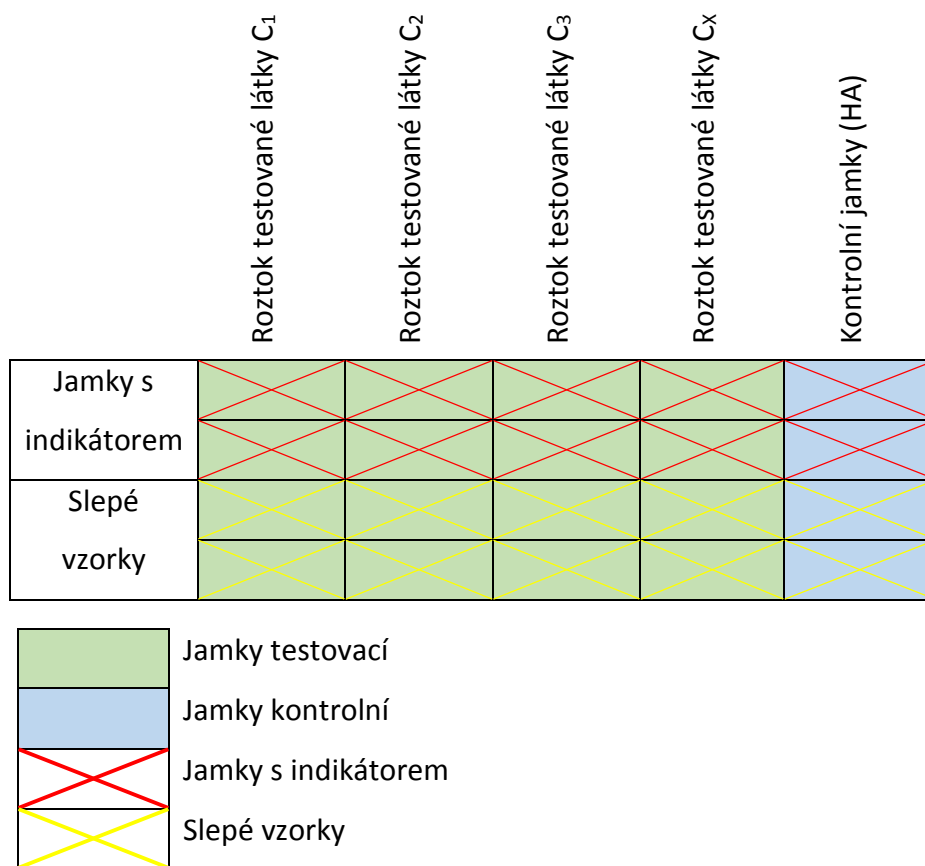
50 μl roztoku Cu^{2+} iontů

50 μl roztoku HA

50 μl roztoku BCS nebo vody

8.2.7. Chelatace měďných iontů v DMSO

- 1) Vlastní provedení experimentu probíhalo podle níže uvedeného schématu (Obrázek 19), kde pro každou koncentraci testované látky byly využity 4 jamky. Dvě vrchní jamky obsahovaly indikátor (roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové). Spodní dvě jamky, označované jako slepé, obsahovaly vodu. Kontrolní jamky neobsahovaly roztok testované látky, ale rozpouštědlo.
- 2) Bylo napipetováno 100 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace v DMSO do testovacích jamek. Do jamek kontrolních bylo napipetováno 100 μl rozpouštědla.
- 3) Následně bylo přidáno 50 μl 1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu.
- 4) Poté bylo do všech jamek přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů.
- 5) Mikrotitrační destička byla míchána 2 minuty na třepačce.
- 6) Do první poloviny jamek (tzn. první dvě řady) bylo napipetováno 50 μl 5mM roztoku disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Do druhé poloviny jamek bylo napipetováno 50 μl vody.
- 7) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a ihned byla změřena absorbance při 484 nm. Absorbance byla znovu změřena po 5 minutách (tzn. měření začalo v čase 4 minuty a 30 sekund).



Obrázek 19 - Schéma mikrotitrační destičky při chelataci měďných iontů v DMSO

Konečný obsah jamky:

100 µl roztoku testované látky v DMSO nebo DMSO

50 µl roztoku HA

50 µl roztoku Cu⁺ iontů

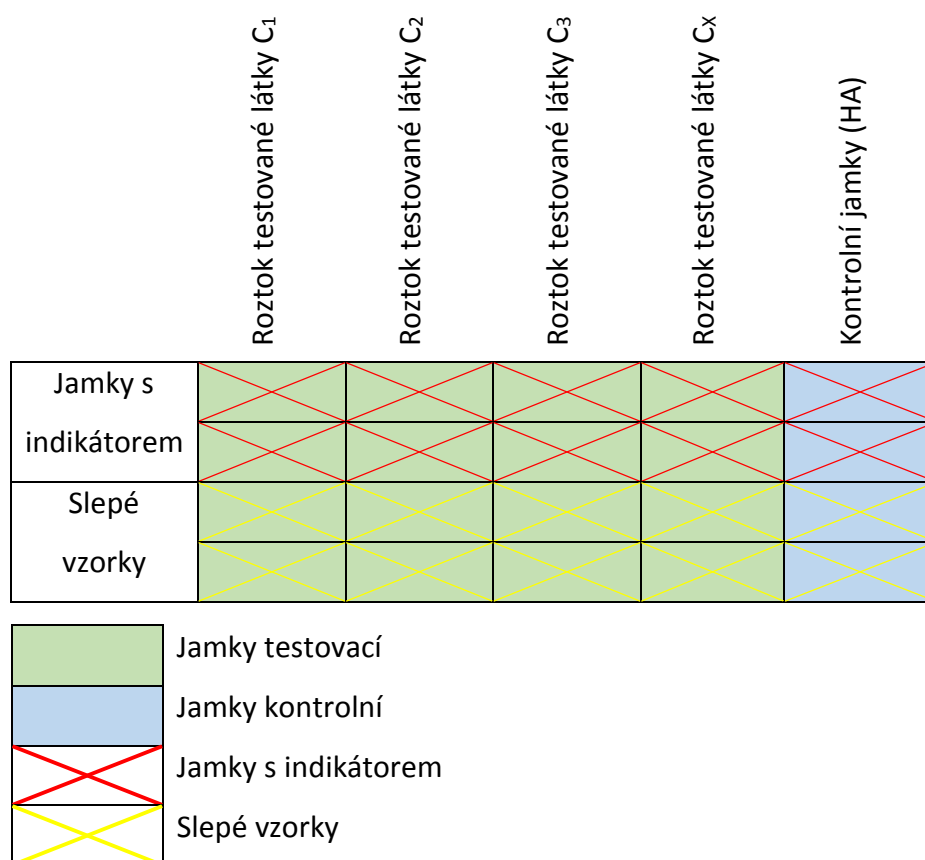
50 µl roztoku BCS nebo vody

8.2.8. Chelatace měďnatých iontů hematoxylinem v pufru

Chelatace hematoxylinem se provádí u měďnatých iontů v pufru o pH 7.5, 6.8 a 5.5.

- 1) Vlastní provedení experimentu probíhalo podle níže uvedeného schématu (Obrázek 20), kde pro každou koncentraci testované látky byly využity 4 jamky. Dvě vrchní jamky obsahovaly indikátor (roztok hematoxylinu). Spodní dvě jamky, označované jako slepé, obsahovaly místo hematoxylinu DMSO. Kontrolní jamky neobsahovaly roztok testované látky, ale rozpouštědlo.

- 2) Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μl příslušného pufru (7.5, 6.8, 5.5).
- 3) Následně bylo do všech jamek napipetováno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů.
- 4) Do testovacích jamek bylo napipetováno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace. Do jamek kontrolních bylo napipetováno 50 μl rozpouštědla.
- 5) Poté byla mikrotitrační destička míchána 2 minuty na třepačce.
- 6) Do první poloviny jamek (tzn. první dvě řady) bylo napipetováno 50 μl 250 μM roztoku hematoxylinu. Do druhé poloviny jamek bylo napipetováno 50 μl DMSO. DMSO do druhé poloviny jamek bylo pipetováno jako první.
- 7) Před vlastním měřením absorbance byla mikrotitrační destička míchána 3 minuty na třepačce.
- 8) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a ihned byla změřena absorbance při 610 nm v pH 7.5/ 590 nm v pH 6.8/ 595 nm v pH 5.5 a dále v čase 5 a 7 minut.



Obrázek 20- Schéma mikrotitrační destičky při chelataci měďnatých iontů v pufru hematoxylinem

Konečný obsah jamky:

150 μl pufru (7.5, 6.8, 5.5)

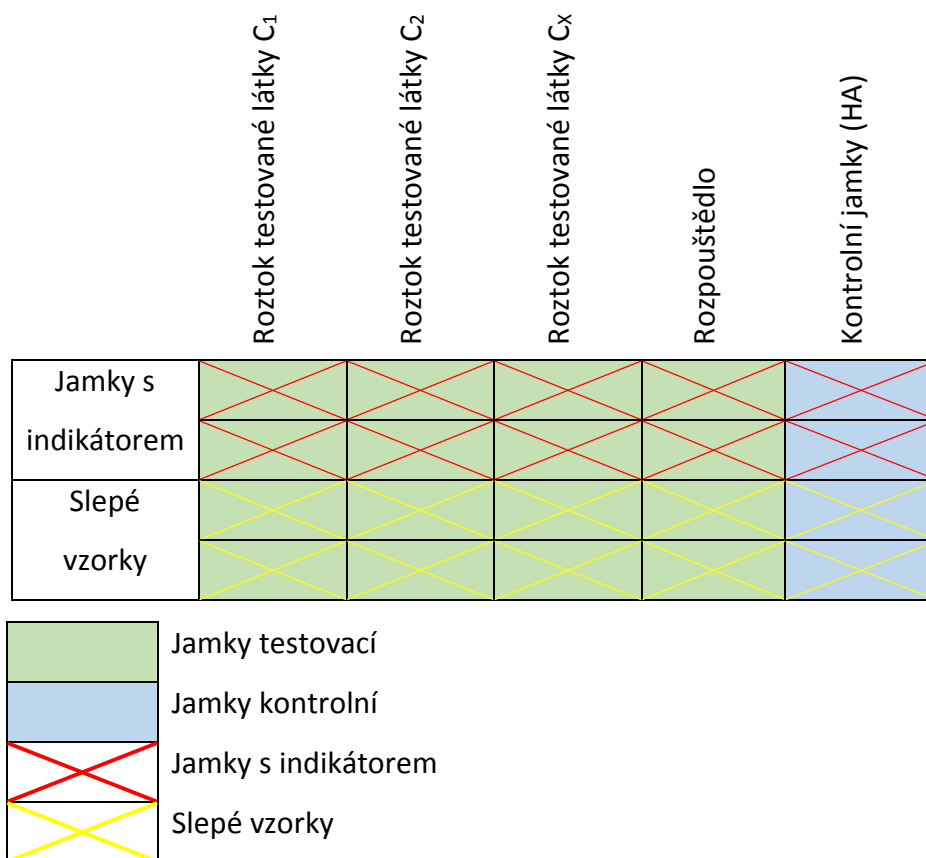
50 μl roztoku Cu^{2+} iontů

50 μl roztoku testované látky nebo rozpouštědla

50 μl roztoku hematoxylinu nebo DMSO

8.2.9. Redukce měďnatých iontů v pufru

- 1) Vlastní provedení experimentu probíhalo podle níže uvedeného schématu (Obrázek 21), kde pro každou koncentraci testované látky byly využity 4 jamky. Dvě vrchní jamky obsahovaly indikátor (roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové). Spodní dvě jamky, označované jako slepé, obsahovaly vodu. Kontrolní jamky neobsahovaly roztok testované látky, ale rozpouštědlo.
- 2) Do všech jamek bylo napipetováno 100 μl příslušného pufru (7.5, 6.8, 5.5, 4.5).
- 3) Následně bylo přidáno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace nebo rozpouštědla do jamek testovacích. Do jamek kontrolních bylo přidáno 5 μl 1mM hydroxylamin hydrochloridu při pH 6.8 a pH 7.5. Při pH 4.5 a pH 5.5 bylo do kontrolních jamek přidáno 5 μl 10mM hydroxylamin hydrochloridu.
- 4) Poté bylo do všech jamek přidáno 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů.
- 5) Mikrotitrační destička byla míchána 2 minuty na třepačce.
- 6) Do první poloviny jamek (tzn. první dvě řady) bylo přidáno 50 μl 5mM roztoku disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Do druhé poloviny jamek bylo přidáno 50 μl vody.
- 7) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a ihned byla změřena absorbance při 484 nm. Absorbance byla znovu změřena po 5 minutách (tzn. měření začalo v čase 4 minuty a 30 sekund).



Obrázek 21- Schéma mikrotitrační destičky při redukcí měďnatých iontů v pufru

Konečný obsah jamky:

100 µl pufru (7.5, 6.8, 5.5, 4.5)

50 µl roztoku testované látky, rozpouštědla nebo roztoku HA

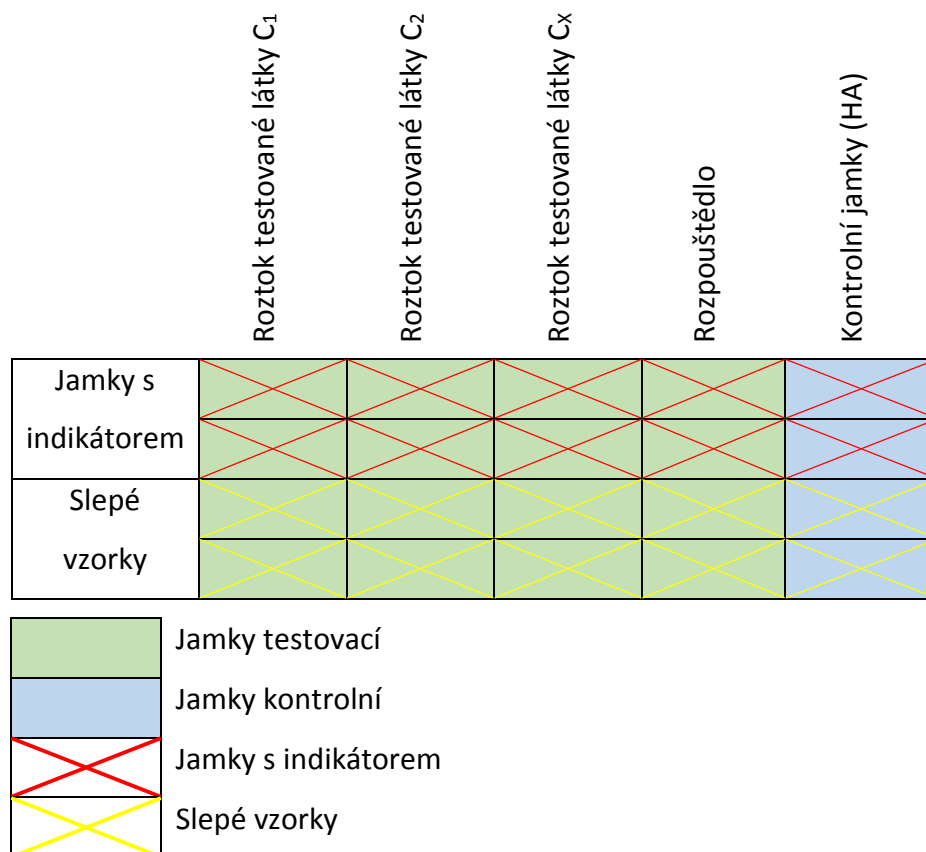
50 µl roztoku Cu²⁺ iontů

50 µl roztoku BCS nebo vody

8.2.10. Redukce měďnatých iontů v DMSO

- 1) Vlastní provedení experimentu probíhalo podle níže uvedeného schématu (Obrázek 22), kde pro každou koncentraci testované látky byly využity 4 jamky. Dvě vrchní jamky obsahovaly indikátor (roztok disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové). Spodní dvě jamky, označované jako slepé, obsahovaly vodu. Kontrolní jamky neobsahovaly roztok testované látky, ale rozpouštědlo.

- 2) Bylo napipetováno 100 μ l roztoku testované látky příslušné koncentrace v DMSO/ DMSO do testovacích jamek. Do jamek kontrolních bylo napipetováno 100 μ l 1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu.
- 3) Následně bylo do všech jamek přidáno 50 μ l 250 μ M roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO.
- 4) Mikrotitrační destička byla míchána 2 minuty na třepačce.
- 5) Do první poloviny jamek (tzn. první dvě řady) bylo napipetováno 50 μ l 5mM roztoku disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové. Do druhé poloviny jamek bylo napipetováno 50 μ l vody.
- 6) Mikrotitrační destička byla vložena do spektrofotometru a ihned byla změřena absorbance při 484 nm. Absorbance byla znovu změřena po 5 minutách (tzn. měření začalo v čase 4 minuty a 30 sekund).



Obrázek 22 - Schéma mikrotitrační destičky při redukcí měďnatých iontů v DMSO

Konečný obsah jamky:

100 µl roztoku testované látky v DMSO, DMSO nebo roztoku HA

50 µl roztoku Cu^{2+} iontů

50 µl roztoku BCS nebo vody

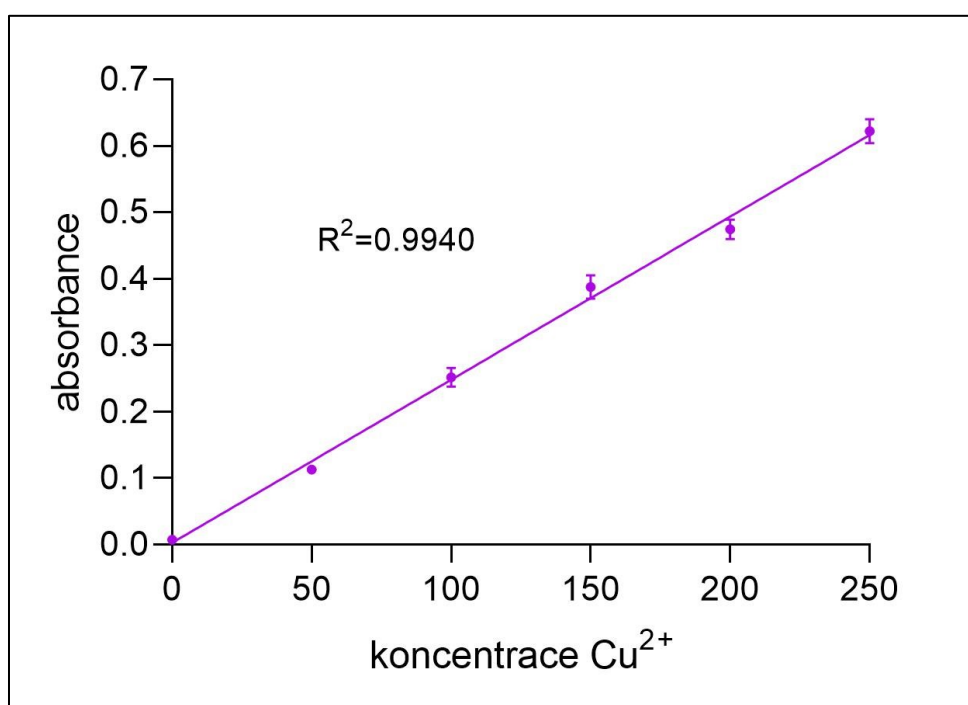
9. Výsledky

9.1. Kalibrační křivka

Graf kalibrační křivky (Obrázek 23) byl sestaven z hodnot naměřených absorbancí (Tabulka 2). Pro sestavení grafu byly použity základní koncentrace měďnatých iontů: 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 250 μM . Ze sestavené kalibrační křivky je patrné, že se zvyšující se koncentrací měďnatých iontů se zvyšovala i hodnota naměřené absorpance. Absorbance je tedy lineárně závislá na koncentraci měďnatých iontů.

Tabulka 2- Naměřené hodnoty absorbancí potřebné pro sestavení kalibrační křivky

Základní koncentrace měďnatých iontů (μM)	0	50	100	150	200	250
Průměrná absorbance	0,0073333	0,113	0,252	0,3876667	0,4746667	0,622333



Obrázek 23- Kalibrační křivka měďnatých iontů Cu^{2+}

9.2. Měď-chelatující účinky alkaloidů

Měď-chelatující účinky alkaloidů byly stanoveny pomocí dvou metod s indikátory hematoxylinem (HEM) a disodnou solí kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS).

9.2.1. Stanovení chelatace mědi pomocí HEM

Pomocí této metody byly změřeny všechny testované látky. Měření s hematoxylinem probíhalo v prostředích pufrů o pH 5.5, 6.8 a 7.5. Žádná z testovaných látek aporfinového, morfinanového, pavinanového a spirobenzylisochinolinového typu v těchto prostředích chelatační aktivitu měďnatých Cu^{2+} iontů nevykázala.

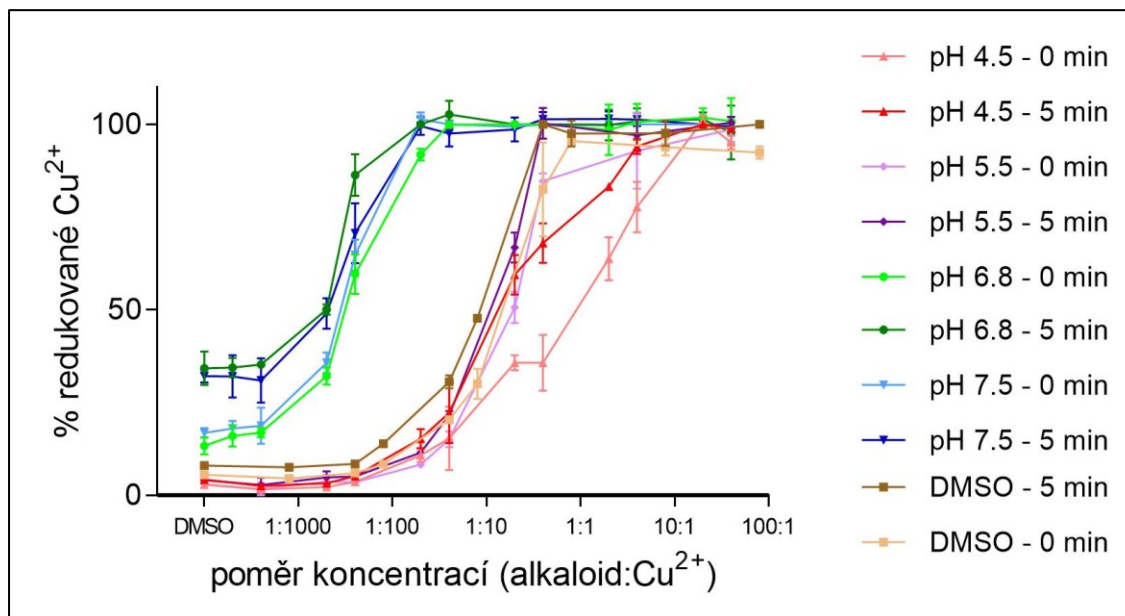
9.2.2 Stanovení chelatace mědi pomocí BCS

Touto metodou byly změřeny všechny testované látky. Měření s BCS probíhalo v prostředích pufrů o pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 a v prostředí DMSO. Žádná z testovaných látek aporfinového, morfinanového, pavinanového a spirobenzylisochinolinového typu v těchto prostředích chelatační aktivitu měďných Cu^+ a měďnatých Cu^{2+} iontů nevykázala.

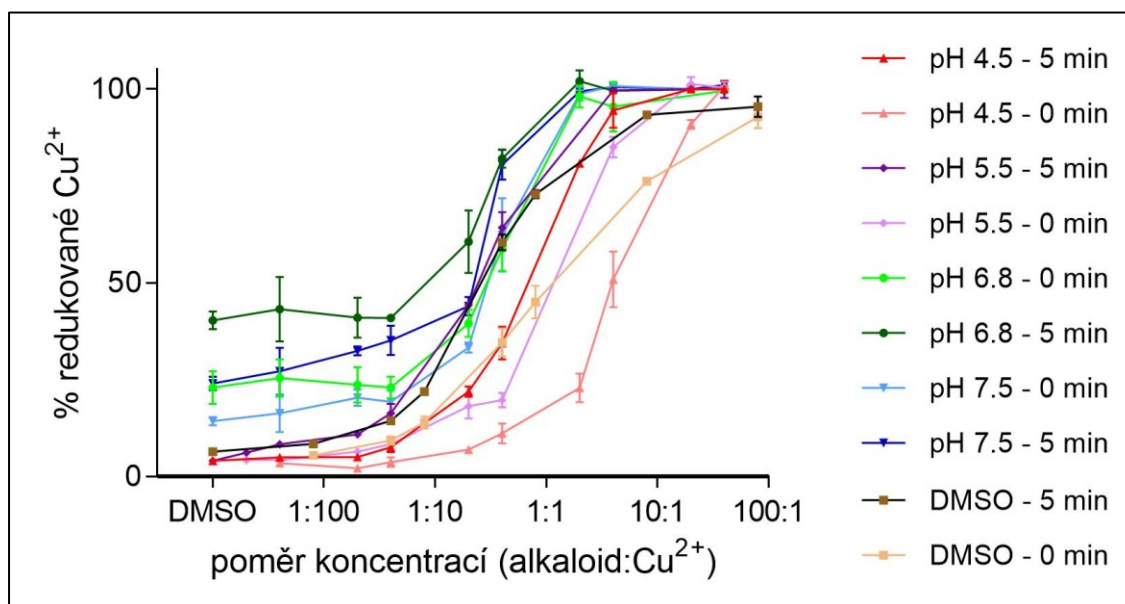
9.3. Měď-redukující účinky alkaloidů

Měď-redukující účinky alkaloidů byly stanoveny pomocí metody s indikátorem disodnou solí kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS). Měď-redukující účinky námi testovaných látek jsou zaneseny na obrázcích č. 24-34. V grafu jsou zaneseny aktivity alkaloidů při různých hodnotách pH prostředí a v prostředí DMSO, vždy v časech 0 min a 5 min.

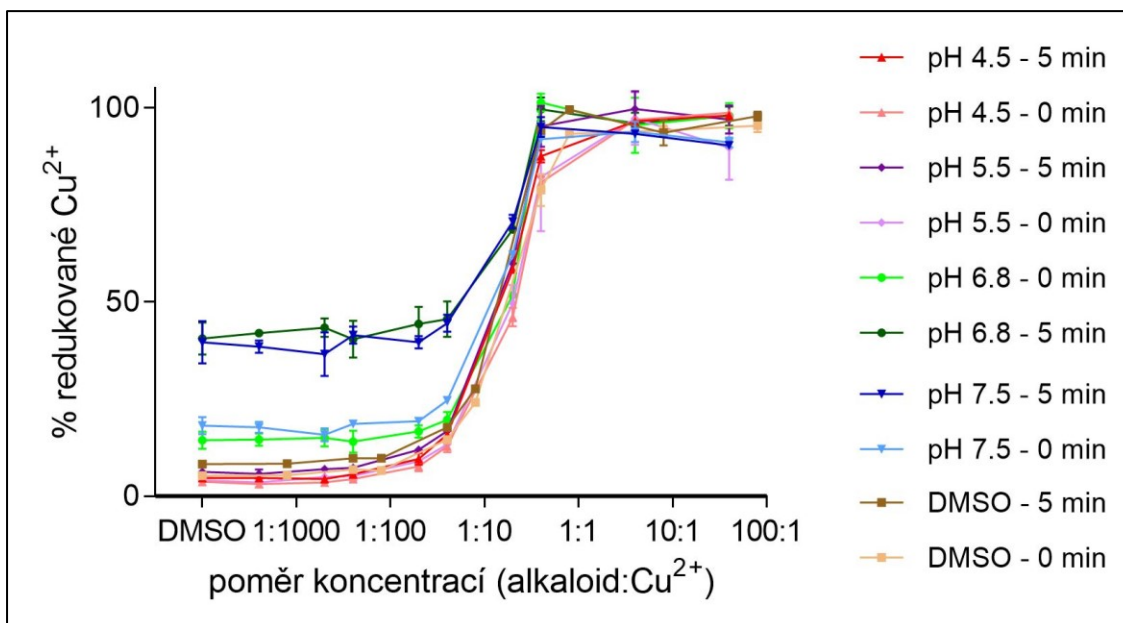
9.3.1. Alkaloidy aporfinového typu



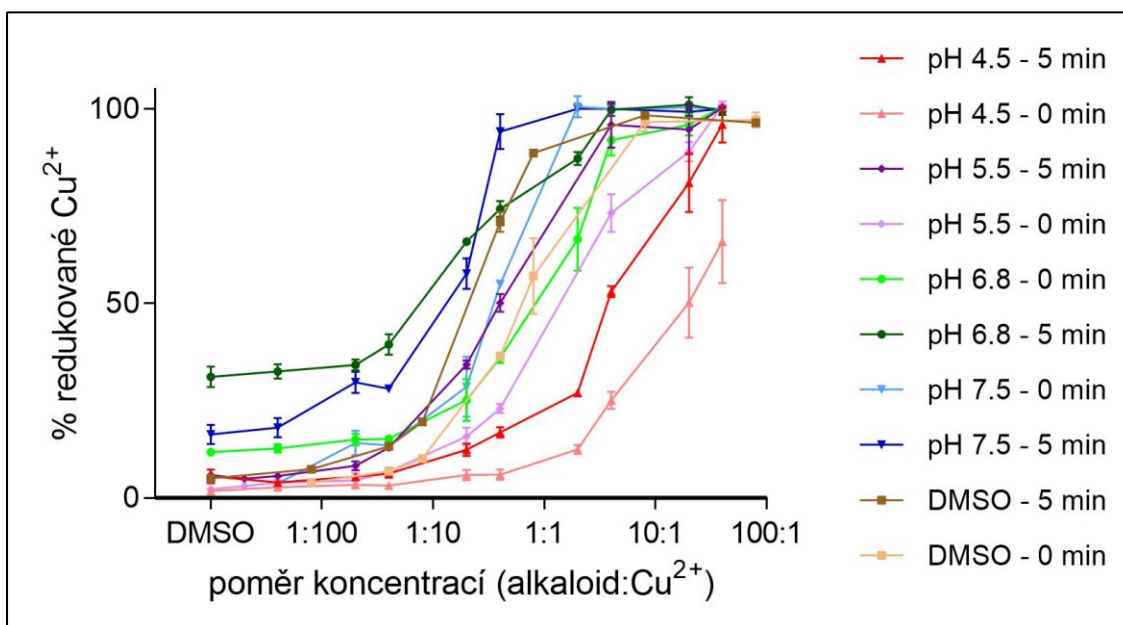
Obrázek 25 - Měď-redukující účinky boldinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



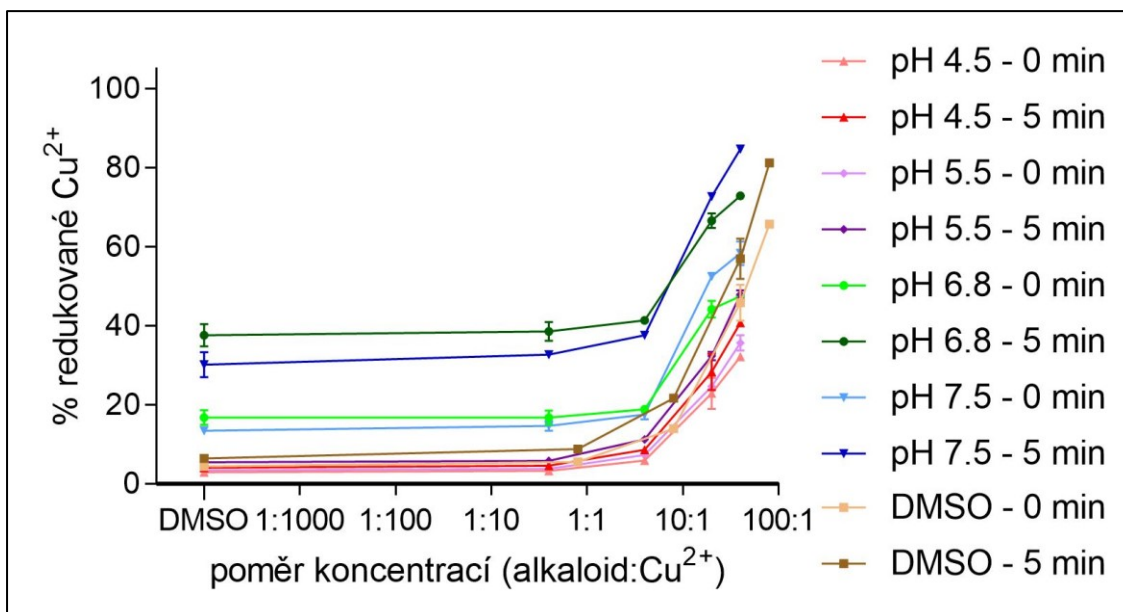
Obrázek 24 - Měď-redukující účinky isokorydinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



Obrázek 26 - Měď-redukující účinky (+)-bulbokapninu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

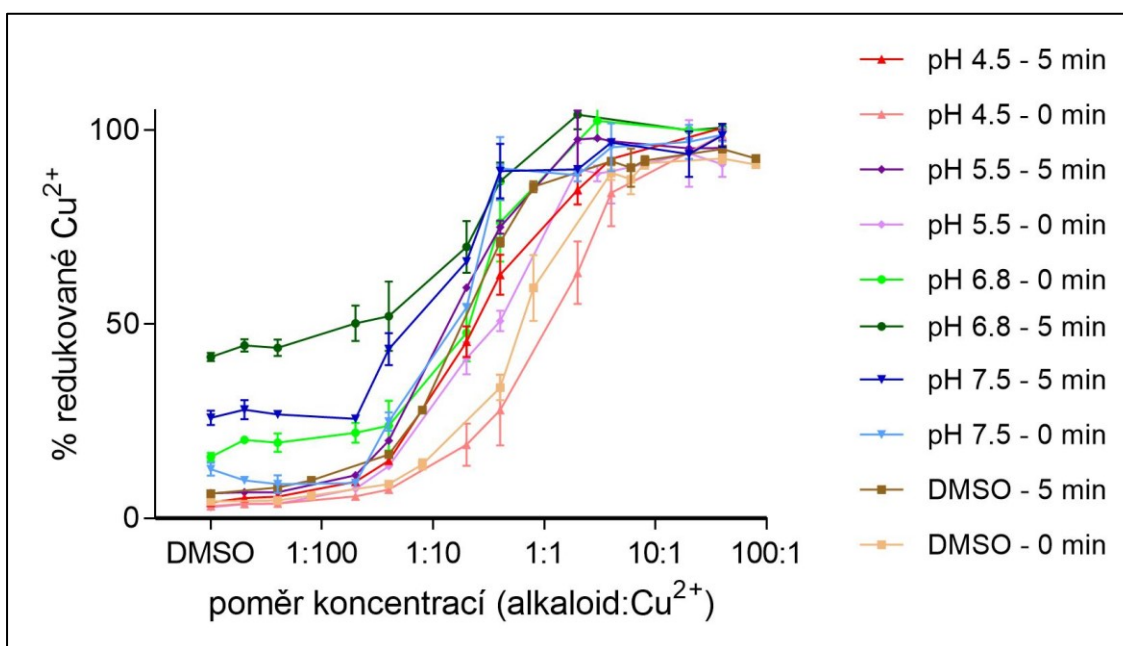


Obrázek 27 - Měď-redukující účinky (+)-korydinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



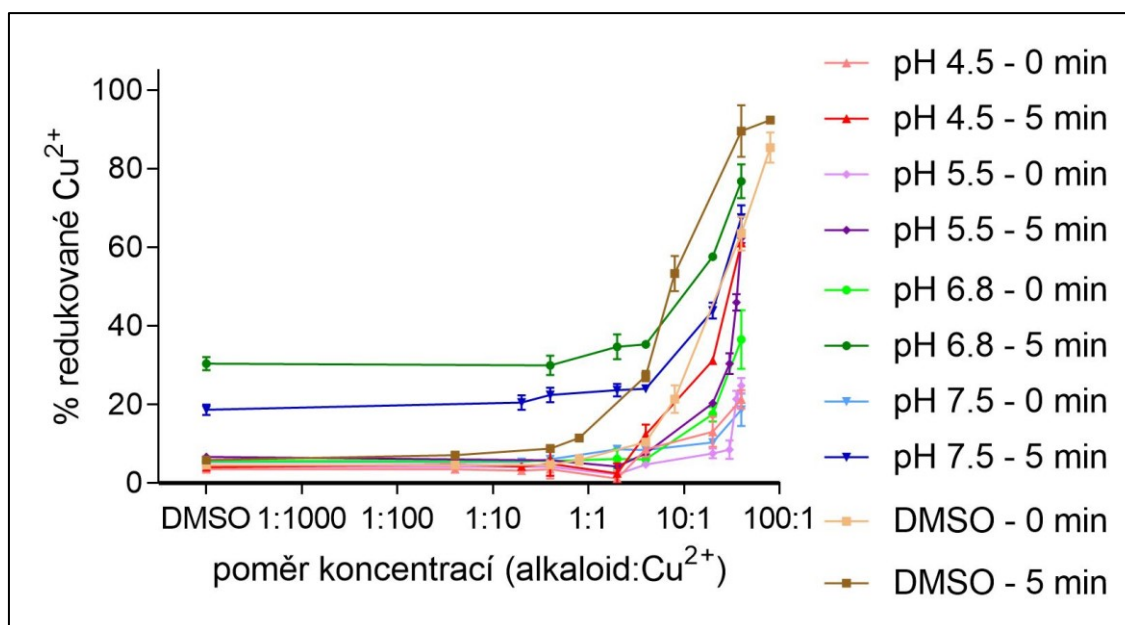
Obrázek 28 - Měď-redukující účinky glaucinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

9.3.2 Alkaloid morfinanového typu

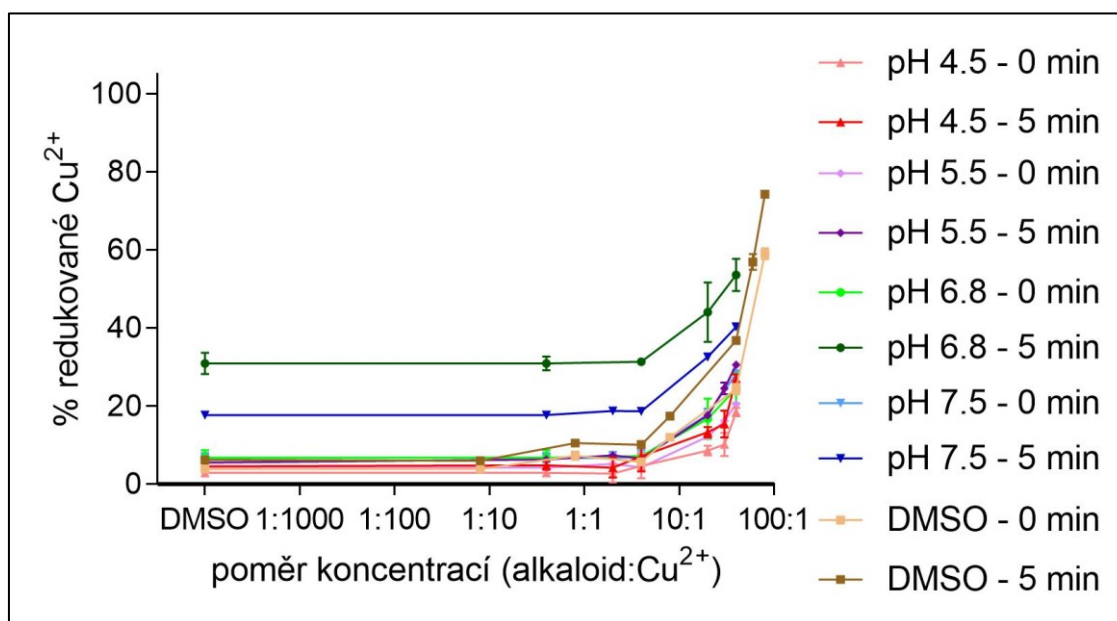


Obrázek 29 - Měď-redukující účinky (-)-sinoakutinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

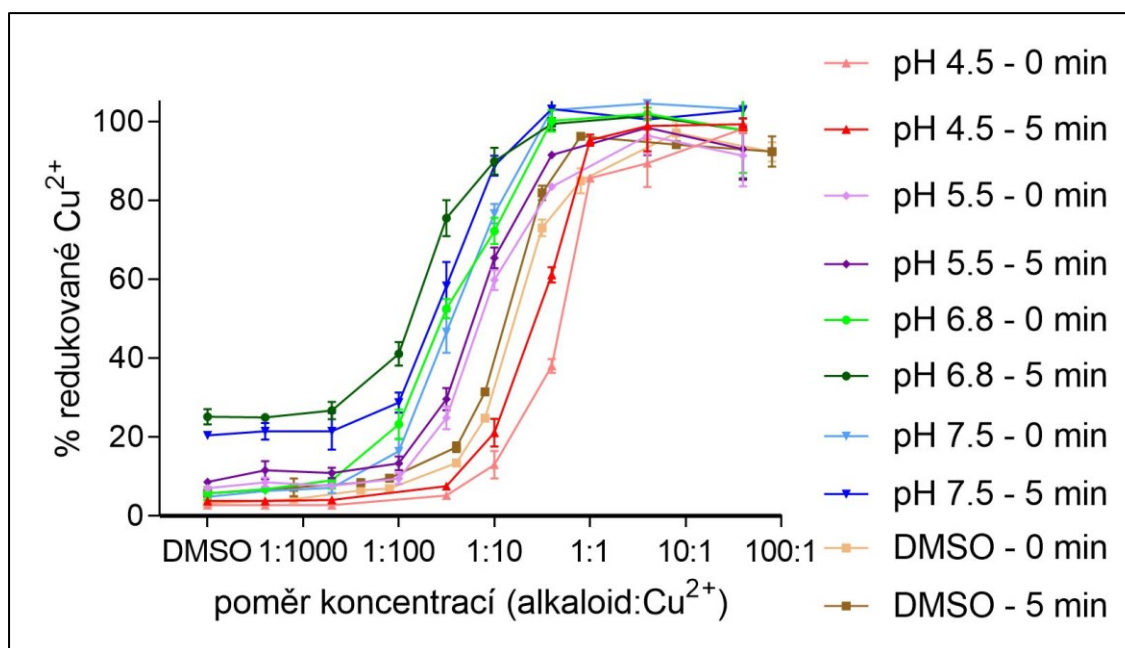
9.3.3 Alkaloidy pavinanového typu



Obrázek 30 - Měď-redukující účinky (-)-kalifornidinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

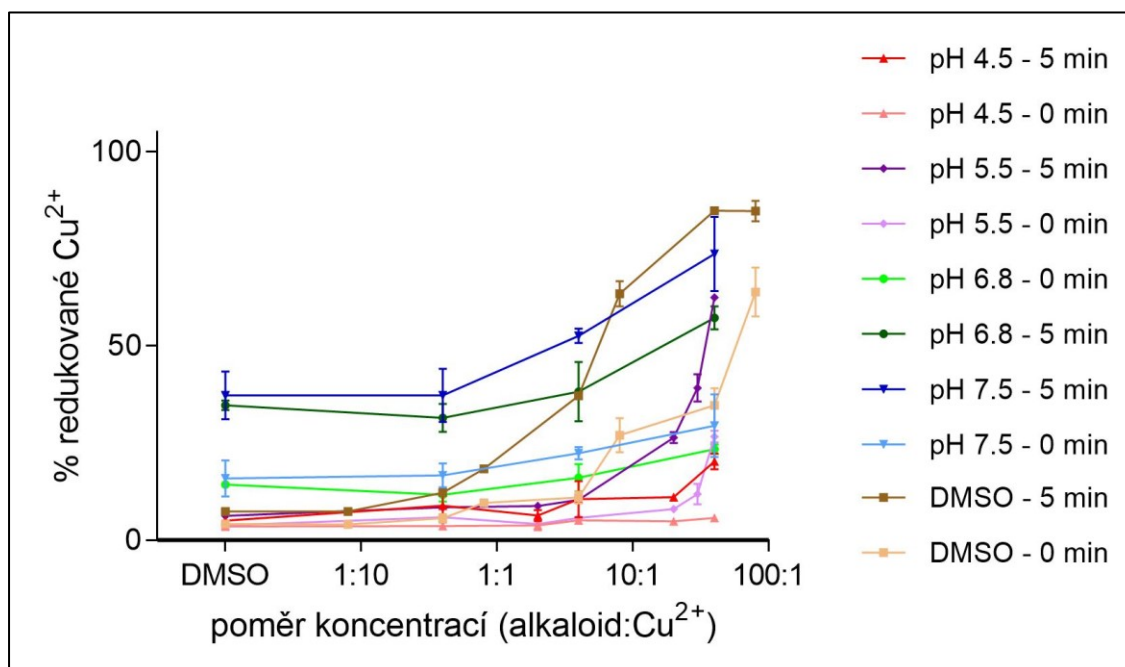


Obrázek 31 - Měď-redukující účinky (-)-escholtzinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

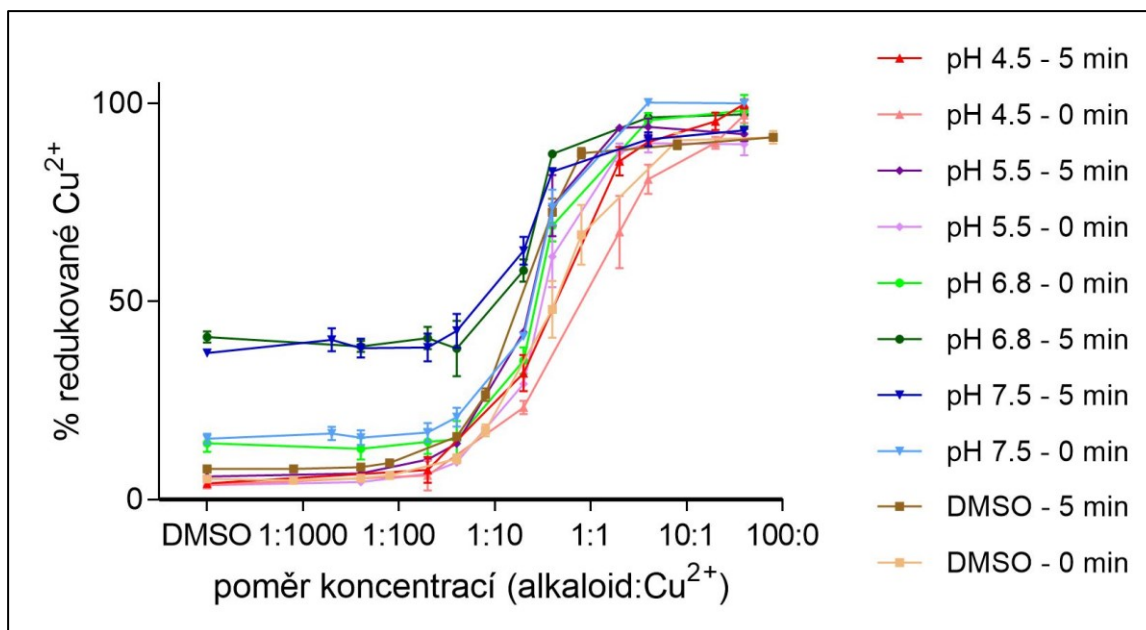


Obrázek 32 - Měď-redukující účinky platycerinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

9.3.4 Alkaloidy spirobenzylisochinolinového typu



Obrázek 33 - Měď-redukující účinky (-)-fumaricinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min



Obrázek 34 - Měď-redukující účinky (+)-parfuminu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min

10. Diskuze

Isochinolinové alkaloidy jsou hned po indolových alkaloidech druhou největší skupinou alkaloidů, které nalezneme ve vyšších rostlinách. Alkaloidy se vyznačují řadou aktivit a jejich význam je nepochybný. [56] Mezi isochinolinové alkaloidy můžeme zahrnout několik strukturních typů, např. aporfinové, morfinanové, pavinanové, spirobenzylisochinolinové a další. Právě těmito strukturními typy se naše práce zabývala. Měď je v lidském organismu důležitá, ale existuje mnoho patologických stavů, u kterých jsou popisovány zvýšené hladiny mědi v organismu. Mezi taková onemocnění můžeme zařadit neurodegenerativní onemocnění (AD a PD), aterosklerózu, nádorová onemocnění a další. [33, 41] Právě pochopení patogeneze takových onemocnění je důležité k vývoji nových látek, které by byly využitelné v terapii těchto onemocnění. U nových potenciálních látek se výzkum zabývá např. zjištěním jejich měď-chelatační a měď-redukující aktivity. Katedra farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, se již mnoho let zabývá testováním právě isochinolinových alkaloidů, jakožto potenciálních látek v léčbě některých z těchto onemocnění.

Cílem mé diplomové práce bylo stanovit měď-chelatační a měď-redukující aktivitu u vybraných alkaloidů. Bylo vybráno 5 aporfinových alkaloidů, 1 morfinanový alkaloid, 3 pavinanové alkaloidy a 2 spirobenzylisochinolinové alkaloidy. Pro stanovení takových aktivit *in vitro* existuje více metod. K mému měření bylo použito spektrofotometrické měření, které je rychlé, relativně levné a ověřené. K zjištění měď-chelatační aktivity byly použity dvě kompetitivní metody, založené na dvou různých indikátorech (HEM, BCS). První metodou byla metoda hematoxylinová, u které se používá indikátor hematoxylin. HEM chelatuje měďnaté ionty Cu^{2+} , se kterými vytváří stabilní komplexy. Tyto komplexy jsou však v porovnání s komplexy, které tvoří BCS méně stabilní. Druhou metodou byla metoda bathocuproinová, u které používaný indikátor BCS chelatuje měďné Cu^+ ionty, se kterými poté vytváří více stabilní komplexy. BCS je tedy silně kompetitivní indikátor. BCS se využívá také ke stanovení chelatační aktivity měďnatých iontů Cu^{2+} , které před vlastním stanovením musí být redukovány HA. [88] Druhá zmíněná metoda byla použita také pro stanovení měď-redukující aktivity vybraných alkaloidů. Principem této metody je přidání indikátoru BCS k měďnatým iontům Cu^{2+} , které s ním normálně nereagují. Pokud dojde k tvorbě měďných iontů Cu^+ , tedy

dojde-li k redukci, vytvoří BCS s měďnými Cu^+ ionty komplex, který vykazuje určitou hodnotu absorpance, která je spektrofotometricky změřena.

10.1. Měď-chelatační aktivita

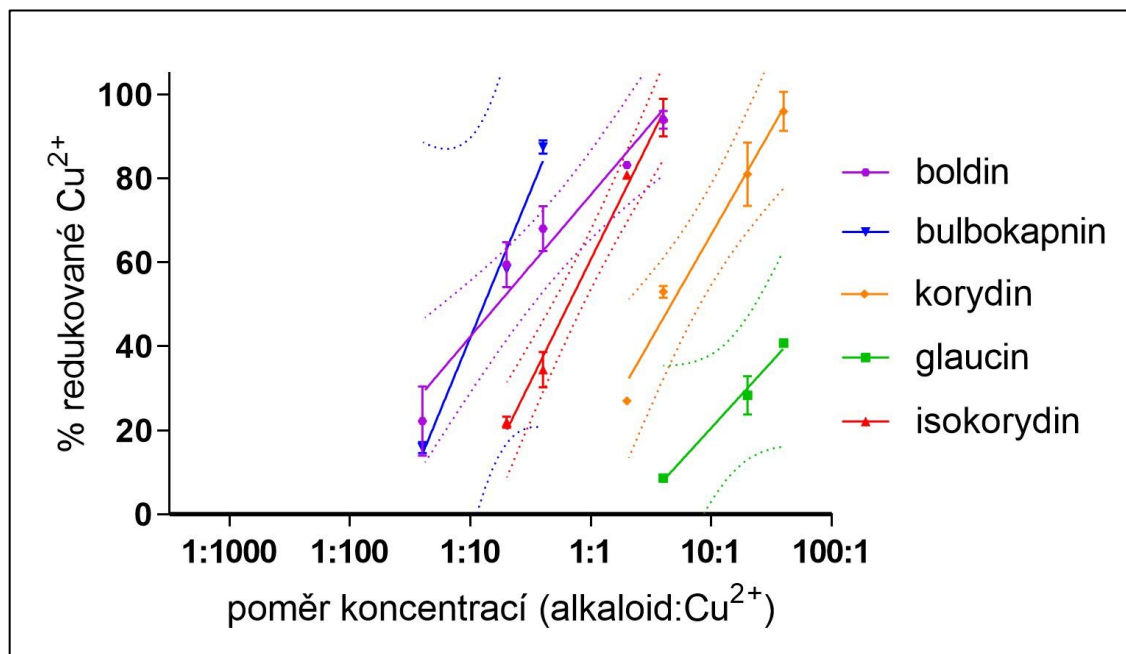
První metodou, kterou byla měřena měď-chelatační aktivita, byla metoda hematoxylinová. Hematoxylin vytváří s měďnatými ionty Cu^{2+} komplexy v prostředích o pH 5.5, 6.8 a 7.5. Tyto komplexy poté vykazují určitou hodnotu absorpance a jsou proto stanovovány pomocí spektrofotometrických metod. Vzhledem k tomu, že HEM je slabě kompetitivní indikátor, vytváří s ionty mědi méně stabilní komplexy v porovnání s BCS. Afinita HEM k mědi klesá se snižujícím se pH, a proto není toto činidlo vhodné pro měření při nízkých hodnotách pH. [95] Proto všechna měření s ním byla prováděná pouze v prostředích o výše zmíněném pH. V těchto podmínkách žádný z alkaloidů chelatační aktivitu nevykazoval. Na základě předchozích studií, které se zabývaly měřením železo-chelatační aktivity alkaloidů vyplývá, že chelatační aktivitu mohou v prostředí DMSO vykazovat i alkaloidy, které chelatační aktivitu v prostředí pufrů nevykázaly. [89] Vzhledem k tomu, že HEM není za těchto podmínek použitelný, byla k měření měď-chelatační aktivity použita také druhá bathocuproinová metoda. V této metodě je používán vysoce specifický BCS. Tento chelátor se využívá k měření měď-chelatační aktivity měďných iontů Cu^+ , se kterými vytváří stabilnější komplexy v širším rozmezí pH (4.5, 5.5, 6.8 a 7.5). Může se využít také pro měření měď-chelatační aktivity měďnatých iontů Cu^{2+} , které však před vlastním stanovením musí být redukovány HA, jelikož BCS chelatuje pouze měďné ionty. Touto metodou byla proměřena chelatační aktivita u všech testovaných alkaloidů, ale ani tady žádný alkaloid nevykazoval významnou schopnost chelatace. Naše výsledky měření nemůžeme s žádnými výsledky z dostupných publikací porovnat, jelikož studie na měď-chelatační aktivitu našich alkaloidů dosud nebyly provedeny.

10.2. Měď-redukující aktivita

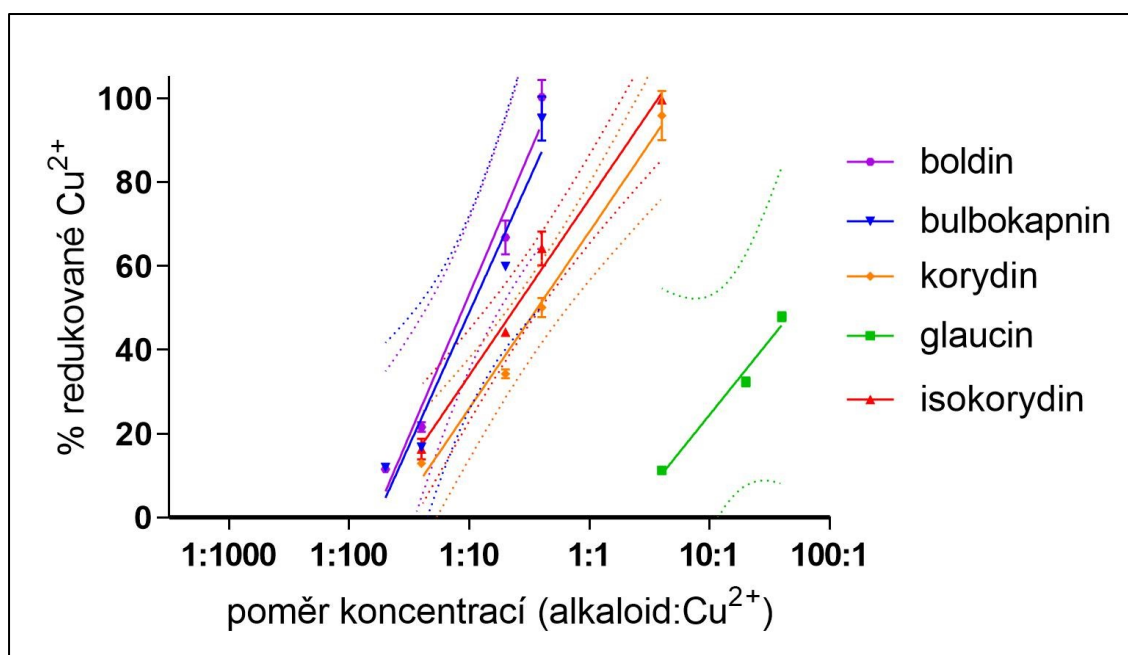
Většina mědi v lidském organismu se vyskytuje ve formě měďnatých iontů Cu^{2+} , které se vlivem silného redukčního činidla mohou redukovat na ionty měďné Cu^+ . Ty jsou zodpovědné za tvorbu volných kyslíkových radikálů např. hydroxylového radikálu, který je pro tělo nebezpečný. [53] V rámci této práce bylo cílem zjistit, jakou mají vybrané alkaloidy schopnost redukovat měďnaté ionty na ionty měďné. Měď-redukující aktivita byla stanovována *in vitro* v prostředích o různých pH (4.5, 5.5, 6.8, 7.5) a při různých koncentracích. Ze získaných hodnot měď-redukujících aktivit jednotlivých alkaloidů byly sestrojeny grafy (Obr. č. 24–34), které znázorňují měď-redukující aktivitu alkaloidů v prostředích o různém pH a v prostředí DMSO. Z grafů je patrné, že měď-redukující aktivita je závislá na čase (0 min vs. 5 min). Aby bylo možné porovnat aktivitu jednotlivých alkaloidů z určité strukturní skupiny (alkaloidy aporfinové, pavinanové, spirobenzylisochinolinové), byly sestrojeny přímky lineární regrese s 95% konfidenčními intervaly, které jsou viditelné na obrázcích č. 35–49. Na těchto grafech jsou zaneseny alkaloidy při jednotlivých prostředích pH (4.5, 5.5, 6.5 a 7.8) a v prostředí DMSO. Graf morfinanového alkaloidu (-)-sinoakutinu nebyl vytvořen, jelikož byl jediným zástupcem a jeho aktivita nemá být s čím porovnána. Porovnáme-li však jeho aktivitu (Obr. č. 29) s dalšími látkami ostatních strukturních typů, pak jsou jeho redukční účinky srovnatelné s látkami, které mají ve své struktuře jednu hydroxylovou skupinu, stejně jako (-)-sinoakutin, s výjimkou spirobenzylisochinolinového alkaloidu fumaricinu, který vykazuje významně nižší aktivitu (Obr. č. 33).

Všechny námi testované aporfinové alkaloidy vykazovaly ve všech prostředích měřitelnou měď-redukující aktivitu (Obr. 35–39). Porovnáním aktivit jednotlivých alkaloidů je patrné, že na měď-redukující aktivitu má velký vliv počet hydroxylových skupin ve struktuře. Nejnížší měřitelnou aktivitu ze všech alkaloidů ve všech prostředích vykazoval glaucin, což může být vysvětleno absencí hydroxylové skupiny ve struktuře. Ostatní testované alkaloidy ve své struktuře obsahují minimálně jednu hydroxylovou skupinu. Nejvyšší aktivitu naopak vykazoval boldin v prostředích o pH 6.8 a 7.5 (Obr. 37, 38). V prostředích o pH 4.5, 5.5 (Obr. 35, 36) a v prostředí DMSO (Obr. 39) vykazoval srovnatelnou aktivitu jako ostatní alkaloidy (bulbokapnin, korydin a isokorydin). Nejvyšší aktivita boldinu může být vysvětlena přítomností dvou hydroxylových skupin ve struktuře molekuly. Bulbokapnin, korydin a isokorydin vykazovaly navzájem podobnou aktivitu, která může být vysvětlena přítomností

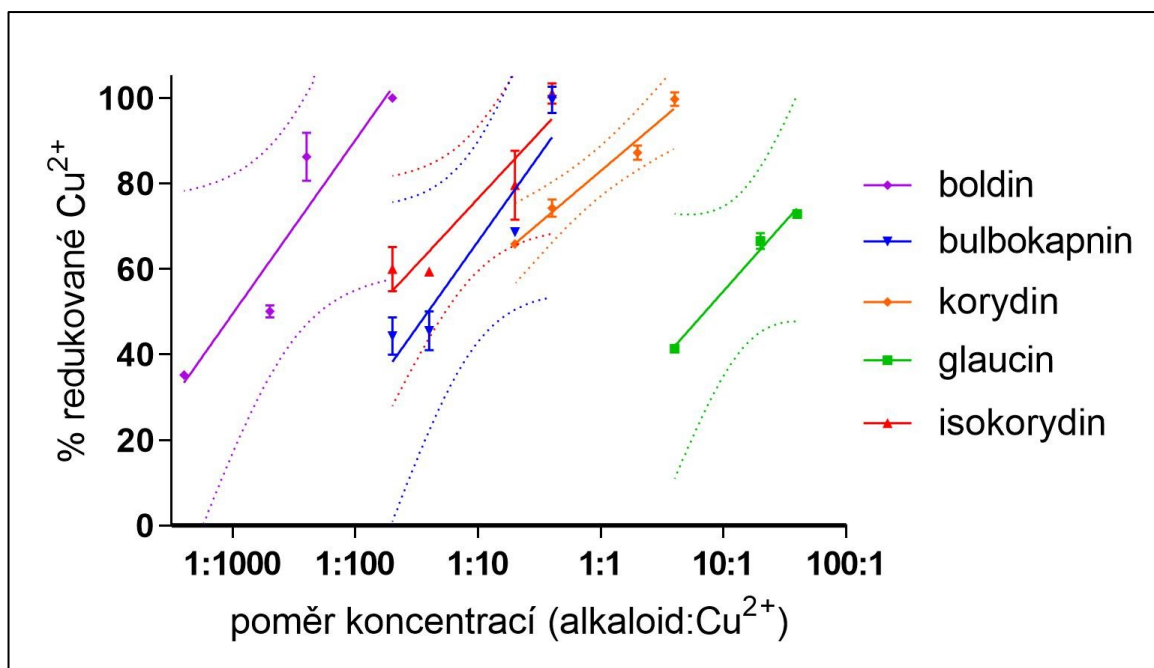
jedné hydroxylové skupiny ve struktuře alkaloidu. Ačkoliv je známo, že nejen počet, ale také poloha hydroxylových skupin může mít velký vliv na redukční účinky látek [90], v případě námi testovaných aporfinových alkaloidů se zdá, že poloha hydroxylové skupiny nemá na jejich redukční účinky vliv.



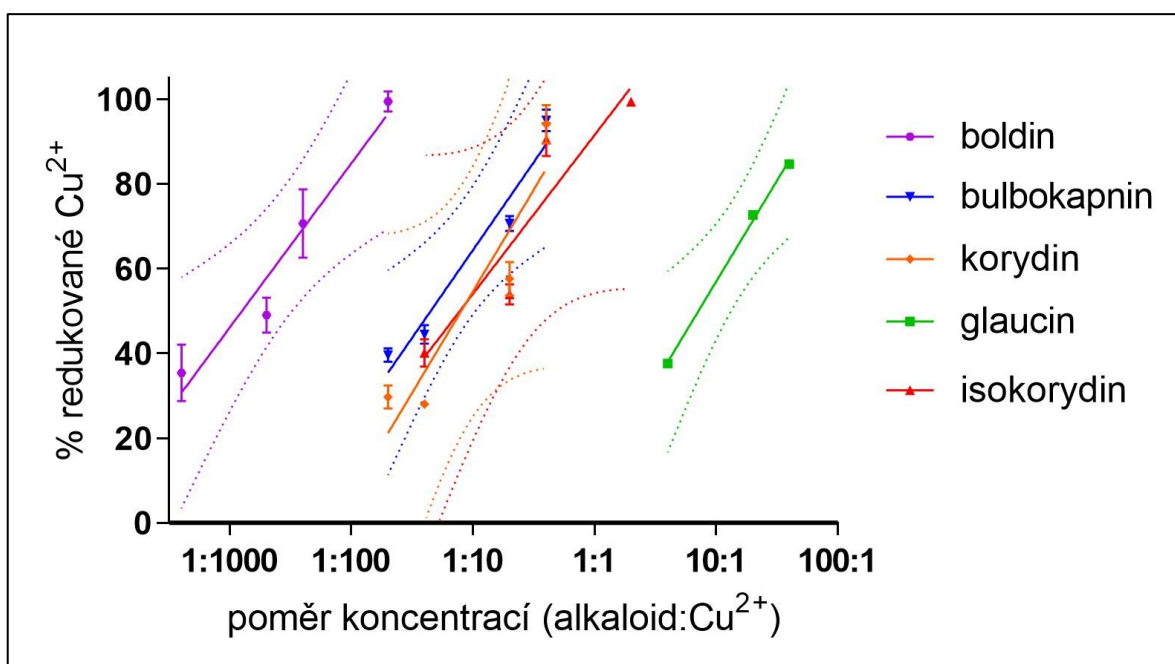
Obrázek 35 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 4.5



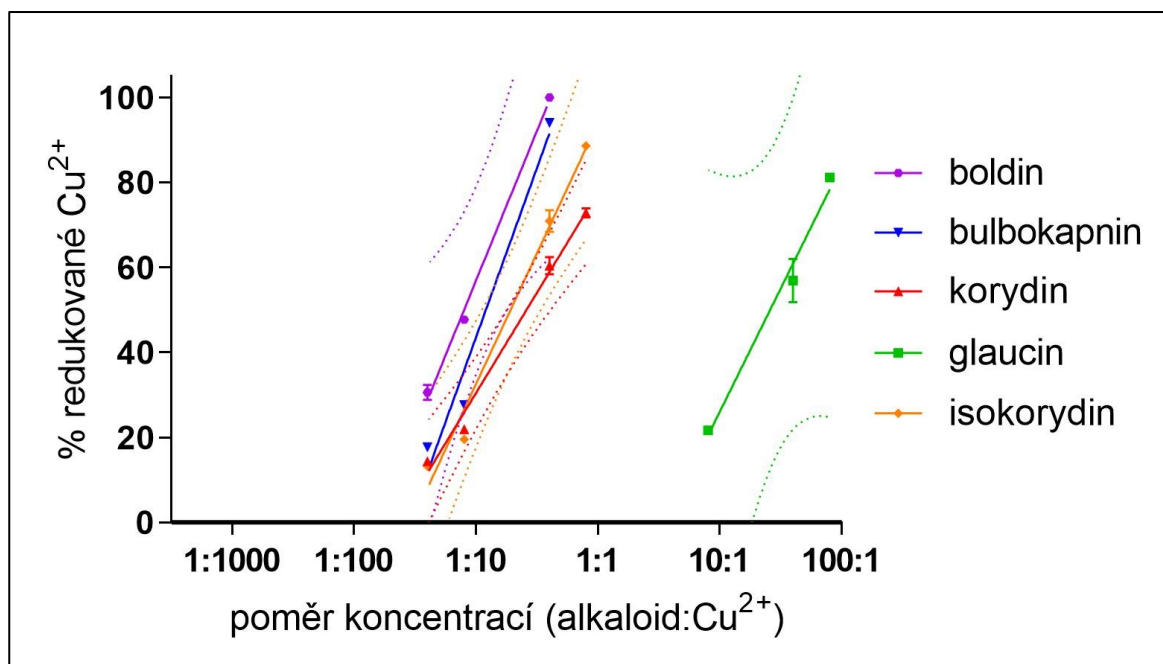
Obrázek 36 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 5.5



Obrázek 37 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 6.8

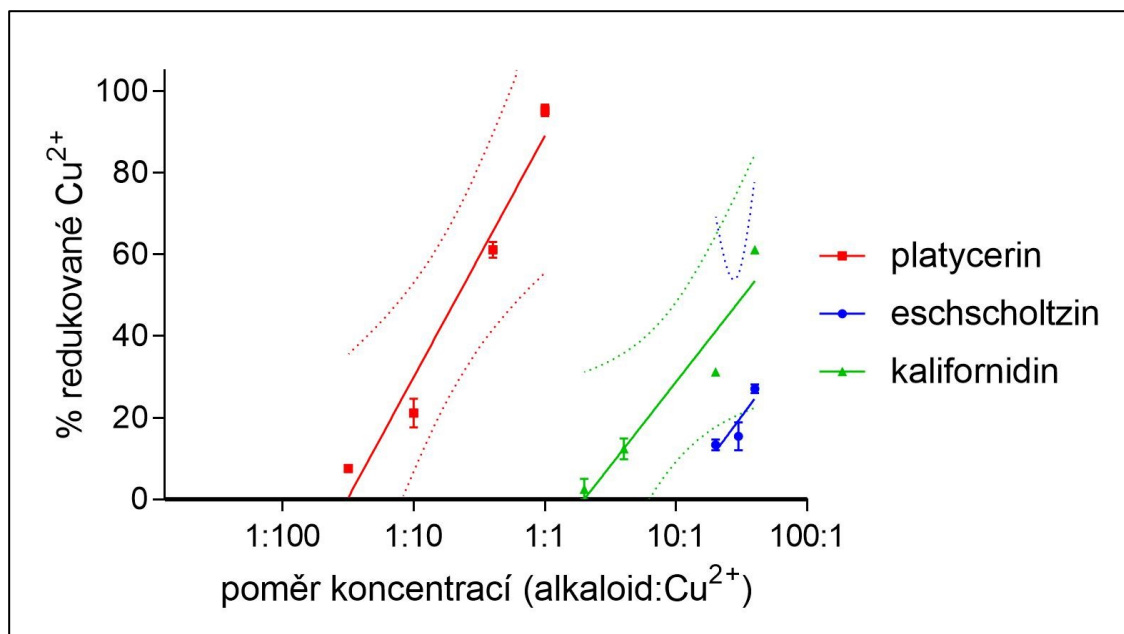


Obrázek 38 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 7.5

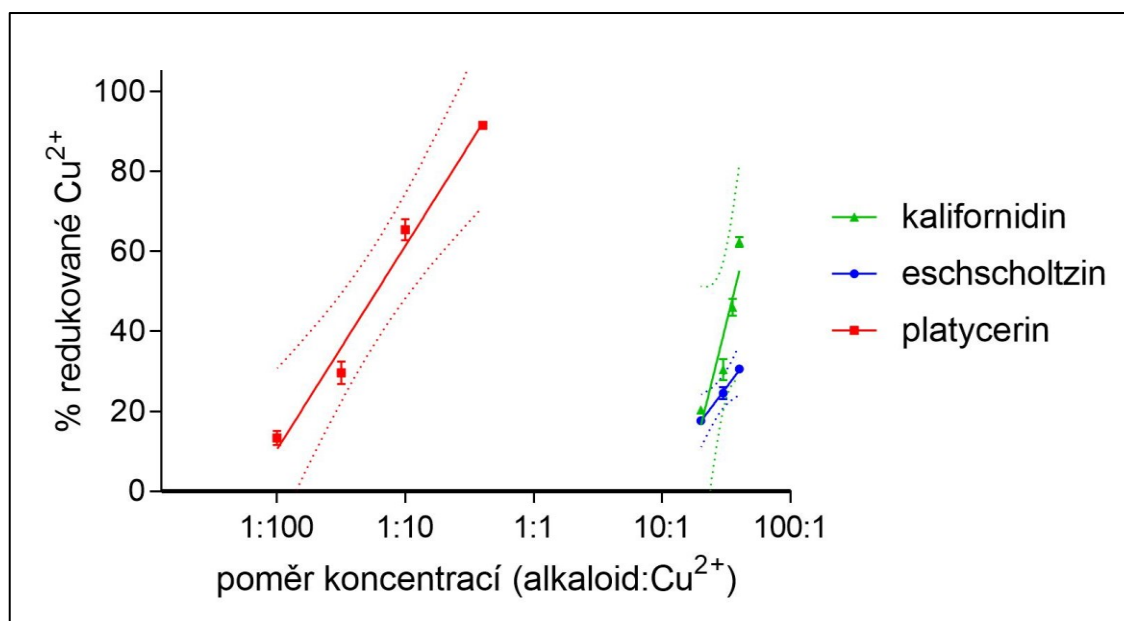


Obrázek 39 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů v prostředí DMSO

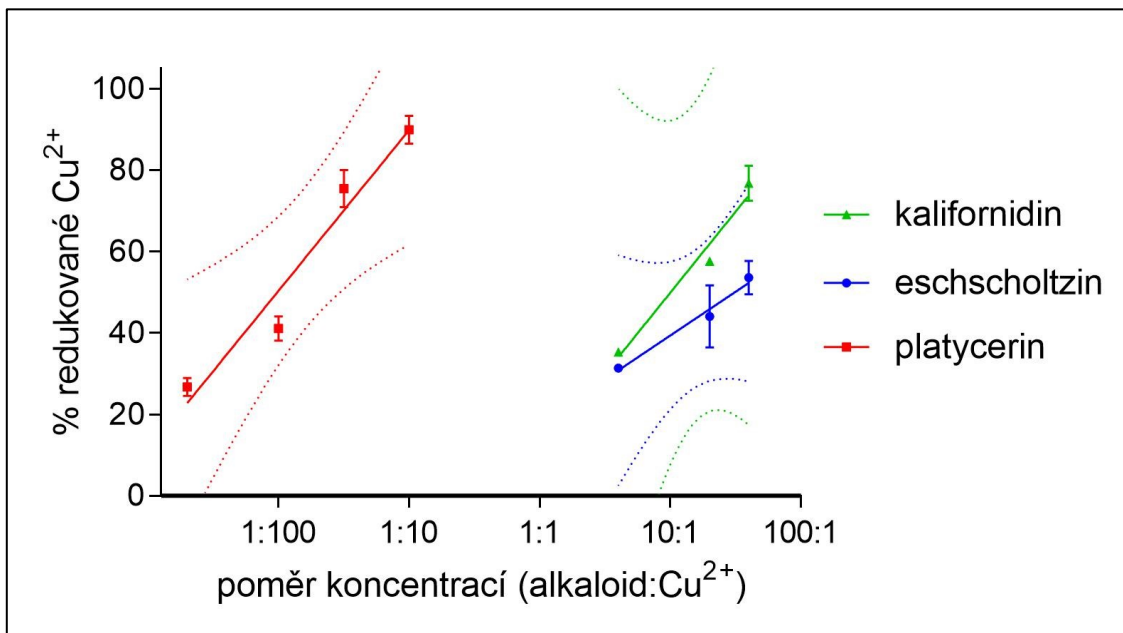
Všechny námi testované pavinanové alkaloidy vykazovaly ve všech prostředích měřitelnou měď-redukující aktivitu (Obr. 40-44). Stejně jako u přechozí skupiny alkaloidů je patrné, že na měď-redukující aktivitu má velký vliv počet hydroxylových skupin ve struktuře. Nejnížší měřitelnou aktivitu vykazoval escholtzin, druhou nejnížší aktivitu vykazoval kalifornidin. Jejich nízká aktivita může být vysvětlena absencí hydroxylové skupiny ve struktuře. Nejvyšší aktivitu ve všech prostředích vykazoval platycerin, který ve své struktuře obsahuje jednu hydroxylovou skupinu.



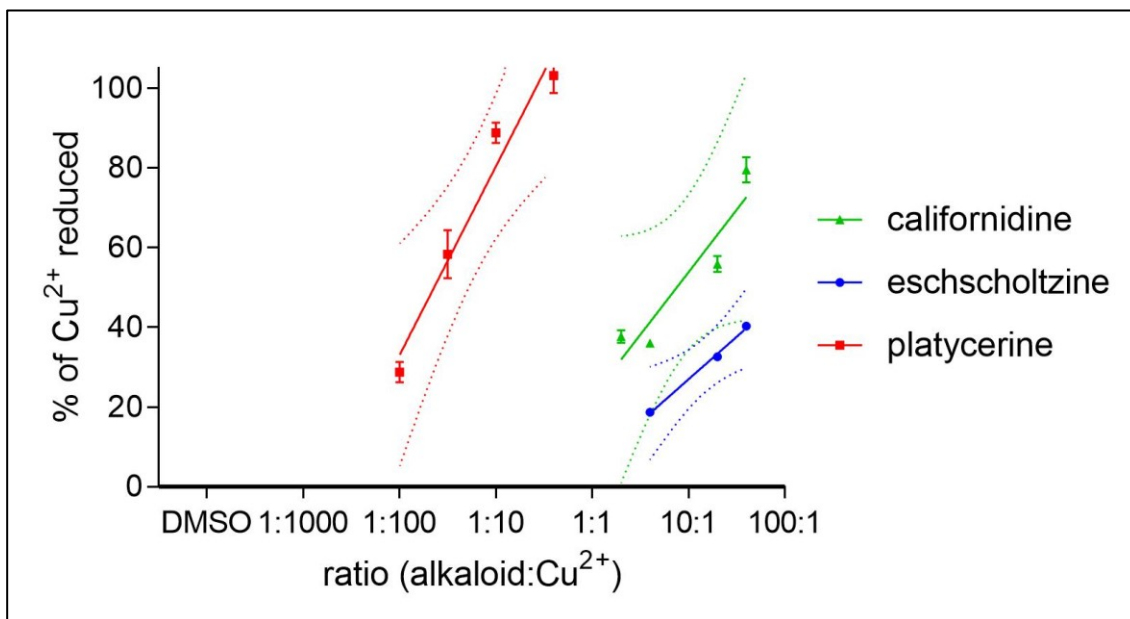
Obrázek 40 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů při pH 4.5



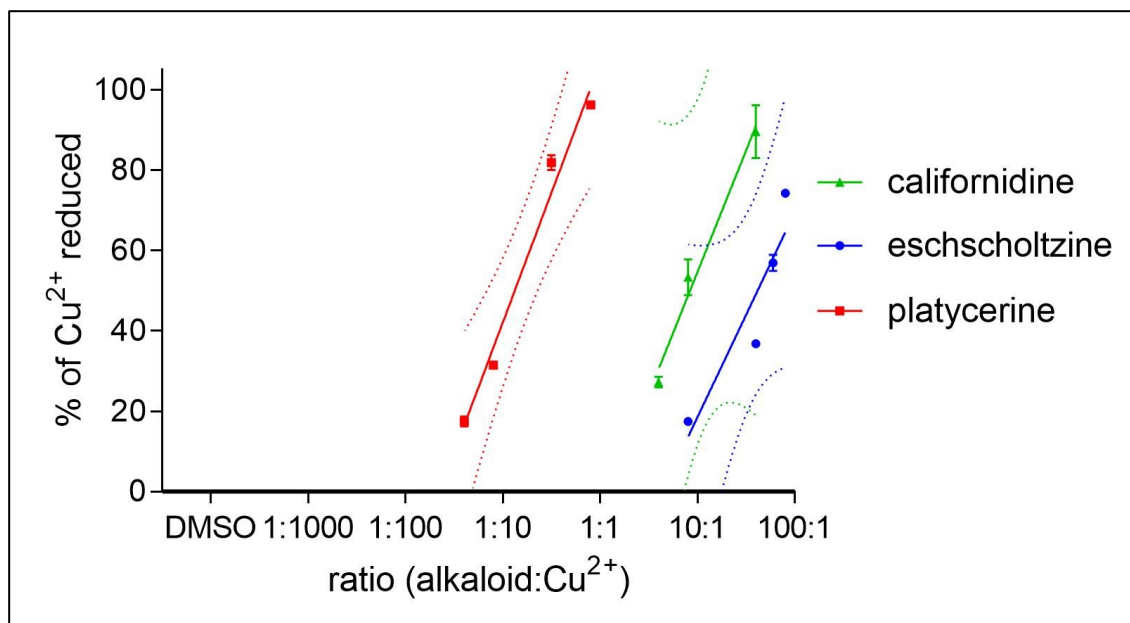
Obrázek 41 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů při pH 5.5



Obrázek 42 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů při pH 6.8

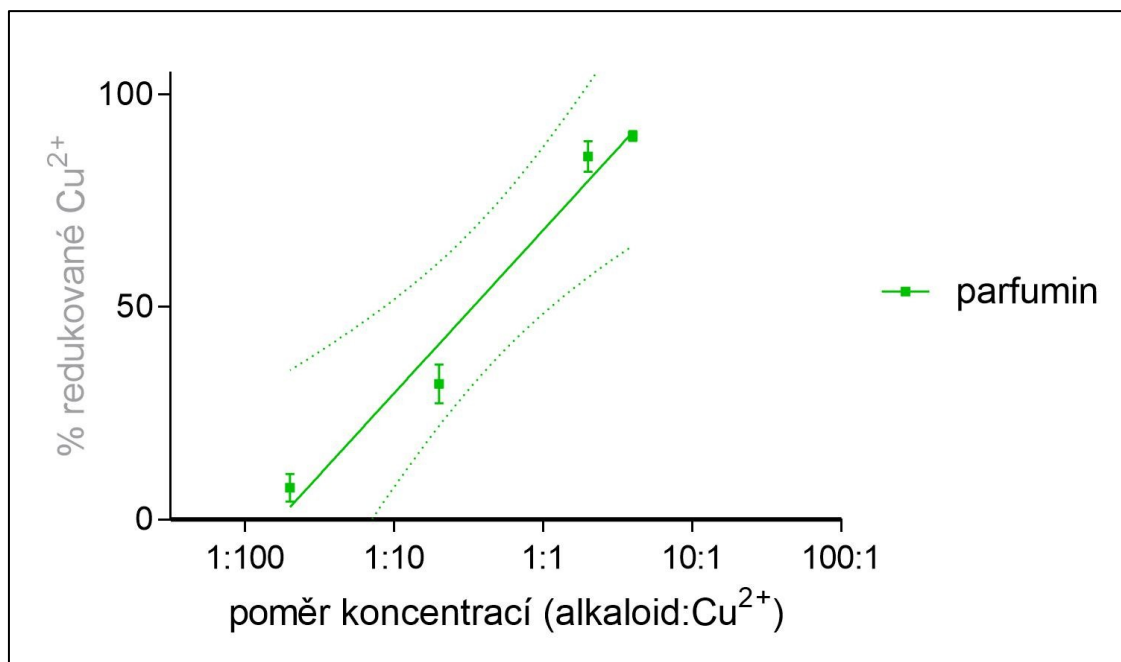


Obrázek 43 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů při pH 7.5

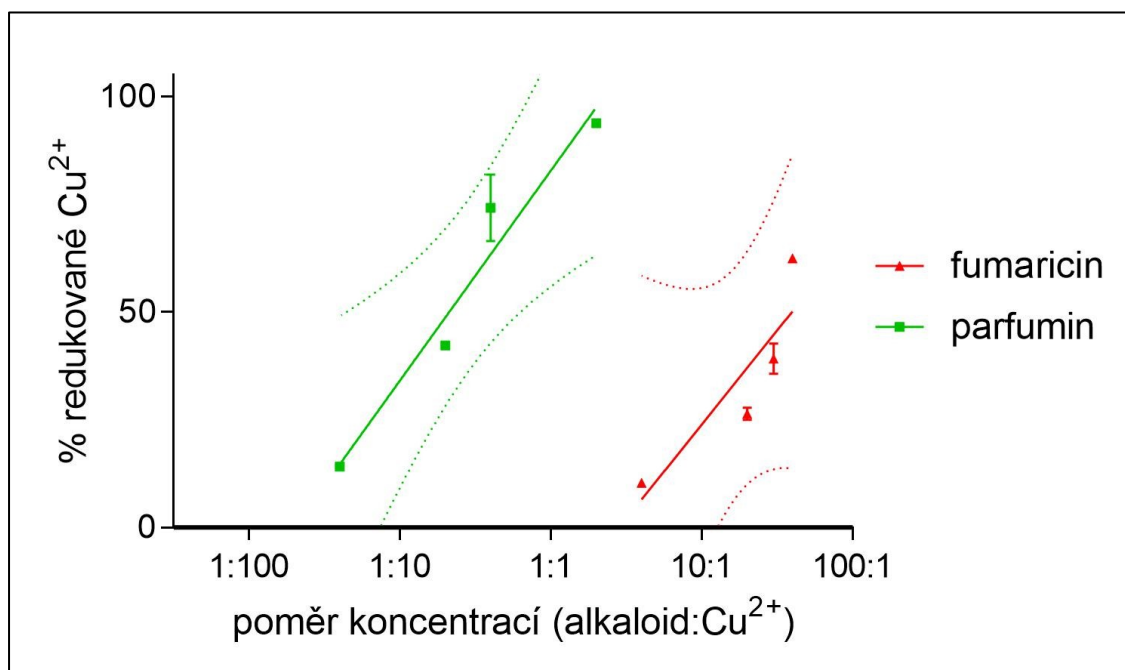


Obrázek 44 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů v prostředí DMSO

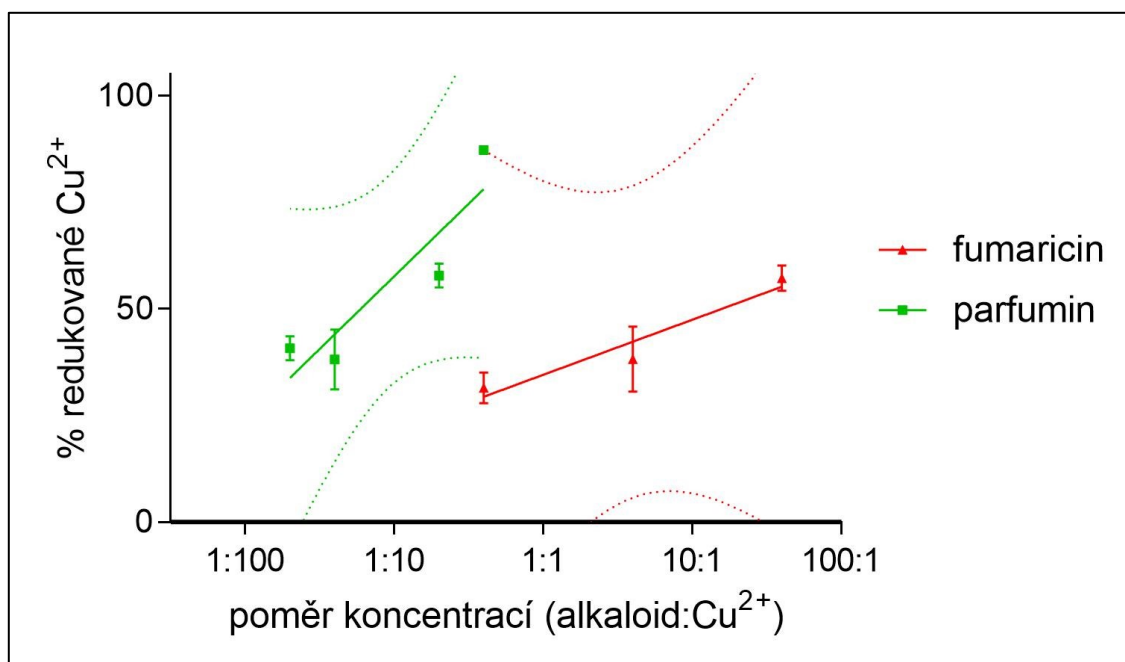
Z alkaloidů spirobenzylisochinolinového typu vykazoval při pH 4.5 (Obr. 45) měřitelnou měď-redukující aktivitu pouze parfumin. V ostatních prostředích vykazovaly měřitelnou aktivitu oba testované alkaloidy (Obr. 46-49). Měď-redukující aktivita je vyšší u parfuminu ve všech prostředích v porovnání s fumaricinem. Oba testované alkaloidy obsahují ve své struktuře jednu hydroxylovou skupinu, je tedy zřejmé, že na aktivitu látek této skupiny má také vliv poloha hydroxylové skupiny, jak je tomu i u jiných typů látek [90]. U parfuminu je hydroxylová skupina navázána přímo na isochinolinovém skeletu. U fumaricinu je hydroxylová skupina navázána na cyklopentanovém kruhu, který je na isochinolinový skelet připojen. Je tedy zřejmé, že alkaloidy s hydroxylovou skupinou na isochinolinovém skeletu vykazují větší měřitelnou měď-redukující aktivitu v porovnání s alkaloidy, který hydroxylovou skupinu mají navázanou na jiné části molekuly.



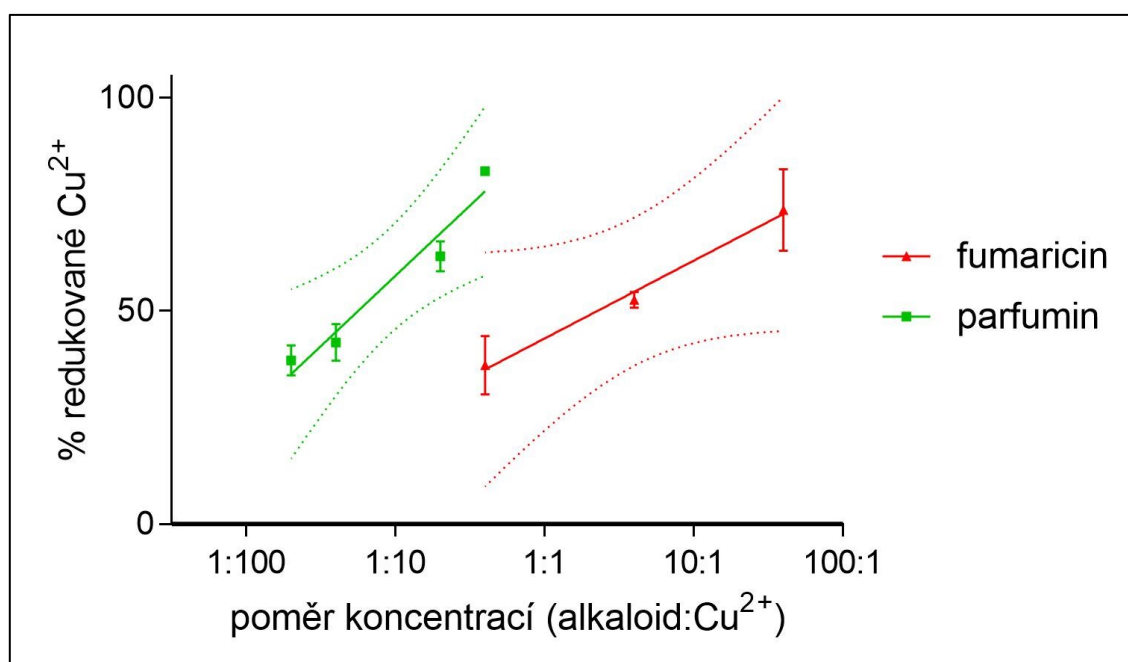
Obrázek 45 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 4.5



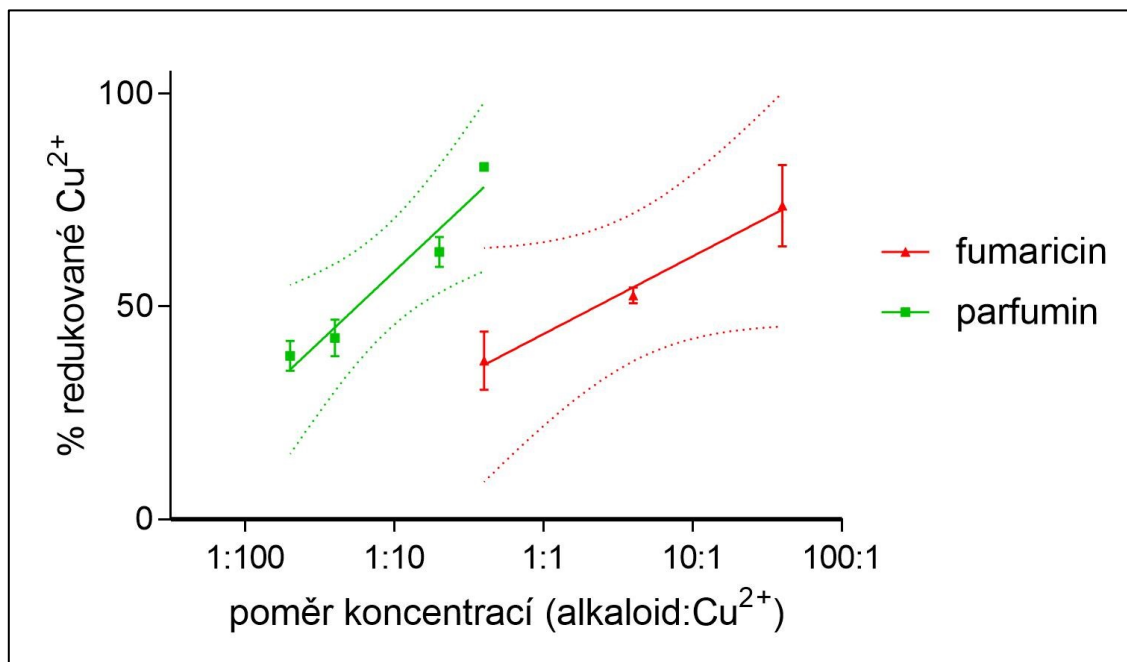
Obrázek 46 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 5.5



Obrázek 47 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 6.8



Obrázek 48 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 7.5



Obrázek 49 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů v prostředí DMSO

11. Závěr

Na základě jednoduchého spektrofotometrického měření a dvou metod (hematoxylinová a bathocuproinová) byly kvantifikovány měď-chelatující a měď-redukující účinky u čtyř strukturních typů isochinolinových alkaloidů: aporfinových (boldinu, isokorydinu, bulbokapninu, korydinu, glaucinu), morfinanového (sinoakutinu), pavinanových (kalifornidinu, escholtzinu, platycerinu) a u spirobenzylisochinolinových (fumaricinu, parfuminu). Cílem této diplomové práce bylo změřit jejich aktivitu a poté porovnat jejich aktivitu se strukturou. Chelatační aktivitu nevykazoval ani jeden z námi testovaných alkaloidů. Redukční aktivitu vykazovaly všechny testované strukturní typy. Nejvyšší měřitelnou měď-redukující aktivitu ze všech testovaných alkaloidů vykazoval aporfinový alkaloid boldin. Boldin jako jediný zástupce ze všech obsahuje ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny, které jsou pravděpodobně důvodem jeho nejvyšší redukční aktivity. Druhou nejvyšší měřitelnou aktivitu vykazovaly alkaloidy, které ve své struktuře obsahovaly jednu hydroxylovou skupinu. Alkaloidy s absencí hydroxylové skupiny vykazovaly aktivitu nejnižší.

12. Použitá literatura

- 1) Pavelková M. et al.: Biologická role mědi jako základního stopového prvku v lidském organismu. *Česká a slovenská farmacie* 67, 143-153 (2018).
- 2) Angelova M. et al.: Copper in the human organism. *Trakia Journal of Science* 9, 1, 88-98 (2011). ISSN 1313-3551.
- 3) Prvky.com: <http://www.prvky.com/29.html>, staženo 12. 3. 2019.
- 4) Toužín J.: *Stručný přehled chemie prvků*. 1. vydání, Masarykova univerzita, Brno 2001. ISBN 80-210-2635-9.
- 5) Straka J.: <http://www.tabulka.cz/prvky/ukaz.asp?id=29>, staženo 21. 3. 2019.
- 6) Barthelmy D.: <http://webmineral.com/chem/Chem-Cu.shtml#XV6VLuMzblW>, staženo 12. 3. 2019.
- 7) Pechová A. et al.: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJBGD.htm staženo 12. 3. 2019.
- 8) Trojan S. a kolektiv: *Lékařská fyziologie*. 4. přepracované a doplněné vydání, Grada Publishing a.s., Praha 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- 9) Celostnimedicina.cz: <https://www.celostnimedicina.cz/med-a-jeji-vyznam-pro-nas-organismus.htm>, staženo 12. 3. 2019.
- 10) Institut Galenus: <https://www.galenus.cz/clanky/vyziva/mineraly-med>, staženo 12. 3. 2019.
- 11) DocPlayer.cz: <https://docplayer.cz/3492050-8-prednaska-mikroprvky-tema-prednasky-vyznam-a-charakteristika-mikroelementu-ve-vyzive-cloveka-cil-prednasky-zelezo-fe.html>, staženo 12. 3. 2019.
- 12) Lech T. et al.: Copper Concentration in Body Tissues and Fluids in Normal Subjects of Southern Poland. *Biological Trace Element Research* 118, 10-15 (2007).
- 13) Voet D. et al: *Biochemistry*. 4. vydání, John Wiley & Sons. ISBN: 978-0470-57095-1.
- 14) Ledvina M. et al.: *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. 2. vydání, Nakladatelství Karolinum, Praha 2009. ISBN 978-80-246-1416-8.
- 15) Masopust J.: *Klinická biochemie, požadování a hodnocení biochemických vyšetření, část II*. Nakladatelství Karolinum, Praha 1998. ISBN 80-7184-649-X.

- 16) Masopust J.: *Klinická biochemie, požadování a hodnocení biochemických vyšetření, část I.* Nakladatelství Karolinum, Praha 1998. ISBN 80-7184-648-1.
- 17) MeDila spol. s r. o.: <http://www.medila.cz/vysetreni/specificke-proteiny/cpl/>, staženo 12. 3. 2019.
- 18) Hellman N. E. et al.: Ceruloplasmin Metabolism and Function. *Annual Reviews of Nutrition* 22, 439-458 (2002). DOI: 10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457.
- 19) Racek J. et al.: Enzymy a volné radikály. *Chemické listy* 93, 774-780 (1999).
- 20) Lai X. et al.: Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry A European Journal* 24, 47-55 (2018).
- 21) Mačák J. et al.: *Patologie*. 2. doplněné vydání, Grada publishing a.s., Praha 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.
- 22) OldakQuill: File:Dopamine beta-hydroxylase reaction.svg, odkaz: User:OgreBot/Uploads_by_new_users/2015_October_02_18:00, staženo 15. 3. 2019.
- 23) Kvasnička J.: *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. 1. vydání, Grada publishing a.s., Praha 2003. ISBN 80-7169-993-4.
- 24) Collins J. F.: Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews* 68, 3, 133-147 (2010). DOI: 10.1111/j.1753-4887.2010.00271.x.
- 25) Silbernagl S., Lang F.: *Atlas patofyziologie člověka*. 2. české vydání, Grada Publishing a.s., Praha 2012. ISBN 978-80-247-3555-9.
- 26) Zadák Z.: *Magnézium a další minerály, vitaminy a stopové prvky ve službách zdraví*. 1. vydání, Adamira, Břeclav 2010. ISBN 978-80-904217-0-7.
- 27) Radvan Z.: *Kovy kolem nás – Měď*. Regena 10/2011.
- 28) European Food Safety Authority: Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals (2006). ISBN 92-9199-014-0.
- 29) Růžička E. et al.: *Dyskinetické syndromy a onemocnění, Extrapyramidová onemocnění II*. 1. vydání, Galén, Praha 2002. ISBN 80-7262-154-8.
- 30) Mareček Z.: *Wilsonova choroba (Hepatolentikulární degenerace)*. 1. vydání, Galén, Praha 1996. ISBN 80-85824-37-X.
- 31) Fernandes J. et al.: *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*. 4. vydání, Triton, Praha 2008. ISBN 80-7387-096-6.

- 32) Tümer Z. et al.: Menkes disease. *European Journal of Human Genetics* 18, 511-518 (2010). DOI:10.1038/ejhg2009.187.
- 33) Stelmashook E. V. et al.: Role of Zinc and Copper Ions in the Pathogenetic Mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Biochemistry (Moscow)* 79, 5, 391-396 (2014). ISSN 0006-2979.
- 34) Bucossi S. et al.: Copper in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis of Serum, Plasma, and Cerebrospinal Fluid Studies. *Journal of Alzheimer's Disease* 24, 175-185 (2011). DOI: 10.3233/JAD-2010-101473.
- 35) Squitti R. et al.: Non-ceruloplasmin bound copper and ATP7B gene variants in Alzheimer's disease. *Metallomics* 8, 863-873 (2016).
- 36) Squitti R. et al.: Commentary: The case for Abandoning Therapeutic Chelation of Copper Ions in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology* 8, Art. 503 (2017). DOI:10.3389/fneur.2017.00503.
- 37) Robert A. et al.: Regulation of Copper and Iron Homeostasis by Metal Chelators: A Possible Chemotherapy for Alzheimer's Disease. *Accounts of chemical research* 48, 1332-1339 (2015). DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00119.
- 38) Montes S. et al.: Copper and Copper Protein in Parkinson's Disease. Hindawi Publishing Corporation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Art.147251, 15 pages (2014). DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/147251>.
- 39) Gangania M. K. et al.: Role of Iron and Copper in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 32, 3, 353-356 (2017). DOI: 10.1007/s12291-016-0614-5.
- 40) Karpenko M. N. et al.: Role of Copper Dyshomeostasis in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 164, 5, 596-600 (2018). DOI: 10.1007/s10517-018-4039-4.
- 41) Owoade A. O. et al.: Free Radicals as Mediators of oxidative Damage and Disease. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 14, 2 Ser. II, 57-64 (2019).
- 42) Daniel K. G. et al.: Copper storage diseases: Menkes, Wilson's and cancer. *Frontiers in Bioscience* 9, 1, 2652-2662 (2004).
- 43) Denoyer D. et al.: Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics* 7, 1459-1476 (2015). DOI: 10.1039/C5MT00149H.

- 44) Ferencikova V. et al.: Potential of selected trace elements in patients with diabetes mellitus. *Acta medica martiniana* 18, 3 (2018). DOI: 10.2478/acm-2018-0013.
- 45) Qiu Q. et al.: Copper in Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis and Systematic Review of Plasma and Serum Studies. *Biological Trace Element Research* 177, 53-63 (2017).
- 46) McNaught A. D. et al.: *IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). ISBN 0-9678550-9-8. Online version (2019) <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- 47) Flora G. et al.: Medical Countermeasures – Chelation Therapy. *Handbook of Arsenic Toxicology*, 589-618 (2015). DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-418688-0.00026-5>.
- 48) Flora S. J. S. et al.: Chelation in Metal Intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7, 2745-2788 (2010). DOI:10.3390/ijerph7072745.
- 49) Ding X. et al.: The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 301-310 (2011).
- 50) Ceccom J. et al.: Copper Chelator Induced Efficient Episodic Memory Recovery in a Non-Transgenic Alzheimer's Mouse Model. *Public Library of Science ONE* 7, 8, e43105 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0043105.
- 51) Kohen R. et al.: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* 30, 6, 620-650 (2002). DOI: 10.1080/01926230290166724.
- 52) Arredondo M. et al.: Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 313-327 (2005).
- 53) Ninh Pham A. et al.: Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of Catalysis* 301, 54-64 (2013).
- 54) Uriu-Adams J. Y. et al.: Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 268-298 (2005).

- 55) Debnath B. et al.: Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry* 9, 56-72 (2018).
- 56) Hošťálková A. et al.: Boldinové alkaloidy a perspektivy jejich využití. *Chemické listy* 109, 846-855 (2015).
- 57) O'Brien P. et al.: Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions* 159, 1-17 (2006).
- 58) Hošťálková A. et al.: Alkaloids from *Peumus boldus* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibition Activity. *Natural Product Communications* 10, 4, 577-580 (2015).
- 59) Yue-Xiu Si. Et al.: Effects of boldine on tyrosinase: Inhibition kinetics and computational simulation. *Process Biochemistry* 48, 152-161 (2013).
- 60) Zhong M. et al.: Asymmetric total synthesis of (*S*)-isocorydine. *Tetrahedron: Asymmetry* 26, 1145-1149 (2015).
- 61) Adsersen A. et al.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 1, 179-182 (2007). ISSN: 0378-8741.
- 62) Salminen et al.: Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 18, 6, 533-538 (2011). ISSN: 1618-095X.
- 63) Shin J. S. et al.: Inhibitory effects of bulbocapnine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neuroscience letters* 244, 3, 161-164 (1998). ISSN: 0304-3940.
- 64) Zetler G.: Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 296, 255-281 (1988).
- 65) Kondo Y. et al.: Suppression of Tumor Cell Growth and Mitogen Response by Aporphine Alkaloids, Dicine, Glaucine, Corydine and Apomorphine. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* 13, 426-431 (1990).
- 66) Cortijo J. et al.: Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: In vitro studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. *British Journal of Clinical Pharmacology* 12, 1641-1651 (1999).
- 67) Rühle K. H. et al.: Objective evaluation of dextromethorphan and glaucine as antitussive agents. *British Journal of Clinical Pharmacology* 17, 521-524 (1984).

- 68) Morteza-Semnami K. et al.: Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. *Fitoterapia* 74, 5, 493-496 (2003). ISSN: 0367-326X.
- 69) Asencio M. et al.: Biochemical and Behavioral Effects of Boldine and Glaucine on Dopamine System. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 62, 1, 7-13 (1999). ISSN: 0091-3057.
- 70) Hung T. M. et al.: Cholinesterase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Corydalis Tuber*. *Natural Product Sciences* 17, 2, 108-112 (2011).
- 71) Nikolaev V. O. et al.: Live Cell Monitoring of μ -Opioid Receptor-mediated G-protein Activation Reveals Strong Biological Activity of Close Morphine Biosynthetic Precursors. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 37, 27126-27132 (2007). DOI:10.1074/jbc.M703272200.
- 72) Kardos J. et al.: Pharmacodynamic Investigation of (\pm)-Salutaridine. *Arzneimittel Forschung – Drug Research* 34 (II), 12, 1758-1759 (1984).
- 73) Bao G. H. et al.: Morphinane alkaloids with cell protective effects from *Sinomenium acutum*. *Journal of Natural Products* 68, 7, 1128-1130 (2005).
- 74) Bednaříková L.: *Biologicky aktivní metabolity rostlin 4. Alkaloidy Eschscholtzia californica CHAM. a jejich biologická aktivita*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2011. Repozitář diplomových prací UK [online].
- 75) Assessment report on *Eschscholzia californica* Cham., herba. EMA/HMPC/6803 75/2013.
- 76) Cahlíková L. et al.: Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia* 103, 192-196 (2015). ISSN: 1873-6971.
- 77) Horčíčková Z.: *Biologicky aktivní metabolity rostlin. I. Alkaloidy Eschscholtzia californica Cham. a jejich inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2011. Repozitář diplomových prací UK [online].
- 78) Adamcová M.: *Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z Argemone grandiflora (Papaveraceae) I.* Univerzita Karlova, Hradec Králové 2015. Repozitář diplomových prací UK [online].
- 79) Malý L.: *Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z Fumaria officinalis L. (Fumariaceae) II.* Univerzita Karlova, Hradec Králové 2014. Repozitář diplomových prací UK [online].

- 80) Maiza-Benabdesselam F. et al.: Antioxidant activities of alkaloid extracts of two Algerian species of Fumaria: Fumaria capreolata and Fumaria bastardii. *Records of Natural Products* 1:2-3, 28-35 (2007).
- 81) Al-Ghazzawi A. M. et al.: Chemical constituents of Fumaria densiflora and the effects of some isolated spirobenzylisoquinoline alkaloids on murine isolated ileum and perfused heart. *Natural product research* (2019). DOI: 10.1080/14786419.2018.1550761.
- 82) Khamtache-Abderrahim S. et al.: Isoquinoline alkaloid fractions of Fumaria officinalis: Characterization and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Industrial Crops and Products* 94, 1001-1008 (2016).
- 83) Chlebek J. et al.: Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from Corydalis cava (Fumariaceae). *Natural Product Communications* 6, 5, 607-610 (2011).
- 84) Klíčová A.: *Alkaloidy dřeva druhu Liriodendron tulipifera L. a jejich biologická aktivita*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2018. Repozitář diplomových prací UK [online].
- 85) Cahlíková L. et al.: Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from Eschscholzia californica (Papaveraceae). *Natural Product Communications* 5, 7, 1035-1038 (2010).
- 86) Siatka T. et al.: Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from Argemone platyceras (Papaveraceae). *Molecules* 22, 1181 (2017). DOI: 10.3390/molecules22071181.
- 87) Chlebek J. et al.: Isoquinoline Alkaloids from Fumaria officinalis L. and Their Biological Activities Related to Alzheimer's Disease. *Chemistry & Biodiversity* 13, 91-99 (2016).
- 88) Říha M. et al.: In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *Royal Society of Chemistry Advances* 4, 32628-32638 (2014).
- 89) Rudolfová T.: *Železo-chelatační aktivita vybraných alkaloidů I*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2012-2013. Repozitář diplomových prací UK [online].
- 90) Karlíčková J. et al.: Isoflavones Reduce Copper with Minimal Impact on Iron *In Vitro*. Hindawi Publishing Corporation, *Oxidative Medicine and Cellular*

Longevity, Art. 437381, 11 pages (2015). DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/437381>.

13. Seznam tabulek

Tabulka 1- Průměrný obsah Cu ve vybraných potravinách (v mg/kg) - převzato z [20]	15
Tabulka 2- Naměřené hodnoty absorpčních potřebné pro sestavení kalibrační křivky	62

14. Seznam reakcí

Reakce 1- Přeměna superoxidových radikálů na peroxid vodíku – převzato z [19]	19
Reakce 2- Syntéza noradrenalinu (norepinefrinu) z dopaminu – převzato z [22]	21
Reakce 3- Fentonova reakce	34

15. Seznam obrázků

Obrázek 1 - Charakteristické vlasy u pacientů s Menkesovou chorobou – převzato z [32]	27
Obrázek 2- Vzorec kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA)	33
Obrázek 3- Vzorec kyseliny diethylentriaminpentaoctové (DTPA)	33
Obrázek 4 - Vzorec boldinu	35
Obrázek 5 - Vzorec isokorydinu.....	36
Obrázek 6 – Vzorec bulbokapninu	37
Obrázek 7 - Vzorec korydinu	37
Obrázek 8 - Vzorec glaucinu	38
Obrázek 9 - Vzorec sinoakutinu.....	39
Obrázek 10 - Vzorec kalifornidinu	40
Obrázek 11 - Vzorec escholtzinu	40
Obrázek 12 - Vzorec platycerinu	41
Obrázek 13 - Vzorec fumaricinu	42
Obrázek 14 - Vzorec parfuminu	42
Obrázek 15- Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci měďnatých iontů	50
Obrázek 16- Schéma mikrotitrační destičky při chelataci měďnatých iontů v pufru	51
Obrázek 17- Schéma mikrotitrační destičky při chelataci měďných iontů v pufru.....	53
Obrázek 18- Schéma mikrotitrační destičky při chelataci měďnatých iontů v DMSO	54
Obrázek 19 - Schéma mikrotitrační destičky při chelataci měďných iontů v DMSO	56
Obrázek 20- Schéma mikrotitrační destičky při chelataci měďnatých iontů v pufru hematoxylinem.....	57
Obrázek 21- Schéma mikrotitrační destičky při redukci měďnatých iontů v pufru	59

Obrázek 22 - Schéma mikrotitrační destičky při redukci měďnatých iontů v DMSO.....	60
Obrázek 23- Kalibrační křivka měďnatých iontů Cu^{2+}	62
Obrázek 24 - Měď-redukující účinky isokorydinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	64
Obrázek 25 - Měď-redukující účinky boldinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	64
Obrázek 26 - Měď-redukující účinky (+)-bulbokapninu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	65
Obrázek 27 - Měď-redukující účinky (+)-korydinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	65
Obrázek 28 - Měď-redukující účinky glaucinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	66
Obrázek 29 - Měď-redukující účinky (-)-sinoakutinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	66
Obrázek 30 - Měď-redukující účinky (-)-kalifornidinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	67
Obrázek 31 - Měď-redukující účinky (-)-escholtzinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	67
Obrázek 32 - Měď-redukující účinky platycerinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	68
Obrázek 33 - Měď-redukující účinky (-)-fumaricinu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	68
Obrázek 34 - Měď-redukující účinky (+)-parfuminu při různých hodnotách pH a v prostředí DMSO v časech 0 min a 5 min	69
Obrázek 35 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 4.5.....	73
Obrázek 36 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 5.5.....	73
Obrázek 37 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 6.8.....	74
Obrázek 38 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů při pH 7.5.....	74
Obrázek 39 - Porovnání měď-redukující aktivity aporfinových alkaloidů v prostředí DMSO ..	75
Obrázek 40 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů při pH 4.5.....	76
Obrázek 41 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů při pH 5.5.....	76
Obrázek 42 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů při pH 6.8.....	77

Obrázek 43 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů při pH 7.5	77
Obrázek 44 - Porovnání měď-redukující aktivity pavinanových alkaloidů v prostředí DMSO .	78
Obrázek 45 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 4.5.....	79
Obrázek 46 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 5.5.....	79
Obrázek 47 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 6.8.....	80
Obrázek 48 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů při pH 7.5.....	80
Obrázek 49 - Porovnání měď-redukující aktivity spirobenzylisochinolinových alkaloidů v prostředí DMSO.....	81