

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

INTERAKCE ESENCIÁLNÍCH AMINOKYSELIN S IONTY ŽELEZA

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

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

Hradec Králové, květen 2022

Jana Nadějová

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE
DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

INTERACTION OF ESSENTIAL AMINO ACIDS WITH IRON IONS

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Head of Department: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, May, 2022

Jana Nadějová

Poděkování

Tato diplomová práce byla vytvořena za využití přístrojů v rámci projektu OPVVV 02_16_017: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682: Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu (MOLABI), MŠMT ČR/Univerzita Karlova v Praze.

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, červen, 2022

jméno, příjmení

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Železo	10
3.1.1	Oxido-redukční potenciál železa	11
3.1.2	Funkce v organismu.....	11
3.1.3	Zdroje a příjem	12
3.1.4	Homeostáza železa a její regulace.....	13
3.1.5	Patologie při narušení homeostázy železa	14
3.2	Chelatace	17
3.2.1	Princip.....	18
3.3	Redukce železa	18
3.4	Aminokyseliny	18
3.4.1	Fyzikální a chemické vlastnosti aminokyselin	19
3.4.2	Rozdělení základních aminokyselin.....	21
3.4.3	Peptidy.....	25
3.4.4	Fyziologická funkce aminokyselin.....	26
3.4.5	Zdroje a příjem aminokyselin	27
3.4.6	Metabolismus aminokyselin.....	27
3.4.7	AMK pool	28
3.4.8	Vztah AMK k železu	29
3.4.9	Testované látky.....	31
4	Experimentální část	39
4.1	Materiál	39
4.2	Přístroje	39
4.3	Chemikálie	39
4.3.1	Chemikálie používané pro měření s ionty železa	39
4.3.2	Chemikálie používané pro přípravu pufrů.....	39
4.4	Testované látky	40
4.5	Používané programy a statistické vyhodnocení.....	40
4.6	Metodika měření s ionty železa	41
4.6.1	Příprava základních a pracovních roztoků pro měření iontů železa.....	41
4.6.2	Metodický postup stanovení chelatace železnatých iontů	42
4.6.3	Metodický postup stanovení chelatace železitých iontů	43
4.6.4	Metodický postup stanovení redukce železitých iontů.....	44

5	Výsledky.....	46
5.1	Kalibrační křivka iontů železa	46
5.2	Chelatační aktivita testovaných látek se železem – ferrozinová metoda	47
5.2.1	Chelatace železnatých iontů	47
5.2.2	Chelatace železitých iontů.....	52
5.3	Redukční aktivita testovaných látek.....	56
6	Diskuze	60
7	Závěr.....	63
8	Literatura.....	64
9	Zdroje obrázků a tabulek.....	67
10	Abstrakt.....	69
11	Abstract	70

Seznam použitých zkratk:

AMK	aminokyselina/y
APAP-CYS	adukty acetaminofenu a cysteinu
ATP	adenosintrifosfát
BCS	bathokuproinová metoda
CNS	centrální nervová soustava
DAAK	dekarboxylasa aromatických aminokyselin
DFO	deferoxamin mesylát
DFP	deferipron
EC 1.2.1.12	aspartát-semialdehyddehydrogenáza
EC 4.3.1.3	histidin amoniak-lyasa
Fe	železo
Fe ²⁺	železnaté ionty
Fe ³⁺	železité ionty
GABA	gama aminomáselná kyselina
GSH	glutathion
HA	hydroxylamin hydrochlorid
HFE	Human homeostatic iron regulator protein
MDS	myelodysplastický syndrom
NAC	<i>N</i> -acetylcystein
NF-kB	nukleární faktor-kappa B
Notch2	Neurogenic locus notch homolog protein 2 precursor
O ₂	kyslík
ROS	reaktivní forma/y kyslíku
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 Úvod

Železo řadíme mezi velmi důležité esenciální stopové prvky. Pro lidský organismus je nepostradatelné. Jako součást hemoglobinu hraje roli v přenosu a využití kyslíku v organismu, syntézu nukleových kyselin a mnoho dalších významných procesů. Jeho funkcí je především schopnost přeměny mezi dvěma oxidačními stavy, železnatým a železitým. Redoxní reakce je využito k syntéze svalového a krevního barviva. Tělo dospělého člověka obsahuje 3,5 - 4 gramy železa. Dojde-li k poruše metabolismu železa, projevem je jeho nadbytek či nedostatek. [3, 4, 5, 6]

Mezi příčiny nedostatku železa patří silné krvácení, nedostatečný přísun stravy bohaté na železo, malabsorpce či genetické defekty. Následně dochází k sideropenické anémii, která může vést k zastavení růstu buněk. [3, 4, 5]

Při nadbytku železa v organismu už není dostačující jeho běžné vylučování formou odlupujících se buněk střeva. Železo se hromadí v buňkách a může spouštět Fentonovu reakci, jejímž důsledkem je tvorba volných radikálů. Tyto radikály mohou poškodit různé buněčné struktury peroxidací membránových lipidů. Tento proces vede k poškození DNA, chromozomů, mitochondrií a je zodpovědný za vyšší tvorbu kolagenu. Dochází k fibrotizaci jaterní tkáně a slinivky, což má za následek nižší produkce inzulínu společně s ukládáním hemosiderinu a melaninu do kůže. Projevem této patologie je tzv. bronzový diabetes. Dochází k patologiím kardiovaskulárního systému jako jsou arytmie či srdeční selhání. Poruchy homeostázy železa mohou být i dědičné, např. hereditární hemochromatóza, jež je charakteristická zvýšenou absorpcí železa ve dvanáctníku. Další příčinou zvýšených hladin železa může být krevní transfuze, která se využívá k léčbě talasemie. Dříve se nadbytek železa léčil odběrem krve. Novějším způsobem léčby je chelatace železa pomocí vhodných chelátorů, což jsou látky vytvářející se železem komplex, který je z těla následně vyloučen. [3, 4, 5]

Chelátory železa by ideálně měly napodobovat struktury, které jsou pro organismus přirozené. Proto se tato diplomová práce zaměřuje na vybrané aminokyseliny a jejich interakce s ionty železa. [3, 5]

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit míru interakce iontů železa s aminokyselinami. S využitím spektrofotometru bylo provedeno *in vitro* stanovení železo-chelatační a železo-redukční aktivity vybraných aminokyselin (L-histidinu, L-methioninu, L-cysteinu, L-cystinu, L-asparagové kyseliny a L-glutamové kyseliny) a látky odvozené od L-cysteinu (*N*-acetylcysteinu) v pufrách o pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5, které odpovídají (pato)fyzilogickému prostředí v lidském organismu. Následně byly naměřené hodnoty zpracovány do grafů. Poté se zhodnotila míra aktivity jednotlivých látek a souvislost této aktivity s chemickou strukturou. Na závěr byly hodnoty aktivit vzájemně porovnány.

3 Teoretická část

3.1 Železo

V chemii řadíme železo do skupiny kovů (nikl, kobalt, měď, zinek atd.). Je to lesklý, stříbrosivý, kujný, tažný prvek s atomovým číslem 26, který řadíme do VIII.B skupiny periodické soustavy prvků. [4] Na planetě Zemi je nejčastějším prvkem právě železo, přičemž nejvíce tohoto prvku se nachází v Zemském jádře. Jako čtvrtý nejčastější prvek je zastoupen v Zemské kůře. Ve formě rud se nachází jako součást neživé přírody (různé oxidy; minerály magnetit, hematit a takonit). [4] Pro člověka patří železo do esenciálních stopových prvků, což jsou prvky pro život nezbytné. [1] Železo je nejenom významným stopovým prvkem a součástí hemoglobinu s těsným vztahem k transportu dýchacích plynů, ale ovlivňuje i celou řadu významných reakcí. [37]

V toxikologii se dříve železu nevěnovalo mnoho pozornosti. Popsáno bylo jen leptavé působení některých solí železa. Nověji se však začala jeho toxickému působení věnovat větší pozornost a byla popsána akutní otrava železem, jenž se rozděluje na několik fází. První nastane po krátké době latence a projevuje se krvavým průjmem a zvracením, což může mít za následek acidózu a kolaps. Následně dochází v průběhu hodin k hlubokému bezvědomí a ohrožení pacienta na životě. Ve čtyřech z pěti případů naopak příznaky charakteristické pro první fázi během 8-16 hodin přechodně ustupují, poté přichází razantní zhoršení stavu s kolapsem, jenž se rychle prohlubuje s epileptiformními křečemi. Toto je pro pacienta nejnebezpečnější období, které může být překonáno a přechází v rekonvalescenci, nebo nastává hluboké bezvědomí, kdy je život či uzdravení pacienta dále nejisté. [6]

Sloučeniny železnatých iontů (Fe^{2+}) při pozření zvířaty nejsou příliš toxické a nevedly k poškození ani chronicky. Některé zdroje uvádějí, že sloučeniny železitých iontů (Fe^{3+}) jsou méně jedovaté než sloučeniny Fe^{2+} , ale mají větší leptavý účinek. V jiných pramenech jsou oba typy sloučenin považovány za stejně jedovaté, proto tedy záleží na typu sloučeniny a způsobu aplikace. I když byla otázce vstřebávání železa z gastrointestinálního traktu, ve spojení s léčbou některých anémií, věnována velká pozornost, stále není vše zcela jasné. Venózní aplikace řady sloučenin železa se projevuje podstatně vyšší jedovatostí než při požití *per os*. [6]

Při vdechnutí dýmů, které obsahují mimo jiné oxidy železa, dochází ke dráždění dýchacích cest, jež může vyústit v onemocnění podobné horečce svářečů. K onemocnění dochází pouze při inhalaci chronické, ani při velké akutní expozici nedochází k horečce. [6]

3.1.1 Oxido-redukční potenciál železa

Za běžných podmínek existuje železo ve dvou stabilních oxidačních stavech jako Fe^{2+} a Fe^{3+} . Atomy železa se tak můžou účastnit redoxních (oxido-redukčních) reakcí. Tyto reakce jsou typické přenosem jednoho elektronu. V závislosti na charakteru vazeb a ligandů se mění redoxní potenciál $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ komplexně vázaného železa. Díky těmto unikátním chemickým vlastnostem železo hraje rozhodující roli v oxido-redukčním dění organismu. [2]

Železnaté ionty jsou běžně rozpustné ve vodě, přičemž vzniká komplex $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. V oxidační atmosféře za normálních podmínek dochází k rychlé oxidaci dvojmocného železa na železo trojmocné, jež je rozpustné ve vodě pouze za extrémně nízkého pH (nižší než 1) za vzniku komplexu $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$. Z toho vyplývá, že ve fyziologických podmínkách oxidační atmosféry a fyziologického pH je rozpustná forma železa prakticky nedostupná. Tento problém byl vyřešen zavedením nízkomolekulárních nosičů železa (sideroforů) s vysokou afinitou k železu a dobrou rozpustností ve vodě. [2]

Na druhou stranu oxido-redukční schopnost železa může být pro organismus i nebezpečná. Železo musí být v organismu pevně uloženo v bílkovinách a jeho metabolismus je nutné pečlivě regulovat, neboť železo volné se v organismu za běžných podmínek podílí na tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které vznikají i jako produkty metabolických drah. ROS hrají důležitou roli v patogenezi kardiovaskulárních chorob. Dochází-li k podstatnému poklesu pH pod 6 u akutního infarktu myokardu, následuje uvolňování volného železa se známými následky ROS. Proto chelatace železa může zeslabit některé důsledky ROS. Pokud však dojde k redukci železitých iontů na železnaté, je i tato situace nepříznivá a vede k intenzifikaci produkce ROS. [26]

Když reaguje trojmocné železo se superoxidovým aniontem, může vzniknout dvojmocné železo, které v reakci známé jako Fentonova reakce, reaguje s peroxidem vodíku za vzniku extrémně nebezpečného hydroxylového radikálu ($\cdot\text{OH}$): [2]

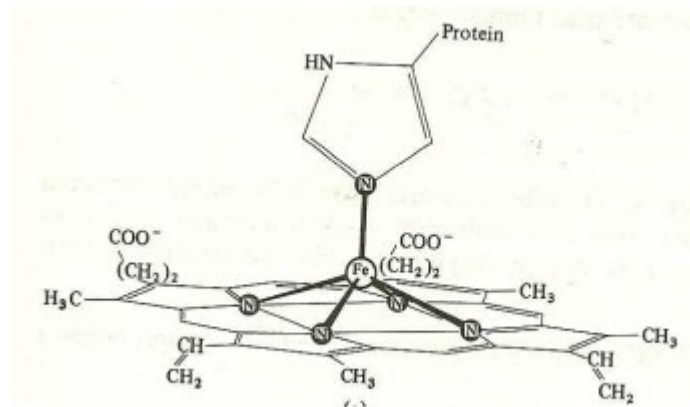


3.1.2 Funkce v organismu

Železo je základním prvkem podílejícím se na mnoha životně důležitých procesech. [26] Schopnost navázat kyslík (O_2) je nejdůležitější biologická vlastnost železa. Tato schopnost se vyvinula průběhem evoluce v krevní cirkulaci, kde je hemové železo v roli distributora O_2 do živočišných tkání. Železo má také důležitou roli v podobě součástí enzymů pro jeho oxido-redukční potenciál v metabolismu mnoha látek. [1]

3.1.2.1 Vazebná schopnost pro kyslík

Železo se váže na hemoproteiny (tak souhrnně nazýváme molekuly myoglobinu a hemoglobinu). Hemoglobin je složen z globinu (bílkovinné složky) a hemu (porfyrinového kruhu). Hemoglobin je bílkovina tvořená tetramerem globinových podjednotek. V každé podjednotce je obsažena jedna molekula hemu. Jedna molekula hemu váže jeden atom železa. Obsah železa zůstává v průběhu života stejný, na rozdíl od bílkovinné složky hemoglobinu. [1]



Obrázek č. 1 - hemoglobin

3.1.3 Zdroje a příjem

Železo můžeme najít v rostlinné i živočišné stravě. Vyskytuje se v různých formách a lidským organismem je zpracováváno s různým efektem. Tam, kde je vázáno na bílkoviny obsahující hem, pak hovoříme o hemovém železe. Když je vázáno na jiné molekuly, pak hovoříme o nehemovém železe. V rostlinné stravě je součástí různorodých nehemových enzymů a bílkovin. [1] Doporučený denní příjem železa je 20 mg, u žen je příjem vyšší. Denní ztráty železa tvoří 0,5 - 1 mg, u žen toto číslo dosahuje vyšších hodnot, a to 1,5 - 2 mg z důvodu těhotenství, porodu a menstruace, proto mají premenopauzální ženy nižší hladiny železa jako následek menstruace. Minimální denní dávka železa potřebná pro správnou tvorbu erytrocytů (červené krvinečky) se pohybuje v rozmezí 10-15 mg. Množství potřebné pro krvinečky je pokryté díky mechanismu recyklace železa z odumřelých erytrocytů. Tyto červené krvinky jsou pohlceny makrofágy a následně včleněny mezi erytrocytní prekurzory. [4]

Schopnost železa vázat kyslík využívá i svalová tkáň, neboť její aktivita je vysoce energeticky náročná. Železo se ve svalu váže na myoglobin, který je tvořen jednořetězcovým globinem (bílkovinná složka). Na jednu molekulu globinu se váže jedna molekula hemu, na kterou se váže jeden atom železa. Každá molekula myoglobinu je schopna navázat jen jednu molekulu kyslíku. Příčně pruhovanou svalovinu lze tedy dle intenzity červeného

zbarvení (množství železa a myoglobinu) rozlišit na svalovinu intenzivně pracující a méně aktivní svalovou tkáň. [1]

3.1.3.1 Rostlinná strava

Rostlinná strava je obecně velmi bohatá na železo, ale pro člověka není tak důležitý obsah, jako spíše jeho dostupnost. V rostlinách se nachází pouze železo nehemové. Rostlinná strava, obsahem svých dalších látek, může na různých úrovních ovlivňovat vstřebatelnost železa. Železo je ve tkáni rostlin vázáno převážně na fytáty, které obecně snižují jeho uvolňování během zažívání. Vliv na vstřebávání železa mají i další látky, jako jsou například polyfenoly (v kávě, červeném víně, čaji) a taniny. Přibližně 200 ml čaje dokáže snížit absorpci železa až o 70 - 80 %. Naopak vstřebávání pozitivně ovlivňuje např. kyselina askorbová. Mezi potraviny bohaté na železo řadíme například ovesné vločky, sójové boby, luštěniny, špenát nebo červenou řepu či ořechy. [1]

3.1.3.2 Živočišná strava

Mezi hlavní složku živočišné stravy řadíme železo hemové. Živočišná strava (např. drůbež, ryby a červené maso) je tvořena obecně velkým množstvím svalové tkáně. Příčně pruhované kosterní svaly a srdeční svalovina jsou zdrojem molekul sloužících k uskladnění kyslíku, jenž je nutný pro svalovou kontrakci. Železo je vázané hlavně na myoglobin. V živočišné stravě najdeme v menší míře i železo vázané na erytrocytární hemoglobin a nehemové železo, které je součástí feritinu, hemosiderinu, transferinu apod. Mezi potraviny živočišného původu bohaté na železo řadíme např. kuřecí játra, ústřice, hovězí maso či tuňáka. [1]

3.1.4 Homeostáza železa a její regulace

Rovnováha hladiny železa neboli homeostáza, je udržována recyklací starých erytrocytů, kdy nastane postupné opětovné uvolnění železa do krevního řečiště. Dojde-li ke ztrátám železa drobným krvácením nebo zvýšením metabolismu, jsou tyto ztráty železa nahrazeny zásobním železem uloženým v játrech. Nedostatečné množství lze doplnit příjmem železa běžnou stravou. Železo se přirozeně vstřebává v zaživacím traktu. Ideální podmínky pro absorpci železa ze zaživacího traktu jsou v žaludku a duodenu, neboť je zde nízké pH a redoxní

potenciál. Sliznice těchto orgánů také v největší míře exprimuje proteiny, které jsou potřeba k přestupu železa (Fe) ze zažívacího traktu do krevního oběhu. [1]

Člověk nemá na rozdíl od jiných živočichů efektivní způsob vylučování nadbytečného železa. Fyziologicky se nadbytek železa v organismu nevyskytuje. Mechanismem eliminace přebytečného železa je ztráta buněk, např. epitelu gastrointestinálního traktu, epidermis a u žen erytrocytů menstruační krve. [1]

Celkové množství železa v lidském těle	3-4 g
Z toho v hemoglobinu	65-70 %
V myoglobinu	3-4 %
V enzymech	1 %
Plazmatické Fe vázané na transferin	0,1 %
Fe vázané na bílkoviny (zásobní železo)	15-30 %

Tabulka č. 2

3.1.5 Patologie při narušení homeostázy železa

3.1.5.1 Deficit železa

Nedostatek železa související se stravou se projevuje jako hypochromní mikrocytární anémie (sideropenická anémie). [4] Primární příčiny jsou: ztráta krve (nejčastější příčina), nedostatečný příjem nebo absorpce Fe, zvýšený požadavek na Fe k růstu, těhotenství, kojení atd, snížená recyklace Fe v důsledku chronické infekce. [34]

Mezi subjektivní příznaky nedostatku železa patří únava, slabost, palpitace, závratě, bolest hlavy. Mezi objektivní příznaky řadíme bledost, tachykardie s palpitacemi, parestézie na končetinách, může se objevit pálení jazyka a zhoršené polykání. Často dochází k lámání nehtů, které mají tvar obráceného hodinového sklíčka a vypadávání vlasů. Mohou se objevit trhlinky v koutcích úst a zvýšená náchylnost k infekcím. [33]

Anémie byla Světovou zdravotnickou organizací (WHO) uznána jako jeden z nejčastějších závažných globálních zdravotních problémů s vážnými důsledky pro lidské zdraví, které postihují rozvojové i vyspělé země. WHO odhaduje, že je asi 24,8 % světové populace anemických, což odpovídá asi 1,62 miliardám lidí na celém světě. Etiologie anémie je multifaktoriální a komplexní, a co hlavně přispívá k zátěži tohoto onemocnění, je nedostatek železa, který je zodpovědný za přibližně 50 % případů anémie. [25]

Snížení frekvence prevalence anémie je zásadní zejména pro ženy v plodném věku, neboť snížení frekvence onemocnění o 50 % je u nich stanoveno jako jeden z globálních cílů WHO pro rok 2025, protože ženy v plodném věku a předškolní děti jsou zvláště ohroženi nedostatkem železa. Z dosažení tohoto cíle budou profitovat jak matky, tak jejich potomci, protože výsledky metaanalýzy ukázaly silné souvislosti mezi mateřskou anémií z nedostatku železa a nepříznivými neonatálními výsledky. [25]

Pro skupinu dospívajících žen je udržení pozitivní rovnováhy železa náročné. Jejich růst a dospívání je doprovázené vyššími nároky na železo ve srovnání s dospívajícími muži. Nedostatečný příjem železa se vyskytuje u 25-39 % dospívajících žen ve věku 10-19 let. Navíc u dospívajících má anémie za následek širokou škálu závažných zdravotní následků, které nejsou pozorovány u dospělých, jako je narušený duševní vývoj, fyzický růst a snížená školní výkonnost či pracovní kapacita. [25]

Zvýšená hladina železa a/nebo akcelerovaná erythropoéza
Růstový spurt v kojeneckém věku a v pubertě
Těhotenství
Terapie erythropoetinem
Zvýšené ztráty železa
Krevní ztráty při krvácení z GIT
Menstruační krvácení
Akutní krvácení např. při úrazech
Dárcovství
Terapie venepunkcemi
Snížený přísun a absorpce železa
Strava chudá na železo
Malabsorpce při zánětlivých onemocněních střeva (celiakie, nespecifické střevní záněty)
Pooperační malabsorpce (např. stp. gastrektomie, sy. krátkého střeva)
Akutní a chronický zánět

Tabulka č. 3 - Příčiny nedostatku železa v organismu

Symptomatická léčba klinických obtíží patří mezi hlavní léčebné postupy. U mírných forem anémie se podávají preparáty železa. Z důvodu zvýšené hladiny hepcidinu je omezené

vstřebávání z gastrointestinálního traktu, proto jsou vhodnější preparáty podávané nitrožilně. Dojde-li k závažnému snížení hladiny hemoglobinu, je podání krevní transfuze nutností. [1]

3.1.5.2 *Nadbytek železa*

Dojde-li k přetížení organismu železem, začne se tento nadbytek železa volně ukládat do tkání. Pokud není železo vázáno na bílkoviny (zásobní či transportní), dochází k toxickému poškození nejenom buněk, ale i tkání a celých orgánů, které nefungují tak jak mají. Ukládání železa do tkání ve vyšší míře způsobuje fibrotizaci a tím pádem ubytok funkční tkáně. To vše je v důsledku reaktivity volného železa a tvorbě volných kyslíkových radikálů, které vystavují buňky oxidativnímu stresu. Přetížení železem nejčastěji poškozuje játra (jaterní hemosideróza vedoucí k cirhóze a „bronzovému diabetes mellitus“), slinivku, myokard (hemochromatóza) a žlázy s vnitřní sekrecí (hypogonadismus, hypotyreóza). Pokud přívod Fe obchází střevní trakt (injekce Fe), může dojít k překročení transferinové kapacity a v důsledku toho, může dojít k otravě volným železem. [1]

Existují i vrozená onemocnění regulace hladiny a metabolismu železa. Mezi ně patří hereditární hemochromatóza, což je skupina onemocnění, jež je charakteristická patologickým ukládáním většího množství železa v parenchymatických orgánech a tkáních. Rozlišujeme hemochromatózu primární (dědičnou, která má 4 podtypy) a sekundární. [1, 4]

Primární hemochromatóza je autozomálně recesivní dědičné onemocnění. Příčinou je mutace genu pro HFE (Human homeostatic iron regulator protein) lokalizovaného na krátkém raménku chromozomu 6. Tento chromozom kóduje protein, který je důležitý pro syntézu hepcidinu. Dochází tedy k jeho snížené syntéze. V důsledku mutace je snížena hladina funkčního HFE, což má za následek porušení regulace množství zásobního železa a jeho vstřebávání. Dochází tedy k nadměrnému vstřebávání železa z potravy přes stěnu tenkého střeva. [1, 4]

Z počátku se neprojevuje klinicky nijak výrazně. Nejčastější je únava i po nočním odpočinku, bolesti břicha, nechutenství, u mužů impotence a pokles libida. Léčba je založena na včasném zachytu onemocnění. Mezi nejčastější metody patří pouštění žilou, venepunkce, přičemž běžný odběr je 450 ml, opakující se jednou za 2-3 měsíce. Pacientům, kteří netolerují venepunkci se indikuje chelatační terapie. [1, 4]

Sekundární hemochromatóza (získaná) vzniká v důsledku jiného onemocnění nebo při opakovaném vystavení vysokých dávek železa, často u pacientů s chronickým onemocněním jater v důsledku alkoholismu, hepatitidy, cirhózy a neoplazmy. [1, 4]

3.2 Chelatace

Chelatace kovů se ukazuje jako slibný nástroj k řešení patologických stavů nadbytku nebo dysregulace přechodných kovů. „Farmaceutická“ chelatační činidla jsou slabou náhražkou přirozených mechanismů, ale jsou nezbytná, pokud jsou přirozené mechanismy dysfunkční. Patologickými stavy jsou nemoci z přetížení železem (hemochromatóza, talasémie), které často doprovází zhoršená funkce ledvin, infekce parazitickými červy a ztráta krve. Chelatace kovů je jednoduchý způsob stínění kovového iontu, který však může bránit organismu v získávání nezbytných stopových množství kovů, které potřebuje. Mnoho farmaceutických chelátorů má vedlejší účinky a některé byly staženy z trhu. [27]

Léčivo v ideálním případě potřebuje odstranit kov z místa akumulace v těle. To znamená, že se musí dostat na místo, chelatovat kov a být z organismu nějakým způsobem odstraněn. Farmaceutický chelátor ani jeho výsledný kovový komplex nesmí být toxické. S chelátem mohou kompetovat jiné kovy. Konkurence může být způsobena vyšší vazebnou konstantou nebo vyšší koncentrací. Předvídatelnost je omezená. Někdy se dobrý *in vitro* kandidát na chelátor ukáže jako špatná volba *in vivo*. To může být způsobeno tím, že může dojít ke kompetici endogenních látek, jako jsou hemoglobin a cytochromy, s chelátorem. Léčivo musí mít určitou odolnost vůči biologické transformaci nebo rozkladu. [27]

Aby se léčivo dostalo na místo, kde se nachází kov, jenž chceme z těla vyloučit, musí překonat membránové bariéry, proto musí být dostatečně lipofilní, ale ne natolik, aby uvízlo v membráně. Stejně tak musí být komplex kov-chelátor schopen opustit místo a být vyloučen z těla ven. Pokud je komplex příliš objemný, může to bránit jeho pohybu. Většina chelatačních činidel je citlivá na pH, což je třeba brát v potaz za patologických stavů, jako je acidóza nebo alkalóza. Pokud se chelatační činidlo dostane pouze do extracelulární tekutiny, může dojít k mobilizaci kovu, který se začne hromadit v mozku a tukových tkáních. [27]

Někdy lze použít i kombinaci dvou strukturálně odlišných chelátorů, pokud je kombinace prospěšnější, než použití jednoho chelátoru. Potenciální úspěch kombinované terapie je založen na možnosti, že dvě chelatační činidla působí různými mechanismy, což vede ke dvěma odlišným efektům, nebo se dokonce vzájemně doplňují. [27]

3.2.1 Princip

Chelátotvorné látky jsou rozdílné struktury. Tvoří komplex s ionty těžkých kovů, čímž odstraní jejich toxicitu. Výraz „chelát“ pochází z řeckého chele = klepeto. Jde o komplex vytvořený mezi iontem kovu a látkou, která na své molekule nese více vazebných míst pro iont. Chelát je netoxický, eliminován z organismu a až do vyloučení udržuje navázaný kov, a to dokonce i v kyselé a koncentrované moči. [7]

Během chelatace se kovové ionty naváží na ligandy a vzniknou chelátové komplexy. [7]

Koordinační číslo železa je 6. Centrální atom železa tedy může navázat maximálně 6 jednovazebných ligandů. Výsledný chelát má tvar osmistěnu. Ligandy, které mají více atomů, jež se mohou navázat na centrální atom, nazýváme dle jejich počtu dvojjazyčnými, trojjazyčnými a šestivaznými. Stabilita vícevazných chelátorů je mnohem vyšší v porovnání s jednovaznými chelátory. [7]

Atom ligandu je donorem jednoho či více elektronových párů (Lewisova báze). Kovový iont je zde v roli akceptora (Lewisova kyselina). Mezi donorem a akceptorem vznikne koordinačně kovalentní vazba. Na hodnotě pH nebo přítomném kovovém iontu závisí, jaký atom bude donorem. [5]

3.3 Redukce železa

Po tom, co se chelátory železa absorbují, mohou v organismu chelatovat Fe^{2+} a Fe^{3+} ionty a tím podpoří jejich vyloučení, nebo stejně tak mohou redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} , čímž zvýší tvorbu hydroxylových radikálů, které jsou nejreaktivnější známé ROS. [5]

Chelatace i redukce jsou možným terapeutickým nástrojem. Redukcí volných iontů železa dochází ke katalýze Fentonovy reakce. Fentonova reakce může být škodlivá například u infarktu myokardu, nicméně může najít své uplatnění v terapii nádorových onemocnění. [5]

3.4 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AMK) jsou základními stavebními kameny proteinů a slouží jako dusíkaté páteře sloučenin, jako jsou neurotransmitery a hormony. V chemii je aminokyselina organická sloučenina, která obsahuje funkční aminoskupinu ($-NH_2$) i karboxylovou skupinu ($-COOH$), odtud název aminokyselina. Proteiny jsou řetězce aminokyselin, které se skládají prostřednictvím amidových vazeb známých jako peptidové vazby. Rozdíl ve skupině postranního řetězce nebo R-skupině určuje jedinečné vlastnosti každé aminokyseliny.

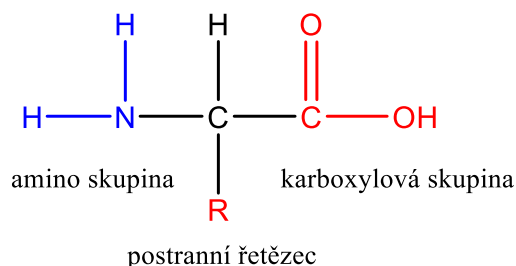
Jedinečnost různých proteinů je pak určena tím, jaké aminokyseliny obsahují, jak jsou tyto aminokyseliny uspořádány v řetězci a dále komplexní interakce, které řetězec vytváří se sebou samým a s prostředím. Tyto polymery aminokyselin jsou schopny produkovat rozmanitost, kterou lze vidět v živé přírodě. Existuje přibližně 20 000 jedinečných genů kódujících proteiny, odpovědné za více než 100 000 jedinečných proteinů v lidském těle. Přestože se v přírodě vyskytují stovky aminokyselin, pouze asi 20 aminokyselin je zapotřebí k vytvoření všech proteinů nacházejících se v lidském těle a většině ostatních forem života. Těchto 20 aminokyselin jsou všechny L-izomery, α -aminokyseliny. Všechny, kromě glycinu, obsahují chirální alfa uhlík. A všechny tyto aminokyseliny jsou L-izomery s R-absolutní konfigurací kromě glycinu (žádné chirální centrum) a cysteinu (S-absolutní konfigurace, kvůli R-skupině obsahující síru). Je třeba zmínit, že aminokyseliny selenocystein a pyrolysin jsou považovány za 21. a 22. aminokyselinu. Jsou to nedávno objevené aminokyseliny, které se mohou začlenit do proteinových řetězců během syntézy ribozomálních proteinů. Pyrolysin je funkční v živých organismech; lidé však pyrolysin při syntéze proteinů nepoužívají. Těchto 22 aminokyselin může být také modifikováno prostřednictvím posttranslační modifikace, aby se přidala další rozmanitost při vytváření proteinů. Mezi 20 až 22 aminokyselin, které tvoří proteiny, patří: [9]

- Alanin, Arginin, Asparagin, Asparagová kyselina, Cystein, Glutamová kyselina, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Fenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptofan, Tyrosin, Valin, Selenocystein (nepoužívá se při syntéze lidských proteinů), Pyrolysin (nepoužívá se při syntéze lidských proteinů)

3.4.1 Fyzikální a chemické vlastnosti aminokyselin

Téměř všechny přírodní aminokyseliny, které tvoří proteiny, mají ve své struktuře α -uhlík, na který se váže karboxylová skupina, primární aminoskupina a postranní řetězec charakteristický pro každou z aminokyselin. Výjimku tvoří prolin, protože obsahuje sekundární aminoskupinu.

Obecná struktura aminokyselin



Obrázek č. 4 – obecná struktura aminokyselin

Každá aminokyselina (kromě prolinu, který má sekundární aminoskupinu) obsahuje karboxylovou skupinu, primární aminoskupinu a výrazný postranní řetězec navázaný na atom uhlíku α . Při fyziologickém pH (přibližně pH 7,4) je karboxylová skupina disociována za vzniku záporně nabitého karboxylátového iontu ($-\text{COO}^-$) a aminoskupina je protonována ($-\text{NH}_3^+$). V proteinech jsou téměř všechny tyto karboxylové a aminoskupiny spojeny prostřednictvím peptidové vazby a obecně nejsou dostupné pro chemickou reakci kromě tvorby vodíkové vazby. Roli AMK tedy nakonec určuje povaha postranních řetězců. Je proto užitečné klasifikovat aminokyseliny podle vlastností jejich postranních řetězců, to znamená, zda jsou nepolární (mají rovnoměrné rozložení elektronů) nebo polární (mají nerovnoměrné rozložení elektronů, jako jsou kyseliny a zásady). [28]

α -uhlík aminokyseliny je připojen ke čtyřem různým chemickým skupinám a je to tedy chirální neboli opticky aktivní atom uhlíku. Glycin je výjimkou, protože jeho α -uhlík má dva vodíkové substituenty, a proto je opticky neaktivní. Aminokyseliny, které mají asymetrické centrum na α -uhlíku, mohou existovat ve dvou formách, označených D a L, které jsou vzájemnými zrcadlovými obrazy. Tyto dvě formy se v každém páru nazývají stereoizomery, optické izomery nebo enantiomery. Všechny aminokyseliny nalezené v proteinech mají L-konfiguraci. D-aminokyseliny se však nacházejí v některých antibiotikách a ve stěnách rostlinných a bakteriálních buněk. Aminokyseliny ve vodném roztoku obsahují slabě kyselé α -karboxylové skupiny a slabě bazické α -aminoskupiny. Kromě toho každá z kyselých a bazických aminokyselin obsahuje ve svém postranním řetězci ionizovatelnou skupinu. Tedy jak volné aminokyseliny, tak některé aminokyseliny spojené v peptidových vazbách, mohou působit

jako pufrů. Připomeňme, že kyseliny mohou být definovány jako donory protonů a zásady jako akceptory protonů. [28]

3.4.2 Rozdělení základních aminokyselin

Ve výživě jsou aminokyseliny klasifikovány jako esenciální nebo neesenciální. Tyto klasifikace vyplynuly z raných studií o lidské výživě, které ukázaly, že pro růst nebo dusíkovou bilanci jsou nutné specifické aminokyseliny, i když existuje dostatečné množství alternativních aminokyselin. [9]

3.4.2.1 *Esenciální aminokyseliny*

Esenciální aminokyseliny, také známé jako nepostradatelné aminokyseliny, jsou aminokyseliny, které si lidé a jiní obratlovci nedokážou syntetizovat z metabolických meziproductů. Tyto aminokyseliny musí být dodávány z exogenní stravy, protože lidské tělo postrádá metabolické cesty potřebné k syntéze těchto aminokyselin. Ačkoli jsou možné variace v závislosti na metabolickém stavu jednotlivce, obecně se předpokládá, že existuje devět esenciálních aminokyselin: fenylalanin, valin, tryptofan, threonin, isoleucin, methionin, histidin, leucin a lysin. Pokud jde o výživu, devět esenciálních aminokyselin lze získat jediným kompletním proteinem. Kompletní protein podle definice obsahuje všechny esenciální aminokyseliny. Kompletní bílkoviny obvykle pocházejí z živočišných zdrojů výživy, s výjimkou sóji. Esenciální aminokyseliny jsou také dostupné z neúplných bílkovin, což jsou obvykle potraviny rostlinného původu. [9]

3.4.2.2 *Neesenciální aminokyseliny*

Neesenciální, také známé jako postradatelné aminokyseliny, mohou být ze stravy vyloučeny. Lidské tělo dokáže tyto aminokyseliny syntetizovat pouze za použití esenciálních aminokyselin. Pro většinu fyziologických stavů u zdravého dospělého je výše uvedených devět aminokyselin jedinými esenciálními aminokyselinami. [9]

3.4.2.3 *Semiesenciální aminokyseliny*

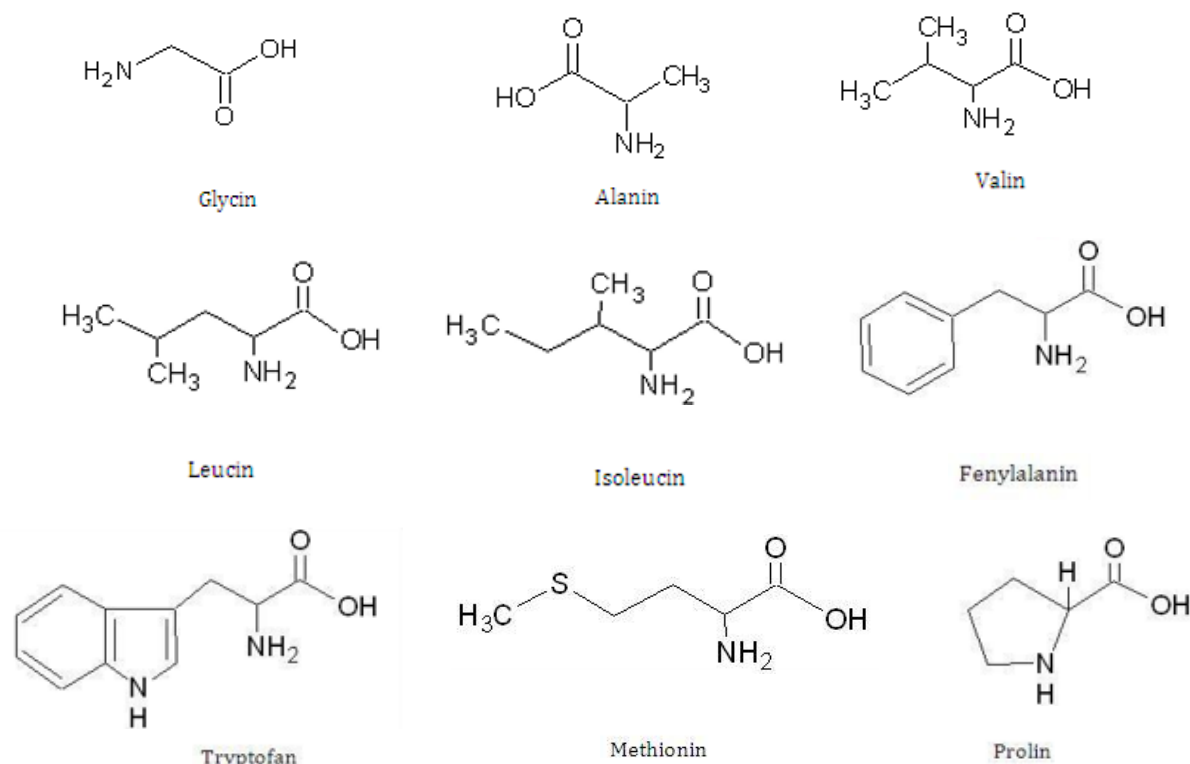
Určité aminokyseliny jsou „podmíněně esenciální“ v závislosti na metabolickém stavu subjektu. Například, ačkoli zdravý dospělý může být schopen syntetizovat tyrosin z fenylalaninu, malé dítě nemusí mít vyvinutý požadovaný enzym (fenylalanin hydroxylasu) k provedení této syntézy, a tak by nebylo schopno syntetizovat tyrosin z fenylalaninu, takže

tyrosin je esenciální aminokyseliny za těchto okolností. Tento koncept se také objevuje u různých chorobných stavů. V zásadě mohou odchylky od standardního metabolického stavu zdravého dospělého uvést tělo do metabolického stavu, který vyžaduje více než standardní esenciální aminokyseliny, aby byla zajištěna dusíková rovnováha. [9]

Obecně platí, že optimální poměr esenciálních aminokyselin a neesenciálních aminokyselin vyžaduje rovnováhu závislou na fyziologických potřebách, které se mezi jednotlivci liší. Nalezení optimálního poměru aminokyselin v celkové parenterální výživě pro onemocnění jater nebo ledvin je dobrým příkladem různých fyziologických stavů vyžadujících různý příjem živin. Proto mohou být termíny „esenciální aminokyseliny“ a „neesenciální aminokyseliny“ zavádějící, protože všechny aminokyseliny mohou být nezbytné pro zajištění optimálního zdraví. [9]

3.4.2.4 Aminokyseliny s nepolárním postranním řetězcem

Tyto aminokyseliny mají nepolární postranní řetězec, tedy uhlovodíkový řetězec, u kterého nedojde k odevzdání nebo příjmu protonů vodíku. Nedochozí tedy k tvorbě vodíkových ani iontových vazeb. Postranní řetězce podporují hydrofobní interakce, mají tedy hydrofobní charakter. Mezi nepolární AMK řadíme glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, tryptofan, methionin a prolin. [5, 29]



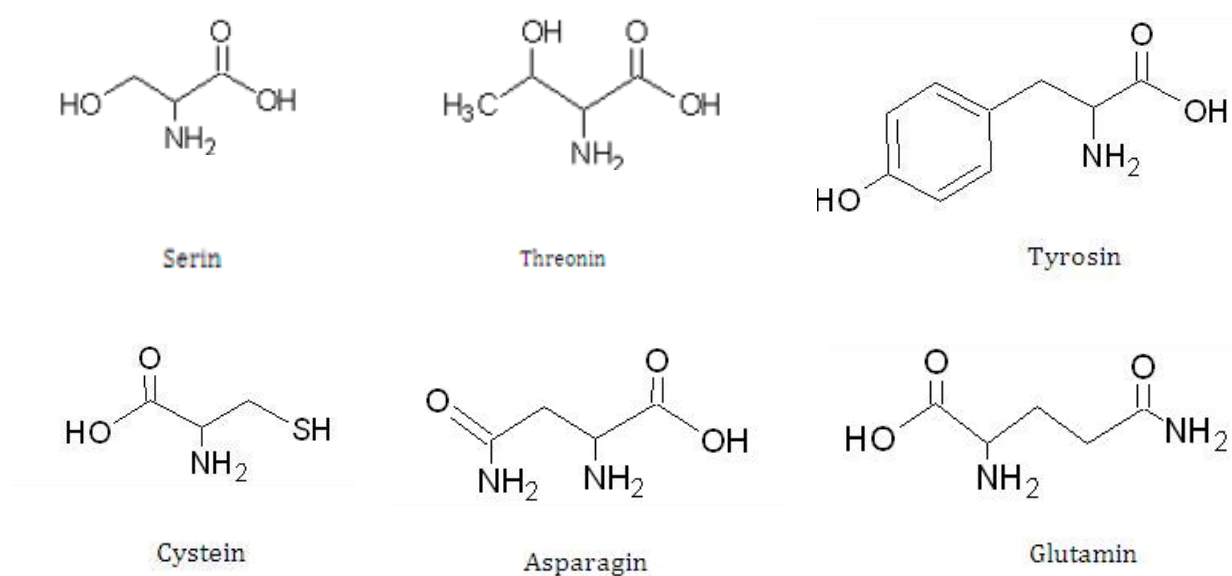
Obrázek č. 5

Glycin se skládá z jednoho uhlíku připojeného k amino a karboxylové skupině. Jeho malá velikost mu pomáhá fungovat jako flexibilní článek v proteinech a umožňuje tvorbu helixů, extracelulární signální molekuly, rozpoznává místa na buněčných membránách a enzymech. Umožňuje mu výskyt v organismu i na místech nedostupných pro ostatní AMK. [14, 5]

Tryptofan a fenylalanin mají postranní řetězce aromatické povahy. Prolin se často označuje jako iminokyselina, neboť obsahuje pětičlenný cyklus, jehož součástí je sekundární aminoskupina. Díky této unikátní struktuře přispívá k tvorbě kolagenních vláken, a ne zřídka přerušuje α -helixy globulárních proteinů. [5]

3.4.2.5 Aminokyseliny s polárním neutrálním postranním řetězcem

Aminokyseliny obsahující polární skupiny -OH, -SH, -CONH₂, nebo heterocyklickou strukturu. Patří sem aminokyseliny serin, threonin, tyrosin, cystein, asparagin, glutamin, tryptofan. [29] Při neutrálním pH mají všechny nulový náboj. V zásaditém prostředí mohou cystein a tyrosin poskytovat proton vodíku. [5]



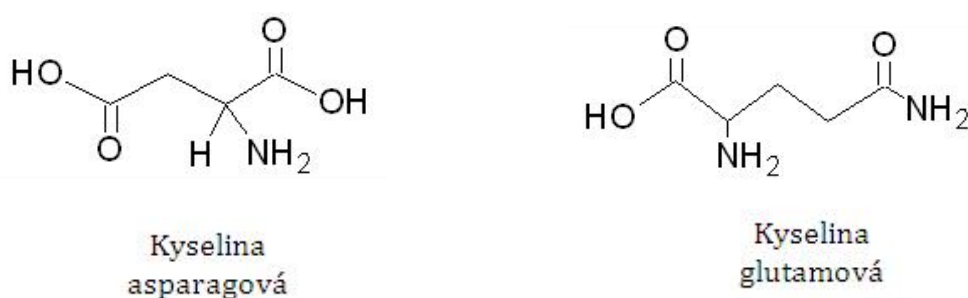
Obrázek č. 6

Společnou vlastností serinu, threoninu a tyrosinu je hydroxylová skupina, která umožňuje tvorbu vodíkových vazeb nebo vazbu fosfátové skupiny. Odlišnost tyrosinu tkví v aromatickém charakteru jeho postranního řetězce. Cystein ve své struktuře obsahuje thiolovou skupinu, která je významnou součástí aktivního místa mnoha enzymů. Dojde-li

k navázání dvou molekul cysteinu, vzniká dimer cystinu. Asparagin a glutamin mají v postranním řetězci amidovou skupinu, ta také může tvořit vodíkové vazby. [5]

3.4.2.6 Aminokyseliny s polárním kyselým řetězcem

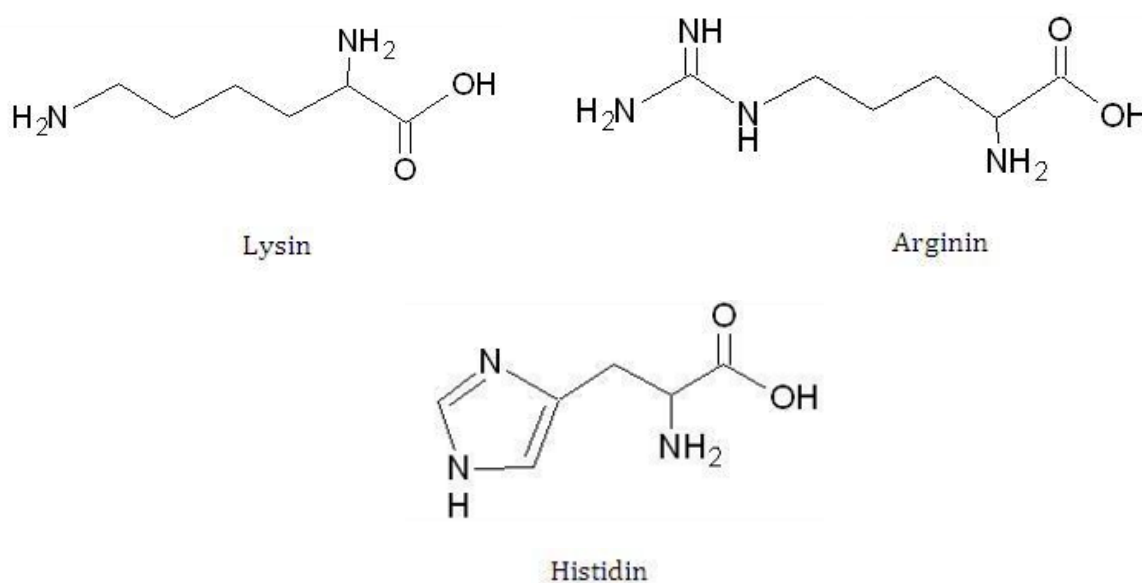
Mezi kyselé aminokyseliny řadíme kyselinu asparagovou a glutamovou. Mohou poskytnout proton vodíku. V obou postranních řetězcích mají karboxylovou skupinu. Může zde vznikat karboxylová skupina se záporným nábojem, pokud jsou AMK ve fyziologickém prostředí. Postranní řetězce jsou tedy zcela ionizovány. V plně ionizovaném stavu je nazýváme aspartát a glutamát. Typickými reakcemi pro tyto aminokyseliny jsou tvorby esterů, anhydridů a amidů. [5]



Obrázek č. 7

3.4.2.7 Aminokyseliny s polárním zásaditým řetězcem

Zásadité aminokyseliny obsahují více než jednu bazickou skupinu. Řadíme sem lysin, arginin, histidin. Mají postranní řetězce, jež jsou schopny přijmout vodíkové protony. Součástí postranního řetězce lysinu je primární aminoskupina. Imidazolová skupina je součástí histidinu a guanidinová skupina argininu. [5]



Obrázek č. 8

Arginin a lysin jsou při fyziologickém pH plně ionizovány a jsou nositeli kladného náboje. Histidin je slabou zásadou, neboť je ve volné formě z větší části bez náboje. Pokud je však součástí proteinu, může mít postranní řetězec podle prostředí polypeptidového řetězce buď pozitivní, nebo neutrální náboj. Těto vlastnosti využívají některé proteiny pro svou správnou funkci, např. hemoglobin. Také pro enzymatickou katalýzu hraje imidazolová skupina histidinu jedinečnou roli. [5]

3.4.3 Peptidy

Peptidy jsou pojmenovány na základě počtu aminokyselinových zbytků v sekvenci. Pokud dojde ke spojení 10-20 aminokyselinových zbytků, získáme oligopeptid. *In vivo* je každá aminokyselina vázaná na amino-konec jedné aminokyseliny za vzniku peptidového řetězce. Nerozvětvený řetězec tvořený více než 20 aminokyselinami je považován za polypeptid. Každá aminokyselina obsažená v peptidu se nazývá „zbytek“, protože to je část zbývající po ztrátě vody při dehydratační reakci. Syntéza peptidu závisí na třech hlavních reakcích: 1. aminokyselina prochází krokem deprotektace, přípravnou reakcí, která přidává další aminokyselinu do řetězce, a nakonec spojovací reakcí, která tvoří konečný peptid s danou funkcí. Ve druhém kroku se aminokyselina aktivuje několika činidly. Tato karboxylová kyselina v aminokyselině bude reagovat za vzniku aktivované formy, která pak vstoupí do vazebné reakce. Po jednom kole syntézy peptidu je tento proces opakovatelný, aby se přidaly další aminokyseliny, dokud se nevytvoří požadovaná délka peptidu. Peptidové vazby jsou odolné vůči podmínkám, které denaturují proteiny, jako jsou zvýšené teploty a vysoká koncentrace močoviny. Aminokyseliny mají všechny stejnou obecnou strukturu, s kladným nábojem na dusíku a záporným nábojem na karboxylové skupině. Peptidová vazba vytvořená v aktivním místě ribozomu má charakter částečné dvojně vazby. Tato vazba je tužší a rovinnější než jednoduchá vazba, protože dvojně vazby jsou kratší a silnější a vyžadují více volné energie k jejich rozbití. Vzhledem ke sterické interferenci R skupin je vazba téměř vždy trans vazba. Povaha vazby brání úplné volné rotaci mezi karboxylovým uhlíkem a dusíkem peptidové vazby. Vazby mezi ostatními atomy uhlíku se však mohou volně otáčet. Tato konfigurace umožňuje vytvoření více konfigurací a izomerů peptidů. [15]

3.4.4 Fyziologická funkce aminokyselin

Aminokyseliny (AMK), společně s cukry a tuky, patří mezi pro život nejdůležitější makronutrienty. AMK jsou ve formě bílkovin a bílkovinných komplexů stavebními kameny našeho buněčného aparátu a tvoří hormony a enzymy, jež regulují a řídí metabolismus. Kromě toho buněčným metabolismem AMK vznikají důležité látky jako např. puriny, pyrimidiny, neurotransmitery atd. Na rozdíl od tuků a sacharidů se AMK v lidském těle neukládají na žádném vyhrazeném místě a k jejich uložení dojde až v případě jejich deficitu. Toho je dosaženo buněčnými mechanismy, jako je recyklace aminokyselin prostřednictvím autofagie a zpracování proteinů v lysozomu, zároveň dochází k fyziologickým procesům jako je útlum buněčného obratu tkání spotřebovávajících AMK, inhibici proteosyntézy v klidových tkáních a kontrole ureageneze odpovídající přísunu bílkovin v potravě. Nicméně některé důležité biochemické dráhy vyžadují ztráty aminoskupiny, tudíž je potřeba tyto ztráty nahradit potravou bohatou na proteiny. Protože jsou vysoce rozpustné a velmi dobře snášeny pokožkou, vyrábí se z nich kosmetické přípravky. [11]

V těle se nacházejí vázané jako součást proteinů nebo volné. Patří mezi biologicky bezpečné látky, jež se používají pro potravinářské účely i mimo ně. Aminokyseliny a další potravinové složky lze rozdělit podle jejich funkce na nutriční, sensorické a regulační. [10]

Mezi jejich nutriční funkci patří zajištění příjmu esenciálních aminokyselin potravou. Naproti tomu jíst bílkoviny s aminokyselinovou nerovnováhou vede k nedostatku esenciálních aminokyselin. Některé rostlinné bílkoviny postrádají určité aminokyseliny (tj. lysin v obilovinách), které jsou nezbytné pro růst zvířat; proto se tyto aminokyseliny často přidávají do určitých potravin, aby se obohatila jejich nutriční hodnota. Navíc u jedinců, kteří nemohou jíst proteiny, se aminokyselinové přípravky používají pro nutriční management patologických stavů. [10]

Co se týče sensorické funkce, některé aminokyseliny vykazují jednu nebo více z pěti chutí (sladkost, kyselost, slanost, hořkost a umami) a používají se k dochucení zpracovaných potravin. [10]

Aminokyseliny mají i regulační funkci, například leucin zvyšuje anabolismus svalových proteinů, arginin má vazodilatační účinek a posiluje imunitu a gama aminomáselná kyselina (GABA) reguluje krevní tlak. Kromě těchto tří funkcí, aminokyseliny lze také použít jako lékařské diagnostické nástroje a k predikci rizika různých onemocnění, jako je např. rakovina,

měření jejich hladin v krvi. Účinky aminokyselin na zdraví jsou tedy velmi důležitá záležitost. [10]

Proteosyntéza, kterou označujeme jako translace, je proces, při kterém dochází k překladu nukleotidových sekvencí mRNA do sekvencí aminokyselin v proteinu. Prostřednictvím genetického kódu se informace obsažené v sekvenci nukleové kyseliny translací exprimují a vzniká tak specifická sekvence aminokyselin. Jako kodony nazýváme nukleotidové triplety kódující určité aminokyseliny. [5]

3.4.5 Zdroje a příjem aminokyselin

Hlavním zdrojem aminokyselin jsou obecně potraviny bohaté na proteiny, jako je maso, mléčné produkty, vejce, obiloviny a luštěniny. Živočišné produkty poskytují zpravidla vyšší množství proteinů a zároveň i kvalitnější proteiny oproti produktům rostlinným. Pro srovnávání proteinů v různých potravinách se používá vaječný protein, který se považuje za kompletní. [5]

V rostlinné říši se velké množství aminokyselin nachází v různých druzích čeledi bobovitých (*Fabaceae*), příkladem může být fazol obecný (*Phaseolus vulgaris* L.), který řadíme mezi luštěniny. V luštěninách je typický nedostatek methioninu, nicméně například fazol má ve svých semenech prokázané aminokyseliny arginin, asparagin, fenylalanin a tryptofan. [5]

Obiloviny jsou bohaté na methionin, a však množství lysinu a tryptofanu je nízké. Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) obsahuje ve svých semenech albumin bohatý na vysoký obsah methioninu. Kyselina L-glutamová a po ní charakteristická chuť „umami“ se ve významném množství vyskytuje ve zralých plodech rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Nezanedbatelné množství aminokyselin můžeme najít i v čeledi chaluhovitých (*Fucaceae*), kam řadíme např. chaluhu pilovitou (*Fucus serratus* L.) a chaluhu bublinatou (*Fucus vesiculosus* L.). [5]

3.4.6 Metabolismus aminokyselin

Po tom, co přijmeme proteiny v potravě, dochází k jejich štěpení v gastrointestinálním traktu pomocí peptidas a proteinas na jednotlivé aminokyseliny. V žaludku je pepsin a kyselé prostředí, které vede k denaturaci proteinů. V lumen tenkého střeva se na trávení podílí pankreatická šťáva obsahující trypsin a chymotrypsin. Také na povrchu enterocytu se nacházejí aminopeptidasy. Výsledkem trávení jsou tedy krátké peptidy a směs volných

AMK. Pomocí aktivního transportu jsou volné AMK absorbovány do enterocyty. U některých aminokyselin dochází ještě k metabolismu v enterocyty, většina je ale transportována v nezměněné formě do plazmy. Hydrofobní AMK se váží na albumin, hydrofilní se transportují volně. Většina AMK se metabolizuje v játrech. [5, 30]

Nejdříve přichází soubor reakcí, které vedou k odstranění α -aminoskupiny a případně α -karboxylu AMK. [30]

Transaminace pomocí aminotransferas či oxidační deaminace pomocí glutamátdehydrogenasy zaručí odejmutí α -NH₂ a vyloučení nadbytečného dusíku ve formě netoxického produktu. Ze zbytku AMK se stane oxokyselina (α -ketokyselina). [30]

Při dekarboxylaci díky histidindekarboxylase, dekarboxylase aromatických aminokyselin (DAAK) a glutamátdekarboxylase vznikají biogenní aminy. [30]

Detoxikace amoniaku u člověka pak probíhá v játrech. V močovinovém cyklu dochází k tvorbě močoviny, která je nejedovatá a dobře rozpustná. Tvoří hlavní organickou součást moči. Močovinový cyklus se aktivuje při stravě bohaté na bílkoviny nebo při hladovění a je značně energeticky náročný. Dochází k vysoké spotřebě ATP. Klíčovým (regulačním) enzymem močovinového cyklu je karbamoylfosfátsynthetasa I. Tento enzym není inhibován konečným produktem. [30]

Zbylá odpovídající α -ketokyselina je ve druhé fázi katabolismu přeměněna na běžné meziproducty energetického metabolismu, jako jsou oxalacetát, pyruvát, α -ketoglutarát, fumarát, sukcinylkoenzym A, acetylkoenzym A a acetoacetát. Aminokyseliny dělíme v závislosti na tom, který z meziproductů degradace vzniká, na glukogenní, ketogenní a smíšené. Následně dochází k metabolizaci meziproductů na oxid uhličitý a vodu, glukosu, mastné kyseliny nebo ketolátky. [5, 30]

3.4.7 AMK pool

Pokud má organismus nadbytek aminokyselin (bílkovin), uloží se tyto AMK do aminokyselinového poolu, který slouží jako okamžitá menší zásobárna aminokyselin v organismu. Aminokyseliny z aminokyselinového poolu se dají využít dvěma způsoby. Mohou být zařazeny do proteinů nebo mohou být přeměněny na energii (glukózu), která může být následně uložena do tukové tkáně. Osud aminokyselin závisí především na celkové potřebě organismu. [8]

Při stavech nedostatečného příjmu esenciálních aminokyselin, jako je zvracení nebo nízká chuť k jídlu, se mohou objevit klinické příznaky. Mezi tyto příznaky může patřit deprese, úzkost, nespavost, únava, slabost, zpomalení růstu u dětí atd. Tyto příznaky jsou většinou způsobeny nedostatkem syntézy bílkovin v těle kvůli nedostatku esenciálních aminokyselin. Požadovaná množství aminokyselin jsou nezbytná k produkci neurotransmiterů, hormonů, růstu svalů a dalších buněčných procesů. Tyto nedostatky se obvykle vyskytují v chudších částech světa nebo u starších dospělých s nedostatečnou péčí. [9]

Kwashiorkor a marasmus jsou příklady závažnějších klinických poruch způsobených podvýživou a nedostatečným příjmem esenciálních aminokyselin. Kwashiorkor je forma malnutrice charakterizovaná periferním edémem, suchou olupující se kůží s hyperkeratózou a hyperpigmentací, ascitem, poruchou funkce jater, imunitním deficitem, anémií a relativně nezměněným složením svalových bílkovin. Je důsledkem stravy s nedostatkem bílkovin, ale dostatečným množstvím sacharidů. Marasmus je forma podvýživy charakterizovaná chřadnutím, způsobeným nedostatkem bílkovin a celkově nedostatečným příjmem kalorií. [9]

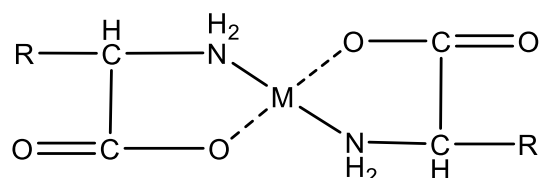
3.4.8 Vztah AMK k železu

Jak je psáno v kapitole 3.1, železo má jednak důležitou roli v podobě součástí enzymů pro jeho oxido-redukční potenciál v metabolismu mnoha látek, tak i ve schopnosti vázat kyslík. V organismu je vázáno na hemoproteiny (hemoglobin, myoglobin). Pokud se však nachází v nevázané formě, dochází k poškození organismu v důsledku oxidačního stresu. Chelatační terapií se tak můžeme volného železa zbavit. [5]

Aminokyseliny tvoří společně se železem chelát. Tyto cheláty, jsou obecně produkovány reakcí mezi ligandy a kovovými ionty, které mají mocenství dvě nebo více, za vytvoření kruhové struktury. V takové reakci mohou elektrony dostupné z elektron-donorové skupiny ligandu uspokojit kladný elektrický náboj kovového iontu. Konkrétně byl termín "chelát" definován jako kombinace iontu kovu vázaného na jeden nebo více ligandů za vzniku heterocyklické kruhové struktury. Podle této definice může být tvorba chelátu prostřednictvím neutralizace kladného náboje (nábojů) kovového iontu prostřednictvím tvorby iontových, kovalentních nebo koordinačních kovalentních vazeb. Alternativní a modernější definice termínu "chelát" vyžaduje, aby byl kovový iont navázán k ligandu výhradně koordinačními kovalentními vazbami tvořícími heterocyklický kruh. V obou případech jsou definice, které popisují kovový iont a ligand tvořící heterocyklický kruh.

Chelataci lze potvrdit a odlišit od směsí složek infračerveným spektrem prostřednictvím srovnání délky vazeb nebo posunu absorpce způsobené tvorbou vazby. [24]

Podrobněji s ohledem na cheláty aminokyselin, se karboxylový kyslík a aminoskupina aminokyseliny vážou s kovovým iontem. Takový pětičlenný kruh je definován atomem kovu, karboxylovým kyslíkem, karbonylovým uhlíkem, α -uhlíkem a α -amino dusíkem. Skutečná struktura bude záviset na molárním poměru ligandu ke kovu a na tom, zda karboxylový kyslík tvoří koordinační kovalentní vazbu nebo iontovou vazbu s kovovým iontem. Obecně je molární poměr ligandu ke kovu alespoň 1 : 1 a výhodně 2 : 1 nebo 3 : 1. V určitých případech však může být poměr 4 : 1. Nejtypičtěji chelát aminokyseliny s dvojmocným kovem může být reprezentován v molárním poměru ligandu ke kovu 2 : 1 takto: [24]



Obrázek č. 9 – chelát aminokyseliny s dvojmocným kovem

Ve výše uvedeném vzorci přerušované čáry představují koordinačně kovalentní vazby, kovalentní vazby nebo iontové vazby. M představuje kov, jako je železo. Dále, když R je H, aminokyselina je glycin, který je nejjednodušší z α -aminokyselin. Nicméně, R by mohlo být představitelem jakéhokoli jiného postranního řetězce, který, když je vzat v kombinaci se zbytkem ligandové struktury (struktur), vede k jakékoli z dalších asi dvaceti přirozeně se vyskytujících aminokyselin odvozených z proteinů. Všechny aminokyseliny mají stejnou konfiguraci pro umístění karboxylového kyslíku a α -amino dusíku vzhledem ke kovovému iontu. [24]

Vezmeme-li jako příklad cheláty aminokyselin železa, jedna výhoda chelátů aminokyselin v oblasti minerální výživy je připisována skutečnosti, že tyto cheláty železa mohou být snadno absorbovány ze střeva a do buněk sliznic pomocí aktivního transportu. Jinými slovy, železo může být absorbováno spolu s aminokyselinami jako jedna jednotka využívající aminokyseliny jako molekuly nosiče. Proto vznikají problémy spojené s konkurencí železa o aktivní místo. [23]

Odborná literatura naznačuje, že několik aminokyselin může zvýšit absorpci železnatého iontu. Histidin a lysin významně zvýšily absorpci železa podávaného v železité formě z ligovaných, *in vivo*, duodenálních segmentů, zatímco glutamin, kyselina glutamová, methionin a glycin nikoli. Dále, histidin není účinný, pokud je podáván intraperitoneálně nebo pokud je vložen do střevního segmentu sousedícího s tím, do kterého je podáváno železo. Když je histidin přidán k roztoku železitých iontů, který obsahuje kyselinu askorbovou, zvýší se absorpce nad rámec pozorovaný u samotné kyseliny askorbové. Histidin zvýší vychytávání železa pouze tehdy, pokud jsou histidin a železo podávány ve stejném roztoku. To naznačuje určitou přímou reakci mezi železem a histidinem a je v souladu s hypotézou, že se tvoří a následně absorbuje chelát aminokyselina-železo. Protože je histidin produktem hydrolyzy bílkovin v gastrointestinálním traktu, může se podílet na normální absorpci železa. [23]

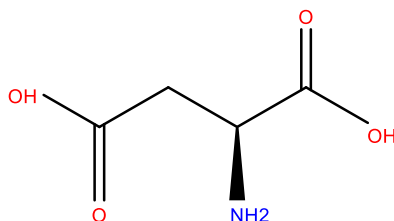
3.4.9 Testované látky

3.4.9.1 *L*-asparagová kyselina

Kyselina *L*-asparagová je *L*-enantiomer kyseliny asparagové. Hraje roli jako metabolit *Escherichia coli*, myší metabolit a neurotransmitter. Je to proteinogenní aminokyselina aspartátové rodiny. Jedná se o konjugovanou kyselinu *L*-aspartátu.

Jedna z neesenciálních aminokyselin běžně se vyskytujících v *L*-formě. Nachází se u zvířat a rostlin, zejména v cukrové třtině a cukrové řepě. Může být neurotransmitterem.

L-aspartát je považován za neesenciální aminokyselinu, což znamená, že za normálních fyziologických podmínek je v těle syntetizováno dostatečné množství aminokyseliny pro uspokojení tělesných požadavků. *L*-aspartát vzniká transaminací meziprojektu oxalacetátu Krebsova cyklu. Aminokyselina slouží jako prekurzor pro syntézu proteinů, oligopeptidů, purinů, pyrimidinů, nukleových kyselin a *L*-argininu. *L*-aspartát je glykogenní aminokyselina a může také podporovat produkci energie prostřednictvím svého metabolismu v Krebsově cyklu. Tento poslední fakt byl důvodem pro tvrzení, že doplňkový aspartát má účinek proti únavě na kosterní svalstvo, což nebylo nikdy jednoznačně potvrzeno. [16]



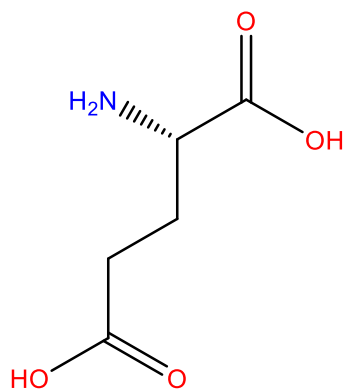
Obrázek č. 10 – *L*-asparagová kyselina

3.4.9.2 L-glutamová kyselina

Kyselina L-glutamová je opticky aktivní forma kyseliny glutamové s L-konfigurací. Má roli nutraceutika, mikroživiny, metabolitu *Escherichia coli*, myšího metabolitu, induktoru ferroptózy a neurotransmiteru. Proteinogenní aminokyselina z rodiny glutaminu. [17]

Kromě toho, že je kyselina glutamová jedním ze stavebních kamenů při syntéze proteinů, je nejběžnějším excitačním neurotransmiterem v centrálním nervovém systému a prekurzor pro syntézu GABA v GABAergních neuronech. Kortikální excitabilita odráží rovnováhu mezi excitací a inhibicí. Glutamát je hlavní excitační a GABA hlavní inhibiční neurotransmitter v mozkové kůře savců. Považován za přírodní "potravu pro mozek" pro zlepšení mentálních schopností; pomáhá urychlit hojení vředů; "vytahuje" z únavy; pomáhá kontrolovat alkoholismus, schizofrenii a touhu po cukru. [17]

Změny v metabolismu glutamátu a GABA mohou hrát důležitou roli při kontrole kortikální excitability. Glutamát je metabolický prekurzor GABA, který může být recyklován cyklem trikarboxylových kyselin za účelem syntézy glutamátu. Syntéza GABA je mezi neurotransmitery jedinečná, má dvě samostatné izoformy enzymu řídicího rychlost, dekarboxylázy kyseliny glutamové. Potřeba dvou samostatných genů na dvou chromozomech pro řízení syntézy GABA není vysvětlena. Dva metabolity GABA (homokarnosin a pyrrolidinon) jsou přítomny v jedinečně vysokých koncentracích v lidském mozku a mají zásadní vliv na metabolismus GABA. Oba tyto metabolity GABA mají antikonvulzivní vlastnosti. Významná role, kterou aminokyselina glutamát přebírá v řadě základních metabolických drah, je stále lépe chápána. Glutamát usnadňuje syntézu i degradaci aminokyselin. V játrech je glutamát koncem pro uvolňování amoniaku z aminokyselin a intrahepatická koncentrace glutamátu moduluje rychlost detoxikace amoniaku na močovinu. V β -buňkách pankreatu oxidace glutamátu zprostředkovává aminokyselinami stimulovanou sekreci inzulínu. Glutamát je také prekurzorem inhibičního neurotransmiteru GABA, stejně jako glutaminu, potenciálního mediátoru hyperamonemické neurotoxicity. Nedávná identifikace nové formy vrozeného hyperinzulinismu spojeného s asymptomatickou hyperamonémií přisuzuje oxidaci glutamátu glutamátdehydrogenasou důležitější roli, než jaká byla dříve uznávána při sekreci inzulínu β -buněk a detoxikaci amoniaku v játrech a centrální nervové soustavě (CNS). Poruchy metabolismu glutamátu se podílejí na jiných klinických poruchách, jako jsou záchvaty závislé na pyridoxinu, což potvrzuje důležitost neporušeného metabolismu glutamátu. [17]



Obrázek č. 11 – L-glutamová kyselina

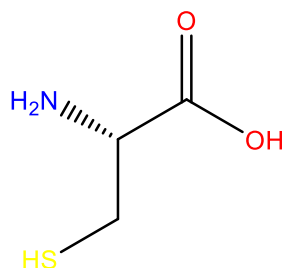
3.4.9.3 L-cystein

Cystein je u lidí neesenciální aminokyselina obsahující síru, příbuzná cystinu. Cystein je důležitý pro syntézu bílkovin, detoxikaci a různé metabolické funkce. Cystein, který se nachází v β -keratinu, hlavním proteinu v nehtech, pokožce a vlasech, je důležitý pro produkci kolagenu a také pro pružnost a texturu pokožky. Cystein je také nezbytný při výrobě aminokyseliny taurinu, je složkou antioxidantu glutathionu a hraje roli v metabolismu základních biochemických látek, jako je koenzym A, heparin a biotin. [18]

L-cystein je opticky aktivní forma cysteinu s L-konfigurací. Působí jako činidlo upravující mouku, lidský metabolit a inhibitor histidin amoniak-lyasy (EC 4.3.1.3). Je to aminokyselina serinové rodiny, proteinogenní aminokyselina, cystein a L- α -aminokyselina. [18]

Adukty acetaminofenu a cysteinu (APAP-CYS) jsou sérovým biomarkerem expozice acetaminofenu, který se tvoří, když se oxidační metabolit acetaminofen váže na cysteinové zbytky jaterních proteinů. Adukty APAP-CYS se zvyšují v případech akutního selhání jater po předávkování acetaminofenem a byly navrženy jako diagnostický nástroj k identifikaci akutního selhání jater vyvolaného acetaminofenem, když standardní testování není průkazné.

Díky této schopnosti podstupovat redoxní reakce má cystein antioxidační vlastnosti. Cystein je důležitým zdrojem síry v lidském metabolismu, a přestože je klasifikován jako neesenciální aminokyselina. Cystein může být nezbytný pro kojence, starší osoby a jedince s určitým metabolickým onemocněním nebo trpící malabsorpčními syndromy. Může být v určitém okamžiku uváděn jako esenciální nebo podmíněně esenciální aminokyselina. [18]



Obrázek č. 12 - L-cystein

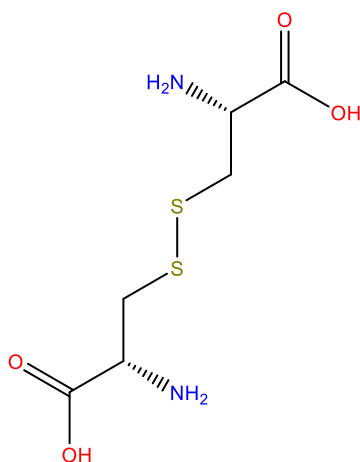
3.4.9.4 L-cystin

L-cystin je L-enantiomer aminokyseliny cystinu obsahující síru. Má roli jako činidlo pro úpravu mouky, lidský metabolit, metabolit *Saccharomyces cerevisiae*, myší metabolit a inhibitor aspartát-semialdehyddehydrogenázy (EC 1.2.1.12). Je to cystin, derivát L-cysteinu a neproteinogenní L- α -aminokyselina. Jedná se o konjugovanou kyselinu L-cystinového aniontu. Je to enantiomer D-cystinu a tautomer L-cystinového zwitterionu. [19]

Je to derivát obsahující síru. L-cystin je kovalentně vázaná dimerní neesenciální aminokyselina vytvořená oxidací thiolových postranních řetězců cysteinu. Dvě molekuly cysteinu jsou spojeny dohromady disulfidovým můstkem za vzniku cystinu. Funguje jako antioxidant a chrání tkáň před zářením a znečištěním, čímž zpomaluje proces stárnutí. Napomáhá také syntéze bílkovin. Cystin se hojně vyskytuje v mnoha proteinech kosterních tkání a kůže a nachází se v inzulinu a trávicích enzymech chromotrypsinogenu A, papainu a trypsinogenu. [19]

Tvrdí se, že L-cystein má protizánětlivé vlastnosti, že může chránit před různými toxiny a že může být užitečný při osteoartróze a revmatoidní artritidě. Než bude možné L-cystein indikovat pro některý z těchto stavů, bude třeba provést další výzkum. Dosavadní výzkum probíhal většinou na zvířecích modelech. [19]

Cystin je chemická látka, která se přirozeně vyskytuje jako usazenina v moči a při ukládání v ledvinách. Může tvořit zubní kámen (tvorba tvrdého minerálu). Cystin je nutný pro správné využití vitamínu B6 a také pomáhá při hojení popálenin a ran, odbourává usazeniny hlenu při nemocech, jako je bronchitida nebo cystická fibróza. Cystin také pomáhá při zásobování slinivky břišní inzulinem, který je potřebný pro asimilaci cukrů a škrobů. Zvyšuje hladinu glutathionu v plicích, játrech, ledvinách a kostní dřeni, což může mít na tělo účinek proti stárnutí tím, že redukuje stařecké skvrny atd. [19]



Obrázek č. 13 - L-cystin

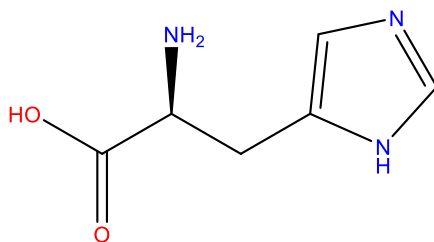
3.4.9.5 L-histidin

Histidin je semi-esenciální aminokyselina (děti by ji měly získávat z potravy) potřebná u lidí pro růst a obnovu tkání. Histidin je důležitý pro udržování myelinových pochev, které chrání nervové buňky a je metabolizován na neurotransmitter histamin. Histaminy hrají mnoho rolí v imunitě, žaludeční sekreci a sexuálních funkcích. Histidin je také nezbytný pro tvorbu krevních buněk a chrání tkáň před poškozením způsobeným zářením a těžkými kovy. [20]

L-histidin je L-enantiomer aminokyseliny histidin. Hraje roli jako nutraceutikum, mikroživina, metabolit *Saccharomyces cerevisiae*, metabolit *Escherichia coli*, lidský metabolit, metabolit řas a myší metabolit. Je to proteinogenní aminokyselina, histidin a L-alfa-aminokyselina. Je to konjugovaná báze L-histidinia (1+). Je to konjugovaná kyselina L-histidinátu (1-). Je to enantiomer D-histidinu a tautomer L-histidinového zwitterionu. [20]

Účinky doplňkového L-histidinu jsou zcela nejasné. Může mít určitou imunomodulační i antioxidační aktivitu. L-histidin může být indikován pro použití u některých pacientů s revmatoidní artritidou. Není indikován k léčbě anémie nebo urémie nebo ke snížení sérového cholesterolu. [20]

Nachází se hojně v hemoglobinu a používá se při léčbě revmatoidní artritidy, alergických onemocnění, vředů a anémie. Nedostatek může způsobit špatný sluch. [20]



Obrázek č. 14 - L-histidin

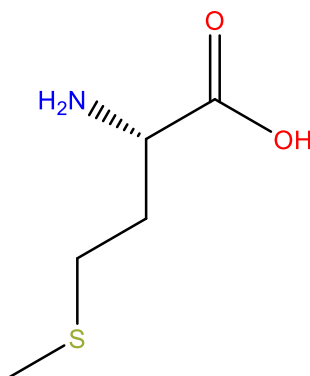
3.4.9.6 L-methionin

Methionin je jednou z devíti esenciálních aminokyselin u lidí (poskytovaných potravou). Methionin je nezbytný pro růst a obnovu tkání. Jedná se o aminokyselinu s obsahem síry. Zlepšuje tonus a poddajnost pokožky, vlasů a posiluje nehty. Síra poskytovaná methioninem se účastní mnoha detoxikačních procesů, chrání buňky před znečišťujícími látkami, zpomaluje stárnutí buněk a je nezbytná pro absorpci a biologickou dostupnost selenu a zinku. Methionin chelatuje těžké kovy, jako je olovo a rtuť, čímž napomáhá jejich vylučování. Působí také jako lipotropní činidlo a zabraňuje nadměrnému ukládání tuku v játrech. [21]

L-methionin je L-enantiomer methioninu. Působí jako nutraceutikum, mikronutrient, protijed na otravu paracetamolem, lidský metabolit a myší metabolit. Je to aminokyselina aspartátové rodiny, proteinogenní aminokyselina, methionin a L- α -aminokyselina. Je to konjugovaná báze L-methioninia a konjugovaná kyselina L-methioninátu. Jedná se o enantiomer D-methioninu a tautomer L-methioninového zwitterionu. [21]

Používá se pro syntézu proteinů, L-homocysteinu, L-cysteinu, taurinu a sulfátu. K nežádoucím účinkům methioninu patří nevolnost, zvracení, ospalost a podrážděnost. Neměl by být podáván pacientům s acidózou. Methionin může zhoršit jaterní encefalopatii u pacientů s prokázaným poškozením jater, a proto by měl být používán s opatrností u pacientů se závažným onemocněním jater. [21]

L-methionin je hlavním dodavatelem síry, která zabraňuje poruchám vlasů, kůže a nehtů. Pomáhá snižovat hladinu cholesterolu zvýšením produkce lecitinu v játrech, snižuje jaterní tuk a chrání ledviny. Reguluje tvorbu amoniaku a vytváří moč bez amoniaku, která snižuje podráždění močového měchýře. L-methionin může chránit před toxickými účinky hepatotoxinů, jako je acetaminofen. Methionin může mít antioxidační aktivitu. [21]



Obrázek č. 15 - L-methionin

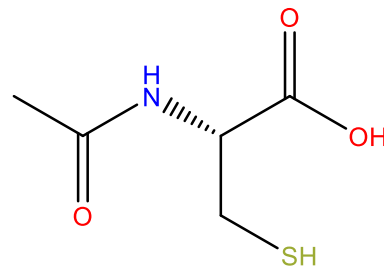
3.4.9.7 *N*-acetylcystein (*N*-acetyl-L-cystein)

Acetylcystein je syntetický *N*-acetylový derivát a proléčivo endogenní aminokyseliny L-cystein, prekursoru antioxidantu glutathionu (GSH), s mukolytickými, antioxidačními a potenciálními cytoprotektivními, rakovino-preventivními a protizánětlivými aktivitami. Po podání projevuje acetylcystein svou mukolytickou aktivitu redukcí disulfidových vazeb v mukoproteinech, což vede ke zkapalnění hlenu a snížení jeho viskozity. Používá se také k léčbě předávkování acetaminofenem, protože může obnovit vyčerpané zásoby GSH v hepatocytech během procesu detoxikace. Antioxidační aktivita je přisuzována schopnosti GSH vychytávat reaktivní formy kyslíku (ROS), čímž předchází poškození buněk. Snižuje oxidační stres, chrání buňky před škodlivými účinky volných radikálů a zabraňuje apoptóze těchto buněk. Je nejúčinnější při časném podání, přičemž přínos je patrný především u pacientů léčených během 8-10 hodin po předávkování. Navíc může inhibovat proliferaci, progresi a přežití citlivých nádorových buněk, které se při své proliferaci a maligním chování spoléhají na signalizaci zprostředkovanou ROS. Za určitých okolností je acetylcystein schopen indukovat apoptózu u citlivých buněk, včetně určitých nádorových buněk, prostřednictvím vnitřní dráhy závislé na mitochondriích. Acetylcystein může být také schopen degradovat Neurogenic locus notch homolog protein 2 precursor (Notch2) a tím zabránit proliferaci, migraci a invazi v buňkách glioblastomu s nadměrnou expresí Notch2. Kromě toho může acetylcystein inhibovat virovou stimulaci reaktivními kyslíkovými meziprodukty, a tím vytvářet antivirovou aktivitu u pacientů s HIV. Acetylcystein má také protizánětlivou aktivitu prostřednictvím modulace dráhy nukleárního faktoru-kappa B (NF- κ B) a modulace syntézy cytokinů. [22]

Acetylcystein, také známý jako *N*-acetylcystein (NAC), je modifikovaná aminokyselina, která se používá jako protijed při předávkování acetaminofenem, aby se zabránilo poškození jater. Acetylcystein je hepatoprotektivní látka a nebyla spojena s významným zvýšením sérových enzymů během léčby nebo s případy klinicky zjevného akutního poškození jater. [22]

Acetylcystein je derivát cysteinu s acetylovou skupinou připojenou k aminoskupině cysteinu. NAC je v podstatě proléčivo, které je přeměněno na cystein (ve střevě enzymem aminoacylasou a absorbováno ve střevě do krevního oběhu). Cystein je klíčovou složkou glutathionu, a proto podávání acetylcysteinu doplňuje zásoby glutathionu. Acetylcystein se běžně používá u jedinců s poruchou funkce ledvin, aby se zabránilo akutnímu selhání ledvin. Bylo prokázáno, že acetylcystein je účinný při léčbě mírného až středně těžkého

traumatického poškození mozku, včetně ischemického poškození mozku, zejména při včasném podání snižuje ztráty neuronů a také snižuje kognitivní a neurologické symptomy. *N*-acetylcystein je nyní široce používán při léčbě HIV a jeho účinnost byla popsána u chronické obstrukční plicní nemoci a kontrastem indukované nefropatie. Acetylcystein se také úspěšně používá k léčbě různých neuropsychiatrických a neurodegenerativních poruch včetně závislosti na kokainu, konopí a kouření, Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, autismu, kompulzivních poruch a poruch péče o tělo, schizofrenie, deprese a bipolární poruchy. Nedávné údaje také ukazují, že *N*-acetylcystein inhibuje svalovou únavu a může být použit ke zvýšení výkonu při vytrvalostních aktivitách a při cvičení. Acetylcystein také prochází klinickými testy jako RK-0202, orální výplach pro prevenci a léčbu mukozitidy. Skládá se z acetylcysteinu v polymerní matici. [22]



Obrázek č. 16 - *N*-acetyl-L-cystein

4 Experimentální část

4.1 Materiál

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

4.2 Přístroje

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

4.3 Chemikálie

Všechny používané látky byly v čistotě p.a.

4.3.1 Chemikálie používané pro měření s ionty železa

- Chlorid měďný (CuCl) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄·5H₂O) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hematoxylin (HEM) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner, Česká republika)

4.3.2 Chemikálie používané pro přípravu pufrů

4.3.2.1 15mM acetátové pufrů o pH 4,5 a 5,5

- kyselina octová (CH₃COOH) (Penta, Česká republika)
- octan sodný bezvodý (CH₃COONa) (Penta, Česká republika)
- Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Acetátové pufrы o pH 4,5 a 5,5 (octanové pufrы) obsahovaly vždy 15 mM octanu sodného a 27,3 mM kyseliny octové (pH 4,5), respektive 2,7 mM kyseliny octové (pH 5,5).

4.3.2.2 15mM HEPES pufrы o pH 6,8 a 7,5

- kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová (HEPES)
- sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonové (NaHEPES)

HEPES pufrы o pH 6,8 a 7,5 konkrétně obsahovaly 15 mM NaHEPES a 71,7 mM HEPES (pH 6,8), respektive 14,3 mM HEPES (pH 7,5).

4.4 Testované látky

- L-aspartátová kyselina ≥98% (HPLC)
- L-glutamová kyselina ≥99% (HPLC)
- L-cystein ≥97% FG
- L-cystin ≥98% (TLC)
- L-histidin ≥99% (TLC)
- L-methionin ≥98% (HPLC)
- L-acetylcystein ≥99% (TLC)

Všechny testované látky byly zakoupeny od Sigma-Aldrich, Německo.

4.5 Používané programy a statistické vyhodnocení

- Všechny vzorce molekul byly zhotoveny pomocí programu ChemDraw profesional 20.0.
- Pro zpracování výsledků do grafů bylo využito programu Microsoft Excel nebo GraphPad verze 9 (GraphPad Software, USA).
- Naměřené výsledky byly zpracovány jako průměr ± směrodatná odchylka vypočítaná podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$.
- Sestavení všech křivek bylo za pomoci nejméně pěti bodů (první bod 0 % chelatace až poslední bod 100 % chelatace).
- Všechny kontroly byly změřeny minimálně dvakrát.
- Pro porovnání chelatačních schopností vybraných látek byly použity 95 % konfidenční intervaly.

4.6 Metodika měření s ionty železa

4.6.1 Příprava základních a pracovních roztoků pro měření iontů železa

4.6.1.1 Příprava roztoků pro měření chelatace železnatých iontů

- **Indikační roztok ferrozinu:** připravili jsme si 5 mM indikačního roztoku ferrozinu, rozpuštěním náležitého množství ferrozinu (disodná sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl) bisbenzenesulfonová kyselina) v ultračisté vodě (Mw= 492,5 g/mol)
- **železnaté ionty (Fe^{2+}):** připravili jsme si 5 mM roztok rozpuštěním náležitého množství $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v ultračisté vodě a následně jsme ho dále zředili ultračistou vodou na pracovní roztok s koncentrací 250 μM (Mw= 278,02 g/mol)
- **hydroxylamin hydrochlorid (HA) - Pouze pro pH 7.5 (verze B):** připravili jsme si 100 mM roztok rozpuštěním náležitého množství HA v ultračisté vodě, následně jsme ho zředili ultračistou vodou na pracovní roztok s koncentrací 10 mM. Při měření byl využit jako redukční činidlo. (Mw= 69,49 g/mol)

4.6.1.2 Příprava roztoků pro měření chelatace železitých iontů

- **Indikační roztok ferrozinu:** stejné viz chelatace železnatých iontů
- **železité ionty (Fe^{3+}):** připravili jsme si 5 mM roztok rozpuštěním náležitého množství $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v ultračisté vodě (tento roztok je důležité chránit před světlem) a následně jsme ho dále zředili ultračistou vodou na pracovní roztok s koncentrací 2,5-7,5 mM (Mw= 270,3 g/mol) - zásobní roztok Fe^{3+}
- **hydroxylamin hydrochlorid (HA):** stejné viz chelatace železnatých iontů

4.6.1.3 příprava roztoků pro měření redukce železitých iontů

- **Indikační roztok ferrozinu:** připravili jsme si 5 mM indikační roztok ferrozinu, rozpuštěním náležitého množství ferrozinu (disodná sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl) bisbenzenesulfonová kyselina) v ultračisté vodě (Mw= 492,5 g/mol)
- **železité ionty (Fe^{3+}):** připravili jsme si 5 mM roztok rozpuštěním náležitého množství $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v ultračisté vodě (tento roztok je důležité chránit před světlem) a následně jsme ho dále zředili ultračistou vodou na pracovní roztok s koncentrací 2,5-7,5 mM (Mw= 270,3 g/mol) - zásobní roztok Fe^{3+}
- **hydroxylamin hydrochlorid (HA):** připravili jsme si 100 mM roztok rozpuštěním náležitého množství HA v ultračisté vodě, následně jsme ho zředili ultračistou

vodou na pracovní roztok s koncentrací 10 mM. Při měření byl využit jako redukční činidlo. ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$)

- **tlumivý roztok o pH 4,5**

4.6.2 Metodický postup stanovení chelatace železnatých iontů

Před samotným začátkem pipetování do mikrotitrační destičky jsme si připravili roztok testovaného chelátoru v destilované vodě, methanolu nebo DMSO o koncentracích 10 mM, 1 mM a 0,1 mM.

4.6.2.1 Test s pufrům pro pH 4,5; 5,5 a 6,8 (verze A) nebo pro pH 7,5 (verze B)

- Do všech jamek jsme napipetovali příslušný pufr
- Přidali jsme 50 μl chelátoru do **testovaných jamek** a přidali jsme stejné množství rozpouštědla do **kontrolních jamek**
- **Pouze verze B** – přidali jsme 50 μl HA do všech jamek
- přidali jsme 50 μl roztoku Fe^{2+} iontů do všech jamek
- nechali jsme třepat po dobu 2 minut
- přidali jsme 50 μl roztoku ferrozinu do jamek označených (X) a 50 μl destilované vody do jamek se slepým vzorkem označených (X)
- měřili jsme absorbenci ihned při vlnové délce 562 nm
- měřili jsme absorbanci při vlnové délce 562 nm po 5 minutách (start druhého měření po 4 minutách a 30 sekundách)

	roztok testované látky $c = 10 \text{ mM}$	roztok testované látky $c = 1 \text{ mM}$	roztok testované látky $c = 0,1 \text{ mM}$	kontrolní jamky $c = 0 \text{ mM}$
ferrozin				
slepý vzorek				

	Testované jamky		Jamky s indikátorem
	Kontrolní jamky		Slepé vzorky bez indikátoru

Tabulka č. 17- Schématické znázornění jamek mikrotitrační destičky při chelataci Fe^{2+} iontů

Konečný obsah jamky:

100 μ l	pufri
50 μ l	roztok chelátoru
50 μ l	Fe ²⁺ 0,25mM
50 μ l	ferrozin 5mM (vodný roztok)

Verze B: + 50 μ l hydroxylamin 10mM

4.6.3 Metodický postup stanovení chelatace železitých iontů

Před samotným začátkem pipetování do mikrotitrační destičky jsme si připravili roztok testovaného chelátoru v destilované vodě nebo DMSO o koncentracích 10 mM, 1 mM a 0,1 mM.

pro pH 4.5

- do všech jamek jsme napipetovali 150 μ l pufri o pH 4.5
- přidali jsme 50 μ l roztoku chelátoru do testovaných jamek až na jamky s nulovou koncentrací, kam jsme napipetovali stejné množství rozpouštědla.
- Připravili jsme čerstvý 250 μ M roztok Fe³⁺ iontů ze zásobního roztoku Fe³⁺.
- Přidali jsme 50 μ l roztoku Fe³⁺ do všech jamek.
- Nechali jsme třepat po dobu 2 minut
- Přidali jsme 50 μ l HA do všech jamek
- Nechali jsme třepat 1 minutu
- Přidali jsme 50 μ l ferrozínového roztoku do jamek označených (X) a 50 μ l vody do jamek se slepým vzorkem označených (X)
- Měřili jsem absorbanci ihned a po 5 minutách při vlnové délce 562 nm (start druhého měření po 4 minutách a 30 sekundách)

	roztok testované látky c = 10 mM	roztok testované látky c = 1 mM	roztok testované látky c = 0,1 mM	kontrolní jamky c = 0 mM
ferrozin				
slepý vzorek				

	Testované jamky		Jamky s indikátorem
	Kontrolní jamky		Slepé vzorky bez indikátoru

Tabulka č. 19 - Schématické znázornění jamek mikrotitrační destičky při chelataci Fe³⁺ iontů

Konečný obsah jamky:

- 150 µl pufr o pH 4.5
- 50 µl roztok chelátoru
- 50 µl Fe³⁺ 0,25mM (Fe²⁺)
- 50 µl hydroxylamin 10mM
- 50 µl ferrozin 5mM (vodný roztok)

4.6.4 Metodický postup stanovení redukce železitých iontů

Před samotným pipetováním do mikrotitrační destičky jsme si připravili roztok testovaného chelátoru v destilované vodě, methanolu nebo DMSO o koncentracích 10 mM, 1 mM a 0,1 mM.

Pro pufr

- napipetovali jsme 150 µl pufru do všech jamek s testovaným chelátorem a napipetovali jsem 150 µl pufru o pH 4,5 do kontrolních jamek
- přidali jsem 50 µl roztoku chelátoru (rozpuštědlo do jamek s nulovou koncentrací chelátoru) do testovaných jamek a 50 µl HA do kontrolních jamek
- Připravili jsem si čerstvý 250µM roztok Fe³⁺ iontů ze zásobního roztoku Fe³⁺ iontů
- Přidali jsem 50 µl roztoku Fe³⁺ do všech jamek
- Nechali jsem třepat 2 minuty

- Přidali jsme 50 μl ferrozinu do jamek označených (X) a 50 μl destilované vody do jamek se slepým vzorkem označených (X)
- Měřili jsme absorbanci ihned při vlnové délce 562 nm a po pěti minutách (start druhého měření po 4 minutách a 30 sekundách)

	roztok testované látky c = 10 mM	roztok testované látky c = 1 mM	roztok testované látky c = 0,1 mM	roztok testované látky c = 0 mM =rozpouštědlo	kontrolní jamky (HA)
ferrozin					
slepý vzorek					

	Testované jamky		Jamky s indikátorem
	Kontrolní jamky		Slepé vzorky bez indikátoru

Tabulka č. 20 - Schématické znázornění jamek mikrotitrační destičky při redukci Fe^{3+} iontů

Konečný obsah jamky:

150 μl pufr

50 μl příslušná koncentrace chelátoru / HA

50 μl Fe^{3+} 0,25mM (Fe^{2+})

50 μl ferrozín 5mM nebo destilovaná voda

5 Výsledky

5.1 Kalibrační křivka iontů železa

Pro sestavení kalibrační křivky železnatých iontů jsme si připravili základní reagenční roztoky.

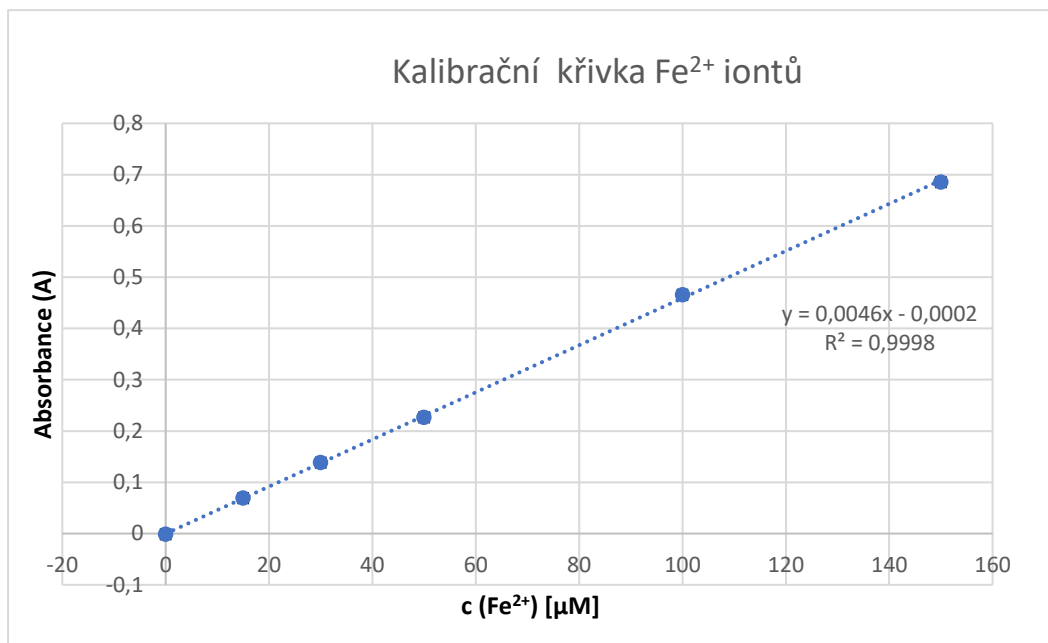
- Roztok ferrozinu [4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzenesulfonová kyselina – sodná sůl] 5 mM v destilované vodě /Mw= 492,5 g/mol/
- Roztok FeSO₄·7H₂O...5 mM v destilované vodě /Mw= 278,02 g/mol/

Vodné roztoky železnatých solí byly připraveny v koncentracích 75, 150, 250, 500 a 750 μM. Do všech určených jamek mikrotitrační destičky jsme napipetovali 150 μl destilované vody. Přidali jsme žádanou koncentraci železnatých iontů v objemu 50 μl (pro jamky s nulovou koncentrací železnatých iontů jsme přisali 50 μl destilované vody). Do poloviny jamek (X) jsme přidali 50 μl ferrozinového roztoku. Do druhé poloviny jamek (X) jsme přidali 50 μl destilované vody. Změřili jsme absorbanci při vlnové délce 562 nm a sestrojili jsem kalibrační křivku.

	kontrola - přidaná c(Fe ²⁺) = 0 μM	přidaná c(Fe ²⁺) = 75 μM	přidaná c(Fe ²⁺) = 150 μM	přidaná c(Fe ²⁺) = 250 μM	přidaná c(Fe ²⁺) = 500 μM	přidaná c(Fe ²⁺) = 750 μM
ferrozin						
slepé vzorky						

Základní koncentrace Fe ²⁺ (μM)	0	75	150	250	500	750
Finální koncentrace Fe ²⁺ (μM)	0	15	30	50	100	150
Průměrná absorbance (A)	-0,00133	0,069	0,138333	0,226667	0,465667	0,685333

Tabulka č. 21 - Schématické znázornění jamek mikrotitrační destičky pro sestavení kalibrační křivky



Obrázek č. 22 – kalibrační křivka Fe²⁺ iontů

5.2 Chelatační aktivita testovaných látek se železem – ferrozinová metoda

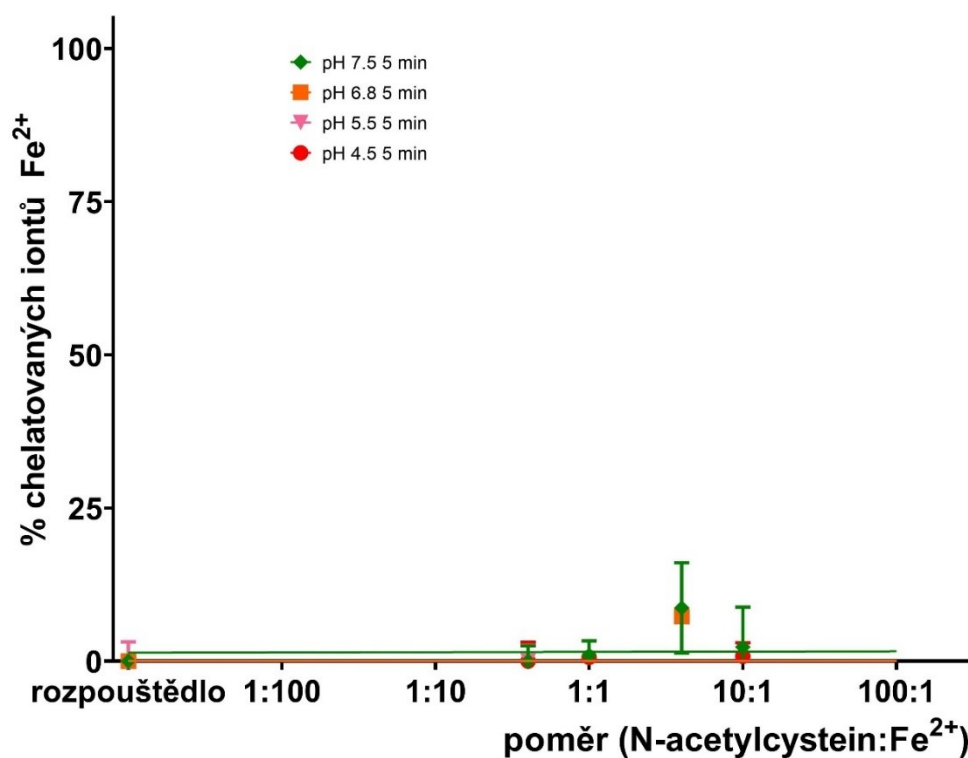
Pro stanovení koncentrace železa byla použita ferrozinová metoda. Ferrozin je specifické činidlo, které tvoří s železnatými ionty purpurově zbarvený komplex s absorpčním maximem při 562 nm. Proto byly měřeny železnaté ionty ihned po přidání ferrozinu (50 μl, 5 mM vodný roztok), pro stanovení celkového železa byl přidán vodný roztok hydroxylaminu (50 μl, 10 mM), aby došlo k redukci železitých iontů na železnaté, které byly následně měřeny přidáním ferrozinu. Všechny experimenty byly provedeny na 96-jamkových mikrotitračních destičkách. Každý vzorek byl měřen alespoň dvakrát s přidavkem ferrozinu a bez ferrozinu (slepý vzorek). Absorbance byla měřena ihned po přidání ferrozinu (interakce ferrozinu s železnatými ionty neproběhla) a o 5 minut později pomocí spektrofotometru. Ferrozin je chelátor železa, tudíž určitý stupeň chemické rovnováhy mezi chelatací železa testovanou látkou a ferrozinem je dosaženo po 5 min. [31]

5.2.1 Chelatace železnatých iontů

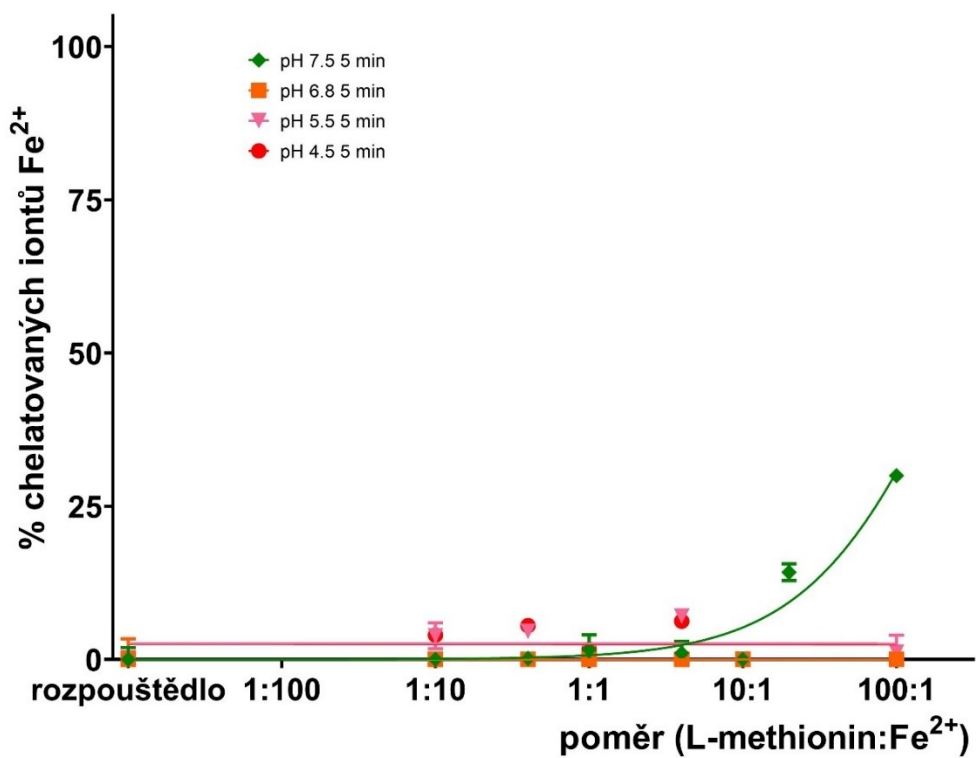
Vybrané testované látky byly testovány ve vodě *in vitro* na chelatační aktivitu při čtyřech různých (pato) fyziologických pH prostředí. Osa X znázorňuje koncentrační poměr testované

látky a Fe^{2+} . Osa Y znázorňuje v procentech schopnost testované látky chelatovat Fe^{2+} ionty. Časy měření a různá pH jsou odlišena barevně.

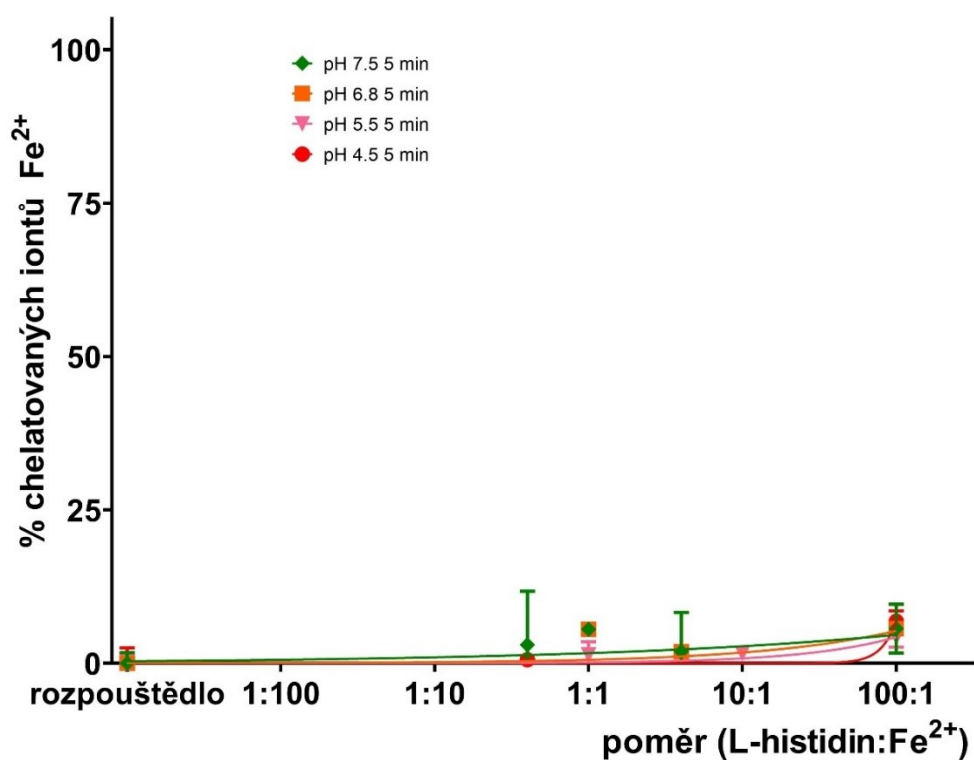
Z grafů lze odečíst, že jediná zkoumaná látka L-methionin (obrázek č. 24, str. 49) vykazuje chelatační aktivitu Fe^{2+} iontů nad 25 % v poměru 100 : 1 (L-methionin : Fe^{2+}) při pH 5,5. Ostatní zkoumané látky nevykazují žádnou signifikantní chelatační aktivitu.



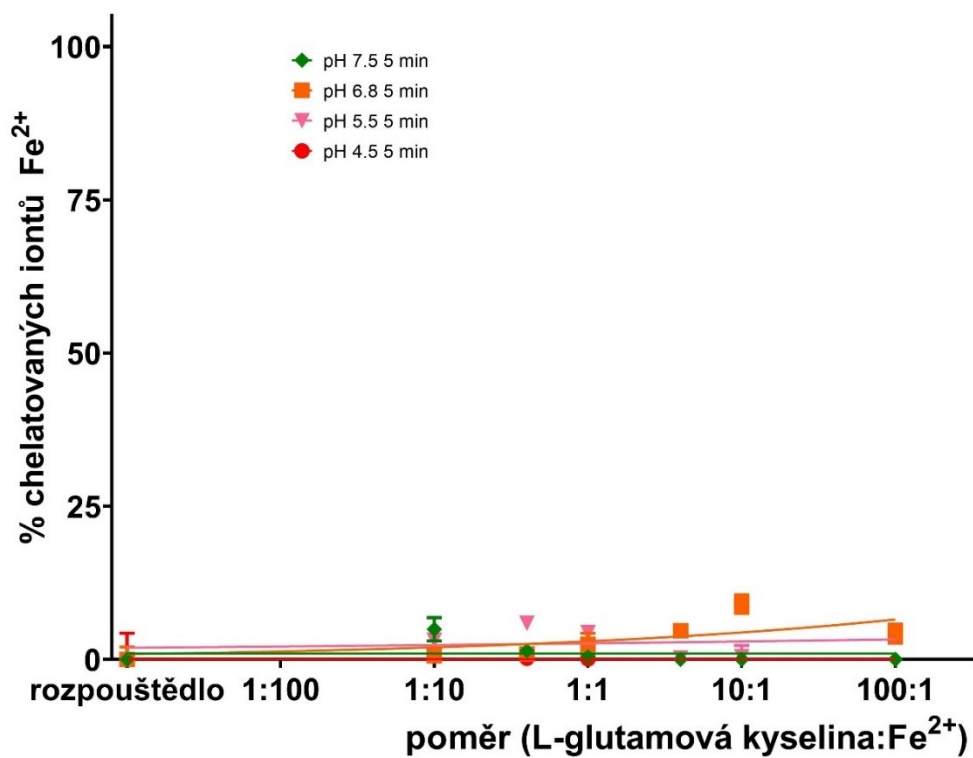
Obrázek č. 23 – Grafické znázornění schopnosti N-acetylcysteinu chelatovat Fe^{2+} ionty



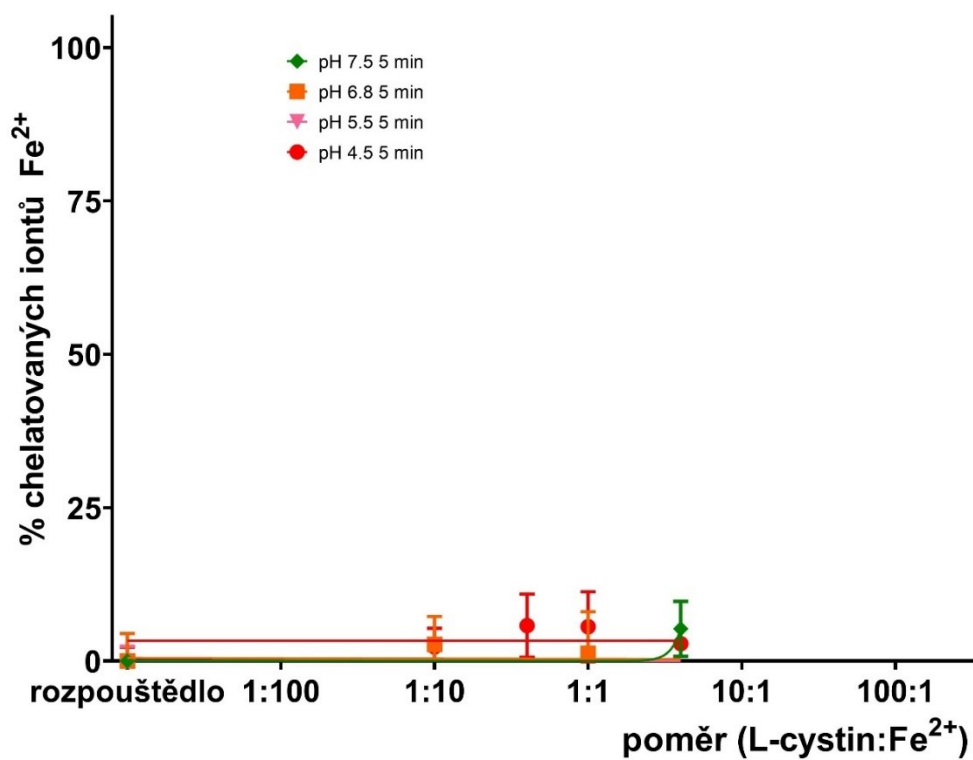
Obrázek č. 24 - Grafické znázornění schopnosti L-methioninu chelatovat Fe²⁺ ionty



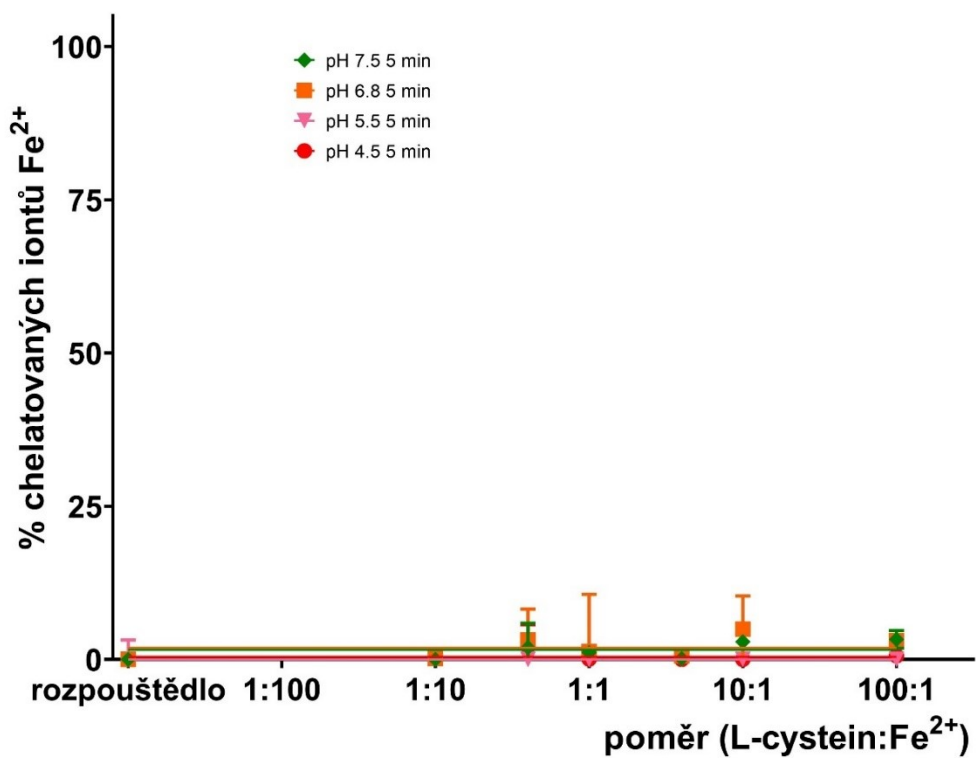
Obrázek č. 25 - Grafické znázornění schopnosti L-histidinu chelatovat Fe²⁺ ionty



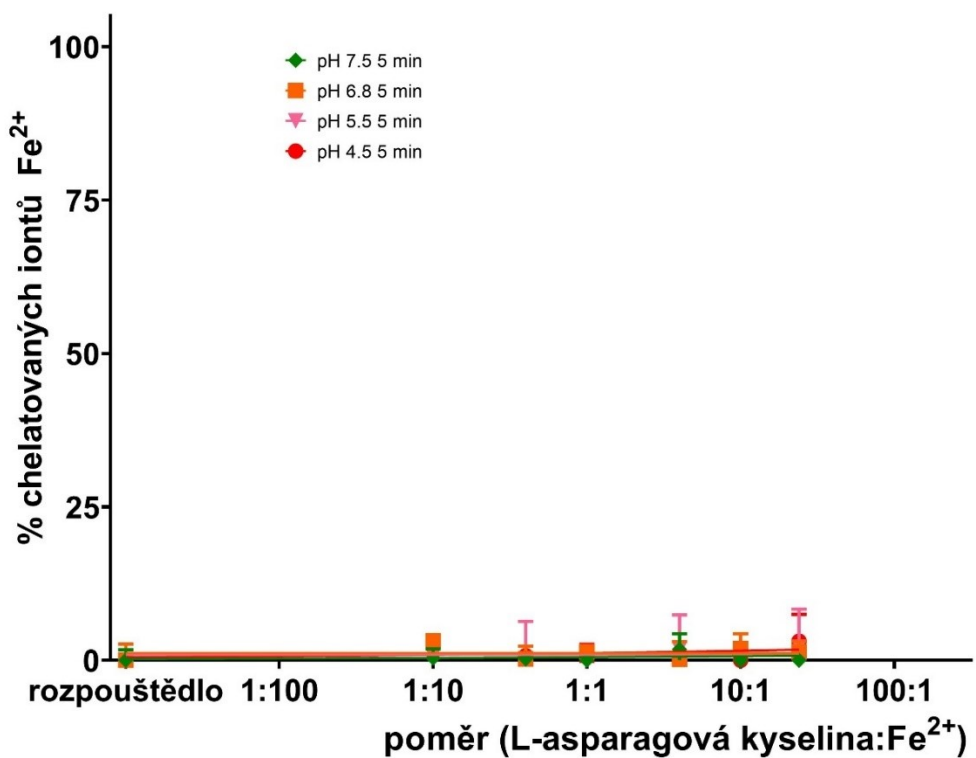
Obrázek č. 26 - Grafické znázornění schopnosti L-glutamové kyseliny chelatovat Fe²⁺ ionty



Obrázek č. 27 - Grafické znázornění schopnosti L-cystinu chelatovat Fe²⁺ ionty



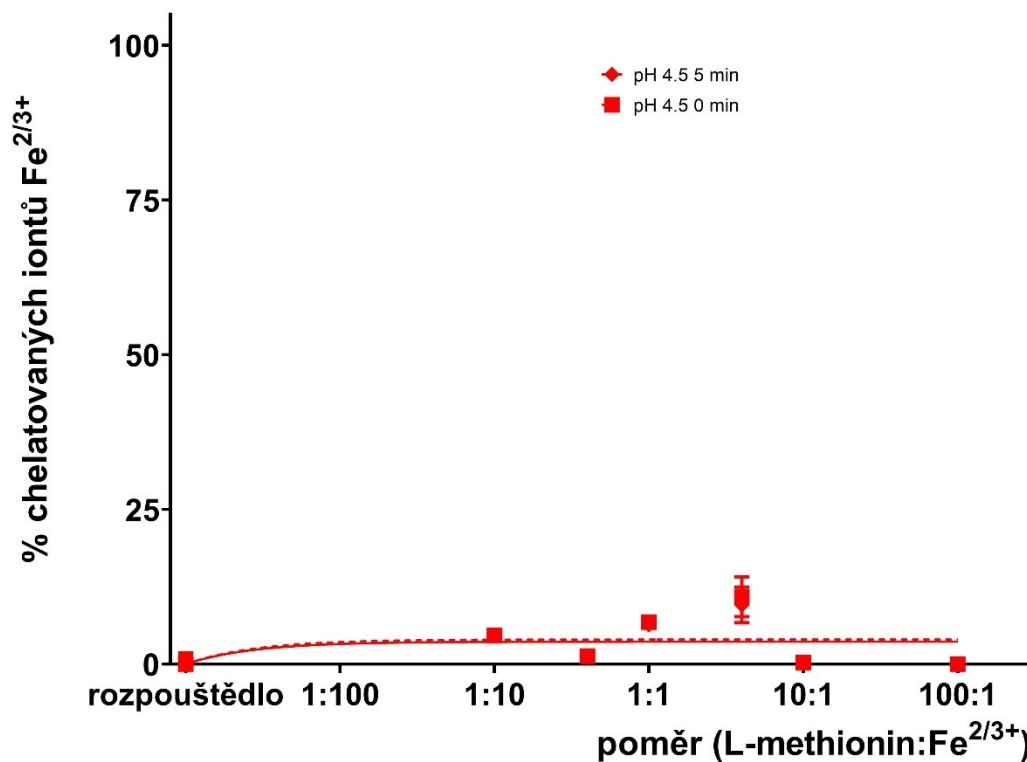
Obrázek č. 28 - Grafické znázornění schopnosti L-cysteinu chelatovat Fe²⁺ ionty



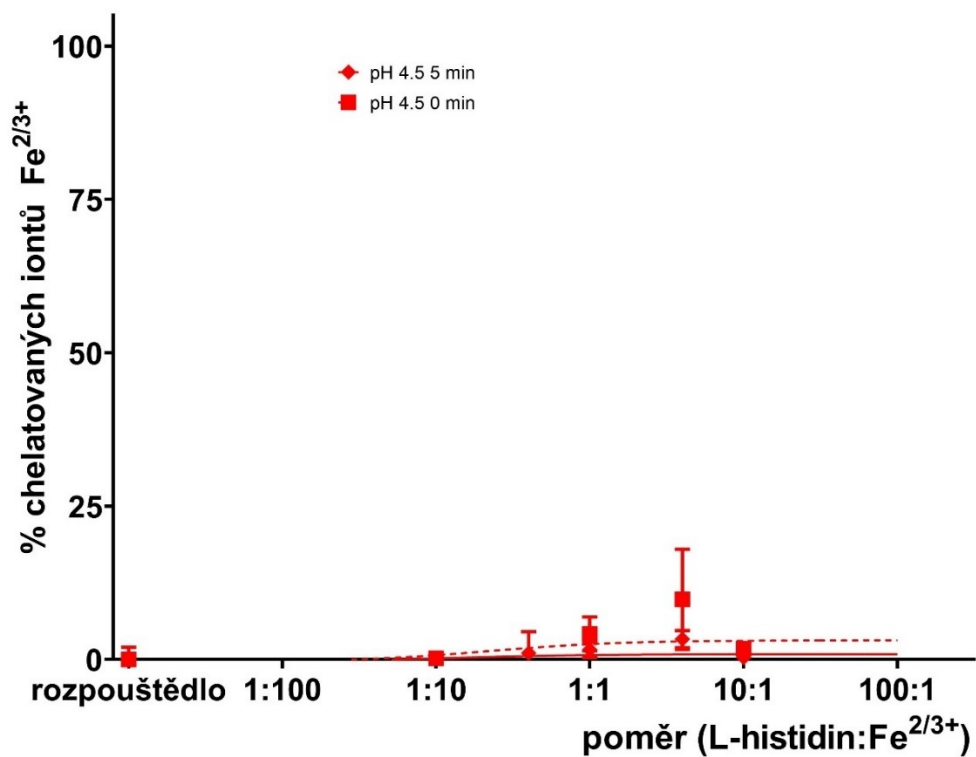
Obrázek č. 29 - Grafické znázornění schopnosti L-asparagové kyseliny chelatovat Fe²⁺ ionty

5.2.2 Chelatace železitých iontů

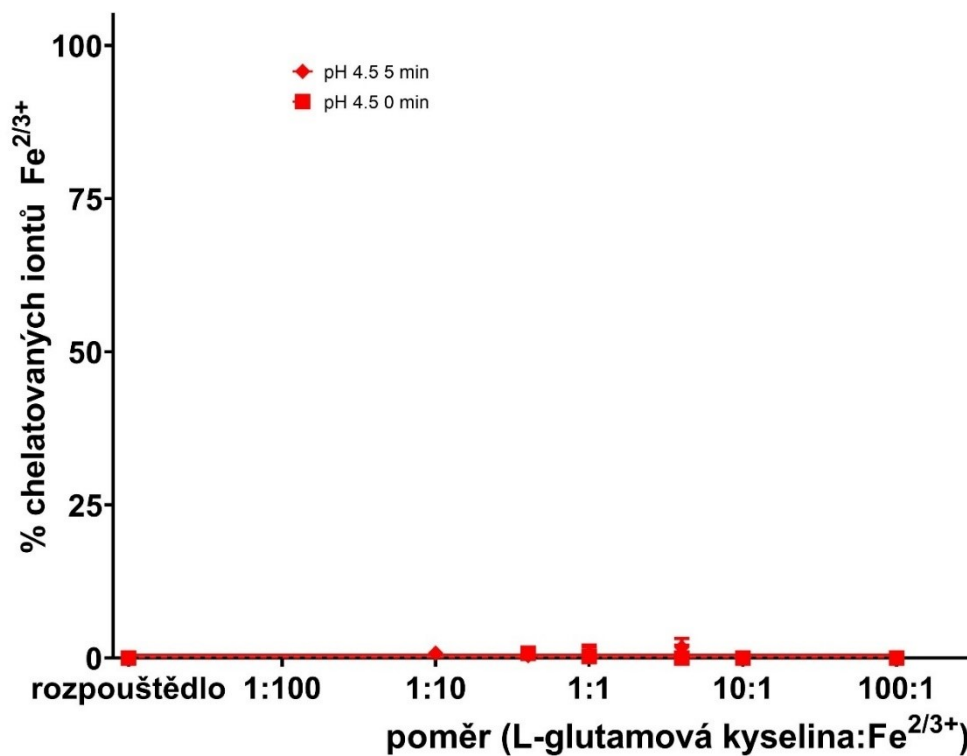
Následující grafy ukazují, že žádná ze zkoumaných látek nevykazovala chelatační aktivitu Fe^{3+} iontů.



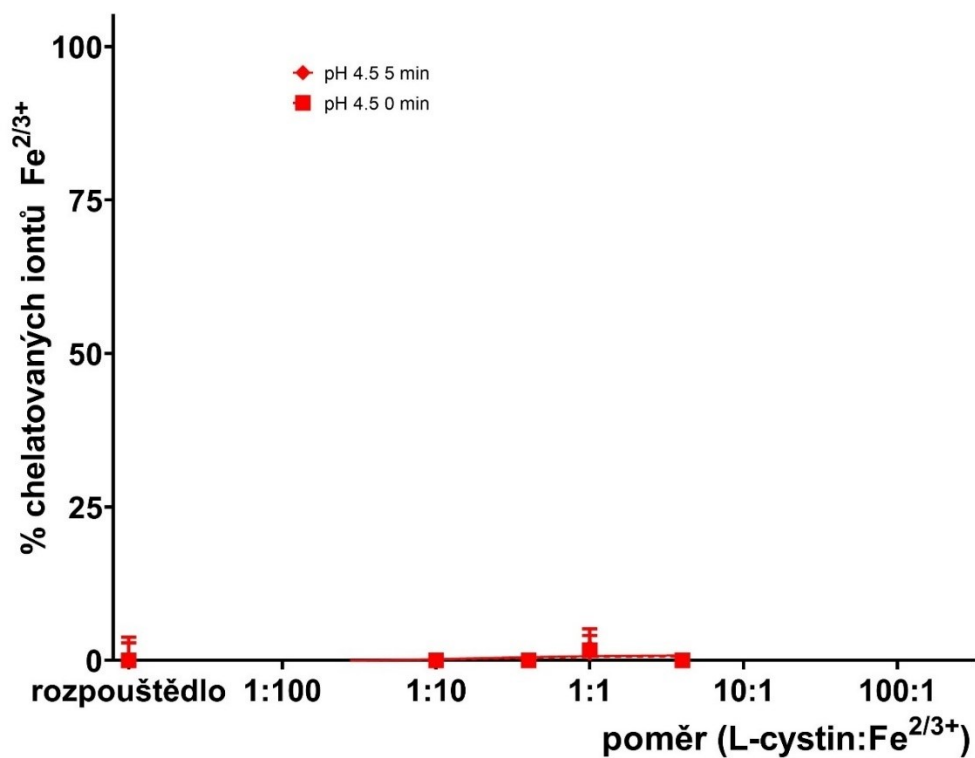
Obrázek č. 30 - Grafické znázornění schopnosti L-methioninu chelatovat Fe^{3+} ionty



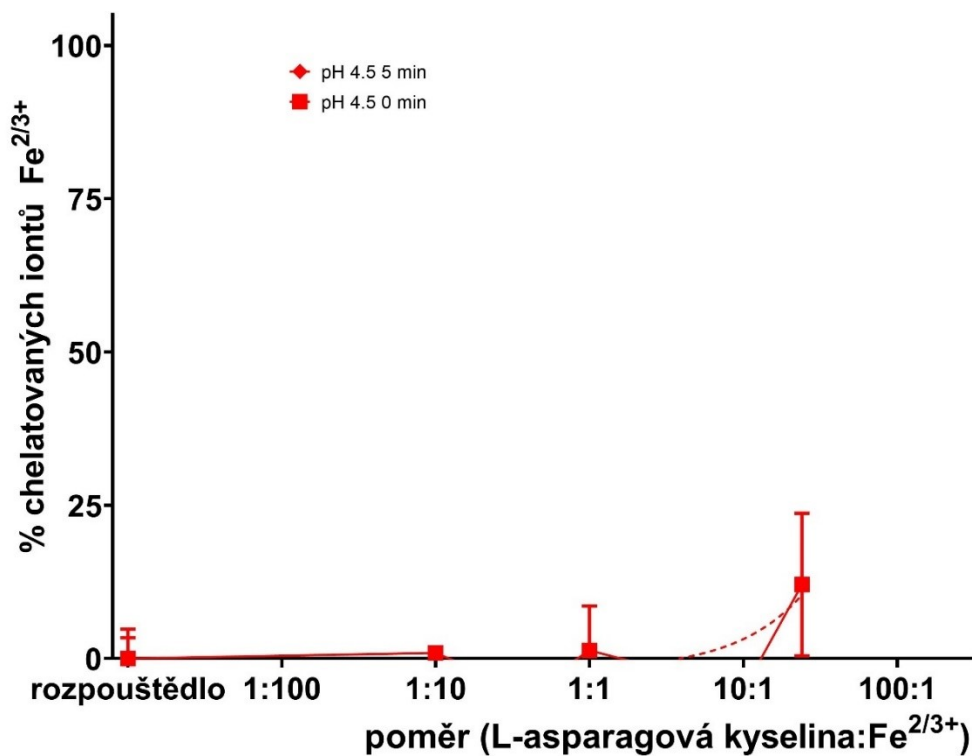
Obrázek č. 31 - Grafické znázornění schopnosti L-histidinu chelatovat Fe^{3+} ionty



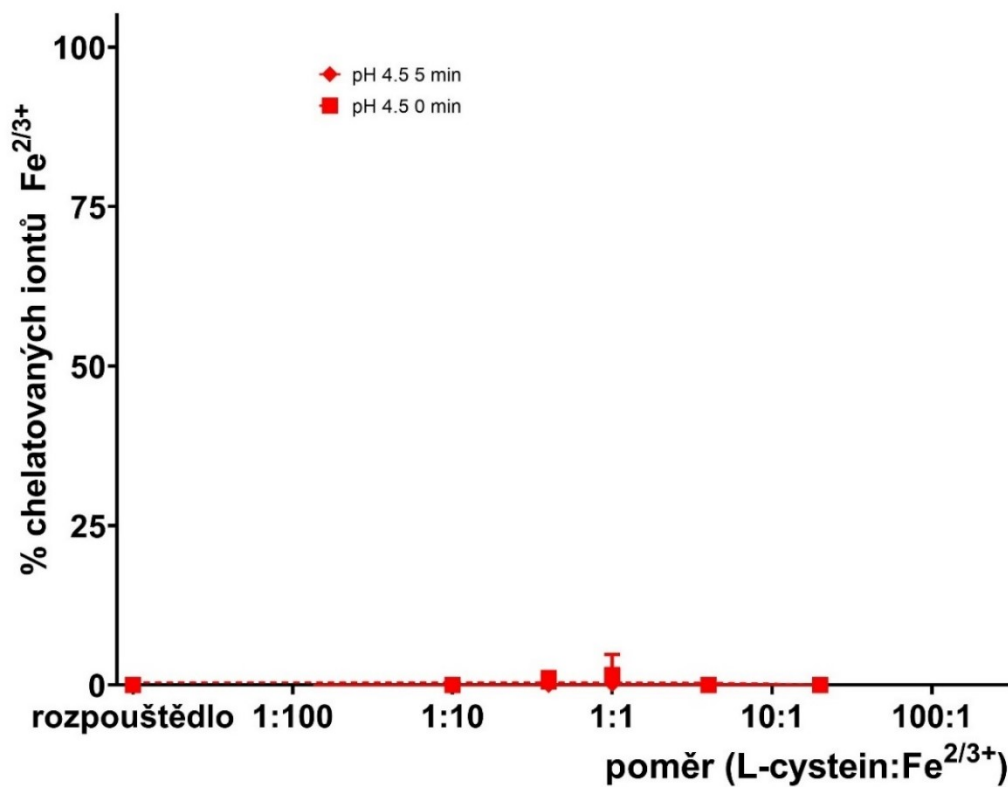
Obrázek č. 32 - Grafické znázornění schopnosti L-glutamové kyseliny chelatovat Fe^{3+} ionty



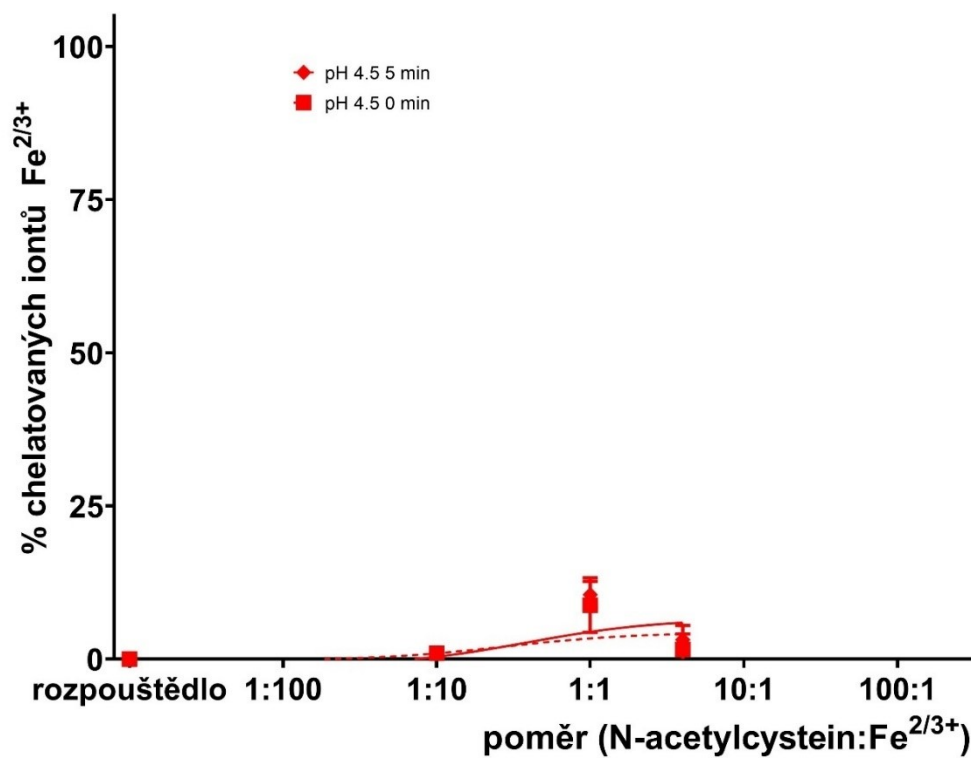
Obrázek č. 32 - Grafické znázornění schopnosti L-cystinu chelatovat Fe^{3+} ionty



Obrázek č. 33 - Grafické znázornění schopnosti L-asparagové kyseliny chelatovat Fe³⁺ ionty



Obrázek č. 34 - Grafické znázornění schopnosti L-cysteinu chelatovat Fe³⁺ ionty

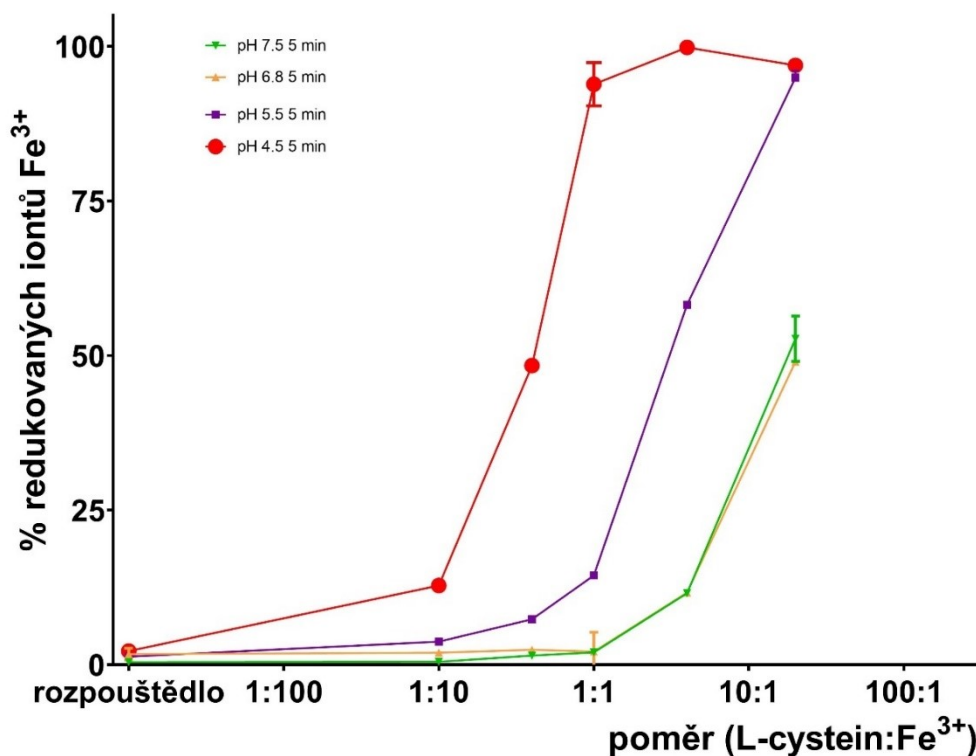


Obrázek č. 35 - Grafické znázornění schopnosti *N*-acetylcysteinu chelátovat Fe³⁺ ionty

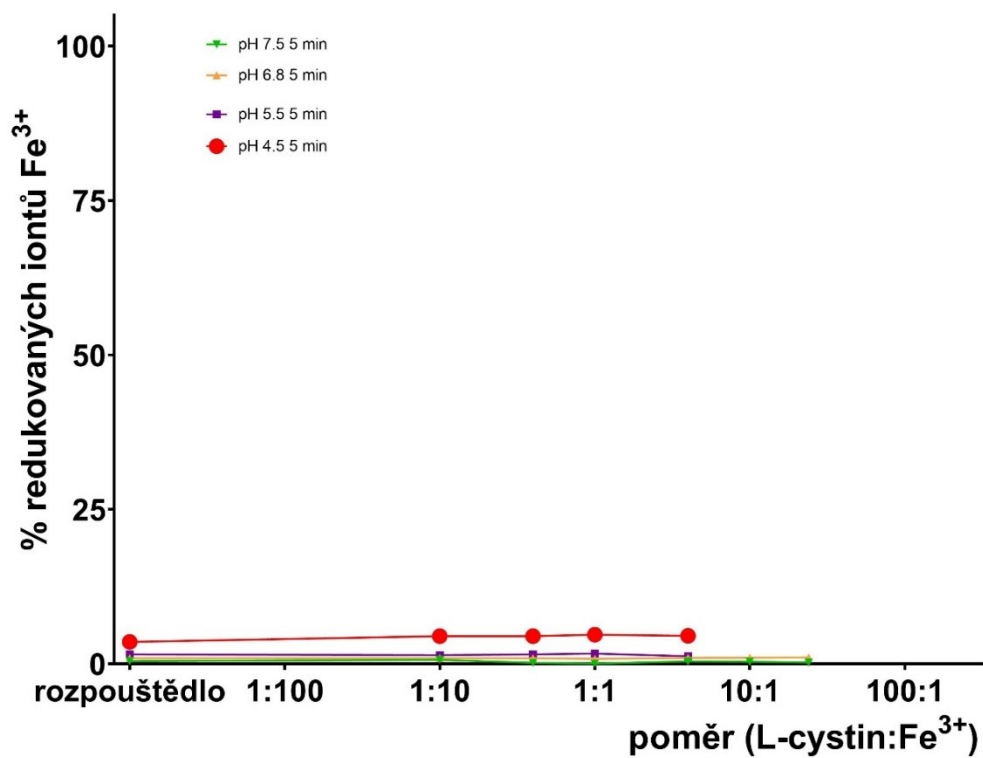
5.3 Redukční aktivita testovaných látek

Osa X uvedených grafů znázorňuje poměr roztoku zkoumané látky ku roztoku iontů železa. Na ose Y můžeme vidět množství redukováných iontů vyjádřené v procentech. pH a časy měření jsou odlišeny barevně. Významnou redukční aktivitu Fe^{3+} iontů prokázal L-cystein (obrázek č. 36, str. 56) při všech měřených pH. V poměru 1 : 1 (L-cystein : Fe^{3+}) při pH 4,5 dosahovala redukce téměř 100 %. Při pH 5,5 dosahoval L-cystein podobné redukční aktivity v poměru 10 : 1 (L-cystein : Fe^{3+}). Ve zbylých pH prostředí (6,8 a 7,5) dosahovala redukce 50 %.

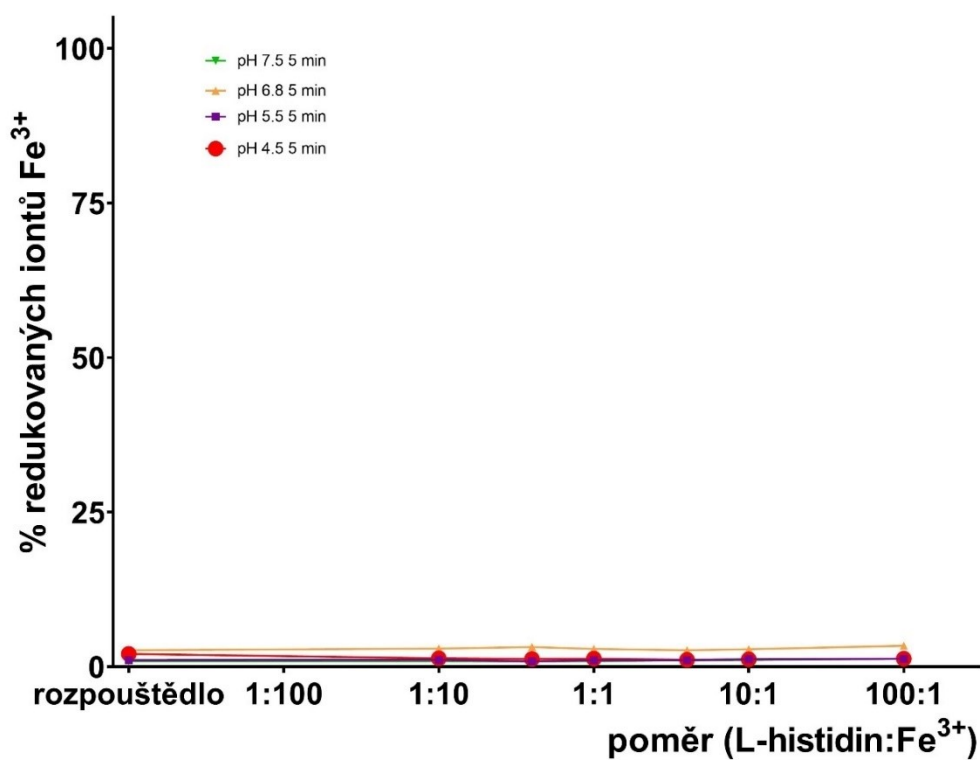
Dále byla 100% redukce pozorována u N-acetylcysteinu (obrázek č. 39, str. 58) při pH 4,5 a 6,8 v poměru 10:1 (N-acetylcystein : Fe^{3+}). Při pH 7,5 a 5,5 byla redukční aktivita v poměru 10 : 1 (N-acetylcystein : Fe^{3+}) 50 %. Zbylé testované látky nevykazovaly signifikantní redukční aktivitu.



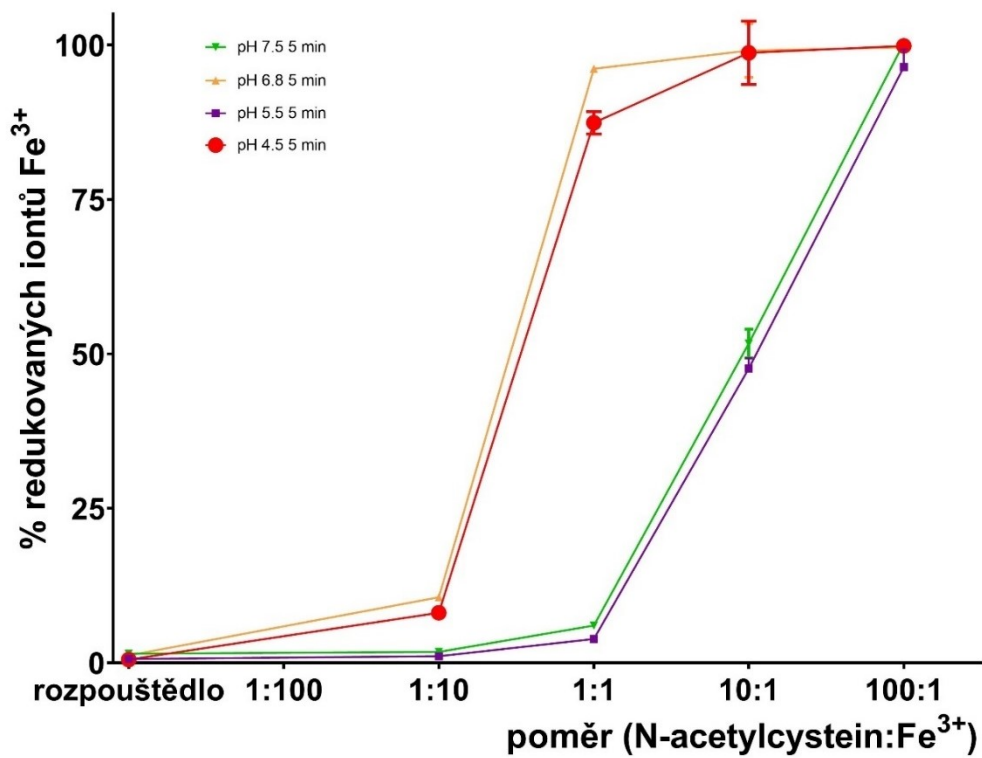
Obrázek č. 36 - Grafické znázornění schopnosti L-cysteinu redukovat Fe^{3+} ionty



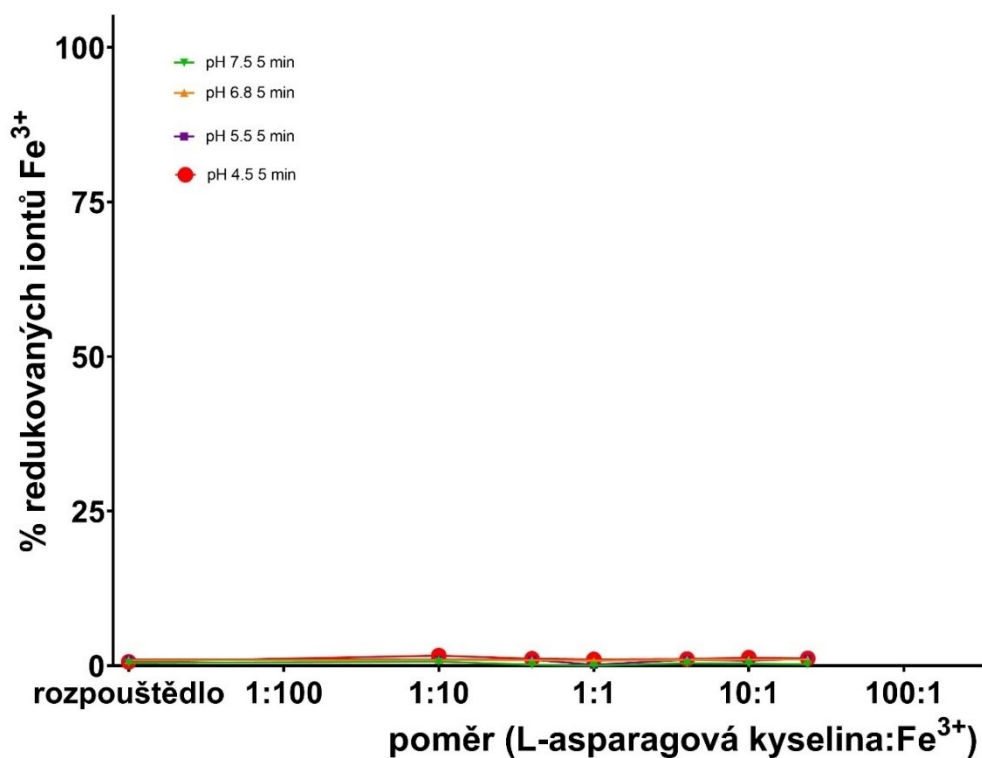
Obrázek č. 37 - Grafické znázornění schopnosti L-cystinu redukovat Fe^{3+} ionty



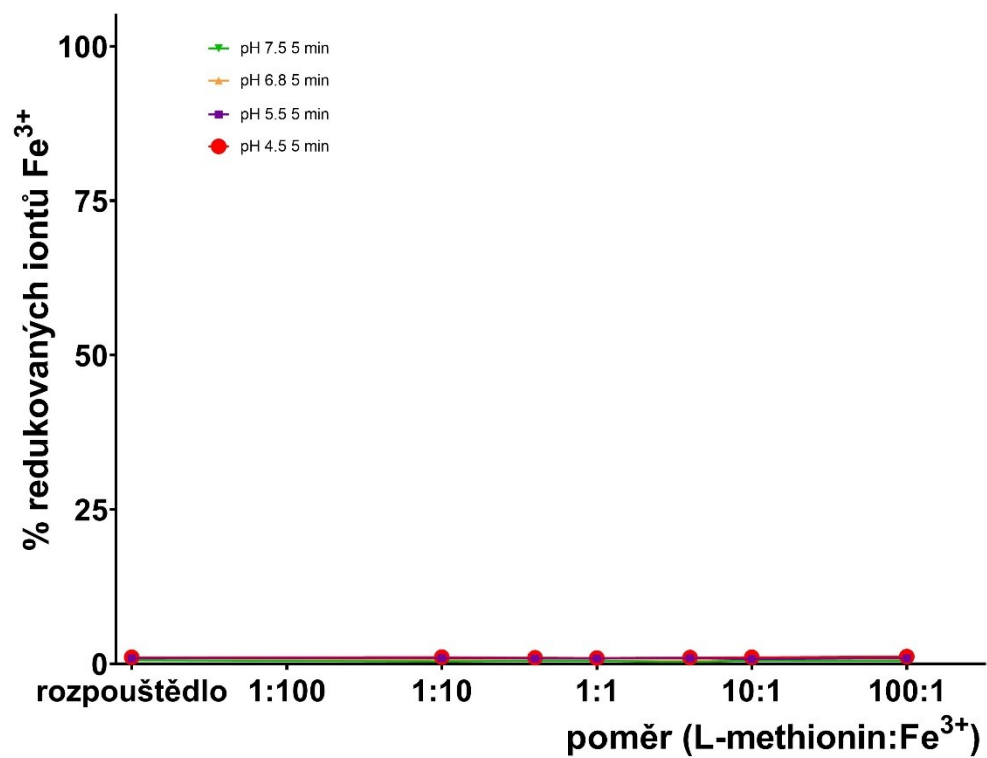
Obrázek č. 38 - Grafické znázornění schopnosti L-histidinu redukovat Fe^{3+} ionty



Obrázek č. 39 - Grafické znázornění schopnosti *N*-acetylcysteinu redukovat Fe^{3+} ionty



Obrázek č. 40 - Grafické znázornění schopnosti L-asparagové kyseliny redukovat Fe^{3+} ionty



Obrázek č. 41 - Grafické znázornění schopnosti L-methioninu redukovat Fe^{3+} ionty

6 Diskuze

Železo patří mezi důležité esenciální stopové prvky, který jsou pro správnou funkci organismu nenahraditelné. Zejména pro přenos a využití kyslíku v organismu. Nedostatek, stejně tak, jako nadbytek železa může vést k patologickým stavům, proto je potřeba hladinu železa v krvi kontrolovat. Mezi patologické stavy patří například vznik volných radikálů, oxidační poškození buněk či sideropenická anémie. [5]

Během chelatace se ionty železa naváží na ligandy za vzniku chelátových komplexů, čímž se odstraní toxicita přebytečného železa nebo jeho disregulace. Chelatace je potenciálním terapeutickým nástrojem v případě narušení homeostázy železa v organismu. [5]

V současné době se klinicky používají tři chelátory železa – deferoxamin mesylát (DFO), deferasirox a deferipron (DFP), jejichž rozdíl je v mechanismu působení. Prozatímní výsledky a zkušenosti ukazují, že tyto klinicky využívané chelátory železa mimo svou hlavní funkci modulují i signální dráhy v buňce zapojené do regulace buněčného cyklu, apoptózy a imunitní odpovědi. Proapoptotické a antiproliferační působení chelátorů železa na nádorové buňky je zřejmé, k jejich úplnému prostudování bude však potřeba ještě mnoho práce. Chelátory železa jsou v současnosti důležitou modalitou v léčbě myelodysplastického syndromu (MDS). Jedná se o heterogenní skupinu onemocnění, při kterých dochází k hromadění nezralých krevních prekurzorů v kostní dřeni a neefektivní hematopoézou projevující se nízkým počtem krevních buněk v periferní krvi. [35]

Ideální chelátor by měl napodobovat funkci přirozeně se vyskytujících chelatačních látek v organismu. Strukturu těchto tělu vlastních chelátorů tvoří AMK propojené peptidovými vazbami. To je důvod, proč se tato diplomová práce zaměřuje na interakce aminokyselin s ionty železa. Důležitou součástí práce bylo také zjistit i železo-redukující aktivitu, jež by mohla být v praxi příčinou prooxidačního účinku. [35]

Všechny látky, které byly v této práci testovány, obsahují ve své struktuře vždy alespoň jeden atom kyslíku, síry nebo dusíku. Tyto atomy by mohly mít funkci ligandů a poskytnout elektronové páry iontům železa a tím vytvořit chelátový komplex. Byly testovány esenciální aminokyseliny L-methionin a L-histidin, dále neesenciální aminokyseliny L-cystein, jeho dimer L-cystin a odvozená látka od L-cysteinu, *N*-acetylcystein. Zkoumány byly také neesenciální aminokyseliny L -glutamová a L -asparagová kyselina. [5]

Pro měření byla využita metodika, založená na indikátoru ferrozinu, jenž chelatuje železnaté ionty za vzniku barevného komplexu. Tento komplex byl následně měřen

spektrofotometricky, výsledná hodnota absorbance byla poté převedena do grafů a tím jsme nepřímo získali informaci o schopnosti testovaných aminokyselin chelátovat nebo redukovat ionty železa. Abychom zjistili chelatace celkového železa (Fe^{2+} i Fe^{3+} iontů) bylo nutné přidat redukční činidlo – Hydroxylamin, neboť ferrozín tvoří komplexy pouze s železnatými ionty. [36]

Měření *in vitro* probíhala v prostředí pufrů o pH 4,5; 5,5; 6,8; a 7,5. Tato pH odpovídají (pato)fyziologickému prostředí v organismu člověka. Pufr o hodnotě pH 4,5 odpovídá prostředí karcinogenní tkáně nebo probíhajícímu infarktu myokardu. pH 5,5 nalezneme v lysozomech. Prostředí v duodenu pak odpovídá pufru s pH 6,8 a lidská plazma pufru s pH 7,5. [5]

Z grafů lze vyčíst, že jediná zkoumaná látka L-methionin (obrázek č. 24, str. 49) vykazovala chelatační aktivitu Fe^{2+} iontů nad 25 % v poměru 100 : 1 (L-methionin : Fe^{2+}) při pH 5,5. Ostatní zkoumané látky nevykazovaly žádnou signifikantní chelatační aktivitu.

Chelatační aktivitu Fe^{3+} iontů nevykazovala žádná ze zkoumaných látek.

Významnou redukční aktivitu Fe^{3+} iontů prokázal L-cystein (obrázek č. 36, str. 56) při všech měřených pH. V poměru 1 : 1 (L-cystein : Fe^{3+}) při pH 4,5 dosahovala redukce téměř 100 %. Při pH 5,5 dosahoval L-cystein podobné redukční aktivity v poměru 10 : 1 (L-cystein : Fe^{3+}). Ve zbylých pH prostředí (6,8 a 7,5) dosahovala redukce 50 %.

Dále byla 100% redukce pozorována u N-acetylcysteinu (obrázek č. 39, str.) při pH 4,5 a 6,8 v poměru 10 : 1 (N-acetylcystein : Fe^{3+}). Při pH 7,5 a 5,5 byla redukční aktivita v poměru 10 : 1 (N-acetylcystein : Fe^{3+}) 50 %. Zbylé testované látky nevykazovaly signifikantní redukční aktivitu.

Testování vybraných aminokyselin proběhlo v rámci jiné studie také s měďnými (Cu^+) a měďnatými ionty (Cu^{2+}) za využití bathokuproinové metody (BCS). Byla stanovena i měď-chelatační a měď-redukující aktivita těchto aminokyselin. Testované látky lze tedy spíše považovat za slabé chelátory mědi. Pouze esenciální aminokyselina L-histidin poskytovala metodou s BCS signifikantní výsledky. K chelataci však bylo potřeba vyšších koncentrací této látky a prostředí o vyšším pH (6,8 a 7,5). Zároveň u L-histidin nebyla prokázána redukční aktivita, z čehož lze usoudit, že L-histidin je v rámci této studie nejvhodnějším kandidátem na chelataci mědi *in vitro*, a proto je vhodné jej dále zkoumat. L-cystein vykázal zvláštní chování. Byla u něj touto metodou zjištěna mírná chelatace Cu^{2+} v prostředí s pH 4,5. L-cystein však vykazoval vysokou redukční aktivitu v rámci všech pH, proto pravděpodobně nebude

moci být využit v praxi jako chelátor mědi. Vysokou redukční aktivitu při všech pH vykazoval také *N*-acetylcystein. Schopnost redukovat ionty mědi měly tedy stejné aminokyseliny jako u železa. [5]

Na redukcii se pravděpodobně podílejí thiolové skupiny. V jiné studii byl testován tripeptid glutathion, u něhož jsou právě thiolové skupiny cysteinu schopné redukce, z čehož vyplývá jeho antioxidační účinek. [4]

Naším měřením došlo k potvrzení známé informace, že *L*-methionin má chelatační účinky, i když v rámci této studie vyšly jen mírné. Z těchto výsledků vyplývá, že žádná z testovaných aminokyselin se nejeví jako vhodný chelátor železa.

V plánu je provést testování i s dalšími přechodnými kovy, jako je zinek a kobalt.

7 Závěr

Jedinou ze zkoumaných látek L-methionin lze považovat za velmi slabý chelátor Fe^{2+} iontů, a to v prostředí o pH 5,5 v poměru 100 : 1 (L-methionin : Fe^{2+}). Ostatní testované látky nevykázaly žádnou chelatační aktivitu v případě železnatých i železitých iontů.

Redukci Fe^{3+} iontů vykazoval L-cystein při všech měřených pH. V poměru 1 : 1 (L-cystein : Fe^{3+}) při pH 4,5 dosahovala jeho redukce až 100 %. Při pH 5,5 dosahoval L-cystein podobné redukční aktivity v poměru 10 : 1 (L-cystein : Fe^{3+}). Ve zbylých pH prostředí (6,8 a 7,5) dosahovala redukce L-cysteinu až 50 %.

Další ze zkoumaných látek N-acetylcystein vykazoval až 100% redukci při pH 4,5 a 6,8 v poměru 10 : 1 (N-acetylcystein : Fe^{3+}) a při pH 7,5 a 5,5 v poměru 10 : 1 (N-acetylcystein : Fe^{3+}) vykazoval redukci až 50 %.

V rámci jiné studie byla zkoumána také chelatační a redukční aktivita stejných AMK s ionty mědi, kde schopnost redukovat ionty mědi měly stejné aminokyseliny jež redukovaly ionty železa. Závěrem tedy lze konstatovat, že na redukci iontů železa i iontů mědi se pravděpodobně podílejí thiolové skupiny (–SH).

Došlo k potvrzení známých chelatačních účinků L-methioninu, i když v této diplomové práci byly naměřeny jen mírné hodnoty chelatace.

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že žádná z testovaných aminokyselin se nejeví jako vhodný chelátor železa.

8 Literatura

- 1 Houda, J., *Disertační práce*. Univerzita Palackého: Olomouc, 2014.
- 2 Horák, J., *Hemochromatóza*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-3287-09.
- 3 Stonawská, M., *Diplomová práce*. Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2011.
- 4 Salanciová, I., *Diplomová práce*. Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2020.
- 5 Holotíková, N., *Diplomová práce*. Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2021.
- 6 Marhold, J., *Přehled průmyslové toxikologie*. 2. vydání. Praha: Avicenum-Zdravotnické nakladatelství, 1980. ISBN 08-035-80
- 7 Šulcová, M., *Diplomová práce*. Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2011.
- 8 Krčová, D., *Diplomová práce*. Univerzita Karlova: Praha, 2019.
- 9 Lopez, M.J., Mohiuddin, S.S., *Biochemistry, Essential Amino Acids*. Treasure Island (LF): StatPearls Publishing, 2021. PMID: 32496725.
- 10 Kamei, Y., Hatazawa, Y., Uchitomi, R., Yoshimura, R., Miura, S., *Regulation of Skeletal Muscle Function by Amino Acids*. *Nutrients*. 12(1), 261 (2020).
- 11 Rose, A. J., *Amino Acid Nutrition and Metabolism in Health and Disease*. *Nutrients*. 11(11), 2623 (2019).
- 13 <https://www.nutrientsreview.com/proteins/amino-acids/> cit. 31.3.2022
- 14 Diestel, C. F., Marques, R. G., Lopes-Paulo, F., Paiva, D., Horst, N. L., Caetano, C. E., & Portela, M. C., *Role of l-glutamine and glycine supplementation on irradiated colonic wall*, *International Journal of Colorectal Disease*, 22(12), 1523-1529 (2007).
- 15 Forbes, J., Krishnamurthy, K., *Biochemistry, Peptide*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. PMID: 32965931
- 16 National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5960, Aspartic acid" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aspartic-acid>. Accessed 31 March, 2022.
- 17 National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 33032, Glutamic acid" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutamic-acid>. Accessed 31 March, 2022.

- 18** National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5862, Cysteine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cysteine>. Accessed 31 March, 2022.
- 19** National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 67678, L-cystine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-cystine>. Accessed 31 March, 2022.
- 20** National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 6274, Histidine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Histidine>. Accessed 31 March, 2022.
- 21** National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 6137, Methionine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methionine>. Accessed 31 March, 2022.
- 22** National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 12035, Acetylcysteine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetylcysteine>. Accessed 31 March, 2022.
- 23** Campen, D. V., Gross, E., *Effect of Histidine and Certain Other Amino Acids on the Absorption of Iron-59 by Rats*. The Journal of Nutrition, 1972. PMID: 5008741
- 24** <https://patents.google.com/patent/WO2007136727A2/en/> cit. 30.4.2022
- 25** Skolmowska, D., Głąbska, D., *Analysis of Heme and Non-Heme Iron Intake and Iron Dietary Sources in Adolescent Menstruating Females in a National Polish Sample*. Nutrients. 11(5), 1049 (2019).
- 26** Mladěnka, P., Macáková, K., Zatloukalová, L., Řeháková, Z., Singh, B.K., Prasad, A.K., Parmar, V.S., Jahodář, L., Hrdina, R., Saso, L., *In vitro interactions of coumarins with iron*. Biochimie. 92(9), 1108-14 (2010).
- 27** Lawson, M. K., Valko, M., Cronin, M. T. D., Jomová, K., *Chelators in Iron and Copper Toxicity*. Curr. Pharmacol. Rep. 2, 271-280 (2016).
- 28** Harvey, R. A., Ferrier, D., *Lippincott's Illustrated Reviews*. Biochemistry. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2011. ISBN 978-1-60913-998-8.
- 29** <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2500/> cit. 31.3.2022
- 30** <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/731838bf-116b-4783-abec-0c831f3d57db/2021-Metabolismus-aminokyselin-II.aspx?disposition=attachment/> cit. 31.3.2022

- 31** Mladěnka, P., Macáková, K., Zatloukalová, L., Řeháková, Z., Singh, B.K., Prasad, A.K., Parmar, V.S., Jahodář, L., Hrdina, R., Saso, L., *In vitro interactions of coumarins with iron*. *Biochimie*. 92(9), 1108-1114 (2010).
- 33** Fábryová, V., et al., *Anémie*. Martin: Vydavatelství Osveta, 2017. ISBN 978-80-8063-452-0.
- 34** Silbernagl, S., Despopoulos, A., *Atlas fyziologie člověka*. 4. vydání. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-4271-7.
- 35** Křupková, L., Rašková Kafková, L., Somíková, Z., Beličková, M., Lužná, P., Čermák, J., Divoký V., *Protinádorové účinky klinicky používaných chelátorů železa*. *Transfuze a hematologie dnes*. 7(4), 117-125 (2015).
- 36** Mísař, J., *Rigorózní práce*. Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2016.
- 37** Wilhelm, Z., *Co je dobré vědět o železe*. *Praktické lékařství*. 3(1), 41-44 (2007).

9 Zdroje obrázků a tabulek

Obrázek č. 1: Greenwood, N. N., *Chemie prvků*. Svazek 2., 1. vydání. Praha: Informatorium, 1993. ISBN 80- 85427-38-9.

Tabulka č. 2: Salanciová, I., *Diplomová práce*. Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2020.

Tabulka č. 3: Houda, J., *Disertační práce*. Univerzita Palackého: Olomouc, 2014.

Obrázek č. 4: <https://www.nutrientsreview.com/proteins/amino-acids/> cit. 31.3.2022

Obrázek č. 5: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2500/> cit. 31.3.2022

Obrázek č. 6: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2500/> cit. 31.3.2022

Obrázek č. 7: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2500/> cit. 31.3.2022

Obrázek č. 8: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2500/> cit. 31.3.2022

Obrázek č. 9: <https://patents.google.com/patent/WO2007136727A2/en/> cit. 31.3.2022

Obrázek č. 10: National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5960, Aspartic acid" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aspartic-acid>. Accessed 31 March, 2022.

Obrázek č. 11: National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 33032, Glutamic acid" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutamic-acid>. Accessed 31 March, 2022.

obrázek č. 12: National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5862, Cysteine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cysteine>. Accessed 31 March, 2022.

obrázek č. 13: National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 67678, L- cystine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-cystine>. Accessed 31 March, 2022.

obrázek č. 14: National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 6274, Histidine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Histidine>. Accessed 31 March, 2022.

obrázek č. 15: National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 6137, Methionine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methionine>. Accessed 31 March, 2022.

obrázek č. 16: National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 12035, Acetylcysteine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetylcysteine>. Accessed 31 March, 2022.

10 Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Kandidát: Jana Nadějová

Školitel: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce esenciálních aminokyselin s ionty železa

Železo je důležitý stopový prvek, který je potřebný pro správnou funkci organismu. Nedostatek, stejně tak jako nadbytek železa může vést k patologickým stavům, proto je potřeba hladinu železa v krvi kontrolovat a v případě přetížení těla železem, lze jeho chelataci považovat za možný terapeutický nástroj.

Chelátory pro tyto léčebné účely by měly být tělu vlastní látky. Aminokyseliny jsou tedy ideálními kandidáty na regulaci homeostázy železa v organismu, proto se tato diplomová práce zaměřuje na některé z nich. Jednotlivé aminokyseliny jsou spojeny pomocí peptidové vazby a tvoří tak proteiny. Proteinogenní aminokyseliny dělíme na esenciální, které je třeba přijímat potravou a neesenciální, jež si tělo dokáže vytvořit samo.

Cílem této práce bylo porovnat železo-chelatační a železo-redukční aktivitu esenciálních aminokyselin L-histidinu, L-methioninu a neesenciálních aminokyselin L-cysteinu, jeho dimeru L-cystinu, L-asparagové a L-glutamové kyseliny. Součástí výzkumu byla také látka odvozená od L-cysteinu, *N*-acetylcystein. Testování všech látek bylo prováděno pomocí spektrofotometrických metod při pH, která imitují (pato)fyziologické prostředí v lidském organismu.

Žádná z testovaných látek nevykázala významnou chelatační aktivitu iontů železa. Redukční aktivita železitých iontů se projevila u *N*-acetylcysteinu a L-cysteinu při všech pH, a to v různé intenzitě.

Klíčová slova: esenciální aminokyseliny, chelatace, redukce, železo

11 Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: Jana Nadějová

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of Thesis: Interaction of essential amino acids with iron ions

Iron is an important trace element that is needed for the proper functioning of the body. Lack of iron, as well as an excess of iron, can lead to pathological conditions, so it is necessary to control the level of iron in the blood and in case of overloading the body with iron, its chelation can be considered a possible therapeutic tool.

Chelators for these therapeutic purposes should be the body's own substance. Amino acids are therefore ideal candidates for the regulation of iron homeostasis in the body, so this thesis focuses on some of them. The individual amino acids are linked by a peptide bond to form proteins. Proteinogenic amino acids are divided into essential, which must be ingested through food, and nonessential, which the body can create on its own.

The aim of this study was to compare the iron-chelating and iron-reducing activity of the essential amino acids L-histidine, L-methionine, and the nonessential amino acids L-cysteine, its dimer L-cystine, L-aspartic and L-glutamic acid. The research also included a substance derived from L-cysteine, N-acetylcysteine. Testing of all substances was performed using spectrophotometric methods at pH, which mimic the (patho)physiological environment in the human body.

None of the tested substances showed significant chelating activity of iron ions. The reducing activity of iron ions was observed for N-acetylcysteine and L-cysteine at all pHs at different intensities.

Key words: essential amino acids, chelation, reduction, iron