

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Meď – chelatačné účinky derivátov xantén-3-ónov

Rigorózna práca

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

Hradec Králové 2022

Mgr. Daniela Uramová

Čestné vyhlásenie

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

.....
Mgr. Daniela Uramová

Pod'akovanie

Týmto by som sa chcela poďakovať prof. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady, pripomienky a odborné vedenie, ktoré mi pomohli pri vypracovaní tejto mojej rigorózneho práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Prahe

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študent: Mgr. Daniela Uramová

Školiteľ: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Názov práce: Meď – chelatačné účinky derivátov xantén-3-ónov

Meď ako biogénny prvok sa v ľudskom organizme účastní mnohých metabolických procesov, je súčasťou viacerých enzýmov a jej prítomnosť je tak esenciálna pre život. Na druhej strane, voľné atómy medi zvyšujú tvorbu voľných radikálov, v dôsledku čoho sa meď stáva pre organizmus nebezpečná a toxická. Preto v súčasnej dobe prebieha výskum viacerých látok, ktoré by boli schopné interagovať s iónmi medi a ovplyvniť tým jej dyshomeostázu v organizme. Zaujímavé sa javia polyfenolické xantóny, ktoré okrem týchto vlastností vykazujú aj ďalšie pozitívne účinky.

Cieľom tejto práce bolo zhodnotiť meď-chelatačnú aktivitu desiatich štrukturálne blízky synteticky pripravených derivátov xantén-3-ónov. Spektrofotometrické meranie bolo prevedené *in vitro* za využitia hematoxylínovej a batokuproínovej metódy.

Ukázalo sa, že deriváty 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónu sú schopné chelatovať meď pri všetkých testovaných pH (5,5; 6,8 a 7,5). Avšak, vo viac kompetitívnom prostredí nie sú vzniknuté komplexy stabilné. V niektorých prípadoch bolo možné odhadnúť stechiometriu komplexu, ktorá sa pohybovala od 1:1 cez 3:2 k 2:1, xantón: Cu^{2+} . Tieto rozdiely ale neboli potvrdené štatistickým porovnaním, kedy substitúcia fenylového zvyšku v polohe 9 výrazne neovplyvnila chelatačné vlastnosti molekuly. Zdá sa, že chelatačným miestom je 2-hydroxy, 3-keto skupina na základnom skelete xantónu.

Na záver je dôležité zmieniť, že klinické použitie týchto látok ako chelátorov medi nie je reálne.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Daniela Uramová, MSc.

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

Title: The copper – chelating activity of xanthen-3-ones derivatives

As a biogenic element, copper participates in many metabolic processes in the human body, it is a part of several enzymes, and its presence is therefore essential for life. On the other hand, free atoms of copper increase the formation of free radicals, and hence copper can be toxic to the body. Therefore, current research has been testing several substances that could be able to interact with copper ions and thus affect its dyshomeostasis in the body. Polyphenolic xanthenes seem interesting, as they possess in addition to these properties also show other positive effects.

The aim of this work was to evaluate the copper-chelating activity of ten closely structurally related synthetic derivatives of xanthen-3-ones. The spectrophotometric measurement was carried out *in vitro* using the hematoxylin and bathocuproine method.

2,6,7-trihydroxy-xanthen-3-one derivatives were shown to be able to chelate copper at all tested pH conditions (5.5; 6.8 and 7.5). However, in a more competitive environment, the resulting complexes are unstable. In some cases, it was possible to estimate the stoichiometry of the complex, which varied from 1:1 to 3:2 to 2:1, xanthen: Cu²⁺. These differences were not confirmed by statistical comparison when the substitution of the phenyl residue in position 9 did not significantly influence the chelating properties of the molecule. The 2-hydroxy, 3-keto group on the xanthen backbone appears to be the chelating site.

Finally, it is important to mention that clinical use of these substances as copper chelators is not realistic.

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická časť	9
2.1	Med'	9
2.1.1	Med' v ľudskom organizme	9
2.1.2	Kinetika medi v organizme	12
2.1.3	Funkcie medi v organizme	15
2.1.4	Poruchy homeostázy medi a patologické stavy	16
2.1.5	Chelatácia medi	18
2.1.5.1	Dimerkaprol	18
2.1.5.2	D-penicilamín	18
2.1.5.3	Trientín	19
2.1.5.4	Tetratiomolybdenan	20
2.2	Deriváty xantén-3-ónov	21
3	Praktická časť	23
3.1	Cieľ práce	23
3.2	Materiál a metodika	23
3.2.1	Chemikálie	23
3.2.2	Testované látky	24
3.2.3	Prístrojové vybavenie a pomôcky	24
3.2.4	Postup	25
3.2.4.1	Stanovenie chelatácie medi pomocou hematoxylínovej metódy ..	25
3.2.4.1.1	Príprava základných roztokov	25
3.2.4.1.2	Príprava pracovných roztokov a roztokov testovanej látky ...	25
3.2.4.1.3	Vlastné prevedenie experimentu	25
3.2.4.2	Stanovenie chelatácie medi pomocou batokuproínovej metódy ...	26
3.2.4.2.1	Príprava základných roztokov	26

3.2.4.2.2	Príprava pracovných roztokov a roztokov testovanej látky ...	27
3.2.4.2.3	Vlastné prevedenie experimentu	27
3.2.5	Matematické spracovanie výsledkov.....	28
4	Výsledky.....	29
5	Diskusia	42
6	Záver.....	45
7	Použité skratky	46
8	Použité zdroje	47

1 Úvod

Zastúpenie medi v organizme je v porovnaní s inými prvkami mnohonásobne nižšie, o to dôležitejšie je zabezpečenie rovnovážneho stavu. (Trojan et al., 2003) Je popísaných množstvo patologických stavov, ktoré súvisia s dysbalanciou medi, ako napríklad Wilsonova a Menkesova choroba, neurodegeneratívne, nádorové či iné metabolické ochorenia. (Chen et al., 2020)

Stavy spojené s nadbytkom medi sú liečené za pomoci chelátorov medi, ktoré sú schopné vytvoriť s iónmi medi komplexy. V praxi máme len obmedzené množstvo týchto látok a ich použitie je kvôli ich nežiaducim účinkom značne limitované. Preto je snaha o skúmanie nových látok, ktoré by našli svoje uplatnenie vo farmakológii a medicíne.

Jednou skupinou potenciálne využiteľných látok sa ukazujú byť xantóny. Sú to polyfenolické zlúčeniny, ktorých štruktúra môže byť rôzne obmeňovaná, pričom cieľom je dosiahnuť čo najvýhodnejšie vlastnosti a čo najnižšiu toxicitu. Svojou štruktúrou sa podobajú látkam, u ktorých bolo dokázané, že sú schopné chelatovať meď a niektoré vykazujú aj antioxidantné, protinádorové, antimikrobiálne, antimykotické, či rôzne iné účinky. (Shagufta a Ahmad, 2016)

2 Teoretická časť

2.1 Med'

Med' svoj latinský názov *cuprum* dostala podľa ostrovu Cyprus (latinsky *Cyprium*), kde sa ťažila v období Rímskej ríše.

Chemicky sa med' radí medzi prechodné prvky. S protónovým číslom 29 ju nájdeme v periodickej tabuľke v 4. perióde, v skupine I.B. Je to lesklá, červenohnedá, pevná látka bez zápachu. Medzi jej fyzikálne vlastnosti patrí dobrá elektrická a tepelná vodivosť, a vysoká odolnosť voči korózii.

V prírode ju môžeme nájsť takmer výlučne len vo forme zlúčenín, v rýdzej forme sa skoro vôbec nevyskytuje. Najčastejšie ju nájdeme vo forme nerastov, ako napríklad chalkopyrit, chalkozín, bornit, kovelín, burnonit (sulfidické rudy) alebo kuprit, malachit, azurit, tenorit (kyslíkaté rudy). V atmosfére sa med' vyskytuje v koncentrácii okolo 5 – 200 ng Cu/m³. Známe sú aj zliatiny medi. Rozlišujú sa dve hlavné skupiny: mosadze (zliatiny medi so zinkom a ďalšími prvkami v minoritnom zastúpení) a bronzy (zliatiny medi s cínom, hliníkom, olovom, prípadne s inými prvkami). (Barceloux, 1999)

2.1.1 Med' v ľudskom organizme

Ľudské telo je zložené z tzv. biogénnych prvkov, pričom hlavný podiel tvorí uhlík, vodík, kyslík a dusík. Neoddeliteľnou súčasťou sú aj vápnik, fosfor, draslík, sodík, horčík, chlór. V menších množstvách sa v ľudskom tele nachádza železo, jód, zinok, med', selén, kobalt, molybdén atď. – tieto prvky označujeme aj ako stopové prvky.

Obsah medi v ľudskom tele je len približne 0,1 – 0,15 g. (Trojan et al., 2003) Jej koncentrácia je najvyššia hlavne v mozgu, pečeni, žlči, srdci, ďalej v obličkách, črevách, pľúcach, slezine a v menšom množstve sa nachádza aj v krvi. (Lech, 2007)

Hoci sú stopové prvky v porovnaní s biogénnymi prvkami v mnohonásobne nižšom množstve, sú rovnako dôležité pre správne fungovanie procesov a metabolizmu v ľudskom organizme. Preto musíme zabezpečiť ich dostatočný príjem z potravy. (Trojan et al., 2003)

Tabuľka č. 1**HLAVNÉ ZDROJE MEDI V POTRAVE**

<i>Zdroj</i>	<i>Množstvo µg/g</i>
Otruby	15
Orechy	6 – 37
Strukoviny	3 – 7
Pečeň	4,6 – 6,2
Morské ryby	2 – 3
Sladkovodné ryby	0,3 – 3
Zemiaky	2,1
Hydina	0,5 – 3
Zelenina	0,3 – 3
Ovocie	0,4 – 1,5

Prevzaté a upravené podľa Barceloux et al., 1999

Aby bolo zabezpečené adekvátne prijímanie jednotlivých živín a prvkov, boli vypracované viaceré odporúčania. Obsah medi v potrave je zhrnutý v Tabuľke č. 1. EFSA (European Food Safety Authority) stanovuje doporučený denný príjem medi pre dospelých mužov 1,6 mg/deň, pre ženy 1,3 mg/deň a pre deti v závislosti na veku. (www.efsa.europa.eu) Detailnejšie odporúčania stanovuje Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky (ÚVZSR). Podľa § 11 písm. o) Zákona č. 355/2007 Z. z. o ochrane, podpore a rozvoji verejného zdravia a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov vyhlasuje aktualizované Odporúčané výživové dávky pre obyvateľstvo v Slovenskej republike. Tieto odporúčania (zhrnuté v Tab. č. 2) vytvárajú základný predpoklad na zabezpečenie zdravej výživy pre jednotlivé fyziologické skupiny populácie a zohľadňujú ich energetické a výživové požiadavky podľa veku, pohlavia, fyzického zaťaženia organizmu a fyziologického stavu organizmu tehotných a dojčiacich žien. (www.uvzs.sk)

Tabuľka č. 2

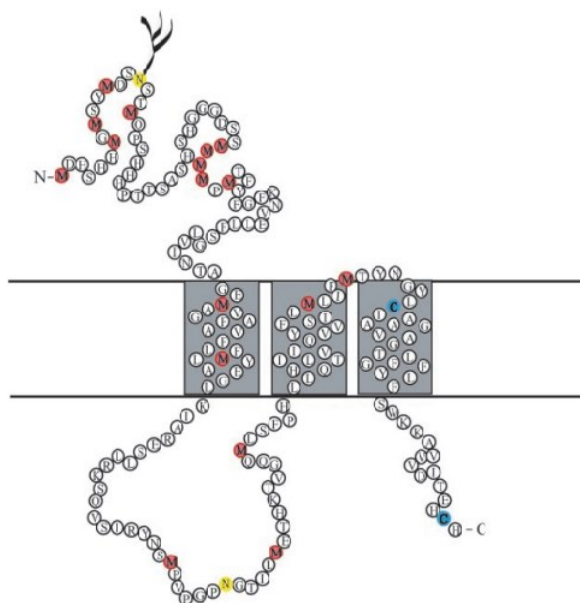
**ODPORÚČANÉ VÝŽIVOVÉ DÁVKY PRE OBYVATELSTVO SLOVENSKEJ
REPUBLIKY**

<i>Veková kategória</i>			<i>Dávka v µg</i>
Dojčatá	0 – 6 mesiacov		200
	7 – 12 mesiacov		500
Deti predškolského veku	1 – 3 roky		600
	4 – 6 rokov		800
	7 – 10 rokov		1000
Deti školského veku	11 – 14 rokov	Chlapci	1200
		Dievčatá	1300
Dospievajúci chlapci	15 – 18 rokov	Študujúci	900
		Zvýš. fyzická aktivita	950
Dospievajúce dievčatá	15 – 18 rokov	Študujúce	850
		Zvýš. fyzická aktivita	900
Pracujúce ženy	19 – 34 rokov		1000 – 1400
	35 – 62 rokov		900 – 1200
Ženy	Tehotné od II.trimestra		1100
	Dojčiace		1300
Nepracujúce ženy	65(63) – 79 rokov		900
	80 rokov a viac		900
Pracujúci muži	19 – 34 rokov		1400 – 1800
	35 – 62 rokov		1200 – 1600
Nepracujúci muži	65(63) – 79 rokov		1200
	80 rokov a viac		1200

Prevzaté a upravené z www.uvzsr.sk (9. revízia)

2.1.2 Kinetika medi v organizme

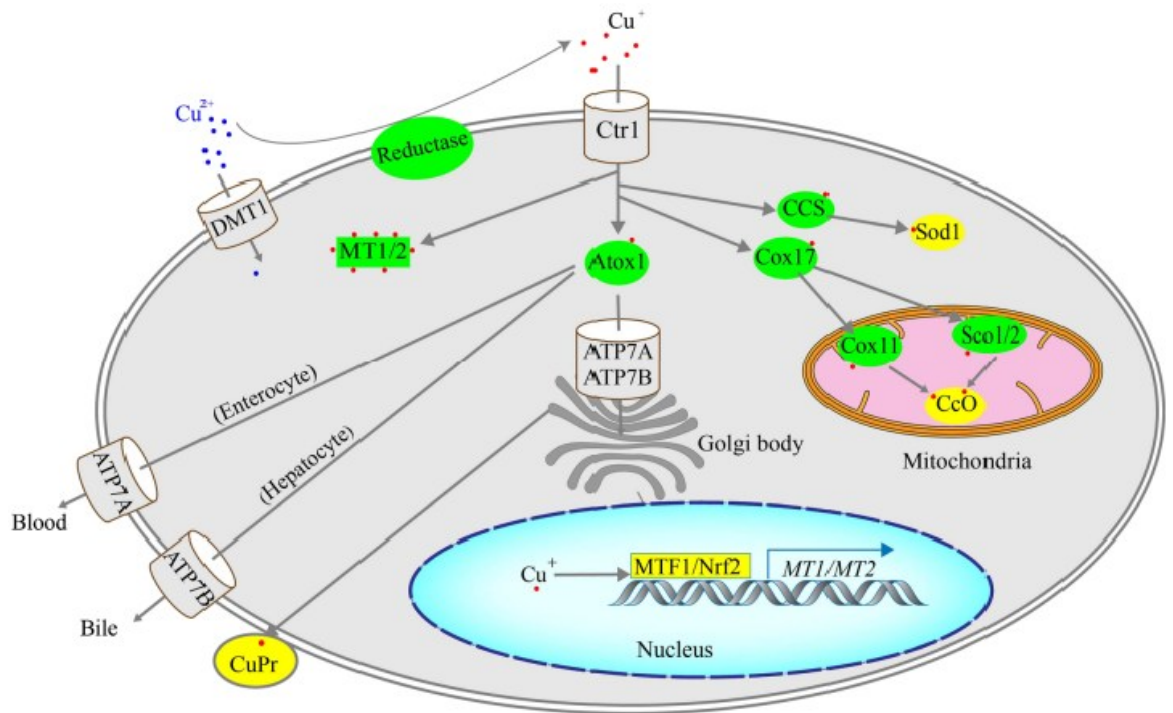
K absorpcii medi z potravy dochádza prevažne v horných častiach tenkého čreva, v dvanástniku. Sú známe dva prenášače medi DMT1 (divalent metal transporter 1) a CTR1 (copper transporter 1). Prostredníctvom DMT1 sú Cu^{2+} prenesené do bunky, avšak tieto ióny nemôžu bunky priamo využívať. Hlavnú úlohu pri transporte Cu^{1+} z lumen tenkého čreva zohráva transportér CTR1 (Obr. č. 1), ku ktorému má meď vysokú afinitu. Je lokalizovaný na apikálnej strane enterocytov, ale zdá sa, že sa môže nachádzať aj na bazolaterálnej strane alebo aj vnútri enterocytu. Jedná sa o transmembránový homotrimérny proteín pozostávajúci zo 190 aminokyselín, ktoré sa členia do troch častí, a to extracelulárnej, transmembránovej a intracelulárnej časti. Najdlhšia extracelulárna doména, tiež známa ako N-koniec, je bohatá na metionín a histidín. Jej začiatok tvorí trojica aminokyselinových zvyškov Met-Asp-His (MDH sekvencia), ktorá patrí do motívu ATCUN (amino terminal copper and nickel binding). Predpokladalo sa, že samotnému transportu musí predchádzať redukcia meďnatých iónov na meďné ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$) v extracelulárnom priestore. No k redukcii môže dôjsť aj tesne pred naviazaním na N-koniec za pomoci metaloreduktáz alebo až v okamihu keď je Cu^{2+} naviazaná na MDH sekvenciu za účasti ATCUN motívu. Samotný transport nie je energeticky závislý na hydrolýze ATP. Dochádza k nemu cez póry ktoré sú lokalizované v transmembránovej doméne. Po prechode medi cez membránové póry je meď naviazaná na intracelulárnu časť, označovanú ako C-koniec. Je najkratšia a nachádza sa tam hojné zastúpenie histidínu a cysteínu, ktoré vytvárajú krátke sekvencie His-Cys-His. (Bossak et al., 2018; De Feo et al., 2007; Galler et al., 2020; Lee et al., 2001; Oghami, 2006; Shawki et al., 2015; Van Campen et al., 1965; Zimnicka et al., 2007)



Obrázok č. 1: ŠTRUKTÚRA TRANSPORTÉRU CTR1. Prevzaté z Eisses et al., 2002

Po absorpcii je meď v bunke naviazaná na proteíny, tzv. chaperóny. Vyznačujú sa prítomnosťou aminokyselín metionínu a cysteínu s charakteristickým usporiadaním MXCXXC, ktoré im umožňuje viazať meď a ďalej ju distribuovať po bunke. Okrem toho sú zodpovedné aj za ochranu bunky pred možným katalytickým účinkom voľných atómov medi na tvorbu voľných radikálov v intracelulárnom priestore. Pokiaľ v bunke napriek tomu dôjde k zvýšenému množstvu voľnej medi, je viazaná na metalotioneiny. Hlavné prenášače sú ATOX1 (antioxidant 1), CCS (copper chaperon for SOD) a COX17 (cytochrome c-oxidase copper chaperone) (viac vid' Obr. č. 2). Prostredníctvom COX17 je meď transportovaná do mitochondrií, kde sa stáva súčasťou cytochróm c oxidázy. Pomocou CCS je meď dopravená ku katalytickému miestu enzýmu superoxidodismutázy. ATOX1 prenáša meď do Golgiho aparátu alebo zabezpečuje transport medi k bazolaterálnej membráne, kde dochádza za pomoci ATPázy ATP7A k efluxu do portálnej žily, a tento dej je teda kľúčový pre absorpciu. V pečeni je za pomoci chaperónov distribuovaná do Golgiho aparátu, kde je väčšina, až 95%, zabudovaná do ceruloplazmínu alebo iných kuproenzýmov. Zvyšok, respektíve nadbytok, ATOX1 prenesie k proteínu ATP7B a následne dochádza na kanalikulárnej strane hepatocytu k vylúčeniu prebytočnej medi. Hlavný spôsob exkrécie medi z organizmu je žlčou. Transport prostredníctvom ATP7A a ATP7B je viazaný na spotrebu ATP. Podľa nárokov organizmu je meď krvou distribuovaná do jednotlivých tkanív a orgánov. V krvnom

riečisku prebieha transport za pomoci transportných proteínov. Meď je viazaná na ceruloplazmín, transkupreín, albumín alebo histidín. (Collins et al., 2010; Harrison et al., 1999; Lutchenko et al., 2007; Nishito a Kambe, 2018)



Obrázok č. 2: SCHÉMATICKÉ ZNÁZORNENIE METABLIZMU MEDI V BUNKE. Prevzaté z Chen et al., 2020

Meď je primárne transportovaná prostredníctvom CTR1, potom čo bola redukovaná pomocou reductáz. Cu^{2+} môže byť inkorporovaná do bunky aj cez DMT1. Absorbovaná meď je pomocou chaperónov ATOX 1, CCS a COX17 transportovaná a využitá na zabudovanie do superoxididismutázy (SOD1), cytochróm c oxidázy (CcO) alebo prenesená do Golgiho aparátu (GA), zatiaľ čo voľné ióny medi sú vychytávané metalotioneínami 1 a 2 (MT1 a MT2) kvôli ochrane bunky pred toxicitou. V GA dochádza k syntéze kuproenzýmov (CuPrs), ktoré sú distribuované do bunky alebo ďalších organel. V enterocytoch a hepatocytoch sa ATP7A a ATP7B premiestňujú k plazmatickej membráne, aby distribuovali meď do krvi alebo žlče. Zvýšené hladiny medi vplývajú na syntézu transkripčných faktorov MTF1 (Metal Regulatory Transcription Factor 1) a Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) v jadre bunky.

2.1.3 Funkcie medi v organizme

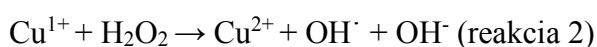
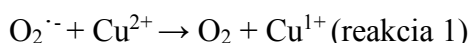
Prítomnosť medi v ľudskom organizme je aj napriek jej nízkemu obsahu v porovnaní s ostatnými prvkami esenciálna pre život. Je súčasťou množstva enzýmov, tiež nazývaných aj kupro- alebo metaloenzýmy, ktoré sa podieľajú na rade metabolických procesov v organizme. Základným predpokladom je schopnosť medi meniť svoj oxidačný stav z oxidovanej formy Cu^{2+} na redukovanú formu Cu^{1+} a naopak, a teda prijímať a odovzdávať elektróny. Med' vystupuje v metaloenzýmoch ako kofaktor typu prostetickej skupiny. Taktiež je súčasťou rôznych proteínov, ktoré môžu ovplyvňovať homeostázu iných prvkov alebo majú vplyv na zdravie organizmu. Proteíny, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú atóm medi sú:

- **Cu, Zn - superoxidodismutáza** má antioxidačnú aktivitu, eliminuje voľné superoxidové radikály za vzniku peroxidu vodíka.
- **Cytochróm c oxidáza** je súčasťou dýchacieho reťazca v mitochondriách, zabezpečuje oxidačno-redukčné reakcie.
- **Tyrozínáza** zabezpečuje produkciu melanínu a tým ovplyvňuje pigmentáciu pokožky, poruchy funkcie tohto enzýmu spôsobujú albinizmus, vitiligo.
- **Lyzyloxidáza** stabilizuje vlákna kolagénu, je potrebná pri siet'ovaní kolagénu a elastínu. Poruchy tohto enzýmu vedú ochoreniam spojivového tkaniva, ako napr. osteoporóza, degeneratívne ochorenia kĺbov, emfyzém, petechie a iné.
- **Ceruloplazmín** zabezpečuje transport medi a pôsobí ako feroxidáza, tzn. oxiduje železnaté ióny na železité, čím zabezpečuje aj homeostázu železa.
- **Hephaestin** sa podieľa na transporte železa z enterocytov do krvi, a to vďaka jeho ceruloplazmínu – analogickej funkcii feroxidázy.
- **Dopamín β -hydroxyláza** je dôležitá pre syntézu katecholamínov.
- **Peptidylglycín α -amidujúca monooxygenáza** zabezpečuje amidáciu neuropeptidov a peptidových hormónov.

(Inesi, 2016; Lutsenko et al., 2007; Mladěnka et al., 2005; Muller et al., 2007; Shim a Harris, 2003)

2.1.4 Poruchy homeostázy medi a patologické stavy

Súhrn všetkých procesov, ktoré sa podieľajú na udržovaní normálnych hladín medi v organizme, je dôležitý pre fyzické a psychické zdravie, keďže meď môže byť pre organizmus aj veľmi toxická a nebezpečná. Voľná meď pôsobí ako katalyzátor v tzv. Haber-Weissovej reakcii (reakcia 1 a 2), kedy vzniká hydroxylový radikál, ktorý môže priamo poškodiť bunkové štruktúry. Preto je dôležité, aby absorpcia, distribúcia, utilizácia a exkrécia medi bola v organizme striktné regulovaná pomocou špecifických proteínov. (Muller et al., 2007)



Koncentráciu medi v tele ovplyvňuje množstvo faktorov. Už na úrovni absorpcie, kedy pri zníženom množstve medi v bunke dochádza k vyššiemu vychytávaniu medi z potravy. Lepšia absorpcia je aj v prítomnosti draselných iónov, histidínu alebo pri nižšom extracelulárnom pH. Naopak absorpciu znižuje prítomnosť strieborných iónov, železo alebo zinok. Prítomnosť sodných iónov absorpciu medi neovplyvňuje (Collins et al., 2010; Lee et al., 2001)

Ďalšie ovplyvnenie homeostázy sa odohráva na úrovni ATPáz. Pri nedostatku medi v periférnych tkanivách dochádza k zvýšenej expresii ATP7A v čreve a pečeni, tým sa zabezpečí lepšia distribúcia a dostupnosť medi v tele. Pri vysokých hladinách medi v bunkách dochádza k translokácii ATP7B z Golgiho aparátu do membrány, čím dochádza k vylúčeniu prebytočného množstva. Poruchy súvisiace s ATPázovou aktivitou môžu byť aj geneticky podmienené. Medzi najznámejšie ochorenia súvisiace s poruchou na úrovni ATPáz sú Menkesova choroba a Wilsonova choroba. (Chen et al., 2020; Kim et al., 2010; Lutchenko et al., 2007) V Tabuľke č. 3 je uvedený stručný prehľad patologických stavov, ktoré vyplývajú z poruchy homeostázy medi.

Tabuľka č. 3

PATOLOGICKÉ STAVY SPOJENÉ S PORUCHOU HOMEOSTÁZY MEDI

<i>Patologický stav</i>	<i>Symptómy</i>	<i>Zmeny Cu</i>	<i>Mechanizmus vzniku</i>
Menkesova choroba	Neurodegenerácia, abnormálne spojivové tkanivo, poruchy kolagénu a elastínu, vaskulopatia, kučeravé vlasy	Nedostatok	Primárne: mutácia génu pre ATP7A spôsobuje nedostatok Cu Sekundárne: znížená aktivita niektorých enzýmov
Wilsonova choroba	Poškodenie pečene a neurodegenerácia	Nadbytok	Mutácia génu pre ATP7B vedie k zvýšenej akumulácii Cu v pečeni a mozgu
Infantilná kardioencefalomyopatia	Novorodenecká smrť	Nedostatok	Mutácia génu pre SCO2 spôsobujúca nedostatok Cu pre CcO, ktoré vedie k smrti novorodenca
Metabolický syndróm	Nealkoholická steatóza pečene a obezita	Nedostatok	Zníženie PDE3B spôsobuje pokles cAMP dependentnej lipolýzy, a tým ovplyvnenie plazmatickej hladiny cholesterolu a lipoproteínov
Anémia	Hemolytická anémia	Nadbytok	Vysoké hladiny voľných iónov medi v krvi spôsobuje hemolýzu
Poruchy KVS	Hypertenzia a ateroskleróza	Nadbytok	Cu aktivuje LOX, IL-1 α , FGF1 atď., čím dochádza k podpore rozvoja aterogenézy a hypertenzie
		Nedostatok	Poškodenie SOD3 a zvýšenie O ₂ ⁻
Rakovina	Zhubná proliferácia a metastázovanie	Nadbytok	Cu stimuluje proliferáciu, angiogenézu a metastázovanie
Neurodegeneratívne poruchy	Poškodenie kognitívnych funkcií, pamäte a pohybového aparátu	Nesprávna distribúcia	Akumulácia medi s A β , α -synukleínom a i., čo vedie k zvýšeniu ROS a zároveň dochádza k nedostatku medi v DBH, PAM
Diabetes	Inzulínová rezistencia a hyperglykémia	Nesprávna distribúcia	Zvýšené hladiny Cu v pečeni a obličkách a nedostatočné vychytávanie škodlivého O ₂ ⁻ prostredníctvom vaskulárnej SOD3

Vysvetlivky: A β (amyloid- β), cAMP (cyklický adenosínmonofosfát), DBH (dopamín- β -hydroxyláza), FGF1 (fibroblastový rastový faktor), IL-1 α (interleukín 1 α), LOX (lyzyoxidáza), PAM (peptidyl-glycín α -amidujúca monooxygenáza), PDE3B (fosfodiesteráza 3B), SCO2 (gén pre syntézu CcO), SOD3 (superoxiddismutáza 3).

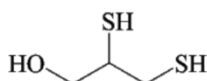
2.1.5 Chelatácia medi

Z vyššie uvedeného vyplýva, že zvýšená akumulácia medi v organizme vedie k závažným zdravotným problémom. Riešením týchto patologických stavov je použitie chelátorov medi.

Chelatačné činidlá sú vo všeobecnosti molekuly obsahujúce ligandy, ktoré majú vysokú afinitu k určitým katiónom kovov a sú schopné vytvárať s nimi koordinačnú väzbu. Vznik tejto väzby je základným predpokladom pre vytvorenie komplexov, čoho následkom je zníženie množstva voľných katiónov. Práve tento spôsob vyvážovania voľných iónov sa využíva pri intoxikáciách ťažkými kovmi a pri liečbe patologických stavov spojených s ich nadbytkom v organizme. (Cao et al., 2015; Flora a Pachauri, 2010; Kontoghiorghes, 2020)

2.1.5.1 Dimerkaprol

Dimerkaprol (Obr. č. 3) bol vyvinutý už v roku 1940 ako antidotum, ktoré sa používalo počas 2. svetovej vojny pri otrave lewisitom, chemickou zbraňou obsahujúcou arzén. Odtiaľ je tiež známy jeho názov British anti-Lewisite, BAL. Podával sa vo forme intramuskulárnych injekcií a mal výrazné nežiaduce účinky. Preto sa v súčasnej dobe dimerkaprol ako chelátor medi v terapii nevyužíva. Chemicky sa jedná o 2,3-dimerkapto-1-propanol. Je to alkohol s dvomi tiolovými skupinami. (Aggarwal a Bhatt, 2018; Denny-Brown a Porter, 1951; Peters, 1945)



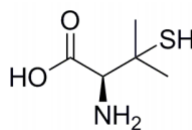
Obrázok č. 3: ŠTRUKTÚRA DIMERKAPROLU

2.1.5.2 D-penicilamín

Objaviteľom penicilamínu je John Walshe, ktorý v roku 1950 dokázal, že penicilamín je účinný a relatívne bezpečný chelátor medi s trvalým prínosom pre pacientov s Wilsonovou chorobou. (Walshe, 2003)

Molekula je tvorená cysteínom, na ktorom sú v polohe β naviazané dve metylové skupiny (Obr. č. 4). Pre väzbu s meďou je dôležitá prítomnosť tiolovej skupiny. Ide ale o relatívne slabý chelátor medi, ktorý ale výrazne zvyšuje jej vylučovanie močom. V praxi

sa používa len D-izomér, pretože L-izomér je toxickejší. (Říha et al., 2013; Walshe, 1956; Walshe, 2003)

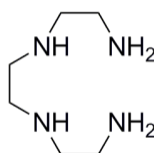


Obrázok č. 4: ŠTRUKTÚRA D-PENICILAMÍNU

V Českej a Slovenskej republike je D-penicilamín registrovaný pod názvom Metalcaptase[®], v sile 150 mg a 300 mg. Podáva sa perorálne vo forme enterosolventných tabliet. Okrem liečby Wilsonovej choroby a otravy meďou má podľa SPC schválenú indikáciu aj na liečbu revmatoidnej artritídy; otravy olovom, ortuťou a zinkom; cystinúrie sprevádzanou tvorbou močových kameňov (pokiaľ recidíve nebolo možné zabrániť napr. diétou neobsahujúcou metionín, hyperhydratáciou, alkalizáciou moču); pri pokročilom štádiu ochorenia a s ním spojených zvláštnych rizík (napr. stav po nefrektómii); a na liečbu sklerodermie. Medzi časté nežiaduce účinky patria poruchy funkcie kostnej drene, kožné prejavy alergického pôvodu, poruchy chuti, nauzea. (www.sukl.cz; www.sukl.sk)

2.1.5.3 Trientín

Ako jediný z chelatačných činidiel medzi nemá vo svojej štruktúre tiolovú skupinu (Obr. č. 5). Chemicky sa jedná o trietyléntetramín a už z názvu vyplýva, že ligandami sú štyri atómy dusíku, ktoré s meďou vytvárajú stabilný komplex. (Walshe 2009)

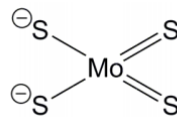


Obrázok č. 5: ŠTRUKTÚRA TRIENTÍNU

Trientín vykazuje lepšie chelatačné účinky než penicilamín a dimerkaprol. Je podávaný perorálne a je vylučovaný obličkami do moču. V súčasnosti je používaný ako liek voľby u symptomatických aj asymptomatických pacientov s Wilsonovou chorobou. Môže byť tiež podávaný tehotným ženám. (Aggarwal a Bhatt, 2018; Říha et al., 2013)

2.1.5.4 Tetratiomolybdenan

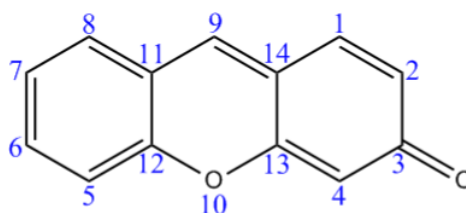
Tetratiomolybdenan (TTM, Obr. č. 6) má viac mechanizmov účinku. V krvi vychytáva atómy medi, pričom vzniká komplex TTM-Cu-albumín. Pôsobí aj na úrovni absorpcii. Po perorálnom podaní spolu s potravou takmer úplne blokuje vstrebávanie medi, pretože vytvára s iónmi medi komplexy, ktoré sú následne vylúčené stolicou. Zároveň sa podieľa na odstraňovaní medi z metalotioneinov v tkanivách, hlavne v hepatocytoch, následkom čoho dochádza k zvýšenému vylučovaniu medi žľou. Tetratiomolybdenan získal od EMA (European medicines agency) v roku 2013 štatút sirotčieho lieku na Wilsonovu chorobu (www.ema.europa.eu), americká FDA (Food and drug administration) ho ale zatiaľ neschválila. (www.drugs.com) Spočiatku sa používala amóniová soľ TTM, ktorá bola však nestabilná. Preto bola vyvinutá stabilnejšia forma s cholínom. V súčasnosti stále prebiehajú klinické štúdie, ale zdá sa, že soľ s cholínom je stabilnejšia a vykazuje dobrý bezpečný profil. (Moini et al., 2021)



Obrázok č. 6: ŠTRUKTÚRA TETRATIOMOLYBDENANU

2.2 Deriváty xantén-3-ónov

Xantény sú organické heterocyklické zlúčeniny. Ich oxidáciou vznikajú deriváty xantóny, pričom poloha ketoskupiny je určujúca pre názvoslovie. Táto práca je zameraná na deriváty xantén-3-ónu. Molekulárny vzorec je $C_{13}H_8O_2$ a základná štruktúra je uvedená na Obrázku č. 7. Po chemickej stránke je to plne konjugovaný systém troch benzénových jadier, kde uhlík v polohe 10 je nahradený atómom kyslíku a ketoskupina sa nachádza v polohe 3. (Das a Banik, 2020; Lauridsen et al., 2020)



Obrázok č. 7: ZÁKLADNÁ ŠTRUKTÚRA XANTÉN-3-ÓNOV

Základná štruktúra môže byť rôzne substituovaná, čím dochádza k ovplyvneniu vlastností výslednej molekuly a jej aktivity. V súčasnosti prebieha extenzívny výskum mnohých derivátov xantén-3-ónu a ukazuje sa ich potenciálne využitie v terapii. Vykazujú cytotoxický, antiproliferatívny účinok na nádorové bunky kolorektálneho, cervikálneho a adenokarcinómu. (Veljović et al., 2019; Zukić et al., 2021) Niektoré deriváty 2,6,7-trihydroxy-xantén-3-ónov sú schopné chelatovať a redukovať železo (Mladěnka et al., 2020), ďalšie deriváty xantónov dokážu vytvárať komplexy s iónmi hliníka, chrómu, ortuti, striebra alebo zinku. (Mabhai et al., 2019; Lee et al., 2018; Lv et al., 2017; Rao et al., 2019) Svoje uplatnenie by mohli nájsť v terapii patologických stavov spojených s nadbytkom týchto prvkov. Známy je aj ich antiagregačný účinok, ktorý je založený na antagonizovaní účinku tromboxánu. Najaktívnejšia zlúčenina, 9-(4'-dimetylamínofenyl)-2,6,7-trihydroxy-xantén-3-ón, dokonca vykazuje lepšiu protidoštičkovú aktivitu než v praxi bežne používaná kyselina acetylsalicylová. (Applová et al., 2018)

Iné xantónové deriváty sú skúmané v súvislosti s účinkom na kardiovaskulárny systém, kde vykazujú vysokú afinitu k adrenergným receptorom a majú antiarytmický a hypotenzný účinok. (Marona et al., 2008b) Ďalšie vykazujú baktericídny účinok proti *Mycobacterium tuberculosis* (Szkaradek et al., 2008) a antimykotický účinok proti kmeňom *Candida species*, *Cryptococcus neoformans* a dermatofytom. (Tocci et al., 2011)

Uplatnenie by vďaka inhibičnej aktivite voči acetylcholinesteráze mohli nájsť aj v liečbe Alzheimerovej choroby (Kou et al., 2020) alebo vďaka antikonvulzivnému účinku pri liečbe epilepsie. (Marona et al., 2008a) Ako antioxidanty sú schopné vychytávať voľné radikály a chrániť bunky pred oxidatívnym poškodením, niektoré deriváty vykazujú inhibičný účinok voči enzýmom, ktorých vyššia aktivita súvisí so starnutím pokožky. (Lin et al., 2014; Resende et al., 2020)

3 Praktická časť

3.1 Cieľ práce

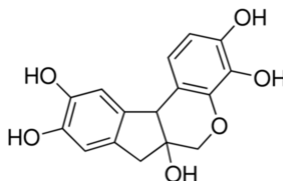
Cieľom tejto rigoróznejšej práce bolo zistiť, či sú nami skúmané deriváty 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónu schopné interagovať s iónmi medi. Prípadne z výsledkov odvodiť možné štrukturálne predpoklady týchto derivátov pre ich chelatačnú aktivitu.

3.2 Materiál a metodika

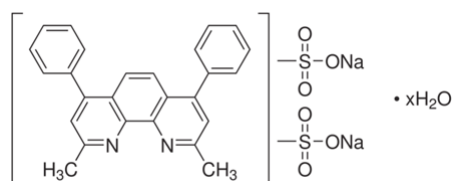
3.2.1 Chemikálie

Pentahydrát síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), chlorid meďný (CuCl), chlorid sodný (NaCl), kyselina chlorovodíková (HCl), dimetylsulfoxid (DMSO), hematoxylín (HEM, Obr. č. 8), disódna soľ batokuproíndisulfónovej kyseliny (BCS, Obr. č. 9), hydroxylamín hydrochlorid (HA), 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínetsulfónová kyselina (HEPES), jej sodná soľ, kyselina octová a octan sodný, boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (Nemecko).

Acetátové tlmivé roztoky o pH 4,5 a 5,5 boli pripravené ako vodné roztoky octanu sodného a kyseliny octovej (15 mM), tj. 15 mM octanu sodného a 27,3 respektíve 2,7 mM kyseliny octovej. HEPES pufrý o pH 6,8 a 7,5 boli pripravené ako vodné roztoky HEPES 71,7 respektíve 14,3 mM, a jeho sodnej soli (15 mM).



Obrázok č. 8: HEMATOXYLÍN



Obrázok č. 9: DISÓDNA SOĽ BATOKUPROÍNDISULFÓNOVEJ KYSELINY

3.2.2 Testované látky

Testované látky, deriváty 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónu, boli syntetizované na Univerzite v Sarajeve a sú zhrnuté v Tabuľke č. 4.

Tabuľka č. 4: TESTOVANÉ LÁTKY A ICH ŠTRUKTÚRA

Základná štruktúra	Zlúčenina	R-
	č. 1	3', 4'-dihydroxy
	č. 2	2'-hydroxy-3'-metoxy
	č. 3	3', 5'-dimetoxi-4'-hydroxy
	č. 4	3'-metoxi-4'-hydroxy-5'-nitro
	č. 5	4'-etoxy
	č. 6	3'-bróm
	č. 7	2'-chlór-6'-fluór
	č. 8	4'-dimetylamino
	č. 9	4'-trifluórmetyl
	č. 10	4'-acetamido

V tabuľke sú zhrnuté testované látky, tj. zlúčeniny č. 1 – 10. Základnou štruktúrou je 9-fenyl-2,6,7-trihydroxy-xantén-3-ón, pričom fenylový zvyšok je ďalej rôzne substituovaný (R-), vid' tretí stĺpec.

3.2.3 Prístrojové vybavenie a pomôcky

- Spektrofotometer: SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Analytické váhy: KERN ABT120-5DM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Nemecko)

- Trepačka pre mikrotitračné doštičky: IKA® MS 3 digital (IKA® - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemecko)
- Trepačka pre skúmavky: IKA® VORTEX GENIUS 3 (IKA® - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemecko)
- Mikrotitračné doštičky (Brand)
- Automatické pipety (Brand)
- Viackanálové pipety (Biohit)

3.2.4 Postup

3.2.4.1 Stanovenie chelatacie medi pomocou hematoxylínovej metódy

3.2.4.1.1 Príprava základných roztokov

Základný roztok meďnatých iónov bol 5 mM roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v destilovanej vode. Jeho molekulárna hmotnosť (M_w) je 249,69 g/mol a je uchovávaný v chladničke, kde je stabilný.

Základný roztok hematoxylínu bol 5 mM roztok v DMSO, s $M_w = 302,28$ g/mol. Jeho stabilita je nízka a dá sa použiť po dobu cca 5 hodín.

3.2.4.1.2 Príprava pracovných roztokov a roztokov testovanej látky

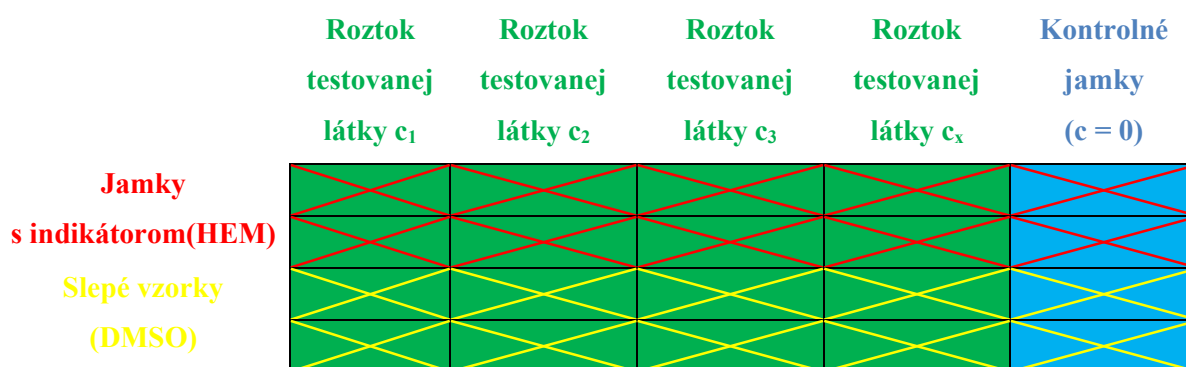
Pracovné roztoky Cu^{2+} a HEM boli pripravené z príslušných základných roztokov riedením na požadovanú koncentráciu 250 μM , pričom na riedenie Cu^{2+} bola použitá destilovaná voda a na riedenie HEM bol použitý DMSO. Pracovný roztok HEM je kvôli nízkej stabilite nutné po 90 minútach znovu nariediť.

Roztoky testovaných látok boli riedené pomocou DMSO zo základných roztokov (obvykle 10 mM roztoky daných zlúčenín rozpustených v DMSO) na požadovanú koncentráciu.

3.2.4.1.3 Vlastné prevedenie experimentu

Chelácia meďnatých iónov v tlmivom roztoku s pH 7,5; 6,8 a 5,5: do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky bolo pipetovaných 150 μl príslušného tlmivého roztoku. Následne bolo do nich pridaných 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} . Do **testovacích jamiek** bolo pridaných 50 μl roztoku testovanej látky (deriváty z Tab. č. 4) o príslušnej koncentrácii, pričom koncentrácia smerom zľava doprava postupne klesala. Do **kontrolných jamiek** bolo

pridaných 50 μl rozpúšťadla (vid' Obr. č. 10). Následne sa doštička nechala po dobu 2 minút trepať, aby došlo k reakcii medzi testovanou látkou a meďnatými iónmi. Ďalej bolo do polovice jamiek pipetovaných 50 μl DMSO, tj. do tretej a štvrtej rady doštičky (označené ako „X“) a až potom bolo do prvej polovice jamiek, tj. do prvých dvoch rád (označené ako „X“), pipetovaných 50 μl 250 μM roztoku hematoxylínu. HEM ako indikátor chelatuje nezreagované Cu^{2+} ióny za tvorby farebných komplexov. Doštička bola znovu miešaná 3 minúty a hneď potom bola meraná absorbanca (tzn. v čase 3 min) a ďalšie meranie sa opakovalo po 4 minútach (tzn. v čase 7 min). Pre pH 7,5 sa absorbanca merala pri 610 nm, pre pH 6,8 pri 590 nm a pre pH 5,5 pri 595 nm.



Obrázok č. 10: SCHÉMATICKÉ ZNÁZORNENIE MIKROTITRAČNEJ DOŠTIČKY PRI HEMATOXYLÍNOVEJ METÓDE

3.2.4.2 Stanovenie chelatácie medi pomocou batokuproínovej metódy

3.2.4.2.1 Príprava základných roztokov

Základný roztok pre meďnaté ióny bol pripravený rovnako ako pri HEM metóde.

Základný roztok meďných iónov bol 5 mM roztok CuCl vo vodnom roztoku 0,1 M HCl a 1 M NaCl . Jeho M_w je 98,99 g/mol.

Základný roztok hydroxylamínu hydrochloridu bol 100 mM roztok HA v destilovanej vode, s $M_w = 69,49$ g/mol.

Základný roztok disódnej soli batokuproíndisulfónovej kyseliny bol 5 mM roztok BCS v destilovanej vode, s $M_w = 564,54$ g/mol.

Všetky základné roztoky sú pri uchovávaní v chladničke stabilné.

3.2.4.2.2 Príprava pracovných roztokov a roztokov testovanej látky

Pracovné roztoky Cu^+ a Cu^{2+} boli pripravené riedením príslušných základných roztokov na požadovanú koncentráciu 250 μM za použitia DMSO (rozdiel oproti HEM metódy, kde boli Cu^{2+} ióny riedené destilovanou vodou).

Roztoky testovaných látok boli pripravené rovnako ako pri HEM metóde.

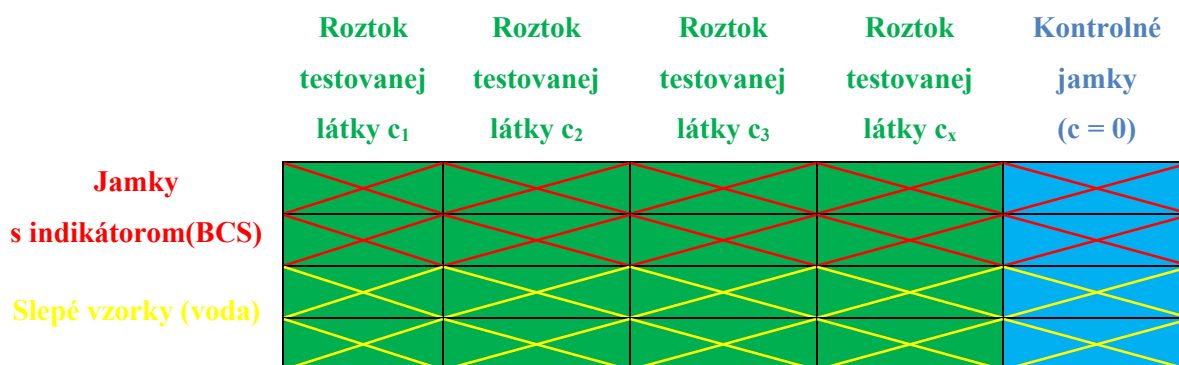
3.2.4.2.3 Vlastné prevedenie experimentu

BCS je schopná chelatovať len meďné ióny, preto sa rozlišujú dva samostatné postupy pre stanovenie Cu^+ a Cu^{2+} , vid' nižšie.

Chelatácia meďnatých (Cu^{2+}) iónov v tlmivom roztoku: do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky bolo pipetovaných 100 μl príslušného tlmivého roztoku. Do **testovacích jamiek** bolo pridaných 50 μl roztoku testovanej látky o príslušnej koncentrácii a do **kontrolných jamiek** bolo pridaných 50 μl rozpúšťadla (vid' Obr. č. 11). Následne bolo do všetkých jamiek pridaných 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iónov v DMSO a doštička bola po dobu 2 minút miešaná, aby došlo k reakcii medzi testovanou látkou a meďnatými iónmi. Potom bolo do všetkých jamiek pridaných 50 μl roztoku HA, ktorý zredukoval nezreagované meďnaté ióny na meďné. Bol pridávaný v koncentrácii 1 mM pre tlmivé roztoky s pH 6,8 a 7,5 alebo v koncentrácii 10 mM pre tlmivé roztoky s pH 4,5 a 5,5. Znovu bola doštička 1 minútu miešaná. Ďalej bolo do prvej polovice jamiek, tj. do prvých dvoch rád (označené ako „X“), pipetovaných 50 μl 5 mM roztoku BCS a do druhej polovice jamiek bolo pipetovaných 50 μl vody, tj. do tretej a štvrtej rady doštičky (označené ako „X“). BCS chelatovala zredukované meďné ióny za vzniku farebných komplexov. Absorbancia bola meraná pri 484 nm ihneď po pridaní BCS alebo vody, a následne po 5 minútach.

Chelatácia meďných (Cu^+) iónov v tlmivom roztoku: do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky bolo pipetovaných 100 μl príslušného tlmivého roztoku. Následne bolo do všetkých jamiek pridaných 50 μl HA, pričom jeho koncentrácia závisela na pH tlmivého roztoku, vid' vyššie. Následne bolo do všetkých jamiek pridaných 50 μl 250 μM roztoku Cu^+ iónov v DMSO a doštička bola 1 minútu miešaná. Do **testovacích jamiek** bolo pridaných 50 μl roztoku testovanej látky o príslušnej koncentrácii a do **kontrolných jamiek** bolo pridaných 50 μl rozpúšťadla (vid' Obr. č. 11, schéma mikrotitračnej doštičky vyzerá

rovnako, rozdiel je v postupnosti pridávania jednotlivých zložiek). Následne bola doštička po dobu 2 minút miešaná. Ďalej bolo do prvej polovice jamiek (označené ako „X“), pipetovaných 50 µl 5 mM roztoku BCS a do druhej polovice jamiek (označené ako „X“). bolo pipetovaných 50 µl vody. Absorbancia bola meraná pri 484 nm ihneď a následne po 5 minútach.



Obrázok č. 11: SCHÉMATICKÉ ZNÁZORNENIE MIKROTITRAČNEJ DOŠTIČKY PRI BATOKUPROÍNOVEJ METÓDE

Konečný obsah jamiek pri chelatacii Cu²⁺ iónov: 100 µl tlmivého roztoku → 50 µl roztoku testovanej látky alebo rozpúšťadla → 50 µl roztoku Cu²⁺ → 50 µl roztoku HA → 50 µl roztoku BCS alebo vody.

Konečný obsah jamiek pri chelatacii Cu⁺ iónov: 100 µl tlmivého roztoku → 50 µl roztoku HA → 50 µl roztoku Cu²⁺ → 50 µl roztoku testovanej látky alebo rozpúšťadla → 50 µl roztoku BCS alebo vody.

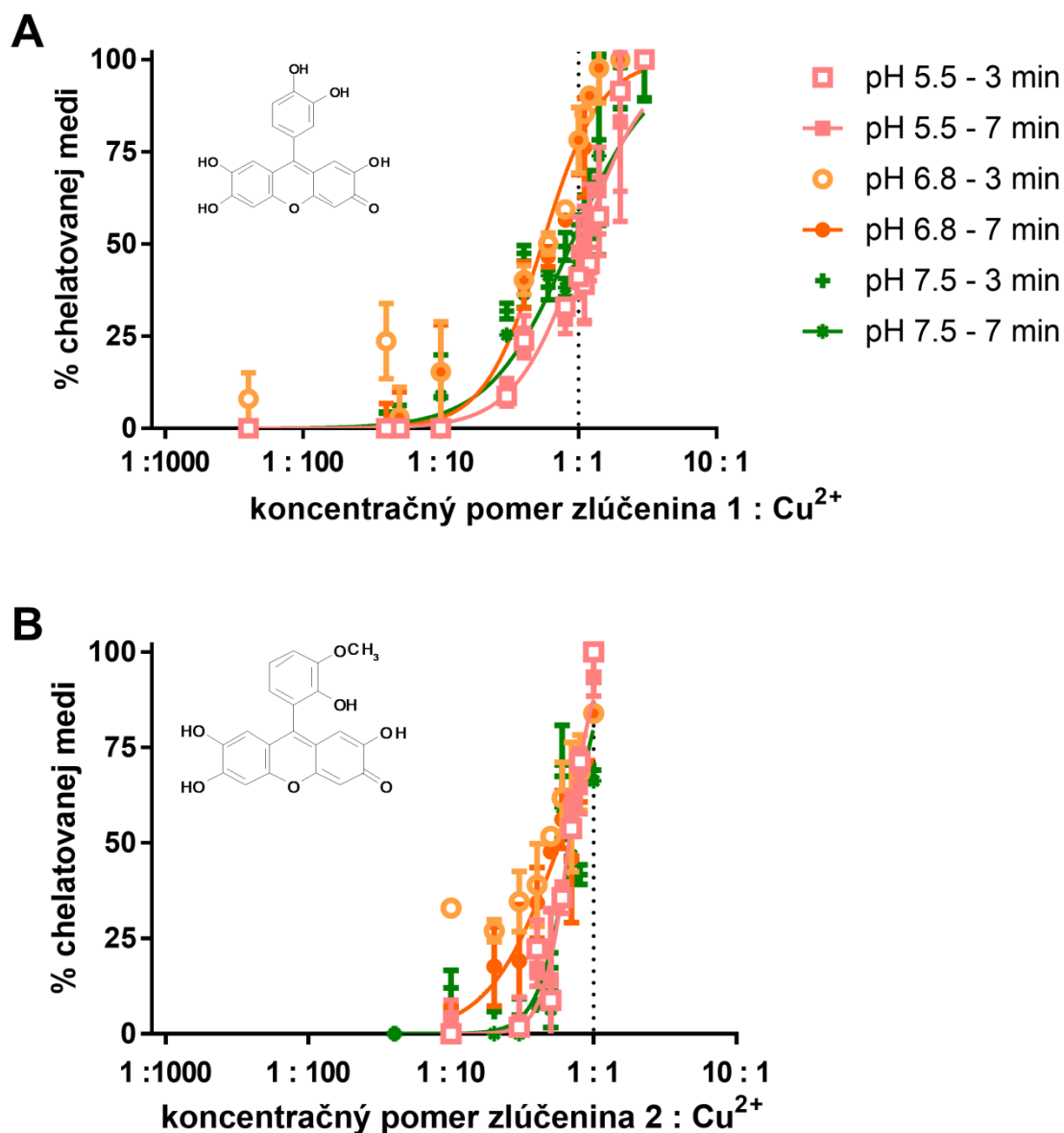
3.2.5 Matematické spracovanie výsledkov

Množstvo nezchelatovanej medi bolo vypočítané ako rozdiel absorbancie testovanej látky, tj. vzorka s indikátorom a jeho príslušnej slepej vzorky, tj. vzorka bez indikátora, vydelený rozdielom kontrolnej vzorky, tj. vzorka so známym množstvom medi bez testovanej látky, a jej slepej vzorky.

Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka. Rozdiely chelatačného potenciálu boli získané porovnaním 95% konfidenčných intervalov. Pri štatistickom spracovaní výsledkov bol použitý program MS Excel a GraphPad Prism verzia 6 pre Windows (GraphPad Software, USA).

4 Výsledky

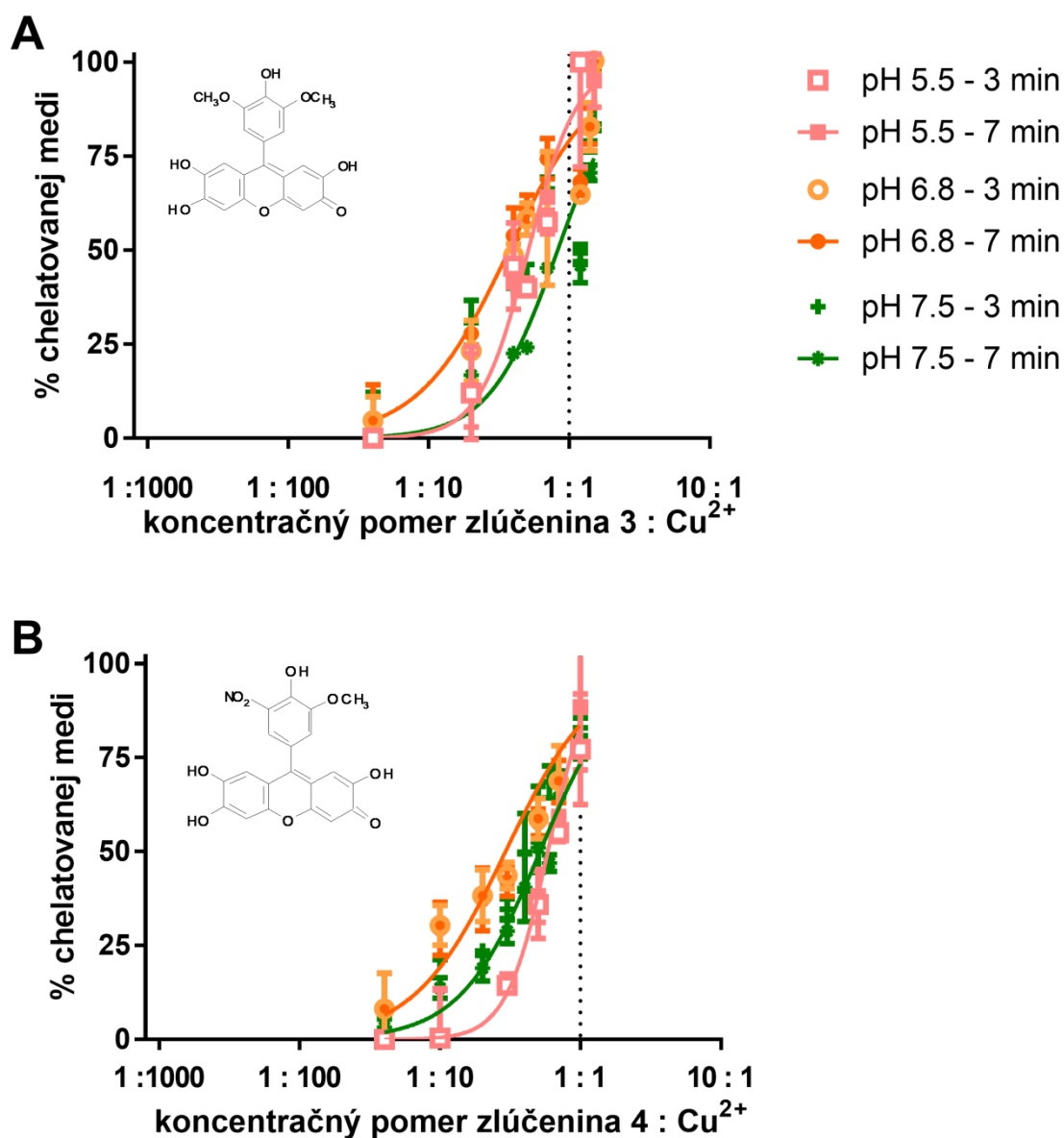
Najskôr boli otestované všetky látky na skriningovej hematoxylínovej metodike. Všetkých desať testovaných látok chelatovalo meďnaté ióny pri všetkých zvolených pH (5,5 – 7,5), vid' Obr. č. 12 – 16. Všetky testované xantóny sa podľa tejto metodiky javia ako účinné chelátory. Pri pomere 1:1 chelatovali od 50 do 100% prítomných meďnatých iónov, čo naznačuje tvorbu komplexov 1:1 pri 100% alebo takmer 100% chelatacii, alebo 3:2 (chelatacia okolo 67%) alebo výnimočne 2:1, xantón: Cu^{2+} , ako je dobre vidieť v prípade zlúčeniny 1 pri pH 5,5 (Obr. č. 12A) alebo zlúčeniny 3 pri pH 7,5 (Obr. č. 13A). Komplexy všetkých testovaných látok boli tiež stabilné, pretože sa chelatačná účinnosť nezmenila pri meraní po 3 a 7 minútach.



Obrázok č. 12: CHELATÁCIA MEĎNATÝCH IÓNOV POMOCO U HEMATOXYLÍNOVEJ METÓDY ZLÚČENINOU 1 (A) A ZLÚČENINOU 2 (B) PRI RÔZNYCH HONOTÁCH pH

A: zlučenina č. 1 dokázala chelatovať v pomere 1:1 pri pH 5,5 okolo 50% medi (pravdepodobná stechiometria 2:1, xantón: Cu^{2+} , pri pH 6,8 75% medi a pri pH 7,5 okolo 60% medi. V týchto vyšších pH nie je možné jednoznačne určiť stechiometriu.

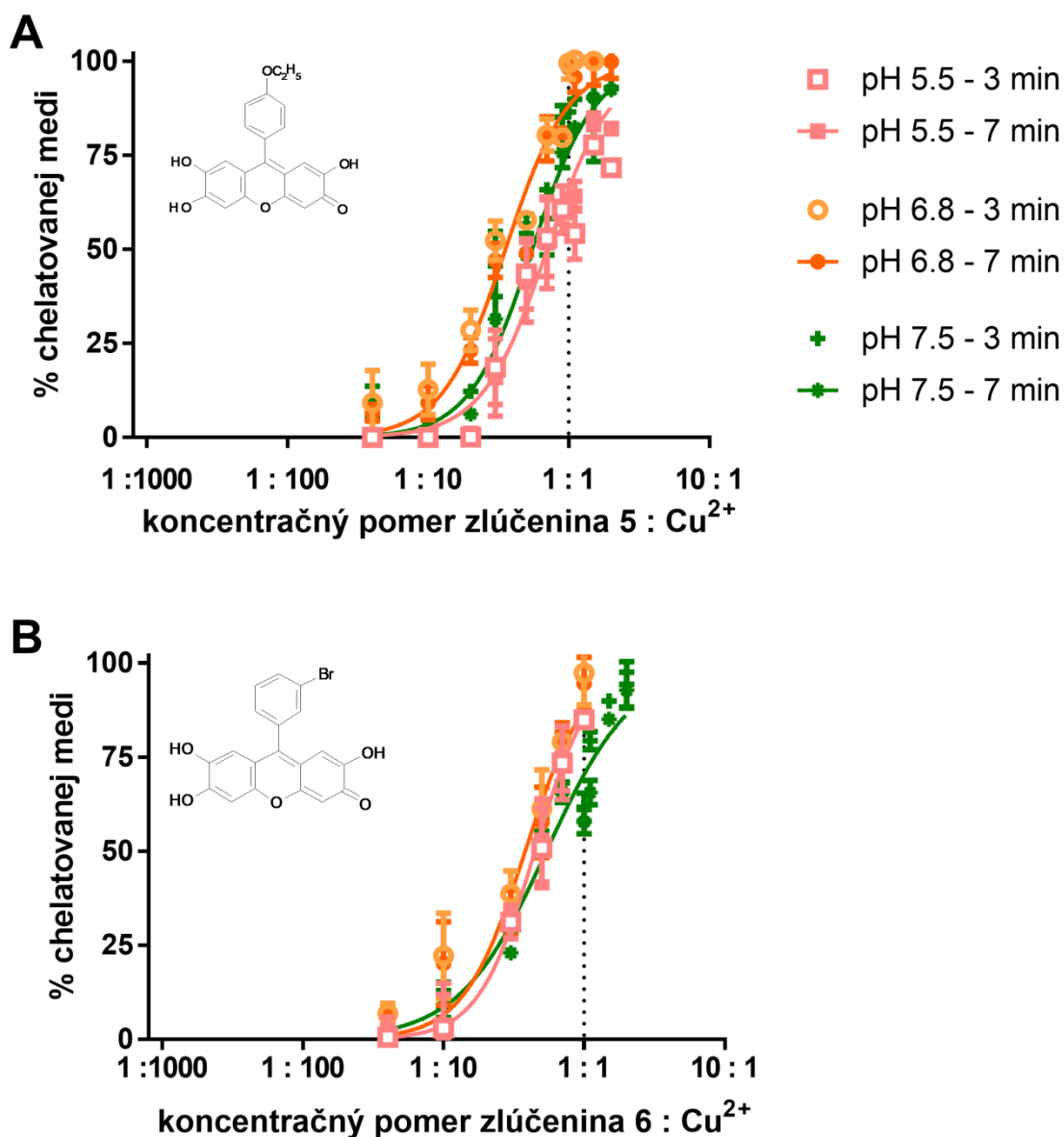
B: zlučenina č. 2 vykazovala najlepšiu chelatačnú aktivitu s pravdepodobnou stechiometriou 1:1, (100% chelatácia pri pH 5,5). Pri vyšších pH bola chelatácia nižšia.



Obrázok č. 13: CHELATÁCIA MEĎNATÝCH IÓNOV POMOCOU HEMATOXYLÍNOVEJ METÓDY ZLÚČENINOU 3 (A) A ZLÚČENINOU 4 (B)

A: v koncentračnom pomere 1:1 sme pri pH 5,5 a pH 6,8 pozorovali približne 75% chelatáciu a pri pH 7,5 okolo 50%. Pri tomto najvyššom pH sa teda pravdepodobne tvoril komplex 2:1, xantón: Cu^{2+} .

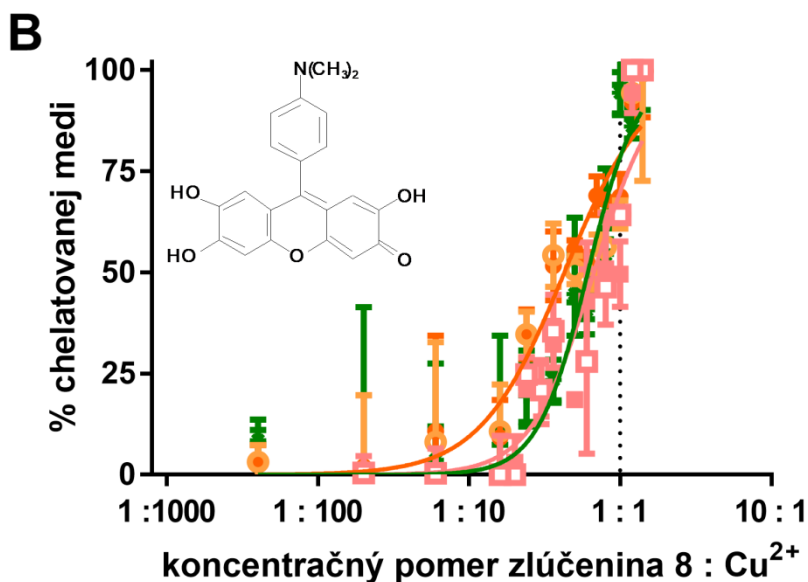
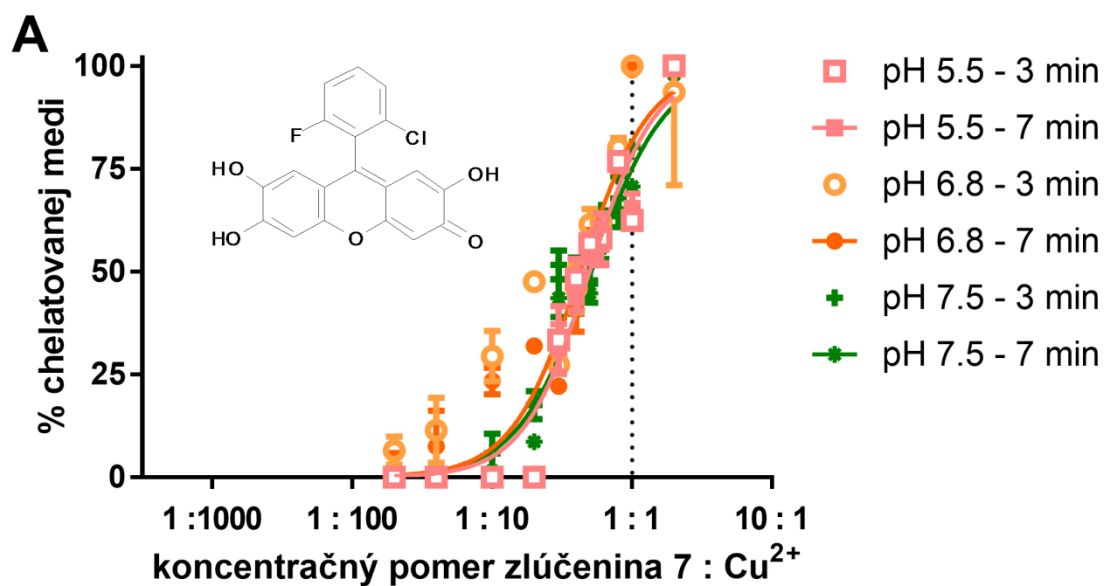
B: v pomere 1:1 bolo chelatované okolo 70%, a to pri všetkých pH. Nedá sa určiť stechiometria komplexu.



Obrázok č. 14: CHELATÁCIA MEĎNATÝCH IÓNOV POMOCO U HEMATOXYLÍNOVEJ METÓDY ZLÚČENINOU 5 (A) A ZLÚČENINOU 6 (B)

A: zlučienina č. 5 vykazovala pri pH 5,5 najnižšiu chelatačnú aktivitu, v pomere 1:1 to bolo len okolo 50 – 60%. S vyšším pH sme pozorovali aj vyššiu chelataciu. K 100% chelatacii došlo v pomere 1:1 pri pH 6,8.

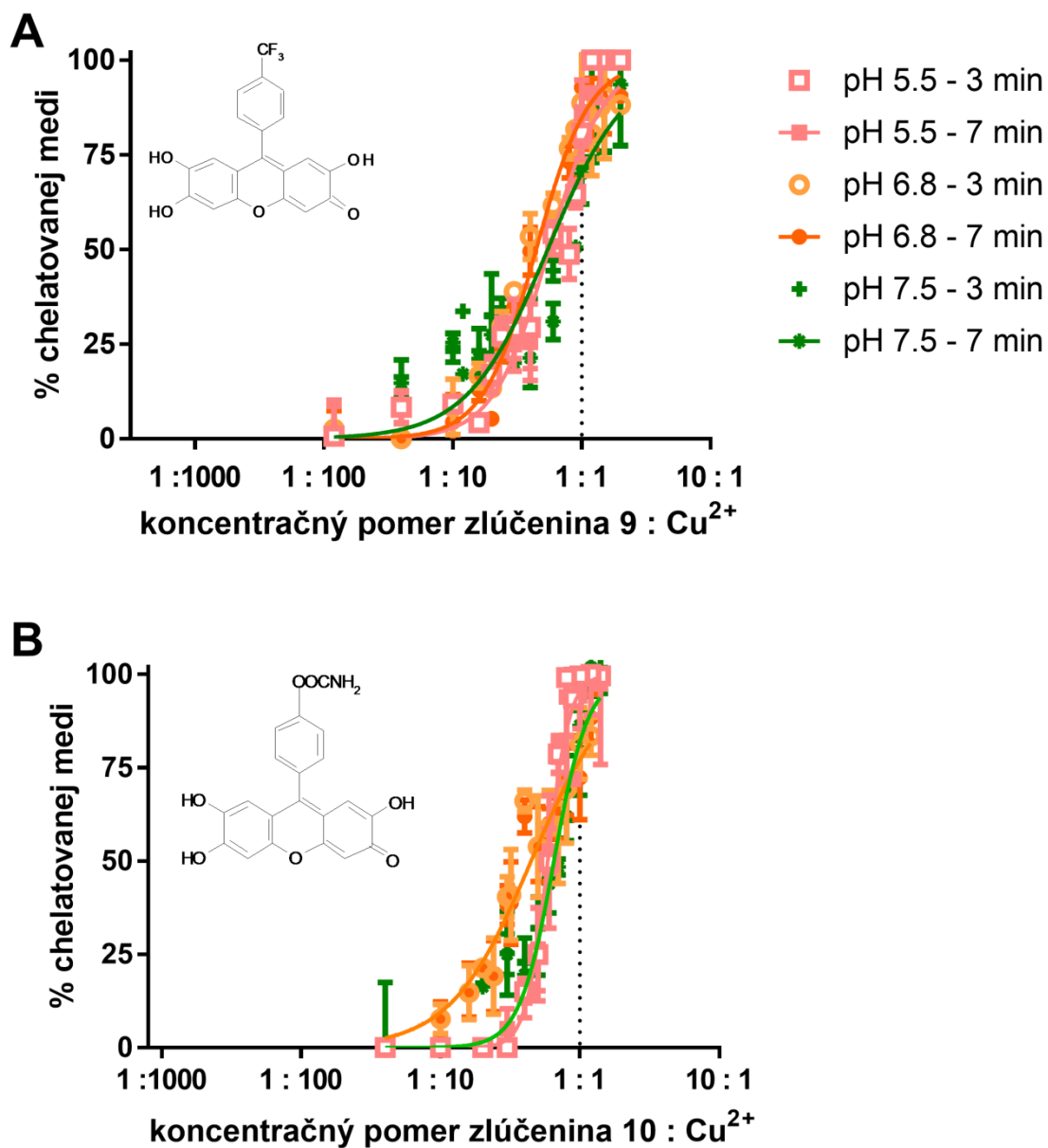
B: maximálna chelatačná aktivita bola zreteľne dosiahnutá už v pomere 1:1 pri pH 6,8. Pri pH 5,5 bola ľahko nižšia (80%), zatiaľ čo pri pH 7,5 len okolo 60%. K 100% chelatovanej medi pri pH 7,5 bola potrebná vyššia koncentrácia testovanej látky.



Obrázok č. 15: CHELATÁCIA MEĎNATÝCH IÓNOV POMOCOU HEMATOXYLÍNOVEJ METÓDY ZLÚČENINOU 7 (A) A ZLÚČENINOU 8 (B)

A: v pomere 1:1 bolo pri všetkých pH dosiahnutých okolo 70% chelatácie. Stechiometria nie je úplne jasná, môže ísť o komplex 3:2, xantón: Cu^{2+} .

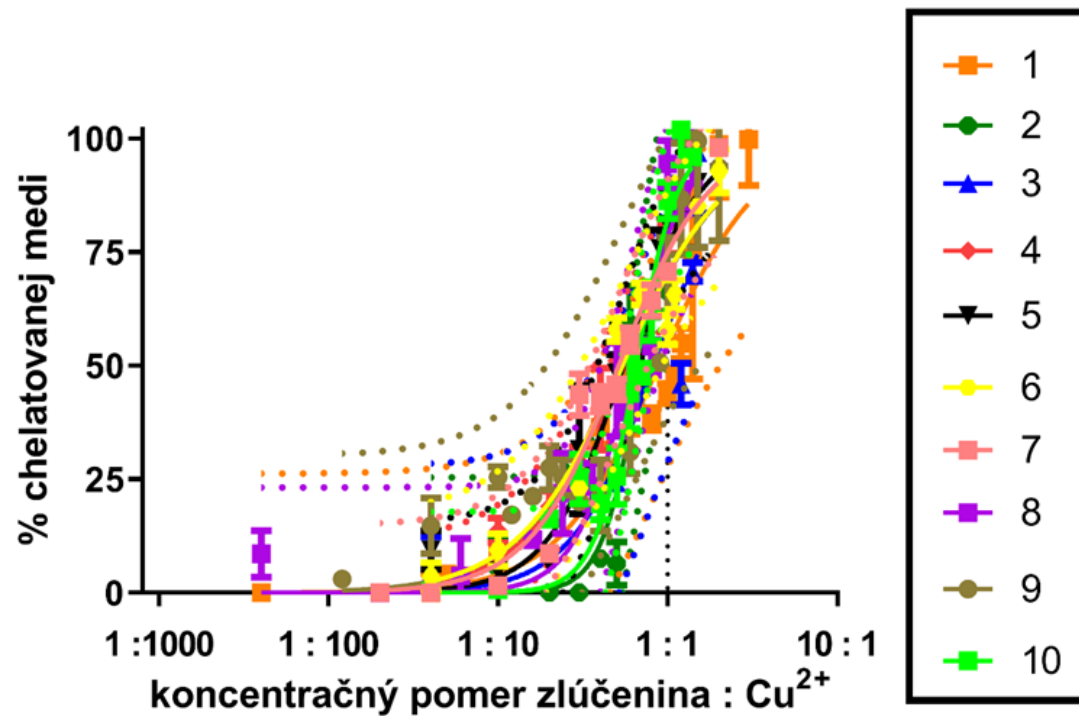
B: zlúčenina 8 chelatovala veľmi podobne ako zlúčenina 7.



Obrázok č. 16: CHELATÁCIA MEĎNATÝCH IÓNOV POMOCO U HEMATOXYLÍNOVEJ METÓDY ZLÚČENINOU 9 (A) A ZLÚČENINOU 10 (B)

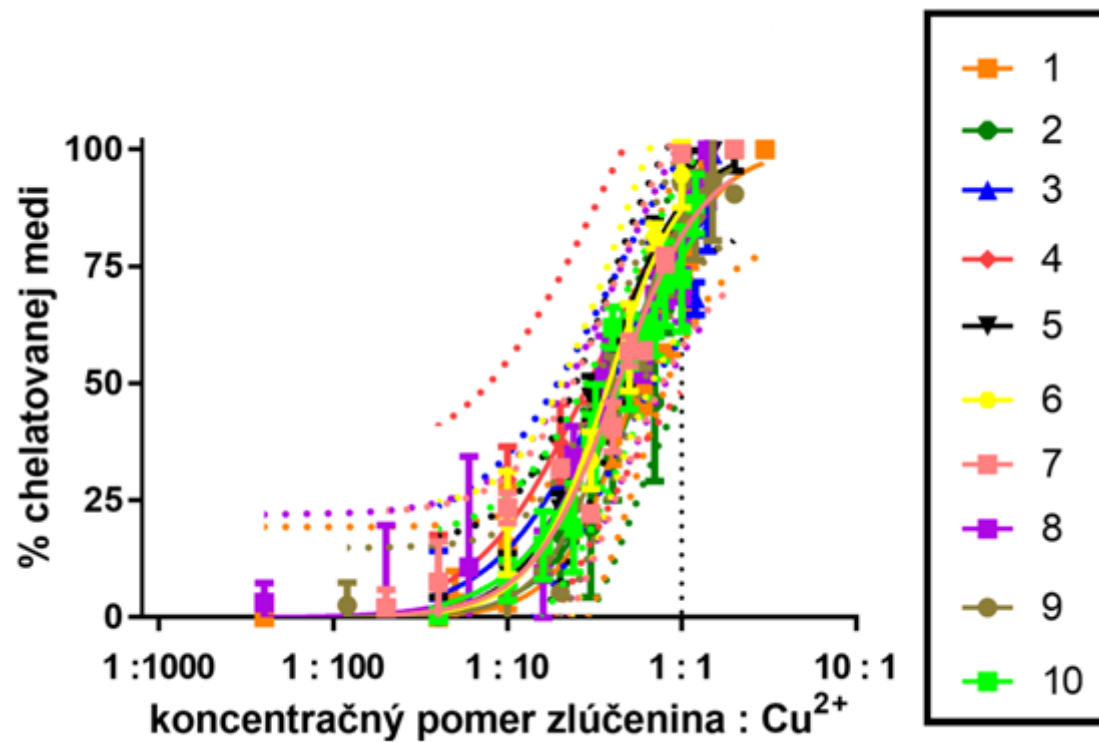
A: v prípade nižších pH sme pozorovali pri pomere 1:1 100% kompletnú (pH 5,5) alebo skoro kompletnú (pH 6,8) chelatáciu meďnatých iónov. Dá sa teda predpokladať stechiometria 1:1. Pri pH 7,5 to bolo len okolo 70%.

B: zlúčenina č. 10 dokázala chelatovať meď pri všetkých hodnotách pH. K 100% chelatácii došlo pri všetkých pH v pomere 1:1. Opäť teda môžeme špekulovať o stechiometrii 1:1.



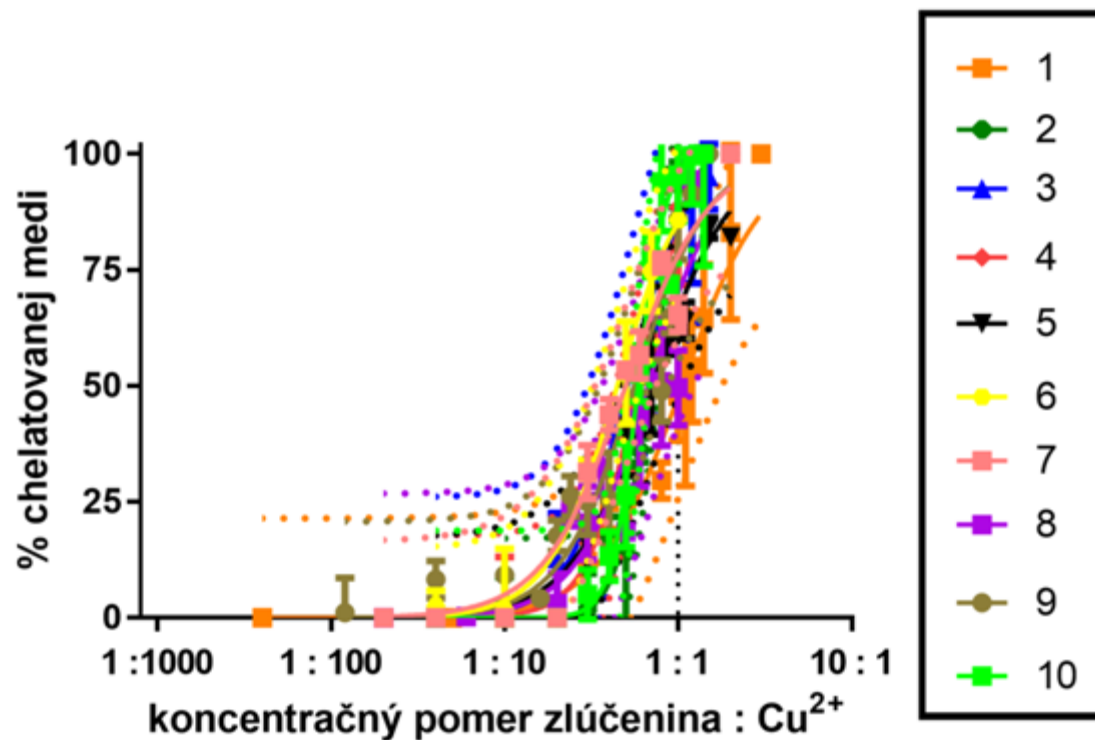
Obrázok č. 17: POROVNANIE CHELATAČNEJ ÚČINNOSTI TESTOVANÝCH LÁTKOK PRI pH 7,5

Dáta zobrazujú meranie po 7 minútach vrátane 95% konfidenčných intervalov. Medzi jednotlivými testovanými látkami neboli nájdené významné rozdiely, pretože sa konfidenčné intervaly všetkých látok prekrývajú.



Obrázok č. 18: POROVNANIE CHELATAČNEJ ÚČINNOSTI TESTOVANÝCH LÁTOK PRI pH 6,8

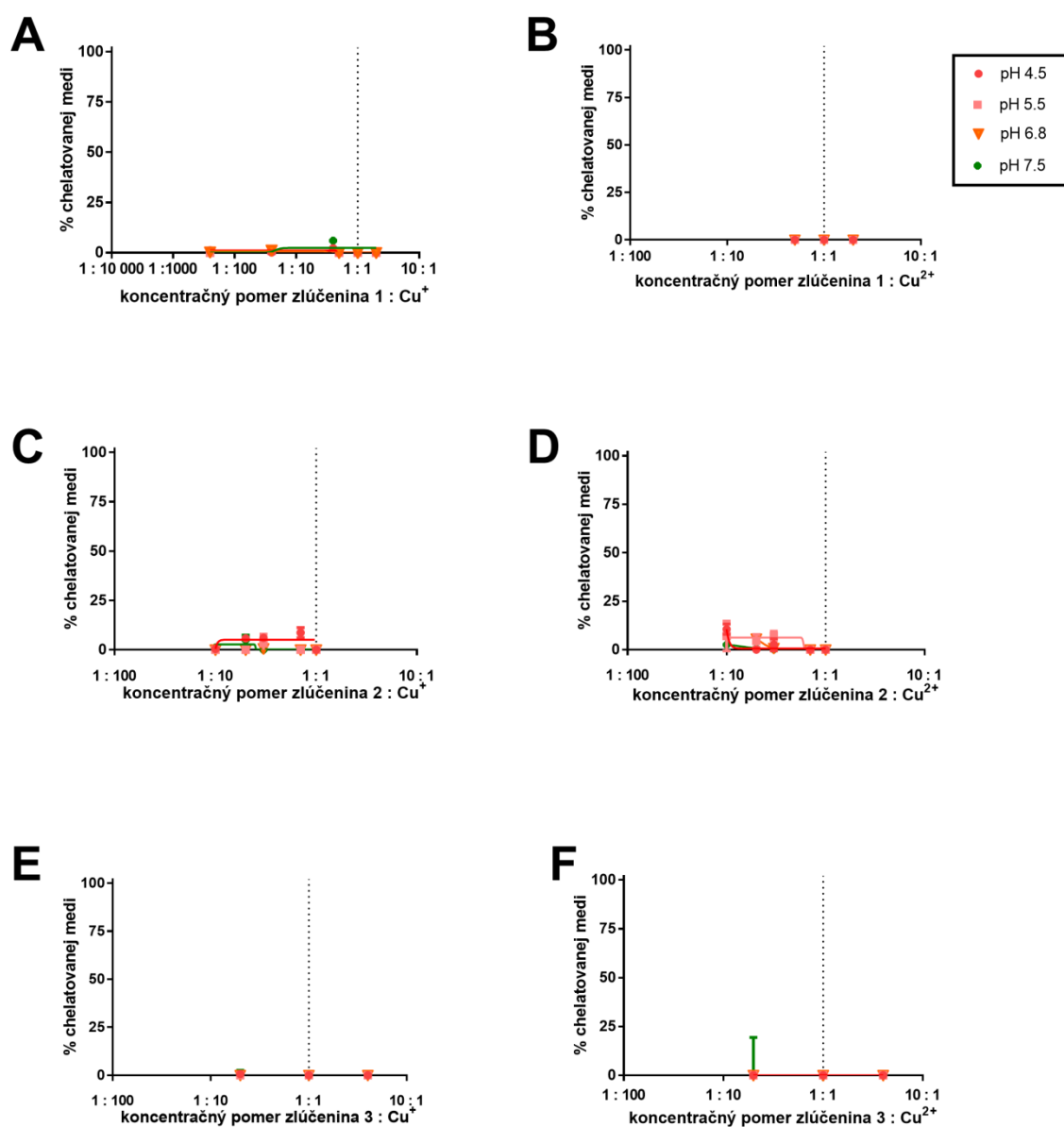
Dáta zobrazujú meranie po 7 minútach vrátane 95% konfidenčných intervalov. Medzi jednotlivými testovanými látkami neboli nájdené významné rozdiely, pretože sa konfidenčné intervaly všetkých látok prekrývajú.



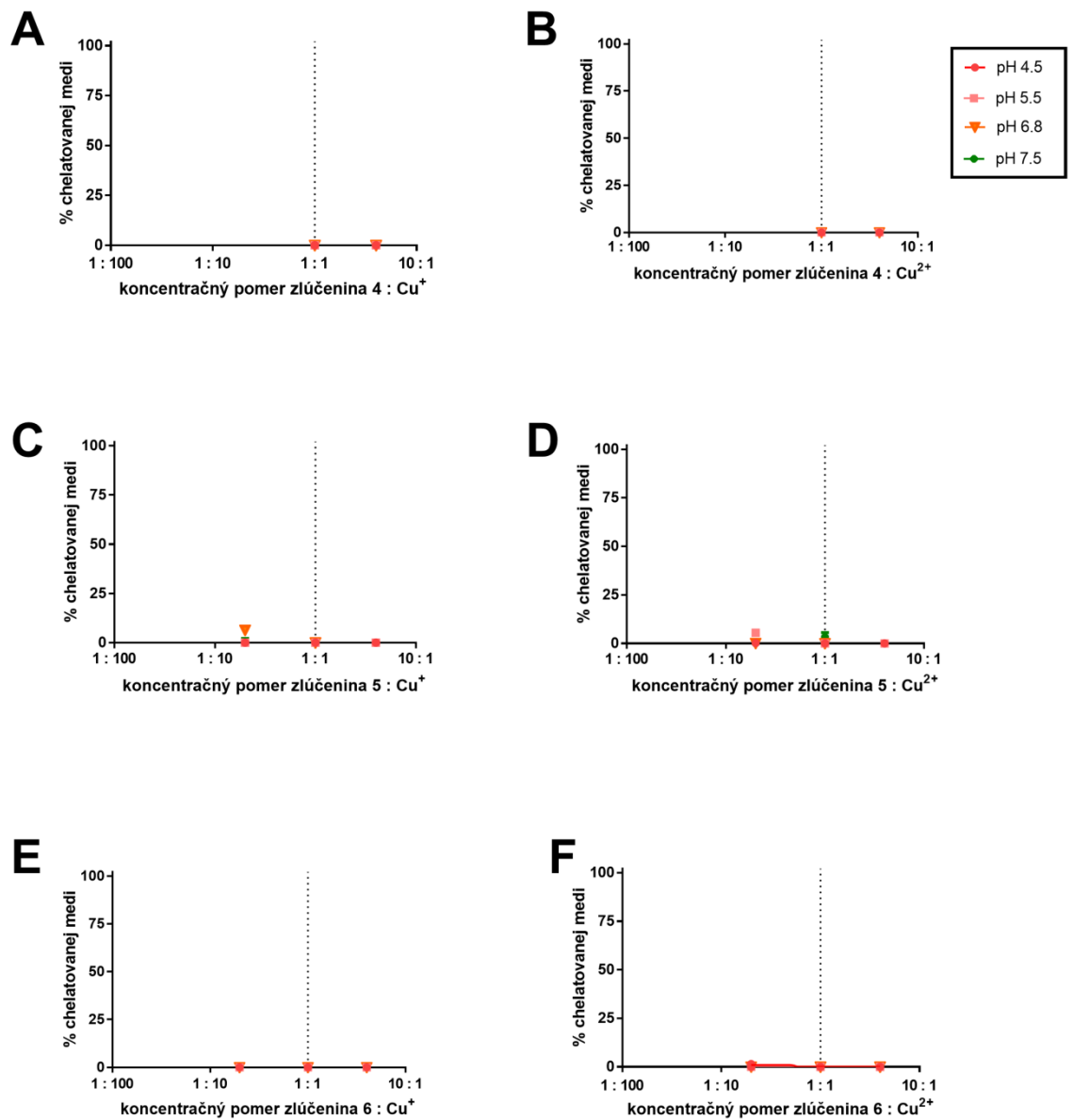
Obrázok č. 19: POROVNANIE CHELATAČNEJ ÚČINNOSTI TESTOVANÝCH LÁTKOK PRI pH 5,5

Dáta zobrazujú meranie po 7 minútach vrátane 95% konfidenčných intervalov. Medzi jednotlivými testovanými látkami neboli nájdené významné rozdiely, pretože sa konfidenčné intervaly všetkých látok prekrývajú.

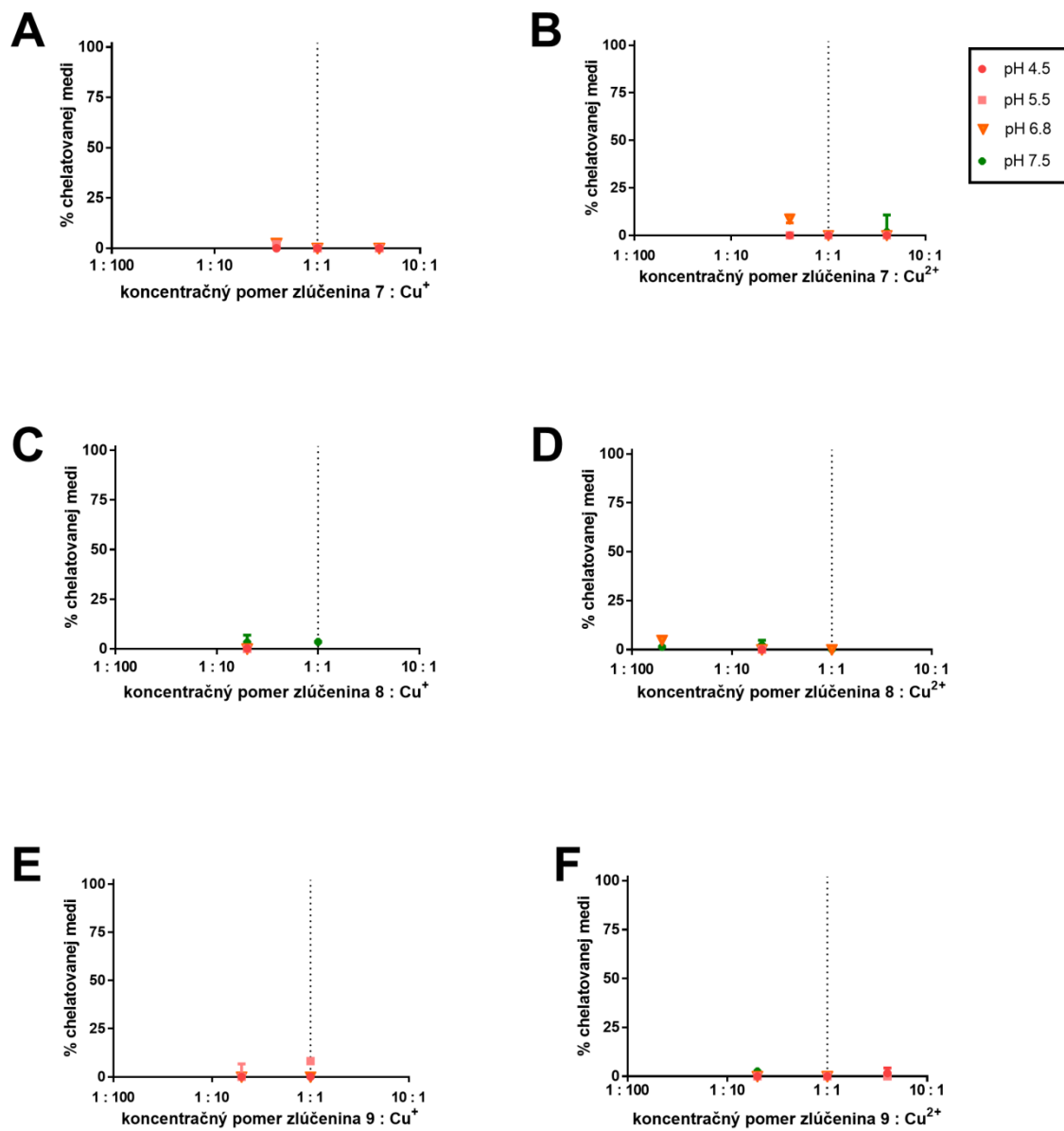
Pri použití batokuproínovej metódy sme pozorovali žiadnu alebo len zanedbateľnú chelatačnú aktivitu voči Cu^{2+} a aj Cu^+ iónom, a to u všetkých testovaných zlúčenín (č. 1 – 10) a pri každom pH (Obr. č. 20 – 23).



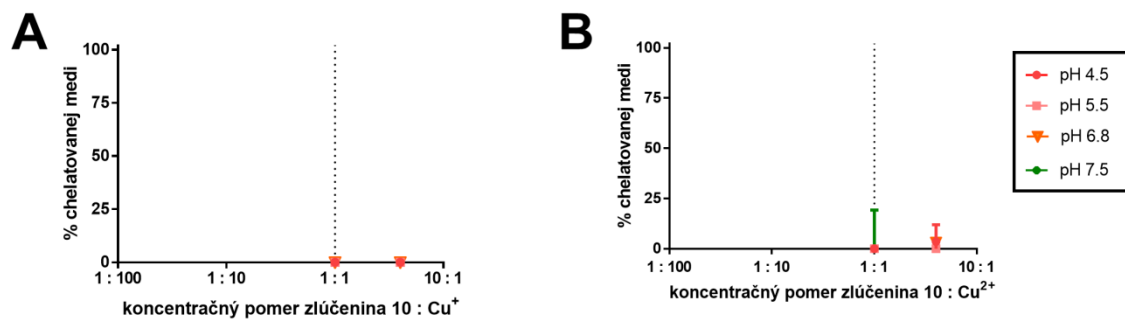
Obrázok č. 20: CHELATÁCIA MEĎNÝCH A MEĎNATÝCH IÓNOV POMOCOU BATOKUPROÍNOVEJ METÓDY ZLÚČENINOU 1 (A, B), 2 (C, D), 3 (E, F) PRI RÔZNYCH HONOTÁCH pH



Obrázok č. 21: CHELATÁCIA MEĎNÝCH A MEĎNATÝCH IÓNOV POMOCOU BATOKUPROÍNOVEJ METÓDY ZLÚČENINOU 4 (A, B), 5 (C, D), 6 (E, F) PRI RÔZNYCH HONOTÁCH pH



Obrázok č. 22: CHELATÁCIA MEĎNÝCH A MEĎNATÝCH IÓNOV POMOCOU BATOKUPROÍNOVEJ METÓDY ZLÚČENINOU 7 (A, B), 8 (C, D), 9 (E, F) PRI RÔZNYCH HONOTÁCH pH



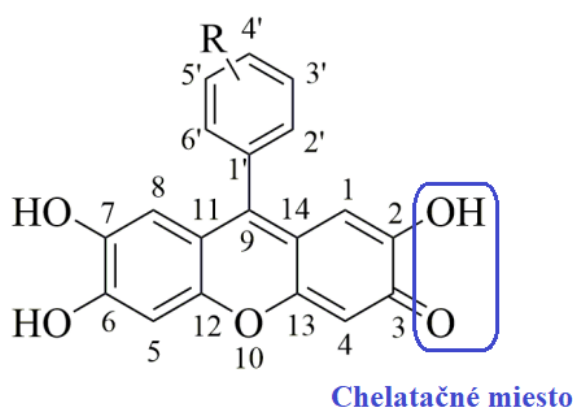
Obrázok č. 23: CHELATÁCIA MEĎNÝCH A MEĎNATÝCH IÓNOV POMOCOU BATOKUPROÍNOVEJ METÓDY ZLÚČENINOU 10 (A, B) PRI RÔZNYCH HONOTÁCH pH

5 Diskusia

V súčasnej dobe sa venuje veľká pozornosť skúmaniu prírodných látok, ktoré vykazujú heterogénne vlastnosti, potenciálne využiteľné aj v oblasti farmakológie a medicíny. Zaujímavé sa však javia aj ich syntetické analógy, u ktorých vhodná štruktúrna obmena môže priaznivo ovplyvniť požadovaný účinok. Jednou skupinou, ktorú posledné roky vedci skúmajú kvôli ich možnému využitiu v terapii, sú xantóny.

Táto práca bola zameraná na skrining desiatich štruktúrne blízkych syntetických derivátov xantén-3-ónov, pričom cieľom bolo zhodnotiť ako interagujú s iónmi medi. Hoci prebieha extenzívny výskum, tieto konkrétne látky nie sú až tak prebádané. V počiatkových hypotézach a ďalších porovnávaniach sme vychádzali z výsledkov prác zaoberajúcich sa inými polyfenolickými látkami.

Zlúčenina č. 10 sa javila ako najlepší chelátor. Dokázala pri pomere 1:1 chelatovať 100% medi, a to vo všetkých prostrediach pH, čo naznačuje tvorbu komplexu 1:1 (xantón: Cu^{2+}). Keďže ostatné zlúčeniny nevykazovali markantné rozdiely, môžeme usúdiť, že substituenty na fenylovom jadre v polohe 9 ani 6,7-dihydroxylové skupiny sa priamo nepodieľajú na chelatacii. Z toho vyplýva, že skúmané deriváty majú len jedno chelatačné miesto – je to hydroxylová skupina v polohe 2 a keto skupina v polohe 3 na základnej štruktúre xantónu (Obr. č. 24). Toto tvrdenie je v súlade s výsledkami práce Kou et al., 2020 a Mladěnka et al., 2020.



Obrázok č. 24: CHELATAČNÉ MIESTO V MOLEKULE XANTÉN-3-ÓNU

Zaujímavé je, že substitúcia fenylového zvyšku v polohe 9 väčšinou výrazne neovplyvnila výslednú aktivitu derivátov. Viaceré štúdie poukazujú na lepšiu chelatačnú

aktivitu oxidovaných foriem xantónov – konkrétne, derivátov obsahujúcich hydroxylové skupiny (Cidade et al., 2017; Mladěnka et al., 2011; Resende et al., 2020; Říha et al., 2014) alebo derivátov obsahujúcich halogénové prvky. (Říha et al., 2013) Známe chelátory medi, penicilamín či trientín, obsahujú vo svojej štruktúre atóm dusíka, ktorý je jedným z ligandov. Zavedenie funkčných skupín obsahujúcich dusík moduluje aktivitu výslednej zlúčeniny a zvyšuje selektivitu pre väzbu s Cu^{2+} (Chereddy et al., 2013), to sa v tejto práci nepotvrdilo. Zdá sa, že rôzne substituenty skôr ovplyvňujú redukčné než chelatačné účinky. (Karličková et al., 2015; Mladěnka et al., 2020) Je možné, že substituenty na fenylovom jadre len nepriamo ovplyvňujú výslednú aktivitu jednotlivých zlúčenín. Jedným z vysvetlení by mohol byť efekt poľa, kedy môže dôjsť k ovplyvneniu polarizácie, štruktúry a reaktivity molekuly priestorom, nie po väzbách ako je to pri indukčnom alebo mezomérom efekte. Tento efekt je relatívne slabý a znižuje sa s rastúcou vzdialenosťou funkčných skupín. (Wheeler a Houk, 2009) Tým by substitúcia fenylu v blízkosti hlavného chelatačného miesta, t.j. v polohe C'2 a C'6, mohla ovplyvniť 2-hydroxy alebo 3-keto skupinu. (Mladěnka et al., 2020)

Jedným z faktorov ovplyvňujúci priebeh reakcie je pH prostredie. Zo zistených výsledkov skúmania nemožno jednoznačne určiť závislosť na pH. Zdá sa, že pH 7,5 bolo najmenej vhodné, pretože k 100% chelatacii v tomto prostredí došlo pri pomere 1:1 len u zlúčeniny č. 10. Nižšie pH sa javili ako vhodnejšie, čo je zaujímavé, pretože zistenia iných štúdií poukazujú na klesajúcu chelatačnú aktivitu v kyslejšom prostredí. (Říha et al., 2013) U jednotlivých derivátov 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónu sme pozorovali len jemné rozdiely, ako napr. zlúčenina č. 1 a č. 5 mala pri pH 5,5 najnižšiu chelatačnú aktivitu, naopak najvyššiu aktivitu vykazovala zlúčenina č. 2 a č. 9. Pri pH 6,8 najlepšie chelatovala zlúčenina č. 5 a č. 6. Tieto rozdiely však nie sú tak výrazné, aby sa dali zovšeobecniť. Navyiac je nutné si uvedomiť, že tieto rozdiely neboli významné pri porovnaní konfidenčných intervalov (Obr. č. 17 – 19), t.j. navrhnuté rozdiely v stechiometrii sa v rámci experimentálnej chyby danej meraním neprejavili v účinnosti chelatacie hodnotenej štatistickou metódou.

Z výsledkov je zrejmé, že všetky zlúčeniny boli schopné vytvoriť komplexy s iónmi medi. Avšak pri použití batokuproínovej metódy, ktorá predstavuje viac kompetitívne prostredie, sa chelatačná aktivita nepreukázala. Z tejto skutočnosti vyplýva, že vytvorené komplexy nie sú stabilné a rozpadajú sa. Zdá sa, že afinita nami skúmaných derivátov 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónu k iónom medi nie je až tak vysoká v porovnaní

s ich afinitou k iónom železa. Tá bola preukázaná a publikovaná v komplexnej vedeckej práci prof. Mladěnkú v roku 2020, kde okrem iného boli publikované aj výsledky tejto rigoróznejs práce. K rovnakému výsledku došlo aj pri skúmaní flavanónov, kde sa skúmané látky neprejavili ako vhodné chelátory medi. (Karlíčková et al., 2015) V ďalšom skúmaní týchto látok naším pracoviskom bolo preukázané, že sú schopné silne redukovať meďnaté ióny (Mladěnka et al., 2020) a môžu teda potenciovat tvorbu voľných radikálov Fentónovou reakciou. (Sakihama et al., 2002) Takéto látky by teoreticky mohli byť využiteľné v terapii nádorov.

Na druhej strane je nutné povedať, že i napriek nádejne vyzerajúcim výsledkom chelatacie zistených použitím hematoxylínovej metodiky, ide o veľmi slabé chelátory, ako preukázala batokuproínová metodika. Ich chelatačný účinok bude teda v klinickom prostredí zanedbateľný. Je ale možné, že určitou derivatizáciou iných miest v molekule týchto látok, môžeme zvýšiť chelatačný účinok. Špeciálne u látok, ktoré inhibujú aktivitu acetylcholinesterázy (Kou et al., 2020), by chelatačný účinok bol výhodný, pretože v priebehu Alzheimerovej choroby dochádza i k nerovnováhe hladín kovov v mozgu. (Li et al., 2017)

6 Záver

Všetky deriváty 2,6,7-trihydroxyxantén-3-ónu sú schopné chelatovať ióny medi, ale vzniknuté komplexy nie sú stabilné. Substitúcia fenylového jadra nemá vplyv na chelatačnú účinnosť a ligandmi sú 2-hydroxy a 3-keto skupiny na základnej štruktúre xantónu. Z výsledkov vyplýva, že xantén-3-óny svoje využitie v klinickej praxi nenájdu pri liečbe stavov s nadbytkom medi ako chelátory. Nemusí však ísť o slepú vývojovú vetvu, ponúka sa modifikácia iných častí molekuly vedúca k zvýšeniu chelatačnej aktivity alebo skúšanie týchto látok kvôli ich redukčným schopnostiam na modeloch nádorových ochorení.

7 Použité skratky

- ATCUN – amino terminal copper and nickel binding
- ATOX1 – prenášač antioxidant 1
- ATP – adenosíntrifosfát
- ATP7A – prenášač ATPase copper transporting alpha
- ATP7B – prenášač ATPase copper transporting beta
- BCS – batokuproíndisulfónová kyselina
- CcO – cytochróm c oxidáza
- CCS – copper chaperon for SOD
- COX17 – cytochrome c-oxidase copper chaperone
- CTR1 – copper transporter 1
- DMT1 – divalent metal transporter 1
- DMSO – dimetylsulfoxid
- EFSA – European food safety authority
- EMA – European medicines agency
- FDA – Food and drug administration
- GA – Golgiho aparát
- HA – hydroxylamín hydrochlorid
- HEM – hematoxylín
- HEPES – 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínétánsulfónová kyselina
- MDH sekvencia – sekvencia Met-Asp-His
- SOD – superoxiddismutáza
- TTM – tetratiomolybdenan
- ÚVZSR – Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky

8 Použité zdroje

Aggarwal A., Bhatt M. (2018). Advances in treatment of Wilson disease. Tremor and other hyperkinetic movements (N.Y.), 8, 525.

Applová L., Veljović E., Muratović S., Karlíčková J., Macáková K., Završnik D., Saso L., Durić K., Mladěnka P. (2018). 9-(4'-dimethylaminophenyl)-2,6,7-trihydroxy-xanthene-3-one is a potentially novel antiplatelet drug which antagonizes the effect of thromboxane A₂. Medicinal Chemistry, 14, 1–10.

Barceloux D. G. (1999). Copper. Clinical Toxicology, 37(2): 217–230.

Bossak K., Drew S. C., Stefaniak E., Płonka D., Bonna A., Bal W. (2018). The Cu(II) affinity of the N-terminus of human copper transporter CTR1: comparison of human and mouse sequences. Journal of Inorganic Biochemistry, 182, 230–237.

Cao Y., Skaug M. A., Andersen O., Aaseth J. (2015). Chelation therapy in intoxications with mercury, lead and copper. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 31, 188–192.

Cidade H., Rocha V., Palmeira A., Marques C., Tiritan M. E., Ferreira H., Sousa Lobo J., Almeida I.F., Sousa M.E., Pinto M. (2017). In silico and in vitro antioxidant and cytotoxicity evaluation of oxygenated xanthone derivatives. Arabian Journal of Chemistry, 13(1), 17–26.

Collins J. F., Prohaska J. R., Knutson M. D. (2010). Metabolic crossroads of iron and copper. Nutrition Reviews, 68(3), 133–147.

Das A., Banik B. K. (2020). Dipole moment in medicinal research: green and sustainable approach. Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design, 921–964.

De Feo C. J., Aller S. G., Unger V. M. (2007). A structural perspective on copper uptake in eukaryotes. BioMetals, 20(3-4), 705–716.

Denny-Brown D., Porter H. (1951). The effect of BAL (2,3-dimercaptopropanol) on hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). New England Journal of Medicine, 245(24), 917–925.

Eisses J. F., Kaplan J. H. (2002). Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29162–29171.

Flora S. J. S., Pachauri V. (2010). Chelation in metal intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(7), 2745–2788.

Galler T., Lebrun V., Raibaut L., Faller P., Wezynfeld, N. E. (2020). How trimerization of CTR1 N-terminal model peptides tunes Cu-binding and redox-chemistry. *Chemical Communications*, 56, 12194–12197.

Harrison M. D., Jones C. E., Dameron C. T. (1999). Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 4(2), 145–153.

Chen J., Jiang Y., Shi H., Peng Y., Fan X., Li C. (2020). The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 472(10):1415–1429.

Cherreddy N. R., Korrapati P. S., Thennarasu S., Mandal A. B. (2013). Tuning copper(II) ion selectivity: the role of basicity, size of the chelating ring and orientation of coordinating atoms. *Dalton Transactions*, 42(36), 12873.

Inesi G. (2016). Molecular features of copper binding proteins involved in copper homeostasis. *IUBMB Life*, 69(4), 211–217.

Karlíčková J., Macáková K., Říha M., Pinheiro L. M. T., Filipický T., Horňasová V., Hrdina R., Mladěnka P. (2015) Isoflavones reduce copper with minimal impact on iron in vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015: 437381.

Kim B.-E., Turski M. L., Nose Y., Casad M., Rockman H. A., Thiele D. J. (2010). Cardiac copper deficiency activates a systemic signaling mechanism that communicates with the copper acquisition and storage organs. *Cell Metabolism*, 11(5), 353–363.

Kontoghiorghes G. J. (2020). Advances on chelation and chelator metal complexes in medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2499.

Kou X., Song L., Wang Y., Yu Q., Ju H., Yang A., Shen R. (2020). Design, synthesis and anti-Alzheimer's disease activity study of xanthone derivatives based on multi-target strategy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(4): 126927.

Lauridsen J. M. V., Kragh, R. R., Lee, J.-W. (2020). Pyrans and their benzo derivatives: Synthesis. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV* (editori: Black D.S., Cossy J., Stevens C.V.), Elsevier: e-book, 7: 329–90.

Lee J., Peña M. M. O., Nose Y., Thiele D. J. (2001). Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4380–4387.

Lee S.-O., An K.-L., Shin S.-R., Jun K., Naveen M., Son Y.-A. (2018). “Turn-on” fluorescent and colorimetric detection of Zn²⁺ ions by rhodamine-cinnamaldehyde derivative. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(8), 5333–5340.

Lech T., Sadlik J. K. (2007). Copper concentration in body tissues and fluids in normal subjects of southern Poland. *Biological Trace Element Research*, 118(1), 10–15.

Li Y., Jiao Q., Xu H., Du X., Shi L., Jia F., Jiang H. (2017). Biometal dyshomeostasis and toxic metal accumulations in the development of Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10:339.

Lin J., Gao Y., Li H., Zhang L., Li X. (2014). DNA protective effect of mangosteen xanthenes: an in vitro study on possible mechanisms. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(2): 147–153.

Lutsenko S., Barnes N. L., Bartee M. Y., Dmitriev O. Y. (2007). Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiological Reviews*, 87(3), 1011–1046.

Lv J., Zhao L.-J., Qian R.-C., Long Y.-T. (2017). Off-on fluorescence monitoring of intracellular Ag⁺ in single living cells using an Ag⁺-responsive probe. *Methods and Applications in Fluorescence*, 5(4), 044003.

Mabhai S., Dolai M., Dey S. K., Dhara A., Choudhury S. M., Das B., Dey S., Jana A. (2019). Rhodamine-azobenzene based single molecular probe for multiple ions sensing:

Cu^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} and its imaging in human lymphocyte cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 219, 319–332.

Marona H., Pękala E., Antkiewicz-Michaluk L., Walczak M., Szneler E. (2008a). Anticonvulsant activity of some xanthone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(15), 7234–7244.

Marona H., Szkaradek, N., Kubacka M., Bednarski M., Filipek B., Cegla M., Szneler E. (2008b). Synthesis and evaluation of some xanthone derivatives for anti-arrhythmic, hypotensive properties and their affinity for adrenergic receptors. *Archiv Der Pharmazie*, 341(2), 90–98.

Mladěnka P., Hrdina R., Hübl M., Šimůnek T. (2005). The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica*, 48: 127–35.

Mladěnka P., Macáková K., Filipický T., Zatloukalová L., Jahodář L., Bovicelli P., Silvestri I. P., Hrdina R., Saso L. (2011). In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(5), 693–701.

Mladěnka P., Karlíčková J., Hrubša M., Veljović E., Muratović S., Carazo A., Durić K. (2020). Interaction of 2,6,7-trihydroxy-xanthone-3-ones with iron and copper, and biological effect of the most active derivative on breast cancer cells and erythrocytes. *Applied Sciences*, 10(14), 4846.

Moini M., To U., Schilsky M. L. (2021). Recent advances in Wilson disease. *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 6: 21.

Muller P., van Bakel H., van de Sluis B., Holstege F., Wijmenga C., Klomp L. W. J. (2007). Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4), 495–507.

Nishito Y., Kambe T. (2018). Absorption mechanisms of iron, copper, and zinc: An overview. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(1), 1–7.

Ohgami R. S. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 108(4), 1388–1394.

Peters R. A., Stocken L. A., Thompson R. H. S. (1945). British Anti-Lewisite (BAL). *Nature*, 156(3969), 616–619.

Rao P. G., Saritha B., Siva Rao T. (2019). Colorimetric and turn-on fluorescence chemosensor for Hg²⁺ ion detection in aqueous media. *Journal of Fluorescence*, 29(2): 353–360.

Resende D. I. S. P., Almeida M. C., Maciel B., Carmo H., Sousa Lobo J., Dal Pozzo C., Cravo S. M., Rosa G. P., Kane-Pges A., Barreto M. C., Almeida I. F., Sousa M. E., Pinto M. M. M. (2020). Efficacy, stability, and safety evaluation of new polyphenolic xanthenes towards identification of bioactive compounds to fight skin photoaging. *Molecules*, 25(12), 2782.

Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Hrdina R., Mladěnka P. (2013). Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 123, 80–87.

Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Rocha L., Bovicelli P., Silvestri I. P., Saso L., Jahodář L., Hrdina R., Mladěnka P. (2014). In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4, 32628–32638.

Sakihama Y., Cohen M. F., Grace S. C., Yamasaki H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67–80.

Shagufta, Ahmad, I. (2016). Recent insight into the biological activities of synthetic xanthone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 116, 267–280.

Shawki A., Anthony S. R., Nose Y., Engevik M. A., Niespodzany E. J., Barrientos T., Mackenzie B. (2015). Intestinal DMT1 is critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper or manganese. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(8), G635–G647.

Shim H., Harris Z. L. (2003). Genetic defects in copper metabolism. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1527S–1531S.

Szkaradek N., Stachura K., Waszkielewicz A. M., Cegła M., Szneler E., Marona H. (2008). Synthesis and antimycobacterial assay of some xanthone derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 65(1), 21–8.

Tocci N., Simonetti G., D'Auria F. D., Panella S., Palamara A. T., Valletta A., Pasqua G. (2011). Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 977–987.

Van Campen D. R., Mitchell E. A. (1965). Absorption of Cu^{64} , Zn^{65} , Mo^{99} , and Fe^{59} from Ligated Segments of the Rat Gastrointestinal Tract. *The Journal of Nutrition*, 86(2), 120–124.

Veljović E., Špirtović-Halilović S., Muratović S., Osmanović A., Haverić S., Haverić A., Hadžić M., Salihović M., Malenica M., Šapčanin A., Završnik D. (2019). Antiproliferative and genotoxic potential of xanthen-3-one derivatives. *Acta Pharmaceutica*, 69(4): 683–694.

Walshe J. M. (1956). Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *The American Journal of Medicine*, 21(4), 487–495.

Walshe J. M. (2003). The story of penicillamine: A difficult birth. *Movement Disorders*, 18(8), 853–859.

Walshe J. M. (2009). The conquest of Wilson's disease. *Brain*, 132(8), 2289–2295.

Wheeler S. E., Houk K. N. (2009). Through-space effects of substituents dominate molecular electrostatic potentials of substituted arenes. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(9), 2301–2312.

Zimnicka A. M., Maryon E. B., Kaplan, J. H. (2007). Human copper transporter hCTR1 mediates basolateral uptake of copper into enterocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26471–26480.

Zukić S., Oljacić S., Nikolic K., Veljović E., Špirtović-Halilović S., Osmanović A., Završnik D. (2021). Quantitative structure-activity relationships of xanthen-3-one and xanthen-1,8-dione derivatives and design of new compounds with enhanced

antiproliferative activity on HeLa cervical cancer cells. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(11): 4026–4036.

Knižné publikácie

Trojan Stanislav a kol. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003: 398–399.

Internetové odkazy

Oficiálne webové stránky European Food Safety Authority – www.efsa.europa.eu (online). Dostupné na: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/updated-advice-acceptable-intake-copper-consultation-open>. Navštívené 30.5.2022.

Oficiálne webové stránky European Medicines Agency – www.ema.europa.eu (online). Dostupné na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu308539>. Navštívené 29. 7. 2022.

Oficiálne webové stránky Drugs – www.drugs.com (online). Dostupné na: <https://www.drugs.com/history/coprexa.html>. Navštívené 29. 7. 2022.

Oficiálne webové stránky Státního ústavu pro kontrolu léčiv – www.sukl.cz (online). Dostupné na: https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Batc_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=penicilamin&data%5Bpat_h%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braillyes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brailno&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brailldf&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20. Navštívené 2. 4. 2022.

Oficiálne webové stránky Štátneho ústavu pre kontrolu liečiv – www.sukl.sk (online). Dostupné na: https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/databazy-a-servis/vyhladavanie-liekov-zdravotnickych-pomocok-a-zmien-v-liekovej-databaze/vyhladavanie-v-databaze-registrovanychliekov?page_id=242&lie_nazov=METALCAPTASE&atc_nazov=&lie_kod=&atc_kod=&lie_rc=&drz_kod=; . Navštívené 2. 4. 2022.

Oficiálne webové stránky Úradu verejného zdravotníctva Slovenskej republiky –
www.uvzsr.sk (online). Dostupné na:
https://www.uvzsr.sk/index.php?option=com_content&view=article&id=1014:odporuane-vyivove-davky-pre-obyvatestvo-vnslovenskej-republike&catid=66:vyiva-a-bezpenos-potravin&Itemid=72. Navštívené 2. 4. 2022.