

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



**INTERAKCIE 7,8-DIHYDROXYFLAVÓNU
S FYZIOLOGICKÝMI KOVMI**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

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

Konzultant: PharmDr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Aneta STŘEĎANSKÁ

Prehlásenie

„Čestne prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktorú som vypracovala samostatne pod vedením školiteľa **prof. PharmDr. Přemysla Mladěny, Ph.D.** Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri písaní čerpala sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci náležite citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, dňa

.....

Aneta Stred'anská

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa rada pod'akovala predovšetkým vedúcemu diplomovej práce, Prof. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D. za ústretový prístup, cenné rady a pripomienky, odborné vedenie a ochotu pri vypracovaní diplomovej práce. Ďalej by som sa chcela pod'akovať celému kolektívu Katedry farmakológie a toxikológie za umožnenie vypracovania mojej práce. Moja vd'aka taktiež patrí PharmDr. Zuzane Lomozovej, Ph.D a Mgr. Lukášovi Konečnému za ich obetavú pomoc pri meraní a vyhodnocovaní výsledkov.

V neposlednom rade touto cestou vyjadrujem pod'akovanie celej svojej rodine a priateľom, ktorí mi boli počas celého štúdia oporou a podporovali ma.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Aneta Stred'anská

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

Konzultant: PharmDr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Interakcie 7,8-dihydroxyflavónu s fyziologickými kovmi

7,8-dihydroxyflavón patrí medzi fenolické látky súhrne označované ako flavonoidy. Flavonoidy sú bioaktívne zložky bohato distribuované v každodennej strave so schopnosťou modulovať zdravie a ochorenia prostredníctvom mnohých mechanizmov vrátane svojej antioxidačnej aktivity. Avšak za určitých podmienok môžu vykazovať aj prooxidačné účinky. Vzhľadom na túto skutočnosť, ktorá súvisí jak s vplyvom jednotlivých faktorov, tak s pestrou štruktúrou flavonoidov, je preto esenciálne pochopiť dané redoxné správanie na základe vzťahu štruktúry a účinku a porozumieť ich fyziologickým, farmakologickým, a teda i prípadným toxickým vlastnostiam.

Interakcia s fyziologickými kovmi je daná štruktúrou molekuly prostredníctvom dihydroxy uskupenia v polohe 7 a 8. Tieto spomenuté kovy sú esenciálne pre mnohé biochemické pochody v biologických systémoch. Ich homeostáza je v ľudskom tele prísne regulovaná a narušenie tejto rovnováhy môže viesť k vývoju rôznych patofyziologických zmien.

Táto práca prezentuje flavonoidy a fyziologické kovy z teoretického hľadiska, kde na získanie náležitých vedomostí sme využili dostupnú literatúru. V praktickej časti diplomovej práce sme sa zamerali na ich účinky najmä z hľadiska redoxných dejov. Konkrétne sme skúmali chelatačnú schopnosť 7,8-dihydroxyflavónu so železom, meďou, kobaltom, zinkom, horčíkom a vápnikom použitím kompetitívnych metódik a redukčné schopnosti tejto látky k železitým a meďnatým iónom. Ďalej sme sledovali vplyv danej látky na železom a meďou iniciovanú Fentonovu reakciu. Otestovali sme účinky tohto flavónu na meďou iniciovanú lýzu červených krviniek.

Záverom, touto prácou sme zistili, že 7,8-dihydroxyflavón je schopný najúčinnnejšie chelatovať železnaté ióny a účinnejšie redukovať meďnaté ióny. Analýzou Fentonovej reakcie v prítomnosti meďnatých a železitých iónov pri pH 7,5 a 6,8 zlúčenina vykazovala prooxidačnú aktivitu a pri pH 5,5 a 4,5 antioxidačnú aktivitu. Látka vykazovala protektívnu aktivitu na ľudské erytrocyty v prítomnosti meďnatých iónov.

Kľúčové slová: chelatácia, meď, železo, zinok, kobalt, vápnik, horčík, flavonoid

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Aneta Středanská

Supervisor: prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., PhD.

Consultant: Zuzana Lomozová, Pharm.D., PhD.

Title of thesis: Interactions of 7,8-dihydroxyflavone with physiological metals

7,8-dihydroxyflavone belongs to the phenolic substances collectively referred to as flavonoids. Flavonoids are bioactive components abundantly distributed in the daily diet with the ability to modulate health and disease through miscellaneous mechanisms including their antioxidant activity. However, they can also exhibit prooxidative effects under certain conditions. Due to this fact, which is related to individual factors, i.e. presence of various substitutions on the flavonoid come, it is therefore essential to understand the redox behavior based on the relationship between structure and effect and to understand their physiological, pharmacological and thus also potential toxic properties.

The interaction with physiological metals is determined by the structure of the molecule through the dihydroxy moiety in positions 7 and 8. These mentioned metals are essential for many biochemical processes in biological systems. Their homeostasis is strictly regulated in the human body and disruption of this balance can lead to the development of various pathophysiological states.

This thesis presents flavonoids and physiological metals from a theoretical point of view, where we have used current literature to obtain relevant knowledge. In the practical part of the thesis, we focused on their effects, especially in terms of redox processes. Specifically, we investigated the chelating ability of 7,8-dihydroxyflavone with iron, copper, cobalt, zinc, magnesium and calcium by using competitive methodology and the reduction ability of this substance to ferric and copper ions. Furthermore, we observed the influence of the substance on iron and copper-initiated

Fenton reaction. We tested the effect of this flavone on copper-initiated lysis of red blood cells.

In conclusion, we found that 7,8-dihydroxyflavone is able to chelate ferrous ions most efficiently and reduce copper ions more effectively. By analysing the Fenton reaction in the presence of copper and ferric ions at pH 7.5 and 6.8, the compound shows pro-oxidant activity whereas at pH 5.5 and 4.5 antioxidant activity. The substance has protective activity on human erythrocytes in the presence of copper ions.

Key words: chelation, copper, iron, zinc, cobalt, calcium, magnesium, flavonoid

OBSAH

1	ZOZNAM SKRATIEK	11
2	ÚVOD	13
3	TEORETICKÁ ČASŤ	14
3.1	Flavonoidy.....	14
3.2	7,8-dihydroxyflavón.....	17
3.3	Biogénne kovy	19
3.3.1	Vápnik.....	21
3.3.2	Kobalt.....	25
3.3.3	Meď.....	28
3.3.4	Železo.....	31
3.3.5	Horčík	39
3.3.6	Zinok.....	43
3.4	Oxidačný stres – Fentonova reakcia	47
4	CIELE PRÁCE.....	49
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	50
5.1	Experimentálne stanovenie chelatácie a redukcie iónov.....	50
5.1.1	Chelatácia vápenatých a horečnatých iónov (Ca^{2+} a Mg^{2+}).....	52
5.1.2	Chelatácia kobaltnatých iónov (Co^{2+}).....	55
5.1.3	Chelatácia meďnatých iónov s HEM (Cu^{2+}).....	57
5.1.4	Chelatácia meďných iónov s BCS (Cu^{1+}).....	60
5.1.5	Chelatácia meďnatých iónov s BCS (Cu^{2+}).....	63
5.1.6	Redukcia meďnatých iónov s BCS (Cu^{2+}).....	66
5.1.7	Chelatácia železnatých iónov (Fe^{2+}).....	68
5.1.8	Chelatácia železitých iónov (Fe^{3+}).....	71
5.1.9	Redukcia železitých iónov (Fe^{3+})	74
5.1.10	Chelatácia zinočnatých iónov (Zn^{2+})	77

5.2	Vplyv 7,8-DHF na meďou a železom katalyzovanú Fentonovu reakciu.....	80
5.2.1	Chemikálie	80
5.2.2	Prístrojové vybavenie	80
5.2.3	Materiál potrebný na prevedenie	81
5.2.4	Metodický postup experimentu	81
5.3	Vplyv 7,8-DHF na meďou katalyzovanú hemolýzu	85
5.3.1	Chemikálie	85
5.3.2	Prístrojové vybavenie	86
5.3.3	Materiál potrebný na prevedenie	86
5.3.4	Metodický postup experimentu	86
5.4	Matematicko-štatistické spracovanie výsledkov	90
5.4.1	Experimentálne stanovenie chelatácie a redukcie iónov	90
5.4.2	Vplyv 7,8-DHF na meďou a železom katalyzovanú Fentonovu reakciu..	90
5.4.3	Vplyv 7,8-DHF na meďou katalyzovanú hemolýzu.....	91
6	VÝSLEDKY	92
6.1	Experimentálne stanovenie chelatácie a redukcie iónov.....	92
6.1.1	Chelatácia vápenatých a horečnatých iónov (Ca^{2+} a Mg^{2+}).....	92
6.1.2	Chelatácia kobaltnatých iónov (Co^{2+}).....	93
6.1.3	Chelatácia meďnatých iónov s HEM (Cu^{2+}).....	94
6.1.4	Chelatácia meďných a meďnatých iónov s BCS (Cu^{1+} a Cu^{2+}).....	95
6.1.5	Redukcia meďnatých iónov s BCS (Cu^{2+}).....	96
6.1.6	Chelatácia železnatých iónov (Fe^{2+})	98
6.1.7	Chelatácia železitých iónov (Fe^{3+}).....	99
6.1.8	Vyhodnotenie stability komplexov 7,8-DHF s kovovými iónmi.....	101
6.1.9	Redukcia železitých iónov (Fe^{3+})	102
6.1.10	Chelatácia zinočnatých iónov (Zn^{2+})	103
6.2	Vplyv 7,8-DHF na meďou a železom katalyzovanú Fentonovu reakciu.....	105

6.3	Vplyv 7,8-DHF na meďou katalyzovanú hemolýzu	107
7	DISKUSIA	108
8	ZÁVER	112
9	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	113

1 ZOZNAM SKRATIEK

7,8-DHF	7,8-dihydroxyflavón
2,3-DHBA	kyselina 2,3-dihydroxybenzoová (z angl. 2,3- dihydroxybenzoic acid)
2,5-DHBA	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (z angl. 2,5- dihydroxybenzoic acid)
BCS	disodná soľ bathokuproindisulfónovej kyseliny (z angl. bathocuproinedisulfonic acid disodium salt)
BDNF	mozgový neurotrofický faktor (z angl. brain-derived neurotrophic factor)
CC	o-kresolftalein komplexon (z angl. oresolphthalein complexone)
CoA	koenzým A (z angl. coenzyme A)
CYP 450	cytochróm P 450 (z angl. cytochrome P 450)
DMSO	dimetylsulfoxid
GIT	gastrointestinálny trakt
HA	hydroxylamín hydrochlorid (z angl. hydroxylamine hydrochlorid)
HEM	hematoxylín
HEPES	4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínétansulfónová kyselina (z angl. 4-(2- hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid)
HPLC	vysoko účinná kvapalinová chromatografia (z anfl. high performance liquid chromatography)
IL-6	interleukín-6
LDH	laktátdehydrogenáza (z angl. lactate dehydrogenase)
Na₂EDTA	disodná soľ etyléndiamíntetraoctovej kyseliny (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt)
Na₂NFDSA	disodná soľ kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfónovej
NAD⁺/ NADH	nikotínnamidadenín dinukleotid (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide)
NADPH-oxidáza	nikotínnamidadenín dinukleotidfosfát oxidáza (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)
NaHEPES	sodná soľ HEPES

PPI	inhibítory protónovej pumpy (z angl. proton pump inhibitors)
RONS	reaktívne formy kyslíka a dusíka (z angl. reactive oxygen and nitrogen species)
ROS	reaktívne formy kyslíka (z angl. reactive oxygen species)
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometán (z angl. tris(hydroxymethyl)aminomethane)
TrkB	tyrozínkinázový receptor B (z angl. tropomyosin receptor kinase B)

2 ÚVOD

Flavonoidy sú zlúčeniny patriace do jednej z hlavných tried rastlinných sekundárnych metabolitov. Prirodzene sa vyskytujú v ovocí, zelenine a rastlinách, kde sa podieľajú na regulácii mnohých biologických funkcií vrátane podpory rastu, vývoja, ochrany pred stresovými faktormi a sfarbení kvetov, ktoré pomáha priťahovať opel'ovače. Tieto polyfenolické zlúčeniny majú pôsobivé antioxidantné, antiflogistické a antiproliferatívne účinky. Ich všeobecnú štruktúru tvorí 15 uhlíková kostra usporiadaná ako C6-C3-C6. V závislosti od ich štrukturálnej modifikácie sa flavonoidy delia do niekoľkých podrodín, a tým vykazujú rozdiely v biologických aktivitách (*Zhuang et al. 2023, Badshah et al. 2021, Kiyama et al. 2023*).

7,8-dihydroxyflavón je zlúčenina patriaca do tejto rozsiahlej skupiny prírodných látok, flavonoidov. Záujem o výskum tejto molekuly sa rozvinul od roku 2010, kedy sa zistila jeho agonistická aktivita k receptorom tropomyozín kinázy B (TrkB). Prostredníctvom tejto interakcie a svojej vlastnej antioxidantnej aktivity sa javí ako potenciálne sľubná terapeutická intervencia na klinickú liečbu neuropsychiatrických porúch. Môže významne ovplyvniť patologické charakteristiky neurodegeneratívnych ochorení protekciou a regeneráciou neurónov, útlmom neurozápalu a reguláciou synaptickej plasticity. Zlepšením kognitívnych funkcií, podporou pamäti a učenia sa tiež môže podieľať na progresii zlepšenia neurologických ochorení. Tento flavonoid predisponuje aj množstvom ďalších prospešných účinkov, avšak pre jeho budúce klinické použitie je nevyhnutné ďalšie testovanie molekuly v oblasti terapeutického potenciálu a bezpečnosti (*Kim et al. 2013, Chen et al. 2011, Yang et al. 2022, Paul et al. 2021*).

Pre správnu funkciu ľudského tela potrebujeme asi 20 prvkov, z ktorých 10 tvoria kovy. Všetky prirodzene sa vyskytujúce prvky majú svoju kľúčovú biologickú funkciu. Zúčastňujú sa mnohých biochemických reakcií a sú nezastupiteľné v niekoľkých štrukturálnych a funkčných úlohách. Je nevyhnutné, aby esenciálne prvky boli v tele v primeranom množstve resp. aby bola udržiavaná rovnováha. V prípade absencie alebo excesívneho množstva dochádza k rôznym patologickým stavom. Deficit, je stav, ktorému sa dá predchádzať alebo liečiť prostredníctvom suplementácie. Preťaženie musí byť včas rozpoznané a terapeuticky kontrolované (*Zoroddu et al. 2019, Fraga 2005, Slobodian et al. 2021*).

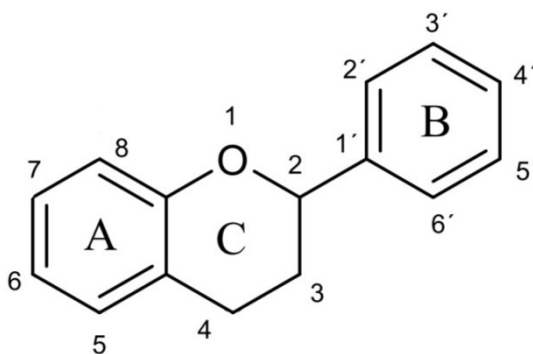
3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Flavonoidy

Flavonoidy sú prírodné zlúčeniny patriace do skupiny fenolických látok s charakteristickým žltým sfarbením (lat. *flavus* = žltý). V súčasnosti táto rozsiahla skupina sekundárnych metabolitov obsahuje viac ako 8 000 prirodzene sa vyskytujúcich molekúl (Jucá et al. 2020, Rakha et al. 2022, Slámová et al. 2018).

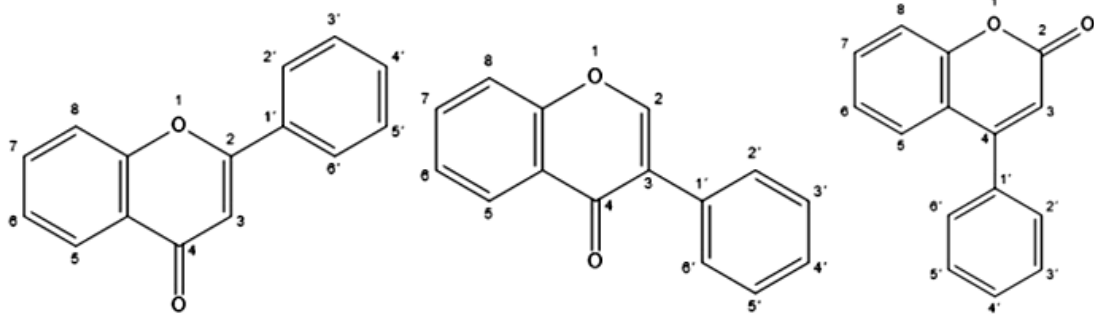
V rastlinnej ríši sú zúčastňujú na mnohých biologických procesoch vrátane regulácie rastu a vývoja, opelenia, tvorbe semien, zastávajú funkciu signálnych molekúl a v neposlednom rade ide o pigmenty dodávajúce farbu kvetom a plodom (žltú cez červenú až modrú). Flavonoidy poskytujú nevyhnutnú ochranu pred rôznymi biotickými a abiotickými stresmi (UV žiarenie, nízke teploty, sucho, ťažké kovy), mimo iné aj prostredníctvom inaktivácie reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Ide teda o detoxikačné činidlá a antimikrobiálne obranné latky nevyhnutné pre život rastlín (Zhuang et al. 2023, Ciumărnean et al. 2020, Park et al. 2022).

Základom ich štruktúry je 15-uhlíkový skelet (C6-C3-C6) tvorený dvomi fenylovými kruhmi (A a B) a jedným heterocyklickým kruhom (C) (**Obr. 1.**).



Obr. 1. Základná štruktúra flavonoidov s označením jednotlivých kruhov

Dôležitým biosyntetickým krokom je izomerizácia bočného fenyly. Substitúciou fenyly do polohy C₂ vznikajú flavonoidy (2-fenylchromén-4-ón), do C₃ izoflavonoidy (3-fenylchromén-4-ón) a C₄ neoflavonoidy (4-fenylkumarín) (**Obr. 2.**) (Kiyama et al. 2023, Zhuang et al. 2023, Ciumărnean et al. 2020).



Obr. 2. Chemická štruktúra flavonoidov (vľavo), izoflavonoidov (uprostred) a neoflavonoidov (vpravo)

Ďalšími modifikáciami ich základnej štruktúry prípadne obmenami funkčných skupín vzniká šesť podtriedy flavonoidov, ku ktorým patria flavóny, flavanóny flavonoly, flavanoly, anthokyanidíny a izoflavóny (*Park et al. 2022, Shamsudin et al. 2022*).

V prírode sú široko rozšírené najmä vo forme glykozidov. Bohaté zastúpenie majú v ovocí a zelenine, pričom denný príjem v každodennej strave predstavuje približne 1 g. Najbežnejším zdrojom sú čajové nápoje najmä zelený a bylinkové, ďalej káva a víno. Z ovocia sú vo vysokých množstvách prítomné v jablkách, hrozne, citrusových plodoch a v zelenine najmä červenej paprike, zeleri, cibuli. Z iných zdrojov napr. v kakau, sóji, orechoch a olivovom oleji (*Slámová et al. 2018, Peluso et al. 2015, Serafini et al. 2010, Aoi et al. 2021*).

Podľa epidemiologických štúdií pravidelná konzumácia potravy bohatej na flavonoidy je spojená s nižším výskytom rizika chronických ochorení a to najmä kardiovaskulárnych, neurodegeneratívnych a onkologických. Tieto prospešné účinky sa kedysi vysvetľovali ich antioxidačnou aktivitou. Novšie štúdie naznačujú, že flavonoidy predisponujú niekoľkými farmakologickými účinkami ako sú antibakteriálne, antifungálne, antivírusové, antiparazitárne, antidiabetické, estrogénne, imuno-odulačné, antiflogistické, vazodilatačné, protidoštičkové a antihistaminické. Avšak z celkového množstva objavených molekúl sa len minimálny počet látok využíva v klinickej v praxi, napr. v terapii chronickej venóznej insuficiencie hesperidín + diosmín, rutín a troxerutín. Pravdepodobne je to dôsledok veľmi nízkej perorálnej biologickej dostupnosti ich základnej nemodifikovanej formy. Flavonoidy sa stali dôležitými dietetickými zlúčeninami modulujúcim zdravie, ktoré predisponujú sľubným

terapeutickým potenciálom, avšak vyžadujú si ďalší podrobnejší výskum ich účinnosti a bezpečnosti (*Jucá et al. 2020, Kumar et al. 2013, Casili et al. 2021, Rabe et al. 2013, Zhuang et al. 2023, Rakha et al. 2022, Serafini et al. 2010, Peluso et al. 2015, Park et al. 2022, Aoi et al. 2021, Shamsudin et al. 2022, Vissenaekens et al. 2022, Kiyama et al. 2023, Badshah et al. 2021, Ciumărnean et al. 2020*).

3.2 7,8-dihydroxyflavón

7,8-dihydroxyflavón (7,8-DHF) patrí tiež medzi sekundárne metabolity rastlín. Tento prírodný flavón sa nachádza v rastlinách *Godmania aesculifolia*, *Tridax procumbens* a *Primula halleri*. Bohato je obsiahnutý aj v celej rastline *Lepisorus ussuriensis*, ktorá sa v tradičnej čínskej medicíne používa na detoxikáciu.

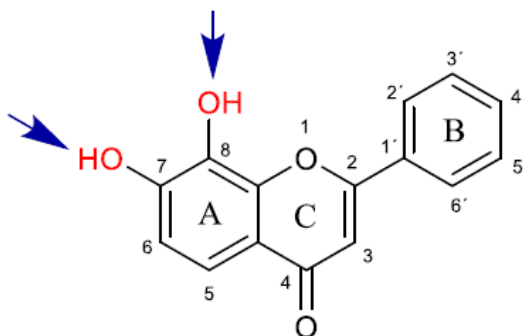
Štruktúrne pozostáva z O-heterocyklického kruhu prikondenzovaného na 7,8-dihydroxy aromatický kruh a fenylu v polohe 2 (**Obr. 3.**) (Kim et al. 2013, Yang et al. 2022, Choi et al. 2013, Liu et al. 2020).

V roku 2010 sa výskumom zistilo, že 7,8-DHF je schopný preniknúť hematoencefalickou bariérou a napodobňovať účinok mozgového neurotrofického faktoru (BDNF) selektívnou aktiváciou TrkB receptorov a tým chrániť neuróny. Na základe daného zistenia, ako vysokoafinitný agonista TrkB s malou molekulou, bol skúmaný jeho potenciál v modulácii patologických stavov, vrátane neuropsychiatrických, metabolických a kardiovaskulárnych (Yang et al. 2022, Zhao et al. 2021).

Konkrétne príklady terapeutického potenciálu z doterajších výskumov preukázali, že 7,8-DHF má antidepresívnu aktivitu, *in vitro* účinky proti obezite resp. antiadipogénny potenciál, vykazuje antidiabetické účinky zmiernením inzulínovej rezistencie vyvolanej obezitou, pôsobí hepatoprotektívne, cytoprotektívne pred poškodením genotoxickými látkami, u potkanov sa preukázala jeho vazorelaxačná a antihypertenzívna aktivita, zlepšuje motorický a kognitívny deficit v myšacom modeli Parkinsonovej, Alzheimerovej a Huntingtonovej choroby, zlepšuje motorickú výkonnosť na myšom modeli amyotrofickej laterálnej sklerózy, zmiernuje kardiálnu fibrózu vyvolanú ischemiou, potláča úbytok kostnej hmoty u potkanov po ovariektómii, inhibuje proliferáciu a indukuje apoptózu ľudských buniek osteosarkómu a chráni stratu pamäti spôsobenú alkoholom a stravou s vysokým obsahom tukov (Korkmaz et al. 2014, Pandey et al. 2020, Huai et al. 2014, Choi et al. 2016, Shin et al. 2023, Kumar et al. 2019, Kim et al. 2013, Li et al. 2016, Chen et al. 2011, Kinoshita et al. 2023, Paul et al. 2021, Hang et al. 2023, Xue et al. 2021, Zhao et al. 2021).

Mechanizmus jeho terapeutickej účinnosti v závislosti na štruktúre je daný základným farmakofórom molekuly, katecholovým usporiadaním. Pre interakciu resp. naviazanie 7,8-DHF na TrkB receptor je esenciálna fenolická hydroxylová skupina

v polohe C₈. Ďalším skúmaním bola dokázaná jeho vlastná antioxidačná schopnosť nezávislá od interakcie s TrkB receptorom, ktorá je zaistená uskupením hydroxylov v *ortho* polohe (**Obr. 3.**) (Chen et al. 2018, Yang et al. 2022, Zhang et al. 2009, Kang et al. 2015).



Obr. 3. Štruktúra 7,8-dihydroxyflavónu so zvýrazneným chelatačným miestom

Vo všeobecnosti, však, sú určité pochybnosti o skutočnej relevantnosti týchto účinkov, a tým aj o reálnom uplatnení v klinickej praxi a to najmä kvôli jeho nízkej orálnej biologickej dostupnosti v experimentoch na myšacích modeloch. Na viac, susedné dihydroxy uskupenie v kruhu A je náchylné na rýchlu metabolizáciu v pečeni vrátane metylácie, glukuronidácie a sulfatácie. Na druhej strane pri chronickej aplikácii na zvieracích modeloch sa neprejavila žiadna toxicita, čo dokazuje jeho adekvátnosť na predklinické skúmanie a vývoj vhodnej modifikácie pre zlepšenie biologickej dostupnosti (Chen et al. 2023, Chen et al. 2018, Paul et al. 2021, Yang et al. 2022).

3.3 Biogénne kovy

Biogénne kovy spolu so 6 základnými prvkami, C,H,O,N, P, S sú nevyhnutnou súčasťou biomolekúl. Vo všetkých živých systémoch sú komponentov nukleových kyselín, proteínov a biomembrán. Približne 20 prvkov je esenciálnych pre človeka, z toho asi 10 tvoria kovové prvky: draslík (K), sodík (Na), vápnik (Ca), horčík (Mg), ďalej sem patrí mangán (Mn), železo (Fe), kobalt (Co), meď (Cu), zinok (Zn) a molybdén (Mo), ktoré sú súhrnne označované ako stopové prvky (**Obr. 4.**) (Jomova et al. 2022, Moustakas 2021).

H											
Li	Be										
Na	Mg										
K	Ca										
Rb	Sr										
Cs	Ba										
		Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
		Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd
		Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg

Obr. 4. Časť periodickej tabuľky prvkov so zvýraznenými biologicky relevantnými kovmi. Zelene vyznačené prvky patria medzi esenciálne, ružové sú nevyhnutné pre niektoré formy života a oranžový Cr je dôležitý len pre určité biologické funkcie.

Prevzaté z: Jomova et al. 2022

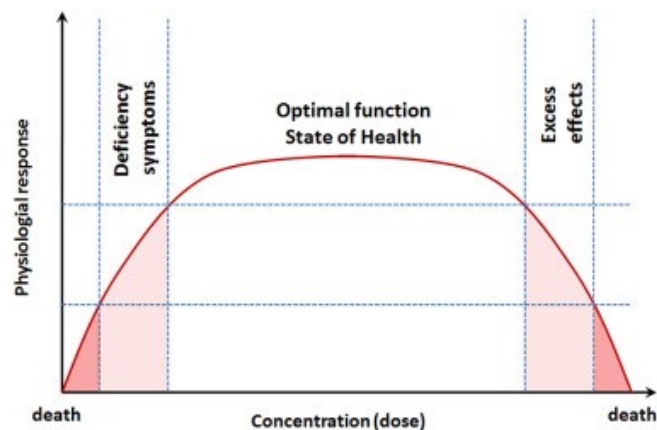
Všeobecne sa kovy delia podľa ich nevyhnutnosti v biologických systémoch na 2 kategórie: esenciálne a neesenciálne. Aby bol prvok zaradený medzi nevyhnutné pre život musí spĺňať určité podmienky:

- a) prítomnosť v ľudských tkanivách
- b) úplná absencia v organizme vedie k poškodeniu životných funkcií
- c) insuficienciu je možné normalizovať vhodnou suplementáciou prvku (Zoroddu et al. 2019, Slobodian et al. 2021).

Esenciálne, už podľa názvu, sú nutné pre udržanie homeostázy a zachovanie života rastlín, zvierat a ľudí. Zúčastňujú sa širokej škály biologických procesov, či už ako štruktúrna alebo funkčná opora. Tvoria nezastupiteľnú rolu v biochemických

reakciách, podieľajú sa na intra a intercelulárnej komunikácii, udržujú osmotický tlak a elektrický náboj. Sú potrebné pre správne pochody týkajúce sa párovania a stability nukleotidových báz a transkripcie DNA. V rastlinách sú nevyhnutné pre fotosyntetický pochod a prenos elektrónov. Celkovo prispievajú k správnej funkcii svalových a nervových buniek, srdca, mozgu a iných orgánov.

Nedostatok prípadne nadbytok týchto kovov sa spája s mnohými nepriaznivými zdravotnými účinkami. Toxicita závisí od množstva a druhu iónu. Absencia môže spôsobiť vážne poruchy, karcinogenitu až smrť. Ich prospešné pôsobenie je spojené so stopovými množstvami. Na druhej strane prekročenie prahovej koncentrácie, však, môže vyvolať toxicitu (**Obr. 5.**) (Moustakas 2021, Jomova et al. 2022, Fraga 2005, Slobodian et al. 2021).



Obr. 5. Diagram závislosti dávka – efekt esenciálnych prvkov. Diagram ukazuje základný Paracelsov princíp „dávka robí jed“ resp. závisí od koncentrácie prvku, aby sa prejavila toxicita.

Prevzaté z: Zoroddu et al. 2019

Neesenciálne nemajú žiadnu fyziologickú funkciu a sú pre organizmus toxické zvyčajne už v stopových množstvách. Veľmi často sú kontaminantami životného prostredia. Na molekulárnej úrovni sú chemicky podobné esenciálnym a tak môže dochádzať k narúšaniu biologických pochodov podobnými interakciami na cieľových štruktúrach. Príkladom je nahradenie esenciálnych kovových iónov neesenciálnymi v metaloproteínoch (Slobodian et al. 2021).

3.3.1 Vápnik

Vápnik tvorí najzastúpenejšie percento minerálov v našom tele, čo predstavuje asi 2 % telesnej hmotnosti, v absolútnych číslach približne 1200 g. Najviac, až 99 %, celkového vápnika je uložené vo forme hydroxyapatitu v zuboch a kostiach, kde tvorí rezervoár, dodáva im tuhosť a štruktúru. Zvyšné množstvo je lokalizované v telesných tekutinách a mäkkých tkanivách, t.j. v krvi a cytoplazmatických organelách. Frakcia, ktorá sa nepodieľa na opornej funkcii kostry má nezastupiteľnú úlohu v mnohých metabolických procesoch vrátane svalovej a vaskulárnej kontrakcie, transmembránového prenosu, hormonálnej funkcie, regulácie enzymatických pochodov a účasti na prenose nervových vzruchov. Zastáva rolu druhého posla, a tým zasahuje do mnohých bunkových pochodov napr. proteolýzy, apoptózy, autofágie, sekrécie neurotransmiterov a neurmodulátorov, enzymatickej aktivácie/deaktivácie cez fosforyláciu a defosforyláciu, agregácie trombocytov, transkripcie a iných (Martínez de Victoria 2016, Shkempi et al. 2021, Shlisky et al. 2022).

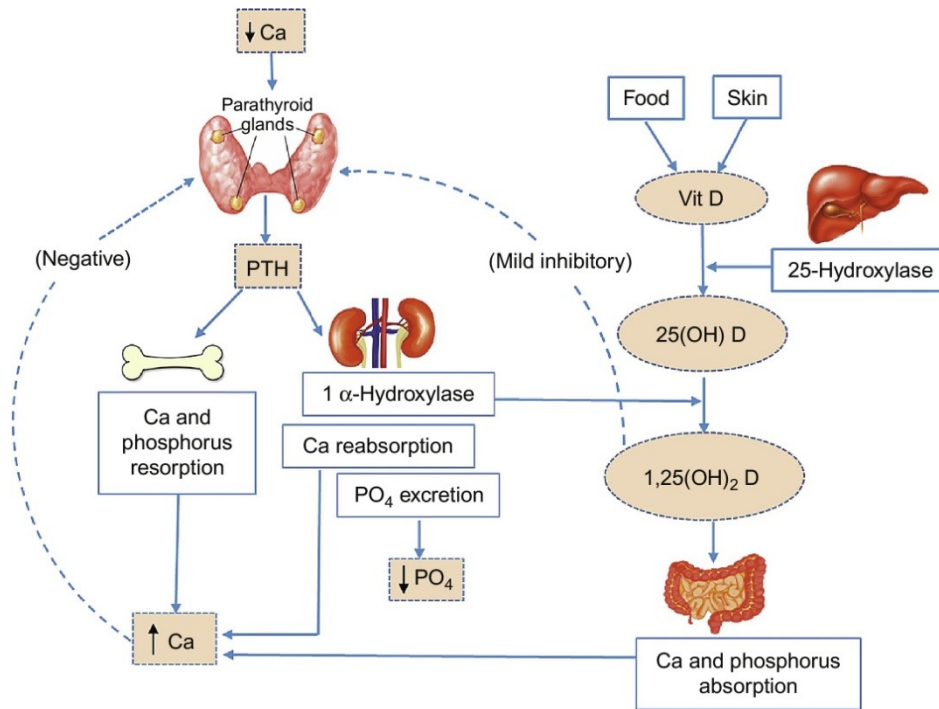
Niektoré živiny si ľudské telo dokáže vyrobiť, avšak mnohé nie, a preto je potrebné ich dodávať z exogénnych zdrojov resp. príjmom zo stravy. Adekvátne množstvo prijatého vápnika na deň pre dospelého sa pohybuje v rozmedzí od minima 600 mg do 1200 mg, pričom horná hranica je 2500 mg. Ženy nad 50 a muži nad 70 rokov by mali prijať 1200 mg/deň, počas tehotenstva je odporúčaná dávka 1300 mg/deň (Jomova et al. 2022, Fujita 2000, Shkempi et al. 2021).

Z potravy predstavuje najbohatšie zdroje mlieko (124 mg/100 g), mliečne výrobky (niektoré syry 1000 mg/100 g, jogurty, kefír, smotana a maslo), mäkkýše, kôrovce a ryby. Dve tretiny obsiahnutého vápnika v mlieku sú viazané na kazeín a zvyšok voľný. Vyšší obsah je zaznamenaný v semenách, obilninách (30 mg/100 g), strukovinách, orechoch a zelenine napr. brokolica, žerucha, a kel (100 – 150 mg/100 g). Množstvo vápnika v pitnej vode z kohútika prípadne v minerálnych vodách kolíše s určitou variabilitou. Táto forma zaisťuje vysokú dostupnosť, ale nižšie koncentrácie ako v mliečnych výrobkoch (Shkempi et al. 2021, Martínez de Victoria 2016).

Intestinálna absorpcia je jedným zo základných mechanizmov udržiavania homeostázy. Tenkým črevom sa absorbuje viac ako 90 % celkového prijatého vápnika, zatiaľ čo v hrubom čreve len približne 3 – 6 %, a to v závislosti od potreby vápnika. Vstrebávanie je zaistené prostredníctvom dvoch ciest: paracelulárny pasívny

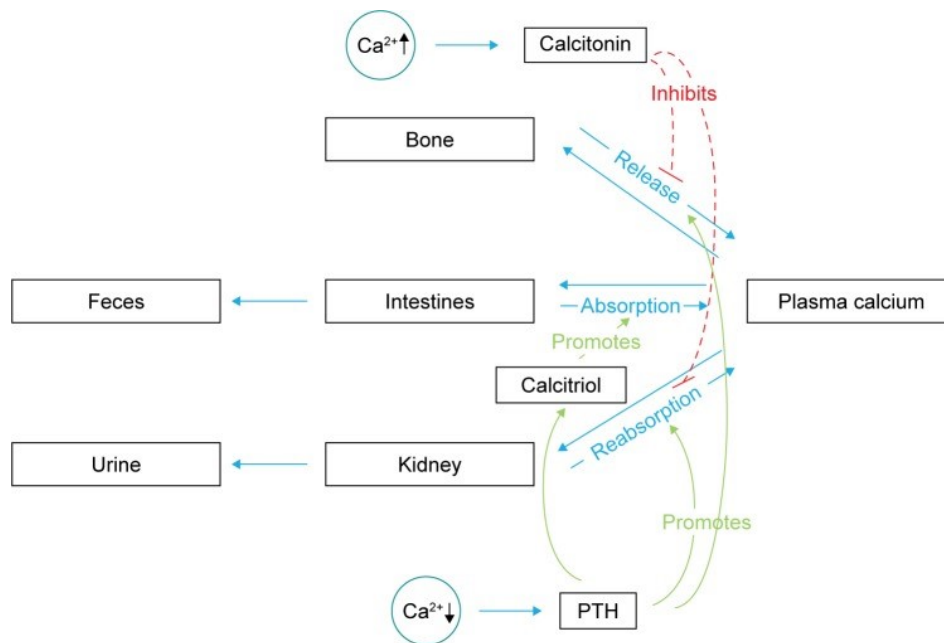
nesaturateľný transport a transcelulárny aktívny saturateľný transport. Paracelulárna difúzia prevláda pri zvýšenom príjme a transcelulárny je stimulovaný vitamínom D. Pred tým, ako dôjde k absorpcii, musí byť vápnik v ionizovanej forme Ca^{2+} , ku ktorej dochádza v kyslom prostredí žalúdka, prípadne je v danej forme prijatý potravou. V prípade väzby na proteíny, prevláda interakcia s albumínom. Nadmerné prijaté množstvo alebo neabsorbovaný sa eliminuje močom a stolicou (*Shkempi et al. 2021, Song 2017, Li et al. 2018*).

U zdravých jedincov sa plazmatická koncentrácia udržiava v úzkom rozmedzí 2,2 – 2,6 mmol/l a voľná ionizovaná forma 1,15 – 1,33 mmol/l, najmä prostredníctvom pôsobenia humorálnych regulátorov: vitamínu D_3 (1,25-dihydroxycholecalciferol), parathormónu a kalcitonínu. Udržovanie homeostázy sa zabezpečuje na úrovni črevnej absorpcie, renálnej exkrécie a mobilizácie alebo inkorporácie do kostnej hmoty. Parathormón z prištítnych teliesok zvyšuje reabsorpciu v obličkách a zároveň zvyšuje vylučovanie fosfátov do moču. V obličkách aktivuje enzým 1α -hydroxyláza, ktorý premieňa vitamín D na najaktívnejší metabolit, dihydroxyformu, a tým sa uľahčuje vstrebávanie vápniku a fosfátov z gastrointestinálneho traktu (GIT). Pri chronickom zvýšení parathormónu dochádza k vyššej resorpcii kostí a tým aj koncentrácii vápnika v sére. Naopak, keď hladina v sére stúpne, pôsobením kalcitonínu sa potláča uvoľnenie vápnika z kostí a znižuje sa reabsorpcia v obličkách (**Obr. 6.** a **Obr. 7.**) (*Song 2017, Shkempi et al. 2021, Li et al. 2018*).



Obr. 6. Schéma homeostázy vápnika. Keď hladina vápnika v sére klesne, zvýši sa uvoľňovanie parathormónu (PTH) z prištítnych teliesok, čo stimuluje renálnu reabsorpciu vápnika, vylučovanie fosfátu a produkciu 1,25-dihydroxycholecalciferolu resp. vitamínu D, ($1,25(\text{OH})_2 \text{D}$). Vedie tiež k resorpcii vápnika a fosfátu z kostí. Zvýšením produkcie vitamínu D v obličkách sa zvýši absorpcia vápnika v čreve. (Plná čiara – stimulácia a prerušovaná čiara – negatívna spätná väzba).

Prevzaté z: Song 2017



Obr. 7. Doplnujúca schéma homeostázy vápniku. Vápnik z potravy sa vstrebáva hlavne v tenkom čreve, v prípade nadmernej koncentrácie alebo neabsorbovaný sa vylučuje renálne alebo stolicou. Plazmatická hladina je udržiavaná prostredníctvom najmä už vyššie popísaného parathormónu a kalcitonínu. V prípade vyšších hladín vápnika v sére sa potláča jeho uvoľňovanie z kostí a znižuje reabsorpcia v obličkách prostredníctvom kalcitonínu.

Prevzaté z: Li et al. 2018

V priebehu života sa menia nároky na príjem potrebného množstva. V určitých etapách sa zvyšujú: aktívny rast (prvé roky a pubertálny rastový skok), ženy po menopauze a tehotenstvo. V prípade, ak homeostáza zlyhá, dochádza k rôznym patologickým zmenám ako dôsledok zmien hladiny tohto minerálu napr. neurodegeneratívne, neurologické, muskuloskeletálne poruchy, kardiomyopatie a iné.

Jedným z ochorení z nedostatku je osteoporóza. Ide o systémové metabolické ochorenie, ktoré znižuje kvalitu života. Zvyčajne sa vyskytuje, keď prevláda resorpcia kostí nad novotvorbou. Príčinou je nízka hustota kostnej hmoty a zhoršená mikroarchitektúra vedúca ku krehkosti a zvýšenému riziku fraktúr spôsobujúcich významnú imobilitu a mortalitu (Martínez de Victoria 2016, Li et al. 2018, Song 2017).

Hypokalcémia je jednou z najfrekvencovanejších porúch elektrolytovej rovnováhy, pri ktorej sérové hladiny celkového vápnika sú $< 2,12$ mmol/l. Môže byť spôsobená nedostatočným príjmom, zvýšenou stratou močom, hypoparatyreózou

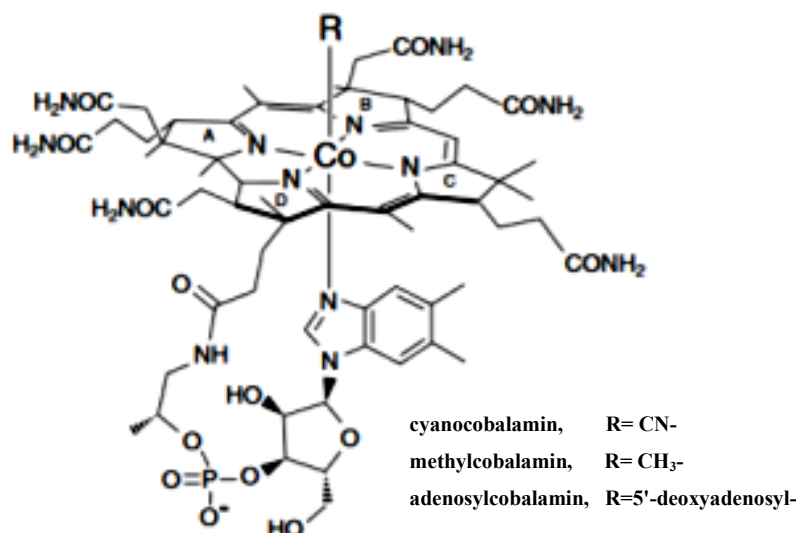
prípadne ťažkým deficitom vitamínu D, niektorými liekmi (diuretiká, inhibítory protónovej pumpy /PPI/, antiepileptiká, cisplatina, glukokortikoidy, antifungálne látky), ochoreniami obličiek a pečene spojené s nedostatkom vitamínu D a chelatačnou terapiou. Deficit býva asymptomatický alebo vyvoláva svalové zášklby, brnenie prstov, necitlivosť, periorálnu parestéziu a kŕče. Závažnejšia formou je karpopedálny spazmus, ktorý môže progredovať do tetánie, epileptických záchvatov, srdcových dysrytmii a iných kardiovaskulárnych ťažkostí (*Pepe et al. 2020, Fujita 2000, Jomova et al. 2022, Song 2017, Cooper et al. 2008*).

Prijateľná maximálna denná dávka v strave je daná na 2500 – 3000 mg pre dospelých, 2500 mg pre deti a 1000 – 1550 mg pre dojčatá. Príjem nad tieto množstvá zvyšuje riziko nežiaducich efektov. Jedným z nich je zápcha, ktorá postihuje len niektorých jedincov, ďalej môže dôjsť k hyperkalcémii, hyperkalciúrii až nefrolitiáze, kalcifikácii ciev a mäkkých tkanív a zásahu do vstrebávania zinku a železa.

Hyperkalcémia, je stav, kedy je hladina v krvi abnormálne zvýšená, t.j. > 2,6 mmol/l. Medzi symptómy patria polakiúria, polydypsia v dôsledku činnosti obličiek, bolesť a slabosť kostí, únava, malátnosť, neurologické a psychické poruchy (depresia, apatia, znížená koncentrácia), kardiovaskulárne následky (arytmie) a GIT poruchy (nevoľnosť a vracanie). Tento stav môže vzniknúť v prípade hyperparatyreózy, dehydratácie, zlyhania obličiek, účinkov liekov (distálne diuretiká napr. hydrochlorotiazid), intoxikácie vitamínom D, malignít pľúc, obličiek a prsníka a mnohočetného myelómu. Princípom hyperkalcémie navodenej nádorom sú zahrnuté 3 mechanizmy: sekrécia parathormónu a vitamínu D a osteolytické metastázy (*Weaver et al. 2019, Jomova et al. 2022, Song 2017*).

3.3.2 Kobalt

Kobalt je mikroživina zohrávajúca úlohu kofaktoru v 2 základných enzýmoch, metionínsyntáza a methylmalonyl-CoA mutáza. V tele sa najčastejšie vyskytuje ako centrálny atóm viazaný koordinačnou väzbou v makrocykle korríne v štruktúre vitamínu B₁₂. Podľa ligandu sa vitamín B₁₂ vyskytuje v niekoľkých kobalamínových formách: kyano- a hydroxy- (formy používané v terapii nedostatku vitamínu B₁₂ a intoxikácie kyanidmi), metyl- a 5'-deoxyadenosyl- (koenzýmy v mnohých metabolických pochodoch), (**Obr. 8.**) (*Yamada 2013, Okamoto et al. 2011, Jomova et al. 2022*).



Obr. 8. Štruktúra kobalamínu. Kostra molekuly je tvorená korrínovým kruhom s centrálnym atómom kobaltom. R predstavuje horný ligand, ktorý sa obmieňa a tvorí tak 3 základné štruktúry: kyanokobalamín (CN-), metylkobalamín (CH₃-) a adenosylkobalamín (5'deoxyadenosyl-). Dolný ligand, nukleotid, v axiálnej polohe je napojený na korrínovy kruh v časti označenej D cez fosfát a cez dimetylbenzimidazol koordinovaný na atóm kobaltu.

Prevzaté z: Yamada 2013

Doporučená denná dávka kobaltu pre dospelého je 2,4 µg, najnižšia zo všetkých esenciálnych kovov. Z celkového hľadiska sa teda deficit u človeka prakticky nevyskytuje. Priemerný príjem kobaltu zo stravy tvorí 5 – 45 µg Co/deň, pričom najvyšší obsah poskytujú ryby, zelenina (najmä v zelenej listovej) a čerstvé obilniny (0,2 – 0,6 µg Co/g čistej hmotnosti), kukuričné cereálie a zemiakové lupienky. Medzi ďalší významný zdroj patrí zvieracia pečeň (0,1 – 0,3 µg Co/g čistej hmotnosti). Tabak obsahuje asi 0,3 – 2,3 mg Co/kg. V pitnej vode sa vyskytuje vzácne aj to v nízkej koncentrácii v rozmedzí 0,1 – 5 µg Co/l. Mimo iného s kobaltom sa stretávame na každodennej baze v okolitom prostredí. Stopové množstvá sú v jazerách, riekach, podzemných vodách, pobrežných morských vodách, pôde a horninách aj v priemysle. V ovzduší sa vyskytuje buď ako prírodný zdroj po sopečnej erupcii, lesnom požiari, alebo sa do vzduchu dostane pomocou spaľovania fosílnych palív emisie motoru, fosfátových hnojív a spracovaním kobaltu. Vo forme vitamínu B₁₂ má hojné zastúpenie v živočíšnych produktoch: hovädzie, teľacie, kuracie a jahňacie mäso, vajcia, mlieko

a mliečne výrobky. Vajcia pokrývajú až 25 % dennú potrebu. Dobrým zdrojom sú aj ryby, mäkkýše a z rastlinnej stravy určité jedlé riasy a fermentované sójové bôby (*Yamada 2013, Barceloux 1999, Jomova et al. 2022, Watanabe et al. 2018, Gille et al. 2015*).

Absorpcia požitého kobaltu prebieha v tenkom čreve a mení sa v závislosti od formy, podanej dávky, času posledného jedla a množstva železa v GIT. Kobalt vykazuje čiastočnú chemickú a fyziologickú podobnosť so železom, teda pravdepodobný mechanizmus vstrebávania je transport zdieľaný so železom. V menšej miere sa vstrebáva cez kožu a v prípade vdychnutia aj pľúcami. Najvyššie koncentrácie kobaltu v ľudskom tele sú v pečeni, srdci a obličkách. Menšie množstvo sa vyskytuje aj v mozgu a pankrease. Soli kobaltu sa zúčastňujú syntézy erythropoetínu tvoreného v obličkách, ktorý je nutný pre stimuláciu krvotvorby resp. erytrocytov v kostnej dreni. Hlavným eliminačným orgánom sú obličky (*Leggett 2008, Barceloux 1999, Jomova et al. 2022*).

Nedostatok priamo súvisí s narušenou tvorbou vitamínu B₁₂ a vedie k hematologickými, neurologickými a psychiatrickými prejavom (perniciózna anémia, neuropatie, parestézie, demencia, depresia až psychóza). Priamy deficit kobaltu ma za následok zníženú funkciu štítnej žľazy a vrodené chyby (*Jomova et al. 2022, Gille et al. 2015, Oh et al. 2003*).

Preťaženie kobaltom je menej časté a symptómy sú relatívne mierne v porovnaní s intoxikáciou inými redoxne aktívnymi kovmi. Pre živé bunky sú ióny kobaltu vo vyšších dávkach toxické a spájajú sa s rôznymi ochoreniami. Toxicita kobalamínu je výrazne nižšia ako voľného iónu kvôli korrínovému kruhu brániacemu väzbe iónu na nefyziologické miesta. Symptómy sú spojené podľa cesty kontaktu zlúčeniny s telom (ingescia, inhalácia, dermálna cesta): kontaktná dermatitída, pneumónia, alergická astma až karcinóm pľúc. Hlavným zdrojom intoxikácie sú elektrochemické závody, kde sú pracovníci vystavení zlúčeninám s obsahom kobaltu, a tým sa zvyšuje riziko vzniku rakoviny pľúc. Ako jeden z redoxne aktívnych kovových iónov, ktorý katalyzuje tvorbu ROS interferuje s opravou DNA a spôsobuje jej poškodenie. Ide o tzv. Fentonovu reakciu katalyzovanú kobaltom, ktorou sa podieľa na oxidačnom strese vyvolávajúceho mnohé ochorenia (**viď kap. 3.4**). Najväčšie riziko predstavuje súťaženie s ostatnými biologickými iónmi kovov o väzbu na makromolekuly, kde zaujme miesto fyziologického iónu, a tak inhibuje správnu funkciu. Jeden z príkladov enzýmu, kde

môže dôjsť k zámene Zn za Co je alkoholdehydrogenáza. Súperenie kobaltu a železa je obzvlášť významné, pretože majú rovnaké biologické oxidačné stavy (2+/3+), čo uľahčuje nesprávne zabudovanie. Mimo iné zasahuje do metabolizmu jódu a vedie k abnormálnej funkcii štítnej žľazy (*Okamoto et al. 2011, Jomova et al. 2022*).

3.3.3 Med'

Med' je ďalší stopový prvok nevyhnutný pre život ľudí a zvierat. Tento prechodný kov je kofaktorom mnohých redoxných enzýmov, pričom ceruloplazmín je najfrekvencovanejší Cu-dependentný ferroxidázový enzým podieľajúci sa na fyziologickej kinetike železa v organizme. Účastní sa mnohých biologických procesov napr. fotosyntézy, tvorbe spojivového tkaniva, na bunkovom dýchaní, syntézy hemoglobínu a neurotransmitterov. Okrem toho sa podieľa na mnohých neurologických funkciách, imunitnej a antioxidačnej obrane resp. zachytávaní voľných radikálov. Typické oxidačné stavy molekúl sú +1 a +2 (*Bost et al. 2016, Jomova et al. 2022, Myint et al. 2018*).

Túto nevyhnutnú mikroživinu prijímame len v stopových množstvách a náš organizmus obsahuje asi 100 mg medi. Doporučené množstvo pre dospelých tvorí 2 – 3 mg/deň. Vyššiu odporúčanú dávku ako dospelí majú deti, tehotné ženy a dojčatá. Obsah v potravinách sa mení na základe miestnych podmienok, použitia hnojív, medi ako fungicídu a baktericídneho činidla a lokalizácie priemyslu. Zdroje, ktoré vo zvýšenej miere obsahujú med' zahŕňajú orechy, vnútornosti, v menšej miere chlieb, obilniny, ovocie a zelenina. Medzi ďalšie zdroje patria kôrovce (mäkkýše, homár, krab), kakao a huby. Nízke koncentrácie sú obsiahnuté aj v mlieku a mliečnych výrobkoch. Množstvo v pitnej vode je premenlivé v závislosti od zloženia podzemnej vody a vodovode v domácnostiach (*Bost et al. 2016, Myint et al. 2018*).

Prijatá med' z potravy sa primárne vstrebáva v proximálnej časti tenkého čreva, dvanástniku, kde prebieha následný transport do pečene cez *venae portae*. Rýchlosť absorpcie z potravy závisí na niekoľkých premenných: veku, type potravy, pohlaví, na množstve obsahu v potrave. Tieto parametre spôsobujú kolísanie absorpcie medzi 12 a 71 %. V štúdiách sa zistilo, že vyššia vstrebateľnosť je u žien, a nebola ovplyvnená užívaním hormónov. U dojčiat je vyššia ako u dospelých, ale rozdiel medzi mladými dospelými a seniormi nebol výrazný. Po črevnej absorpcii dochádza k vychytávaniu pečenu (75 %), kde sa následne uskladňuje v hepatocytoch, ústredni metabolizmu

medi. Zvyšok putuje do periféria viazané na albumín. Existuje niekoľko ciest eliminácie, pričom urinárna je zanedbateľná v porovnaní s exkréciou do žlče. Malé množstvo medi sa vylučuje potom, kožným epitelom, slinami a u žien sa stráca počas menštruácie (*Liu et al. 2013, Bost et al. 2016, Myint et al. 2018*).

Narušená rovnováha, či už deficit, prípadne preťaženie, má za následok rôzne poruchy. Príkladom narušeného metabolizmu medi sú 2 vrodené choroby: Menkesova choroba, t.j. deficit medi, a naopak, toxikóza z prebytku medi známa ako Wilsonova choroba.

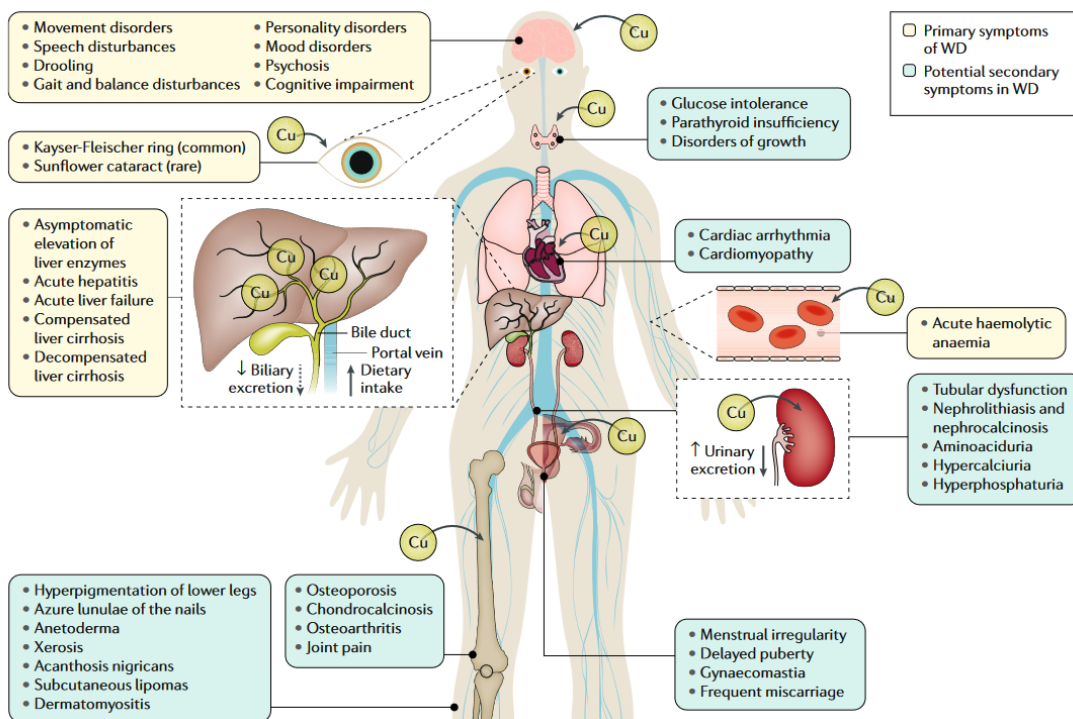
S nedostatkom sa stretávame menej častou ako s toxickými dávkami. Deficit počas *in utero* vývoja môže spôsobiť narušenie kardiovaskulárneho systému, kostného vývoja (malformácie), a postupne aj neurologické a imunologické abnormality. V dospelosti nedostatok spôsobuje narušenie metabolizmu cholesterolu. Deficit môže nastať z niekoľkých príčin: predčasne narodené deti s nízkou pôrodnou hmotnosťou, podvyživené dojčatá, parenterálna výživa bez suplementácie medi, malabsorpčný syndróm a vegetariáni kvôli nižšej biologickej dostupnosti z rastlinnej stravy. Medzi sekundárne príčiny zaraďujeme vysoký príjem Zn, terapiu chelatačnými látkami, operácie v oblasti GIT. Klinické príznaky sú rôznorodé od hematologických (nedostatok krvných elementov) po neurologické (neuropatie), vrátane osteoporózy, fraktúr a malformácií kostí. Ďalšie štádium vedie k abnormálnemu metabolizmu glukózy a cholesterolu, zhoršenej produkcii energie, narušenej syntéze neuropeptidov, kardiomyopatiám, zvýšenému oxidačnému poškodeniu a negatívnym účinkom na imunitný systém (*Bost et al. 2016, Jomova et al. 2022, Stern et al. 2007, Scheiber et al. 2013, Stern et al. 2007, Uriu-Adams et al. 2005*).

Menkesova choroba, X-viazaný hlboký nedostatok medi, vzniká mutáciou génu (ATP7A) kódujúceho Cu^{2+} -transportujúcu ATPázu. Medzi základné príznaky patrí neurologická degenerácia, porucha hematopoetického systému, hypopigmentácia kože a vlasov, hypotermia, mentálna retardácia, abnormality kože, tepien, spojivového tkaniva a vlasov tzv. „choroba kučeravých vlasov“ (krehké a krivé) a iné. Úmrtnosť je na začiatku detstva. Aj pri včasnej diagnóze a liečbe je fatálna zvyčajne do 10. roku života. (*Jomova et al. 2022, Stern et al. 2007*).

Vysoké dávky medi spôsobujú toxicitu, ktorá je spojená s oxidačno-redukčnými reakciami Fentonového typu spôsobujúce oxidačný stres až bunkovú smrť (**vid' kap. 3.4**). Akútna intoxikácia sa spája s náhodným požitím alebo so samovražednými

sklonmi, kedy dávka často presahuje 20 g. U týchto pacientov sa vyskytovali symptómy zahrňujúce nauzeu, vracanie, bolesť hlavy, brucha, hnačku, letargiu, tachykardiu, hemolytickú anémiu, GIT hemorágiu, hematúriu, dýchacie ťažkosti, zlyhávanie eliminačných orgánov až smrť. Prejavy otravy môžu nastať aj po pôsobení medi dermálne a na dýchacie cesty (*Bost et al. 2016, Uriu-Adams et al. 2005, Scheiber et al. 2013, Stern et al. 2007*).

Wilsonova choroba je autozomálne recesívne ochorenie, tzv. toxikóza z prebytku medi. Dochádza ku genetickému defektu transportného proteínu, ktorý uľahčuje exkréciu medi žlčou. Med' sa hromadí v pečeni a v mozgu, v menšej miere aj v iných orgánoch. Po nadmernej kumulácii v hepatocytoch dochádza k lýze a uvoľnený kov sa hromadí v extrahepatálnych tkanivách (oči, obličky, nervový systém). Najčastejšie prejavy preťaženia zahŕňajú hepatálnu, psychiatrickú, neurologickú, skeletálnu, renálnu a endokrinologickú symptomatológiu (**Obr. 9.**). Ak je ochorenie diagnostikované včas a začne sa s okamžitou liečbou, pacienti môžu žiť normálny život. Stáva sa smrteľným, pokiaľ sa nezahájí vhodná terapia na odstránenie nadbytku kovu z tela. Využíva sa chelatačná terapia alebo podávanie zinku, ktorý blokuje vstrebávanie medi. Liečba zahŕňa aj diétu s vylúčením potravín s vysokým obsahom, napr. ustrice, čokoláda a huby (*Stern et al. 2007, Scheiber et al. 2013, Uriu-Adams et al. 2005*).



Obr. 9. Toxicita medi v patogenéze Wilsonovej choroby. Med' prijatá z potravy (Cu) sa transportuje cez portálnu žilu, kde prebieha systémová homeostáza Cu. Zhoršením biliárnej exkrécie v patológii Wilsonovej choroby dochádza k akumulácii Cu v pečeni. Po vyčerpaní kapacity pečene sa nadmerné množstvo Cu dostáva do systémového obehu a hromadí sa v rôznych extrahepatálnych tkanivách (rohovka, mozog, erytrocyty, kostrové a srdcové bunky, synoviálna membrána veľkých kĺbov a renálny parenchým.), kde spôsobuje toxicitu. Primárne klinické prejavy sú spojené s akumuláciou Cu v pečeni, očiach a mozgu. Voľná med' je eliminovaná močom.

Prevzaté z: Czlonkowska et al. 2018

3.3.4 Železo

Železo je kľúčový prvok pre bunky uľahčujúci mnohé chemické reakcie nevyhnutné pre život. Tento kov funguje ako kofaktor v enzýmoch, metaloproteínoch, zodpovedných za nespočetné množstvo pochodov využívajúcich jeho redoxnú flexibilitu Fe^{2+}/Fe^{3+} . Klastre železo-síra (Fe-S) často tvoria aktívne centrá v enzýmoch zodpovedných za prenos elektrónov a tvorbu energie pri mitochondriálnom dýchaní a cykle kyseliny citrónovej (dehydratázy, oxidoreduktázy napr. xantinoxidáza, akonitáza a sukcinát dehydrogenáza). Tvoria súčasť hémových (cytochrómy, peroxidázy, katalázy a i.) aj nehemových enzymatických systémov vo forme železo-oxo

klaster (ribonukleotidreduktáza) alebo Fe-S klaster. Ako zložka erytrocytov vo forme hemoglobínu je potrebné pre transport kyslíka v tele a odvod oxidu uhličitého z tkanív do pľúc. Vo svaloch je zase za dodanie a ukládanie kyslíka zodpovedný myoglobín. Na molekulárnej úrovni zasahuje do bunkových katabolických a anabolických procesov napr. syntézy DNA, RNA a proteínov, bunkovej proliferácie, diferenciácie a regulácie génovej expresie.

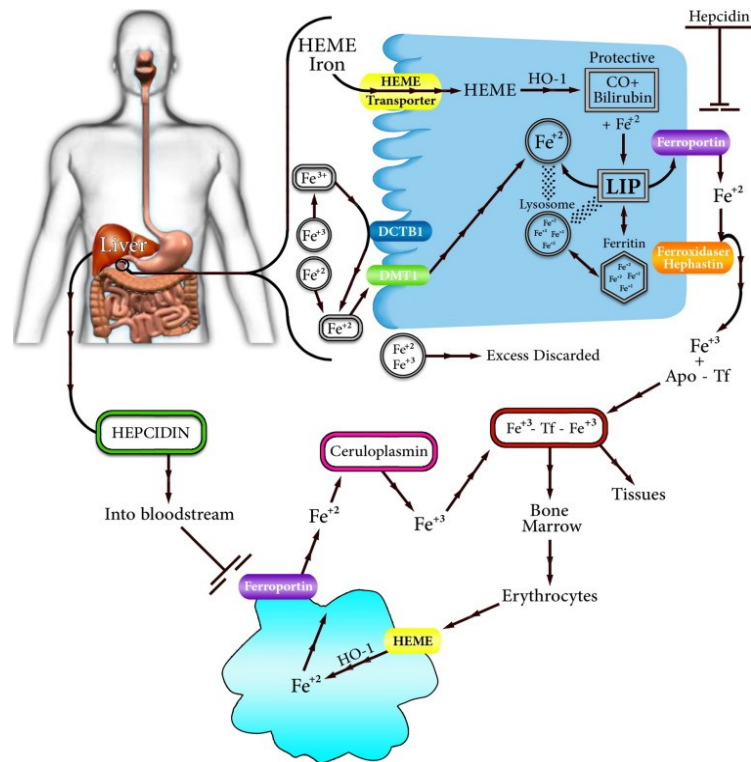
Celkový obsah železa v tele sa pohybuje v rozmedzí 3,5 – 5 g z toho 2,5 g tvoria erytrocyty, asi 1 g je uložený v pečeni, ostatné tkaniva napr. svaly obsahujú asi 0,3 g a cirkulujúce v podobe transferínu je nízke približne 3 – 4 mg (*Zeidan et al. 2021, Eid et al. 2017, Nairz et al. 2020, Geissler et al. 2011, Lieu et al. 2001, Bennett et al. 2019, Papanikolaou et al. 2005, Chifman et al. 2014, Mwangi et al. 2018, Jomova et al. 2022*).

Železo je nevyhnutné prijímať z potravy (8 mg/deň muži, 18 mg/deň premenopauzálné ženy a 27 mg/deň tehotenstvo), kde sa najčastejšie vyskytuje v dvoch formách, hémové a nehémové. Nehémové sa hojne vyskytuje v rastlinnej strave (ovocie, zelenina, semená, orechy a obilniny), doplnkoch a v potravinách obohatených železom. Vyskytuje sa buď v železitej forme, alebo vo viac biologicky dostupnej, železnej forme, ktorá je rozpustnejšia vo vodnom prostredí. Kľúčovú úlohu zohráva žalúdočná kyselina (nízke pH 1 – 2), ktorá uľahčuje premenu menej rozpustného trojmocného železa na rozpustnejšiu formu. Hémové železo, viazané na porfyrínový kruh, prijímame z mäsitej stravy, pečene, morských plodov, rýb a hydiny. Po spracovaní má najvyšší obsah hovädzie mäso > bravčové mäso > ryba > kuracie mäso. V porovnaní s nehémovým má vyššiu biologickú dostupnosť (20 – 40 %), vstrebávanie je teda efektívnejšie a menej ovplyvnené zložením stravy a inými faktormi. Ďalším determinantom absorpcie je potreba v organizme, v prípade deficitu sa vstrebáva viac. Hlavnými inhibítormi vstrebávania sú iné ióny (vápnik, zinok a i.), fytáty v strukovinách a obilninách, fenolické zlúčeniny v čaji a káve, vo všeobecnosti flavonoidy, taníny a niektoré proteíny. Najdôležitejším zosilňovačom je vitamín C vďaka jeho redukčnej sile a tvorbe stabilného železo-askorbátového chelátu. V mnohých krajinách sú bežné potraviny obohatované železom, aby sa zabránilo nedostatku. Delia sa na dve kategórie: zamerané na pacienta resp. rizikovú populáciu a pre všeobecnú populáciu. Príkladom takýchto potravín a surovín pre prípravu jedál sú: dojčenská výživa a príkrmy, soľ, sójová omáčka, ryža, výrobky z obilnín (pšeničná a kukuričná múka, cereálie, chleby,

sušienky), mliečne výrobky, krmivá pre sliepky pre zvýšený obsah vo vajčkách a cukrovinky. Na prekonanie nepríjemných organoleptických vlastností sa využívajú nové postupy ako enkapsulácia a chelatácia (Zeidan et al. 2021, Geissler et al. 2011, Man et al. 2022, Pasricha et al. 2021, Dutt et al. 2022, Fairweather-Tait et al. 2021, Percy et al. 2017, Jomova et al. 2022).

Kinetiku železa delíme na niekoľko základných krokov: transport z potravy tráviacim traktom, vstup a výstup do/z enterocytov a makrofágov do obehu, transport v krvnom obehu, vstup do buniek a intercelulárne pochody na jeho využitie. Primárne sa vstrebáva v proximálnej časti tenkého čreva, dvanástniku a hornom jejúne. Hemoglobín a myoglobín prijatý z mäsitej stravy sa trávi za uvoľnenia hémovej formy železa. Tá sa následne vstrebáva cez transportér na apikálnej strane enterocytu doteraz neznámym mechanizmom. Po vstupe sa degraduje hemoxygenázou za uvoľnenia anorganickej formy. Nehémové trojmocné železo sa pred absorpciou redukuje pomocou kyseliny chlorovodíkovej, vitamínu C a najmä ferrireduktázami (cytochróm b duodenálna reduktáza) na prednostne vychytávané Fe^{2+} . Do enterocytov vstupuje cez transportér so širokou špecifitou (aj pre iné dvojmocné ióny) tzv. divalentný kovový transportér. Ďalšia cesta závisí od dopytu v organizme, buď sa uchováva vo forme ferritínu v enterocyte alebo sa využíva na bunkové procesy závisle od železa prípadne sa transportuje bazolaterálnou stranou do krvného obehu. Pre export cez ferroportín (nachádza sa aj v makrofágoch, hepatocytoch a placentе) a následnú inkorporáciu na transferín je potrebná reoxidácia Fe^{2+} na Fe^{3+} pomocou multimedenej ferroxidázy, hefaestínu, naviazanej na membráne alebo alternatívne sérovým ceruloplazmínom (sú homologické). Trojmocné železo ma vysokú afinitu k transferínu, čo znamená, že v plazme nie je takmer žiadne voľné železo. Komplex sa distribuuje do tkanív regulovaným spôsobom cez väzbu na tranferínový receptor. Nasleduje internalizácia endocytózou, kde v kyslom prostredí endozómu sa uvoľní železo, redukuje sa transmembránovou metaloreduktázou, prejde do cytoplazmy transportérom a receptor aj transferín sa znovu recykluje na povrch bunky. V cieľovej bunke sa podobne ako v enterocyte (aj v makrofágoch) využíva na metabolické účely (syntéza hému a klastrov Fe-S importom do mitochondrii) alebo uloženie do zásoby (ferritín). Z celkového obratu transferínu sa až 80 % transportuje do kostnej drene na erytropoézu. Ferritín slúži ako rezervoár železa pre budúci dopyt, pričom najvyššia zásobáreň je v pečeni, ale aj v kostnej dreni a slezine. Ľudské telo denne využije asi 30 mg železa na erytropoézu a iné pochody, pričom strava pokrýva iba 1 – 2 mg. Väčšina dennej potreby je

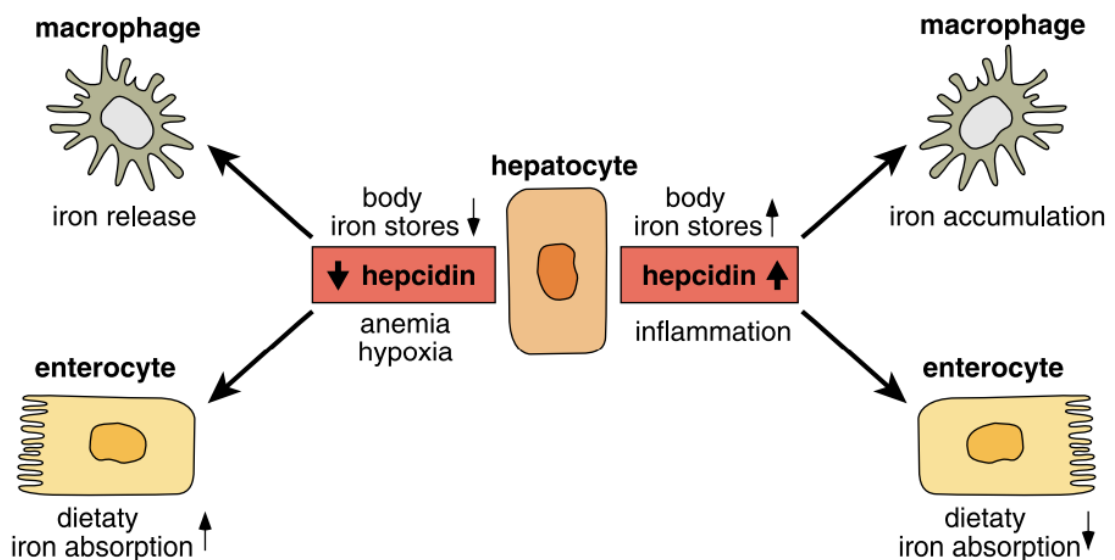
zabezpečená recykláciou starnúcich a poškodených erytrocytov retikuloendotelovými makrofágmi prevažne v slezine. Vo fagolyzozómoch sa rozložia na jednotlivé zložky, ktoré sa ďalej využijú napr. železo sa cez ferroportín exportuje do plazmy, naviaže na transferín a distribuuje sa po tele. Ľudské telo nemá žiadnu aktívnu cestu exkrécie železa. Pasívne strácame 1 – 2 mg/deň najmä odlupovaním črevného epitelu, deskvamáciou kožných buniek a ženy menštruáciou. Menšiu časť strácame močom, potom a vlasmi alebo v špecifických prípadoch ako laktácia a tehotenstvo. Homeostáza sa udržiava na úrovni regulácie absorpcie a recyklácie makrofágmi pomocou osi hepcidín/ferroportín (**Obr. 10.**).



Obr. 10. Globálny prehľad kinetiky železa v ľudskom organizme. Železo sa vstrebáva v tráviacom trakte enterocyty. Transport elementárneho železa vo forme Fe^{2+} prebieha cez membránový proteín, transportér divalentného kovu 1 (DMT1). Membránovo viazaná ferroxidáza (Dctb1, cytochróm b duodenálna reduktáza) môže previesť Fe^{3+} na formu Fe^{2+} , aby sa umožnilo vstrebávanie. Železo vo forme hému sa vychytáva nešpecifickým transportérom na membráne enterocyty a následne sa intracelulárne uvoľňuje z hému hemoxygenázou (HO-1). Zásoba labilného železa (LIP), ktorá je dostupná na utilizáciu v bunke a na transport do krvného obehu cez ferroportín. Je nevyhnutná konverzia Fe^{2+} formy železa na Fe^{3+} formu ferroxidázou, hephaestinom, viazanou na membránu (alebo v pečeni syntetizovaným ceruplazmínom v krvi), aby bolo vychytené apo-transferínom (Apo-Tf) s vysokou afinitou. Takto naviazané železo sa transportuje do všetkých buniek a tkanív prostredníctvom interakcie s transferínovým receptorom (najmä do kostnej drene pre syntézu hému pre produkciu hemoglobínu potrebného pre erytrocyty). Okrem železa z enterocytov veľká časť pochádza z makrofágov, ktoré sa uvoľňuje cez ferroportín na ich membráne. Toto železo pochádza z recyklácie erytrocytov. Pečeňou produkovaný hepcidín je negatívny regulátor hladiny železa, ktorý sa viaže na ferroportín a podporuje jeho degradáciu pri nadbytku železa v tele (viac vid' ďalej).

Prevzaté z: Eid et al. 2017

Hepcidín, hormón exprimovaný prevažne v pečeni, ktorý reguluje eflux železa prostredníctvom oklúzie alebo indukcie degradácie ferroportínu. Zvýšená syntéza obmedzuje export železa do plazmy z enterocytov (nižšia absorpcia), hepatocytov a makrofágov. Expresia hepcidínu je indukovaná dostatočnými zásobami prípadne preťažením železom, centrálnou adipozitou, infekciami a zápalom cez lipopolysacharid a interleukín-6 (IL-6). Naopak inhibítory syntézy sú zvýšený dopyt, deficit napr. anémia a hypoxia (**Obr. 11.**) (Percy et al. 2017, McKay et al. 2020, Lal 2020, Geissler et al. 2011, Lieu et al. 2001, Man et al. 2022, Pasricha et al. 2021, Papanikolaou et al. 2005, Isidori et al. 2021, Eid et al. 2017, Chifman et al. 2014, Dutt et al. 2022, Wang et al. 2019, Fairweather-Tait et al. 2021, Percy et al. 2017, Mladěnka et al. 2005).



Obr. 11. Model regulácie hladiny železa hepcidínom. Zníženie hladín hepcidínu v plazme v dôsledku zníženia zásoby železa v tele, anémia alebo hypoxie podporuje vstrebávanie železa z potravy a uvoľňovanie železa z makrofágov. Zvýšenie plazmatického hepcidínu v dôsledku zvýšených zásob železa alebo zápalu, naopak inhibuje absorpciu železa a jeho uvoľňovanie.

Prevzaté z: Papanikolaou et al. 2005

Narušenie homeostázy železa vedie k rozvoju porúch, ktoré sú klasifikované ako choroby spôsobené deficitom alebo preťažením. Nedostatok železa sa môže vyskytnúť sám o sebe bez anémie, avšak postupnou progresiou sa napokon anémia vyvinie. Delí sa na 2 kategórie, absolútny a funkčný.

Funkčný nedostatok, anémia chronického zápalu, prípadne anémia chronického ochorenia je systémová porucha železa, ktorá vzniká dôsledkom imunitnej aktivácie a zvýšenej produkcie cytokínov (interleukíny, patogény a lipopolysacharid), a tým aj stimulácie hepcidínu (proteín akútnej fázy zápalu). Podkladom pre rozvoj ochorenia je malignita, trauma, chronické infekcie, zápalové poruchy a zlyhávanie orgánov. Rizikový faktor je aj chronický zápal nízkeho stupňa resp. obezita. Princíp nedostatku tvorí železo sekvestrované v makrofágoch a teda nízka saturácia transferínu a nedostupnosť pre distribúciu do funkčných miest napr. erytropoézu, pričom sa vyskytuje zvýšená koncentrácia ferritínu (tiež reaktant akútnej fázy). Celkové množstvo železa môže byť v norme, ide o paradoxnú situáciu nedostatku erytrocytov so zvýšeným depozitom, čo má viesť k nedostupnosti železa pre mikroorganizmy a rakovinové bunky. Pri terapii je kľúčovým cieľom odstrániť základnú poruchu, a tým sa upraví mierna až stredne závažná anémia.

Absolútny typ nedostatku je v dôsledku celkovej deplécie železa v tele a následnej obmedzenej erytropoéze a anémii. Etiologicky sa spája so zníženým príjmom z potravy (monotvárna strava a dlhodobý pôst), anomáliami črevnej absorpcie (Crohnova choroba, ulcerózná kolitída, celiakia, genetické poruchy) a s fyziologickými, patologickými a iatrogennými stratami krvi (menštruácia, trauma, krvácanie z tráviaceho traktu ako napr. peptický vred, pažerákové varixy, okultné krvácanie spôsobené polypmi alebo kolorektálnym karcinómom), hormonálnymi poruchami a liekmi (PPI a antagonisti H₂ receptoru). Pri postupnom vývine anémie (chronické krvácanie) sa telo prispôbuje klesajúcej hladine železa a pacient môže byť asymptomatický, prípadne len s miernejšími klinickými príznakmi. Asi 2/3 celkového železa sú využité na syntézu hemoglobínu, čo pri deficite ovplyvní erytrocyty (mikrocytárna hypochromná anémia). Charakteristické symptómy sú chronická únava, závraty, hučanie v ušiach, neschopnosť sústredenia, cefalea, búšenie srdca, alopecia, suché vlasy a pokožka, lyžičkovité nechty (koilonychia), znížená fyzická výkonnosť, bledosť kože a spojiviek, praskanie kútikov a chuť na látky, ktoré sa nekonzumujú (pôda, papier a neuvarená ryža). Na deficit sú náchylnejšie najmä deti, tehotné, predčasne narodené deti, ľudia nad 65 rokov, ženy vo fertilnom veku, darcovia plnej krvi, vrcholový športovci, vegáni a vegetariáni. U detí je na deficit náchylný najmä mozog, to môže viesť k duševným poruchám, k negatívnemu ovplyvneniu kognitívneho, motorického a behaviorálneho vývoja. Lieči sa perorálnou suplementáciou, vo vážnejších prípadoch intravenóznou infúziou alebo transfúziou

erytrocytov. Komplikácie neliečenej anémie vedú k nepravidelnému tepu a zhoršeniu prognózy ischemickej choroby srdca až prípadne k akútnemu infarktu myokardu a srdcovému zlyhaniu.

Medzi ďalšie typy anémii zaradíme vrodenú dyserythropoetickú anémiu (neúčinná erythropoéza s dysplastickými zmenami v erytroblastoch), sideropenickú anémiu (vrodená alebo získaná porucha adekvátneho začlenenia železa do hému) a talasémiu (dedičná porucha syntézy globínového reťazca v hemoglobíne) (*Jomova et al. 2022, Chifman et al. 2014, Zeidan et al. 2021, Lal 2020, Geissler et al. 2011, Lieu et al. 2001, Brissot et al. 2021, Johnson 1990, Man et al. 2022, Percy et al. 2017, Pasricha et al. 2021, Ward et al. 2019, Banjari et al. 2018*).

Za normálnych podmienok je transferín saturovaný oba z 30 %. Ak sa prekročí limitné množstvo, 70%, začne sa v krvi objavovať netransferínové železo, ktoré môže iniciovať tvorbu voľných radikálov, a tým spôsobovať toxicitu na úrovni makromolekúl, orgánov, buniek a orgánov. Poruchy nadbytku sú oveľa menej frekventované ako nedostatku. Preťaženie môže vznikáť v dôsledku nadmerného nutričného príjmu, hepatopatií a suplementáciou doplnkami (akútna aj chronická intoxikácia). Najdôležitejším podkladom je genetická porucha (primárna hemochromatóza) alebo opakované transfúzie (sekundárna hemochromatóza). Počiatočné nešpecifické symptómy sú abdominálny diskomfort, únava, prípadne absencia akýchkoľvek. Na prejavenie toxicity je nevyhnutné významné zvýšenie hladiny počas dlhšieho časového úseku (roky). Nadbytočné železo sa najčastejšie kumuluje v pečeni, pankrease, srdci, synovii kĺbov, koži, endokrinných žľazách, ďalej zhoršuje funkciu imunitného systému a je rizikový faktor neoplastickej transformácie. Progresiou dochádza ku klinickým komplikáciám a multiorgánovej dysfunkcii napr. cirhóza až hepatocelulárny karcinóm, kardiomyopatie (s arytmiami až srdcovým zlyhaním), artropatie veľkých kĺbov (artritída, artralgia), myalgie a spazmy, hyperpigmentácia kože, diabetes mellitus, hypogonádizmus až neplodnosť, hypotyreóza a smrť.

Hereditárna hemochromatóza je najčastejšia genetická porucha spôsobená mutáciou génov osi hepcidín/ferroportín alebo receptoru pre transferín. Ochorenie nastupuje medzi 40. –50. rokom a je charakteristické akumuláciou železa v orgánoch (najmä v pečeni) v dôsledku jeho zvýšenej absorpcie. Juvenilná hemochromatóza, jedna z foriem hereditárnej hemochromatózy, má rýchlejší rozvoj: nastupuje do 30.

najčastejšie okolo 15. – 20. roku života, s typickým hypogonádizmom a kardiomyopatiou.

Aceruloplazminémia je spôsobená mutácia génu kódujúceho ceruloplazmín, čo vedie k inaktivácii ferroxidázovej aktivity, zníženej väzbe železa na transferín a teda transportu z intracelulárneho kompartmentu do plazmy. Tak dochádza k jeho akumulácii v parenchýme orgánov a najmä v mozgu, pričom sú dominantné neurologické príznaky a mikrocytárna anémia.

Neuroferritinopatia je dedičné progresívne neurodegeneratívne ochorenie. Prvé prejavy sú medzi 40. – 60. rokom života. Oxidačný stres spôsobuje neurodegeneráciu a vedie k poruche pohybu (chorea, dystónia, bradykinéza a tremor).

Friedrichova ataxia je progresívne neurodegeneratívne ochorenie s kardiomyopatiou spôsobujúce predčasné úmrtie. Dochádza k mutácii mitochondriálneho proteínu, frataxínu, ktorého nedostatok narúša syntézu hému alebo klastrov Fe-S a akumuluje železo v mitochondrii, čo v konečnom dôsledku zodpovedá za oxidačný stres a respiračnú insuficienciu.

Špecifickým ochorením je atransferinémia, dedičné ochorenie spojené s nedostatkom transferínu vedúce k porušenej erytropoéze a depozitom železa v parenchymatických orgánoch (pečeň).

Krvné transfúzie sú používané pri liečbe ťažký chronických anémii. Sekundárne preťaženie sa teda vyskytne po opakovaných transfúziách erytrocytov pri beta talasémii, kosáčikovitej anémii, myelodysplastickom syndróme a i. anémiách. Pokiaľ sa tento stav nezačne riešiť je až život ohrozujúci, preto je nevyhnutné včasné odhalenie. Základom terapie u dedičných hemochromatóz je flebotómia, prípadne aj podávanie chelatačných činidiel (desferrioxamín, deferiprón a deferasirox). U transfúzne navodených zase chelatačná (*Tapiero et al. 2001, Geissler et al. 2011, Eid et al. 2017, Dutt et al. 2022, Shander et al. 2009, Papanikolaou et al. 2005, Lieu et al. 2001, Chifman et al. 2014, Ward et al. 2019, Zeidan et al 2021, Lal 2020, Nairz et al. 2020*).

3.3.5 Horčík

Horčík patrí medzi štvrtý najzastúpenejší minerál v organizme a druhý najrozšírenejší intracelulárny kation v bunkách. V bunke pôsobí ako protiión pre nukleárne kyseliny a ATP, a tak elektrostaticky kompenzuje záporne náboje kyslíka a dusíka. Ako kofaktor enzýmov reguluje biochemické pochody v tele, príkladom

enzýmov závislých na horčíku sú Na^+/K^+ -ATPáza, kreatínkináza, proteínkináza a cykláza. Konverzia neaktívnej formy vitamínu D v pečeni a obličkách na aktívnu dihydroxy je tiež závislá od horčíka. Podieľa sa na mnohých fyziologických funkciách neurologického a kardiovaskulárneho systému, mozgu a kostrového svalstva. Zohráva kľúčovú úlohu pri správnom vedení nervových impulzov, udržiavaní cievného tonu, muskulárnej kontrakcii a pri normálnom kardiálnom rytme. Je esenciálny pre syntézu DNA a RNA, proteínov, výrobu aeróbnej a anaeróbnej energie, reguláciu krvného tlaku, glykémie a zápalu. Predstavuje fyziologického antagonistu vápnika, preto pomer Mg/Ca je významný pre správnu aktivitu proteínov transportujúcich vápnik (*Fiorentini et al. 2021, Gröber et al. 2015, Blancquaert et al. 2019, Fritzen et al. 2023, Jomova et al. 2022*).

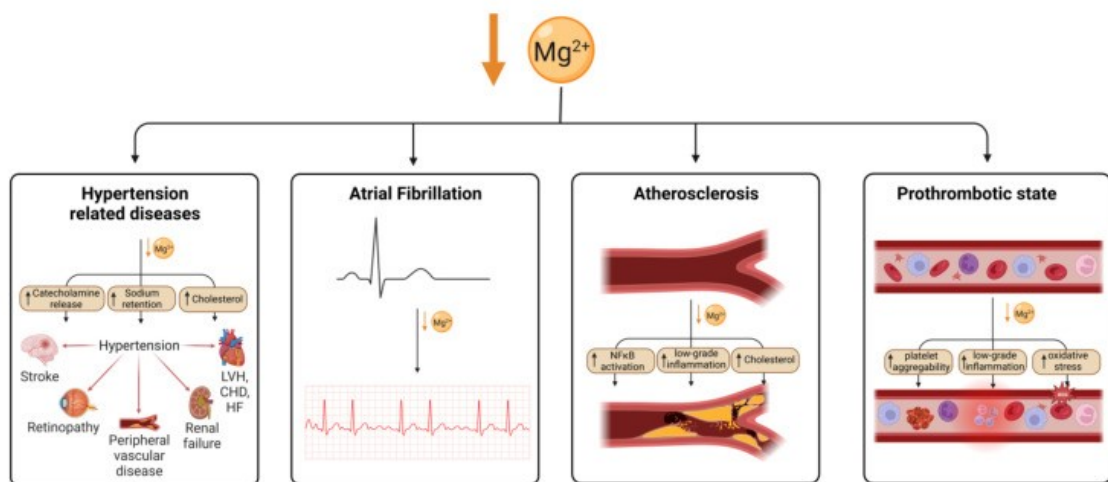
U ľudí je nevyhnutná pravidelná konzumácia horčíka, aby sa predišlo deficitu. Optimálna denná potreba pre zdravých dospelých sa odhaduje na 300 – 400 mg, čo predstavuje asi 5 – 6 mg/kg. Vyšší príjem sa odporúča pri niekoľkých fyziologických stavoch ako je tehotenstvo, starší ľudia, športovci, ale aj alkoholici a pri patologických stavoch, napr. infekcie a diabetes mellitus. Najbohatším zdrojom je zelená zelenina ako napr. špenát, vďaka obsahu chlorofylu. Za ďalšie bohaté zdroje sa považujú strukoviny, semená, celozrnné pečivo, orechy (kešu, mandle a arašidy), kakao a obilniny (hnedá ryža a proso). Z ovocia vyššie množstvo je obsiahnuté najmä v sušených marhuliach a banánoch a v čerstvom ovocí ako napr. černice, avokádo, arónia a opuncia. Pôda je čoraz chudobnejšia na horčíka a iné minerály, čo vedie k deficitu horčíka u ľudí v dôsledku zníženia obsahu v ovocí a zelenine. Stredné až nízke koncentrácie sú v rybách, mäse a mliečnych výrobkoch. Spracovaním potravín, varenie zeleniny, rafinácia obilnín, odstránenie klíčkov a otrúb podstatne znižuje obsah horčíka. Významným zdrojom je pitná voda (tvorí asi 10 % denného príjmu horčíka), z ktorej môže byť horčík lepšie absorbovaný ako z potravín (*Fiorentini et al. 2021, Laires et al. 2004, Dominguez et al. 2020, Barbagallo et al. 2021, de Baaij et al. 2015, Gröber et al. 2015*).

V tele dospelého človeka je asi 25 g horčíka, pričom 50 – 60 % je uložené v kostiach ako povrchové substituenty hydroxyapatitovej minerálnej zložky. Väčšina zvyšného sa nachádza v kostrových svaloch a mäkkých tkanivách. Lokalizuje sa vo všetkých bunkách tela hlavne v mitochondriách, endoplazmatickom retikule a jadre kvôli väzba na negatívne nabité časti molekúl (proteíny, fosfolipidy, nukleové kyseliny,

chromatín a nukleotidy). Menej ako 1 % sa nachádza extracelulárne najmä v sére a v erytrocytoch. Absorbujú sa v primárne v tenkom čreve pasívnym paracelulárnym mechanizmom najmä v ileu a distálnej časti jejúna, kde je hnacou silou luminálna koncentrácia a transepitéálne napätie s pozitívne nabitým lúmenom. Určitá časť sa však vstrebe aj cez hrubé a slepé črevo. Rozsah absorpcie prijatého horčíka potravou a pitnou vodou závisí od potreby organizmu. Nevstrebané množstvo sa vylúči stolicou. Pre udržanie homeostázy sú kľúčovým orgánom obličky. Normálna referenčná hladina v sére (0,76 – 1,15 mmol/l) sa udržiava exkréciou močom a prípadne reabsorpciou v nefróne. Na rovnováhu horčíka vplýva mnoho faktorov: vysoký obsah vápnika, sodíka, proteínov, kofeínu a alkoholu, prípadne liečivá a to diuretiká (furosemid) a PPI. Hlavným proteínom v plazme, ktorý viaže horčík je sérový albumín (*Costello et al. 2016, Blancquaert et al. 2019, Gröber et al. 2015, de Baaij et al. 2015, Barbagallo et al. 2021, Fritzen et al. 2023*).

Hypomagneziémia nastáva, keď sérová hladina horčíka klesne pod 0,75 mmol/l, najčastejšie v dôsledku zníženého príjmu a/alebo zvýšenej exkrécie obličkami. Vyššie riziko je práve u starších ľudí, ktorí trpia nedostatočnou črevnou absorpciou, zlyhávaním obličiek, a teda aj zníženou renálnou reabsorpciou, majú, navyše, ďalšie pridružené ochorenia a sú polypragmatickí. Deficit sa spája s ďalšími ochoreniami a stavmi ako napr. chronická diarea, malabsorpčný syndróm, chronický stres, nedostatočne kontrolovaný diabetes mellitus (inzulínová rezistencia), preeklampsia, endokrinné príčiny (aldosteronizmus, hypertyreóza, hyperparatyreóza), osteoporóza, chronické zápalové ochorenia, astma a dialýza. Môže byť geneticky podmienená, prípadne niektoré liečivá sú zodpovedné za vznik hypomagneziémie (antacidá, diuretiká, aminoglykozidové antibiotiká, antivirotiká, PPI a beta agonisti). Ďalším rizikovým faktorom je pravidelná nadmerná konzumácia alkoholu zvyšujúca renálne vylučovanie horčíka. Krátkodobým dočasným nedostatkom trpia pacienti s akútnym infarktom myokardu. Mierny nedostatok je asymptomatický, v prípade výskytu príznakov sú najčastejšie: nauzea, vracanie, strata chuti dojedla, únava, závraty, točenie hlavy, insomnie a letargia. Prvé príznaky sa prejavujú ako neuromuskulárne ťažkosti, a to zvýšená dráždivosť, tremor, svalová slabosť, myalgie v oblasti chrbta a krku, karpopedálne spazmy, kŕče v tvárovej oblasti až tetánia. Mimo iné sa môžu vyskytnúť psychiatrické a neurologické poruchy (depresia, anxieta, zhoršená pamäť, parestézie, generalizované záchvaty, migréna a bolesť hlavy, nystagmus). Nedostatok má negatívny

vplyv na civilizačné ochorenia kvôli zvýšenému oxidačnému stresu a zároveň aj zníženej antioxidačnej ochrane. Horčík je esenciálny pre správnu elektrickú vodivosť srdca cez moduláciu napät'ovo riadené vápnikové a sodíkové kanály. Kardiálne prejavy deficitu súvisia so spomínanými mechanizmami a zahŕňajú arytmie, tachykardie, fibrilácie a extra systoly vrátane predĺženia QT intervalu a *torsades de pointes*. Zvýšený risk je preto u kardiakov liečených digoxínom (deplécia vedie k arytmogénite) a diuretikami. Horčík je potrebný pre správnu endotelovú funkciu a reguláciu krvného tlaku cez ovplyvnenie produkcie oxidu dusnatého a prostacyklínov, preto vďaka nedostatku dochádza k ateroskleróze, hypertenzii a celkovo so súhrou iných faktorov k metabolickému syndrómu (**Obr.12.**) (Costello et al. 2016, Gröber et al. 2015, Barbagallo et al. 2021, Fritzen et al. 2023, Jomova et al. 2022).



Obr. 12. Deficit horčíka a jeho kardiovaskulárne dôsledky. Prostredníctvom viacerých mechanizmov nedostatok horčíka vedie k hypertenzii, arteriálnej fibrilácii, ateroskleróze a zvýšenému riziku trombózy. Tieto mechanizmy zahŕňajú retenciu sodíka, zvýšený cholesterol a katecholamíny a zápalové reakcie nízkeho stupňa.

Prevzaté z: Fritzen et al. 2023

Hypermagneziémia je hladina horčíka v sére zvýšená nad 1,1 mmol/l. Tento stav, prípadne akútna intoxikácia horčíkom sa vyskytuje veľmi zriedkavo. Zvyčajne vzniká v dôsledku akútneho alebo chronického ochorenia obličiek, iatrogenne resp. medikamentózne indukovaná. Lieky vyvolávajúce nadbytok zahŕňajú samotnú suplementáciu, antacidá, laxatíva, epsomská soľ (síran horečnatý), Mg^{2+} soli liečiv a pacienti užívajúci lítium, kde dochádza k zníženej exkrécii horčíka. Ďalšie ochorenia

vyvolávajúce zvýšenú hladinu sú hypotyreóza a hyperparatyreóza, kde nastávajú zmeny v metabolizme vápnika a vyvolávajú prostredníctvom hyperkalcémie zvýšenú absorpciu v tubule. Väčšina starších ľudí a pacienti liečení anticholinergikami alebo opioidmi sú vystavení zvýšenej absorpcii kvôli zníženej motilite čriev. Zvýšené riziko je aj u pacientov s hemolýzou, lebo v porovnaní s plazmou je v erytrocytoch trikrát viac horčíka. Syndróm rozpadu nádoru, rhabdomyolýza alebo dekompenzovaná diabetická ketoacidóza môže vyvolať hypermagneziémiu cez extracelulárny posun horčíka. Tento stav je zvyčajne dobre tolerovaný a pacienti sú obvykle asymptomatickí. Najčastejšie symptómy môžu byť gastrointestinálne ťažkosti (nauzea, vracanie), slabosť, závraty a zmätenosť. Pri zvýšení hladiny sa príznaky začínajú stupňovať: ospalosť, cefalea, návaly horúčavy, sčervenanie, zmätenosť, znížené reflexy, a rozmazané videnie. Pri vyšších hodnotách nastávajú komplikácie napr. svalová paralýza, letargia, bradykardie, hypotenzia, zmeny na EKG vrátane predĺženia intervalov QRS, PR a QT s bradykardiou. Extrémna hypermagneziémia môže viesť k útlmu dýchania, srdčej zástave, kóme až smrti (*Van Laecke 2019, Cascella et al. 2023, Jomova et al. 2022, Costello et al. 2016, Gröber et al. 2015*).

3.3.6 Zinok

Zinok je po železe druhým najzastúpenejším prvkom v ľudskom tele, pričom celkový obsah predstavuje 2 – 3 g. Tvorí štruktúru širokej škály proteínov, a tým zabezpečuje katalytickú a regulačnú funkciu v biologických systémoch. Ako jediný kov je súčasťou všetkých šiestich tried enzýmov (hydrolázy, transferázy, oxidoreduktázy, lyázy, ligázy, a izomerázy), t. j. buď ako základná zložka, alebo sa účastní aktivácie asi 300 enzýmov a ich izoforiem. Je biologicky nevyhnutný pre mnohé bunkové procesy vrátane rastu, vývoja, signalizácie, apoptózy, syntézy a opravy DNA a transkripcie RNA. Jeho antioxidantné pôsobenie je sprostredkované niekoľkými mechanizmami: ochranou –SH skupín proteínov a enzýmov pred oxidáciou ROS, súťažou s inými redoxnými kovmi (železo a meď) o väzbové miesto a ich nahradenie redoxne neaktívnym zinkom a aj samotným zinkom, ktorý aktivuje tvorbu silných antioxidantov (metalotioneín). V organizme má zásadnú rolu pre kardiovaskulárny systém, prestavbu a homeostázu kostí, metabolizmus lipidov a uhľohydrátov, neurogenézu, synaptogenézu, neuronálnu transmisiiu a spermatogenézu. Je tiež potrebný pre správne hojenie rán, normálnu chuťovú odozvu a zdravie zubov. Okrem modulácie zápalovej

odpovede je nevyhnutný regulátor správnej funkcie imunitného systému, vrodeneho aj adaptívneho, cez proliferáciu T a B-lymfocytov a produkciu protilátok sprostredkovaných B bunkami (*Saper et al. 2009, Read et al. 2019, Glutsch et al. 2019, Ozyildirim et al. 2023, Maret et al. 2006, Molenda et al. 2023, Skalny et al. 2021, Sanna et al. 2018, Jomova et al. 2022*).

Telo človeka si nedokáže akumulovať zinok, preto je nevyhnutná jeho pravidelná suplementácia stravou. Priemerný denný príjem zinku z potravy kolíše od 4,7 do 18,6 mg. Odporúčaný denné množstvo pre mužov predstavuje 11 mg/deň a pre ženy 8 mg/deň. Zvýšenú potrebu majú dojčatá, starší jedinci, pričom u tehotných a dojčiacich žien sa odporúča zvýšiť príjem o 3 – 4 mg. Najbohatším zdrojom sú morské plody (ustrice), hovädzie mäso, hydina, strukoviny a obilniny. Strukoviny zvyčajne obsahujú viac ako rafinované obilniny. Pre adekvátny príjem je nevyhnutná pestrá strava, vegetariánstvo prípadne preferencia hydiny namiesto červeného mäsa môže viesť k nedostatku (*Saper et al. 2009, McClung 2018, Maret et al. 2006, Glutsch et al. 2019, Sanna et al. 2018*).

V závislosti od koncentrácie dochádza k absorpcii zinku dvoma mechanizmami: pasívnym a uľahčeným transportom. Absorpcia prebieha v tenkom čreve, v jejúne, najmä cez špecifický transportér ZIP4. Inhibovaná je vlákninou a kyselinou fytovou. Lepšia účinnosť vstrebania je z tekutej formy (70 %) ako pevnej (30 %). Podstatná časť absorbovaného zinku je viazaná na albumín, transportovaná do pečene, prípadne uložená v priečne pruhovanom svalstve a kostiach (80 – 85 %), ale aj do kože a pečene (8 – 11 %). Primárna exkrécia prebieha v črevách (2 – 4 mg) spolu s pankreatickou šťavou a žľou. V menšej miere cez obličky (asi 0,5 mg), kožu a chĺpky. V krvi je teda len zlomok (0,1 %) celkového obsahu zinku v tele, 10 – 15 $\mu\text{mol/l}$. Homeostáza je prísne kontrolovaná, keďže vysoké bunkové koncentrácie sú toxické. Voľný alebo voľne viazaný zinok je prítomný iba v pikomolárnych koncentráciách, pretože aj malé prechodné zvýšenie v cytosole môže mať vážne zdravotné dôsledky (*Glutsch et al. 2019, Muhamed et al. 2014, Molenda et al. 2023, Jomova et al. 2022*).

Deficit zinku má rôznu etiológiu: nutričnú, genetickú, iatrogennú alebo spôsobenú ochoreniami v oblasti tráviacej sústavy. Najčastejšou príčinou je nedostatočný príjem v dôsledku dlhodobej parenterálnej výživy, porúch príjmu potravy ako mentálna anorexia a bulímia, ale aj alternatívne stravovacie návyky napr. vegetariáni a vegáni. Podvýživa a následný nedostatok sa môže vyskytnúť aj u starších

jedincov, ale aj u dojčiat a detí a pri zvýšených nárokoch počas tehotenstva a laktácie. Ďalšou príčinou sú malabsorbčné poruchy zahŕňajúce chronické zápaly čriev (ulcerózna kolitída, Crohnova choroba a celiakia), syndróm krátkeho čreva a malabsorpcia po chirurgických zákrokoch v oblasti GIT. Klinicky manifestovaný nedostatok má rôznorodé prejavy. Deficit sa prejavuje typickou triádou dermatitídy, alopecie a hnačky, ktoré sú často sprevádzané inými menej špecifickými príznakmi ako šeroslepota, imunodeficiencia (bakteriálne, vírusové aj mykotické infekcie), úbytok hmotnosti, drsná koža, zhoršené hojenie poranení a zároveň tvorba ostro ohraničených ekzematózných a psoriatických plakov, poruchy zmyslov najmä chute a čuchu (dysgeúzia a dysozmia). Nízke hladiny u detí a dospelých spôsobujú atrofiu týmusu, retardáciu rastu a oneskorené sexuálne dozrievanie resp. hypogonadizmus. Účinky na nervový systém zahŕňajú ataxiu, dezorientáciu, letargia, zníženú nervovú vodivosť a zhoršenú neuropsychickú výkonnosť. Nedostatočná koncentrácia sa spája so zvýšenou tvorbou ROS vedúca k oxidačnému poškodeniu biomolekúl (DNA, membránových lipidov a proteínov), a tým sa negatívne ovplyvňuje funkcia srdca, ciev a narušená je aj prevencia proti cukrovke a ochrana pečene pred poškodením alkoholom (**vid' kap. 3.4**).

Acrodermatis enteropathica (enteropatická akrodermatitída), genetická porucha vstrebávania, je spôsobená mutáciou jedného z transportných proteínov zinku. Tento stav je život ohrozujúci, avšak reverzibilný liečbou vhodným dopĺňaním zinku. Ak sa ochorenie nelieči zinkom je smrteľné. Typickým prejavom je ťažká dermatitída, ktorá postihuje periorálnu resp. tvárovú časť, periunguálnu a perianálno-perineálno-skrotálnu oblasť. Ďalšie symptómy sú zhodné, ako boli popísané vyššie (*Jomova et al. 2022, Saper et al. 2009, Muhamed et al. 2014, Maret et al. 2006, Glutsch et al. 2019, Read et al. 2019, McClung 2019, Sanna et al. 2018*).

Na druhej strane nadmerný príjem zvyčajne vzniká suplementáciou vyššími dávkami doplnkov zinku, prípadne v dôsledku konzumácie potravín a nápojov konzervovaných v pozinkovaných nádobách. Charakteristické príznaky sú nauzea, vracanie, kovová chuť, pálenie a bolesť v ústnej dutine, brušné spazmy, hnačka, tachykardia, hypertenzia až obehový kolaps. Akútna intoxikácia sa vyskytuje kvôli pracovnej expozícii. V prípade inhalácie zinkového dymu sa vyskytujú respiračné symptómy ako suchý kašeľ, dýchavičnosť až zápal pľúc, cyanóza a horúčka. V prípade dlhodobej expozície vyšším množstvám ako je tolerovateľná horná hranica, môže nastať paradox, a dôjde k negatívnemu ovplyvneniu funkcie lymfocytov a začnú prevládať

inhibičné účinky na zložky imunitného systému (*Skalny et al. 2021, Saper et al. 2009, Jomova et al. 2022, Ahmad Wahid et al. 1988*).

3.4 Oxidačný stres – Fentonova reakcia

Reakcie Fentonového typu sú jednými z najdôležitejších kovom sprostredkovaných reakcií spôsobujúce oxidačný stres. Oxidačný stres je stresový stav buniek, kedy nastáva nerovnováha medzi produkciou a elimináciou prooxidačných faktorov (RONS – reaktívne formy kyslíka a dusíka, prípadne len ROS) a intracelulárnym antioxidantným systémom, čo môže viesť k nezvratnému poškodeniu až smrti.

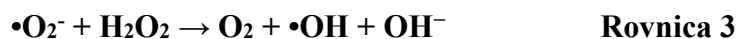
ROS sú nepretržite generované a eliminované z buniek, pričom sa udržiava iba nízka bazálna hladina. Vznikajú pri rôznych fyziologických biochemických procesoch ako sú aktivácia imunitného systému, fagocytóza, intracelulárna signalizácia, regulácia bunkových funkcií, metabolizmus xenobiotík, enzymatické systémy (cytochróm P 450 /CYP 450/, NADPH-oxidáza, xantínoxidáza a lipoxygénáza). Najvýznamnejším zdrojom ROS/RONS je mitochondria (elektrónový transportný reťazec), endoplazmatické retikulum a peroxizómy. Ľudské telo je vybavené detoxikačnými mechanizmami regulujúcimi tvorbu ROS a zároveň schopnými opraviť prípadné už vzniknuté poškodenie.

Prechodné kovy v nadbytku sa podieľajú na tvorbe ROS buď priamo, alebo nepriamo. Železo je dominantný kov podieľajúci sa na Fentonovej reakcii vďaka jeho dostupnosti v biologických systémoch, ale aj iné kovy napr. Cu, Co, Cr sú schopné katalyzovať reakciu. Princípom reakcie je redukcia peroxidu vodík (H_2O_2) jediným elektrónom, z ktorého vzniká vysoko toxický hydroxylový radikál ($\bullet OH$) poškodzujúci širokú škálu bunkových štruktúr. Haber-Weissova reakcia súhrnný názov pre Fentonovu reakciu a redukcii železitých iónov superoxidom. Železo, respektíve vyššie zmienené kovy, teda pôsobí ako katalyzátor reakcie, pri ktorej z H_2O_2 a superoxidu ($\bullet O_2^-$), vzniká $\bullet OH$. Mechanizmus cytotoxicity hydroxylového radikálu je oxidácia biologických makromolekúl a tvorba iných odvodených radikálov prostredníctvom kaskádových radikálových procesov (reakcia $\bullet OH$ s membránovými lipidmi a vznik lipidových peroxylových radikálov $LOO\bullet$).

Výroba hydroxylového radikál ($\bullet OH$), za účasti železa:



Oba kroky reakcie sa súhrnne nazývajú Haber-Weissova reakcia:



Výroba hydroxylového radikál ($\bullet\text{OH}$), za účasti medi:



Nadbytok zinku je možné považovať za nepriame prooxidačné činidlo, schopné vytesniť meď z väzby na proteíny a následne sa katalyticky zúčastniť Fentonovej reakcie.



Tvorba hydroxylového radikál ($\bullet\text{OH}$), za účasti kobaltu:



Kobalt predisponuje oveľa nižším oxidačným potenciálom v porovnaní so železom a meďou.

Vo všeobecnosti oxidačný stres spôsobený kovom je spoločný menovateľ mnohých ochorení. Toto narušenie homeostázy je spojné s patofyziológiou kardiovaskulárnych (ateroskleróza, arteriálna hypertenzia, hypercholesterolémia, diabetes mellitus a srdčné zlyhávanie), autoimunitných (revmatoidná artritída), neurodegeneratívnych ochorení (Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba) a mimo iné aj so starnutím. Dôsledkom oxidačnej modifikácie DNA s následnou mutagenézou spojenou s aktiváciou onkogénov a potlačením niektorých supresorových génov môže dôjsť k tumorigenéze (kolorektálny karcinóm, rakovina prsníka a lymfómy) (Valko et al 2005, Ćwiertnia et al. 2022, Jomova et al. 2011, Galaris et al. 2008, Gudjoncik et al. 2014, Jomova et al. 2022, Salloum et al. 2018, Angelé-Martínez et al. 2023, Nakamura et al. 2019, Gupte et al. 2009, Fukai et al. 2011, Dos Santos et al. 2022, Galaris et al. 2019, Yan et al. 2022, Imam et al. 2017, Illés et al. 2020).

4 CIELE PRÁCE

Cieľom praktickej časti tejto práce je objasniť antioxidačné a prooxidačné správanie 7,8-dihydroxyflavónu vo vzťahu k rôznym fyziologickým kovom:

- Zmerať chelatačnú schopnosť 7,8-dihydroxyflavónu so železom, meďou, kobaltom, zinkom, horčíkom a vápnikom pomocou kompetitívnych metodík
- Zistiť redukčné schopnosti danej látky k železitým a meďnatým iónom
- Zistiť vplyv látky na železom a meďou iniciovanú Fentonovu reakciu, teda antioxidačné alebo prooxidačné účinky *in vitro*
- Otestovať vplyv tohto flavónu na meďou navodenú lýzu červených krviniek – test *ex vivo* na potkaních a ľudských erythrocytoch v zmysle antioxidačnej alebo prooxidačnej kapacity

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Experimentálne stanovenie chelatácie a redukcie iónov

Chemikálie

- Dihydrát chloridu vápenatého $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ca^{2+})
- Heptahydrát síranu horečnatého $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Mg^{2+})
- Spektrofotometrický indikátor vápniku a horčíku: o-kresolftalein komplexon (CC)
- Pentahydrát síranu meďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+})
- Chlorid meďný CuCl (Cu^{1+})
- Spektrofotometrický indikátor medi: hematoxylín (HEM)
- Spektrofotometrický indikátor medi: disodná soľ bathokuproindisulfónovej kyseliny (BCS)
- Heptahydrát síranu železnatého $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}); Penta s.r.o., ČR
- Hexahydrát chloridu železitého $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{3+}); Penta s.r.o., ČR
- Spektrofotometrický indikátor železa: ferozín [4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzénsulfónová kyselina, disodná soľ]
- Hydroxylamín hydrochlorid (HA)
- Chlorid zinočnatý ZnCl_2 (Zn^{2+})
- Spektrofotometrický indikátor zinku: ditizón
- Chlorid kobaltnatý CoCl_2 (Co^{2+})
- Spektrofotometrický indikátor kobaltu: disodná soľ kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfónovej (Na_2NFDSA)
- Chemikálie na rozpúšťadlo:
 - Chlorid sodný NaCl
 - Kyselina chlorovodíková HCl
- Chemikálie na prípravu pufru:
 - Kyselina octová; Penta s.r.o., ČR
 - Octan sodný bezvodý; Penta s.r.o., ČR
 - 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínétánsulfónová kyselina (HEPES)
 - Sodná soľ HEPES (NaHEPES)

- Rozpúšťadlá:
 - Dimetylsulfoxid (DMSO); Lach-Ner, s.r.o., ČR
 - Ultračistá voda bola pripravená pomocou prístroja Milli-Q RG; Merck Millipore, Massachusetts, USA
- Testovaná látka:
 - 7,8-DHF

Pokiaľ nie je uvedené inak, tak všetky chemikálie boli získané od firmy Sigma-Aldrich, Nemecko.

Prístrojové vybavenie

- Analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemecko)
- Laboratórna ultrazvuková vaňa Bandelin Sonorex (BANDELIN electronic GmbH, Berlin, Nemecko)
- Trepáčka pre skúmavky a mikroskúmavky typu Eppendorf IKA[®] VORTEX GENIUS 3 (IKA[®]- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemecko)
- Trepáčka pre mikrotitračné doštičky IKA[®] MS 3 digital (IKA[®]-Werke GmbH Co. KG, Staufen, Nemecko)
- Spektrofotometer pre mikrotitračné doštičky Hidex Sense Multimodal Microplate Reader (Hidex, Turku, Fínsko)
- pH-meter PH 538 (WTW, měřící a analytická technika, s.r.o., Praha)

Materiál potrebný na prevedenie

- Mikroskúmavky 1,5 ml a 5,0 ml (Eppendorf, Nemecko)
- Centrifugačné skúmavky 15 ml a 50 ml (Brand, Nemecko)
- Automatické jednokanálové pipety s rôznym rozsahom objemu (BRAND GmbH + Co KG, Nemecko)
- Multikanálové pipety s rôznym objemom (Biohit, Fínsko)
- Špičky na pipetovanie (Eppendorf, Nemecko)
- Mikrotitračné 96-jamkové doštičky (BRAND GmbH + Co KG, Nemecko)

Príprava tlmivých roztokov

- pH 7,5 sa pripravil zmiešaním vodného 15 mM roztoku NaHEPES a 14,3 mM roztoku HEPES pH.
- 6,8 sa pripravil zmiešaním 15 mM roztoku NaHEPES a 71,7 mM roztoku HEPES.
- Acetátový pufer s pH 5,5 sa pripravil zmiešaním vodného 15 mM roztoku octanu sodného a 2,7 mM roztoku kyseliny octovej.
- Acetátový pufer s pH 4,5 sa pripravil zmiešaním 15 mM vodného roztoku octanu sodného a 27,3 mM vodného roztoku kyseliny octovej.

pH výsledných pufov boli vždy skontrolované pH-metrom. Roztoky pufov sa uchovávajú v chladničke.

5.1.1 Chelatácia vápenatých a horečnatých iónov (Ca^{2+} a Mg^{2+})

Príprava zásobných roztokov

Dihydrát chloridu vápenatého

Roztok vápenatých iónov s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením navážky dihydrátu chloridu vápenatého ($M_w = 147,014$ g/mol) vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Heptahydrát síranu horečnatého

Roztok horečnatých iónov s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením navážky heptahydrátu síranu horečnatého ($M_w = 246,475$ g/mol) vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

o-kresolftalein komplexon

Roztok CC ($M_w = 636,6$ g/mol) s koncentráciou 8 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme pufru pH 7,5.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24$ g/mol) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky vápenatých a horečnatých iónov, CC a pufer pH 7,5 sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke.

Príprava pracovných roztokov

- Roztoky vápenatých a horečnatých iónov oba s koncentráciou 3 mM sa pripravili nariadením príslušných zásobných roztokov v čase potreby ultračistou vodou.
- Roztok CC s koncentráciou 4 mM sa pripravil nariadením daného zásobného roztoku v čase potreby pufrum pH 7,5.
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariadením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Postup stanovenia chelatacie vápenatých a horečnatých iónov (Tab. 1. a 2.)

- 1) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 150 μ l pufru pH 7,5.
- 2) Do všetkých stĺpcov mimo posledného sa pridalo 50 μ l 3 mM roztoku vápenatých iónov. Do posledného sa pridalo 50 μ l rozpúšťadla použitého na prípravu roztoku vápenatých iónov, ultračistá voda.
- 3) Do stĺpcov bolo napipetované 50 μ l roztoku testovanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_x$) okrem posledných dvoch stĺpcov, kde bolo pridané 50 μ l rozpúšťadla, DMSO.
- 4) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 1 minútu na trepačke.
- 5) Do posledného riadku na doštičke sa pridalo 50 μ l pufru pH 7,5 a do prvých troch riadkov 50 μ l 4 mM roztok CC.
- 6) Absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 573 nm hneď a po uplynutí 5 minút.
- 7) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Rovnakým postupom sa merala absorbanca horečnatých iónov, ale s rozdielnou vlnovou dĺžkou, 568 nm.

Tabuľka 1. Konečný obsah jamky chelatácie Ca^{2+} a Mg^{2+}

Konečný obsah jamky	
150 μl	Pufer
50 μl	Roztok $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ alebo ultračistá voda
50 μl	7,8-DHF alebo DMSO
50 μl	Roztok CC alebo pufer pH 7,5

Tabuľka 2. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení chelatácie Ca^{2+} a Mg^{2+}

	C_1	C_2	C_3	C_4	C_X	0+ pozitívna kontrola (bez 7,8- DHF)	0- negatívna kontrola bez (7,8-DHF a $\text{Ca}^{2+}/$ Mg^{2+})
Vzorky s pridaným CC							
Slepé vzorky							

	Jamky so skúmanou látkou, vápenatými alebo horečnatými iónmi a CC
	Jamky so skúmanou látkou a vápenatými alebo horečnatými iónmi, bez CC
	Jamky s vápenatými alebo horečnatými iónmi a CC, bez skúmanej látky
	Jamky s vápenatými alebo horečnatými iónmi, bez CC a skúmanej látky
	Jamky s CC, bez skúmanej látky a vápenatých alebo horečnatých iónov
	Jamky bez CC, skúmanej látky a vápenatých alebo horečnatých iónov

5.1.2 Chelatácia kobaltnatých iónov (Co^{2+})

Príprava zásobných roztokov

Chlorid kobaltnatý

Roztok kobaltnatých iónov s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením navážky chloridu kobaltnatého ($M_w = 129,84 \text{ g/mol}$) vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Na₂NFDSA

Roztok Na₂NFDSA ($M_w = 377,25 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky kobaltnatých iónov, Na₂NFDSA a pufrý sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok kobaltnatých iónov s koncentráciou 0,3 mM sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku v čase potreby ultračistou vodou.
- Roztok Na₂NFDSA s koncentráciou 1,8 mM sa pripravil nariadením daného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode.
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariadením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Postup stanovenia chelatácie kobaltnatých iónov (Tab. 3. a 4.)

- 1) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 100 μl pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 alebo 4,5).
- 2) Pre lepšiu rozpustnosť sa pridalo 50 μl DMSO.

- 3) Do stĺpcov bolo napipetované 50 μ l roztoku testovanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_x$) okrem posledných dvoch stĺpcov (0+ a 0-), kde bolo pridané 50 μ l rozpúšťadla, DMSO.
- 4) Do všetkých stĺpcov mimo posledného sa pridalo 50 μ l 0,3 mM roztoku kobaltnatých iónov. Do posledného (0-) sa pridalo 50 μ l rozpúšťadla použitého na prípravu roztoku kobaltnatých iónov, ultračistá voda.
- 5) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 2 minúty na trepačke.
- 6) Do posledných 2 riadkov sa napipetovalo 50 μ l ultračistej vody a do prvých 2 riadkov 50 μ l vodného roztoku Na_2NFDSA s koncentráciou 1,8 mM.
- 7) Absorbancia bola zmeraná pri dvoch vlnových dĺžkach 490 nm a 540 nm hneď a po uplynutí 5 minút (štart 4:30 po prvom zmeraní). V prípade merania absorbancie v pufrí pH 4,5 navyše po 10 minútach (štart 9:30 po prvom meraní).
- 8) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Postup sa aplikoval pri všetkých pH pufrí (7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).

Tabuľka 3. Konečný obsah jamky chelatácie Co^{2+}

Konečný obsah jamky	
100 μ l	Pufer
50 μ l	DMSO
50 μ l	7,8-DHF alebo DMSO
50 μ l	Roztok Co^{2+} alebo ultračistá voda
50 μ l	Roztok Na_2NFDSA alebo ultračistá voda

Tabuľka 4. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení chelatácie Co^{2+}

	C_1	C_2	C_X	0+ pozitívna kontrola (bez 7,8-DHF)	0- negatívna kontrola (bez 7,8-DHF a Co^{2+})
Vzorky s pridaným Na_2NFDSA					
Slepé vzorky					

	Jamky so skúmanou látkou, kobaltnatými iónmi a Na_2NFDSA
	Jamky so skúmanou látkou a kobaltnatými iónmi, Na_2NFDSA
	Jamky s kobaltnatými a Na_2NFDSA , bez skúmanej látky
	Jamky s kobaltnatými iónmi, bez Na_2NFDSA a skúmanej látky
	Jamky s Na_2NFDSA , bez skúmanej látky a kobaltnatých iónov
	Jamky bez Na_2NFDSA , skúmanej látky a kobaltnatých iónov

5.1.3 Chelatácia meďnatých iónov s HEM (Cu^{2+})

Príprava zásobných roztokov

Pentahydrát síranu meďnatého

Roztok meďnatých iónov s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením navážky pentahydrátu síranu meďnatého ($M_w = 249,69 \text{ g/mol}$) vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Hematoxylin (HEM)

Roztok HEM ($M_w = 302,28 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky meďnatých iónov a pufrů sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke. Zásobný roztok HEM sa dá použiť podobu približne 5 hodín od prípravy a uchováva sa v chladničke.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok meďnatých iónov s koncentráciou 0,25 mM sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode.
- Roztok HEM s koncentráciou 0,25 mM sa pripravil nariadením daného zásobného roztoku v čase potreby v DMSO. Po uplynutí 90 minút bolo nutné ho znovu nariediť.
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariadením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Postup stanovenia chelatacie meďnatých iónov s HEM (Tab. 5. a 6.)

- 1) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 150 μl pufru (pH 7,5; 6,8 alebo 5,5).
- 2) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μl 0,25 mM roztoku meďnatých iónov v ultračistej vode.
- 3) Do testovacích stĺpcov bolo napipetované 50 μl roztoku skúmanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_X$) okrem posledného kontrolného stĺpca, kde bolo pridané 50 μl rozpúšťadla, DMSO.
- 4) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 2 minúty na trepačke.
- 5) Do posledných 2 riadkov sa napipetovalo 50 μl DMSO a do prvých 2 riadkov 50 μl roztoku HEM s koncentráciou 5 mM.

- 6) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 3 minúty na trepačke.
- 7) Absorbancia bola zmeraná pri vlnových dĺžkach 610 nm (pH 7,5); 590 nm (pH 6,8) a 595 nm (pH 5,5) hneď (t.j. po 3 minútach trepania) a v čase 7 minút (štart 6:30 po prvom zmeraní). Jedná sa o optimálne vlnové dĺžky podľa predchádzajúcej práce skupiny (Říha et al., 2013).
- 8) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Postup sa aplikoval pri všetkých pH pufrov (7,5; 6,8 a 5,5).

Tabuľka 5. Konečný obsah jamky chelatačie Cu²⁺ s HEM

Konečný obsah jamky	
150 µl	Pufer
50 µl	Roztok Cu ²⁺
50 µl	7,8-DHF alebo DMSO
50 µl	Roztok HEM alebo DMSO

Tabuľka 6. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení chelatácie Cu^{2+} s HEM

	C_1	C_2	C_3	C_x	Kontrolné jamky (bez 7,8-DHF)
Vzorky s pridaným HEM	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

X	Jamky so skúmanou látkou, meďnatými iónmi a HEM
X	Jamky so skúmanou látkou a meďnatými iónmi, bez HEM
X	Jamky s HEM a meďnatými iónmi, bez skúmanej látky
X	Jamky s meďnatými iónmi, bez skúmanej látky a HEM

5.1.4 Chelatácia meďných iónov s BCS (Cu^{1+})

Príprava zásobných roztokov

Chlorid meďný

Príprava rozpúšťadla:

- 0,1 M roztok HCl sa pripraví napipetovaním 442 μl 32 % HCl do 44 558 μl ultračistej vody ($M_w = 36,46 \text{ g/mol}$; $1 \text{ l} = \approx 1,16 \text{ kg}$)
- v 0,1 M roztoku HCl sa rozpustí vypočítané množstvo NaCl, aby vznikol 1 M roztok ($M_w = 58,44 \text{ g/mol}$)

Roztok meďných iónov s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením navážky chloridu meďného ($M_w = 98,99 \text{ g/mol}$) vo vypočítanom objeme vodného roztoku 0,1 M HCl a 1 M NaCl ($M_w = 143,45 \text{ g/mol}$) a inkubáciou v ultrazvukovom kúpeli.

Hydroxylamín hydrochlorid (HA)

Roztok HA ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 100 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Disodná soľ bathokuproindisulfónovej kyseliny (BCS)

Roztok BCS ($M_w = 564,54 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky meďných iónov, BCS, HA a pufrů sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok meďných iónov s koncentráciou 0,25 mM sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku v čase potreby DMSO.
- Roztoky HA s koncentráciou 1 mM a 10 mM sa pripravili nariadením daného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode.
- BCS má rovnakú koncentráciu ako zásobný roztok.
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariadením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Postup stanovenia chelatácie meďných iónov s BCS (Tab. 7. a 8.)

- 1) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 100 μl pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 alebo 4,5).
- 2) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μl 1 mM HA (pH 7,5 a 6,8) alebo 10 mM HA (pH 5,5 a 4,5).
- 3) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μl 0,25 mM roztoku meďných iónov v DMSO.

- 4) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 1 minútu na trepačke.
- 5) Do testovacích stĺpcov bolo napipetované 50 μl roztoku testovanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_X$) okrem posledného kontrolného stĺpca, kde bolo pridané 50 μl rozpúšťadla, DMSO.
- 6) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 2 minúty na trepačke.
- 7) Do posledných 2 riadkov sa napipetovalo 50 μl ultračistej vody a do prvých 2 riadkov 50 μl roztoku BCS s koncentráciou 5 mM.
- 8) Absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 484 nm hneď a po uplynutí 5 minút (štart 4:30 minúty po prvom zmeraní).
- 9) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Postup sa aplikoval pri všetkých pH pufrov (7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).

Tabuľka 7. Konečný obsah jamky chelatačie Cu^{1+} s BCS

Konečný obsah jamky	
100 μl	Pufer
50 μl	1 mM/ 10 mM roztok HA
50 μl	Roztok Cu^{1+}
50 μl	7,8-DHF alebo DMSO
50 μl	Roztok BCS alebo ultračistá voda

Tabuľka 8. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení chelatácie Cu^{1+} s BCS

	C_1	C_2	C_3	C_x	Kontrolné jamky (bez 7,8-DHF)
Vzorky s pridaným BCS	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

X	Jamky so skúmanou látkou, meďnými iónmi a BCS
X	Jamky so skúmanou látkou a meďnými iónmi, bez BCS
X	Jamky s BCS a meďnými iónmi, bez skúmanej látky
X	Jamky s meďnými iónmi, bez skúmanej látky a BCS

5.1.5 Chelatácia meďnatých iónov s BCS (Cu^{2+})

Príprava zásobných roztokov

Pentahydrát síranu meďnatého

Roztok meďnatých iónov s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením navážky pentahydrátu síranu meďnatého ($M_w = 249,69 \text{ g/mol}$) vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Hydroxylamín hydrochlorid (HA)

Roztok HA ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 100 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Disodná soľ bathokuproindisulfónovej kyseliny (BCS)

Roztok BCS ($M_w = 564,54 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky meďnatých iónov, BCS, HA a pufru sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok meďnatých iónov s koncentráciou 0,25 mM sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku v čase potreby **DMSO**.
- Roztoky HA s koncentráciou 1 mM a 10 mM sa pripravili nariadením daného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode.
- Pracovný roztok BCS mal rovnakú koncentráciu ako zásobný roztok.
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariadením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Postup stanovenia chelatacie meďnatých iónov s BCS (Tab. 9. a 10.)

- 1) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 100 μl pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 alebo 4,5).
- 2) Do testovacích stĺpcov bolo napipetované 50 μl roztoku skúmanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_x$) okrem posledného kontrolného stĺpca, kde bolo pridané 50 μl rozpúšťadla, DMSO.
- 3) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μl 0,25 mM roztoku meďnatých iónov v DMSO.
- 4) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 2 minúty na trepačke.
- 5) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μl 1 mM HA (pH 7,5 a 6,8) alebo 10 mM HA (pH 5,5 a 4,5).
- 6) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 1 minútu na trepačke.

- 7) Do posledných 2 riadkov sa napipetovalo 50 μl ultračistej vody a do prvých 2 riadkov 50 μl roztoku BCS s koncentráciou 5 mM.
- 8) Absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 484 nm hneď a po uplynutí 5 minút (štart 4:30 minúty po prvom zmeraní).
- 9) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Postup sa aplikoval pri všetkých pH pufov (7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).

Tabuľka 9. Konečný obsah jamky chelatacie Cu^{2+} s BCS

Konečný obsah jamky	
100 μl	Pufer
50 μl	7,8-DHF alebo DMSO
50 μl	Roztok Cu^{2+}
50 μl	1 mM/10 mM roztok HA
50 μl	Roztok BCS alebo ultračistá voda

Tabuľka 10. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení chelatacie Cu^{2+} s BCS

	C ₁	C ₂	C ₃	C _x	Kontrolné jamky (bez 7,8-DHF)
Vzorky s pridaným BCS	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

X	Jamky so skúmanou látkou, meďnatými iónmi a BCS
X	Jamky so skúmanou látkou a meďnatými iónmi, bez BCS
X	Jamky s BCS a meďnatými iónmi, bez skúmanej látky
X	Jamky s meďnatými iónmi, bez skúmanej látky a BCS

5.1.6 Redukcia meďnatých iónov s BCS (Cu^{2+})

Príprava zásobných roztokov

Pentahydrát síranu meďnatého

Roztok meďnatých iónov s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením navážky pentahydrátu síranu meďnatého ($M_w = 249,69$ g/mol) vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Hydroxylamín hydrochlorid (HA)

Roztok HA ($M_w = 69,49$ g/mol) s koncentráciou 100 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Disodná soľ bathokuproindisulfónovej kyseliny (BCS)

Roztok BCS ($M_w = 564,54$ g/mol) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24$ g/mol) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky meďnatých iónov, BCS, HA a pufrý sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok meďnatých iónov s koncentráciou 0,25 mM sa pripravil nariedením príslušného zásobného roztoku v čase potreby **DMSO**.
- Roztoky HA s koncentráciou 1 mM a 10 mM sa pripravili nariedením daného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode.
- Pracovný roztok BCS mal rovnakú koncentráciu ako zásobný roztok.
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariedením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Postup stanovenia redukcie meďnatých iónov s BCS (Tab. 11. a 12.)

- 1) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 100 μl pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 alebo 4,5).
- 2) Do testovacích stĺpcov bolo napipetované 50 μl roztoku skúmanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_X$) okrem posledných 2 stĺpcov. Do predposledného stĺpca bolo pridané 50 μl rozpúšťadla, DMSO, a do posledného kontrolného stĺpca sa napipetovalo 50 μl 1 mM roztoku HA (pH 7,5 a 6,8) alebo 50 μl 10 mM roztoku HA (pH 5,5 a 4,5).
- 3) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μl 0,25 mM roztoku meďnatých iónov v DMSO.
- 4) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 2 minúty na trepačke.
- 5) Do posledných 2 riadkov sa napipetovalo 50 μl ultračistej vody a do prvých 2 riadkov 50 μl roztoku BCS s koncentráciou 5 mM.
- 6) Absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 484 nm hneď a po uplynutí 5 minút (štart 4:30 minúty po prvom zmeraní).
- 7) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Postup sa aplikoval pri všetkých pH pufov (7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).

Tabuľka 11. Konečný obsah jamky redukcie Cu^{2+} s BCS

Konečný obsah jamky	
100 μl	Pufer
50 μl	7,8-DHF alebo DMSO alebo roztok HA
50 μl	Roztok Cu^{2+}
50 μl	Roztok BCS alebo ultračistá voda

Tabuľka 12. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení redukcie Cu^{2+} s BCS

	C_1	C_2	C_X	Rozpúšťadlo (DMSO)	Kontrolné jamky (s HA)
Vzorky s pridaným BCS	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

X	Jamky so skúmanou látkou, meďnatými iónmi a BCS, bez HA
X	Jamky so skúmanou látkou a meďnatými iónmi, bez BCS a HA
X	Jamky s meďnatými iónmi a BCS, bez skúmanej látky a HA
X	Jamky s meďnatými iónmi, bez BCS, skúmanej látky a HA
X	Jamky s BCS, meďnatými iónmi a HA, bez skúmanej látky
X	Jamky s meďnatými iónmi a HA, bez skúmanej látky a BCS

5.1.7 Chelatácia železnatých iónov (Fe^{2+})

Príprava zásobných roztokov

Heptahydrát síranu železnatého

Roztok železnatých iónov s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením navážky heptahydrátu síranu železnatého ($M_w = 278,02 \text{ g/mol}$) vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Hydroxylamín hydrochlorid (HA)

Roztok HA ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 100 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Ferozín

Roztok ferozínu ($M_w = 492,5 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky železnatých iónov, HA a pufrů sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke. Navyše zásobný roztok železnatých iónov bolo potrebné uchovávať v tme.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok železnatých iónov s koncentráciou 0,25 mM sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode.
- Roztok HA s koncentráciou 10 mM sa pripravil nariadením daného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode. Využíva sa na zabránenie oxidácie Fe^{2+} na Fe^{3+} pri pH 7,5; podľa predchádzajúcich výsledkov skupiny (*Mladěnka et al. 2010*).
- Roztok ferozínu má zhodnú koncentráciu ako zásobný roztok.
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariadením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Pracovný roztok železnatých iónov je stabilný 8 hodín.

Postup stanovenia chelatacie železnatých iónov (Tab. 13. a 14.)

- 1) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 150 μl pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 alebo 4,5).
- 2) Do testovacích stĺpcov bolo napipetované 50 μl roztoku skúmanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_X$) okrem posledného kontrolného stĺpca, kde bolo pridané 50 μl rozpúšťadla, DMSO.

- 3) V tomto kroku len pri použití pufru s pH 7,5 sa napipetovalo 50 μ l 10 mM HA do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky.
- 4) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μ l 0,25 mM roztoku železnatých iónov.
- 5) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 2 minúty na trepačke.
- 6) Do posledných 2 riadkov sa napipetovalo 50 μ l ultračistej vody a do prvých 2 riadkov 50 μ l roztoku ferozínu s koncentráciou 5 mM.
- 7) Absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 562 nm hneď a po uplynutí 5 minút (štart 4:30 minúty po prvom zmeraní).
- 8) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Postup sa aplikoval pri všetkých pH pufrov (7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).

Tabuľka 13. Konečný obsah jamky chelatacie Fe²⁺

Konečný obsah jamky	
150 μ l	Pufer
50 μ l	7,8-DHF alebo DMSO
50 μ l	Roztok HA pri pH 7,5
50 μ l	Roztok Fe ²⁺
50 μ l	Roztok ferozínu alebo ultračistá voda

Tabuľka 14. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení chelatacie Fe^{2+}

	C ₁	C ₂	C ₃	C _x	Kontrolné jamky (bez 7,8-DHF)
Vzorky s pridaným ferozínom	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

X	Jamky so skúmanou látkou, železnatými iónmi a ferozínom
X	Jamky so skúmanou látkou a železnatými iónmi, bez ferozínu
X	Jamky s ferozínom a železnatými iónmi, bez skúmanej látky
X	Jamky s železnatými iónmi, bez skúmanej látky a ferozínu

5.1.8 Chelatacia železitých iónov (Fe^{3+})

Príprava zásobných roztokov

Hexahydrát chloridu železitého

Roztok železitých iónov s koncentráciou najčastejšie v rozmedzí 2,5 – 7,5 mM sa pripravil rozpustením navážky hexahydrátu chloridu železitého ($M_w = 270,3 \text{ g/mol}$) vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Hydroxylamín hydrochlorid (HA)

Roztok HA ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 100 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Ferozín

Roztok ferozínu ($M_w = 492,5 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky železitých iónov, HA a pufer pH4,5 sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok železitých iónov s koncentráciou 0,25 mM sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode vždy tesne pred použitím.
- Roztok HA s koncentráciou 10 mM sa pripravil nariadením daného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode.
- Roztok ferozínu má zhodnú koncentráciu ako zásobný roztok
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariadením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Pracovný roztok železitých iónov je stabilný 8 hodín.

Postup stanovenia chelatácie železitých iónov (Tab. 15. a 16.)

- 1) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 150 μl pufru pH 4,5.
- 2) Do testovacích stĺpcov bolo napipetované 50 μl roztoku skúmanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_x$) okrem posledného kontrolného stĺpca, kde bolo pridané 50 μl rozpúšťadla, DMSO.
- 3) Zo zásobného roztoku Fe^{3+} sa nariadením pripravil čerstvý pracovný roztok Fe^{3+} s koncentráciou 0,25 mM.

- 4) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μl 0,25 mM roztoku železitých iónov.
- 5) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 2 minúty na trepačke.
- 6) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μl 10 mM HA.
- 7) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 1 minútu na trepačke.
- 8) Do posledných 2 riadkov sa napipetovalo 50 μl ultračistej vody a do prvých 2 riadkov 50 μl roztoku ferozínu s koncentráciou 5 mM.
- 9) Absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 562 nm hneď a po uplynutí 5 minút (štart 4:30 minúty po prvom zmeraní).
- 10) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Tabuľka 15. Konečný obsah jamky chelatačie Fe^{3+}

Konečný obsah jamky	
150 μl	Pufer
50 μl	7,8-DHF alebo DMSO
50 μl	Roztok Fe^{3+}
50 μl	Roztok HA
50 μl	Roztok ferozínu alebo ultračistá voda

Tabuľka 16. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení chelatácie Fe^{3+}

	C_1	C_2	C_3	C_x	Kontrolné jamky (bez 7,8-DHF)
Vzorky s pridaným ferozínom	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

X	Jamky so skúmanou látkou, železitými iónmi a ferozínom
X	Jamky so skúmanou látkou a železitými iónmi, bez ferozínu
X	Jamky s ferozínom a železitými iónmi, bez skúmanej látky
X	Jamky so železitými iónmi, bez skúmanej látky a ferozínu

5.1.9 Redukcia železitých iónov (Fe^{3+})

Príprava zásobných roztokov

Hexahydrát chloridu železitého

Roztok železitých iónov s koncentráciou najčastejšie v rozmedzí 2,5 – 7,5 mM sa pripravil rozpustením navážky hexahydrátu chloridu železitého ($M_w = 270,3 \text{ g/mol}$) vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Hydroxylamín hydrochlorid (HA)

Roztok HA ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 100 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

Ferozín

Roztok ferozínu ($M_w = 492,5 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme ultračistej vody.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky železitých iónov, HA a pufrů sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok železitých iónov s koncentráciou 0,25 mM sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode vždy tesne pred použitím.
- Roztok HA s koncentráciou 10 mM sa pripravil nariadením daného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode.
- Roztok ferozínu má zhodnú koncentráciu ako zásobný roztok
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariadením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Postup stanovenia redukcie železitých iónov (Tab. 17. a 18.)

- 1) Do všetkých testovacích jamiek mikrotitračnej doštičky sa napipetovalo 150 μl pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 alebo 4,5) a do jamiek **kontrolných**, posledný stĺpec, sa pridalo 150 μl pufru s **pH 4,5**.
- 2) Do testovacích stĺpcov bolo napipetované 50 μl roztoku skúmanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_X$) okrem 2 posledných stĺpcov. Do predposledného stĺpca bolo pridané 50 μl rozpúšťadla, DMSO, a do posledného kontrolného stĺpca sa napipetovalo 50 μl roztoku 10 mM HA.
- 3) Zo zásobného roztoku Fe^{3+} sa nariadením pripravil čerstvý pracovný roztok Fe^{3+} s koncentráciou 0,25 mM.

- 4) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μl 0,25 mM roztoku železitých iónov.
- 5) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 2 minúty na trepačke.
- 6) Do posledných 2 riadkov sa napipetovalo 50 μl ultračistej vody a do prvých 2 riadkov 50 μl roztoku ferozínu s koncentráciou 5 mM.
- 7) Absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 562 nm hneď a po uplynutí 5 minút (štart 4:30 minúty po prvom zmeraní).
- 8) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Postup sa aplikoval pri všetkých pH pufrov (7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).

Tabuľka 17. Konečný obsah jamky redukcie Fe^{3+}

Konečný obsah jamky	
150 μl	Pufer
50 μl	7,8-DHF alebo DMSO alebo roztok HA
50 μl	Roztok Fe^{3+}
50 μl	Roztok ferozínu alebo ultračistá voda

Tabuľka 18. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení redukcie Fe³⁺

	C ₁	C ₂	C _x	Rozpúšťadlo (DMSO)	Kontrolné jamky (s HA)
Vzorky s pridaným ferozínom	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X

X	Jamky so skúmanou látkou, železitými iónmi a ferozínom, bez HA
X	Jamky so skúmanou látkou a železitými iónmi, bez ferozínu a HA
X	Jamky s železitými iónmi a ferozínom, bez skúmanej látky a HA
X	Jamky s železitými iónmi, bez ferozínu, skúmanej látky a HA
X	Jamky s ferozínom a železitými iónmi a HA, bez skúmanej látky
X	Jamky s železitými iónmi a HA, bez skúmanej látky a ferozínu

5.1.10 Chelatácia zinočnatých iónov (Zn²⁺)

Príprava zásobných roztokov

Chlorid zinočnatý

Roztok zinočnatých iónov s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením navážky chloridu zinočnatého ($M_w = 136,31 \text{ g/mol}$) vo vypočítanom objeme ultračistej vody. Následne sa zriedil ultračistou vodou na koncentráciu 1 mM.

Ditizón

Roztok ditizónu ($M_w = 256,33 \text{ g/mol}$) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

7,8-DHF

Roztok testovanej látky, 7,8-DHF, ($M_w = 254,24$ g/mol) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením jeho navážky vo vypočítanom objeme DMSO.

Zásobné roztoky zinočnatých iónov, ditizón a pufry sa uchovávali v chladničke a zásobný roztok 7,8-DHF v mrazničke.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok zinočnatých iónov s koncentráciou 0,06 mM sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku v čase potreby v ultračistej vode.
- Roztok ditizónu s koncentráciou 0,25 mM sa pripravil nariadením daného zásobného roztoku v čase potreby v DMSO.
- Roztoky testovanej látky, 7,8-DHF, v požadovaných koncentráciách sa pripravili nariadením zásobného roztoku v čase potreby v rovnakom rozpúšťadle ako zásobný roztok testovanej látky.

Postup stanovenia chelatacie zinočnatých iónov (Tab. 19. a 20.)

- 1) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 150 μ l pufry (pH 7,5; 6,8; 5,5 alebo 4,5).
- 2) Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých sa uskutočňovalo meranie sa napipetovalo 50 μ l 0,06 mM roztoku zinočnatých iónov **okrem posledného stĺpca**. Do posledného stĺpca bolo pridané 50 μ l ultračistej vody.
- 3) Do testovacích stĺpcov bolo napipetované 50 μ l roztoku skúmanej látky, 7,8-DHF, podľa požadovaných koncentrácií ($C_1 - C_x$) okrem posledných 2 stĺpcov, kde bolo pridané 50 μ l rozpúšťadla, DMSO.
- 4) Mikrotitračná doštička sa nechala trepať 2 minúty na trepačke.
- 5) Do posledného riadku sa napipetovalo 50 μ l DMSO a do prvých 3 riadkov 50 μ l roztoku ditizónu s koncentráciou 0,25 mM.
- 6) Absorbancia bola zmeraná pri vlnových dĺžkach 540 a 590 nm (pH 7,5; 6,8 a 5,5) a 530 a 570 nm (pH 4,5) hneď a po uplynutí 5 minút (štart 4:30 po prvom zmeraní).
- 7) Vypočítala sa chelatačná účinnosť v %.

Postup sa aplikoval pri všetkých pH pufrův (7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).

Tabuľka 19. Konečný obsah jamky chelatačie Zn²⁺

Konečný obsah jamky	
150 µl	Pufer
50 µl	Roztok Zn ²⁺ alebo ultračistá voda
50 µl	7,8-DHF alebo DMSO
50 µl	Roztok ditizónu alebo DMSO

Tabuľka 20. Schéma mikrotitračnej doštičky pri stanovení chelatačie Zn²⁺

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C _x	0+ pozitívna kontrola (bez 7,8- DHF)	0- negatívna kontrola (bez 7,8-DHF a Zn ²⁺)
Vzorky s pridaným ditizónom	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕
	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕
	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕
Slepé vzorky	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕

✕	Jamky so skúmanou látkou, zinočnatými iónmi a ditizónom
✕	Jamky so skúmanou látkou a zinočnatými iónmi, bez ditizónu
✕	Jamky so zinočnatými iónmi a ditizónom, bez skúmanej látky
✕	Jamky so zinočnatými iónmi, bez ditizónu a skúmanej látky
✕	Jamky s ditizónom, bez skúmanej látky a zinočnatých iónov
✕	Jamky bez ditizónu, skúmanej látky a zinočnatých iónov

5.2 Vplyv 7,8-DHF na meďou a železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

5.2.1 Chemikálie

- Chlorid železitý FeCl_3 (Fe^{3+})
- Pentahydrát síranu meďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+})
- Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová (2,3-DHBA)
- Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (2,5-DHBA)
- Katechol
- Peroxid vodíku 30 % H_2O_2
- Kyselina salicylová
- Kyselina fosforečná 85 % H_3PO_4
- Disodná soľ etyléndiamíntetraoctovej kyseliny (Na_2EDTA)
- Kyselina chlorovodíková 35 % HCl ; Penta s.r.o., ČR
- Trietylamin
- Chemikálie na prípravu pufrov:
 - Kyselina octová CH_3COOH ; Penta s.r.o., ČR
 - Octan sodný bezvodý $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$; Penta s.r.o., ČR
 - Tris(hydroxymetyl)aminometán (TRIS)
- Rozpúšťadlá:
 - Acetonitril; Fisher Chemical, UK
 - Metanol; Fisher Chemical, UK
 - Ultračistá voda bola pripravená pomocou prístroja Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)
- Testovaná látka:
 - 7,8-DHF

Pokiaľ nie je uvedené inak, tak všetky chemikálie boli získané od firmy Sigma-Aldrich, Nemecko.

5.2.2 Prístrojové vybavenie

- Analytické váhy Kern ALT 220-4NM

- Laboratórna ultrazvuková vaňa Bandelin Sonorex
- Trepačka pre skúmavky a mikroskúmavky typu Eppendorf IKA® VORTEX GENIUS 3
- pH-meter PH 538
- Pumpa ESA model 582 (ESA, Massachusetts, USA)
- Monolitická HPLC kolóna Onyx C8 - 100 x 4,6 mm (Phenomenex, Kalifornia, USA)
- Coulometrický detektor Coulochem III (ESA, Massachusetts, USA)

5.2.3 Materiál potrebný na prevedenie

- Mikroskúmavky 1,5 ml
- Centrifugačné skúmavky 15 ml a 50 ml
- Automatické jednokanálové pipety s rôznym rozsahom objemu
- Špičky na pipetovanie
- Mikrostriekačka 50 μ L (Hamilton Company, Nevada, USA)

5.2.4 Metodický postup experimentu

Príprava zásobných roztokov

- Roztok železitých iónov (Fe^{3+}) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením navážky chloridu železitého ($M_w = 162,2$ g/mol) v ultračistej vode.
- Roztok meďnatých iónov (Cu^{2+}) s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením navážky pentahydrátu síranu meďnatého ($M_w = 249,69$ g/mol) v ultračistej vode.
- Roztok kyseliny salicylovej ($M_w = 138,12$ g/mol) s koncentráciou 66,67 mM sa pripravil rozpustením navážky v metanole.
- Roztoky štandardov (kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová a katechol) s koncentráciou 10 mM sa pripravili rozpustením ich navážok v ultračistej vode.
- 5 mM roztok pufru pH 7,5 sa pripravil rozpustením navážky TRIS ($M_w = 121,14$ g/mol) v ultračistej vode.
- Acetátový pufer s pH 4,5 sa pripravil zmiešaním 15 mM vodného roztoku octanu sodného a 27,3 mM vodného roztoku kyseliny octovej.

- Roztok skúmanej látky, 7,8-DHF, s koncentráciou 5 mM sa pripravil rozpustením navážky v metanole. Následne bol nariadený v čase potreby na požadované koncentrácie metanolom.

Správnosť pH pufrův bola skontrolovaná pH metrom.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok železitých iónov s koncentráciou 1 mM sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku (FeCl_3) v ultračistej vode.
- Roztok meďnatých iónov s koncentráciou 0,04 mM (40 μM) sa pripravil nariadením príslušného zásobného roztoku ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) v ultračistej vode.
- Pri experimente so **železitými** iónmi boli roztoky skúmanej látky, 7,8.DHF, pripravené zriedením zásobného roztoku metanolom na koncentrácie:

1,25 μM ; 2,5 μM ; 12,5 μM ; 125 μM ; 250 μM ; 500 μM ; 2,5 mM; 5 mM

- Pri experimente s **meďnatými** iónmi boli roztoky skúmanej látky, 7,8.DHF, pripravené zriedením zásobného roztoku metanolom na koncentrácie:

0,05 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 500 μM ; 1 mM

- Príprava roztoku štandardov zmiešaním (v mikroskúmavke):

- 27 μl 10 μM roztoku katecholu
- 130 μl 1 μM roztoku 2,5-DHBA
- 130 μl 1 μM 2,3-DHBA
- 713 μl ultračistej vody

- Príprava kontrolných vzoriek zmiešaním (v mikroskúmavke):

- 700 μl pufru (pH 7,5 alebo 4,5)
- 200 μl metanolu
- 50 μl 1 mM Fe^{3+} alebo 50 μl 40 μM Cu^{2+}
- 45 μl 66,67 mM kyseliny salicylovej v metanole
- 5 μl peroxidu vodíku

- Príprava vzoriek zmiešaním (v mikroskúmavke):
 - 700 μl pufru (pH 7,5 alebo 4,5)
 - 200 μl testovanej látky, 7,8-DHF, s rôznou koncentráciou
 - 50 μl 1 mM Fe^{3+} alebo 50 μl 40 μM Cu^{2+}
 - 45 μl 66,67 mM kyseliny salicylovej v metanole
 - 5 μl peroxidu vodíku

Príprava mobilnej fázy

- Príprava 5 mM pufru H_3PO_4 zmiešaním (v kadičke):
 - 68 μl 85 % kyseliny fosforečnej
 - 199,932 ml ultračistej vody
 - 10 ml 20 mM vodného roztoku Na_2EDTA
 - nastavenie pH roztoku na 2,85 pomocou trietylamínu

Vzniknutý pufer sa prefiltraval vákuovou filtráciou pomocou zostavenej aparatúry. Takto pripravený 5 mM pufer H_3PO_4 (pH 2,85) sa v odmernej banke zmiešal s acetonitrilom v pomere 93:7. Táto vzniknutá mobilná fáza sa nechala 5 minút v ultrazvukovom kúpeli.

Postup vykonanie experimentu

- 1) Prístroj na HPLC metódu sa nastavil na izokratický režim s prietokovou rýchlosťou 1,0 ml/min.
- 2) V mikroskúmavke sa pripravila **zmes štandardov** (catechol, 2,3-DHBA, 2,5-DHBA vo vode).
- 3) Takto pripravená zmes štandardov bola aplikovaná Hamiltonovou mikrostriekačkou v množstve 20 μl do HPLC prístroja. Po analýze sa zmerala veľkosť plôch píkov štandardov so známou koncentráciou.
- 4) Krok 2, postup prípravy zmesi štandardov a krok 3, aplikácia zmesi do HPLC sa opakovali trikrát. Výsledky z meraní plôch píkov sa priemerovali.
- 5) V mikroskúmavke sa pripravili **kontrolné vzorky** (slepý pokus).
- 6) Fentonova reakcia bola iniciovaná pridaním peroxidu vodíka. Za stáleho miešania reakcia prebiehala 3 minúty pri laboratórnej teplote.

- 7) Po uplynutí časového limitu 3 minúty sa z mikroskúmaviek Hamiltonovou mikrostriekačkou odobralo 20 μ l zmesi a aplikovalo do HPLC prístroja. Zmerali sa plochy píkov analytov odpovedajúce katecholu, 2,3-DHBA a 2,5-DHBA.
- 8) Krok 5, postup prípravy kontrolných vzoriek, krok 6, priebeh Fentonovej reakcie a krok 7, aplikácia do HPLC a analýza, sa opakovali trikrát. Výsledky z meraní plôch píkov sa spriemerovali.
- 9) V mikroskúmvkách boli pripravené roztoky **skúmanej látky**, ktoré boli zložením podobné kontrolným vzorkám, ale namiesto metanolu boli použité roztoky testovanej látky v metanole s rôznymi koncentraciami.
- 10) Fentonova reakcia bola iniciovaná pridaním peroxidu vodíka. Za stáleho miešania reakcia prebiehala 3 minúty pri laboratórnej teplote.
- 11) Po uplynutí časového limitu 3 minúty sa z mikroskúmaviek Hamiltonovou mikrostriekačkou odobralo 20 μ l zmesi a aplikovalo do HPLC prístroja. Po analýze sa zmerali plochy píkov analytov.
- 12) Krok 9, príprava vzorky, 7,8-DHF, krok 10, priebeh Fentonovej reakcie a krok 11, aplikácia do HPLC a analýza, sa opakovali trikrát pri všetkých koncentraciách. Výsledky z meraní plôch píkov sa spriemerovali.
- 13) Z výsledných hodnôt plôch píkov sa zostrojil graf odrážajúci antioxidačné alebo prooxidačné vlastnosti látky pri daných koncentraciách.

5.3 Vplyv 7,8-DHF na med'ou katalyzovanú hemolýzu

5.3.1 Chemikálie

- Pentahydrát síranu meďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+})
- Glukóza
- Heparín 5000 IU/ml bol zakúpený ako originálny registrovaný preparát od Zentivy (ČR)
- Chemikálie pre prípravu pufrov:
 - Dihydrogénfosforečnan draselný KH_2PO_4
 - Hydrogénfosforečnan draselný KHPO_4 ; Penta s.r.o., ČR
 - Triton X-100 10 % vodný roztok
 - Ditiotreitol
 - Disodná soľ etyléndiamíntetraoctovej kyseliny (Na_2EDTA)
 - Laktát sodný
 - Nikotínnamid adenín dinukleotid (NAD^+); Toronto Research Chemicals, Kanada
 - Tris(hydroxymetyl)aminometán (TRIS)
- Rozpúšťadlá:
 - Dimethylsulfoxid (DMSO); Penta s.r.o., ČR
 - Fyziologický roztok bol zakúpený ako originálny registrovaný preparát od B.Braun, Nemecko
 - Ultračistá voda bola pripravená pomocou prístroja Milli-Q RG; Merck Millipore, Massachusetts, USA
- Testovaná látka:
 - 7,8-DHF

Pokiaľ nie je uvedené inak, tak všetky chemikálie boli získané od firmy Sigma-Aldrich, Nemecko.

- Biologický materiál:
 - Potkania krv (samce kmeňa Wistar: Han, VELAZ, s.r.o., ČR) získaná ako vedľajší produkt z experimentov, pri ktorých sa využíva potkania aorta na testovanie vazodilatačných účinkov (schválený projekt MŠMT-4937_2019-9)

- Ľudská krv od zdravých dobrovoľníkov (štúdiá bola schválená etickou komisiou FAF UK HK, 31.05.2019); všetci dobrovoľníci podpísali informovaný súhlas účasti na tejto štúdiu

5.3.2 Prístrojové vybavenie

- Analytické váhy Kern ALT 220-4NM
- Laboratórna ultrazvuková vaňa Bandelin Sonorex
- Trepačka pre skúmavky a mikroskúmavky typu Eppendorf IKA® VORTEX GENIUS 3
- Spektrofotometr pre mikrotitračné doštičky Hidex Sense Multimodal Microplate Reader
- Centrifúga MIKRO 22R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Nemecko)
- Centrifúga VWR Compact Star CS4 (VWR International Ltd, Spojené Kráľovstvo)
- Inkubátor Hood TH 15 (Edmund Bühler GmbH, Nemecko)

5.3.3 Materiál potrebný na prevedenie

- Mikroskúmavky 1,5 ml a 5,0 ml
- Centrifugačné skúmavky 15 ml a 50 ml
- Automatické pipety s rôznym rozsahom objemu
- Multikanálové pipety s rôznym objemom
- Špičky na pipetovanie
- Mikrotitračné 96-jamkové doštičky

5.3.4 Metodický postup experimentu

Príprava zásobných roztokov

- Roztok meďnatých iónov (Cu^{2+}) s koncentráciou 10 mM sa pripravil rozpustením navážky pentahydrátu síranu meďnatého ($M_w = 249,69 \text{ g/mol}$) vo fyziologickom roztoku.
- Fosfátový pufer s pH 7,8 sa pripravil zmiešaním 8,5 % 200 mM roztoku dihydrogénfosforečnanu draselného a 91,5 % 200 mM roztoku hydrogénfosforečnanu draselného.

- Lyzačný pufer sa pripravil zmiešaním 200 mM fosfátového pufru s pH 7,8, 10 % vodného roztoku Tritonu X-100, 0,1 M roztoku Na₂EDTA, 1 M roztoku ditiotritolu a ultračistej vody.
- Reakčný pufer s pH 8,9, vodný roztok sa pripravil zmiešaním 2 M laktátu, 6 mM NAD⁺ a 0,1 M vodného roztoku TRIS pH 8,9.
- Roztok skúmanej látky, 7,8-DHF, s koncentráciou 100 mM sa pripravil rozpustením navážky v DMSO. Následne bol nariedený v čase potreby na požadované koncentrácie DMSO.

Príprava pracovných roztokov

- Roztok glukózy vo fyziologickom roztoku o objeme asi 50 ml a s koncentráciou 1 mM sa zahrial na 37°C.
- Pripravený zásobný roztok pentahydrátu síranu meďnatého o objeme asi 50 ml a s koncentráciou 10 mM sa zahrial na 37°C.
- Fyziologický roztok o objeme asi 25 ml sa zahrial na 37°C.
- Podľa počtu vzoriek sa pripravilo potrebné množstvo lyzačného pufru.

(1 vzorka = 950 µl pufru)

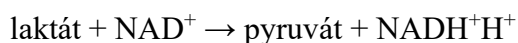
Postup vykonanie experimentu

- 1) Hneď po odbere potkanej alebo ľudskej krvi sa vložila do centrifúgy (VWR CS4) a nechala sa centrifugovať pri 5 400 otáčkach/min. (2 700 g) po dobu 10 minút.
- 2) Zo skúmavky sa odstránila krvná plazma.
- 3) Zvyšné erytrocyty sa zmiešali s dvojnásobným množstvom fyziologického roztoku zahriatym na 37°C a nechalo sa opäť centrifugovať pri 5 400 otáčkach/min. (2 700 g) po dobu 10 minút.
- 4) Supernatant sa odstránil a znovu sa zopakoval postup podľa kroku 3.
- 5) Po poslednom odstránení supernatantu sa očistené erytrocyty preniesli pipetou (3,5 ml) do 50 ml skúmavky.
- 6) Do skúmaviek bolo pridané 20 µl heparínu (5000 IU/1 ml) na 1 ml (70 µl) suspenzie erytrocytov, aby sa zabránilo ich agregácii.
- 7) Erytrocyty sa zmiešali s 9-násobným prebytkom (31,5 ml) 1 mM roztoku glukózy vo fyziologickom roztoku, ktorý bol zahriaty na 37°C.

- 8) Duplicitne sa pripravili mikroskúmavky s objemom 1,5 ml od každej koncentrácie (pred a po lýze), celkovo 4 na 1 koncentráciu.
- 9) Pomocou reverzného pipetovania sa do pripravených mikroskúmviek prenieslo 0,940 ml suspenzie erytrocytov (z kroku 7).
- 10) Do tých istých mikroskúmviek sa tiež napipetovalo 10 μl testovanej látky v požadovaných koncentráciách a do kontrolných vzoriek sa napipetovalo 10 μl rozpúšťadla, DMSO. Každá vzorka sa pripravila duplicitne. Následne sa pridalo 50 μl 10 mM roztoku Cu^{2+} , mimo kontrolných vzoriek, ktoré obsahovali fyziologický roztok. Pripravili sa teda 2 pozitívne slepé vzorky (DMSO + Cu^{2+}) a 2 negatívne slepé vzorky (DMSO + fyziologický roztok).
- 11) Séria vzoriek sa potom nechala 4 hodiny inkubovať pri teplote 37°C v inkubátore pri 100 ot./min.
- 12) Po ukončení inkubácie sa vzorky preniesli do centrifúgy (MIKRO 22R), ktorá sa nastavila na 5 400 otáčkach/min. (1 950 g) po dobu 10 minút.
- 13) Z každej vzorky sa do vopred pripravenej mikroskúmvky napipetovalo 250 μl supernatantu a zmrazilo sa na -80°C .
- 14) Z pôvodných vzoriek sa odstránil zvyšný supernatant a pridalo sa 0,950 ml lyzačného pufru do pôvodného objemu k zvyšným erytrocytom. Premiešali sa na vortexe a nechali 20 minút stáť pri laboratórnej teplote.
- 15) Vzorky sa opäť preniesli do centrifúgy (MIKRO 22R), ktorá sa nastavila na 10 000 otáčok/min. (6 700 g) po dobu 10 minút.
- 16) Po centrifugácii sa opäť odobralo 250 μl z každej vzorky a nechalo sa zmraziť na -80°C .

Stanovenie laktátdehydrogenázovej (LDH) aktivity:

- Princípom stanovenia LDH aktivity je reakcia:



NAD^+ – nikotínamidadenínukleotid a z neho vytvorený produkt reakcie

NADH^+H^+ sa stanovuje spektrofotometricky

- V deň merania sa pripravil reakčný pufer a približne 1 hodinu pred začatím experimentu sa z mrazničky vybrali všetky vzorky, aby sa rozmrazili.

- Rozmrazené vzorky, ktoré boli odobrané pred pridaním lyzačného pufru sa zriedili fyziologickým roztokom 1:1 (z kroku 13) a vzorky odobrané po pridaní lyzačného pufru v pomere 1:5 (z kroku 16).
- Na mikrotitračnú doštičku sa duplicitne napipetovalo 50 μ l, vopred na vortexe primiešanej zriedenej vzorky.
- Ihneď po pridaní 300 μ l reakčného pufru sa zmerala absorbancia pri 340 nm.

5.4 Matematicko-štatistické spracovanie výsledkov

5.4.1 Experimentálne stanovenie chelatácie a redukcie iónov

Všetky výpočty boli uskutočnené prostredníctvom programu MS Excel. Chelatačná účinnosť jednotlivých koncentrácií testovanej látky pri rôznych pH bola vyjadrená grafickým znázornením za použitia programu GraphPad Prism 10.1.1 (GraphPad Software, USA). Pre štatistické porovnanie bol použitý 95 % konfidenčný interval. Pri percentuálnom výpočte miery chelatácie bola vypočítaná pomocou nasledujúcej rovnice:

$$\text{chelatácia [\%]} = \left(1 - \frac{A_x - \overline{A_N}}{A_P - \overline{A_N}} \right) \times 100$$

A_x – absorbanca vzorky (ión + 7,8-DHF + spektrofotometrický indikátor)

A_N – absorbanca negatívnej kontroly (spektrofotometrický indikátor)

A_P – absorbanca pozitívnej kontroly (ión + spektrofotometrický indikátor)

Množstvo nechelatovaného iónu sa vypočíta ako rozdiel absorbancie medzi testovanou látkou (s indikátorom) a slepou vzorkou testovanej látky (bez indikátoru) delené rozdielom absorbancie kontrolného vzorku (bez testovanej látky so známym množstvom iónov) a slepou vzorkou kontrolného vzorku (bez indikátoru), pričom od neho boli ešte odčítané rozdiely medzi absorbanciou negatívnych vzoriek s a bez indikátoru.

Rozdiely pri redukcii boli overené pomocou študentova T-testu pri štatistickej významnosti $p < 0,05$.

Výsledky sú uvádzané ako priemer \pm smerodajná odchýlka vypočítaná podľa vzorca $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$.

5.4.2 Vplyv 7,8-DHF na med'ou a železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

Antioxidačný účinok resp. percentá zníženia alebo prooxidačný účinok resp. percentá zvýšenia produkcie hydroxylových radikálov sa vypočítali zo súčtu koncentrácií katecholu, 2,3-DHBA a 2,5-DHBA medzi testovanou vzorkou a kontrolnou vzorkou resp. slepým pokusom (namiesto testovanej látky obsahovala len rozpúšťadlo).

Výsledky (antioxidačná a prooxidačná aktivita) sú uvádzané ako priemer \pm smerodajná odchýlka ako v prípade chelatačných experimentov. Pre grafické znázornenie bol použitý program GraphPad Prism 10.1.1. Pomocou metódy ANOVA nasledovanej Dunnettovým post-hoc testom sa vykonalo štatistické porovnanie produkcie hydroxylových radikálov.

5.4.3 Vplyv 7,8-DHF na med'ou katalyzovanú hemolýzu

Celkové percento hemolýzy červených krviniek sa určilo pomocou smerníc získaných meraním LDH aktivity podľa vzorca $\frac{2 \times k_{BL}}{2 \times k_{BL} + 6 \times k_{PL}}$

k_{BL} – vzorka bez lýzy (riedenie 1:1)

k_{PL} – vzorka po lýze (riedenie 1:5)

Porovnanie miery hemolýzy vzoriek so skúmanou látkou s pozitívnymi alebo negatívnymi slepým vzorkami (buď s Cu^{2+} alebo bez Cu^{2+} , iba fyziologickým roztokom) sa uskutočnilo podľa vzorca $1 - \frac{\% \text{ lýzy vo vzorkách}}{\% \text{ lýzy v slepých vzorkách}}$, ktorý slúži na zistenie hemolytickej aktivity testovanej látky.

Výsledky sú opäť uvádzané ako priemer \pm smerodajná odchýlka a pre grafické znázornenie bol použitý program GraphPad Prism 10.1.1. Pomocou študentova T-testu sa stanovila štatistická významnosť výsledkov porovnaním celkovej hemolýzy jednotlivých vzoriek a slepých vzoriek.

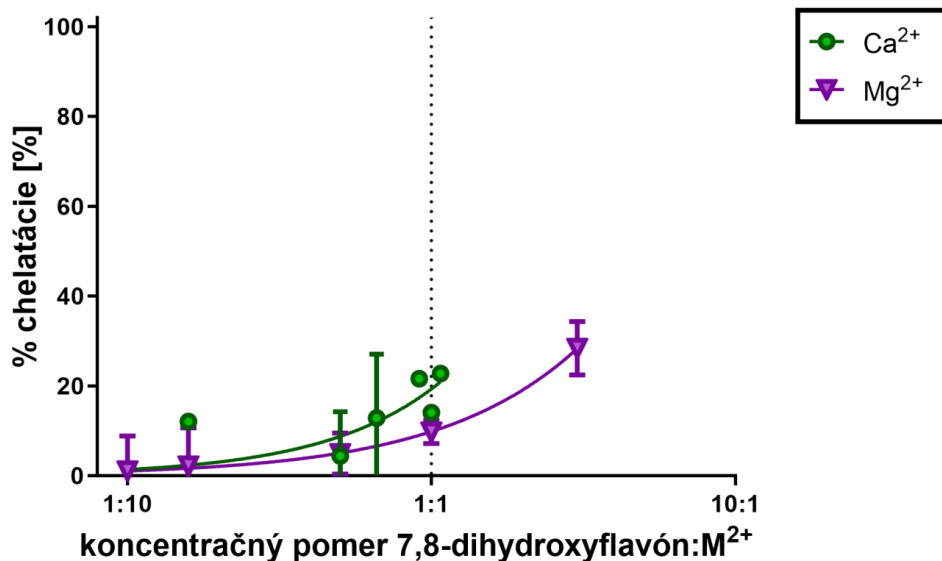
6 VÝSLEDKY

6.1 Experimentálne stanovenie chelatácie a redukcie iónov

6.1.1 Chelatácia vápenatých a horečnatých iónov (Ca^{2+} a Mg^{2+})

V prvom experimente bola zisťovaná chelatačná schopnosť testovanej látky, 7,8-DHF, s iónmi vápnika a horčíka. Indikátor účinnosti resp. neúčinnosti chelatácie skúmanej látky bol o-kresoltalein komplexon, ktorý tvoril s danými iónmi fialovoruzový komplex. V prípade, ak testovaná látka bola schopná viazať ióny vznikol žlto-sfarbený komplex.

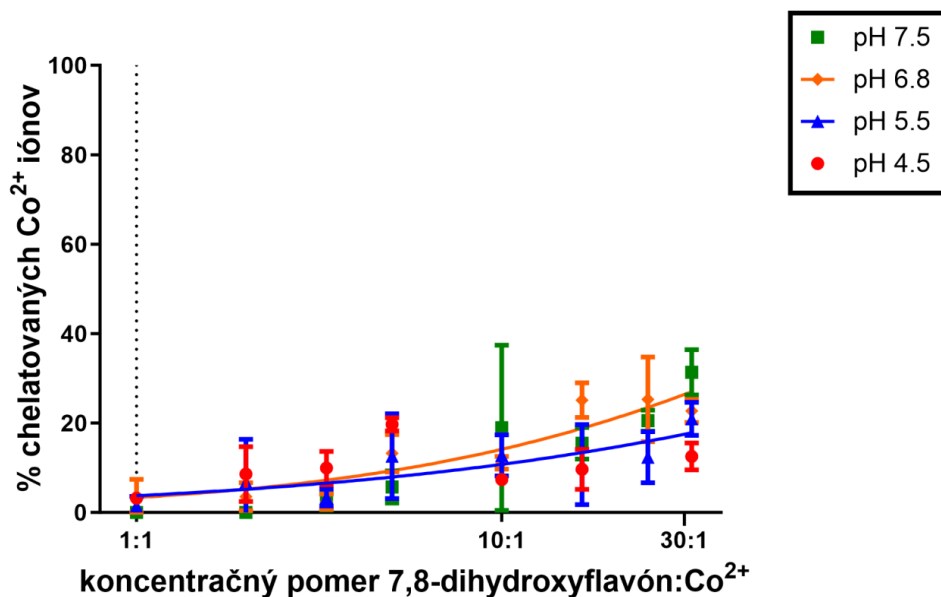
Chelatácia sa stanovila zmeraním nechelatovaných (voľných) iónov vápniku alebo horčíku pri vlnovej dĺžke 573 nm pre Ca^{2+} a 568 nm pre Mg^{2+} pri pH 7,5. Z priloženého grafu (**Obr. 13.**) je zjavné, že chelatačná aktivita 7,8-DHF je nevýrazná. Pri pomere 1:1 látka chelatovala vápenaté ióny približne na 20 % a horečnaté ióny asi na 10 %. Pri pomere 5:1 zlúčenina viazala horčíka asi na 30 %. S rastúcou koncentráciou sa afinita k daným iónom zvyšovala. Látka vykazovala väčší potenciál chelatovať vápenaté ióny. Vyššie koncentrácie nebolo možné zmerať, pretože dochádzalo v jamkách k precipitácii. Z celkového hľadiska 7,8-DHF má zanedbateľnú afinitu k vápenatým a horečnatým iónom.



Obr. 13. Účinnosť chelatácie Ca^{2+} a Mg^{2+} 7,8-DHF pri pH 7,5. Graf vyjadruje závislosť množstva chelatovaného iónu v % na koncentračnom pomere chelátora, 7,8-DHF, k chelatovanému iónu. Miera chelatácie bola stanovená pri vlnovej dĺžke 573 nm pre Ca^{2+} a 568 nm pre Mg^{2+} v čase 5 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm smerodajná odchýlka.

6.1.2 Chelatácia kobaľnatých iónov (Co^{2+})

Chelatácia sa stanovila zmeraním nechelatovaných (voľných) iónov kobaltu pri dvoch vlnových dĺžkach 490 nm a 540 nm pri štyroch rôznych pH prostrediach, teda 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Chelatácia skúmanej látky v pomere 1:1 je zanedbateľná. So zvyšujúcou sa koncentráciou látky sa zvýšila aj chelatácia, avšak rozdiely chelatácie medzi jednotlivými pH nie sú významné. Vyššia účinnosť bolo dosiahnutá pri pH 7,5 a 6,8. Z výsledkov vyplýva, že 7,8-DHF nepredisponuje vysokou afinitou ku kobaľnatým iónom. (**Obr. 14.**)

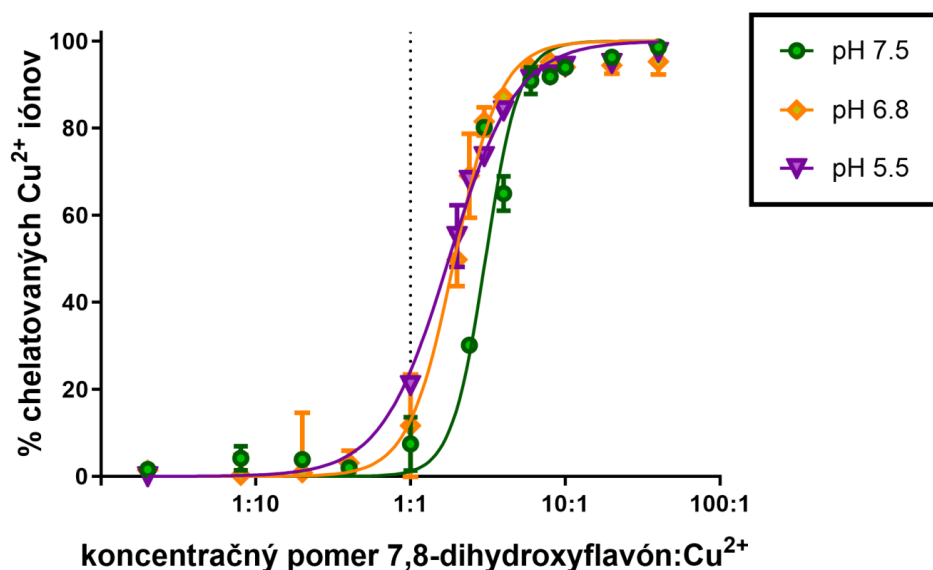


Obr. 14. Účinnosť chelatácie Co²⁺ 7,8-DHF pri pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Graf vyjadruje závislosť množstva chelatovaného iónu v % na koncentračnom pomere chelátora, 7,8-DHF, k Co²⁺. Miera chelatácie bola stanovená pri vlnovej dĺžke 490 nm v čase 5 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka. Chelatačné krivky pri pH 4,5 a 7,5 nebolo možné zo získaných dát pripraviť.

6.1.3 Chelatácia meďnatých iónov s HEM (Cu²⁺)

Indikátor účinnosti resp. neúčinnosti chelatácie skúmanej látky bol hematoxylín, ktorý tvoril s iónmi tmavomodrý komplex. V prípade, ak testovaná látka bola schopná viazať ióny vznikol žlto-sfarbený komplex. Chelatácia sa stanovila zmeraním nechelatovaných (voľných) iónov medi pri vlnových dĺžkach 610 nm (pH 7,5); 590 nm (pH 6,8) a 595 nm (pH 5,5). Táto metóda slúži na overenie, že 7,8-DHF je schopný chelatovať meďnaté ióny. Ide o menej kompetitívny chelátor ako BCS (**vid' kap. 7**).

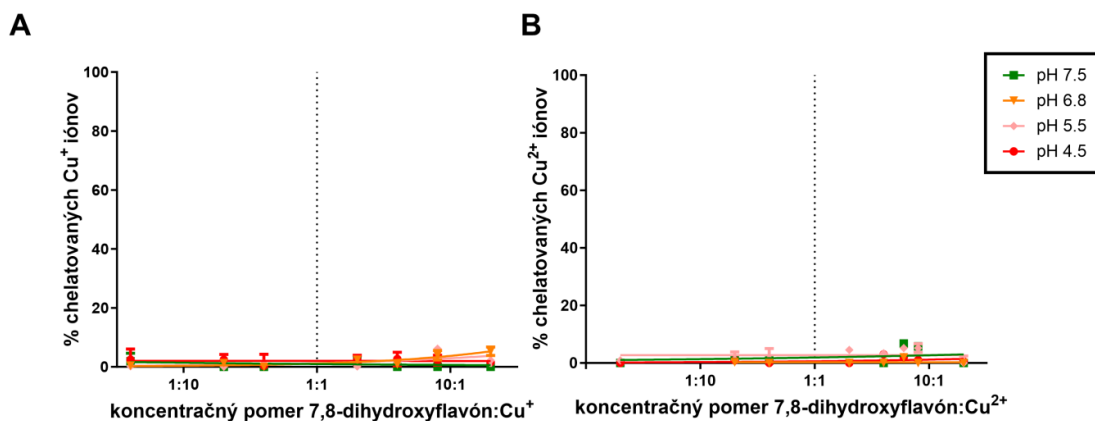
Pri všetkých pH prostrediach v pomere 1:1 bola zistená určitá chelatačná účinnosť skúmanej látky okrem pH 7,5. Pri pomere 10:1 látka bola schopná chelatovať meď na 100 % pri všetkých pH prostrediach. Najvyššiu afinitu k meďnatým iónom mala skúmaná látka pri pH 5,5 (**Obr. 15**).



Obr. 15. Účinnosť chelatácie Cu²⁺ 7,8-DHF metódou HEM pri pH 7,5; 6,8 a 5,5. Graf vyjadruje závislosť množstva chelatovaného iónu v % na koncentračnom pomere chelátora, 7,8-DHF, k Cu²⁺. Miera chelatácie bola stanovená pri vlnových dĺžkach 610 nm (pH 7,5); 590 nm (pH 6,8) a 595 nm (pH 5,5) v čase 7 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

6.1.4 Chelatácia meďných a meďnatých iónov s BCS (Cu¹⁺ a Cu²⁺)

Indikátor účinnosti resp. neúčinnosti chelatácie skúmanej látky bol BCS, ktorý tvoril s iónmi oranžový komplex. V prípade, ak by testovaná látka bola schopná viazať ióny vznikol by žltosfarbený komplex. Chelatácia sa stanovila zmeraním nechelatovaných (voľných) iónov meďi pri vlnovej dĺžke 484 nm pre oba ióny zvlášť. 7,8-DHF nevykazoval afinitu k meďným iónom a nechelatoval ani vo vyšších koncentráciách. V prípade meďnatých iónov testovaná látka, taktiež, nechelatovala pri žiadnej koncentrácii (**Obr. 16.**).



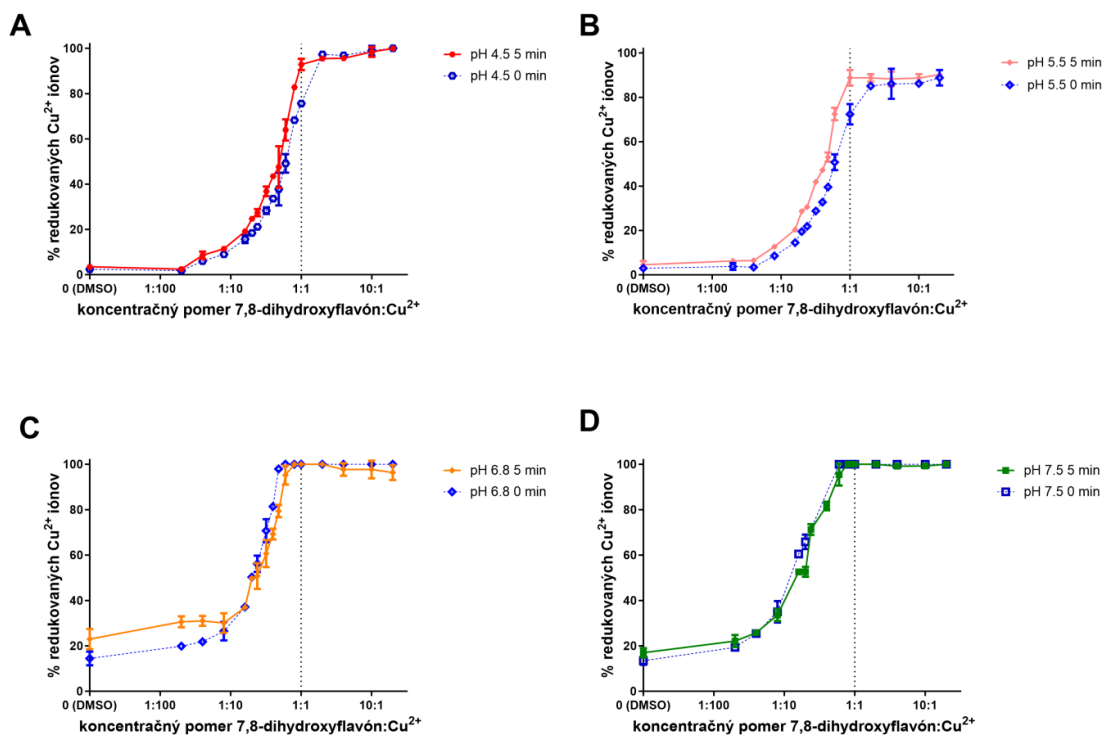
Obr. 16. Účinnosť chelatácie Cu^{1+} a Cu^{2+} 7,8-DHF metódou BCS pri pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Graf vyjadruje závislosť množstva chelatovaného iónu v % na koncentračnom pomere chelátora, 7,8-DHF, k Cu^{2+} a Cu^{1+} . Miera chelatácie bola stanovená pri vlnovej dĺžke 484 nm pre oba ióny v čase 5 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm smerodajná odchýlka.

6.1.5 Redukcia mednatých iónov s BCS (Cu^{2+})

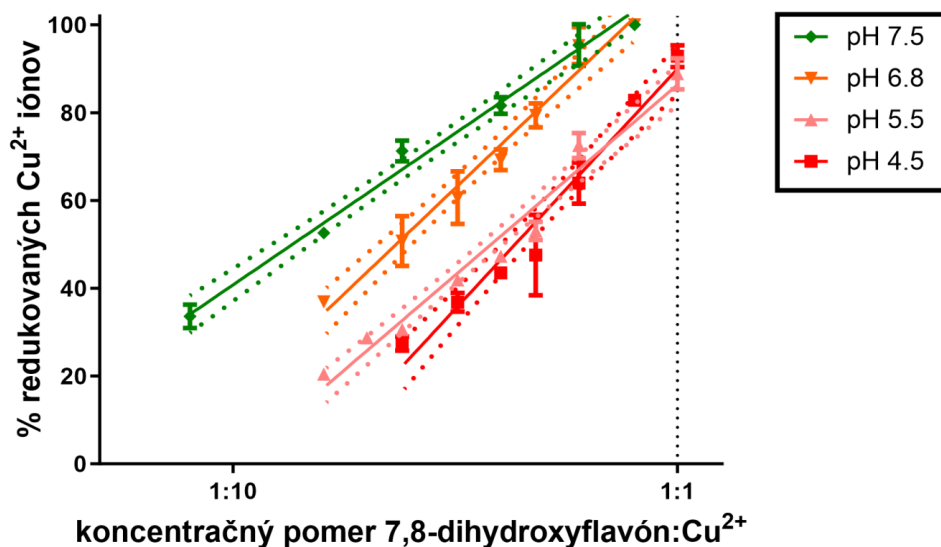
Redukčná schopnosť testovanej látky sa merala pri vlnovej dĺžke 484 nm. Redukciou mednatých iónov (Cu^{2+}) na medné (Cu^{1+}) sa podporuje reakčný mechanizmus Fentonovej reakcie, a tým tvorba voľných radikálov, čo je vo väčšine prípadov nežiaduce (**vid' kap. 3.4**).

Pri pH 7,5 a 6,8 v pomere 1:1 redukcia bola 100 % v čase 0 aj 5 minút. Rozdiel krivky v čase 0 a 5 minút je nevýrazný, tvar a strmosť sú takmer zhodné. Pri pH 5,5 a 4,5 sa redukčná aktivita časom zvýšila a v pomere 1:1 dosiahla asi 90 %. Pri všetkých pH so zvyšujúcou sa koncentráciou 7,8-DHF signifikantne stúpala miera redukcie (**Obr. 17**).

Z výsledkov vyplýva, že látka pri všetkých pH prostrediach so zvyšujúcou sa koncentráciou vykazovala vysokú redukčnú aktivitu k mednatým iónom. Pri štatistickom porovnaní sa ukázalo, že sa schopnosť redukovať mednaté ióny zvyšuje so zvyšujúcim sa pH (**Obr. 18**).



Obr. 17. Účinnosť redukcie Cu^{2+} 7,8-DHF metódou BCS pri pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Graf vyjadruje závislosť množstva redukovaného iónu v % na koncentračnom pomere skúmaného redukčného činidla, 7,8-DHF, k Cu^{2+} . Miera redukcie bola stanovená pri vlnovej dĺžke 484 nm v čase 0 a 5 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm smerodajná odchýlka.

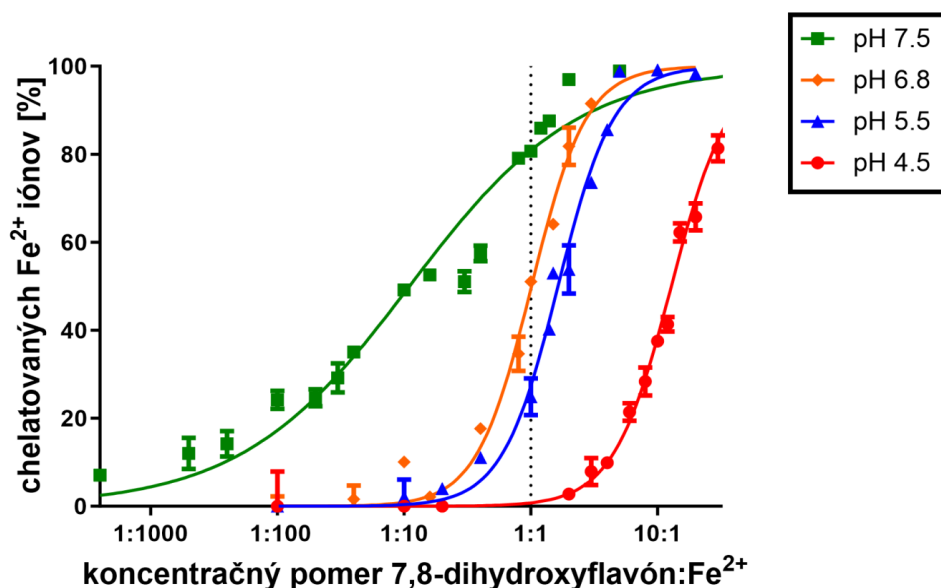


Obr. 18. Porovnanie redukčnej aktivity 7,8-DHF k Cu^{2+} metódou BCS pri pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Graf vyjadruje závislosť množstva redukovaného iónu v % na koncentračnom pomere skúmaného redukčného činidla, 7,8-DHF, k Cu^{2+} pri všetkých pH. Miera redukcie bola stanovená pri vlnovej dĺžke 484 nm v čase 5 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm smerodajná odchýlka s 95 % konfidenčným intervalom.

6.1.6 Chelácia železnatých iónov (Fe^{2+})

Indikátor účinnosti resp. neúčinnosti chelátácie skúmanej látky bol ferozín, ktorý tvoril s iónmi fialový komplex. V prípade, ak testovaná látka bola schopná viazať ióny vznikol žltosfarbený komplex. Chelácia sa stanovila zmeraním nechelatovaných (voľných) iónov železa pri vlnovej dĺžke 562 nm. Z grafu vyplýva, že skúmaná látka najúčinnšie chelatovala ióny pri pH 7,5. V pomere 1:1 to bolo 80 %. Pri pH 6,8 v pomere 1:1 chelatačná účinnosť bola asi 50 %, čo naznačuje, že vzniknutý komplex má stechiometriu pravdepodobne 2:1. Pri pH 5,5 v pomere 1:1 bola viac ako 20 % a pri pH 4,5 látka nechelatovala železnaté ióny. So zvyšujúcou sa koncentráciou miera chelátácie vzrástla pri všetkých pH. V pomere 10:1 látka chelatovala približne na 100 % pri všetkých pH okrem 4,5 (**Obr. 19.**).

7,8-DHF vykazoval chelatačnú aktivitu pri všetkých pH prostrediach, avšak najvyšší potenciál chelátácie mal pri pH 7,5.

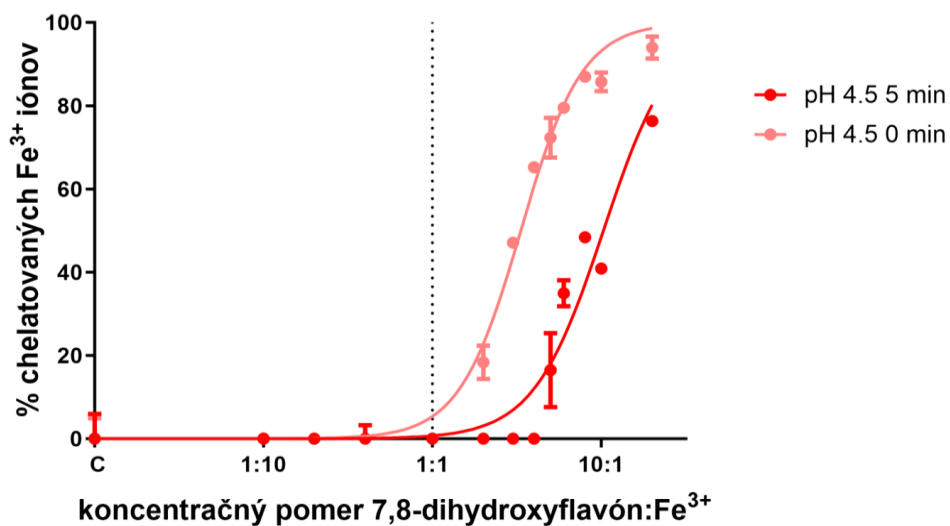


Obr. 19. Účinnosť chelatácie Fe²⁺ 7,8-DHF pri pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Graf vyjadruje závislosť množstva chelatovaného iónu v % na koncentračnom pomere chelátora, 7,8-DHF, k Fe²⁺. Miera chelatácie bola stanovená pri vlnovej dĺžke 562 nm v čase 5 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

6.1.7 Chelatácia železitých iónov (Fe³⁺)

Indikátor účinnosti resp. neúčinnosti chelatácie skúmanej látky bol ferozín, ktorý tvoril s iónmi fialový komplex. V prípade, ak testovaná látka bola schopná viazať ióny vznikol žltosfarbený komplex. Chelatácia sa stanovila zmeraním nechelatovaných (voľných) iónov železa pri vlnovej dĺžke 562 nm. V pomere 1:1 v čase 0 bola chelatácia asi 5 % a po 5 minútach 0 %. So zvyšujúcou sa koncentráciou chelatačná schopnosť skúmanej látky vzrástla, avšak na druhej strane s časom klesala (**Obr.20.**).

7,8-DHF vykazoval afinitu k železitým iónom, ktorá však časom klesala.

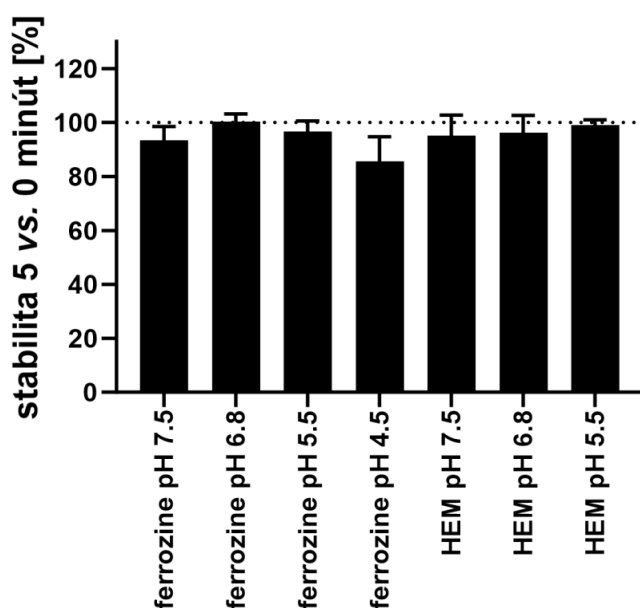


Obr. 20. Účinnosť chelatácie Fe³⁺ 7,8-DHF pri pH 4,5. Graf vyjadruje závislosť množstva chelatovaného iónu v % na koncentračnom pomere chelátora, 7,8-DHF, k Fe³⁺. Miera chelatácie bola stanovená pri vlnovej dĺžke 562 nm v čase 0 a 5 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

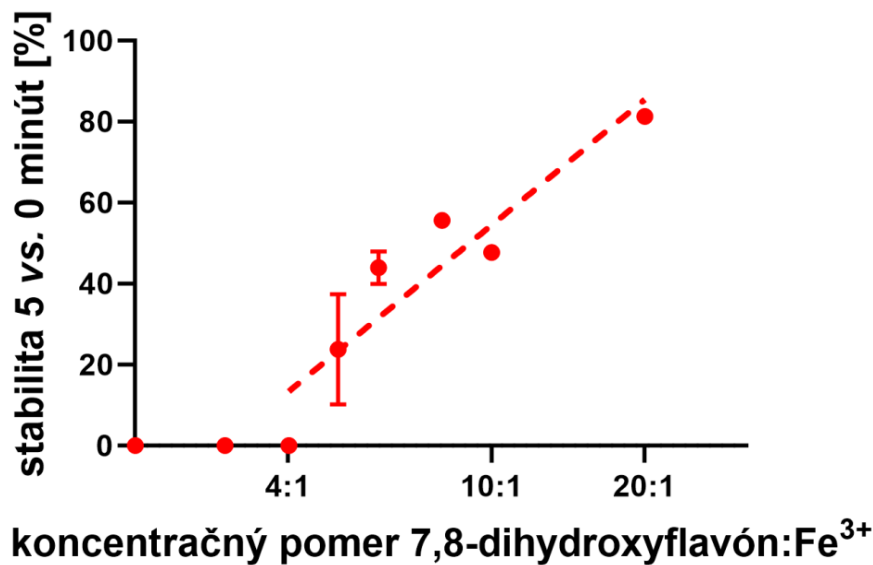
6.1.8 Vyhodnotenie stability komplexov 7,8-DHF s kovovými iónmi

Vyhodnotenie stability komplexov 7,8-DHF s iónmi železa a s iónmi medi bolo vypočítané ako pomer chelatacie v čase 5 minút a chelatacie v čase 0. Analýza stability bola vykonaná len pri iónoch, pri ktorých 7,8-DHF vykazoval významnú chelatačnú účinnosť.

Z grafu vyplýva, že komplexy so železnatými a meďnatými (podľa hodnotenia hematoxylínom) iónmi boli stabilné (Obr. 21.). Menej stabilný komplex tvoril 7,8-DHF so železnatými iónmi pri pH 4,5 (Obr. 20. a 22.). Z grafu na Obr. 22. vyplýva, že komplex 7,8-DHF s Fe^{3+} bol stabilnejší pri nadbytku testovanej látky.



Obr. 21. Stabilita komplexov 7,8-DHF so železnatými (metodika ferozínu) a meďnatými iónmi (metodika hematoxylín /HEM)

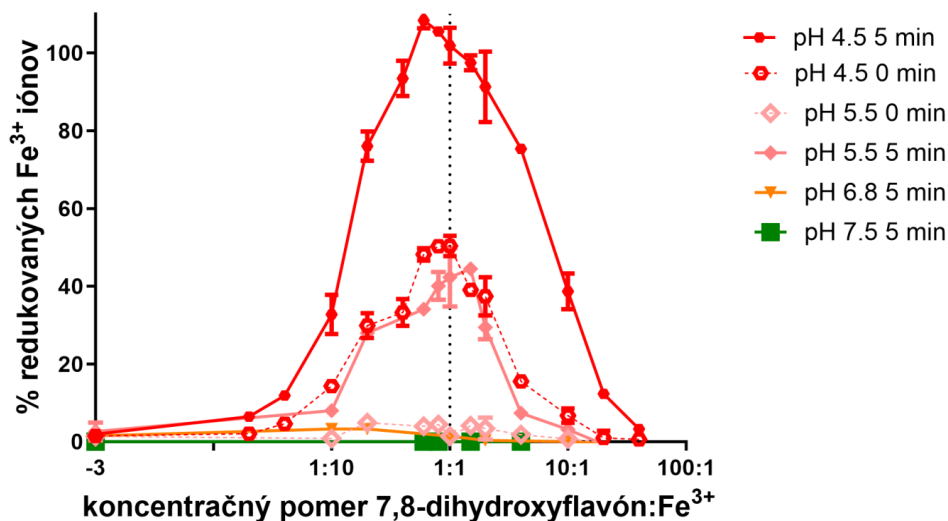


Obr. 22. Stabilita komplexu 7,8-DHF s Fe³⁺

6.1.9 Redukcia železitých iónov (Fe³⁺)

Redukčná schopnosť testovanej látky sa merala pri vlnovej dĺžke 562 nm. Pri pH prostrediach 5,5 a 4,5 sa s rastúcou koncentráciou zvyšovala redukčná schopnosť 7,8-DHF, až do bodu, kedy krivka zmenila charakter so stúpajúcej na klesajúcu. V bode zlomu resp. vytvorenia konkávnej krivky prevládla chelatácia iónu nad redukciou. Pri oboch pH, navyše, s časom vzrástla redukcia železitých iónov. Naopak, pri pH prostrediach 7,5 a 6,8 testovaná látka ióny neredukovala ani v čase 0 ani v čase 5 minút (**Obr. 23**).

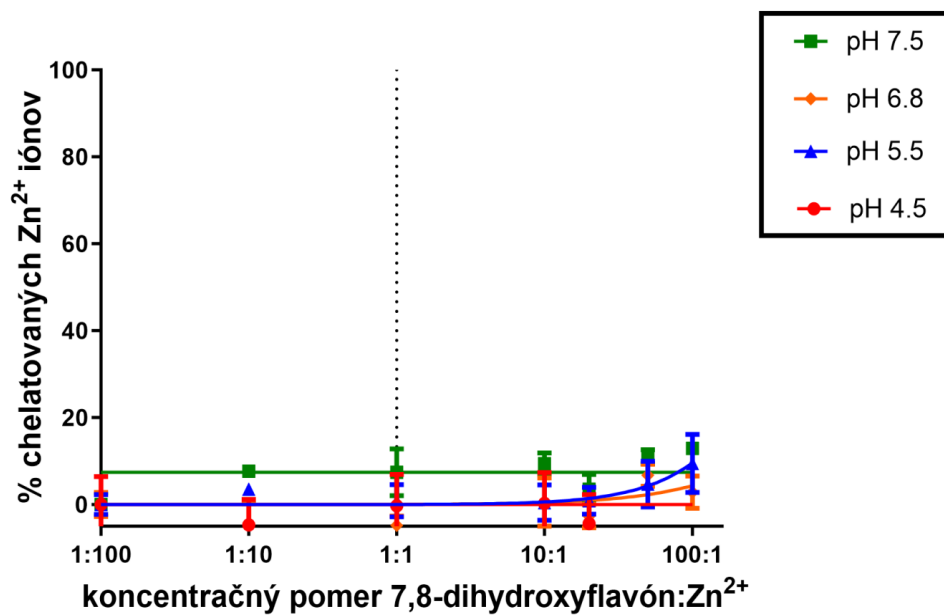
7,8-DHF je schopný redukcie železitých iónov pri pH 5,5 a 4,5, pričom v určitom bode prevládne chelatácia a krivka nadobudne klesajúci charakter.



Obr. 23. Účinnosť redukcie Fe³⁺ 7,8-DHF pri pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Graf vyjadruje závislosť množstva redukovaného iónu v % na koncentračnom pomere skúmaného redukčného činidla, 7,8-DHF, k Fe³⁺. Miera redukcie bola stanovená pri vlnovej dĺžke 562 nm v čase 0 a 5 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

6.1.10 Chelatácia zinočnatých iónov (Zn²⁺)

Indikátor účinnosti resp. neúčinnosti chelatácie skúmanej látky bol ditizón, ktorý tvoril s iónmi červený komplex. V prípade, ak by testovaná látka bola schopná viazať ióny vznikol by žltosfarbený komplex. Chelatácia sa stanovila zmeraním nechelatovaných (voľných) iónov zinku pri vlnových dĺžkach 540 a 590 nm (pH 7,5; 6,8 a 5,5) a 530 a 570 nm (pH 4,5). Z grafu vyplýva, že látka nevykazuje chelatačnú aktivitu k zinočnatým iónom pri žiadnom pH prostredí. Krivka začala rásť až pri vyšších pomeroch, avšak nevýrazne. Pri všetkých pomeroch od 1:100 až po 10:1 bola závislosť chelatácie na koncentrácii 7,8-DHF lineárna, čo naznačuje chelatáciu iba spektrofotometrickým indikátor, ditizónom (**Obr. 24.**).



Obr. 24. Účinnosť chelatácie Zn²⁺ 7,8-DHF pri pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Graf vyjadruje závislosť množstva chelatovaného iónu v % na koncentračnom pomere chelátora, 7,8-DHF, k Zn²⁺. Miera chelatácie bola stanovená pri vlnových dĺžkach 540 nm (pH 7,5; 6,8 a 5,5) a 530 nm (pH 4,5) v čase 5 minút. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

6.2 Vplyv 7,8-DHF na med'ou a železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

Grafy (**Obr. 25. a Obr. 26.**) zobrazujú vplyv 7,8-DHF na priebeh Fentonovej reakcie pri pH prostrediach 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Ide o závislosť produkcie hydroxylových radikálov na koncentrácii skúmanej látky. Pre lepšiu orientáciu sú koncentrácie vyjadrené ako pomery skúmanej látky k iónu na osi X. Os Y je rozdelená na 2 časti, kde sú kladné a záporné hodnoty. Kladné hodnoty vyjadrujú zvýšenú produkciu hydroxylových radikálov, teda prooxidačné vlastnosti 7,8-DHF a záporné hodnoty predstavujú zníženú produkciu hydroxylových radikálov, teda antioxidačné účinky látky.

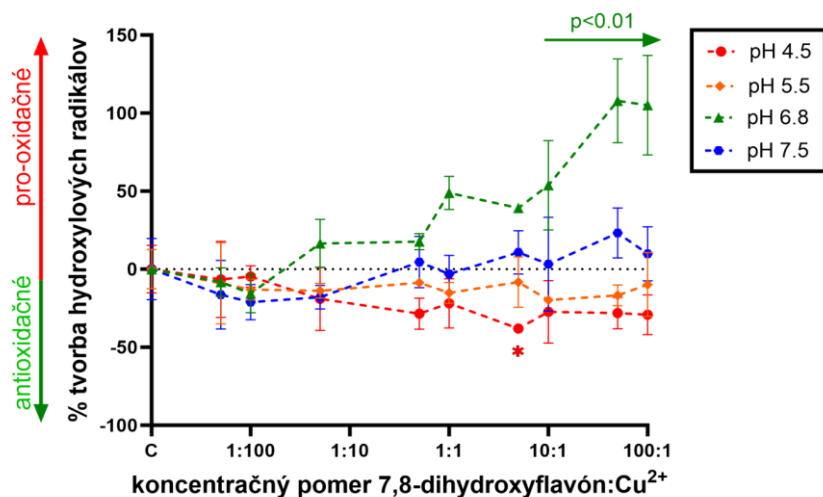
Na prvom grafe (**Obr. 25.**) pri pH 6,8 je vidno, že s rastúcou koncentráciou 7,8-DHF dochádzalo k zvýšeniu produkcie hydroxylových radikálov s meďnatými iónmi indukovanej Fentonovej reakcie, resp. k štatisticky významnému prooxidačnému účinku látky od koncentračného pomeru 10:1 (7,8-DHF:Cu²⁺).

Pri pH prostrediach 7,5 a 5,5 nie sú žiadne štatisticky významné odchýlky od hodnoty nula na osi Y, z čoho vyplýva, že 7,8-DHF nemá antioxidačné ani prooxidačné účinky. Pri pH 4,5 je jediným štatisticky významným bodom pomer koncentrácií 5:1, pri ktorom mal 7,8-DHF mierne antioxidačný účinok.

Na druhom grafe (**Obr. 26.**) je znázornený vplyv testovanej látky na produkciu hydroxylových radikálov so železitými iónmi indukovanej Fentonovej reakcie. Pri pH prostrediach 7,5 a 6,8 je možné vidieť štatisticky významný nárast produkcie hydroxylových radikálov. So zvyšujúcou sa koncentráciou rastie aj prooxidačná aktivita testovanej látky, kde pri pH 7,5 je štatisticky významná od koncentračného pomeru 2:1 a pri pH 6,8 od pomeru 10:1 (7,8-DHF:Fe³⁺).

Naopak, štatisticky významné zníženie tvorby hydroxylových radikálov pozorujeme pri pH 4,5 od koncentračného pomeru 2:1, kde látka predisponuje antioxidačnou aktivitou.

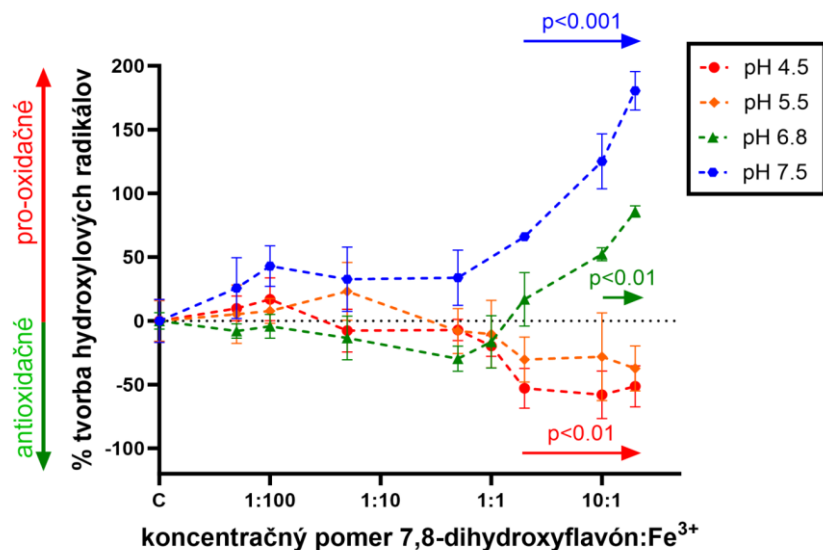
Pri pH 5,5 mal 7,8-DHF neutrálne pôsobenie a nepozorujeme žiadny štatisticky významný úbytok alebo nárast tvorby hydroxylových radikálov.



Obr. 25. Vplyv 7,8-DHF na meďou katalyzovanú Fentonovu reakciu. Zelenou šípkou sú označené všetky štatisticky významné body, ktoré sú odlišné od pozitívnej kontroly (vzorka bez skúmanej látky). Bod označený červenou hviezdikou je tiež štatisticky významný. Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm smerodajná odchýlka.

C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek iba absenciou testovanej látky, kde namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo.

Štatistická významnosť vs. pozitívna kontrola, * odpovedá $p < 0,05$



Obr. 26. Vplyv 7,8-DHF na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu. Modrou, zelenou a červenou šípkou sú označené všetky štatisticky významné body, ktoré sú odlišné od pozitívnej kontroly (vzorka bez skúmanej látky). Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm smerodajná odchýlka.

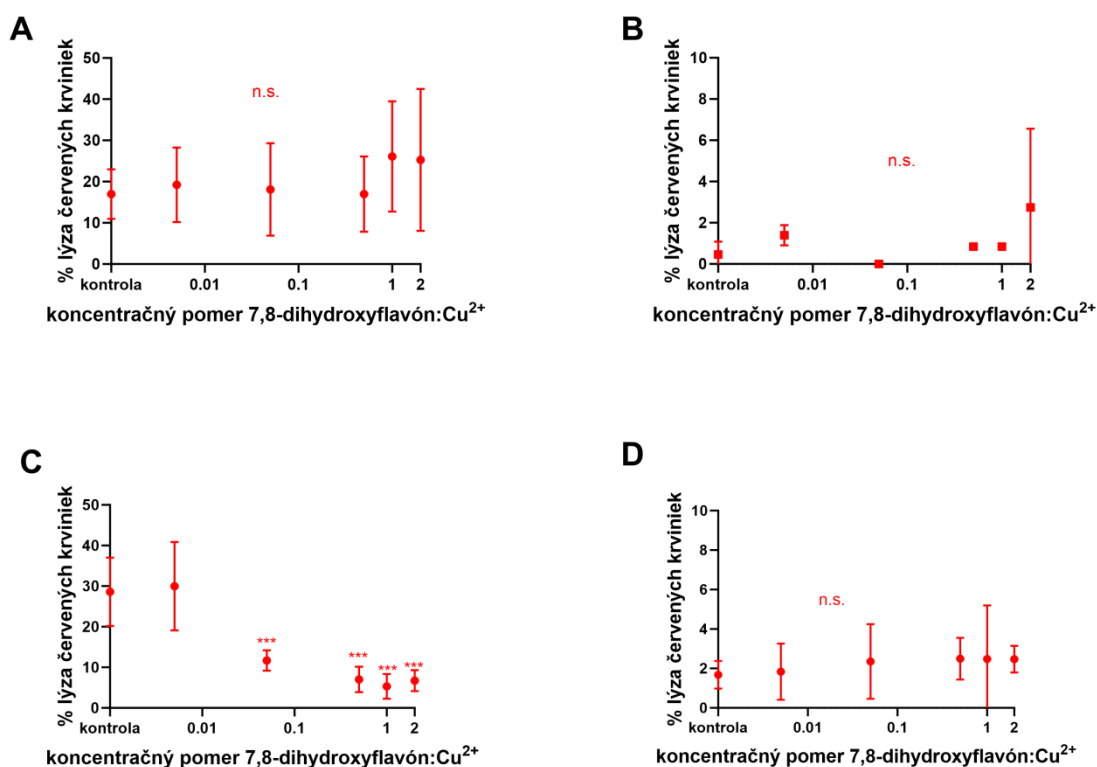
C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek iba absenciou testovanej látky, kde namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo.

6.3 Vplyv 7,8-DHF na med'ou katalyzovanú hemolýzu

Na uvedených grafoch (Obr. 27.) je znázornený vplyv 7,8-DHF na lýzu červených krviniek získaných z potkanej a ľudskej krvi, a to buď v prítomnosti Cu^{2+} vo finálnej koncentrácii 500 μM , alebo bez Cu^{2+} .

Vplyv 7,8-DHF na lýzu potkaních erytrocytov (Obr. 27. časť A a B) bol štatisticky nesignifikantný.

Pridaním 7,8-DHF do ľudských erytrocytov s med'natými iónmi (Obr. 27. časť C) sa zo štatistického hľadiska významne znížila lýza červených krviniek z 30 % na približne 5 % pri koncentračnom pomere 1:1 (7,8-DHF: Cu^{2+}). Samotná látka bez pridaných med'natých iónov nezvyšovala nízku spontánnu lýzu erytrocytov (Obr. 27. časť D).



Obr. 27. Vplyv 7,8-DHF na lýzu erytrocytov. A: lýza potkaních erytrocytov s Cu^{2+} B: lýza potkaních erytrocytov bez Cu^{2+} C: lýza ľudských erytrocytov s Cu^{2+} D: lýza ľudských erytrocytov bez Cu^{2+} .

n.s. – nesignifikantný, *** odpovedá $p < 0,001$

7 DISKUSIA

V prvej časti diplomovej práce sme skúmali *in vitro* schopnosť 7,8-dihydroxyflavónu interagovať s fyziologickými kovmi, ktoré sa bežne vyskytujú v našom tele. Pre stanovenie chelatačnej a redukčnej schopnosti skúmanej látky s biogénnymi kovmi boli použité spektrofotometrické metódy s využitím kompetitívnej metodiky. Princípom je kompetícia testovanej látky s použitým indikátorom o ióny kovu (Říha *et al.* 2013, Catapano *et al.* 2018, Moravcová *et al.* 2023, Mladěnka *et al.* 2010). Metodika na vápnik a horčík zatiaľ nebola publikovaná (v dobe spísania tejto práce je v recenznom riadení v odbornom časopise). Použité bolo neutrálne prostredie pH 7,5, ale aj kyslé s pH 6,8; 5,5 a 4,5, ktoré simulovalo patologickú acidózu spôsobenú napr. ischemiou (Rajamäki *et al.* 2013, Mladěnka *et al.* 2011).

Zo všetkých iónov zlúčenina vykazovala najvyššiu afinitu chelatovať meďnaté ióny za použitia hematoxilínovej metódy a železnaté a železité ióny použitím kompetitívnej metodiky s ferozínom. Látka predisponuje silnými redukčnými vlastnosťami k meďnatým iónom. Železité ióny zlúčenina do určitého koncentračného pomeru účinne redukovala, avšak neskôr prevládla chelatačná schopnosť látky k iónom železa, a to iba v prostrediach pH 5,5 a 4,5.

V prípade použitia hematoxylínu, ktorý s iónmi medi netvorí stabilný komplex, a nie je vhodný pri nízkych pH, ale slúži iba na overenie chelatačnej schopnosti zlúčeniny. V druhej metóde sa použil špecifickejší indikátor, BCS, ktorý má vysokú afinitu k iónom medi a tvorí s nimi stabilné komplexy v rozsiahlom rozmedzí pH (Říha *et al.* 2013). Z našich výsledkov vyplýva, že 7,8-dihydroxyflavón je síce schopný tvoriť komplexy s iónmi medi, ale tieto komplexy sú evidentne nestabilné. Táto látka, teda, nie je použiteľná ako chelátor medi. V praxi používané chelátory medi ako napr. trientín, D-penicilamín a kyselina dimerkaptojantárová tvoria stabilné komplexy alebo k eliminácii medi dochádza iným, nie úplne jasným mechanizmom, ako je tomu u D-penicilamínu (Poujois *et al.* 2018, Shribman *et al.* 2021, Říha *et al.* 2013).

Tento flavonoid je silným redukčným činidlom k meďnatým iónom, a pravdepodobne týmto mechanizmom zvyšoval pri BCS metodike dostupnosť meďných iónov, ku ktorým má indikátor vysokú afinitu. Preto 7,8-dihydroxyflavón nebol schopný chelatovať meďné, a tým ani meďnaté ióny pri BCS metodike (Říha *et al.* 2013, Mira *et al.* 2002). Redukčná schopnosť skúmanej látky k meďnatým iónom môže byť potenciálne nežiaduca kvôli produkcii voľných radikálov prostredníctvom

Fentonovej reakcie. Dochádza k tvorbe škodlivých hydroxylových radikálov, a tým k oxidačnému stresu všetkých biomolekúl vrátane DNA. V závislosti od podmienok flavonoidy môžu zmeniť svoje antioxidačné vlastnosti na prooxidačné, ktoré však možno využiť v prospech vývoja nových antikancerogenných liečiv (*Jomova et al. 2022, Jomova et al. 2023*).

Testovaná látka bola schopná chelatovať železnaté ióny pri všetkých použitých pH prostrediach, ale najvyššiu afinitu k iónom mala pri pH 7,5. S klesajúcim pH sa znížila schopnosť chelatácie, pravdepodobne v dôsledku ľahšej deprotonizácie katecholových hydroxylových skupín v zásaditejšom prostredí, a tým došlo k jednoduchšej tvorbe stabilnejších komplexov so železom (*Perron et al. 2009*).

Chelácia železitých iónov bola meraná pri pH 4,5. Pri tejto metóde je nevyhnutná najskôr redukcia železitých iónov na železnaté redukčným činidlom, hydroxylamínom, a následne spektrofotometricky zmerať ferozínovou metódou. Princípiálne ide o chelatáciu oboch redoxných foriem železa resp. o chelatáciu celkového železa. Táto metodika špecificky využíva kyslé pH prostredie kvôli zvýšenej rozpustnosti železitých iónov. Ich rozpustnosť klesá s rastúcim pH a môže dochádzať k ich precipitácii (*Johnson et al. 2012*), a preto nie je možné túto redukčnú metodiku použiť pri vyšších pH. Skúmaná látka so zvyšujúcou sa koncentráciou tvorila stabilnejšie komplexy so železom. Jej potenciál chelatovať v kyslom prostredí, teoreticky využitý na zmiernenie negatívneho dopadu pri mnohých patologických stavoch ako napr. zápal, nádory a akútne infarkt myokardu (*Morishima et al. 2017, Rajamäki et al. 2013, Mladěnka et al. 2011*), nie je v tomto prípade pravdepodobne využiteľný: a) schopnosť chelatácie sa znižuje s klesajúcim pH a b) v kyslých pH prostrediach, teda 5,5 a 4,5 testovaná látka bola schopná účinne redukovať železité ióny na železnaté do určitého pomeru koncentrácií. Po dosiahnutí určitého bodu krivka začala prudko klesať, čo naznačuje, že prevládla chelatačná schopnosť látky. Z uvedeného zistenia vyplýva, že so zvyšujúcou sa koncentráciou je látka schopná chelatovať ióny železa v kyslom prostredí. Takto vytvorená krivka „zvonovitého“ tvaru je charakteristická pre látky schopné v nízkej koncentrácii redukovať ióny a pri vyšších chelatovať (*Macáková et al. 2012*).

7,8-dihydroxyflavón nevykazoval vyššiu afinitu tvorby komplexov s ostatnými iónmi, a tým nemá žiadny terapeutický potenciál pri nahradení doterajších účinných chelátorov v praxi.

Nakoľko má látka aj redukčný, aj chelatačný potenciál, a to jak u medi, tak u železa, tak sme v druhej časti zistovali, aký bude jej finálny účinok (antioxidačný alebo prooxidačný) na meďou a železom katalyzovanú Fentonovu reakciu. Jednou z hlavných biologických aktivít flavonoidov je ich vlastná antioxidačná aktivita chrániaca poškodenie organizmu pred voľnými radikálmi spôsobujúcimi mnohé chronické ochorenia. V súčasnosti sa zvýšil záujem o výskum flavonoidov vďaka ich možnému prínosu pre zdravie prostredníctvom tejto aktivity pozorovanej *in vitro*. Na druhú stranu, so schopnosťou antioxidačnej aktivity sa vždy za určitých okolností zvyšuje riziko prooxidácie (Procházková *et al.* 2011, Shen *et al.* 2022).

Na základe výsledkov našej práce vyplýva, že skúmaná látka má skôr prooxidačné vlastnosti pri neutrálnom pH a antioxidačné v kyslejšom, pH 4,5. To môže súvisieť so schopnosťou 7,8-dihydroxyflavónu potenciovat' chelataciu nad redukciou železitých iónov úmerne koncentrácii pri kyslom pH. V štúdiu od Procházková *et al.* 2011, uvádzajú možný súvis prooxidačnej aktivity so zvyšujúcim sa počtom hydroxylov, pričom mono- a dihydroxy flavonoidy majú nižší potenciál, čo sa v našom prípade nepotvrdilo. Yen *et al.* 2003 a Laughton *et al.* 1989 zistili, že so zvyšujúcou sa koncentráciou flavonoidu rastie aj prooxidačná aktivita, a to aj v našom prípade.

Miera do akej sú flavonoidy schopné pôsobiť buď anti- alebo prooxidačne je stále nedostatočne pochopená. Limitáciou našej štúdie aj mnohých iných je aj fakt, že na výskum boli použité *in vitro* podmienky. Na lepšie prepojenie súvislostí je potrebný ďalší výskum s využitím aj *in vivo* podmienok. A preto sme v tretej časti experimentu analyzovali vplyv 7,8-dihydroxyflavónu na *ex vivo* lýzu potkaních a ľudských erytrocytov v prítomnosti medi alebo bez nej. Jediným štatisticky významným výsledkom bol vplyv skúmanej látky na lýzu ľudských červených krviniek v prítomnosti medi. Ukázalo sa, že látka má výrazné protektívne účinky na meďou potenciovanú lýzu krviniek, avšak sama o sebe bez prítomnosti medi nevykazovala ani protekciu, ale ani potenciál zvýšiť lýzu. Prečo látka chráni len ľudské, a nie potkanie erytrocyty, nie je jasné. Okrem medzidruhových rozdielov môže byť podkladom aj použitie celkovej anestézie. Odbery krvi u potkanov prebiehali po ich uvedení do celkovej anestézie urethanom, zatiaľ čo odbery krvi u ľudských dobrovoľníkov boli prevedené bez použitia akejkoľvek anestézie.

Obecne sa dá zhrnúť, že látka môže mať terapeutický potenciál, avšak výsledky zistené v *in vitro* experimentoch je potrebné preveriť v *in vivo* podmienkach. Flavonoidy sú látky s množstvom pozitívnych účinkov na zdravie, napriek tomu nie sú

v praxi plne využívané. Je to spôsobené viacerými faktormi, a to najmä kvôli rýchlemu metabolizmu v tele a nízkej biologickej dostupnosti. Sú tiež náchylné na degradáciu svetlom, teplom, kyselinami a na oxidáciu (*Hassani et al. 2023*). Väčšina experimentálnych štúdií sa uskutočnilo na zvieratách a aplikácia 7,8-dihydroxyflavónu bola intraperitoneálnou injekciou. Ak sa vezmú do úvahy terapeutické možnosti liečby chronických ochorení, perorálna aplikácia je nepochybne najlepším spôsobom aplikácie. Preto je esenciálne hľadať účinný spôsob zlepšenia orálnej biologickej dostupnosti, ale aj farmakokinetických parametrov všeobecne (*Yang et al. 2022*).

8 ZÁVER

Záverom, cieľom mojej diplomovej práce bolo pomocou spektrofotometrického hodnotenia overiť schopnosť testovanej látky, 7,8-dihydroxyflavónu, chelatovať vápenaté, horečnaté, kobaltnaté, meďné, meďnaté, železnaté, železité a zinočnaté ióny a redukovať meďnaté a železité ióny pri rôznych pH prostrediach. Zo spomínaných iónov, skúmaná látka mala najvyšší potenciál chelatovať meďnaté ióny v prostredí s menej kompetitívnym spektrofotometrickým indikátorom, hematoxylínom. Ďalšími iónmi, ku ktorým mala testovaná zlúčenina vyššiu afinitu chelatácie boli železnaté a železité ióny.

Potenciálne nežiaduca môže byť schopnosť látky výrazne redukovať meďnaté ióny na meďné pri všetkých pH prostrediach. 7,8-dihydroxyflavón vykazuje, tiež, redukčné vlastnosti k železitým iónom pri pH prostrediach 5,5 a 4,5, avšak so zvyšujúcou sa koncentráciou prevládla následne chelatačná schopnosť zlúčeniny.

Na meďou katalyzovanej Fentonovej reakcii pri pH 6,8 od koncentračného pomeru 10:1 zlúčenina vykazovala prooxidačné pôsobenie. Jediným štatistickým významným bodom antioxidačnej aktivity bol koncentračný pomer 5:1 pri pH 4,5. Pri železom katalyzovanej Fentonovej reakcii zlúčenina disponovala prooxidačnou aktivitou od koncentračného pomeru 2:1 pri pH 7,5 a od koncentračného pomeru 10:1 pri pH 4,5. Významná antioxidačná aktivita bola zistená od koncentračného pomeru 2:1 pri pH 4,5.

Ďalšou časťou skúmania interakcií 7,8-dihydroxyflavón s fyziologickými kovmi, bola schopnosť ovplyvniť lýzu potkaních a ľudských červených krviniek v prítomnosti medi. Samotná meď spôsobila v našich experimentoch lýzu ľudských erytrocytov okolo 30 %, avšak 7,8-dihydroxyflavón s rastúcou koncentráciou túto lýzu prakticky eliminoval. Potkanie erytrocyty, ale táto látka nebola schopná ochrániť proti medi.

Vzhľadom na charakter experimentu, teda *in vitro*, je nevyhnutné overiť zistené účinky v *in vivo* podmienkach a zároveň doplniť štúdiu o možné toxické účinky.

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. Ahmad Wahid M, Abdul Hamid Fathi S, Aboul-Khair MR. Zinc in human health and disease. *Ric Clin Lab*. **1988**;18(1):9-16.
2. Angelé-Martínez C, Murray J, Stewart PA, Haines J, Gaertner AAE, Brumaghim JL. Cobalt-mediated oxidative DNA damage and its prevention by polyphenol antioxidants. *J Inorg Biochem*. **2023**;238:112024.
3. Aoi W, Iwasa M, Marunaka Y. Metabolic functions of flavonoids: From human epidemiology to molecular mechanism. *Neuropeptides*. **2021**;88:102163.
4. Badshah SL, Faisal S, Muhammad A, Poulson BG, Emwas AH, Jaremko M. Antiviral activities of flavonoids. *Biomed Pharmacother*. **2021**;140:111596.
5. Banjari I, Hjartåker A. Dietary sources of iron and vitamin B12: Is this the missing link in colorectal carcinogenesis? *Med Hypotheses*. **2018**;116:105-110.
6. Barbagallo M, Veronese N, Dominguez LJ. Magnesium in Aging, Health and Diseases. *Nutrients*. **2021**;13(2):463.
7. Barceloux D.G. Cobalt. *J Toxicol Clin Toxicol*. **1999**;37(2):201-6.
8. Bennett BD, Gralnick JA. Mechanisms of toxicity by and resistance to ferrous iron in anaerobic systems. *Free Radic Biol Med*. **2019**;140:167-171.
9. Blancquaert L, Vervaet C, Derave W. Predicting and Testing Bioavailability of Magnesium Supplements. *Nutrients*. **2019**;11(7):1663.
10. Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*. **2016**;35:107-15.
11. Brissot E, Troadec MB, Loréal O, Brissot P. Iron and platelets: A subtle, under-recognized relationship. *Am J Hematol*. **2021**;96(8):1008-1016.
12. Cascella M, Vaqar S. Hypermagnesemia. **2023**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Dostupné na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549811/>. Stiahnuté 2.1.2024
13. Casili G, Lanza M, Campolo M, Messina S, Scuderi S, Ardizzone A, Filippone A, Paterniti I, Cuzzocrea S, Esposito E. Therapeutic potential of flavonoids in the treatment of chronic venous insufficiency. *Vascul Pharmacol*. **2021**;137:106825.

14. Catapano MC, Tvrđý V, Karličková J, Mercolini L, Mladěnka P. A simple, cheap but reliable method for evaluation of zinc chelating properties. *Bioorg Chem.* **2018**;77:287-292.
15. Ciumărnean L, Milaciu MV, Runcan O, Vesa ȘC, Răchișan AL, Negrean V, Perné MG, Donca VI, Alexescu TG, Para I, Dogaru G. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules.* **2020**;25(18):4320.
16. Cooper MS, Gittoes NJ. Diagnosis and management of hypocalcaemia. *BMJ.* **2008**;336(7656):1298-302.
17. Costello R, Wallace TC, Rosanoff A. Magnesium. *Adv Nutr.* **2016**;7(1):199-201.
18. Ćwiertnia A, Kozłowski M, Cymbaluk-Płoska A. The Role of Iron and Cobalt in Gynecological Diseases. *Cells.* **2022**;12(1):117.
19. Członkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, Rybakowski JK, Weiss KH, Schilsky ML. Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers.* **2018**;4(1):21.
20. de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev.* **2015**;95(1):1-46.
21. Dominguez L, Veronese N, Barbagallo M. Magnesium and Hypertension in Old Age. *Nutrients.* **2020**;13(1):139.
22. Dos Santos L, Bertoli SR, Ávila RA, Marques VB. Iron overload, oxidative stress and vascular dysfunction: Evidences from clinical studies and animal models. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* **2022**;1866(9):130172.
23. Dutt S, Hamza I, Bartnikas TB. Molecular Mechanisms of Iron and Heme Metabolism. *Annu Rev Nutr.* **2022**;42:311-335.
24. Eid R, Arab NT, Greenwood MT. Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* **2017**;1864(2):399-430.
25. Fairweather-Tait S, Sharp P. Iron. *Adv Food Nutr Res.* **2021**;96:219-250.
26. Fiorentini D, Cappadone C, Farruggia G, Prata C. Magnesium: Biochemistry, Nutrition, Detection, and Social Impact of Diseases Linked to Its Deficiency. *Nutrients.* **2021**;13(4):1136.
27. Fraga CG. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med.* **2005**;26(4-5):235-44.

28. Fritzen R, Davies A, Veenhuizen M, Campbell M, Pitt SJ, Ajjan RA, Stewart AJ. Magnesium Deficiency and Cardiometabolic Disease. *Nutrients*. **2023**;15(10):2355.
29. Fujita T. Calcium paradox: consequences of calcium deficiency manifested by a wide variety of diseases. *J Bone Miner Metab*. **2000**;18(4):234-6.
30. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. **2011**;15(6):1583-606.
31. Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. **2019**;1866(12):118535.
32. Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*. **2008**;45(1):1-23.
33. Geissler C, Singh M. Iron, meat and health. *Nutrients*. **2011**;3(3):283-316.
34. Gille D, Schmid A. Vitamin B12 in meat and dairy products. *Nutr Rev*. **2015**;73(2):106-15.
35. Glutsch V, Hamm H, Goebeler M. Zinc and skin: an update. *J Dtsch Dermatol Ges*. **2019**;17(6):589-596.
36. Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients*. **2015**;7(9):8199-226.
37. Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C, Rochette L. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res*. **2014**;58(8):1721-38.
38. Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. **2009**;35(1):32-46.
39. Hang PZ, Liu J, Wang JP, Li FF, Li PF, Kong QN, Shi J, Ji HY, Du ZM, Zhao J. 7,8-Dihydroxyflavone alleviates cardiac fibrosis by restoring circadian signals via downregulating Bmal1/Akt pathway. *Eur J Pharmacol*. **2023**;938:175420.
40. Hassani S, Maghsoudi H, Fattahi F, Malekinejad F, Hajmalek N, Sheikhnia F, Kheradmand F, Fahimirad S, Ghorbanpour M. Flavonoids nanostructures promising therapeutic efficiencies in colorectal cancer. *Int J Biol Macromol*. **2023**;241:124508.
41. Huai R, Han X, Wang B, Li C, Niu Y, Li R, Qu Z. Vasorelaxing and antihypertensive effects of 7,8-dihydroxyflavone. *Am J Hypertens*. **2014**;27(5):750-60.

42. Chen C, Wang Z, Zhang Z, Liu X, Kang SS, Zhang Y, Ye K. The prodrug of 7,8-dihydroxyflavone development and therapeutic efficacy for treating Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2018**;115(3):578-583.
43. Chen J, Chua KW, Chua CC, Yu H, Pei A, Chua BH, Hamdy RC, Xu X, Liu CF. Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neurosci Lett*. **2011**;499(3):181-5.
44. Chen Y, Xia G, Wang C, Wu H, Xu X, Mao G, Wu J, Zhao Z. Impact of dietary plant flavonoids on 7,8-dihydroxyflavone transepithelial transport in human intestinal Caco-2 cells. *Food Sci Nutr*. **2023**;11(11):6888-6898.
45. Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol*. **2014**;844:201-25.
46. Choi JW, Lee CW, Lee J, Choi DJ, Sohng JK, Park YI. 7,8-Dihydroxyflavone inhibits adipocyte differentiation via antioxidant activity and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocyte cells. *Life Sci*. **2016**;144:103-12.
47. Choi JY, Kang JT, Park SJ, Kim SJ, Moon JH, Saadeldin IM, Jang G, Lee BC. Effect of 7,8-dihydroxyflavone as an antioxidant on in vitro maturation of oocytes and development of parthenogenetic embryos in pigs. *J Reprod Dev*. **2013**;59(5):450-6.
48. Illés E, Patra SG, Marks V, Mizrahi A, Meyerstein D. The FeII(citrate) Fenton reaction under physiological conditions. *J Inorg Biochem*. **2020**;206:111018.
49. Imam MU, Zhang S, Ma J, Wang H, Wang F. Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress. *Nutrients*. **2017**;9(7):671.
50. Isidori A, Loscocco F, Visani G, Chiarucci M, Musto P, Kubasch AS, Platzbecker U, Vinchi F. Iron Toxicity and Chelation Therapy in Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Transplant Cell Ther*. **2021**;27(5):371-379.
51. Johnson DB, Kanao T, Hedrich S. Redox Transformations of Iron at Extremely Low pH: Fundamental and Applied Aspects. *Front Microbiol*. **2012**;3:96.
52. Johnson MA. Iron: nutrition monitoring and nutrition status assessment. *J Nutr*. **1990**;120 Suppl 11:1486-91.
53. Jomova K, Cvik M, Lauro P, Valko M, Cizmar E, Alomar SY, Alwasel SH, Oleksak P, Chrienova Z, Nepovimova E, Kuca K, Rhodes CJ. The role of redox active copper(II) on antioxidant properties of the flavonoid baicalein: DNA protection under Cu(II)-Fenton reaction and Cu(II)-ascorbate system conditions. *J Inorg Biochem*. **2023**;245:112244.

54. Jomova K, Makova M, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Rhodes CJ, Valko M. Essential metals in health and disease. *Chem Biol Interact.* **2022**;367:110173.
55. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* **2011**;283(2-3):65-87.
56. Jucá MM, Cysne Filho FMS, de Almeida JC, Mesquita DDS, Barriga JRM, Dias KCF, Barbosa TM, Vasconcelos LC, Leal LKAM, Ribeiro JE, Vasconcelos SMM. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Nat Prod Res.* **2020**;34(5):692-705.
57. Kang JS, Choi IW, Han MH, Kim GY, Hong SH, Park C, Hwang HJ, Kim CM, Kim BW, Choi YH. The cytoprotective effects of 7,8-dihydroxyflavone against oxidative stress are mediated by the upregulation of Nrf2-dependent HO-1 expression through the activation of the PI3K/Akt and ERK pathways in C2C12 myoblasts. *Int J Mol Med.* **2015**;36(2):501-10.
58. Kim KC, Lee IK, Kang KA, Cha JW, Cho SJ, Na SY, Chae S, Kim HS, Kim S, Hyun JW. 7,8-Dihydroxyflavone suppresses oxidative stress-induced base modification in DNA via induction of the repair enzyme 8-oxoguanine DNA glycosylase-1. *Biomed Res Int.* **2013**;2013:863720.
59. Kinoshita M, Fujimoto C, Iwasaki S, Kondo K, Yamasoba T. Oral Administration of TrkB Agonist, 7, 8-Dihydroxyflavone Regenerates Hair Cells and Restores Function after Gentamicin-Induced Vestibular Injury in Guinea Pig. *Pharmaceutics.* **2023**;15(2):493.
60. Kiyama R. Estrogenic flavonoids and their molecular mechanisms of action. *J Nutr Biochem.* **2023**;114:109250.
61. Korkmaz OT, Aytan N, Carreras I, Choi JK, Kowall NW, Jenkins BG, Dedeoglu A. 7,8-Dihydroxyflavone improves motor performance and enhances lower motor neuronal survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* **2014**;566:286-91.
62. Kumar D, Dwivedi DK, Lahkar M, Jangra A. Hepatoprotective potential of 7,8-Dihydroxyflavone against alcohol and high-fat diet induced liver toxicity via attenuation of oxido-nitrosative stress and NF- κ B activation. *Pharmacol Rep.* **2019**;71(6):1235-1243.
63. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal.* **2013**;2013:162750.

64. Laires MJ, Monteiro CP, Bicho M. Role of cellular magnesium in health and human disease. *Front Biosci.* **2004**;9:262-76.
65. Lal A. Iron in Health and Disease: An Update. *Indian J Pediatr.* **2020**;87(1):58-65.
66. Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JR. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol.* **1989**;38(17):2859-65.
67. Leggett RW. The biokinetics of inorganic cobalt in the human body. *Sci Total Environ.* **2008**;389(2-3):259-69.
68. Li K, Wang XF, Li DY, Chen YC, Zhao LJ, Liu XG, Guo YF, Shen J, Lin X, Deng J, Zhou R, Deng HW. The good, the bad, and the ugly of calcium supplementation: a review of calcium intake on human health. *Clin Interv Aging.* **2018**;13:2443-2452.
69. Li XH, Dai CF, Chen L, Zhou WT, Han HL, Dong ZF. 7,8-dihydroxyflavone Ameliorates Motor Deficits Via Suppressing α -synuclein Expression and Oxidative Stress in the MPTP-induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *CNS Neurosci Ther.* **2016**;22(7):617-24.
70. Lieu PT, Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med.* **2001**;22(1-2):1-87.
71. Liu T, Liu Y, Zhang F, Gao Y. Copper homeostasis dysregulation promoting cell damage and the association with liver diseases. *Chin Med J (Engl).* **2023**;136(14):1653-1662.
72. Liu YC, Liu YL, Hsieh JY, Wang CH, Lin CL, Liu GY, Hung HC. Baicalein, 7,8-Dihydroxyflavone and Myricetin as Potent Inhibitors of Human Ornithine Decarboxylase. *Nutrients.* **2020**;12(12):3867.
73. Macáková K, Mladěnka P, Filipský T, Říha M, Jahodář L, Trejtnar F, Bovicelli P, Proietti Silvestri I, Hrdina R, Saso L. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chem.* **2012**;135(4):2584-92.
74. Man Y, Xu T, Adhikari B, Zhou C, Wang Y, Wang B. Iron supplementation and iron-fortified foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2022**;62(16):4504-4525.
75. Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol.* **2006**;20(1):3-18.

76. Martínez de Victoria E. El calcio, esencial para la salud [Calcium, essential for health]. *Nutr Hosp.* **2016**;33(Suppl 4):341. Spanish.
77. McClung JP. Iron, Zinc, and Physical Performance. *Biol Trace Elem Res.* **2019**;188(1):135-139.
78. McKay AKA, Pyne DB, Burke LM, Peeling P. Iron Metabolism: Interactions with Energy and Carbohydrate Availability. *Nutrients.* **2020**;12(12):3692.
79. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* **2002**;36(11):1199-208.
80. Mladěnka P, Hrdina R, Hübl M, Simůnek T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica (Hradec Kralove).* **2005**;48(3-4):127-35.
81. Mladěnka P, Macáková K, Filipický T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, Silvestri IP, Hrdina R, Saso L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem.* **2011**;105(5):693-701.
82. Mladěnka P, Macáková K, Zatloukalová L, Reháková Z, Singh BK, Prasad AK, Parmar VS, Jahodář L, Hrdina R, Saso L. In vitro interactions of coumarins with iron. *Biochimie.* **2010**;92(9):1108-14.
83. Molenda M, Kolmas J. The Role of Zinc in Bone Tissue Health and Regeneration-a Review. *Biol Trace Elem Res.* **2023**;201(12):5640-5651.
84. Moravcová M, Hrubša M, Lomozová Z, Catapano MC, Argento R, Jirkovský E, Kučera R, Mercolini L, Mladěnka P. A Complex Methodological Approach for the Screening of Efficient and Safe Cobalt Chelators. *Med Chem.* **2023**;19(5):495-507.
85. Morishima H, Washio J, Kitamura J, Shinohara Y, Takahashi T, Takahashi N. Real-time monitoring system for evaluating the acid-producing activity of oral squamous cell carcinoma cells at different environmental pH. *Sci Rep.* **2017**;7(1):10092.
86. Moustakas M. The Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine. *Materials (Basel).* **2021**;14(3):549.
87. Muhamed PK, Vadstrup S. [Zinc is the most important trace element]. *Ugeskr Laeger.* **2014**;176(5):V11120654. Danish.
88. Mwangi MN, Oonincx DGAB, Stouten T, Veenbos M, Melse-Boonstra A, Dicke M, van Loon JJA. Insects as sources of iron and zinc in human nutrition. *Nutr Res Rev.* **2018**;31(2):248-255.

89. Myint ZW, Oo TH, Thein KZ, Tun AM, Saeed H. Copper deficiency anemia: review article. *Ann Hematol.* **2018**;97(9):1527-1534.
90. Nairz M, Weiss G. Iron in health and disease. *Mol Aspects Med.* **2020**;75:100906.
91. Nakamura T, Naguro I, Ichijo H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* **2019**;1863(9):1398-1409.
92. Oh R., Brown D.L. Vitamin B12 deficiency. *Am Fam Physician.* **2003**;67(5):979-86.
93. Okamoto S., Eltis L.D. The biological occurrence and trafficking of cobalt. *Metallomics.* **2011**;3(10):963-70.
94. Ozyildirim S, Baltaci SB. Cardiovascular Diseases and Zinc. *Biol Trace Elem Res.* **2023**;201(4):1615-1626.
95. Pandey SN, Kwatra M, Dwivedi DK, Choubey P, Lahkar M, Jangra A. 7,8-Dihydroxyflavone alleviated the high-fat diet and alcohol-induced memory impairment: behavioral, biochemical and molecular evidence. *Psychopharmacology (Berl).* **2020**;237(6):1827-1840.
96. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2005**;202(2):199-211.
97. Park MY, Kim Y, Ha SE, Kim HH, Bhosale PB, Abusaliya A, Jeong SH, Kim GS. Function and Application of Flavonoids in the Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* **2022**;23(14):7732.
98. Pasricha SR, Tye-Din J, Muckenthaler MU, Swinkels DW. Iron deficiency. *Lancet.* **2021**;397(10270):233-248.
99. Paul R, Nath J, Paul S, Mazumder MK, Phukan BC, Roy R, Bhattacharya P, Borah A. Suggesting 7,8-dihydroxyflavone as a promising nutraceutical against CNS disorders. *Neurochem Int.* **2021**;148:105068.
100. Peluso I, Miglio C, Morabito G, Ioannone F, Serafini M. Flavonoids and immune function in human: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2015**;55(3):383-95.
101. Pepe J, Colangelo L, Biamonte F, Sonato C, Danese VC, Cecchetti V, Occhiuto M, Piazzolla V, De Martino V, Ferrone F, Minisola S, Cipriani C. Diagnosis and management of hypocalcemia. *Endocrine.* **2020**;69(3):485-495.

102. Percy L, Mansour D, Fraser I. Iron deficiency and iron deficiency anaemia in women. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* **2017**;40:55-67.
103. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.* **2009**;53(2):75-100.
104. Poujois A, Woimant F. Wilson's disease: A 2017 update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* **2018**;42(6):512-520.
105. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* **2011**;82(4):513-23.
106. Rabe E, Guex JJ, Morrison N, Ramelet AA, Schuller-Petrovic S, Scuderi A, Staelens I, Pannier F. Treatment of chronic venous disease with flavonoids: recommendations for treatment and further studies. *Phlebology.* **2013**;28(6):308-19.
107. Rajamäki K, Nordström T, Nurmi K, Åkerman KE, Kovanen PT, Öörni K, Eklund KK. Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem.* **2013**;288(19):13410-9.
108. Rakha A, Umar N, Rabail R, Butt MS, Kieliszek M, Hassoun A, Aadil RM. Anti-inflammatory and anti-allergic potential of dietary flavonoids: A review. *Biomed Pharmacother.* **2022**;156:113945.
109. Read SA, Obeid S, Ahlenstiel C, Ahlenstiel G. The Role of Zinc in Antiviral Immunity. *Adv Nutr.* **2019**;10(4):696-710.
110. Říha M, Karličková J, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *J Inorg Biochem.* **2013**;123:80-7.
111. Salloum Z, Lehoux EA, Harper ME, Catelas I. Effects of cobalt and chromium ions on oxidative stress and energy metabolism in macrophages in vitro. *J Orthop Res.* **2018**;36(12):3178-3187.
112. Sanna A, Firinu D, Zavattari P, Valera P. Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* **2018**;10(1):68.
113. Saper RB, Rash R. Zinc: an essential micronutrient. *Am Fam Physician.* **2009**;79(9):768-72.
114. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc.* **2010**;69(3):273-8.

115. Shamsudin NF, Ahmed QU, Mahmood S, Shah SAA, Sarian MN, Khattak MMAK, Khatib A, Sabere ASM, Yusoff YM, Latip J. Flavonoids as Antidiabetic and Anti-Inflammatory Agents: A Review on Structural Activity Relationship-Based Studies and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* **2022**;23(20):12605.
116. Shander A, Cappellini MD, Goodnough LT. Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions. *Vox Sang.* **2009**;97(3):185-97.
117. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem.* **2022**;383:132531.
118. Shin YE, Choi JW, Park YI, Kim HK. 7,8-Dihydroxyflavone Attenuates Inflammatory Response and Insulin Resistance Induced by the Paracrine Interaction between Adipocytes and Macrophages. *Int J Mol Sci.* **2023**;24(4):3520.
119. Shkemi B, Huppertz T. Calcium Absorption from Food Products: Food Matrix Effects. *Nutrients.* **2021**;14(1):180.
120. Shlisky J, Mandlik R, Askari S, Abrams S, Belizan JM, Bourassa MW, Cormick G, Driller-Colangelo A, Gomes F, Khadilkar A, Owino V, Pettifor JM, Rana ZH, Roth DE, Weaver C. Calcium deficiency worldwide: prevalence of inadequate intakes and associated health outcomes. *Ann N Y Acad Sci.* **2022**;1512(1):10-28.
121. Shribman S, Poujois A, Bandmann O, Czlonkowska A, Warner TT. Wilson's disease: update on pathogenesis, biomarkers and treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **2021**;92(10):1053-1061.
122. Scheiber I, Dringen R, Mercer JF. Copper: effects of deficiency and overload. *Met Ions Life Sci.* **2013**;13:359-87.
123. Skalny AV, Aschner M, Tinkov AA. Zinc. *Adv Food Nutr Res.* **2021**;96:251-310.
124. Slámová K, Kapešová J, Valentová K. "Sweet Flavonoids": Glycosidase-Catalyzed Modifications. *Int J Mol Sci.* **2018**;19(7):2126.
125. Slobodian MR, Petahtegoose JD, Wallis AL, Levesque DC, Merritt TJS. The Effects of Essential and Non-Essential Metal Toxicity in the *Drosophila melanogaster* Insect Model: A Review. *Toxics.* **2021**;9(10):269.
126. Song L. Calcium and Bone Metabolism Indices. *Adv Clin Chem.* **2017**;82:1-46.
127. Stern BR, Solioz M, Krewski D, Aggett P, Aw TC, Baker S, Crump K, Dourson M, Haber L, Hertzberg R, Keen C, Meek B, Rudenko L, Schoeny R, Slob W, Starr T. Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for

- modeling dose-response relationships. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* **2007**;10(3):157-222.
128. Tapiero H, Gaté L, Tew KD. Iron: deficiencies and requirements. *Biomed Pharmacother.* **2001**;55(6):324-32.
129. Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med.* **2005**;26(4-5):268-98.
130. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* **2005**;12(10):1161-208.
131. Van Laecke S. Hypomagnesemia and hypermagnesemia. *Acta Clin Belg.* **2019**;74(1):41-47.
132. Vissenaekens H, Criel H, Grootaert C, Raes K, Smagghe G, Van Camp J. Flavonoids and cellular stress: a complex interplay affecting human health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2022**;62(31):8535-8566.
133. Wang CY, Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood.* **2019**;133(1):18-29.
134. Ward DM, Cloonan SM. Mitochondrial Iron in Human Health and Disease. *Annu Rev Physiol.* **2019**;81:453-482.
135. Watanabe F, Bito T. Vitamin B12 sources and microbial interaction. *Exp Biol Med (Maywood).* **2018**;243(2):148-158.
136. Weaver CM, Peacock M. Calcium. *Adv Nutr.* **2019**;10(3):546-548.
137. Xue F, Zhao Z, Gu Y, Han J, Ye K, Zhang Y. 7,8-Dihydroxyflavone modulates bone formation and resorption and ameliorates ovariectomy-induced osteoporosis. *Elife.* **2021**;10:e64872.
138. Yamada K. Cobalt: its role in health and disease. *Met Ions Life Sci.* **2013**;13:295-320.
139. Yan F, Li K, Xing W, Dong M, Yi M, Zhang H. Role of Iron-Related Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* **2022**;2022:5124553.
140. Yang S, Zhu G. 7,8-Dihydroxyflavone and Neuropsychiatric Disorders: A Translational Perspective from the Mechanism to Drug Development. *Curr Neuropharmacol.* **2022**;20(8):1479-1497.
141. Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2003**;67(6):1215-22.

142. Zeidan RS, Han SM, Leeuwenburgh C, Xiao R. Iron homeostasis and organismal aging. *Ageing Res Rev.* **2021**;72:101510.
143. Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Ko DO, Wang ZH, Chang WY, You HJ, Lee IK, Kim BJ, Kang SS, Hyun JW. Preventive effect of 7,8-dihydroxyflavone against oxidative stress induced genotoxicity. *Biol Pharm Bull.* **2009**;32(2):166-71.
144. Zhao J, Li P, Zhu H, Ge F, Liu J, Xia J, Hang P. 7,8-Dihydroxyflavone suppresses proliferation and induces apoptosis of human osteosarcoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* **2021**;53(7):903-911.
145. Zhuang WB, Li YH, Shu XC, Pu YT, Wang XJ, Wang T, Wang Z. The Classification, Molecular Structure and Biological Biosynthesis of Flavonoids, and Their Roles in Biotic and Abiotic Stresses. *Molecules.* **2023**;28(8):3599.
146. Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM. The essential metals for humans: a brief overview. *J Inorg Biochem.* **2019**;195:120-129.