UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Interakce alkaloidů s přechodnými kovy III.

Autor diplomové práce: Bc. Martin Cymbál, DiS.

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

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Hradec Králové, 2020

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

DIPLOMA THESIS

Interactions of alkaloids with transition metals III.

Candidate: Bc. Martin Cymbál, DiS.

Supervisor: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Study programme: Healthcare bioanalytics

Study branch: Specialist in Laboratory Methods

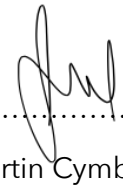
Hradec Králové, 2020

Poděkování:

Velice děkuji doc. Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za přínos velmi cenných poznatků, informací, pomoc a především za vedení diplomové práce, které bylo na nejvyšší úrovni a velice kvalitní. Poděkování patří také celému kolektivu katedry Farmaceutické botaniky za jejich kolegialitu a možnosti využití laboratoře pro stanovení a zhotovení diplomové práce.

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

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



…….

Hradec Králové, 2020 Bc. Martin Cymbál, DiS.

OBSAH

1. ABSTRAKT 7
2. ABSTRACT 8
3. POUŽITÉ ZKRATKY 9
4. ÚVOD 10
5. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE 12
6. MĚĎ A JEJÍ FUNKCE V ORGANISMU 13
6.1. ENZYMY 13
6.1.1. CYTOCHROM C OXIDASA 13
6.1.2. TYROSINASA 14
6.1.3. MONOAMINOXIDASA 15
6.1.4. LYSYLOXIDASA 15
6.1.5. SUPEROXIDDISMUTASA 16
6.1.6. DOPAMIN ß-HYDROXYLASA 16
6.1.7. CERULOPLASMIN 17
6.2. LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ MĚDI 18
6.3. ONEMOCNĚNÍ 19
6.3.1. WILSONOVA CHOROBA 19
6.3.2. MENKESOVA CHOROBA 22
6.3.3. ALZHEIMEROVA CHOROBA 22
6.3.4. PARKINSONOVA CHOROBA 23
6.4. STUDIE 24
6.4.1. CISPLATINA 24
6.4.2. RADIOFARMACIE 25
7. REDUKCE MĚDI 26
8. CHELATACE MĚDI 27
8.1. CHELATAČNÍ ČINIDLA MĚDI V TERAPII 27
9. ALKALOIDY 29
9.1. ISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY 30
9.1.1. ALKALOIDY ČELEDI AMARYLLIDACEAE 31
9.2. TESTOVANÉ ALKALOIDY 33
9.2.1. ALKALOIDY GALANTHAMINOVÉHO TYPU 35
9.2.1.1. GALANTHAMIN 35
9.2.1.2. CHLIDANTHIN 37
9.2.2. ALKALOIDY LYKORINOVÉHO TYPU 38
9.2.2.1. LYKORIN 38
9.2.2.2. GALANTHIN 39
9.2.3. ALKALOIDY HAEMANTHAMINOVÉHO TYPU 40

9.2.3.1. HAEMANTHAMIN 40
9.2.3.2. VITTATIN 41
9.2.4. ALKALOIDY MONTANINOVÉHO TYPU 42
9.2.4.1. MONTANIN 42
10. METODIKA PRÁCE 43
10.1. POMŮCKY 43
10.2. REAGENCIE 43
10.3. TESTOVANÉ ALKALOIDY 44
10.4. ZÁKLADNÍ A PRACOVNÍ ROZTOKY 45
10.5. KONTROLA ZÁKLADNÍHO ROZTOKU MĚDI 45
10.6. KALIBRAČNÍ KŘIVKA MĚĎNATÝCH KATIONTŮ 46
10.7. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ HEMATOXYLINEM 47
10.8. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ V PUFRU 48
10.9. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNÝCH KATIONTŮ V PUFRU 48
10.10. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ V DMSO 49
10.11. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNÝCH KATIONTŮ V DMSO 49
10.12. STANOVENÍ REDUKCE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ V PUFRU 50
10.13. STANOVENÍ REDUKCE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ V DMSO 50
11. VÝSLEDKY STANOVENÍ 51
11.1. KALIBRAČNÍ KŘIVKA 51
11.2. CHELATACE IONTŮ MĚDI 52
11.2.1. CHELATACE HEMATOXYLINEM 52
11.2.2. CHELATACE ROZTOKEM KYSELINY BATHOCUPROINDISULFONOVÉ 53
11.3. REDUKCE IONTŮ MĚDI 55
11.3.1. GALANTHAMINOVÝ TYP 55
11.3.2. LYKORINOVÝ TYP 57
11.3.3. HAEMANTHAMINOVÝ TYP 58
11.3.4. MONTANINOVÝ TYP 59
12. DISKUSE 60
12.1. MĚD-CHELATAČNÍ AKTIVITA 61
12.2. MĚĎ-REDUKUJÍCÍ AKTIVITA 62
13. ZÁVĚR 72
14. BIBLIOGRAFIE 73
15. SEZNAM OBRÁZKŮ 83
16. SEZNAM TABULEK 86

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické botaniky

Kandidát: Bc. Martin Cymbál, DiS.

Školitel: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Diplomová práce 2019/2020: Interakce alkaloidů s přechodnými kovy III., s. 86.

Měď je jedním z důležitých stopových prvků v organismu. Reguluje různé enzymatické dráhy. Tato práce sleduje chelatační a redukující aktivitu isochinolinových alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Alkaloidy Amaryllidaceae čítají velké množství účinků jakými jsou účinky analgetické, narkotické, antiarytmické, antihypertenzní, bronchodilatační, chemoterapeutické, antiparazitické, uteretonické, lokálně anestetické, mydriatické a mnoho dalších významných účinků. Významným zástupcem je galanthamin hydrobromid, který je terapeuticky využívaný a je inhibitorem acetylcholinesterasy. Studovány byly alkaloidy galanthamonového typu (galanthamin, galanthamin hydrobromid, chlidanthin), lykorinového typu (lykorin, galanthin), haemanthaminového typu (haemanthnamin, vittatin) a montaninového typu (montanin). Metodikou práce bylo zjistit chelatační a redukující aktivitu pomocí indikátorů hematoxylinu a kyseliny bathocuproindisulfonové, při různém pH nebo v dimethylsulfoxidu. Ze sledovaných alkaloidů vykazovaly měď-chalatující aktivitu galanthamin a chlidanthin. Významnou měď-redukující aktivitu měl pouze chlidanthin, jediná testovaná látka, která má hydroxylovou skupinu na benzenovém kruhu. Vztah aktivity a struktury souvisí s počtem a polohou hydroxylových skupin.

Klíčová slova: alkaloidy, měď, chelatace, redukce.

2. ABSTRACT

Charles University

Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Bc. Martin Cymbál, DiS.

Supervisor: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Diploma thesis 2019/2020: Interactions of alkaloids with transition metals III., pp. 86.

Copper is one of the important trace elements in the body. It regulates various enzymatic pathways. This work monitors the chelating and reducing activity of isochinoline alkaloids of the family Amaryllidaceae. The alkaloids of Amaryllidaceae have a large number of effects such as analgesic, narcotic, antiarrhythmic, antihypertensive, bronchodilatory, chemotherapeutic, antiparasitic, uteretonic, locally anesthetic, mydriatic and many other significant effects. An important representative is galanthamine hydrobromide, which is therapeutically used and is an inhibitor of acetylcholinesterase. Galanthamine type alkaloids (galanthamine, galanthamine hydrobromide, chlidanthine), lycorine type (lycorine, galanthine), haemanthamine type (haemanthnamine, vittatine) and montanine type (montanine) were studied. The methodology of the work was to determine the chelating and reducing activity with the use of the hematoxylin indicator and bathocuproindisulfonic acid, at different pH or in dimethylsulfoxide. Of the alkaloids studied, galanthamine and chlidanthin showed copper-chelating activity. Only chlidanthine had the highest copper-reducing activity, the only test substance that has a hydroxyl group on the benzene ring. The relationship of activity and structure is related to the number and position of the hydroxyl groups.

Keywords: alkaloids, copper, chelation, reduction.

3. POUŽITÉ ZKRATKY

AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesterasa
ATP	adenosintrifosfrát
BCS	bathocuproindisulfonová kyselina
CNS	centrální nervová soustava
Cp	ceruloplasmin
CRP	C-reaktivní protein
CT	počítačová tomografie
CTR	transportér mědi
CYP	cytochrom P450
DBH	dopamin ß-hydroxylasa
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiaminotetraoctan disodný
FAD	flavinadenindinukleotid
HA	hydroxylamin hydrochlorid
HEM	hematoxylin
HVLP	hromadně vyráběný léčivý přípravek
LOX	lysyloxidasa
MAO	monoaminooxidasa
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
MR	magnetická rezonance
nCp-Cu	měď nevázaná na ceruloplasmin
NMR	nukleární magnetická rezonance
PD	Parkinsonova choroba
PET/CT	pozitronová emisní tomografie spojená s počítačovou tomografií
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutasa
SPECT/CT	jednofotonová emisní počítačová tomografie spojená s počítačovou tomografií
TLC	tenkovrstvá chromatografie

4. ÚVOD

Měď, latinsky *Cuprum*, je vzácný esenciální prvek, který tvoří asi 50 dílů na miliardu zemských hornin. V přírodě se vyskytuje jak v elementární formě, tak v mnoha různých minerálních horninách a nejen v nich. Minerály s největším zastoupením mědi jsou sulfidy, oxidy a uhličitany (1). Měď je nezbytným prvkem v organismu pro zachování jeho správné funkce (2). Je to stopový prvek vyskytující se ve formě Cu^{2+} a Cu^{+}, nachází se v různých koncentracích u rostlin a živočichů. U měkkýšů a korýšů je hlavním prvkem hemocyaninu, molekuly důležité pro transport kyslíku v organismu. Je nezbytnou součástí lidské stravy (3). Nedostatek mědi není příliš častý a projevuje se sníženou aktivitou enzymu obsahující měď. Zvýšená koncentrace mědi se podílí na vzniku oxidačního stresu a tvorbě volných radikálů. Při poruše exkrece mědi dochází k její akumulaci v organismu a proto je třeba množství volné mědi snižovat. K tomu slouží chelatační činidla, která vyvazují měď. Hlavním mechanismem je eliminace absorbované mědi z organismu pomocí tvorby stabilních komplexů, které jsou pak vylučovány močí. Existují dvě známé geneticky podmíněné choroby s poruchou metabolismu mědi, Wilsonova choroba a Menkesova choroba (4).

Alkaloidy jsou organické chemické sloučeniny s dusíkem v heterocyklu, jsou jednou z nejvýznamnějších a největších skupin ze sekundárních metabolitů, vznikají z aminokyselin. Je známo kolem 20 000 alkaloidů. Mají velkou strukturní rozmanitost a pestré a široké využití. Výrazný fyziologický účinek je dosažen již v jednotkách nebo desítkách miligramů. Alkaloidy patří často mezi látky toxické, ale v nízkých subletálních dávkách mají výhodné farmakologické vlastnosti. Zatímco mnoho alkaloidů se používá pro léčebné účely, jiné jsou toxické a řadí se mezi separanda nebo venena a také mezi psychotropní a omamné látky. Čím je účinek výraznější, tím došlo k objevu a izolaci alkaloidu dříve. Používání alkaloidů pro léčebné účely postupně vzrostlo, protože se lidé dozvěděli více o jejich léčivých vlastnostech. Většina alkaloidů používaných v medicíně byla izolována již počátkem devatenáctého století. První surový lék, z něhož byl definitivně izolován alkaloid, bylo opium, také známo jako makové mléko, které bylo dlouho užíváno jako analgetikum. Tento alkaloid v roce 1803 úspěšně izoloval francouzský lékárník a chemik Jean-François Derosne a německý lékárník Friedrich Sertürner ho krátce poté identifikoval jako morfin (1806). Dále pak byl izolován strychnin (1818), atropin (1828),

kofein, emetin, piperin, cinchonin, brucin, chinin, kolchicin a mnoho dalších. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou známi svými léčivými vlastnostmi několik tisíciletí. Jsou členy skupiny isochinolinových alkaloidů. Nejznámější zástupcem je galanthamin, který se využívá v terapii Alzheimerovy choroby (5).

Jedním z příznaků Alzheimerovy choroby je tvorba nerozpustných amyloidních plaků. Bylo zjištěno, že v těchto placích jsou zvýšené hladiny mědi, která podporuje jejich tvorbu a zhoršuje oxidační poškození (6). Galanthamin a další Amaryllidaceae alkaloidy, které jsou intenzivně studovány nejen v souvislosti s Alzheimerovou chorobou, ale i dalšími onemocněními, byly tedy testovány na jejich měď-chelatační účinky v roztoku a také byla zjišťována jejich redukční schopnost.

5. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Alkaloidy jsou široce rozsáhlou skupinou nejrůznějších chemických individuí s rozmanitou škálou účinků. Vyskytují se v mnoha rostlinách nejen samostatně, ale často v kombinaci několika alkaloidů. Cílem diplomové práce je stanovení měď-chelatační a měď-redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu (galanthamin, galanthamin hydrobromid, chlidanthin), lykorinového typu (lykorin, galanthin), haemanthaminového typu (haemanthamin, vittatin) a montaninovéh typu (montanin) v roztoku a určení vztahu mezi aktivitou a strukturou.

6. MĚĎ A JEJÍ FUNKCE V ORGANISMU

Měď, latinsky *Cuprum*, je vzácný esenciální prvek. Měď je stopový prvek vyskytující se ve formě Cu^{+} a Cu^{2+}. Nachází se v několika oxidačních enzymech a je důležitá pro buněčné dýchání (cytochrom *c* oxidasa), homeostasu železa (ferroxidasa/ceruloplasmin), tvorbu melaninu (tyrosinasa), produkci neurotransmiterů (např. monoaminoxidasa a dopamin ß-hydroxylasa), syntézu pojivové tkáně (lysyloxidasa) a ochranu proti oxidantům (superoxiddismutasa) (7). Měď je používána enzymy v oxidaci a utilizaci železa a absorbci vitamínu C . Porucha utilizace železa se současně sníženou hladinou měďnatých kationtů je u dětí možnou příčinou vzniku anemie z nedostatku železa. Denní příjem mědi je zhruba 2 – 4 mg a vstřebává se hlavně v žaludku a v proximální části tenkého střeva. Hladina mědi v těle je primárně řízena vylučováním žlučí, ale také z části probíhá pomocí metalothioneinu. Metalothioneiny mají vysoký obsah cysteinu a tak mohou vázat měď, zinek, rtuť a kadmium. Absorbovaná měď je pravděpodobně uložena intracelulárně ve vazbě na některé proteiny. Měď je důležitá pro tvorbu myelinu a melaninu (8). Nedostatečný přísun mědi potravou je vzácný. Existují dvě známé geneticky podmíněné choroby, Wilsonova choroba a Menkesova choroba, při kterých je narušen metabolismus mědi (4). Obsah mědi v organismu je u dospělého člověka přibližně 100 mg, která je uložena převážně v játrech, svalech, ledvinách a kostech (3).

6.1. ENZYMY

Mezi enzymy, pro jejichž funkci je nezbytná měď, patří cytochrom *c* oxidasa, ferroxidasa (ceruloplasmin), tyrosinasa, monoaminoxidasa, lysyloxidasa, superoxiddismutasa a dopamin ß-hydroxylasa (8).

6.1.1. CYTOCHROM C OXIDASA

Oxidasy cytochromu *c* (EC 7.1.1.9) jsou multimerní integrální membránové proteiny, které fungují tak, že přenášejí elektrony z redukovaného cytochromu *c* na molekulární kyslík (7). Ve výsledné reakci se O_2 redukuje na dvě molekuly H_2O, spotřebují se čtyři ekvivalenty ferrocytochromu *c* a čtyři protony (Reakce 1). Místo pro redukci kyslíku se sestává ze dvou

úzce seskupených kovových center, cytochromu a_3 a Cu_B, které tvoří srdce enzymu a jsou umístěny v oblastech překlenujících membránu podjednotky I. Druhé centrum, kterým je cytochrom *a* a druhé měďnaté centrum, Cu_A, zprostředkovává přenos elektronů z cytochromu *c* do místa kyslíkové reakce. Cytochrom *a* je umístěn v sousedství centra cytochromu a_3-Cu_B uvnitř membránové struktury podjednotky I., zatímco Cu_A je umístěn v doméně podjednotky II. (9).

$$4 \text{ ferrocytochrom } c + O_2 + 4\ H^+ \longleftrightarrow 4 \text{ ferricytochrom } c + 2\ H_2O$$

Reakce 1: Reakce katalyzovaná cytochom c oxidasou.

V eukaryotických buňkách zahrnuje transport mědi do cytochromové oxidasy počáteční přesun mědi do cytosolu prostřednictvím specifického transportéru plazmatické membrány. V cytosolickém prostoru je několik proteinů vázajících měď, které jsou specifické pro dodání mědi do různých kompartmentů (10).

6.1.2. TYROSINASA

Tyrosinasa (EC 1.14.18.1) je multifunkční enzym obsahující měď, který je široce zastoupen u savců, rostlin, hmyzu a mikroorganismů (7). Katalyzuje dvě odlišné reakce, z nichž obě jsou nezbytné pro biosyntézu melaninu, a to hydroxylaci L-tyrosinu na L-dopu a také následnou oxidaci L-dopy na dopachinon (Reakce 2). Dopachinon, známý také jako *O*-dopachinon, je vysoce reaktivní a jeho deriváty spontánně polymerizují za vzniku melaninu v řadě reakčních cest. Tyrosinasa proto hraje rozhodující roli v enzymatickém procesu hnědnutí ovoce a zeleniny, biosyntéze melaninu lidské kůže a tvorbě kutikuly u hmyzu. Inhibitory tyrosinasy tak v poslední době přitahovaly zvýšenou pozornost, protože mají potenciální využití v zemědělství a v kosmetickém průmyslu (11).

$$\text{L-tyrosin} + O_2 \longleftrightarrow \text{L-dopa} + H_2O$$

$$2 \text{ L-dopa} + O_2 \longleftrightarrow 2 \text{ dopachinon} + 2\ H_2O$$

Reakce 2: Reakce katalyzovaná tyrosinasou.

6.1.3. MONOAMINOXIDASA

Aminoxidasy obsahující měď jsou velkou třídou enzymů, které katalyzují oxidaci primárních aminů na odpovídající aldehyd spojený s redukcí molekulárního kyslíku na peroxid vodíku (Reakce 3).

Monoaminoxidasy (MAO; EC 1.4.3.21) jsou mitochondriální FAD-dependentní enzymy, které oxidativně deaminují endogenní biogenní aminové neurotransmitery, jako je dopamin, serotonin, norepinefrin a epinefrin (7). MAO, stejně jako flavinmonoxidasy, mohou katalyzovat oxidaci léčiv za vzniku metabolitů léčiv, které jsou identické v chemické struktuře s těmi, které vytvářejí cytochromy P450 (CYP). Protože výsledné struktury jsou totožné, lze oxidační deaminaci pomocí MAO odlišit od oxidační deaminace CYP pouze charakterizací léčiva a enzymu, nikoli strukturou metabolitu. MAO se nacházejí v játrech, ledvinách, střevech a mozku. Některá léčiva (tranylcypromin a selegilin) byla navržena jako ireverzibilní substráty, které inhibují MAO s cílem změnit rovnováhu neurotransmiterů CNS. K rozlišení tohoto enzymatického procesu se používá jak reakce na tyto inhibitory, tak studium enzymatických přípravků *in vitro* (12, 13).

$$RCH_2NHR' + H_2O + O_2 \longleftrightarrow RCHO + R'NH_2 + H_2O_2$$

Reakce 3: Obecná reakce katalyzovaná monoaminoxidasou.

6.1.4. LYSYLOXIDASA

Lysyloxidasa (LOX; EC 1.4.3.13) je extracelulární kuproenzym, na mědi závislá oxidasa, která katalyzuje klíčový enzymatický krok v zesítění kolagenu a elastinu (Reakce 4) (7). Enzym je syntetizován jako proenzym (50 kDa), který je štěpen extracelulárně prokolagenem-C-proteinasou na dvě odlišné části: zralou formu (29 kDa) a propeptid (18 kDa). Zralý enzym hraje klíčovou roli ve vývoji nádoru a kam bude metastazovat. Lokalizace enzymu do extracelulární matrix, zejména v rakovinných buňkách, z něj činí potenciální cíl pro aktivaci proléčiv, která mají tendenci se hromadit v nádorové tkáni. Vysoká exprese LOX typicky indikuje špatnou prognózu u pacientů s rakovinou tlustého střeva, prsu, prostaty a plic. LOX propeptid inhibuje onkogen ve fibroblastech (14).

$$[protein]\text{-L-lysin} + O_2 + H_2O \longleftrightarrow [protein]\text{-(}S\text{)-2-amino-6-oxohexanoát} + NH_3 + H_2O_2$$

Reakce 4: Obecná reakce katalyzovaná lysyloxidasou.

6.1.5. SUPEROXIDDISMUTASA

Superoxiddismutasy (SOD; EC 1.15.1.1) jsou skupinou metaloenzymů, které jsou nezbytné k ochraně buněk za aerobních podmínek. V biologických systémech jsou SOD a další proteiny citlivé na peroxynitrit ($ONOO^-$), který může vzniknout reakcí oxidu dusnatého se superoxidovým radikálem. Peroxynitrit je silná oxidační molekula schopná nitrovat peptidy a proteiny ve fenylovém postranním řetězci tyrosinových zbytků (15). SOD se vyskytuje jako monomerní 16 kDa protein s jedním atomem Cu a Zn. Dvě podjednotky proteinu SOD tvoří stabilní homodimer. Dimerizace proteinu několikanásobně zvyšuje jeho katalytickou aktivitu. Superoxid je jednou z nejčastěji generovaných reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňce. V hepatocytech a v neparenchymálních buňkách je Cu^{2+}/Zn^{2+}-SOD umístěna v jaderné a cytosolické matrix a Mn^{3+}-SOD je přítomna v mitochondriích. Redoxně aktivní kov v každém enzymu je redukován první superoxidovou molekulou poskytující molekulární kyslík, druhá molekula superoxidu je pak kovovým iontem redukována na peroxid vodíku (Reakce 5). Reakce je omezena pouze difúzí superoxidu na enzym. Přestože je poločas superoxidového aniontu při fyziologickém pH odhadován na přibližně 5 sekund, vysoké intracelulární aktivity SOD udržují koncentrace superoxidu v rovnovážném stavu. Relevance reakce SOD jako obranného mechanismu je někdy zpochybňována, protože enzym pouze urychluje spontánní dismutace. Superoxid však může oxidovat Fe-S klastry enzymů, jako je akonitasa nebo redukčně uvolňovat železo z ferritinu. Důležitost aktivity SOD v buňce je dokumentována experimenty, které poukazují, že zvýšení intracelulární Cu^{2+}/Zn^{2+}-SOD aktivity prostřednictvím liposomálního dodání nebo transfekce virových genů můžou být prospěšné v různých modelech poškození jater *in vivo* (16).

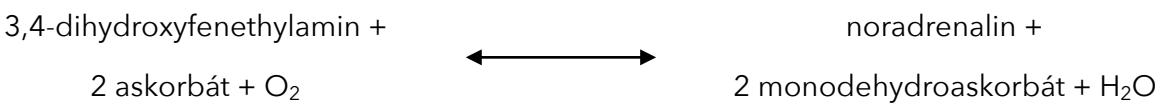
$$2 \text{ superoxid} + 2\ H^+ \longleftrightarrow O_2 + H_2O_2$$

Reakce 5: Reakce katalyzovaná superoxiddismutasou.

6.1.6. DOPAMIN ß-HYDROXYLASA

Dopamin ß-hydroxylasa (DBH; EC 1.14.17.1) je glykoprotein, který hydroxyluje dopamin na noradrenalin (Reakce 6). Obsahuje dva ekvivalentní atomy mědi v aktivním místě, hraje rozhodující roli v syntéze katecholaminu, neuroendokrinní regulační sítě a předpokládá se, že je zapojena do imunoendokrinních odpovědí bezobratlých proti bakteriálnímu

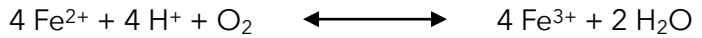
napadení (17). Dopaminová ß-hydroxylasa udržuje buněčný obsah dopaminu a reguluje přeměnu dopaminu v neuronech. Genetické polymorfismy DBH jsou spojeny s Parkinsonovou chorobou (PD) a bylo zjištěno, že mění plazmatickou aktivitu DBH u pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Proto by aktivita DBH v plazmě mohla být potenciálním a snadno detekovatelným biomarkerem pro změnu dopaminergní neuronální funkce u PD (18). Ionty mědi hrají důležitou roli v enzymatické katalýze redoxních reakcí askorbátoxidasy a dopaminové β-hydroxylasy zahrnující kyselinu askorbovou (vitamin C) jako redukční činidlo (19).



Reakce 6: Reakce katalyzovaná dopamin ß-hydroxylasou.

6.1.7. CERULOPLASMIN

Ceruloplasmin (Cp; ferroxidasa; EC 1.16.3.1) je protein vázající měď, o kterém je známo, že podporuje oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} v plazmě savců (Reakce 7) (20). Váže sedm molekul mědi a je pozitivním proteinem akutní fáze, jeho hladina v plazmě je zvýšena při poruchách doprovázených zánětem. Patří mezi α_2-globuliny a má modrou barvu způsobenou vysokým obsahem mědi (21). Ceruloplasmin přenáší přibližně 90 % plazmatické mědi, zbylých 10 % přenáší v plazmě albumin, který odevzdává svou měď tkáním mnohem ochotněji než Cp. Nízká plazmatická koncentrace ceruloplasminu způsobuje Wilsonovu chorobu, poměr Cu k C-reaktivnímu proteinu (CRP) může být prediktivní marker Alzheimerovy choroby (22). Ceruloplasmin je majoritně syntetizovaný v hepatocytech, je důležitý při transportu mědi, podílí se na metabolismu železa, antioxidaci a reakci akutní fáze během zánětu. Asi 70 až 90 % Cu je spojeno s Cp v krevní plazmě. Měď je zapojena do biochemických reakcí, zejména oxidačně redukčních procesů. Měďnaté kationty jsou ve stravě absorbovány z duodena s aminokyselinami nebo malými proteiny, kompetitivně s Fe^{2+}, zinkem a kadmiem, mezi antagonisty mědi patří sulfidy, molybden, zinek a železo. Homeostáza mědi je pečlivě udržována regulací membránového transportéru specifického pro Cu^{+} a několika metalochaperonů (23, 24).



Reakce 7: Reakce katalyzovaná ceruloplasminem.

6.2. LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ MĚDI

Laboratorní vyšetření je jedním z důležitých procesů při monitorování koncentrace mědi v organismu (25). Hlavním vyšetřovaným materiálem je krev, dále moč, popřípadě bioptický materiál jaterní tkáně (26). Laboratorní vyšetření je nejúčinnější metodou v diagnostice a monitorování Wilsonovy choroby, nadbytku, deficience mědi či otravy mědí. Pro správné uzavření výsledků by se mělo provádět stanovení opakovaně a doplnit dalšími podrobnými vyšetřeními, jelikož abnormální výsledek stanovení mědi není diagnostický pro určitý specifický stav (27).

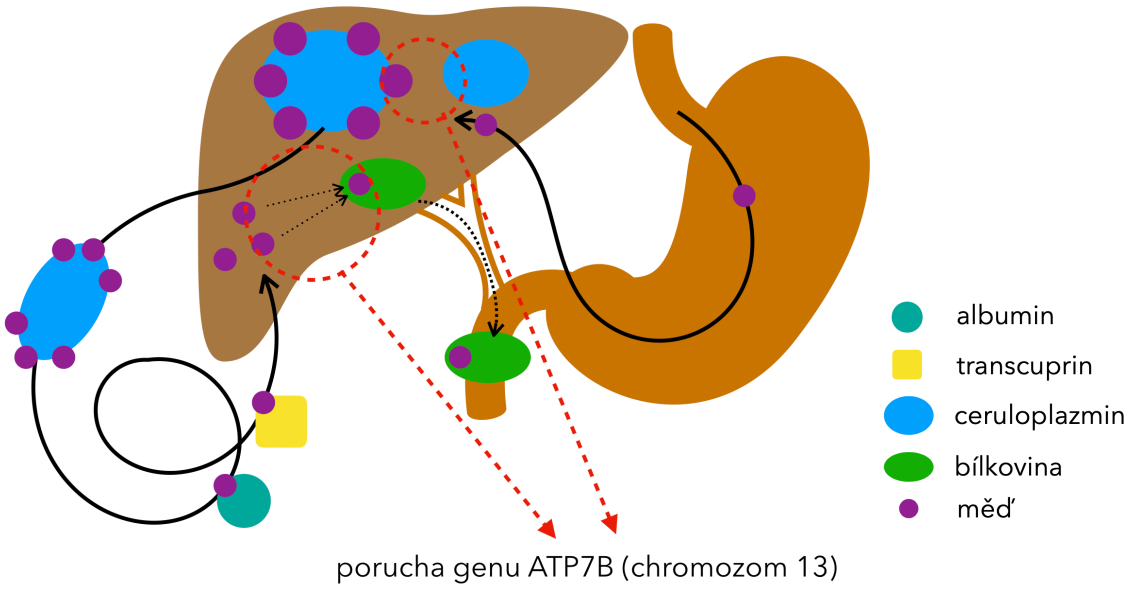
Při laboratorním vyšetření vzorku krve se odebírá žilní krev do zkumavek s oxidem křemičitým (krev srážlivá) nebo do zkumavek s heparinem (krev nesrážlivá). Pro odběr je důležité používat speciálně upravené zkumavky (tzv. Metal free), aby se zabránilo sekundární kontaminaci a falešnému ovlivnění výsledků (28). Ze vzorku séra se stanovuje měď celková, ale i volná spolu s hodnotou ceruloplasminu, to může komplikovat interpretaci výsledků, neboť ceruloplasmin je reaktant akutní fáze, který je přirozeně zvýšený při zánětu nebo závažné infekci, ale i v těhotenství nebo při užívání kontraceptiv (29). Jestliže hodnoty mědi jsou mimo fyziologické rozmezí, je zapotřebí test doplnit 24 hodinovým sběrem moči, kvůli zjištění exkrece mědi ledvinami (30). Koncentrace mědi ve vzorku se stanovuje pomocí atomové absorpční spektrometrie (31). Při podezření na Wilsonovu chorobu se vždy vyšetření doplňuje genetickými testy pro zjištění mutace genu ATP7B (32). Pro Wilsonovu chorobu jsou typické nízké koncentrace mědi v krvi spolu se zvýšenou hodnotou mědi v moči, nízké hodnoty ceruloplasminu a zvýšený obsah mědi v jaterní tkáni. Zvýšená koncentrace mědi v krvi a moči a normální nebo zvýšená hodnota ceruloplasminu může souviset s nadbytkem mědi nebo její sníženou exkrecí ledvinami a jaterním poškozením. Při deficienci dochází ke snížení koncentrace mědi v krvi a v moči a snížení koncentrace ceruloplasminu. Vysoké koncentrace mědi v moči jsou běžným ukazatelem při léčbě chelatačními léčivy, ukazují, jak se tělesné zásoby mědi eliminují. Po čase by se měla hodnota mědi normalizovat. Naopak při léčbě deficience se zvyšují hodnoty ceruloplasminu a celkové mědi, což znamená, že pacient dobře reaguje na léčbu (33). Fyziologické rozmezí mědi v sérum je 11,0 – 22,0 μmol/l a v moči 0,8 – 1,6 μmol/l (28).

6.3. ONEMOCNĚNÍ

6.3.1. WILSONOVA CHOROBA

Wilsonova choroba je autosomálně recesivní dědičné onemocnění, jehož patologie spočívá v poruše metabolismu mědi. Prevalence je 1:30000, převážně u heterozygotů ve věku 13 – 25 let. Jaterní forma je typická u dětí, u dospělých se spíše vyskytuje neurologická forma manifestace (34).

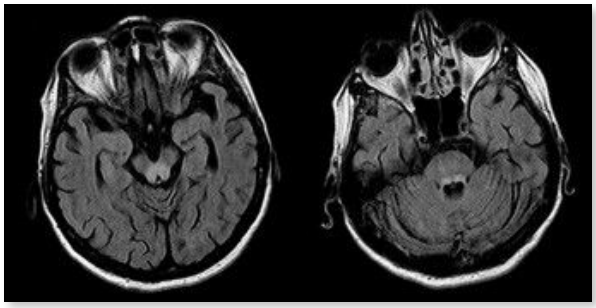
Měď je fyziologicky absorbována z gastrointestinálního traktu a současně blokována metalothioneinem, dále transportována do jater odkud se inkorporuje do ceruloplasminu, popřípadě do albuminu a uvolní se do cirkulace. Exkrece měďnatých kationtů probíhá převážně žlučí. Při patologii se jedná o defekt genu pro měďnaté kationty vázající ATPasu (ATP7B). V důsledku toho je snížená inkorporace měďnatých kationtů do ceruloplasminu a snížená exkrece mědi do žluči, což vyúsťuje v akumulaci v organismu, hlavně v játrech (Obr. 1). To vede ke zvýšení volné frakce měďnatých kationtů v plazmě, kde působí toxicky, zvyšuje se exkrece močí, akumulace v rohovce, v bazálních gangliích, ledvinách, svalech, kostech a erytrocytech. Nadbytek a hromadění mědi v orgánech vede ke zvýšení hladiny volných radikálů a k poklesu koncentrace redukovaného glutathionu. Následkem je peroxidace membránových lipidů, poškození proteinů bohatých na SH skupiny a poškození DNA (35, 36).



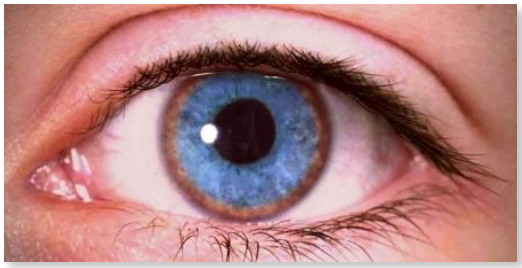
Obr. 1: Schéma poruchy metabolismu mědi (37).

U Wilsonovy choroby se vyskytují různé formy manifestace. Podle převažujících symptomů je lze rozdělit do čtyř skupin: neurologicko-psychiatrická, jaterní, asymptomatická a fulminantní. Neurologicko-psychiatrický typ manifestace často z počátku začíná nenápadnými příznaky, jakými jsou zhoršení řeči a klidový třes, v pozdější fázi dochází k rigiditě, dystonii, hyperkinetóze a dysartrii. Ve většině případů jsou i příznaky psychiatrické. Na snímcích z CT (Obr. 2) nebo MR lze vidět změny v bazálních gangliích, kortikální atrofii, mozkové a kmenové abnormality. Jaterní forma může probíhat skrytě pod jiným jaterním onemocněním a manifestovat v pěti formách, a to v akutní hepatitidu, jaterní steatózu, fulminantní jaterní selhání, chronickou hepatitidu a jaterní cirhózu (38).

Dalšími příznaky nemoci je Kayser-Fleischerů korneální prstenec (Obr. 3) se zlatohnědým zbarvením na okraji duhovky, které vzniká uložením granul mědi (39).



Obr. 2: CT snímek pozdní manifestace Wilsonovy choroby (40).



Obr. 3: Kayser-Fleischerů prstenec (39).

Wilsonovu chorobu často doprovází nefrolithiáza, nefrokalcinóza, renální insuficience s proteinurií (v důsledku poškození renálních tubulů), dále pak kardiomyopatie (39).

K uzavření definitivní diagnózy, zda se jedná o Wilsonovu chorobu, je zapotřebí několika faktorů, opírá se o vyšetření biochemická, histologická, izotopová, oftalmologická a genetická (41).

Terapie je možná pouze za pomocí chelátorů měďnatých kationtů, jakými jsou například D-penicilamin, triethylentetramin dihydrochlorid nebo tetrathiomolybdenan. Do komplexní terapie patří i snížený a kontrolovaný příjem mědi v potravě (Tab. 1), při těžkých stavech až transplantace jater k odstranění genového defektu (42).

Tab. 1: Obsah mědi v některých potravinách (43).

POTRAVINA	OBSAH MĚDI (µg/100mg)	POTRAVINA	OBSAH MĚDI (µg/100mg)
KÁVA	1	VEPŘOVÉ MASO	81
MLÉKO	6	MRKEV	83
SMETANA	6	HRUŠKA	86
PODMÁSLÍ	7	SEKANÁ	90
BÍLÝ JOGURT	8	RAJČE	93
MÁSLO	10	BRAMBORY	107
PIVO	15	SLANINA	110
CELER	18	MUFFIN	130
VÍNO	22	ROHLÍK	135
ČAJ	24	BANÁN	140
WHISKEY	24	HRÁŠEK	190
CUKR	29	CHLEBA	200
TUŇÁK	30	RÝŽE	210
POMERANČ	30	MERUŇKA	280
GRAPEFRUIT	34	BÍLÉ FAZOLE	308
JABLKO	36	KOKOSOVÝ OŘECH	370
MED	37	HOUBY	390
KUKUŘICE	38	PŠENICE	430
ZELÍ	40	TABULKA ČOKOLÁDY	510
OVOCNÝ JOGURT	43	VLOČKY	533
KUKUŘIČNÉ VLOČKY	44	ARAŠÍDY	613
KUŘE	46	SOJOVÉ BOBY	670
BROKOLICE	51	PEKANOVÉ OŘECHY	1203
OKURKA	51	VLAŠSKÉ OŘECHY	1335
CIBULE	53	MANDLE	1411
HOVĚZÍ MASO	58	SLUNEČNICOVÁ SEMÍNKA	1770
KRŮTA	62	VEPŘOVÁ JÁTRA	1820
LOSOS	70	SEZAMOVÁ SEMÍNKA	2080
BROSKEV	77	KAKAO	5000
VEJCE	80	HOVĚZÍ JÁTRA	6436

6.3.2. MENKESOVA CHOROBA

Menkesova choroba patří mezi neurodegenerativní onemocnění, způsobuje neefektivní využití mědi v těle. Nedostatek mědi ovlivňuje normální tvorbu pojivové tkáně a ztrátu některé rozšířené enzymatické aktivity. Smrt obecně nastane během prvních tří let (41).

Menkesova choroba je smrtelná X-vázaná recesivní porucha metabolismu mědi. Onemocnění poprvé popsal v roce 1962 John Menkes u pěti příbuzných dětí mužského pohlaví. Všech pět pacientů vykazovalo abnormální ochlupení a vývojové zpoždění během časného dětství a všech pět pacientů zemřelo ve věku od 7 měsíců do 42 měsíců. Potíže jsou výsledkem mutace v transportním proteinu zprostředkovávajícím příjem mědi ze střeva, který je kódován genem ATP7A. To má za následek těžký deficit mědi. Většina dětí s Menkesovou chorobou postižených ve věku 3 měsíců neprospívá, mají vývojová zpoždění nebo záchvaty. Postižené děti mají charakteristické abnormální ochlupení, abnormality skeletu a hypopigmentaci kůže. Další možné komplikace zahrnují subdurální hematomy, cerebrovaskulární příhody nebo divertikl močového měchýře (44).

6.3.3. ALZHEIMEROVA CHOROBA

Alzheimerova choroba (AD) je nejběžnější formou demence a jednou z nejvíce sociálně nákladných chorob ve všech vyspělých zemích. Alzheimerova choroba je degenerativní onemocnění mozku, kde 60 % až 80 % případů demence je charakterizováno zhoršením paměti, řeči a poklesem dalších kognitivních schopností, což ovlivňuje schopnost osoby vykonávat každodenní činnosti. Mezi několik charakteristických znaků AD patří amyloidní plaky, mikroskopické shluky proteinového fragmentu ß-amyloidu a spletí zkroucených mikroskopických pramenů proteinu tau (45, 46).

Dyshomeostáza stopových prvků je spojena s kognitivním poškozením a zejména s poruchou regulace mědi charakterizovanou zvýšením hladiny mědi v séru, která není vázána na ceruloplasmin (nCp-Cu). Homeostáza mědi je v našem těle jemně regulována, pokud není měď strukturně vázána na enzymy nebo koordinována proteiny, vytváří měď pomocí Haber-Weissových a Fentonových reakcí volné radikály. Albumin je nejhojnější sérový protein a hlavní protein vyměňující měď v nCp-Cu. Měď vázaná na albumin je v rovnováze s mědí koordinovanou jinými malými chelátory mědi cirkulujícími v krevním

řečišti dynamickým způsobem v závislosti na okolní osmolaritě, oxidačním stavu, pH a funkčních skupinách sloučenin. Albumin je citlivý na glykaci, tvoří produkty pokročilé koncové glykace. Volné radikály a volné kovy v oběhu urychlují toto zesítění proteinu se sacharidy. Modifikované albuminy jsou také významně méně účinné při zamezení agregaci ß-amyloidu, hlavní složky amyloidních plaků v mozku (47).

6.3.4. PARKINSONOVA CHOROBA

Parkinsonova choroba (PD) je neurodegenerativní porucha postihující bazální ganglia charakterizovaná sníženou koncentrací dopaminu, intracelulárními inkluzemi (Lewyho tělísky) a depozity železa v mozku. Jedná se o progresivní až fatální extrapyramidovou poruchu, kdy dochází k funkčnímu či strukturnímu poškození bazálních ganglií a jejich spojů (18).

Parkinsonova choroba je také spojena se sníženou ferroxidasovou aktivitou, sníženou obranyschopností, aktivitou antioxidantů a peroxidací lipidů. Měď hraje důležitou roli jako prostetická skupina několika proteinů zapojených do metabolismu železa a antioxidační aktivity. Důležitý je ceruloplasmin (23). Parkinsonova choroba se projevuje hypokineticko-hypertonickým postižením, akinetózou, rigiditou, tremorem, bradykinezí, poruchou řeči, poruchou dýchání, okohybným postižením, demencí, zpomaleným myšlenkovým tokem a labilitou nálady. Dochází k postupné degeneraci dopaminergních neuronů v substantia nigra. Hraje zde důležitou roli mutace genů zapojených v produkci proteinu α-synukleinu. Parkinsonovu chorobu lze zaměnit za parkinsonskou nemoc, která je často způsobena přechodně léky a po vysazení se vrací nemocný k normálu (21, 23). Prvním lékem volby je Levodopa, která snižuje takzvané „off" období, což je náhlý záchvat svalové ztuhlosti, který může trvat několik minut až hodin. Slouží k substituci nedostatku dopaminu (48).

6.4. STUDIE

6.4.1. CISPLATINA

Cisplatina se používá od konce 70. let jako chemoterapeutické činidlo pro léčbu řady nádorů. Její účinnost je však omezena závažnými vedlejšími účinky a rychlým nástupem mechanismů rezistence, které zahrnují snížené vychytávání léčiva a zvýšený odtok a sekvestraci. Protinádorovým léčivem cisplatinou, transportéry mědi a chelátory mědi se zabývá například studie Arnesano a kol. (r. 2018) (49).

Genetický screening kvasinek rezistentních na cisplatinu identifikoval transportér mědi CTR1 jako mediátor vychytávání cisplatiny. Nicméně vazba cisplatiny na motivy bohaté na methionin, umístěná v *N*-terminální extracelulární oblasti proteinu, je doprovázena rychlým vytěsněním aminových ligandů, které jsou považovány za nezbytné pro protinádorovou aktivitu. Po vystavení přebytku mědi prochází protein CTR1 endocytózou a degradací. Předběžná úprava buněk s vysokým množstvím mědi má tedy za následek snížené vychytávání cisplatiny a zvýšenou rezistenci k tomuto léku, zatímco chelát mědi má opačné účinky (49).

Cisplatina se také váže na CxxC motivy exportních pump mědi, ATP7A a ATP7B a podléhá přesunu závislém na ATP. V přítomnosti mědi i cisplatiny je translokace inhibována pro měďné i měďnaté kationty. Zvýšená rezistence na léčiva je spojena s CTR, Cu-ATPasou a Cu-chaperon Atox1, což je klíčové pro sekreci mědi. Schopnost činidel snižujících obsah mědi, jako je například tetrathiomolybdenan, může zvyšovat absorpci cisplatiny, regulovat Cu-ATPasy a inhibovat platinu Cu-Atox1 a tím může resenzitizovat buňky rezistentní na cisplatinu a zlepšit účinnost léčby platinovými léčivy (49).

6.4.2. RADIOFARMACIE

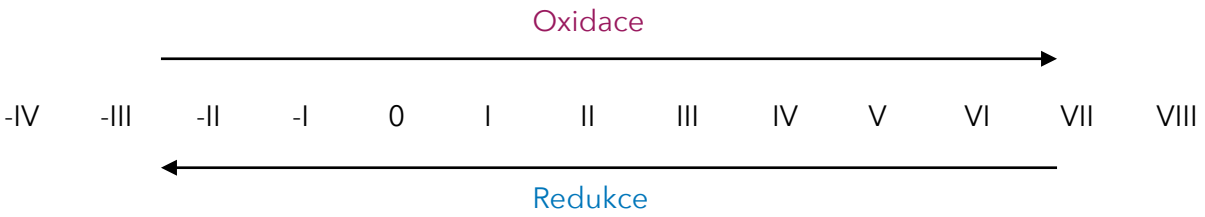
Měď má 32 izotopů, z nichž ^{63}Cu a ^{65}Cu jsou stabilní s přirozeným výskytem v 69,17 a 30,83 %. Mezi radionuklidy mědi patří 21 izotopů s velmi krátkým poločasem rozpadu (méně než sekundu) a pouze pět izotopů s delším poločasem rozpadu splňuje požadavky pro použití v nukleární medicíně (^{60}Cu, ^{61}Cu, ^{62}Cu, ^{64}Cu a ^{67}Cu). Na základě jejich poločasů rozpadu mohou být izotopy Cu rozděleny do dvou skupin: s krátkým poločasem rozpadu ^{62}Cu a ^{60}Cu a izotopy ^{61}Cu, ^{64}Cu a ^{67}Cu s dlouhým poločasem rozpadu. První skupina je zvláště přizpůsobena pro rychlé procesy v živých organismech (jako je myokardiální a renální perfúze), zatímco druhá skupina je vhodná pro studium pomalejších procesů, které vyžadují akumulaci cílových radionuklidů v daném orgánu. Izotopy Cu se používají jako vyzualizační izotopy SPECT/CT (ve formě pozitronových zářičů ^{60}Cu, ^{61}Cu, ^{62}Cu a ^{64}Cu) a radioterapeutik (beta zářičů ^{64}Cu a ^{67}Cu) (50).

Nejlepší radiofarmakum musí zajistit vysokou selektivitu akumulace radionuklidu mědi v cílových tkáních nebo orgánech s minimální neselektivní absorpcí ve zdravé tkáni. Toho lze dosáhnout účinným chelatačním činidlem, které tvoří komplexy radioaktivní mědi s vysokou stabilitou *in vivo* a vysokou kinetickou inertností, aby se zabránilo translaci Cu^{2+} na biologicky dostupné molekuly. Účinného cílení je obvykle dosaženo spojením chelatačního činidla s (bio)molekulárním vektorem, jako je peptid, protein a protilátka, který selektivně nese radionuklid na specifické buňky orgánů nebo tkáně. Tento přístup využívá bifunkčních chelátorů, složených z ligandu komplexujícího kov a funkční skupiny pro snadné kovalentní spojení s vektorem biomolekul (50).

V současné době se pozornost zaměřuje na polyazamakrocyklické chelátory díky zvýšené kinetické inertnosti a termodynamické stabilitě jejich komplexů mědi. Tetraazamakrocyklické cyklenové a cyklamové ligandy s připojenými karboxylovými rameny byly důkladně studovány pro jejich použití jako chelatačních činidel v metalofarmaceutikách vzhledem k tomu, že těží z makrocyklických a chelátových účinků, čímž se tvoří velmi stabilní komplexy (51).

7. REDUKCE MĚDI

Redukce je chemická reakce, při které je elektron přenášen z jedné molekuly na druhou. Molekula poskytující elektrony je redukční činidlo a molekula přijímající elektrony je oxidační činidlo. Redukční a oxidační činidla fungují jako konjugované redukční-oxidační páry nebo redoxní páry (52, 53). Jedná se o rovnovážný stav, kdy jeden prvek je donorem a druhý akceptorem elektronu a naopak. Dochází ke zvětšení nebo zmenšení oxidačního čísla (Obr. 4) (54).



Obr. 4: Posun oxidačního čísla při oxidaci a redukci (54).

Měďnaté kationty přechází z dvojmocného stavu příjmem dvou elektronů na atomární měď (Reakce 8) (55).

$$Cu^{2+} + 2\,e^{-} \xrightarrow{\text{Redukce}} Cu$$

Reakce 8: Redukce mědi.

U člověka existuje měď ve dvou oxidačních stavech, ve formě měďných a měďnatých kationtů. Měďnaté kationty jsou lépe rozpustné oproti měďným kationtům. V biologických systémech se nachází měď hlavně v dvou valenčním stavu, protože v přítomnosti kyslíku či jiných elektronových akceptorů je jednovalenční měď snadno oxidována na dvouvalenční měď. Měďnaté kationty mohou i redukovat v přítomnosti silných redukčních činidel, jakými jsou např. redukovaný gluthathion či askorbát (56).

Prostřednictvím Fentonovy reakce Fe^{2+} a Cu^{+} transformují slabý oxidační peroxid vodíku na hydroxylový radikál ($HO^{\cdot}$) (Reakce 9), jeden z nejreaktivnějších druhů v přírodě. V redukčním prostředí buňky jsou Fe^{3+} nebo Cu^{2+} neenzymaticky redukovány zpět na Fe^{2+} nebo Cu^{+} redukčními činidly (Reakce 9) (56).

$$Cu^{+} + H_2O_2 \longleftrightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + HO\cdot$$

Reakce 9: Vznik hyroxylového radikálu.

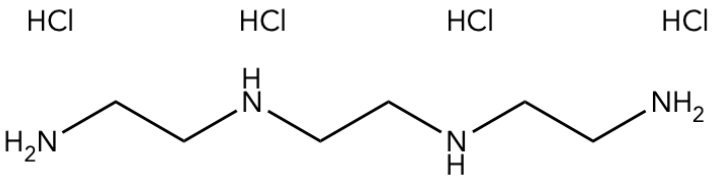
8. CHELATACE MĚDI

Chelatace vede ke vzniku různých sloučenin vazbou kovového kationtu na velkou molekulu za tvorby rozpustného komplexu. Je to fyzikálně-chemický proces, při němž některé organické sloučeniny váží více vazebné kationty kovů (železo, měď, vápník) dvěma nebo více vazbami, jedná se o takzvaného donora, který poskytuje volný elektronový pár. Rozlišujeme jednodonorové a vícedonorové ligandy. Počet vytvořených donor-akceptorových vazeb vyjadřuje koordinační číslo iontu. Příkladem může být tvorba komplexu dvojmocného kationtu s ethylendiaminotetraoctanem disodným (EDTA). Nejstabilnějšími komplexy jsou především komplexy obsahující pěti- nebo šestičlenné kruhy. Chelatačních látek se využívá i léčebně, např. k léčbě otrav některými kovy, např. olovem, k odstranění nadměrného množství mědi u Wilsonovy choroby nebo železa u hemochromatózy. EDTA vyvazuje vápník, čímž se krev stává nesrážlivou, čehož se využívá laboratorně, např. v hematologii a transfuzní službě. Pojem chelatace vychází z řeckého chele = ptačí pařát a klepeto raka (57, 58).

8.1. CHELATAČNÍ ČINIDLA MĚDI V TERAPII

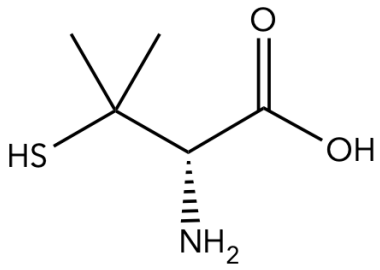
V současné době jsou pouze tři registrované léčivé přípravky. Pouze dva z nich jsou u nás v České republice obchodované. Tyto přípravky podléhají přísným kontrolám a evidenci jejich použití. Veškeré použití musí schválit revizní lékař. Měďnaté kationty jsou součástí celé řady potravních doplňků běžně dostupných v lékárnách na volný prodej.

Prvním z přípravků je Cuprior 150 mg, který obsahuje trientini tetrahydrochloridum (Obr. 5). Terapeutické rozmezí je mezi 450 – 975 mg rozdělených do 2 – 4 dávek za den. Trientin je chelatační činidlo, které vyvazuje měď, a jeho hlavním mechanismem účinku je eliminace absorbované mědi z organismu pomocí tvorby stabilních komplexů, které jsou pak vylučovány močí. Trientin může i inhibovat absorbci mědi vyvazováním v gastrointestinálním traktu (59).



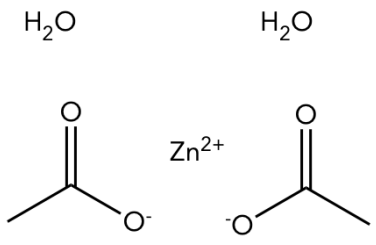
Obr. 5: Struktura trientinu tetrahydrochloridu (59).

Druhým přípravkem je Metalcaptase 150 a 300 mg, který obsahuje účinou látku penicillaminum (Obr. 6). Denní dávky se pohybují v rozmezí 10 – 20 mg/kg. Používá se jak u dospělích, tak u dětí s hepatoretikulární degradací. U terapie penicillaminem je zapotřebí současně podávat vitamin B_6 (pyridoxin). Penicillamin působí tak, že dochází k vazbě těžkých kovů přes volné elektronové páry dusíku a síry za účasti karboxylové skupiny (60).



Obr. 6: Struktura penicillaminu (60).

Třetím přípravkem je Wilzin 25 a 50 mg, který obsahuje účinou látku zinci acetas dihydricus (Obr. 7). Dávkování u dospělých je 50 mg 3x denně. U dětí ve věku 1 – 6 let je dávka 25 mg 2x denně a ve věku 6 – 16 let 25 mg 3x denně, od šestnácti let s hmotností nad 57 kg je dávka stejná jako u dospělých. Těhotné ženy mají upravenou dávku na polovinu dávky dospělých. Aktivní část dihydrátu octanu zinečnatého je zinkový kation, který blokuje střevní absorpci mědi z potravy a reabsorpci endogenně vylučované mědi. Zinek indukuje tvorbu metalothioneinu v erytrocytech, což je protein, který váže měď a tím brání jejímu přenosu do krve. Vázaná měď je pak vyloučena do stolice poté, co dojde k deskvamaci střevních buněk (61).



Obr. 7: Struktura zinci acetas dihydricus (61).

9. ALKALOIDY

Alkaloidy jsou organické chemické sloučeniny s dusíkem v heterocyklu, jsou jednou z nejvýznamnějších a největších skupin ze sekundárních metabolitů vznikajících z aminokyselin. Termín alkaloid byl poprvé navržen lékárníkem W. Meissnerem v roce 1819 k popisu jednoduchých sloučenin obsahujících dusík v rostlinách (5). Chemická struktura však byla identifikována mnohem později. V rostlině není vždy jen jeden alkaloid, ale jeden považujeme za nejdůležitější, za hlavní. Izomerní báze mají předpony pseudo-, iso-, epi-. Předpona nor- se používá pro demethylované deriváty. Jak již bylo zmíněno, alkaloidy obsahují ve své molekule dusík. Musí být alespoň jeden v molekule. Pravé alkaloidy mají dusík prekurzorové aminokyseliny zabudovaný v heterocyklu. Pokud je část aminokyseliny v cyklu, nazýváme je protoalkaloidy. Pokud heterocyklický dusík pochází z jiné aminokyseliny, než ze které je základní skelet, nazýváme je pseudoalkaloidy (62).

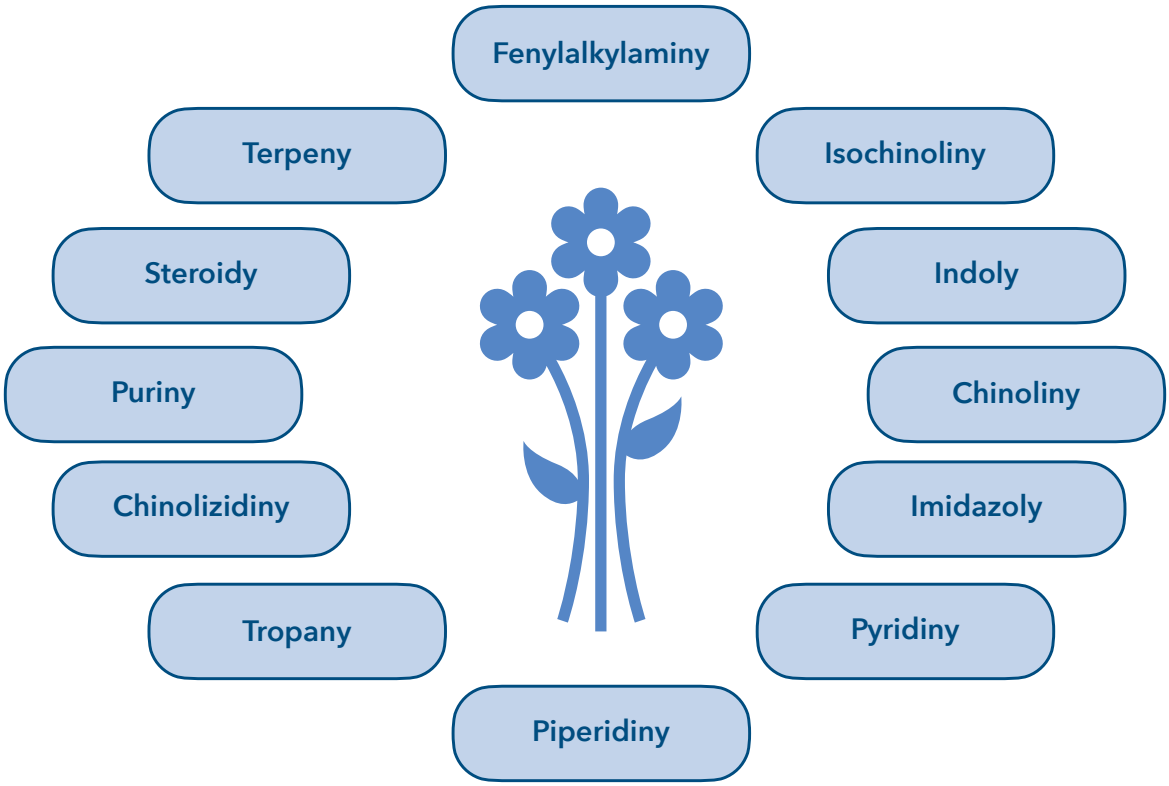
Alkaloidy jsou lipofilní báze ve vodě těžce rozpustné, většinou krystalické a bezbarvé látky (63). Výjimkou je například nikotin a spartein, což jsou kapaliny, a chelidonin, který má žluté zbarvení. K izolaci alkaloidů se využívají jejich soli, které jsou rozpustné ve vodě (64).

Alkaloidy se vyskytují především ve vyšších rostlinách (63). Dále jsou přítomny v mechu, bakteriích, houbách, řasách a mořských organismech. V jedné rostlině mohou být alkaloidy různých typů v různých orgánech. Obsah kolísá s měnícím se ročním obdobím (65).

Při izolaci se využívá bazických vlastností alkaloidů. V prvním kroku se izoluje směs všech přítomných alkaloidů z přírodního materiálu do organického rozpouštědla. Směs se přečistí převedením na sole rozpustné ve vodě, alkalizuje se a zpětně se převede do organické fáze. Dále je možno jednotlivé skupiny od sebe rozdělit podle pH gradientu (64).

Důkaz přítomnosti alkaloidů po extrakci probíhá pomocí srážecí reakce s Dragendorffovým činidlem (hnědočervená sraženina), které se využívá pro vizualizaci v TLC (64). Dále se používá Mayerovo činidlo (bílá sraženina) a další specifická činidla pro určitý typ alkaloidu (62).

Alkaloidy se dělí do několika základních skupin (Obr. 8) (63).



Obr. 8: Dělení alkaloidů (63).

9.1. ISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY

Isochinolinové alkaloidy představují jednu z největších skupin přírodních látek. Tyto sloučeniny jsou biogeneticky odvozeny od fenylalaninu a tyrosinu a zahrnují isochinolinový nebo tetrahydroisochinolinový kruh. Lze je rozdělit do mnoha strukturních podskupin: benzylisochinoliny, aporfiny, protoberberiny, benzo[*c*]fenantridiny, protopiny, ftalidisochinoliny, morfinany a emetiny. Mezi isochinolinové alkaloidy patří galanthamin z *Galanthus nivalis* L. (sněženka podsněžní). Je to inhibitor acetylcholinesterasy a je hlavní složkou v mnoha registrovaných léčivých přípravcích při léčbě Alzheimerovy choroby (63). Opium je zdrojem dalších alkaloidů získávaných z *Papaver somniferum* L. (mák setý). Obsahuje alkaloidy morfin, kodein, narkotin, papaverin, thebain a narcein. Opium crudum (surové opium) se získává ze zasychající mléčné šťávy nezralých makovic. Opium slouží výhradně jako výchozí surovina pro přípravu galenických přípravků (63). Ze surového opia se vysušením a práškováním získá opii pulvis normatus (opium práškované standardizované) nebo opii extractum siccum normatum (opiový extrakt suchý standardizovaný) a také opii tinctura normata (opiová tinktura standardizovaná), která se využívá k zástavě u jinak nezvladatelných průjmů (antidiarhoikum) (64). Morfin využívaný

jako analgetikum anodynum (součást HVLP) tlumí CNS, kašel a střevní peristaltiku. Ve vysokých dávkách působí hypnoticky (63). Kodein (součást HVLP) je užívaný pro své tlumící účinky suchého dráždivého kašle, jedná se o centrální antitusikum (63) a narkotin (noskapin) má slabé tlumivé účinky na CNS a v opiu potencuje účinek morfinu, používal se v preparátech pro zástavu děložního krvácení (64). Papaverin potlačuje křeče a používá se jako spasmolytikum hladkého svalstva gastrointestinálního traktu, močových nebo žlučových cest (63). Thebain, typický křečový jed, připomíná strychnin a terapeuticky se nijak nevyužívá (64). Dále rhoeadin získaný z *Papaver rhoeas* L. (mák vlčí) se používal jako sedativum u dětí a antitusikum u dospělých. Chelidonin získávaný z *Chelidonium majus* L. (vlaštovičník větší) se využívá pro své analgetické a spasmolytické účinky. V lidovém léčitelství se vlaštovičník využívá pro léčbu bradavic. Alkaloidy berberin a hydrastin získávané z *Hydrastis canadensis* L. (vodilka kanadská) mají uterinní hemostyptické účinky. Boldin z *Peumus boldus* MOLINA (boldovník vonný) se pro své účinky užívá jako spasmolytikum, choleretikum, cholagogum, antihelmitikum, mírné diuretikum a je součástí čajové směsi Thé Salvat (63). Emetin a cephaelin z *Caphaelis ipecacuanha* (BROT) L. Andersson (hlavněnka dávivá) se využívaly v nižších koncentracích jako sekretolytikum a expektorans, ve vyšších koncentracích působí emeticky (65).

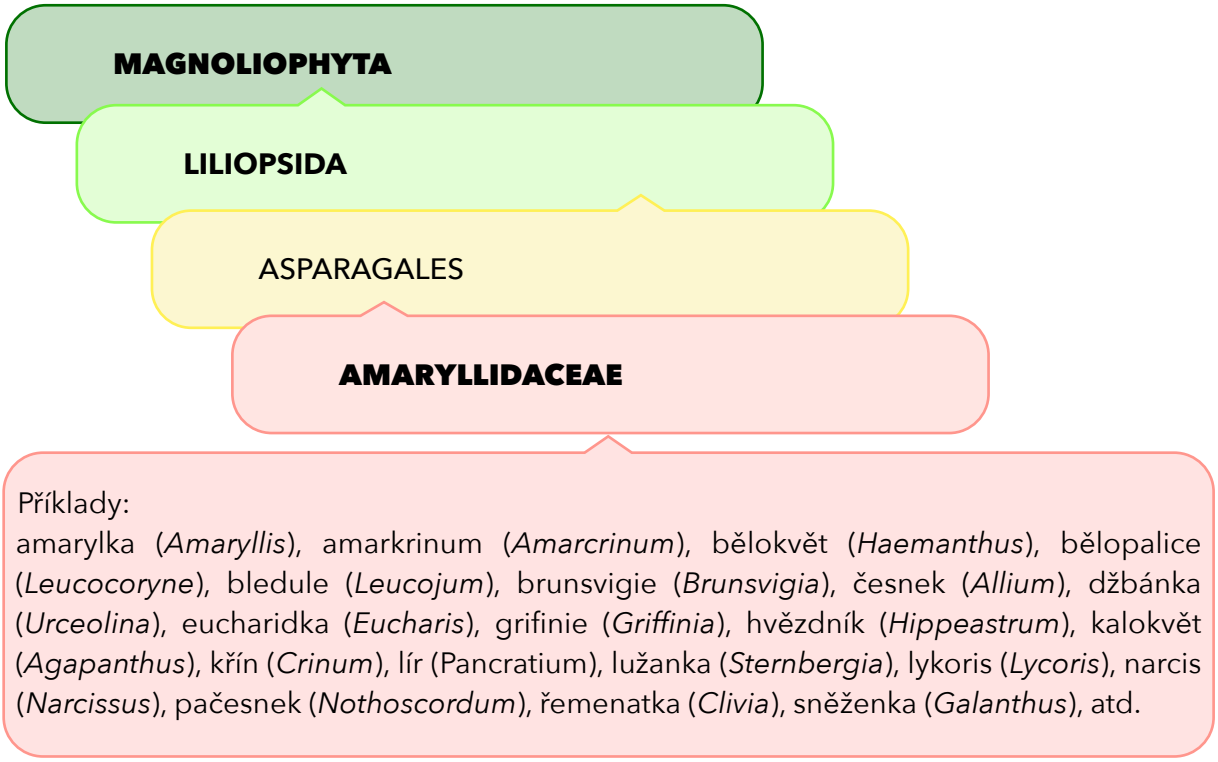
9.1.1. ALKALOIDY ČELEDI AMARYLLIDACEAE

Amaryllidaceae je čeleď bylinných, vytrvalých a cibulovitých kvetoucích rostlin. Alkaloidy se hromadí zejména v cibulích. Sloučeniny izolované z rostlin čeledi Amaryllidaceae jsou známé svými léčivými vlastnostmi několik tisíciletí. Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou vysoce kosmopolitní, vyskytují se ve všech biotopech světa a pochází ze střední Asie a Severní Ameriky. Amaryllidaceae se skládá ze 79 rodů včetně *Allium*, *Nothoscordum*, *Prototulbaghia* a *Tulbaghia* (Obr. 9) (66).

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae byly izolovány z rostlin téměř všech rodů čeledi Amaryllidaceae a jsou členy velké skupiny isochinolinových alkaloidů. Ačkoli se jejich struktury jeví velmi rozdílně, je známo, že se vytvářejí biogeneticky intramolekulární oxidační vazbou norbelladinů. Od izolace lykorinu z *Narcissus pseudonarcissus* L. v roce 1877 bylo z rostlin této čeledi izolováno více než 800 alkaloidů (66), včetně těch, které byly

nedávno izolovány z *Pancratium canariense* Ker Gawl. Bylo stanoveno mnoho jejich struktur. Struktury alkaloidů jsou klasifikovány hlavně do devíti typů: norbelladin, lykorin, homolykorin, krinin, haemanthamin, narciklasin, tazettin, montanin a galanthamin. Narciklasin má významný protinádorový účinek, proto je středem pozornosti biologů a farmakologů (68). Chemické struktury a farmakologické vlastnosti alkaloidů čeledi Amaryllidaceae jsou velmi variabilní. Některé druhy této čeledi obsahují galanthamin, inhibitor acetylcholinesterasy schválený pro léčbu Alzheimerovy choroby. Alkaloidy Amaryllidaceae mají skutečně celou řadu biologických aktivit, včetně antivirových, antiparazitických a protirakovinových (69).

Mezi tyto alkaloidy patří i námi testované alkaloidy, a to galanthaminového typu (galanthamin, galathamin hydrobromid, chlidanthin), lykorinového typu (galanthin, lykorin), haemanthaminového typu (haemanthamin, vittatin) a montaninového typu (montanin).

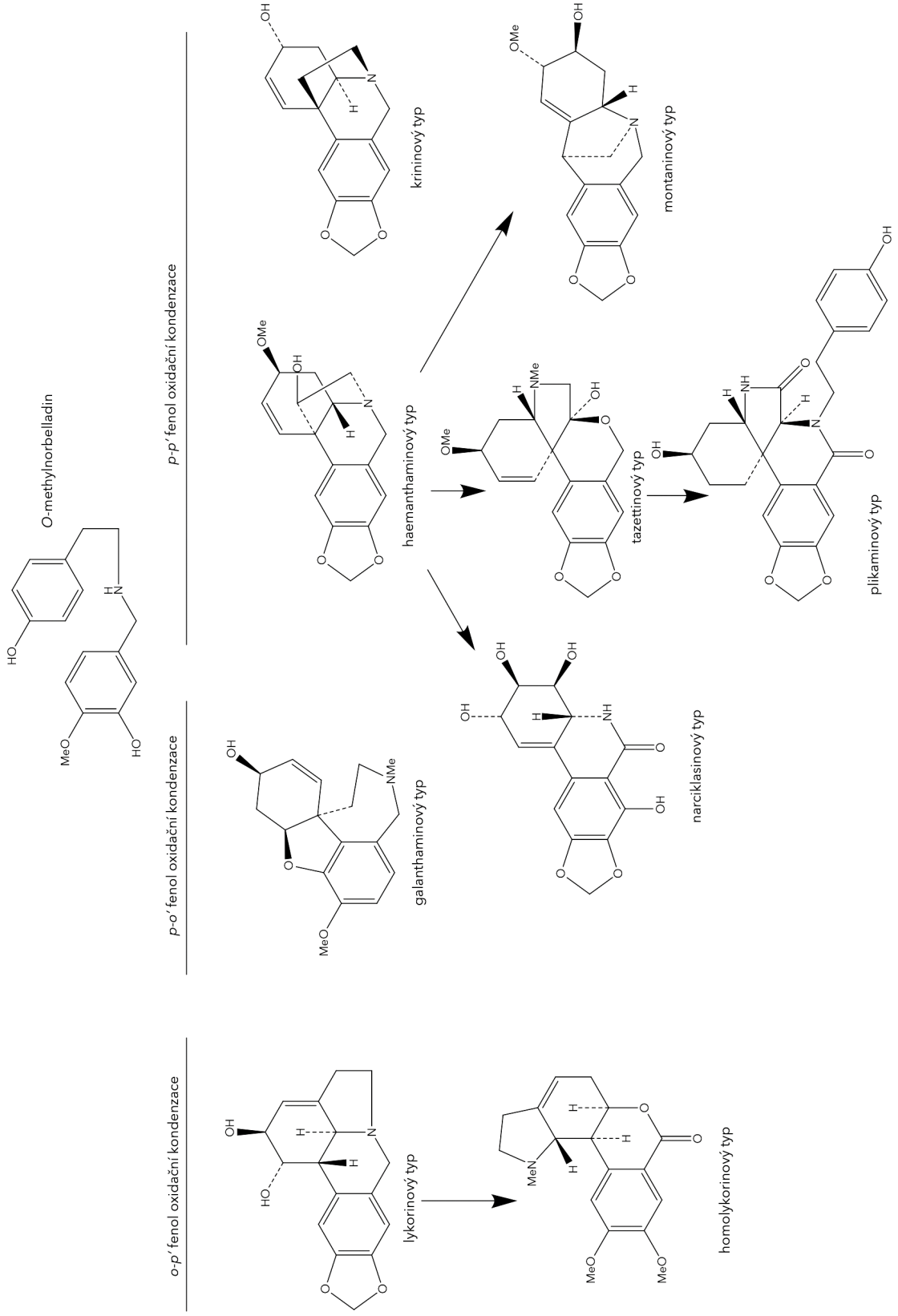


Obr. 9: Zařazení do systému a zástupci čeledi Amaryllidaceae (67, 70).

9.2. TESTOVANÉ ALKALOIDY

Testovány byly alkaloidy galanthamin, galanthamin hydrobromid, chlidanthin, lykorin, galanthin, haemantamin, vittatin a montanin. Některé z těchto alkaloidů jsou toxické, např. lykorin a haemathamin, některé mají cytotoxické účinky. Jejich biosyntéza vychází z aromatických kyselin. Jedna část molekuly pochází z tyrosinu a druhá z fenylalaninu. Terapeuticky je současně nejvýznamnější galanthamin jako galanthamin hydrobromid v terapii degenerativních změn CNS, jelikož působí jako inhibitor acetylcholinesterasy, dále působí myoticky, hypersekreticky, antagonisticky proti kurare a zvyšuje tonus příčně pruhovaného kosterního svalstva (63).

I když jsou alkaloidy Amaryllidaceae strukturně různorodé, jsou biogeneticky příbuzné a lze je rozdělit podle devíti základních struktur: norbelladin, lykorin, homolykorin, krinin, haemanthamin, narciklasin, tazettin, montanin a galanthamin. Alkaloidy pocházejí ze společného prekurzoru *O*-methylnorbelladinu, který je syntetizován z aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu. V *Narcissus broussonetii* Lag. byly identifikovány nové alkaloidy plikaminového typu, které jsou vzhledem ke své strukturální podobnosti pravděpodobně odvozeny od alkaloidů tazettinového typu. Všech těchto devět základních typů alkaloidů Amaryllidaceae společně s novými sloučeninami plikaminového typu se syntetizuje na základě různé fenol oxidační kondenzace *O*-methylnorbelladinu (Obr. 10). Významným taxonomickým rysem v rodu *Narcissus* je nedostatek alkaloidů krininového typu. Tyto rostliny syntetizují alkaloidy pomocí α-5,10b-ethano můstku (haemanthaminového typu), ale ne s β-5,10b-ethano můstkem (krininového typu) (71).



Obr. 10: Cesta syntézy hlavních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae (71).

9.2.1. ALKALOIDY GALANTHAMINOVÉHO TYPU

Galanthamin, v současnosti uváděný na trh pod obchodním názvem Galantamin Mylan, se díky svým inhibičním účinkům na acetylcholinesterasu (AChE) používá k léčbě Alzheimerovy choroby. Bylo popsáno, že několik druhů *Narcissus* má vysoký obsah galanthaminu a některé se používají jako zdroj galanthaminu ve farmaceutickém průmyslu (71).

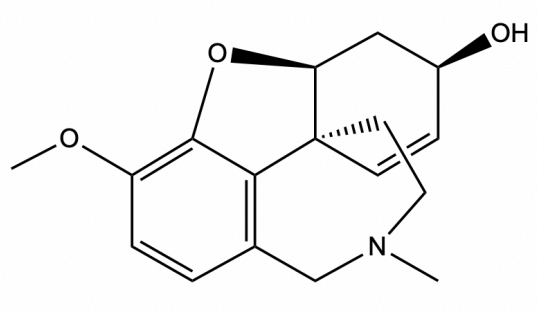
9.2.1.1. GALANTHAMIN

Galanthamin (Obr. 11) je terciální, selektivní, kompetitivní a reverzibilní inhibitor AChE, alkaloid vyskytující se v čeledi Amaryllidaceae používaný k léčbě poškození paměti u neurodegenerativní Alzheimerovy choroby a vaskulární demence. Existují důkazy, že galanthamin může kromě svých účinků na acetylcholinesterasu zvýšit nebo inhibovat mozkové nikotinové acetylcholinové receptory, což by mohlo zvýšit nebo snížit terapeutickou účinnost galanthaminu a poskytuje tak terapeutický přínos v oblastech poznání, pozornosti a antineurodegenerativní aktivity. Galanthamin se vyskytuje u několika druhů čeledi Amaryllidaceae, včetně *Galanthus nivalis* L., *Leucojum aestivum* L., *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herbert a *Narcissus* spp. (72, 73, 74).

Galanthamin hydrobromid (Obr. 12) je určen k symptomatické léčbě mírné až středně těžké demence Alzheimerovy choroby. Galanthamin hydrobromid zesiluje vlastní účinek acetylcholinu na nikotinové receptory, nejspíše vazbou na alosterické vazebné místo receptoru. V důsledku toho lze u pacientů s demencí Alzheimerovy choroby dosáhnout zvýšené aktivity cholinergního systému vedoucí ke zlepšení kognitivní funkce. Galanthamin hydrobromid je alkalická sloučenina s disociační konstantou (pKa 8,2), slabě lipofilní s rozdělovacím koeficientem (Log P) n-oktanol/tlumivý roztok (pH 12) 1,09. Rozpustnost ve vodě (pH 6) činí 31 mg/ml. Galanthamin hydrobromid je parciálně metabolizován různými cytochromy P450, zejména CYP2D6 se podílí na tvorbě *O*-desmethylgalantaminu a CYP3A4 na tvorbě *N*-oxid-galantaminu. Některé z metabolitů vytvářených během degradace galanthaminu hydrobromidu se jeví aktivními *in vitro*, avšak nedůležitými *in vivo* (75).

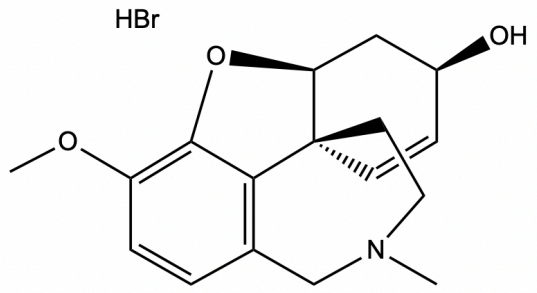
Izotopem ^{11}C značený galanthamin lze využít také pro PET/CT radiodiagnostiku acetylcholinesterasy, jedná se o neinvazivní metodu zobrazení poškozené části mozku (76).

Mw = 287,35 g/mol



Obr. 11: Struktura galanthaminu (77).

Mw = 368,3 g/mol



Obr. 12: Struktura galanthaminu hydrobromidu (78).

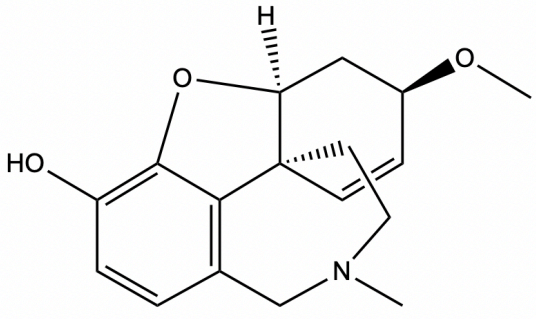
9.2.1.2. CHLIDANTHIN

Chlidanthin (Obr. 13) obdobně jako galanthamin inhibuje acetylcholinesterasu, ale i butyrylcholinesterasu (79). Chlidanthin byl nalezen v *Chlidanthus fragans* (Boit). Základní skelet obsahuje jednu metoxy skupinu a jednu *N*-metylovou skupinu. Po ošetření kyselinou bromovodíkovou byl chlidanthin přeměněn na apogalanthamin (80).

Alkaloid chlidanthin je izomer galanthaminu, avšak ve srovnání s galanthaminem a sanguininem má velmi slabý inhibiční účinek proti acetylchlinesterase. Výsledky studie Ortize a kol. (r. 2018) mohou takové chování velmi dobře vysvětlit. Zatímco chlidanthin se nachází prakticky na stejném místě aktivního centra acetylcholinesterasy jako galanthamin a sanguinin, jejich prostorové uspořádání je velmi odlišné od prostorového uspořádání AChE s galanthaminem a sanguininem. Rozdílné prostorové uspořádání je odpovědné za slabší interakce chlidanthinu oproti interakcím sanguininu a galanthaminu (79).

Chlidanthin, analogicky se známou přeměnou kodeinu na morfin, vzniká z galanthaminu *O*-demetylací, jak se experimentálně prokázalo při začlenění tritiem značeného galanthaminu a narwedinu do struktury chlidanthinu (80).

Mw = 287,35 g/mol



Obr. 13: Struktura chlidanthinu (81).

9.2.2. ALKALOIDY LYKORINOVÉHO TYPU

Lykorin, nejhojněji se vyskytující alkaloid lykorinového typu v rodu *Narcissus*, je inhibitor růstu rostlin, vykazuje cytotoxicitu proti *Trichomonas vaginalis*, má protizánětlivé účinky a antimalarické a protinádorové vlastnosti. Dále vykazuje inhibiční aktivitu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy. Lykorin má *in vitro* cytostatické účinky proti několika lidským rakovinným buňkám, zatímco jeho derivát pseudolykorin má cytotoxické vlastnosti, a byl proto navržen jako prototyp pro další výzkumy v léčbě metastatických rakovinných buněk, které jsou rezistentní vůči většině v současnosti dostupných protirakovinových léčiv (71).

9.2.2.1. LYKORIN

Pyrrolofenanthridinový alkaloid lykorin se nachází v různých druzích čeledi Amaryllidaceae. Mezi nejčastěji uváděné druhy čeledi Amaryllidaceae, které obsahují lykorin, patří např. *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herbert, *Leucojum aestivum* L., *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb., *Hippeastrum equestre* (Lam.) Voss, *Ammocharis coranica* (Ker Gawl.) Herb., *Brunsvigia radulosa* Herb. a *Crinum macowanii* Baker. Lykorin lze získat asymetrickou chemickou syntézou nebo strategií totální syntézy, které jsou také použitelné pro získání jiných derivátů lykorinu. Amaryllidaceae poskytuje velkou rozmanitost biologicky aktivních alkaloidů, u kterých bylo prokázáno, že biosynteticky pocházejí z běžného meziproduktu norbelladinu. Norbelladin podléhá různým cyklizacím, přestavbám, eliminaci a/nebo recyklaci za účelem získání různých sloučenin, např. právě lykorinu (Obr. 14). Lykorin je bezbarvá krystalická látka s teplotou tání 260–262 °C, nemísitelná s vodou a nerozpustná v etheru a alkoholu. Biologická aktivita lykorinu je pevně spojena s jeho strukturou. Mírná modifikace v určité skupině činí tuto sloučeninu buď méně aktivní nebo neaktivní. Strukturálními parametry, které významně přispívají k aktivitě lykorinu jsou: přítomnost planarity molekuly, olefinového nebo dioxolového kruhu, přítomnost hydroxylových skupin a přítomnost kladného náboje na dusíkové a aminové skupině. Lykorin vykazuje antivirové, protinádorové, antiflogistické, antibakteriální a antiparazitární účinky (82).

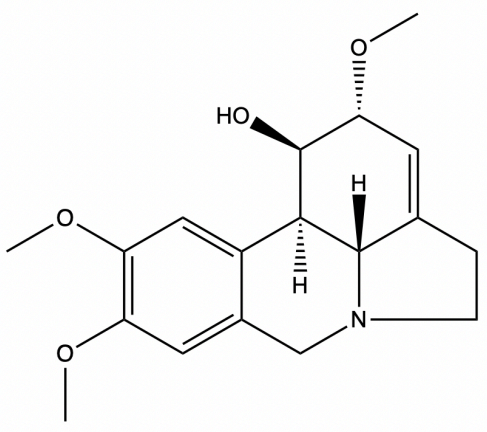
Mw = 287,31 g/mol

Obr. 14: Přeměna norbelladinu na lykorin (83).

9.2.2.2. GALANTHIN

Galanthin (Obr. 15), obdobně jako galanthamin, patří mezi látky ovlivňující inhibičně acetylcholinesterasu a hraje roli v rozvoji Alzheimerovy choroby. Dále má významné protinádorové účinky. Galanthin byl izolován z *Galanthus fosteri* Baker, *Narcissus pseudonarcissus* L., *Habranthus robustus* Herb. ex Sweet a dalších rostlin (84).

Mw = 317,4 g/mol



Obr. 15: Struktura galanthinu (85).

9.2.3. ALKALOIDY HAEMANTHAMINOVÉHO TYPU

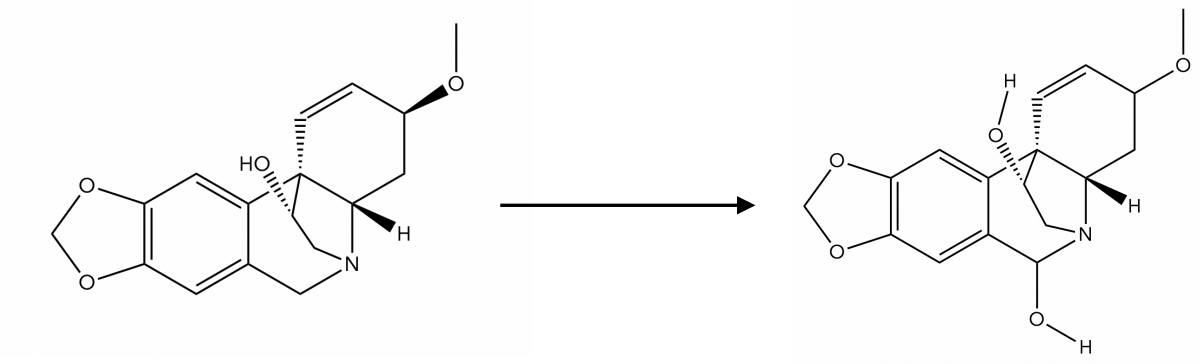
Alkaloidy haemanthaminového typu jsou biogenetické prekurzory jiných typů sloučenin, jako jsou alkaloidy tazettinového, montaninového a narciklasinového typu. Haemanthamin, nejrozšířenější alkaloid v této skupině, je silným inhibitorem růstu buněk a induktorem apoptózy u řady nádorových buněk. Také vykazuje antimalarickou aktivitu (71).

9.2.3.1. HAEMANTHAMIN

Haemanthamin patří mezi isochinolinové alkaloidy. Vyskytuje se v druzích *Narcissus* spp. (narcis), *Galanthus* spp. (sněženka) a *Leucojum* spp. (bledule) (63). Haemanthamin je alkaloid původně odvozený od 5,10-P-ethanofenanthridinu. Patří k alkaloidům haemanthaminového typu a tvoří páry sloučenin s hydroxy substituentem na C6. Zjistilo se, že rostliny z čeledi Amaryllidaceae enzymaticky přeměňují haemanthamin na haemanthidin (Obr. 16) ireverzibilním způsobem. Haemanthidin vykazuje cytotoxický účinek na nádorové buňky. V kombinaci s butyrátem sodným významně inhibuje proliferaci nádorových buněk. Haemanthamin představuje díky svým antioxidačním, antivirovým, antimalarickým a antikonvulzivním účinkům pro farmaceutický výzkum slibné činidlo (86).

Systematický chemický název haemanthaminu je 3-methoxy-1,2-didehydrokrinan-11-ol. Existuje však několik synonym pro triviální název látky, včetně 3-epikrinaminu, hemanthaminu nebo natalensinu, z nichž všechny patří do stejné skupiny odvozené od stejné sloučeniny (87).

Mw = 301,34 g/mol



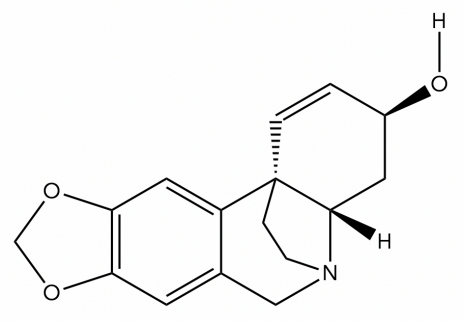
Haemanthamin Haemanthidin

Obr. 16: Přeměna haemanthaminu na haemanthidin (88).

9.2.3.2. VITTATIN

Vittatin (Obr. 17) byl izolován např. z *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. a *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herb. Bahno a kol. popisují stereoselektivní celkovou syntézu (+)-vittatinu a (+)-haemanthaminu vycházející z D-glukózy. Cyklohexenový kruh byl připraven v opticky aktivní formě z D-glukózy za použití karbocyklizační reakce a kritický kvartérní uhlík byl stereoselektivně generován přenosem chirality pomocí přesmyku cyklohexenolu. Kostra hexahydroindolu byla účinně zkonstruována intramolekulární aminomercurací-demerkurací, následovanou Chugaevovou reakcí. Nakonec Pictet–Spenglerova reakce dokončila první chirální syntézu (+)-vittatinu. Na druhé straně α-hydroxylace esteru stereoselektivně pokračovala za vzniku α-hydroxyesteru, do kterého byla zavedena aminoskupina (89).

Mw = 271,31 g/mol



Obr. 17: Struktura vittatinu (90).

9.2.4. ALKALOIDY MONTANINOVÉHO TYPU

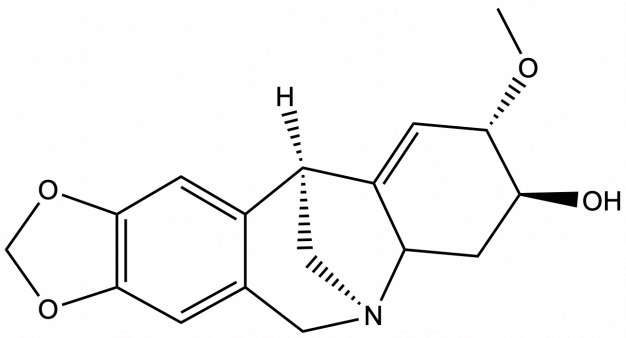
Montaninová skupina alkaloidů je charakterizována 5,11-methanomorftridinem kruhovým systémem. Mezi nejvýznamnější alkaloidy montaninového typu patří montanin, který vykazuje významnou protinádorovou aktivitu. Montanin je cytotoxický pro lidské rakovinné buňky. Mezi alkaloidy montaninového typu patří také pankracin, manthin a brunsvigin (91).

9.2.4.1. MONTANIN

Montanin (Obr. 18) má jádro 5,11-methanomorftridinu a liší se od ostatních alkaloidů montaninového typu v substituentech na C2 a C3. Nejvyšší množství montaninu bylo zjištěno v kořenech a nejnižší v listech. Montanin byl např. izolován z *Haemanthus humilis* Jacq. Nachází se v rodech *Hippeastrum*, *Lycoris*, *Pancratinum* a *Scadoxus*. Bylo zjištěno, že vykazuje významnou protinádorovou aktivitu, dále má AChE inhibiční a antiartritické účinky (92).

Nedávno bylo prokázáno, že montanin má anxiolytické, antidepresivní a antikonvulzivní účinky a imunomodulační vlastnosti. Kromě toho má antirevmatické, antimikrobiální a antiproliferativní účinky. Tyto důležité farmaceutické vlastnosti zdůvodňují vzrůstající zájem o tuto třídu sloučenin (93).

Mw = 400,5 g/mol



Obr. 18: Struktura montaninu (94).

10. METODIKA PRÁCE

10.1. POMŮCKY

- Počítač
- Spektrofotometr Synergy HT multidetection microplate reader (BioTech, Praha)
- Spektrofotometr NEO2MALPHA Synergy 02 (BioTech, Praha)
- Automatické pipety a pipetovací špičky (Brand)
- Vícekanálové pipety (Biohit)
- Vany pro více kanálové pipety
- 96 jamkové mikrotitrační destičky (Brand)
- Mikrozkumavky
- Třepačka IKA MS3 digital
- Váhy Kern ABT 120-5DM
- Ultrazvuková lázeň
- Vortex IKA vortex Genius 3

10.2. REAGENCIE

- Pentahydrát síranu měďnatého (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- Hematoxylin (HEM) (certifikováno Biological Stain Commission, Sigma-Aldrich)
- Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (čistota ≥ 99%, Lachner)
- Chlorid měďnatý (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný (čistota ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (čistota 32%, Penta)
- 15mM acetátové pufry – pH 4,5 a 5,5 (příprava: kyselina octová (Penta), octan sodný (Penta), ultračistá voda)
- 15mM HEPES pufry – pH 6,8 a 7,5 (příprava: HEPES (Sigma-Aldrich), HEPES sodná sůl (Sigma-Aldrich))

10.3. TESTOVANÉ ALKALOIDY

Všechny testované alkaloidy čeledi Amaryllidaceae byly izolovány na katedře farmaceutické botaniky. Jediný komerční od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika) byl alkaloid galanthamin hydrobromid. Čistota látek byla ≥ 98 %. Testovány byly alkaloidy galanthaminového, lykorinového, haemanthaminového a montaninového typu.

Alkaloidy galanthamin a chlidanthin byly izolovány z čerstvých hlíz *Chlidanthus fragrans* Herb. (95). Galanthamin hydrobromid byl komerční od firmy Sigma-Aldrich. Alkaloid lykorin byl také izolován z hlíz *Chlidanthus fragrans* Herb. Galanthin byl izolován z hlíz *Zephyranthes robusta* BAKER (96). Haemanthamin a vittatin byly stejně jako galanthin izolovány a určeny v hlízách *Zephyranthes robusta* BAKER (96). Alkaloid montanin byl izolován z rodu *Hippeastrum* (97).

Všechny chemické struktury testovaných alkaloidů byly objasněny pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) a 1D a 2D nukleární magnetické rezonance (NMR) (95, 96, 97).

10.4. ZÁKLADNÍ A PRACOVNÍ ROZTOKY

Základní roztoky v destilované vodě:

I. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (5mM),

II. CuCl (5mM) ve vodném roztoku 0,1M HCl a 1M NaCl,

III. Hematoxylin (5mM) stabilita cca 5 hodin,

IV. Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (5mM),

V. Hydroxylamin hydrochlorid (100mM).

Ze zásobních roztoků se připraví roztoky pracovní:

I. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (250μM) v destilované vodě,

II. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (250μM) v DMSO,

III. CuCl (250μM) v destilované vodě,

IV. CuCl (250μM) v DMSO,

V. Hematoxylin (250μM, stabilita pouze 90 min.) v destilované vodě,

VI. Hematoxylin (250μM, stabilita pouze 90 min.) v DMSO,

VII. Hydroxylamin hydrochlorid (1mM a 10mM) v destilované vodě.

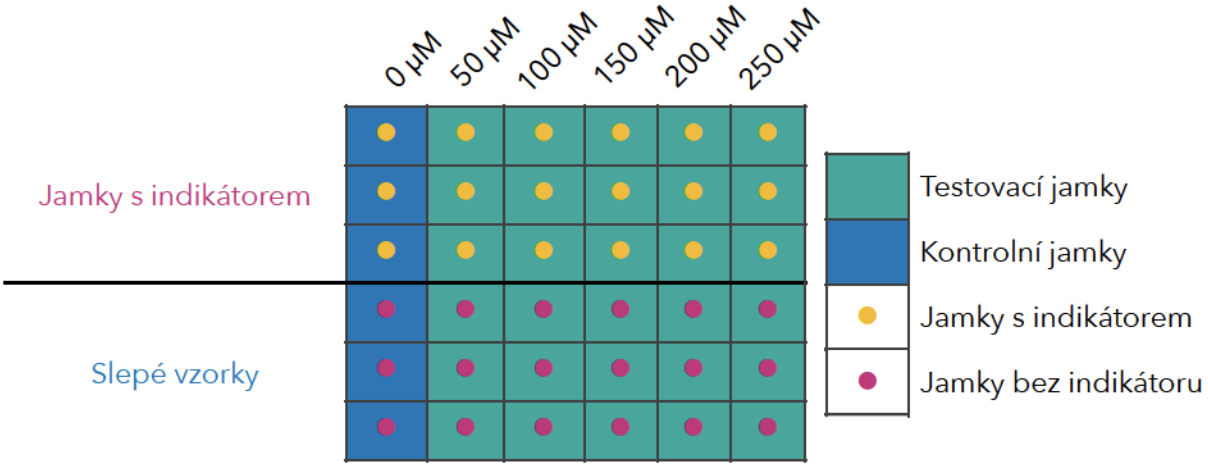
10.5. KONTROLA ZÁKLADNÍHO ROZTOKU MĚDI

Kontrola se provádí po přípravě základních roztoků. Roztoky jsou stabilní. Kontrola platí pro oba základní roztoky Cu^{2+} a Cu^{+}.

Provádí se následovně: napipetuje se na mikrotitrační destičku do dvou jamek pod sebou 150 μL pufru pH 7,5, 50 μL 1mM roztoku hydroxylaminu, 50 μL 0,25mM roztoku měďnatých kationtů, následně se nechá mikrotitrační destička 1 min. míchat a poté se napipetuje 50 μL 5mM roztoku BCS, vyčká se 1 min. a změří se absorbance obou jamek při 484 nm. Správně připravený roztok by měl mít absorbanci v rozmezí 0,500 – 0,550.

10.6. KALIBRAČNÍ KŘIVKA MĚĎNATÝCH KATIONTŮ

Po přípravě základních roztoků se ze zásobního základního roztoku měďnatých kationtů (5mM) připraví pracovní roztoky o molárních koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 μM a pracovní roztok 1mM HA. Následně se do všech určených jamek mikrotitrační destičky napipetuje 150 μL pufru o pH 6,8, přidá se 50 μL 1mM roztoku HA, 50 μL pracovního roztoku měďnatých kationtů žádané koncentrace do testovacích jamek (označeny zeleně) nebo 50 μL destilované vody do kontrolních jamek (označeny modře). Mikrotitrační destička se míchá po dobu jedné minuty a přidá se do poloviny jamek 50 μL základního roztoku BCS (●) a do zbylé poloviny jamek se přidá 50 μL destilované vody (●). Ihned se změří absorbance při vlnové délce 484 nm a poté v čase 5 min (Obr. 19). Z naměřených hodnot se sestrojí kalibrační křivka.



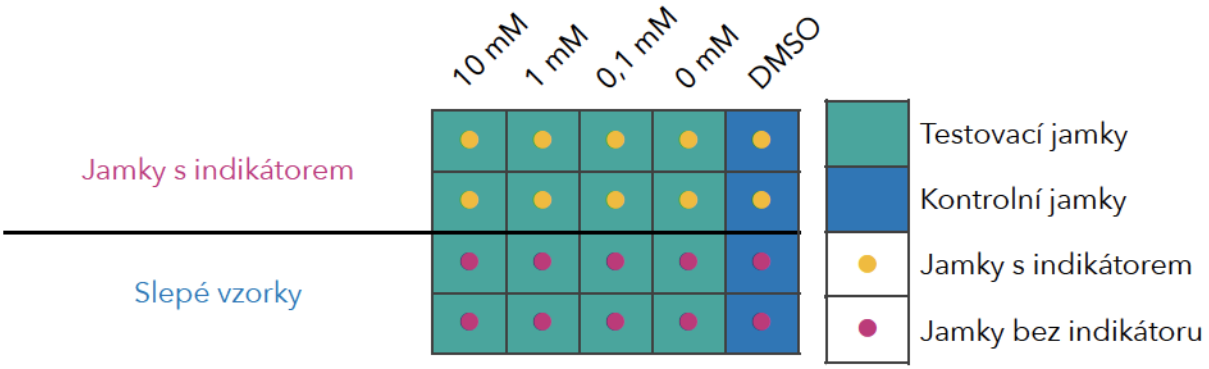
Obr. 19: Obsah mikrotitrační destičky pro sestrojení kalibrační křivky.

Konečný obsah jamky: 150 μL pufru, 50 μL roztoku Cu^{2+}, 50 μL HA a 50 μL vody/BCS

10.7. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ HEMATOXYLINEM

Ke stanovení se použijí základní roztoky $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (5mM) v destilované vodě a hematoxylin (5mM) v DMSO. Je zapotřebí dávat pozor na stabilitu připraveného roztoku HEM (5mM), která je cca 5 hodin. Dále se použijí pracovní roztoky Cu^{2+} 250 µM (ve vodě) a testovaná látka potřebné koncentrace (10, 1, 0,1 mM) a HEM 250 µM v DMSO, který je stabilní 90 min.

Vlastní experiment probíhá při různých podmínkách. Pracuje se v prostředí různých pH pufrů, a to při pH 5,5, 6,8 a 7,5. Do mikrotitračních destiček se napipetuje 150 µL příslušného pufru. Přidá se 50 µL 250µM vodného roztoku měďnatých kationtů do všech jamek, 50 µL roztoku testované látky příslušné koncentrace do testovacích jamek (zelené) nebo rozpouštědla do kontrolních jamek (modré), nechá se dvě minuty míchat, přidá se 50 µL 250µM roztoku HEM do první poloviny (●) nebo DMSO do druhé poloviny (●). DMSO se pipetuje nejdříve. Nechá se tři minuty míchat a ihned se změří absorbance při vlnových délkách 610 nm pH 7,5, 590 nm pH 6,8 a 595 nm pH 5,5. Dále se měří v čase 5 a 7 min (Obr. 20).

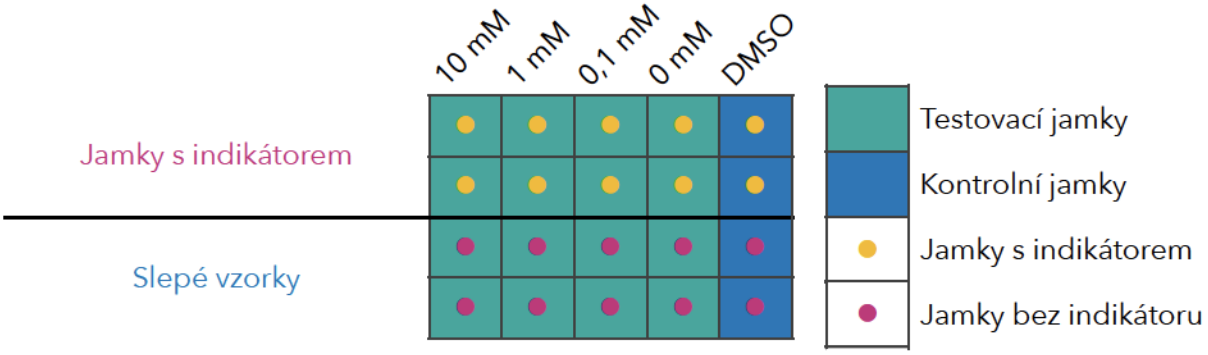


Obr. 20: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďnatých kationtů hematoxylinem.

Konečný obsah jamky: 150 µL pufru, 50 µL roztoku Cu^{2+}, 50 µL roztoku testované látky nebo rozpouštědla a 50 µL roztoku HEM nebo DMSO

10.8. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ V PUFRU

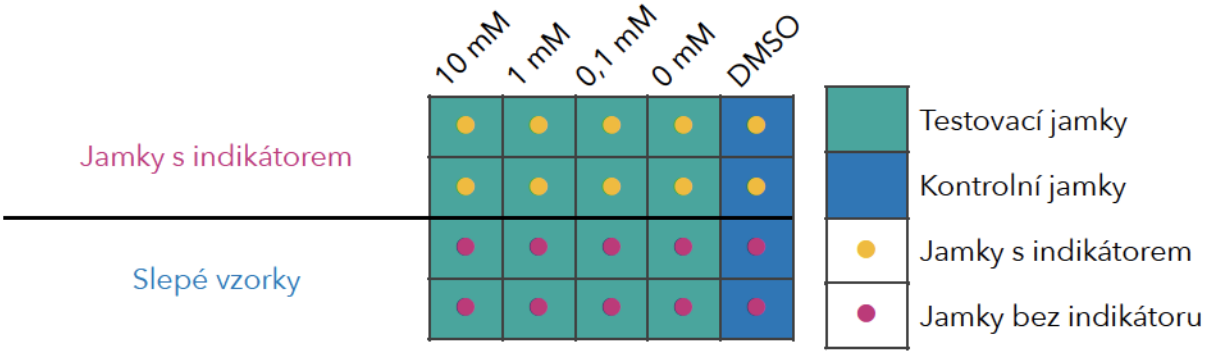
Do mikrotitrační destičky se napipetuje 100 µL příslušného pufru (pH 6,8, 7,5, 4,5 nebo 5,5), přidá se 50 µL roztoku testované látky do testovacích jamek (zelené) nebo rozpouštědla do kontrolních jamek (modré), přidá se 50 µL 250µM roztoku měďnatých kationtů v DMSO do všech jamek a nechá se dvě minuty míchat. Přidá se 50 µL roztoku HA 1mM pro pH 6,8 a 7,5 a 10mM pro pH 4,5 a 5,5 a nechá se jednu minutu míchat. Přidá se 50 µL 5mM roztoku BCS (●) nebo destilované vody (●) a měří se absorbance při vlnové délce 484 nm ihned a po 5 min (Obr. 21).



Obr. 21: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďnatých kationtů v pufru.

10.9. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNÝCH KATIONTŮ V PUFRU

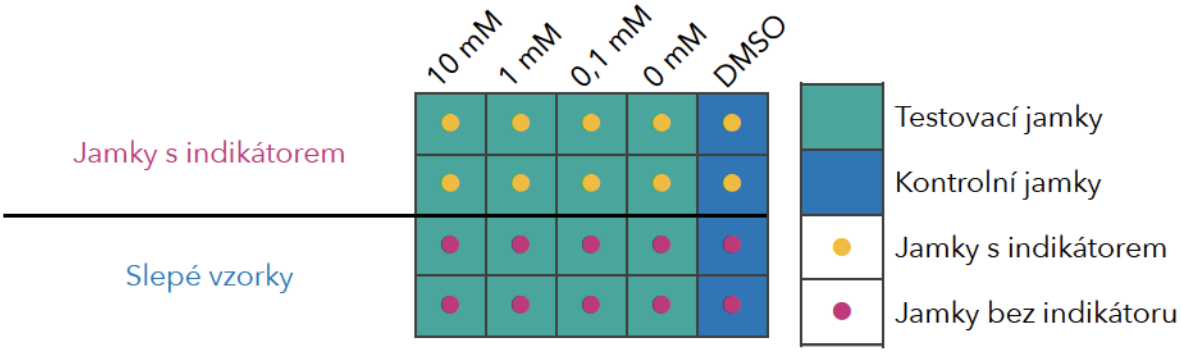
Do mikrotitrační destičky se napipetuje 100 µL příslušného pufru (pH 6,8, 7,5, 4,5 nebo 5,5) a přidá se 50 µL roztoku HA 1mM pro pH 6,8 a 7,5 a 10mM pro pH 4,5 a 5,5. Dále se přidá 50 µL 250µM roztoku měďných kationtů v DMSO do všech jamek a nechá se minutu míchat. Přidá se 50 µL roztoku testované látky příslušné koncentrace do testovacích jamek (zelené) nebo rozpouštědla do kontrolních jamek (modré) a nechá se dvě minuty míchat. Přidá se 50 µL 5mM roztoku BCS (●) nebo destilované vody (●) a měří se absorbance při vlnové délce 484 nm ihned a po 5 min (Obr. 22).



Obr. 22: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďných kationtů v pufru.

10.10. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ V DMSO

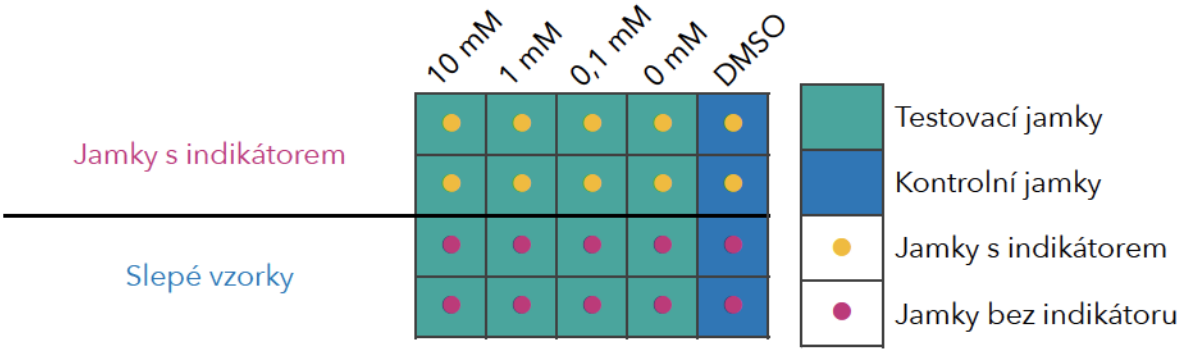
Do mikrotitrační destičky se napipetuje 100 µL roztoku testované látky příslušné koncentrace v DMSO (zelné) nebo rozpouštědla do kontrolních jamek (modré), přidá se 50 µL 250µM roztoku měďnatých kationtů v DMSO do všech jamek a nechá se dvě minuty míchat. Poté se přidá 50 µL 1mM roztoku HA a nechá se jednu minutu míchat a přidá se 50 µL 5mM roztoku BCS (●) nebo destilované vody (●) a měří se absorbance při vlnové délce 484 nm ihned a po 5 min (Obr. 23).



Obr. 23: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďnatých kationtů v DMSO.

10.11. STANOVENÍ CHELATACE MĚĎNÝCH KATIONTŮ V DMSO

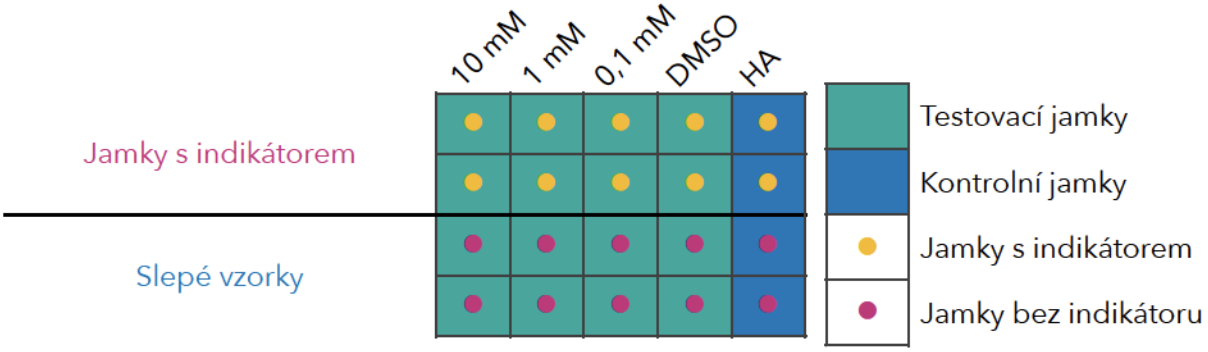
Do mikrotitrační destičky se napipetuje 100 µL roztoku testované látky příslušné koncentrace v DMSO (zelné) nebo rozpouštědla do kontrolních jamek (modré), přidá se 50 µL 250µM roztoku měďných kationtů v DMSO do všech jamek a 50 µL 1mM roztoku HA a nechá se dvě minuty míchat. Dále se přidá 50 µL 5mM roztoku BCS (●) nebo destilované vody (●) a měří se absorbance při vlnové délce 484 nm ihned a po 5 min (Obr. 24).



Obr. 24: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďných kationtů v DMSO.

10.12. STANOVENÍ REDUKCE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ V PUFRU

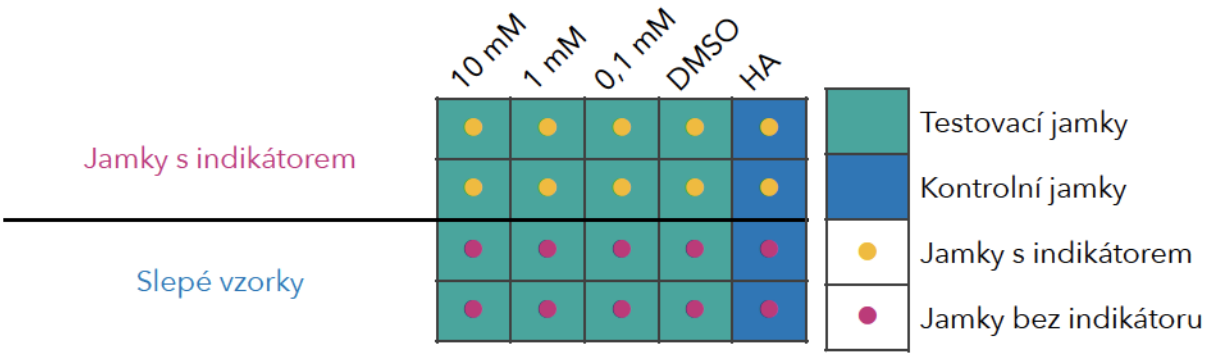
Do mikrotitrační destičky se napipetuje 100 µL příslušného pufru, přidá se 50 µL roztoku příslušné koncentrace testované látky, popřípadě rozpouštědla do testovacích jamek (zelené) nebo 50 µL 1mM HA pro pH 6,8 a 7,5 nebo 10mM HA pro pH 4,5 a 5,5 do kontrolních jamek (modré). Do všech jamek se přidá 50 µL 250µM vodného roztoku měďnatých kationtů a nechá se dvě minuty míchat. Po promíchání se přidá 50 µL 5mM vodného roztoku BCS (●) nebo destilované vody (●). Měří se absorbance při vlnové délce 484 nm ihned a po 5 min (Obr. 25).



Obr. 25: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení redukce měďnatých kationtů v pufru.

10.13. STANOVENÍ REDUKCE MĚĎNATÝCH KATIONTŮ V DMSO

Do testovacích jamek na mikrotitrační destiče se napipetuje 100 µL roztoku v DMSO testované látky příslušné koncetrace nebo jen DMSO (zelené) a do kontrolních jamek 100 µL 1mM vodného roztoku HA (modré). Do všech jamek se přidá 50 µL 250µM roztoku měďnatých kationtů v DMSO a nechá se dvě minuty míchat. Po promíchání se přidá 50 µL 5mM vodného roztoku BCS (●) nebo destilované vody do kontrolních jamek (●). Měří se absorbance při vlnové délce 484 nm ihned a po 5 min (Obr. 26).



Obr. 26: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení redukce měďnatých kationtů v DMSO.

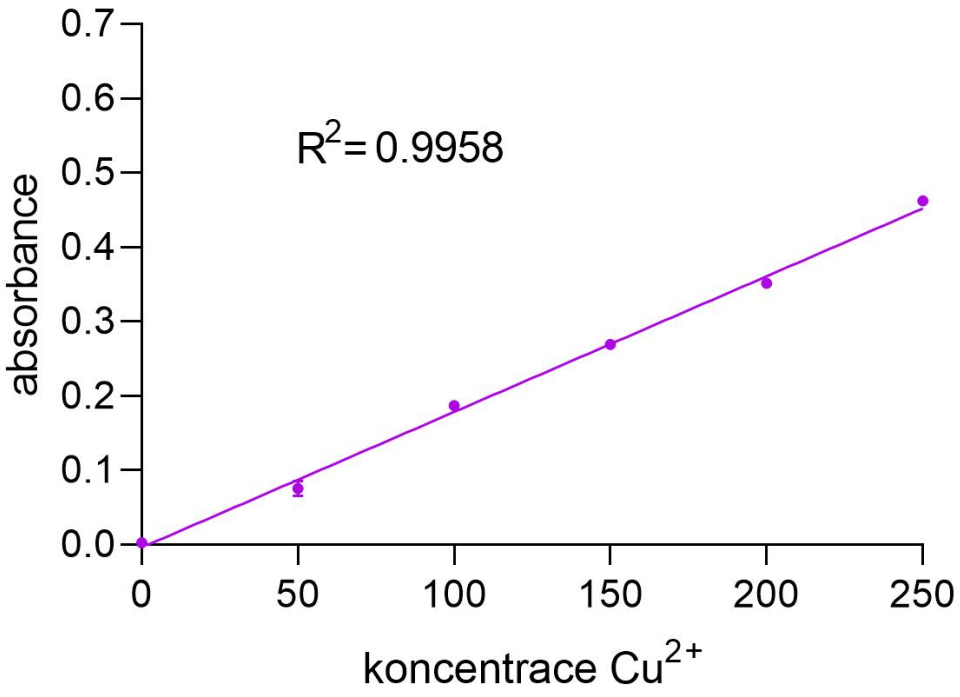
11. VÝSLEDKY STANOVENÍ

11.1. KALIBRAČNÍ KŘIVKA

Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci měďnatých kationtů. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty absorbance a směrodatné odchylky (Tab. 2). Pracovalo se při koncentracích 0, 50, 100, 150, 200 a 250 μM. Kalibrační křivka má přímkový trend (Obr. 27).

Tab. 2: Kalibrační křivka.

Koncentrace přidaná (μM)	**0**	**50**	**100**	**150**	**200**	**250**
Průměrná absorbance s BCS	0,037	0,109	0,221	0,303	0,386	0,496
Průměrná absorbance bez BCS	0,034	0,028	0,029	0,031	0,030	0,030
Průměrná hodnota	0,003	0,081	0,192	0,273	0,356	0,467
SD	0,006	0,010	0,006	0,002	0,006	0,003



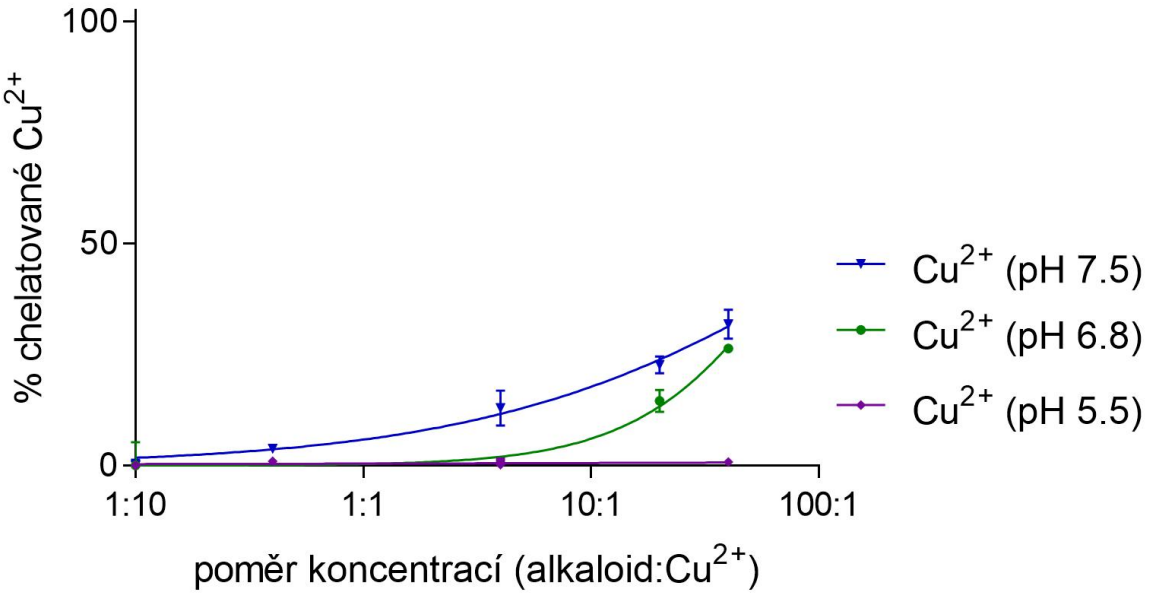
Obr. 27: Kalibrační křivka měďnatých kationtů.

11.2. CHELATACE IONTŮ MĚDI

Chelatační účinky alkaloidů čeledi Amaryllidaceae na ionty mědi byly stanoveny pomocí dvou metod s použitím dvou indikátorů, hematoxylinu a roztoku disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové.

11.2.1. CHELATACE HEMATOXYLINEM

Stanoveny byly indikátorem hematoxylinem všechny studované alkaloidy čeledi Amaryllidaceace. Vlastní experiment byl prováděn pomocí chelatace měďnatých kationtů v prostředí pufru pH 7,5, 6,8 a 5,5. Ze studovaných alkaloidů vykazoval měřitelnou aktivitu pouze lykorinový alkaloid galanthin, ostatní alkaloidy byly zcela neaktivní (Obr. 28).

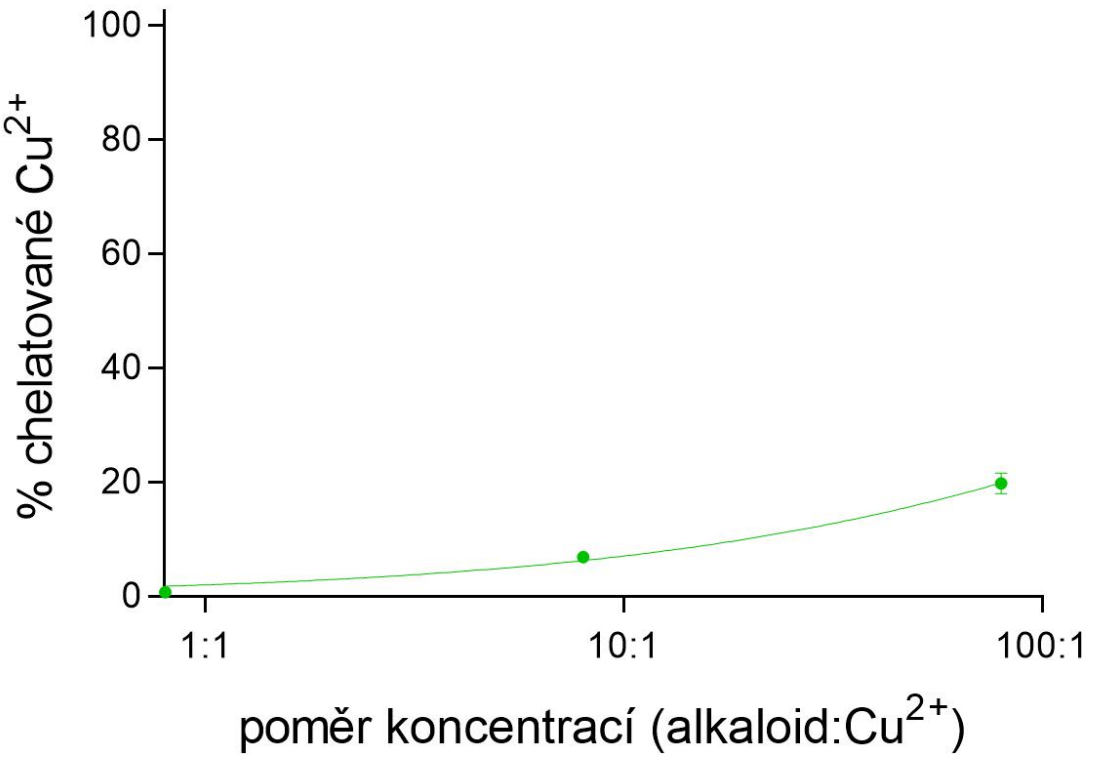


Obr. 28: Chelatační aktivita galanthinu s indikátorem hematoxylinem.

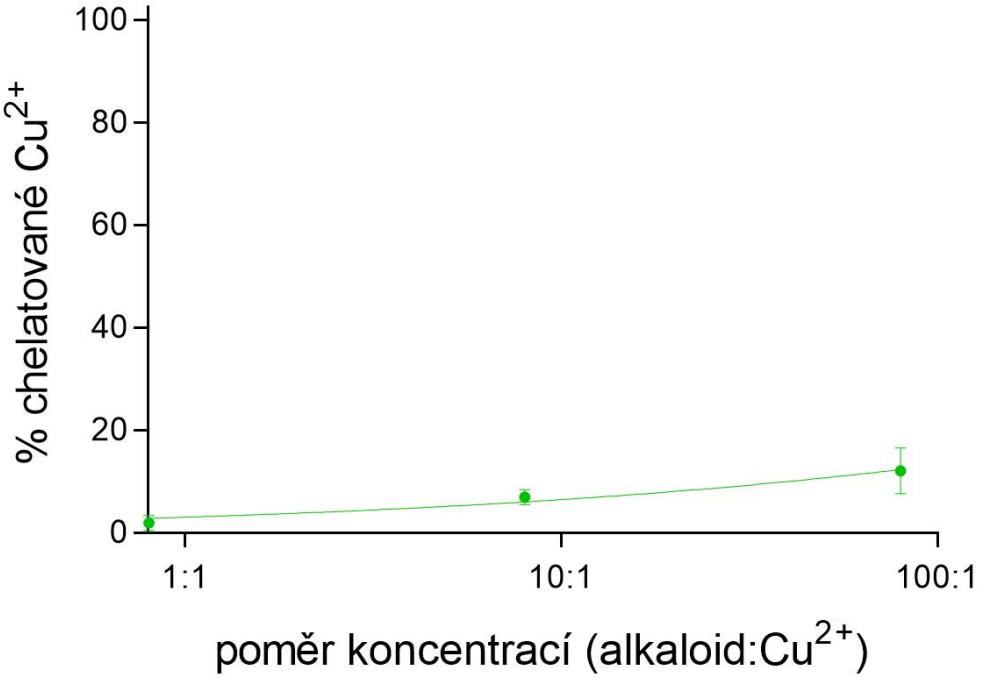
11.2.2. CHELATACE ROZTOKEM KYSELINY BATHOCUPROINDISULFONOVÉ

Pomocí indikátoru kyseliny bathocuproindisulfonové byly stanoveny všechny studované alkaloidy čeledi Amaryllidaceace. Vlastní experiment byl prováděn pomocí chelatace měďných a měďnatých kationtů v prostředí pufru pH 7,5, 6,8, 5,5 a 4,5 a v prostředí DMSO. Ze studovaných alkaloidů vykazovaly chelatační aktivitu měďnatých kationtů v DMSO galanthaminové alkaloidy chlidanthin a galanthamin ve formě volné báze a lykorinový alkaloid lykorin (Obr. 29 – 31). Měďné kationty nechelatoval žádných z testovaných alkaloidů.

Galanthaminový typ

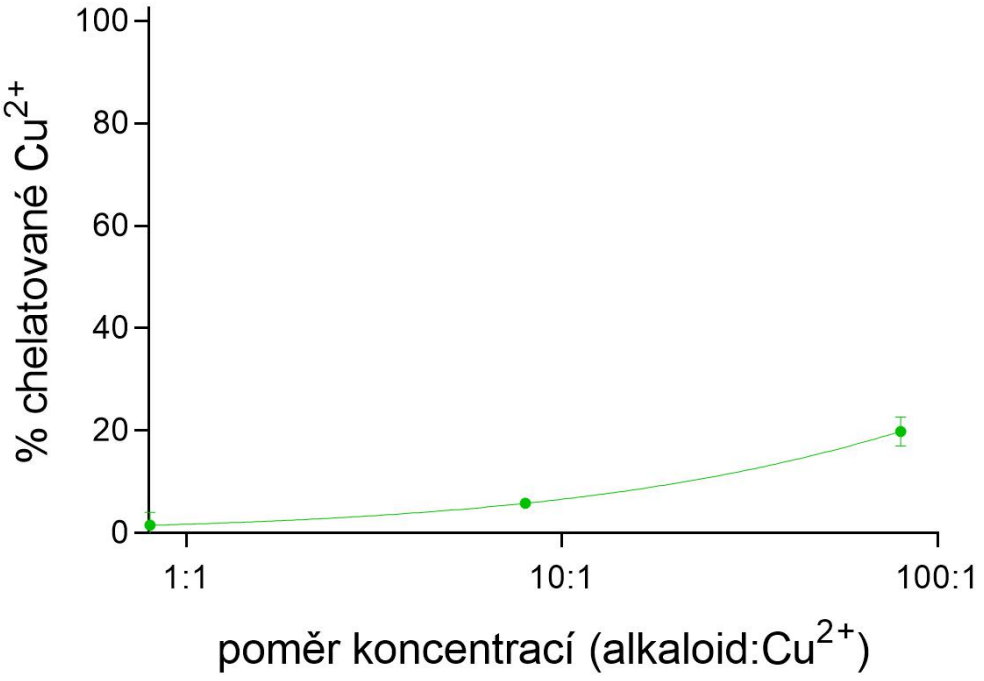


Obr. 29: Chelatační aktivita chlidanthinu v prostředí DMSO s indikátorem BCS.



Obr. 30: Chelatační aktivita galanthaminu v prostředí DMSO s indikátorem BCS.

Lykorinový typ

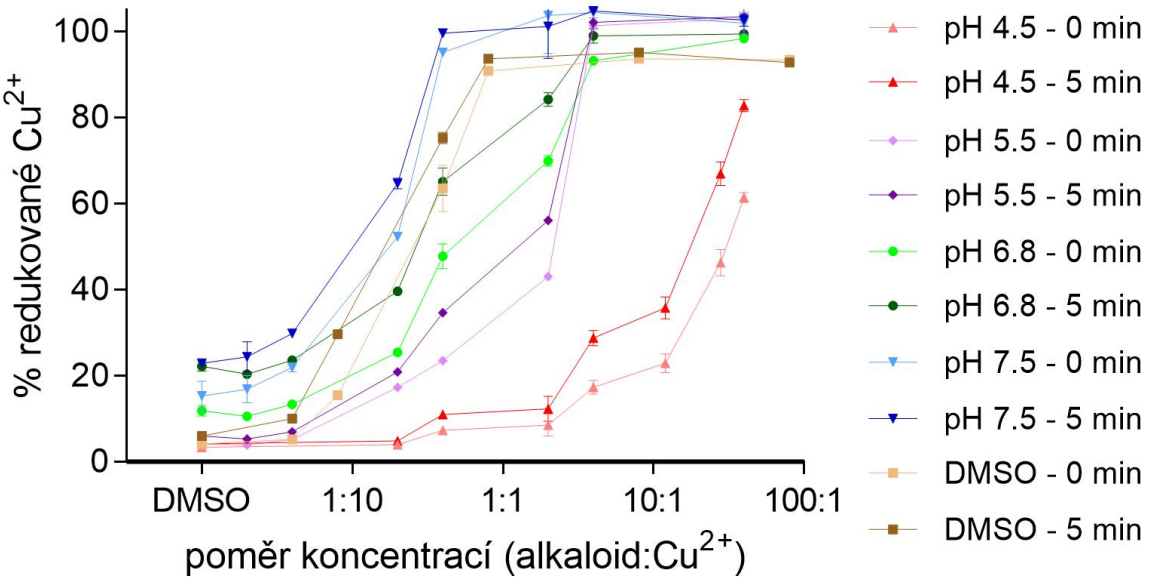


Obr. 31: Chelatační aktivita lykorinu v prostředí DMSO s indikátorem BCS.

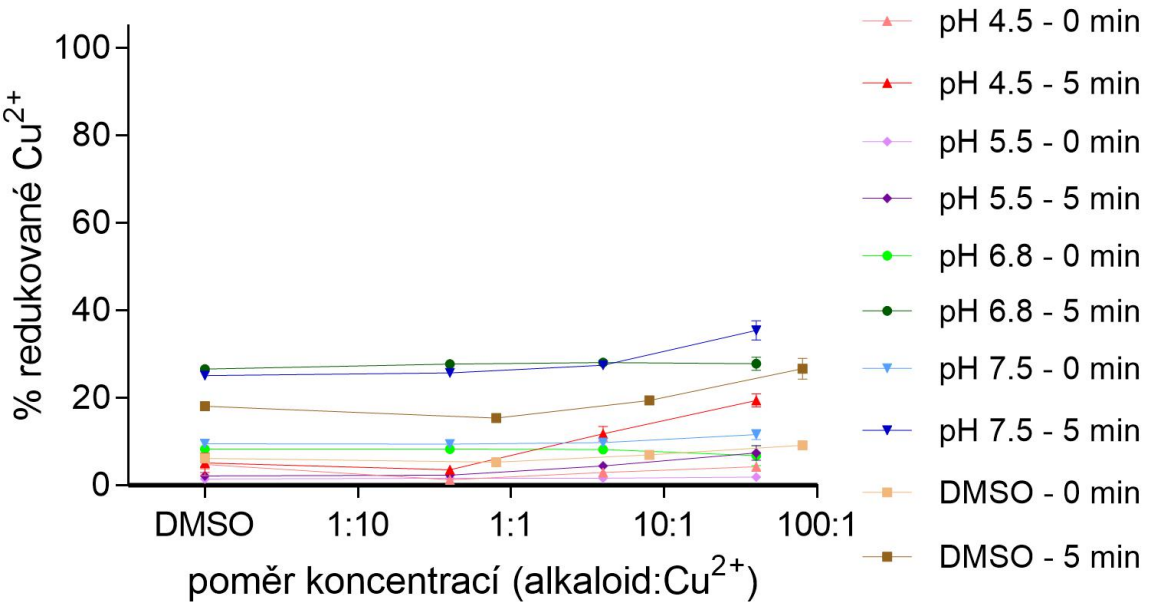
11.3. REDUKCE IONTŮ MĚDI

Redukční aktivita studovaných alkaloidů byla sledována pomocí indikátoru kyseliny bathocuproindisulfonové při různých hodnotách pH pufru (4,5, 5,5, 6,8 a 7,5) nebo v DMSO. Měření bylo prováděno vždy v čase 0 min a 5 min. Z galanthaminových alkaloidů byl nejaktivnější chlidanthin, redukční aktivita se zvyšovala s nárůstem pH a v prostředí DMSO byla srovnatelná s aktivitou při nejvyšším měřeném pH. Galanthamin ve formě soli ani volné báze nevykázal významnou redukční aktivitu. Z lykorinových alkaloidů byla redukční aktivita galanthinu a lykorinu jen při nejvyšších koncentracích a zvyšovala se s nárůstem pH, v prostředí DMSO byla srovnatelná s aktivitou při nejvyšším měřeném pH. Z haemanthaminových alkaloidů nevykázal heamanthamin ani vittatin výraznou redukční aktivitu. Z montaninových alkaloidů montanin vykazoval redukční aktivitu v nejvyšších koncentracích a zvyšovala se s nárůstem pH, v prostředí DMSO byla vyšší ve srovnání s aktivitou při nejvyšším měřeném pH. Ze získaných hodnot byly sestrojeny grafy, kde je závislost redukované Cu^{2+} na poměru koncentrací (alkaloid:Cu^{2+}) (Obr. 32 – 39).

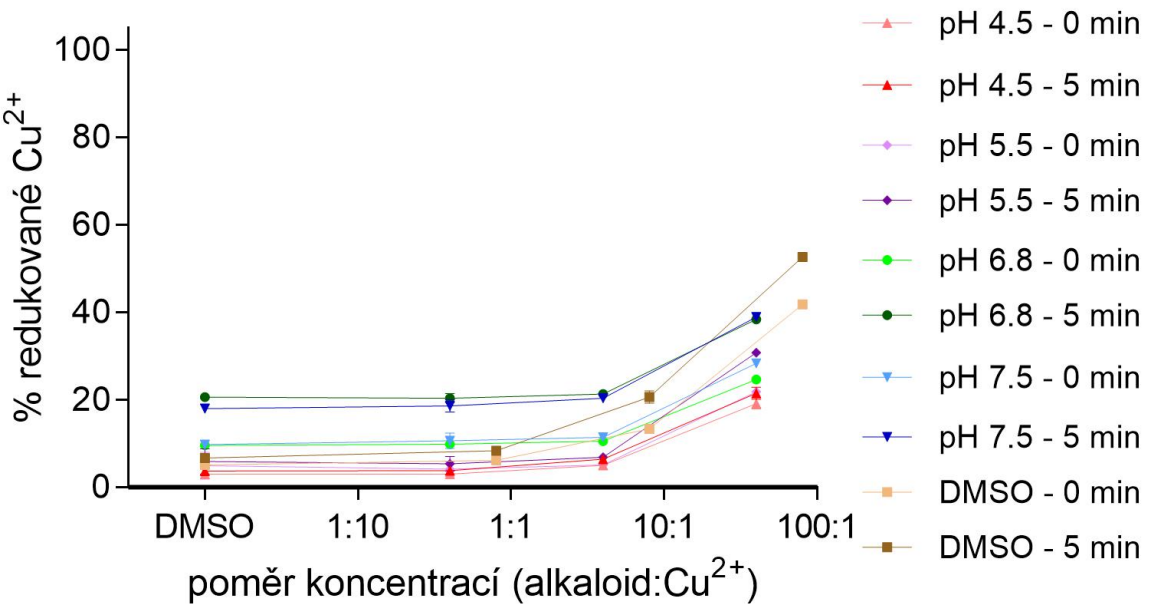
11.3.1. GALANTHAMINOVÝ TYP



Obr. 32: Redukce chlidanthinu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min.

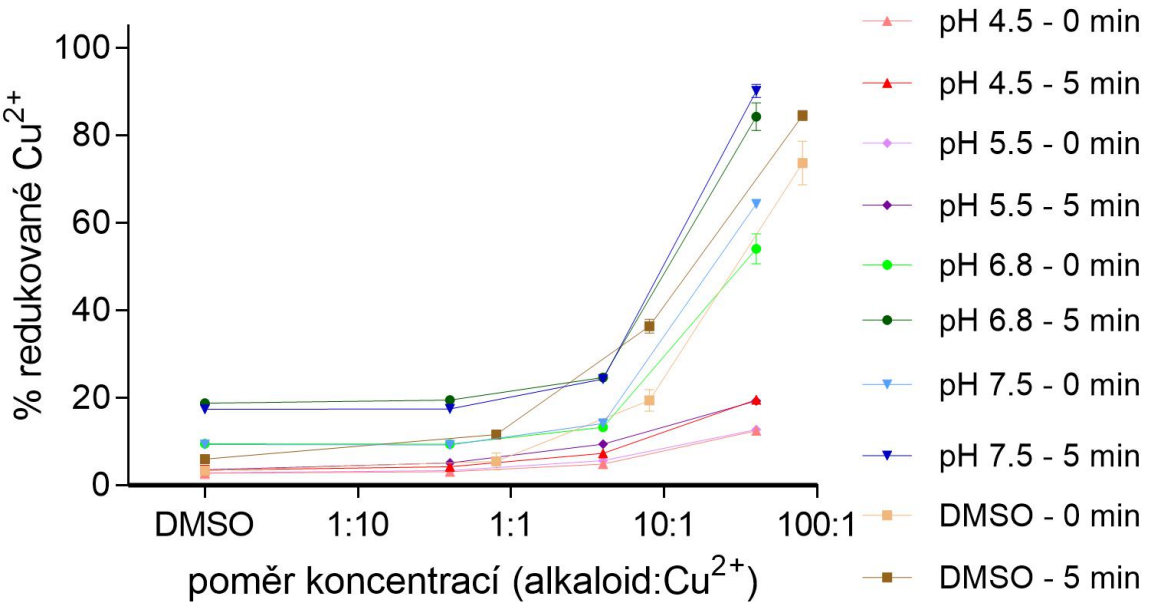


Obr. 33: Redukce galanthaminu hydrobromidu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min.

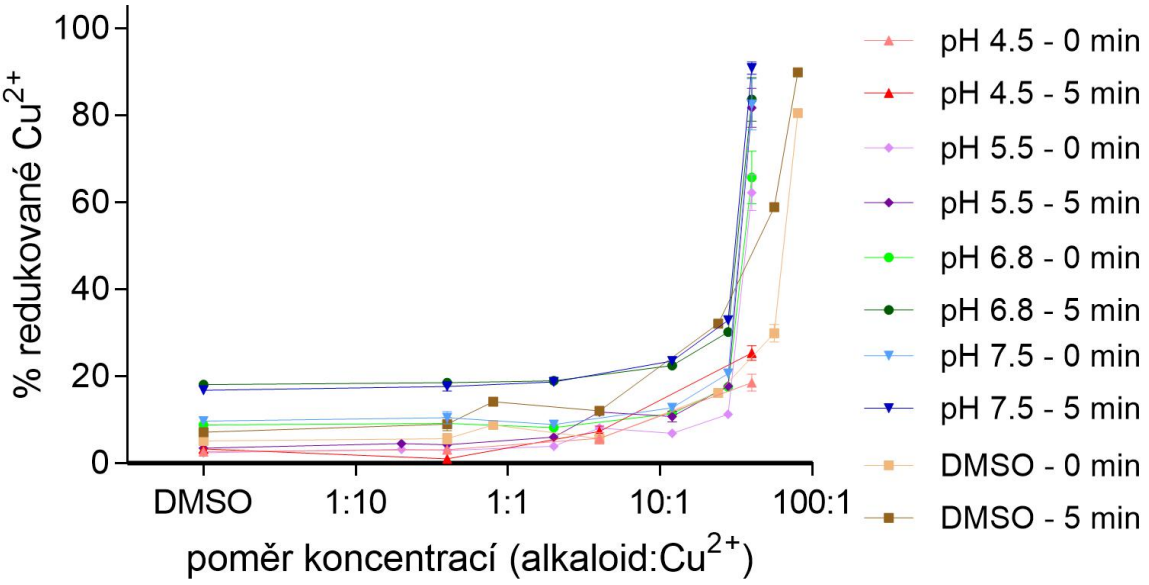


Obr. 34: Redukce galanthaminu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min.

11.3.2. LYKORINOVÝ TYP

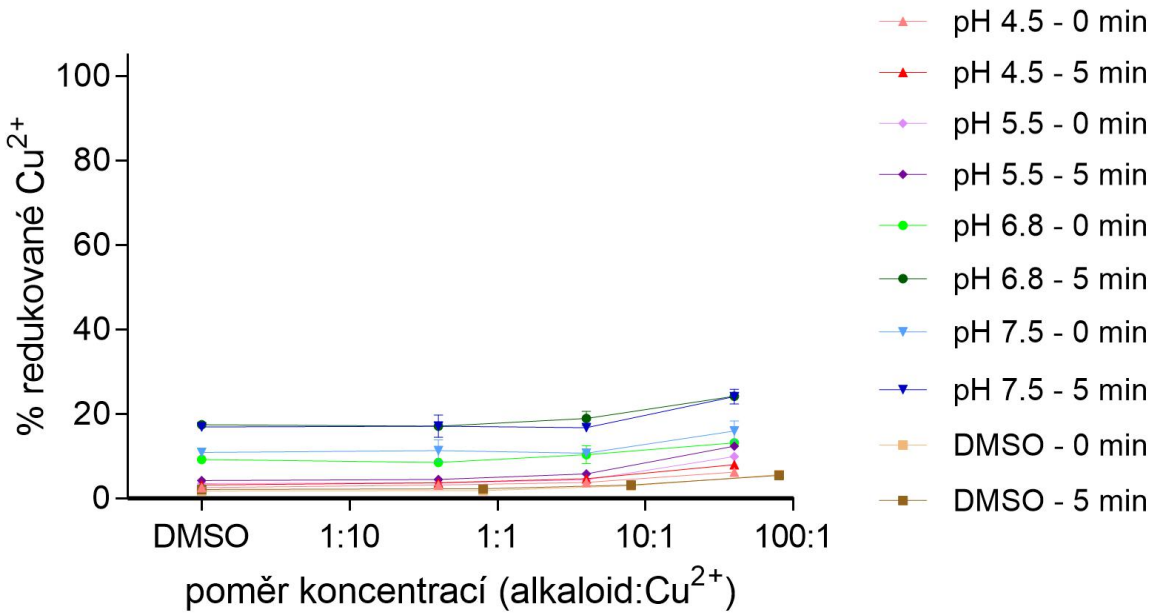


Obr. 35: Redukce galanthinu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min.

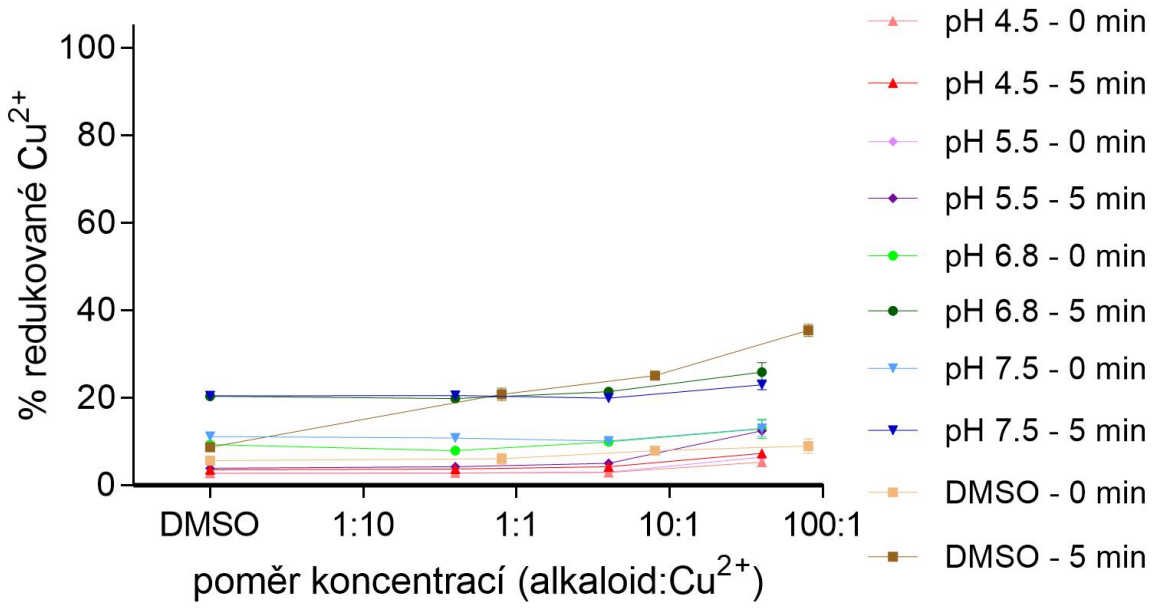


Obr. 36: Redukce lykorinu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min.

11.3.3. HAEMANTHAMINOVÝ TYP

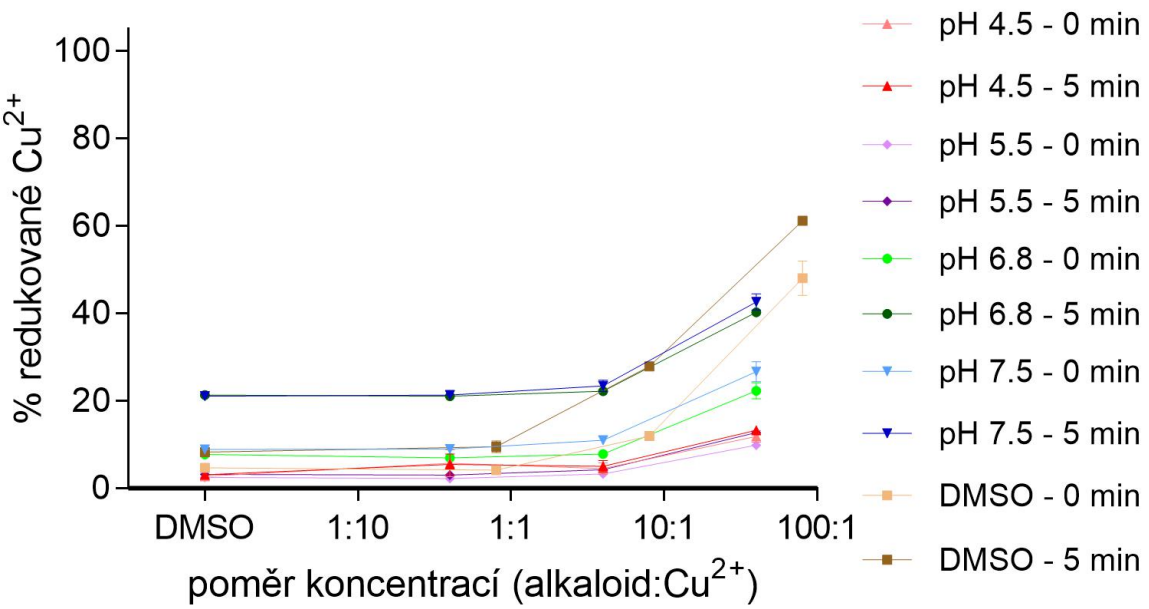


Obr. 37: Redukce haemanthamin v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min.



Obr. 38: Redukce vittatinu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min.

11.3.4. MONTANINOVÝ TYP



Obr. 39: Redukce montaninu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min.

12. DISKUSE

Měď je velice důležitým prvkem, který hraje důležitou roli v regulaci různých biochemických mechanismů, je součastí enzymů cytochrom *c* oxidasy, ferroxidasy (ceruloplasmin), tyrosinasy, monoaminoxidasy, lysyloxidasy, superoxid dismutasy a dopamin ß-hydroxylasy (8). Genové mutace vedoucí k poruchám metabolismu mědi jsou příčinou vzniku Wilsonovi a Menkesovi choroby. Zvýšená hladina volné mědi v organismu je spojována také s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou. (4).

Alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae patří mezi skupinu isochinolinových alkaloidů. Struktura isochinolinových alkaloidů je v rostlinné říši velice rozšířená a významná svými farmakologickými účinky. Isochinolinové alkaloidy lze rozdělit do různých strukturních typů, kam patří např. tetrahydroisochinolinový typ, benzylisochinolinový typ, ftalidisochinolinový typ, protoberberinový typ, protopinový typ, aporfinový typ, morfinanový typ, beznofenanthridinový typ a emetinový typ. Isochinolinové alkaloidy patří mezi alkaloidy odvozené od fenylalaninu a tyrosinu (63).

Mezi isochinolinové alkaloidy patří i studované alkaloidy. Studovány byly alkaloidy galanthaminového typu (galanthamin, galanthamin hydrobromid, chlidanthin), lykorinového typu (lykorin, galanthin), haemanthaminového typu (haemanthamin, vittatin) a montaninového typu (montanin). Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae vychází z aromatických kyselin. Důležitým meziproduktem je norbelladin, jehož metylací vzniká belladin (63). Cílem této diplomové bylo určení měď-chelatační a měď-redukující aktivity alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a porovnání vztahu mezi aktivitou a strukturou.

Existují různé metody zkoumání *in vitro*. Ke kvantifikaci chelatačních a redukčních aktivit jednotlivých alkaloidů byla použita spektrofotometrie. Spektrofotometrie je metoda rychlá, jednoduchá, levná a praxí ověřená. Měď-chelatační aktivity byly studovány pomocí dvou kompetitivních metod. Každá z nich využívala jiný indikátor reakce. Prvním byl hematoxylin, který vytváří s mědí stabilní komplexy. Druhým indikátorem byla kyselina bathocuproindisulfonová, která opět vytváří velice stabilní komplexy. Před vlastním stanovením pomocí indikátoru BCS musí být měďnaté kationty redukovány hydroxylaminem. Na rozdíl od hematoxylinu je BCS silně kompetitivní, takže látky, které

chelatují měď, ale jejich afinita k mědi není příliš silná, se při použití BCS jeví jako neaktivní (98).

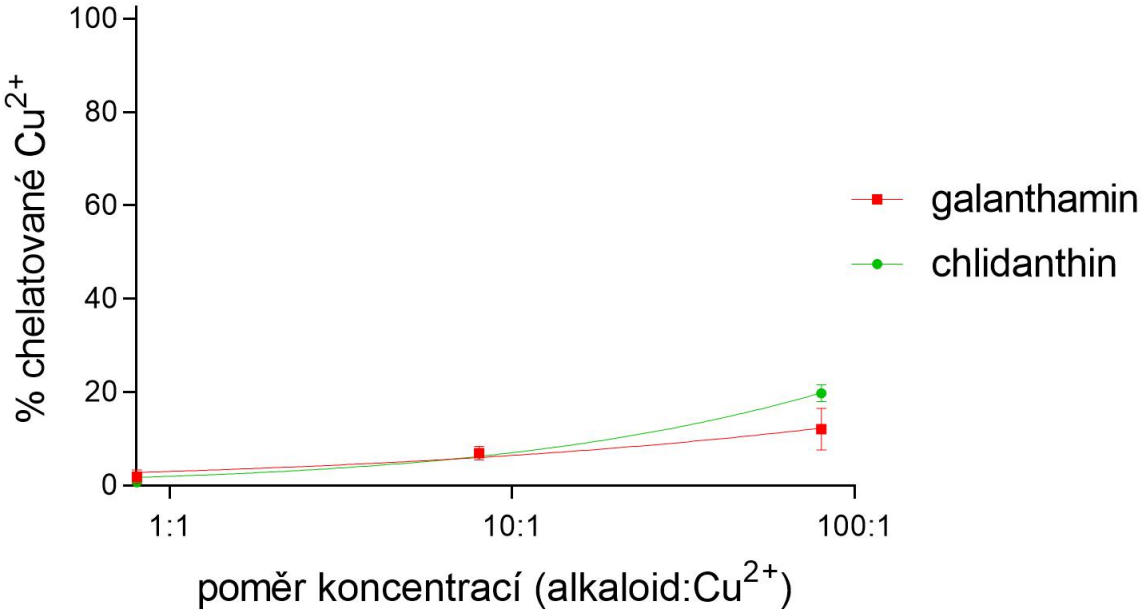
Měď-redukující aktivity byly studovány pomocí indikátoru BCS. BCS standardně s měďnatými kationty nijak nereaguje. Pokud dojde k redukci na měďné kationty tvoří s BCS barevný komplex, jehož absorbanci můžeme spetrofotometricky změřit (99).

Míra redukující aktivity alkaloidů je závislá na množství hydroxylových skupin ve struktuře, ale i poloha hydroxylové skupiny má vliv na redukující aktivitu (99).

12.1. MĚD-CHELATAČNÍ AKTIVITA

V tomto experimentu se využívalo dvou metod stanovení (HEM a BCS). U obou metod se pracovalo v různém prostředí pH (4,5, 5,5, 6,8 a 7,5) nebo v prostředí DMSO. V metodě HEM se pracovalo s pH 5,5, 6,8 a 7,5. Stanovení při nižších hodnotách pH nemá u metody HEM význam, jelikož se snižujícím se pH se snižuje afinita HEM k iontům mědi. Pomocí této metody byly stanoveny všechny studované alkaloidy, z nichž významnou aktivitu vykazoval pouze galanthin (Obr. 28). V metodě BCS se pracovalo ve všech čtyřech oblastech pH za přítomnosti redukčního činidla HA, jelikož měďnaté kationty reagují s BCS až po předchozí redukci s HA na měďné kationty. Při pH 6,8 a 7,5 se používal 1mM HA a při pH se používal 10mM HA. BCS metodou byly testovány všechny studované alkaloidy. Ve srovnání s HEM je BCS silně kompetitivní indikátor, takže nelze předpokládat, že látky, které nevykázaly žádnou chelatační aktivitu při použití HEM, by ji ukázaly při použití BCS. Vzhledem k tomu, že HEM lze použít pouze při pH 7,5 – 5,5, tak jsme použili druhou metodu, kterou je možné použít v širším rozpětí pH, také v prostředí DMSO. Již dříve bylo prokázáno, že některé alkaloidy nevykázaly chelatační aktivitu při použití pufru, ale v prostředí DMSO chelatovaly (jednalo se o chelataci železa), proto jsme je testovali i v DMSO (100, 101). Chelatační aktivitu měďnatých kationtů vykazoval z galanthaminového typu galanthamin a chlidanthin a z lykorinového typu lykorin v prostředí DMSO. Galanthamin hydrobromid nevykázal žádnou aktivitu, z toho vyplývá, že soli alkaloidů nejsou schopny chelatovat měď, ani když jejich volná báze měď chelatuje. Chelatace galanthaminu však není vysoká, a tak rozdíl mezi galanthaminem a galanthaminem hydrobromidem není statisticky významný.

Porovnáním aktivity galanthaminu a chlidanthinu je vidět, že při vysokých koncentracích je aktivita chlidanthinu nepatrně vyšší. Podle struktury lze předpokládat, že je to způsobeno jinou polohou hydroxylové skupiny. Tento rozdíl v aktivitě však není statisticky významný (Obr. 40).

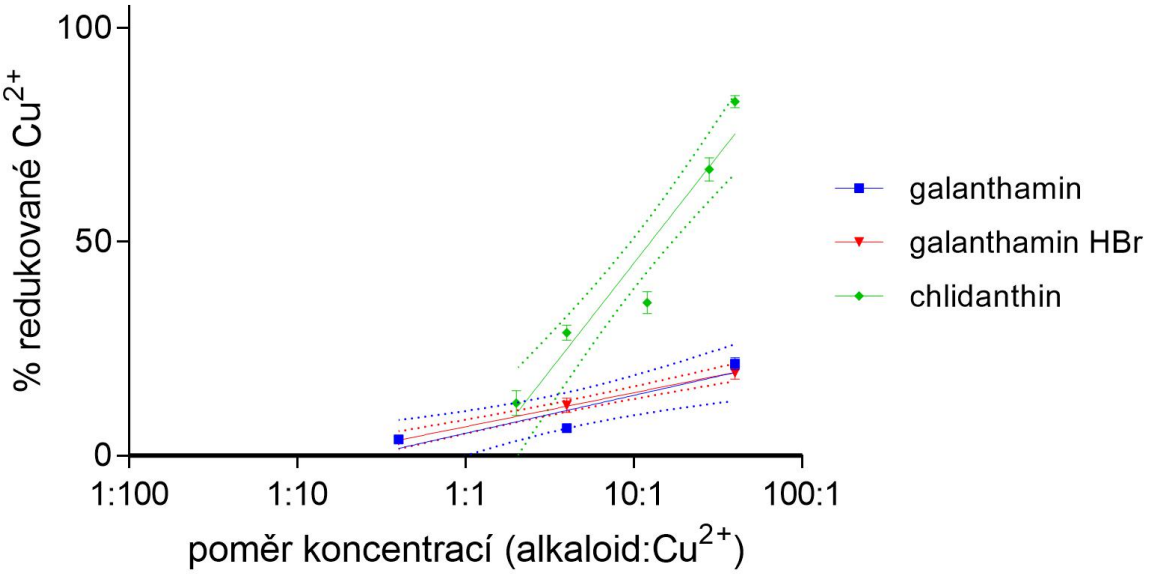


Obr. 40: Porovnání chelatační aktivity alkaloidů galanthaminového typu v prostředí DMSO.

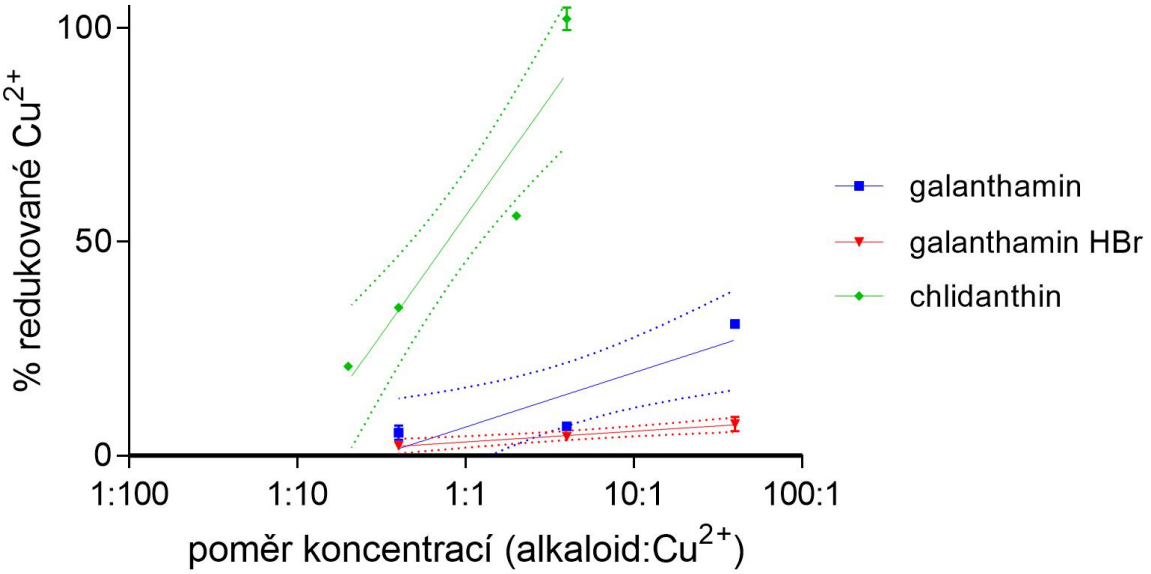
12.2. MĚĎ-REDUKUJÍCÍ AKTIVITA

Cílem této metody bylo dokázat jakou schopnost redukce měďnatých kationtů na kationty měďné mají studované alkaloidy. Měď se v lidském organismu vyskytuje hlavně ve formě měďnatých kationtů. V přítomnosti silného redukčního činidla se mohou kationty mědi redukovat a podílet se na vytváření ROS (12). V rámci *in vitro* studie se pracovalo v různém prostředí pH (4,5, 5,5, 6,8 a 7,5) nebo v prostředí DMSO. Aby bylo možné porovnat aktivitu jednotlivých alkaloidů, byly sestrojeny grafy s přímkou lineární regrese s 95% konfidenčními intervaly. Testovány byly všechny studované alkaloidy. Z alkaloidů galanthaminového typu vykazovaly alespoň mírnou redukční aktivitu všechny testované látky. Z porovnání grafů lze usuzovat, že rozdíl v aktivitě daných alkaloidů (Obr. 41 – 45) je dán různou polohou hydroxylové skupiny. Chlidanthin má hydroxylovou skupinu na benzenovém kruhu na uhlíku C9 zatímco galanthamin na cyklohexenovém kruhu v poloze C3 (Obr. 11 a 13). Přítomnost hydroxylové skupiny na benzenovém jádře má zásadní vliv

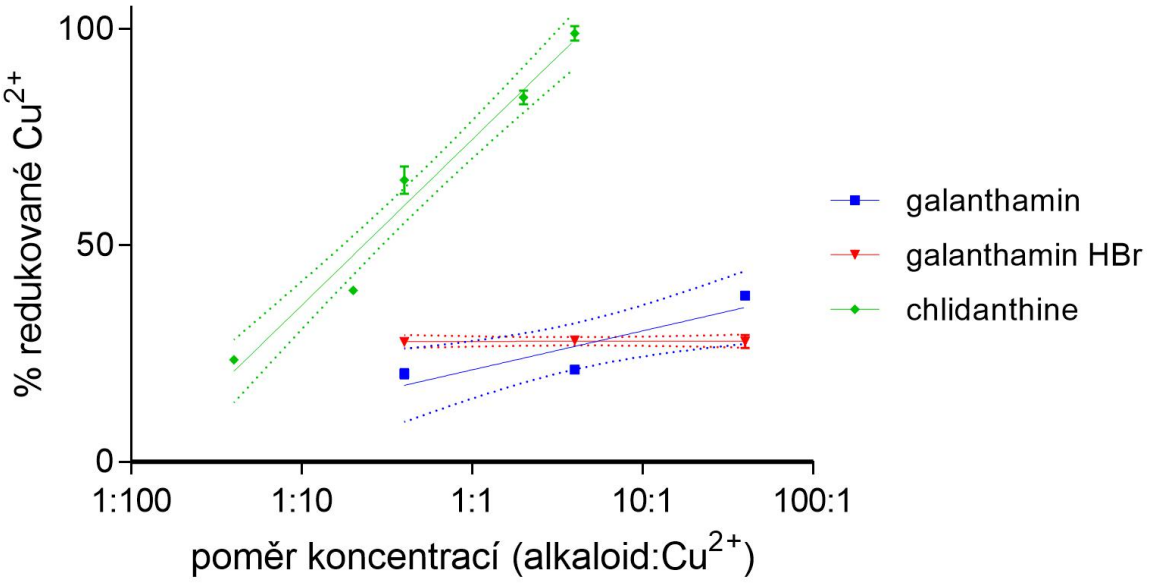
na redukční schopnost látky, což je zřejmé z redukčních vlastností mnoha fenolických látek (99). Při všech hodnotách pH a DMSO vykazoval nejvyšší aktivitu chlidanthin. Jak je vidět z grafů (Obr. 41 – 45), se vzrůstajícím pH aktivita chlidathinu stoupá. Aktivita galanthaminu ve formě volné báze a soli se statisticky neliší, jedinou výjimkou je pH 5,5, kde je aktivita volné báze vyšší.



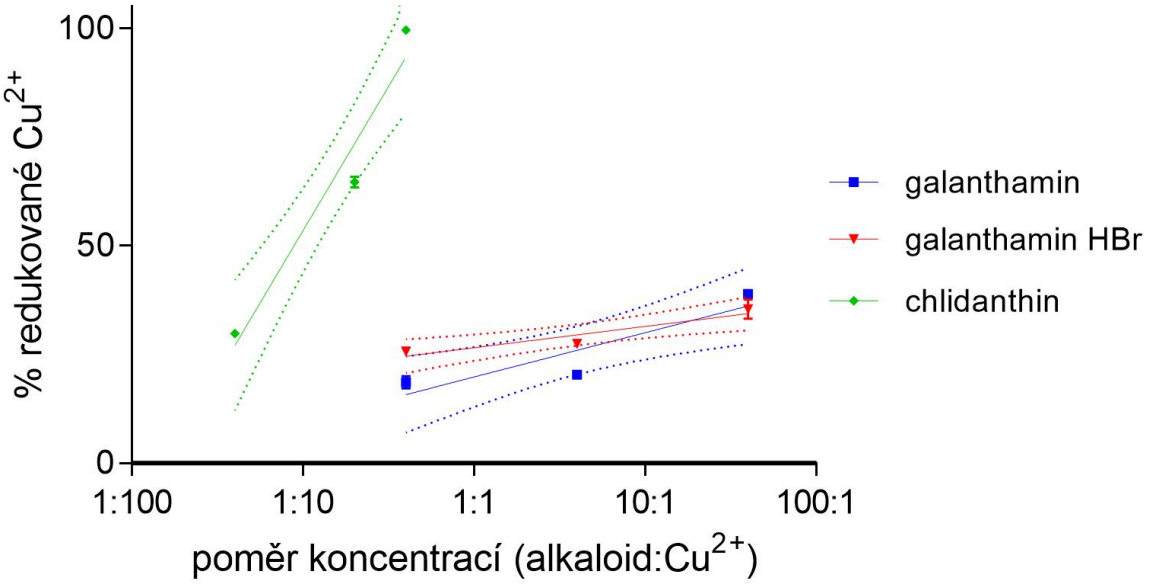
Obr. 41: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu při pH 4,5.



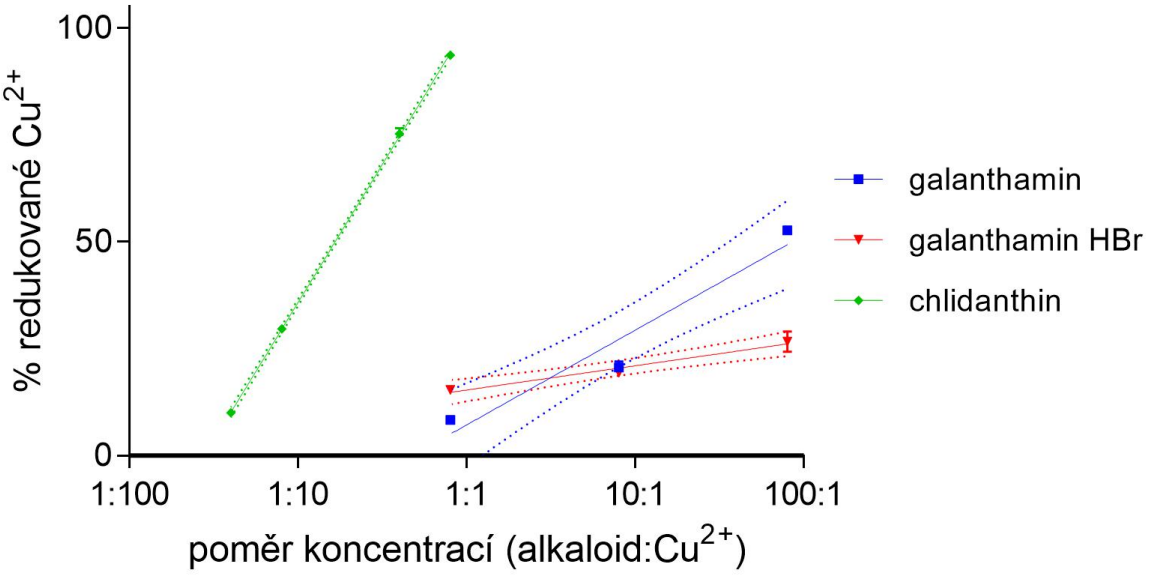
Obr. 42: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu při pH 5,5.



Obr. 43: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu při pH 6,8.

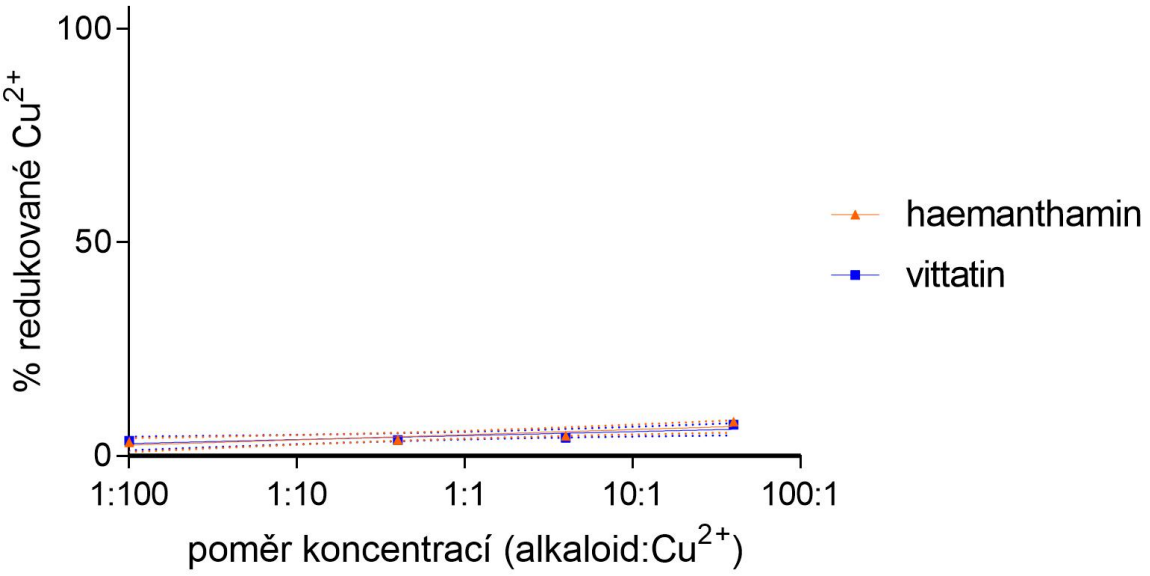


Obr. 44: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu při pH 7,5.

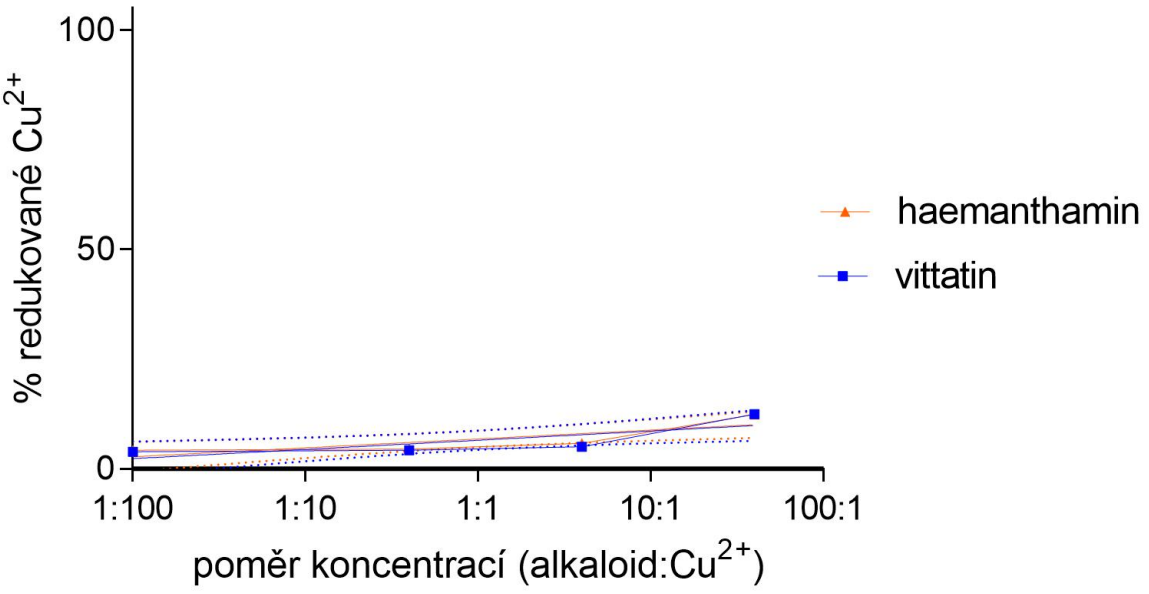


Obr. 45: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu v DMSO.

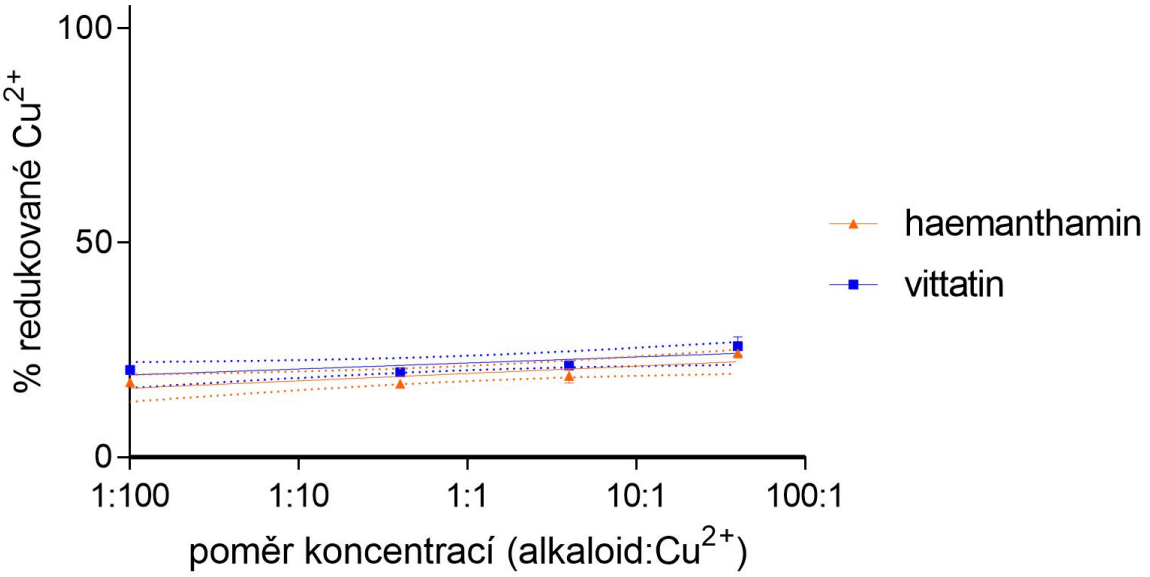
Z alkaloidů haemathaminového typu (haemathamin a vittatin), vykazoval statisticky významnou aktivitu jen vittatin v prostředí DMSO (Obr. 46 – 50). V prostředí pufru všech hodnot pH nevykazoval statisticky významnou aktivitu žádný z alkaloidů tohoto typu. V prostředí DMSO jsou rozdíly v aktivitě závislé na poloze hydroxylové skupiny. Stejně jako u galanthaminu i u vittatinu je přítomnost hydroxylové skupiny na cyklohexenovém kruhu spojena pouze s velmi malou redukční schopností, která se u vittatinu projevila pouze při testování v prostředí DMSO (Obr. 16 a 17).



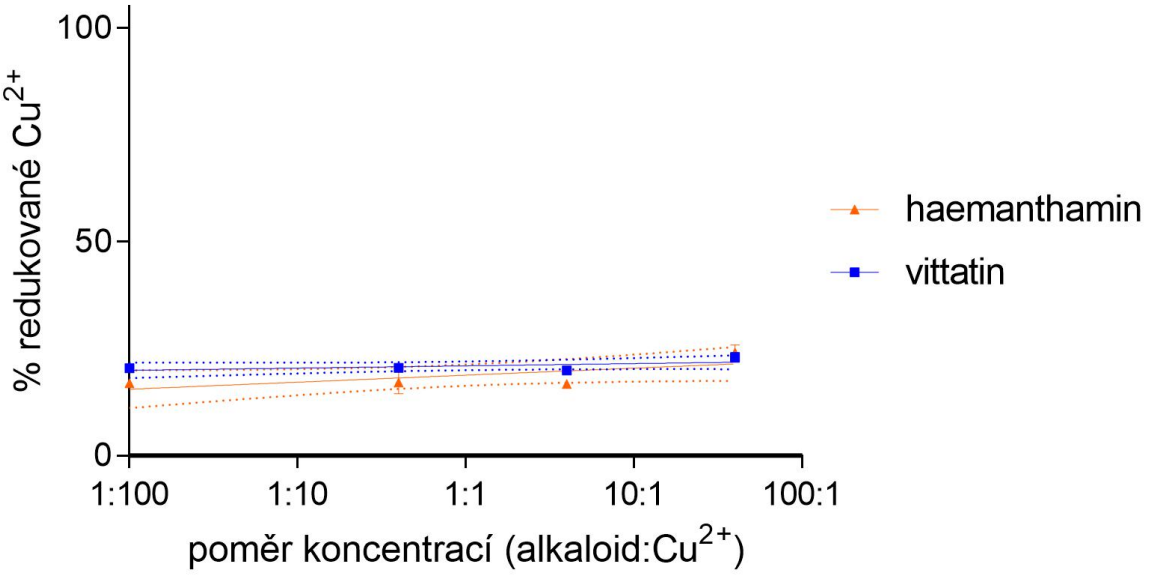
Obr. 46: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu při pH 4,5.



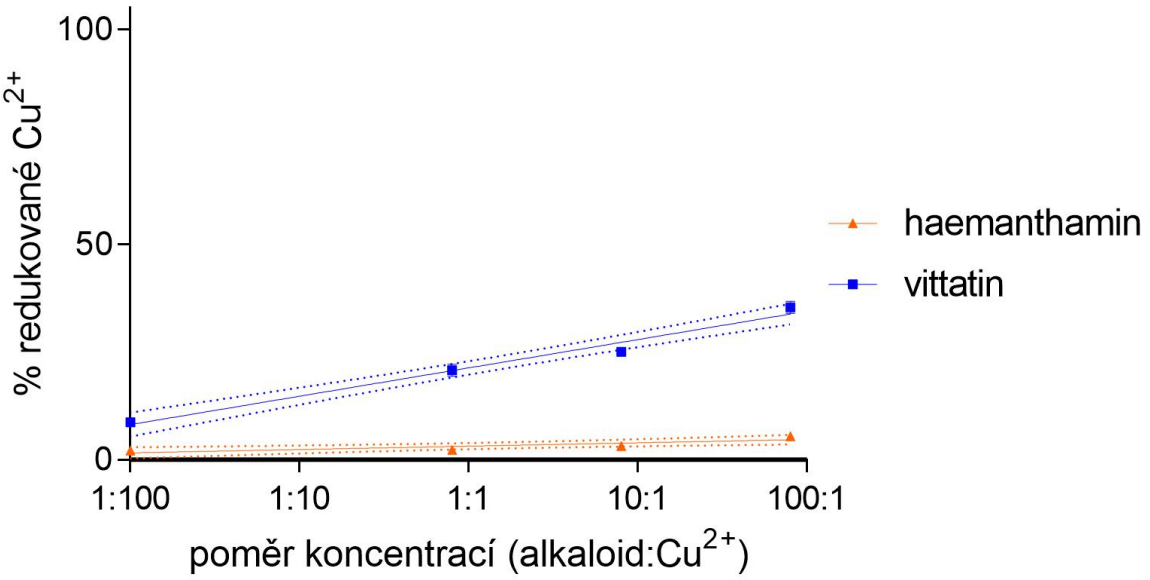
Obr. 47: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu při pH 5,5.



Obr. 48: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu při pH 6,8.

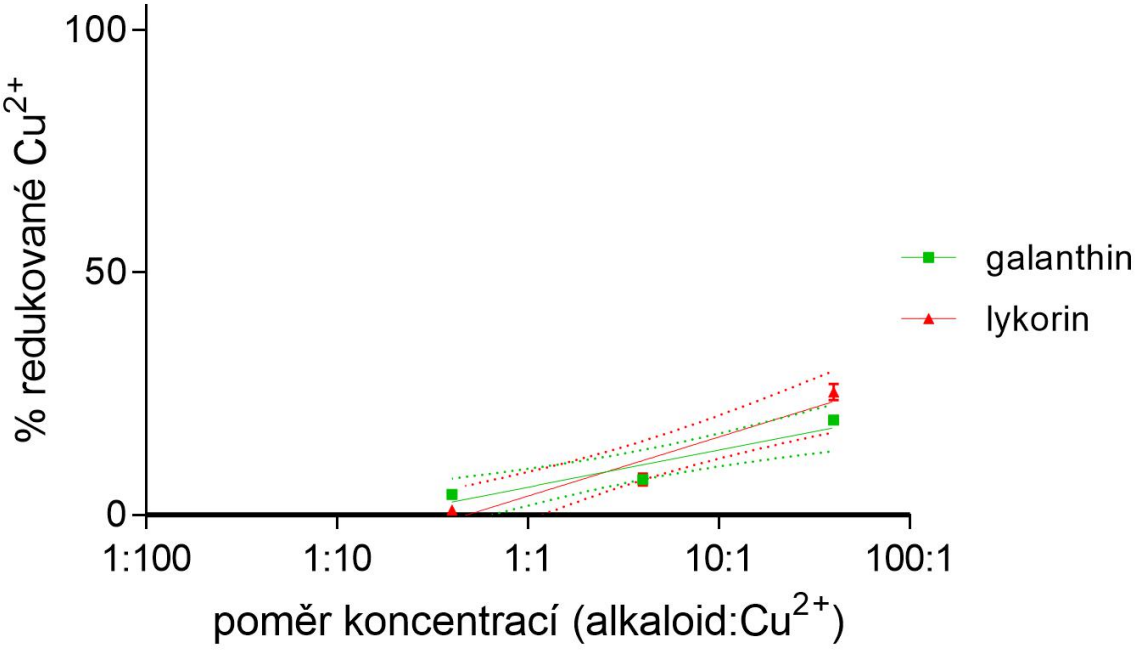


Obr. 49: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu při pH 7,5.

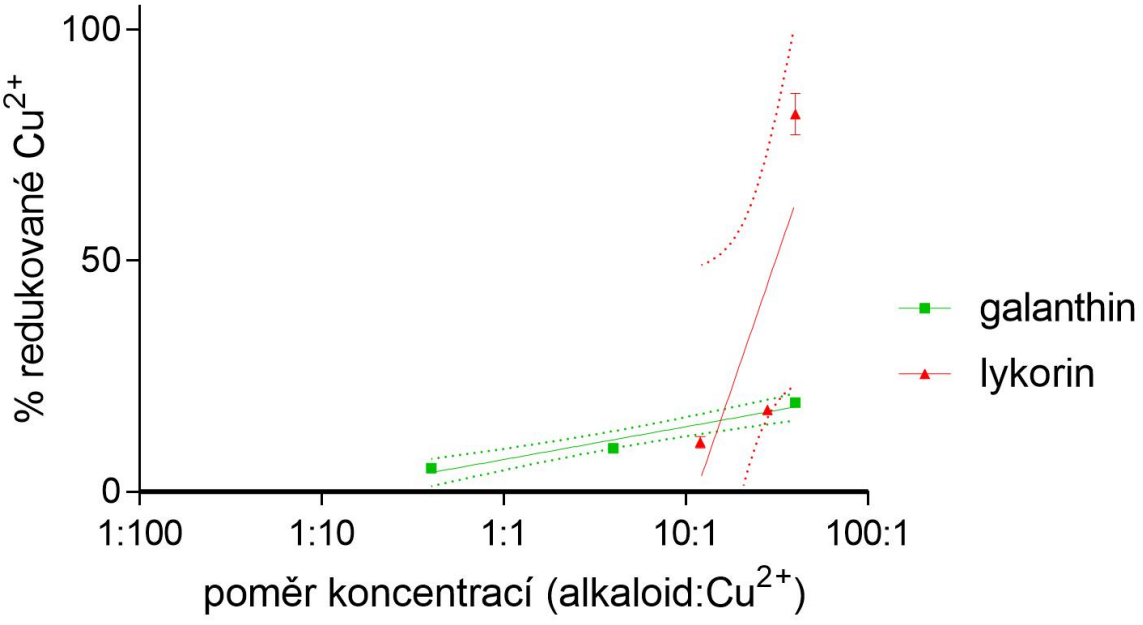


Obr. 50: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu v DMSO.

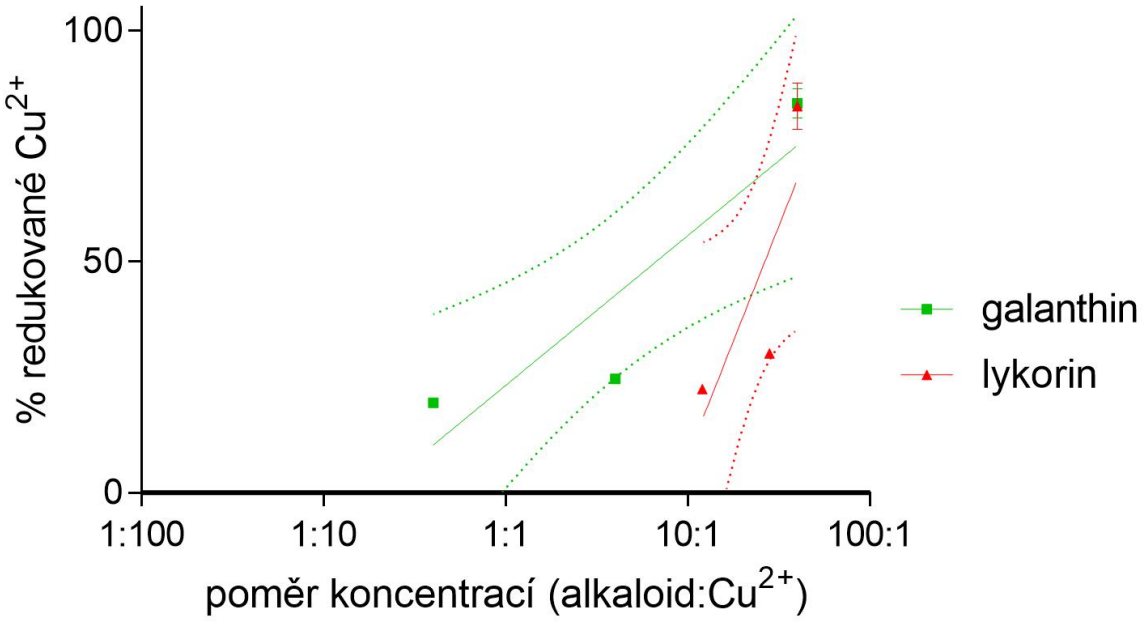
Dále redukující aktivitu vykazovaly alkaloidy lykorinového typu (lykorin a galanthin). Z porovnání grafů (Obr. 51 – 55) lze usuzovat, že se vzrůstající koncentrací a v prostředí se vzrůstajícím pH stoupá i redukující aktivita alkaloidů. Při pH 5,5 má lykorin vyšší redukující aktivitu, v ostatních případech je rozdíl mezi těmito alkaloidy statisticky nevýznamný. Dá se předpokládat, že vliv na redukci měďnatých kationtů má množství hydroxylových skupin, které jsou u obou látek na cyklohexenovém kruhu. Lykorin má ve struktuře dvě hydroxylové skupiny oproti galanthinu, který má jen jednu (Obr. 14 a 15), proto má lykorin při pH 5,5 vyšší redukující aktivitu.



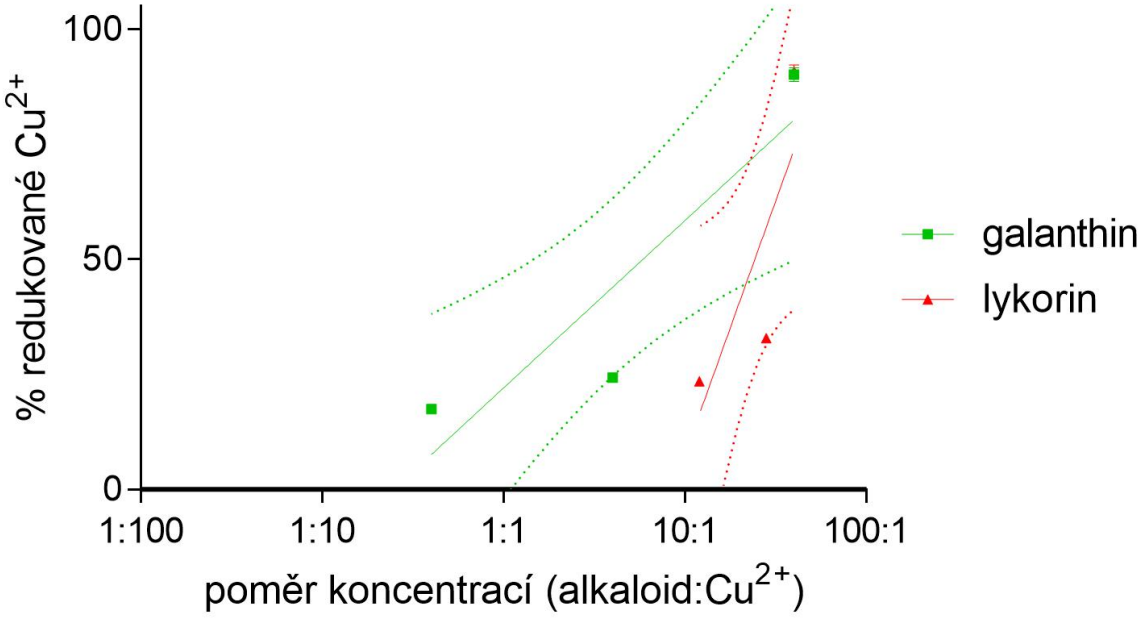
Obr. 51: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu při pH 4,5.



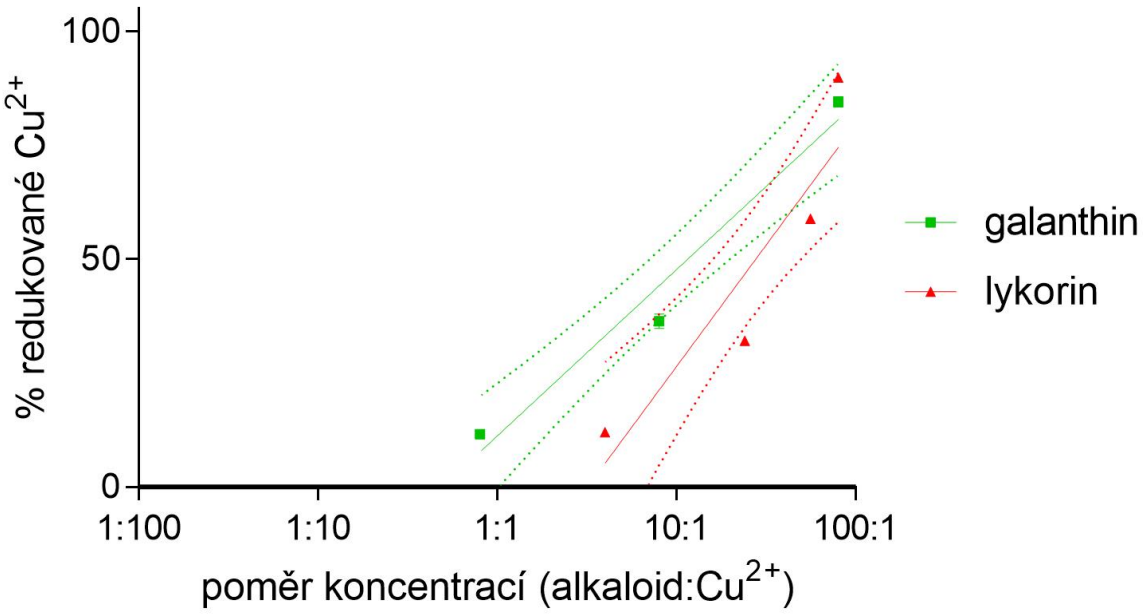
Obr. 52: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu při pH 5,5.



Obr. 53: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu při pH 6,8.



Obr. 54: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu při pH 7,5.



Obr. 55: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu v DMSO.

Jediným alkaloidem montaninového typu testovaného v rámci této práce byl montanin, jehož redukční aktivita byla srovnatelná s ostatními testovanými alkaloidy, které mají jednu hydroxylovou skupinu na cyklohexenovém kruhu, stejně jako montanin.

Z porovnání všech testovaných alkaloidů je zřejmé, že nejvýraznější redukční aktivitu vykazuje chlidanthin, který má ve své molekule hydroxylovou skupinu na benzenovém kruhu.

Jak bylo uvedeno výše, redukce mědi by mohla mít vliv na tvorbu hydroxylového radikálu. Již dříve bylo zjištěno, že ne všechny látky, které mají schopnost redukovat přechodné kovy, jejichž redukované formy mohou indukovat tvorbu hydroxylového radikálu, tvorbu tohoto nebezpečného radikálu opravdu indukují (102). Pro zjištění schopnosti chlidanthinu indukovat tvorbu hydroxylového radikálu pomocí redukce mědi by bylo třeba provést další experimenty.

13. ZÁVĚR

Cílem mé diplomová práce bylo stanovení chelatačních a redukujích vlastností isochinolinových alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, a to alkaloidů galanthaminového typu (galanthamin, galanthamin hydrobromid, chlidnathin), lykorinového typu (lykorin, galanthin), haemanthaminového typu (haemanthamin, vittatin) a montaninového typu (montanin). Použity byly dvě metody, jedna s indikátorem hematoxylinem a druhá s indikátorem BCS, pomocí nichž byla sledována chelatující a redukující aktivita alkaloidů v porovnání s jejich strukturou.

Měřitelnou chelatační aktivitu vykazovaly alkaloidy galanthamin, chlidanthin a lykorin v prostředí DMSO s indikátorem BCS. S indikátorem HEM chelatoval pouze galanthin v pH 5,5, 6,8 a 7,5. V obou případech je však chelatační aktivita velmi nízká a dochází k ní až při vyšších poměrech alkaloid:Cu^{2+}.

Redukující aktivitu z alkaloidů galanthaminového typu vykazoval nejvíce chlidanthin, jak v prostředí pufru, tak v prostředí DMSO. Je to dáno tím, že má ve své molekule hydroxylovou skupinu na benzenovém kruhu. Přítomnost hydroxylové skupiny na benzenovém jádře má zásadní vliv na redukční schopnost látky. Aktivita galanthaminu ve formě volné báze a soli se statisticky nelišila, jedinou výjimkou bylo pH 5,5, kde je aktivita volné báze vyšší. Z alkaloidů haemathaminového typu vykazoval jedinou měřitelnou aktivitu vittatin v prostředí DMSO. V prostředí DMSO jsou rozdíly v aktivitě závislé na poloze hydroxylové skupiny. U vittatinu, stejně jako u galanthaminu, je přítomnost hydroxylové skupiny na cyklohexenovém kruhu spojena pouze s velmi malou redukční schopností, která se u vittatinu projevila pouze při testování v prostředí DMSO. Z alkaloidů lykorinového typu vykazoval nejvyšší aktivitu lykorin. Lykorin má ve struktuře dvě hydroxylové skupiny oproti galanthinu, který má jen jednu, proto má lykorin při pH 5,5 vyšší redukující aktivitu. V prostředí se vzrůstajícím pH pufru a zvyšující se koncentrací montaninu rostla i jeho redukující aktivita. Nejvyšší redukující aktivitu vykazoval v prostředí DMSO. Redukční aktivita montaninu byla srovnatelná s ostatními testovanými alkaloidy, které mají jednu hydroxylovou skupinu na cyklohexenovém kruhu.

14. BIBLIOGRAFIE

1. Yett JR.: Copper (Cu). *Salem Press Encyclopedia of Science*. Salem Press, Amenia 2018

2. Pavelková M, Vysloužil J, Kubová K, et al.: Biologická role mědi jako základního stopového prvku v lidském organismu. *Česká a slovenská farmacie*. 2018;67(4):143-153.

3. Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J.: *Biochemie pro studující medicíny*. Karolinum, Praha 2009.

4. Kehrer JP, Robertson JD, Smith CV.: 1.14 - Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In: McQueen CA, ed. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Elsevier, Amsterdam 2010;277-307.

5. Mondal A, Gandhi A, Fimognari C, et al.: Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European Journal of Pharmacology*. 2019;858:172472.

6. Brewer GJ.: Copper in medicine. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2003;7(2):207-212.

7. Murray RK, Matouš B.: *Harperova ilustrovaná biochemie*. Galén, Praha 2012.

8. Kalousová M.: *Patobiochemie ve schématech*. Grada, Praha 2006.

9. Hill BC, Andrews D.: Differential affinity of BsSCO for Cu(II) and Cu(I) suggests a redox role in copper transfer to the CuA center of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2012;1817(6):948-954.

10. Naruta Y, Sasaki T, Tani F, et al.: Heme–Cu complexes as oxygen-activating functional models for the active site of cytochrome c oxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2001;83(4):239-246.

11. Chen J, Li Q, Ye Y, et al.: Phloretin as both a substrate and inhibitor of tyrosinase: Inhibitory activity and mechanism. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020;226:117642.

12. Markey SP.: Chapter 11 - Pathways of Drug Metabolism. In: Atkinson AJ, Huang S-M, Lertora JJL, Markey SP, eds. *Principles of Clinical Pharmacology (Third Edition)*. Academic Press, Cambridge 2012:153-172.

13. Singh RS, Singh T, Pandey A.: Chapter 1 - Microbial Enzymes—An Overview. In: Singh RS, Singhania RR, Pandey A, Larroche C, eds. *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier, Amsterdam 2019:1-40.

14. Johnston KA, Lopez KM.: Lysyl oxidase in cancer inhibition and metastasis. *Cancer Letters*. 2018;417:174-181.

15. Barranco I, Padilla L, Tvarijonaviciute A, et al.: Levels of activity of superoxide dismutase in seminal plasma do not predict fertility of pig AI-semen doses. *Theriogenology*. 2019;140:18-24.

16. Ramasarma T, Vaigundan D.: Pathways of electron transfer and proton translocation in the action of superoxide dismutase dimer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;514(3):772-776.

17. Cheng W, Ka Y-W, Chang C-C.: Dopamine beta-hydroxylase participate in the immunoendocrine responses of hypothermal stressed white shrimp, Litopenaeus vannamei. *Fish & Shellfish Immunology*. 2016;59:166-178.

18. Ghosh A, Sadhukhan T, Giri S, et al.: Dopamine β Hydroxylase (DBH) is a potential modifier gene associated with Parkinson's disease in Eastern India. *Neuroscience Letters*. 2019;706:75-80.

19. Reddy P, Datta R, Chakravarty A.: Synthesis, X-ray structure and catalytic properties of a copper(II) Schiff base complex modeling the activity of the CuB site of dopamine β-hydroxylase. *Inorganic Chemistry Communications*. 2000;3(6):322-324.

20. Sherwood RA, Bomford A.: CHAPTER 13 - Assessment of hepatic function and investigation of jaundice. In: Marshall WJ, Lapsley M, Day AP, Ayling RM, eds. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects (Third Edition)*. Churchill Livingstone, London 2014:231-249.

21. Ganini D, Canistro D, Jang J, et al.: Ceruloplasmin (ferroxidase) oxidizes hydroxylamine probes: Deceptive implications for free radical detection. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012;53(7):1514-1521.

22. Arnal N, Cristalli DO, de Alaniz MJT, et al.: Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Research*. 2010;1319:118-130.

23. Rubio-Osornio M, Montes S, Heras-Romero Y, et al.: Induction of ferroxidase enzymatic activity by copper reduces MPP+-evoked neurotoxicity in rats. *Neuroscience Research*. 2013;75(3):250-255.

24. Akalın PP, Bülbül B, Çoyan K, et al.: Relationship of blood and seminal plasma ceruloplasmin, copper, iron and cadmium concentrations with sperm quality in Merino rams. *Small Ruminant Research*. 2015;133:135-139.

25. Schneiderka P.: *Kapitoly z klinické biochemie*. Karolinum, Praha 2004.

26. Čermáková M, Štěpánová I.: *Klinická biochemie*. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Praha 2003.

27. Racek J.: *Klinická biochemie*. Galén, Praha 2006.

28. Dastych M, Breinek P.: *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. Masarykova univerzita, Brno 2008.

29. Štern P.: *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. Karolinum, Praha 2005.

30. Masopust J.: *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření. Část 1*. Karolinum, Praha 1998.

31. Masopust J.: *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření. Část 2*. Karolinum, Praha 1998.

32. Prokeš J.: *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Galén, Praha, Karolinum, Praha 2005.

33. FONS Příručka laboratorních vyšetření. Měď [Online]. [citován 24. říjen 2019]. Dostupné z: http://stara.cskb.cz/plv/Produkty/7AF93DED-D1E5-474B-82FB-FCDC3C3D136F.html

34. Lab Tests Online. Wilsonova nemoc [Online]. [citován 24. říjen 2019]. Dostupné z: https://www.labtestsonline.cz/wilsonova-nemoc.html

35. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, et al.: *Klinická genetika*. Triton, Praha 2004.

36. Zima T.: *Laboratorní diagnostika*. Galén, Praha, Karolinum, Praha 2007.

37. Silbernagl S, Lang F.: *Atlas patofyziologie*. Grada, Praha 2012.

38. Ehrmann J, Hůlek P.: *Hepatologie*. Grada, Praha 2010.

39. Špičák J.: *Novinky v gastroenterologii a hepatologii II.* Grada, Praha 2017.

40. Vališ M, Taláb R, Bártová J, et al.: Pozdní manifestace Wilsonovy choroby: kazuistika. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2007;70/103(3):328-331.

41. Collins RD, Lomíček J, Lomíčková Z.: *Diferenciální diagnostika prvního kontaktu.* Grada, Praha 2007.

42. Říha M, Karlíčková J, Filipský T, et al.: Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2013;123:80-87.

43. Lurie DG, Holden JM, Schubert A, et al.: The copper content of foods based on a critical evaluation of published analytical data. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1989;2(4):298-316.

44. Akinseye ON, Yazdani R, Tornow KA, et al.: Imaging findings of Menkes disease, a radiographic mimic of abusive trauma. *Radiology Case Reports*. 2019;14(8):993-996.

45. Siotto M, Squitti R.: Copper imbalance in Alzheimer's disease: Overview of the exchangeable copper component in plasma and the intriguing role albumin plays. *Coordination Chemistry Reviews*. 2018;371:86-95.

46. Sensi SL, Granzotto A, Siotto M, et al.: Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2018;39(12):1049-1063.

47. Squitti R, Ghidoni R, Simonelli I, et al.: Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2018;45:181-188.

48. Státní ústav pro kontrolu léčiv. ISICOM, 100MG/25MG TBL NOB 100.

49. Arnesano F, Nardella MI, Natile G.: Platinum drugs, copper transporters and copper chelators. *Coordination Chemistry Reviews*. 2018;374:254-260.

50. Yang Y-S, Zhang X, Xiong Z, et al.: Comparative in vitro and in vivo evaluation of two 64Cu-labeled bombesin analogs in a mouse model of human prostate adenocarcinoma. *Nuclear Medicine and Biology*. 2006;33(3):371-380.

51. Zhou Y, Baidoo KE, Brechbiel MW.: Mapping biological behaviors by application of longer-lived positron emitting radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(8):1098-1111.

52. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL.: *Lehninger Principles of Biochemistry*. Seventh edition. W.H. Freeman and Company; Macmillan Higher Education, New York, Houndmills 2017.

53. Záruba K.: *Analytická chemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2016.

54. Housecroft CE, Sharpe AG.: *Anorganická chemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2014.

55. Klikorka J, Hájek B, Votinský J.: *Obecná a Anorganická Chemie*. 2. nezměn. vyd. SNTL - Nakladatelství technické literatury, Praha 1989.

56. Arredondo M, Núñez MT.: Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005;26(4):313-327.

57. Bartoš M, Šrámková J, Staněk V.: *Analytická chemie*. Univerzita Pardubice, Pardubice 2011.

58. Moravcová H.: *Analytická chemie*. Pavko, Ostrava 2011.

59. Státní ústav pro kontrolu léčiv. CUPRIOR, 150MG TBL FLM 72.

60. Státní ústav pro kontrolu léčiv. METALCAPTASE, 150MG TBL ENT 50.

61. Státní ústav pro kontrolu léčiv. WILZIN, 25MG CPS DUR 250.

62. Roberts MF, Wink M.: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Springer US, Boston 1998.

63. Spilková J, Martin J, Siatka T.: *Farmakognozie*. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha 2016.

64. Funayama S, Cordell GA.: *Alkaloids: A Treasury of Poisons and Medicines*. Elsevier, Amsterdam 2015.

65. Cassiano NM.: *Alkaloids: Properties, Applications, and Pharmacological Effects*. Nova Science Publishers, Hauppauge 2010.

66. Sabiu S, Madende M, Ajao AA, et al.: Chapter 9 - The Genus Allium (Amaryllidaceae: Alloideae): Features, Phytoconstituents, and Mechanisms of Antidiabetic Potential of Allium cepa and Allium sativum. In: Watson RR, Preedy VR, eds. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes (Second Edition)*. Academic Press, Cambridge 2019:137-154.

67. Skalická A, Větvička V, Zelený V, et al.: *Botanický slovník: rodových jmen cévnatých rostlin*. Aventinum, Praha 2012.

68. Jensen BS, Christensen SB, Jäger AK, et al.: Amaryllidaceae alkaloids from the Australasian tribe Calostemmateae with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2011;39(2):153-155.

69. Reis A, Magne K, Massot S, et al.: Amaryllidaceae alkaloids: identification and partial characterization of montanine production in Rhodophiala bifida plant. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-11.

70. Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2011.

71. Torras-Claveria L, Berkov S, Codina C, et al.: Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of Narcissus by GC–MS combined with k-means cluster analysis. *Industrial Crops and Products*. 2014;56:211-222.

72. Moraga-Nicolás F, Iturriaga-Vásquez P, Mutis A, et al.: Galanthamine and other Amaryllidaceae related alkaloids are inhibitors of α7, α4β2 and α3β4 nicotinic acetylcholine receptors. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019;29(4):495-499.

73. Shao S, Li M, Du W, et al.: Galanthamine, an acetylcholine inhibitor, prevents prepulse inhibition deficits induced by adolescent social isolation or MK-801 treatment. *Brain Research*. 2014;1589:105-111.

74. Fraser MD, Davies JRT, Chang X.: New Gold in Them Thar Hills: Testing a Novel Supply Route for Plant-Derived Galanthamine. *Journal of Alzheimer's Disease* 55(4):1321-1325.

75. Státní ústav pro kontrolu léčiv. GALANTAMIN MYLAN 16MG CPS PRO 30 II.

76. Kimura H, Kawai T, Hamashima Y, et al.: Synthesis and evaluation of (−)- and (+)-[11C]galanthamine as PET tracers for cerebral acetylcholinesterase imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014;22(1):285-291.

77. PubChem. Galantamine [Online]. [citován 29. leden 2020]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9651

78. PubChem. Galantamine hydrobromide [Online]. [citován 29. leden 2020]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/121587

79. Ortiz JE, Garro A, Pigni NB, et al.: Cholinesterase-inhibitory effect and in silico analysis of alkaloids from bulbs of Hieronymiella species. *Phytomedicine*. 2018;39:66-74.

80. Rahman A.: *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Amsterdam 1988.

81. PubChem. Chlidanthine [Online]. [citován 21. duben 2020]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9814447

82. Roy M, Liang L, Xiao X, et al.: Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;107:615-624.

83. PubChem. Lycorine [Online]. [citován 21. duben 2020]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72378

84. Emir A, Emir C, Bozkurt B, et al.: Alkaloids from Galanthus fosteri. *Phytochemistry Letters*. 2016;17:167-172.

85. PubChem. Galanthine [Online]. [citován 28. leden 2020]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10403528

86. Havelek R, Seifrtova M, Kralovec K, et al.: The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*. 2014;21(4):479-490.

87. Seifrtová M, Havelek R, Cahlíková L, et al.: Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, p21WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells. *Phytomedicine*. 2017;35:1-10.

88. PubChem. Haemanthamine [Online]. [citován 28. leden 2020]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441593

89. Bohno M, Sugie K, Imase H, et al.: Total synthesis of Amaryllidaceae alkaloids, (+)-vittatine and (+)-haemanthamine, starting from d-glucose. *Tetrahedron*. 2007;63(30):6977-6989.

90. PubChem. Vittatine [Online]. [citován 21. duben 2020]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443693

91. Govindaraju K, Ingels A, Hasan MN, et al.: Synthetic analogues of the montanine-type alkaloids with activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018;28(4):589-593.

92. Masi M, van Slambrouck S, Gunawardana S, et al.: Alkaloids isolated from Haemanthus humilis Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity of coccinine and montanine. *South African Journal of Botany*. 2019;126:277-281.

93. Reis A, Magne K, Massot S, et al.: Amaryllidaceae alkaloids: identification and partial characterization of montanine production in Rhodophiala bifida plant. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-11.

94. PubChem. Montanine [Online]. [citován 21. duben 2020]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11087935

95. Cahlíková L, Hrabinová M, Kulhánková A, et al.: Alkaloids from Chlidanthus fragrans and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural Product Communications*. 2013;8(11):1541-1544.

96. Kulhánková A, Cahlíková L, Novák Z, et al.: Alkaloids from Zephyranthes robusta BAKER and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity*. 2013;10(6):1120-1127.

97. Al Shammari L, Al Mamun A, Koutova D, et al.: Alkaloid Profiling of Hippeastrum Cultivars by GC-MS, Isolation of Amaryllidaceae Alkaloids and Evaluation of Their Cytotoxicity. *Records of Natural Products*. 2019;14(2):154-159.

98. Říha M, Karlíčková J, Filipský T, et al.: In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advances*. 2014;4(62):32628-32638.

99. Karlíčková J, Macáková K, Říha M, et al.: Isoflavones Reduce Copper with Minimal Impact on Iron In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015:437381.

100. Rudolfová T.: *Diplomová práce*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2013.

101.Dočekalová L.: *Diplomová práce*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2016.

102.Macáková K, Mladěnka P, Filipský T, et al.: Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chemistry*. 2012;135(4):2584-2592.

15. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Schéma poruchy metabolismu mědi (36). 19
Obr. 2: CT snímek pozdní manifestace Wilsonovy choroby (39). 20
Obr. 3: Kayser-Fleischerů prstenec (38). 20
Obr. 4: Posun oxidačního čísla při oxidaci a redukci. 26
Obr. 5: Struktura trientinu tetrahydrochloridu (58). 27
Obr. 6: Struktura penicillaminu (59). 28
Obr. 7: Struktura zinci acetas dihydricus (60). 28
Obr. 8: Dělení alkaloidů (62). 30
Obr. 9: Zařazení do systému a zástupci čeledi Amaryllidaceae (66, 69). 32
Obr. 10: Cesta syntézy hlavních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae (70). 34
Obr. 11: Struktura galanthaminu (76). 36
Obr. 12: Struktura galanthaminu hydrobromidu (77). 36
Obr. 13: Struktura chlidanthinu (80). 37
Obr. 14: Přeměna norbelladinu na lykorin (82). 39
Obr. 15: Struktura galanthinu (84). 39
Obr. 16: Přeměna haemanthaminu na haemanthidin (87). 40
Obr. 17: Struktura vittatinu (89). 41
Obr. 18: Struktura montaninu (93). 42
Obr. 19: Obsah mikrotitrační destičky pro sestrojení kalibrační křivky. 46
Obr. 20: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďnatých kationtů hematoxylinem. 47
Obr. 21: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďnatých kationtů v pufru. 48
Obr. 22: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďných kationtů v pufru. 48
Obr. 23: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďnatých kationtů v DMSO. 49
Obr. 24: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení chelatace měďných kationtů v DMSO. 49

Obr. 25: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení redukce měďnatých kationtů v pufru. 50
Obr. 26: Obsah mikrotitrační destičky pro stanovení redukce měďnatých kationtů v DMSO. 50
Obr. 27: Kalibrační křivka měďnatých kationtů. 51
Obr. 28: Chelatační aktivita galanthinu v prostředí měďnatých kationtů. 52
Obr. 29: Chelatační aktivita chlidanthinu v prostředí DMSO s indikátorem BCS. 53
Obr. 30: Chelatační aktivita galanthaminu v prostředí DMSO s indikátorem BCS....54
Obr. 31: Chelatační aktivita lykorinu v prostředí DMSO s indikátorem BCS. 54
Obr. 32: Redukce chlidanthinu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min. 55
Obr. 33: Redukce galanthaminu hydrobromidu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min. 56
Obr. 34: Redukce galanthaminu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min. 56
Obr. 35: Redukce galanthinu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min. 57
Obr. 36: Redukce lykorinu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min. 57
Obr. 37: Redukce haemanthamin v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min. 58
Obr. 38: Redukce vittatinu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min. 58
Obr. 39: Redukce montaninu v prostředí různého pH roztoku a v prostředí DMSO v čase 0 min a 5 min. 59
Obr. 40: Porovnání chelatační aktivity alkaloidů galanthaminového typu v prostředí DMSO....62
Obr. 41: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu při pH 4.5....63
Obr. 42: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu při pH 5.5....63

Obr. 43: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu při pH 6.8.....64
Obr. 44: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu při pH 7.5.....64
Obr. 45: Porovnání redukující aktivity alkaloidů galanthaminového typu v DMSO.....65
Obr. 46: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu při pH 4.5.....66
Obr. 47: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu při pH 5.5.....66
Obr. 48: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu při pH 6.8.....67
Obr. 49: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu při pH 7.5.....67
Obr. 50: Porovnání redukující aktivity alkaloidů haemathaminového typu v DMSO.....68
Obr. 51: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu při pH 4.5.....69
Obr. 52: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu při pH 5.5.....69
Obr. 53: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu při pH 6.8.....70
Obr. 54: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu při pH 7.5.....70
Obr. 55: Porovnání redukující aktivity alkaloidů lykorinového typu v DMSO.....71

16. SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Obsah mědi v některých potravinách (44) 21

Tab. 11: Kalibrační křivka 51