

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

**MĚĎ CHELATUJÍCÍ ÚČINKY FLAVANONŮ**

*COPPER CHELATING PROPERTIES OF FLAVANONES*

**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

Vedoucí rigorózní práce:

Doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Mgr. Tereza Kantorová

„Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a veškeré použité prameny byly v práci řádně citovány. Tuto práci jsem nepoužila k získání stejného nebo jiného titulu.“

V Hradci Králové, dne 29.9. 2020

.....

Mgr. Tereza Kantorová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala **doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D.** za jeho veškerou pomoc při psaní mé rigorózní práce. Oceňuji nejen jeho odborné rady a velkou profesionalitu, ale nemohu opomenout ani jeho úžasný lidský přístup, za který jsem mu opravdu velice vděčná. Chtěla bych zmínit, že práce vznikla za podpory grantu UK1220314B.

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakologie a toxikologie**

**Kandidát:** Mgr. Tereza Kantorová

**Konzultant:** doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

**Název rigorózní práce:** Měď chelatující účinky flavanonů

Měď je základním stopovým prvkem, který v našem organismu hraje zásadní roli. Jako součást kuproenzymů se podílí na mnoha fyziologických procesech. Zároveň ale představuje pro lidský organismus i jisté riziko. Volná měď má schopnost potencovat tvorbu reaktivních kyslíkových látek a tím podporovat oxidační stres. Proto musí být homeostáza mědi pečlivě regulována.

Flavanony patří do jedné z podtříd flavonoidů. Tyto přírodní látky jsou z vědeckého hlediska velmi zajímavé, a to díky svému možnému rozličnému farmakologickému působení. V této práci jsme se zaměřili na jejich měď-chelatační vlastnosti. Flavanony, u kterých očekáváme nízký potenciál nežádoucích účinků, by mohly najít uplatnění jako chelátory mědi a rozšířit tak terapeutické možnosti u některých onemocnění spojených s dysbalancí mědi (např. Wilsonova choroba, nádory).

Čtyři vybrané flavanony (hesperetin, hesperidin, naringenin a naringin) byly testovány na schopnost chelatovat ionty mědi za pomoci dvou spektrofotometrických indikátorů – hematoxylinu a disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny (BCS).

Screeningová hematoxylinová metoda ukázala, že všechny testované flavanony prokázaly schopnost chelatovat měďnaté ionty při pH 5,5 – 7,5. Při použití indikátoru BCS s vysokou afinitou k měďným iontům (silně kompetitivní prostředí) nebyly ale testované látky schopny významně chelatovat ani měďné ani měďnaté ionty. Ukázalo se, že se jedná o slabé chelátory. Strukturálním předpokladem pro chelataci iontů mědi je 4-keto-5-hydroxyskupina, která se nachází ve všech testovaných flavanonech.

Přestože jsou tyto látky schopny chelatace, jejich chelatační potenciál je malý a jejich uplatnění v praxi je nepravděpodobné.

# ABSTRACT

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacology and Toxicology**

**Candidate:** Tereza Kantorová, MSc.

**Consultant:** Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D.,PhD.

**Title of the Rigorous Thesis:** Copper chelating properties of flavanones

Copper is an essential trace element playing an essential role in our body. As part of copperoenzymes, it is involved in many physiological processes. However, at the same time, it also poses a certain risk to the human body. Free copper has the ability to potentiate the formation of reactive oxygen species and thus to promote oxidative stress. Therefore, copper homeostasis must be carefully regulated.

Flavanones belong to one of the subclasses of flavonoids. These natural substances are very interesting from a scientific point of view due to their possible various pharmacological effects. In this work, we focused on their copper-chelating properties. Flavanones, which are expected to possess a low potential for side effects, could find application as copper chelators and thus expand the current therapeutic modalities for some diseases associated with copper imbalance (e.g. Wilson's disease, tumors).

Four selected flavanones (hesperetin, hesperidin, naringenin and naringin) were tested for their ability to chelate copper ions using two spectrophotometric indicators - hematoxylin and disodium salt of bathocuproindisulfonic acid (BCS).

The hematoxylin screening method showed that all tested flavanones demonstrated the ability to chelate cupric ions at pH 5.5 - 7.5. Tested substances were not however able to significantly chelate neither cuprous nor cupric ions using the BCS as the indicator with high affinity for cupric ions (highly competitive environment). It can be summed up that they are weak chelators. A structural prerequisite for the chelation of copper ions is the 4-keto-5-hydroxy group, which is found in all tested flavanones.

Although these substances are capable of chelating, their chelating potential is small and therapeutic use is unlikely.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Teoretická část</b> .....	<b>10</b>
2.1. Flavonoidy .....	10
2.2. Struktura flavonoidů .....	11
2.3. Dělení flavonoidů .....	11
2.3.1. Flavony .....	13
2.3.2. Flavonoly .....	13
2.3.3. Flavanony.....	14
2.3.4. Flavanoly .....	15
2.3.5. Isoflavony .....	16
2.3.6. Anthokyany.....	17
2.4. Metabolismus flavonoidů .....	18
2.5. Biologické působení flavonoidů .....	20
2.6. Měď.....	21
2.6.1. Oxidační stupně mědi .....	21
2.6.2. Fyziologický význam mědi.....	22
2.6.3. Přítomnost mědi v potravě.....	24
2.6.4. Farmakokinetika mědi .....	27
2.6.5. Patologické stavy spojené s nadbytkem či nedostatkem mědi .....	31
<b>3. Cíl práce</b> .....	<b>38</b>
<b>4. Metodika</b> .....	<b>39</b>
4.1. Testované flavanony .....	39
4.2. Chemikálie .....	39
4.3. Pomůcky .....	39
4.4. Přístroje.....	39
<b>5. Vlastní chelatační metodika</b> .....	<b>40</b>
5.1. Stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem .....	40
5.1.1. Příprava základních roztoků .....	40
5.1.2. Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky.....	40

5.1.3.	Stanovení chelatace měďnatých iontů v pufru (pH 7,5; 6,8 a 5,5) .....	41
5.2.	Stanovení chelatace iontů mědi BCS .....	42
5.2.1.	Příprava základních roztoků .....	42
5.2.2.	Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky .....	42
5.2.3.	Stanovení chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů v pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).....	43
5.2.4.	Stanovení chelatace $\text{Cu}^{+}$ iontů v pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).....	44
<b>6.</b>	<b>Matematická a statistická analýza .....</b>	<b>45</b>
6.1.	Výpočet účinnosti chelatace .....	45
6.2.	Výpočet stability chelatace .....	46
6.3.	Statistická analýza.....	46
<b>7.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>58</b>
<b>9.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>61</b>
<b>10.</b>	<b>Literatura a zdroje.....</b>	<b>62</b>
10.1.	Knihy .....	62
10.2.	Články a periodika .....	62
10.3.	Internetové odkazy.....	67

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATOX1	Chaperon zajišťující transport mědi uvnitř buňky z angl. antioxidant 1 copper chaperone
ATP7A	Specifická Cu-ATPáza, sloužící k přenosu mědi uvnitř buňky
ATP7B	Specifická Cu-ATPáza, sloužící k přenosu mědi uvnitř buňky
BCS	Disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny z angl. bathocuproinedisulfate disodium salt
BMI	Index tělesné hmotnosti z angl. body mass index
CCS1	Chaperon zajišťující transport mědi uvnitř buňky pro superoxiddismutázu z angl. copper chaperone for superoxid dismutase 1
COX	Cytochrom-c-oxidáza
COX17	Chaperon zajišťující transport mědi uvnitř buňky pro COX z angl. cytochrome c oxidase copper chaperone 17
CTR1	Transportér mědi s vysokou afinitou z angl. copper transporter 1
CTR2	Transportér mědi s nízkou afinitou z angl. copper transporter 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
HA	Hydroxylamin hydrochlorid
HEPES	HEPES pufr, N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
LPH	Laktáza-phlorizin hydroláza
MAO	Monoaminoxidáza
MD	Menkesova choroba z angl. Menkes disease
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina z angl. messenger ribonucleic acid
RNS	Reaktivní formy dusíku z angl. reactive nitrogen species
ROS	Reaktivní formy kyslíku z angl. reactive oxygen species
SGLT1	Sodíko – glukózový kotransportér z angl. sodium glucose cotransporter 1
SOD	Superoxiddismutáza
WD	Wilsonova choroba z angl. Wilson's disease



# 1. ÚVOD

Flavanony patří mezi flavonoidy, v přírodě hojně rozšířené fenolické látky. Flavonoidy můžeme nalézt v ovoci, zelenině a také v nápojích připravených z rostlin, zejména v čaji nebo červeném víně. Jsou zkrátka běžnou součástí naší stravy.

Co je na flavonoidech z vědeckého hlediska velmi zajímavé, je jejich rozličné farmakologické působení. Můžeme zmínit jejich protizánětlivé působení, antivirovou a antimykotickou aktivitu, vasodilatační působení a v neposlední řadě i jejich schopnost vychytávat volné radikály, a to buď přímo nebo inhibicí jejich produkce. Také posilují účinky jiných antioxidantů. Všechny tyto i další vlastnosti flavonoidů mohou být podstatou jejich pro zdraví člověka prospěšného působení.

I při normálních metabolických procesech se vytváří malé množství volných radikálů. Ty mohou, pokud jsou tvořeny v nadbytku, škodit. Mohou zapříčinit vznik chorob a účastní se procesu stárnutí. Pro udržení fyziologické hladiny volných radikálů vyvinul organismus široký soubor jak enzymatických, tak neenzymatických, tělu vlastních antioxidačních obranných systémů. Nicméně, v případě, že dojde k nadměrnému zvýšení tvorby volných radikálů, jsou právě v potravě obsažené flavonoidy považovány za důležité k udržení homeostázy. Funkční hydroxylové skupiny ve flavonoidech zprostředkovávají své antioxidační účinky jak vychytáváním volných radikálů, tak chelatací kovových iontů. Ionty železa a mědi se totiž výraznou měrou podílejí na tvorbě volných radikálů, které poškozují cílové biomolekuly.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Flavonoidy

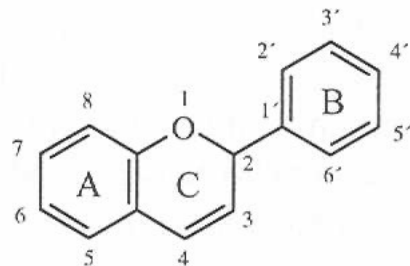
Flavonoidy představují velkou skupinu fenolických látek. V přírodě jsou značně rozšířené. Bylo jich popsáno více než 4000. Vyskytují se zejména v cévnatých rostlinách a patří k rostlinným sekundárním metabolitům. Jejich všudypřítomnost v rostlinné říši a vysoký obsah zejména v ovoci a zelenině z nich činí běžnou součást lidské stravy. Flavonoidy se vyskytují jak volné (aglykony), tak ve formě glykosidů. Glykosidy jsou látky hydrofilní a v rostlinách jsou rozpuštěné v buněčné šťávě vakuol. Naopak methoxylované flavonoidy a flavonoidy chudé na kyslík jsou jako lipofilní látky součástí silic. Oxyflavony a oxyflavonoly působí v rostlině jako květní barviva (Minařík 1979, Spilková 2016).

Zájem o výzkum flavonoidů neustále roste díky jejich možným všestranným zdravotním přínosům, jež uvádějí různé epidemiologické studie. Ukazuje se, že mnoho flavonoidů má antioxidační aktivitu, tj. schopnost zachycovat volné radikály, kardioprotektivní vlastnosti, hepatoprotektivní, protizánětlivé a protirakovinové účinky a některé flavonoidy vykazují i potenciálně antivirovou aktivitu. V rostlinných systémech flavonoidy pomáhají v boji proti oxidačnímu stresu a působí jako regulátory růstu (Kumar a Pandey 2013).

Antioxidační aktivita flavonoidů závisí na uspořádání funkčních skupin kolem základní struktury. Konfigurace, substituce a celkový počet hydroxylových skupin podstatně ovlivňují několik mechanismů antioxidační aktivity, jako je vychytávání radikálů a chelatace kovových iontů (Bravo 1998). Hydroxylová konfigurace kruhu B je nejdůležitějším determinantem zachycování volných forem kyslíku (ROS) a volných forem dusíku (RNS), protože daruje vodík a elektron hydroxylovým, peroxylovým a peroxynitrilovým radikálům, stabilizuje je a vytváří relativně stabilní flavonoidový radikál (Kumar a Pandey 2013).

## 2.2. Struktura flavonoidů

Základní strukturou flavonoidů je flavanové jádro (Obr. 1) (Velíšek 2002).



**Obr. 1** Flavan – základní struktura flavonoidů. Převzato z Velíšek (2002).

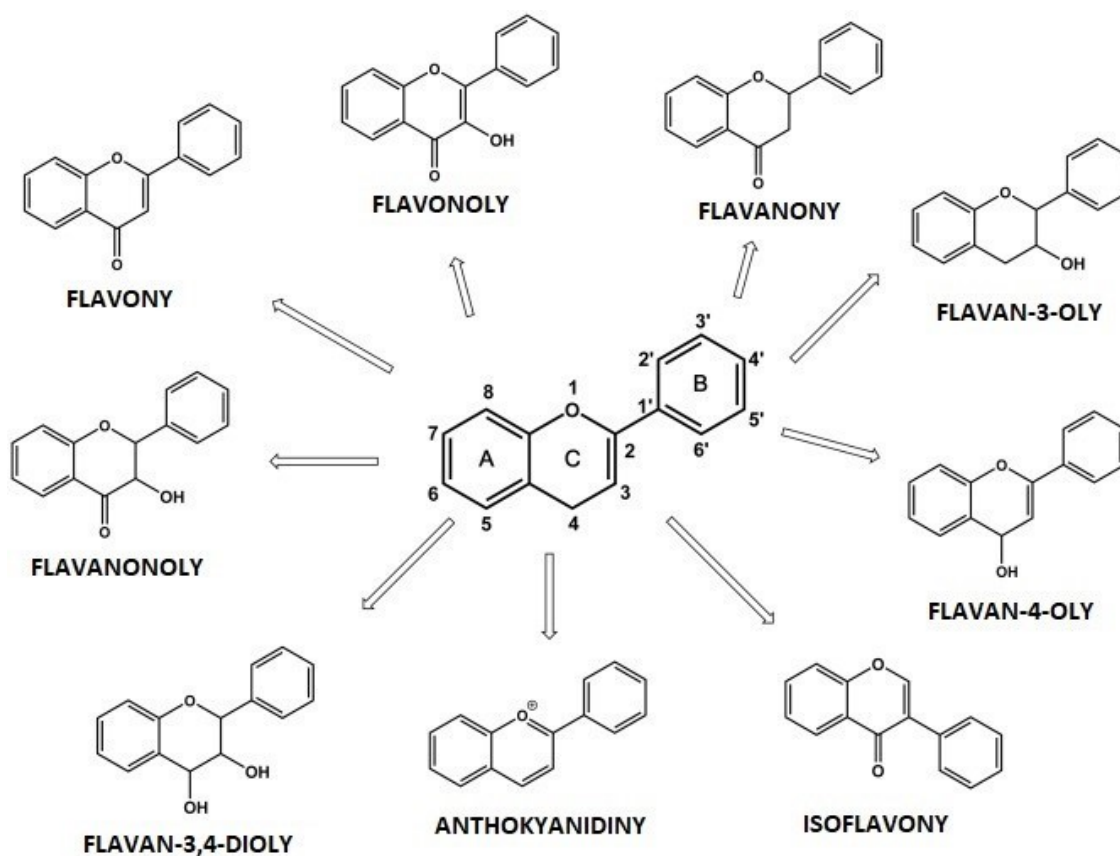
Struktura flavanu se skládá z difenylpropanu, jehož dvě benzenová jádra jsou spojena třemi uhlíky, které společně s kyslíkem formují heterocyklus 2H-pyran (Bravo 1998). Z chemického hlediska se tedy jedná o deriváty 2-fenylchromanu, které se dělí do několika základních skupin, a to podle stupně oxidace pyranového kruhu. Jednotlivé flavonoidy můžeme od sebe odlišit počtem a polohou substituentů na obou aromatických kruzích, přítomností dvojných vazby nebo také napojením cukerných zbytků a organických kyselin (Spilková 2016). Při tvorbě glykosidů se glykosidická vazba nachází nejčastěji v pozicích C3 nebo C7 a cukernou složkou může být L-rhamnóza, D-glukóza, glukorhamnóza, galaktóza nebo arabinóza (Kumar a Pandey 2013).

## 2.3. Dělení flavonoidů

Rozlišujeme (Obr. 2):

- flavony
- flavonoly
- flavanony
- flavan-3-oly
- flavan-4-oly
- flavan-3,4-dioly
- flavanonoly,

dále biogeneticky příbuzné anthokyany a isoflavonoidy (deriváty 3-fenylchromanu). (Spilková 2016, Daidone et al. 2017).

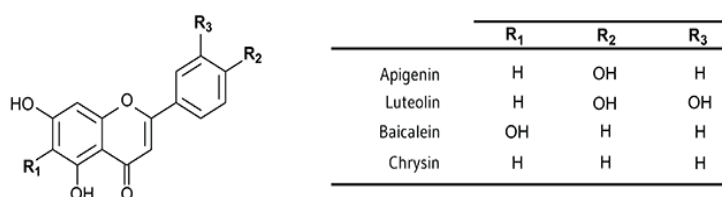


**Obr. 2** Dělení flavonoidů. Převzato z Daidone et al. (2017).

Historie flavonoidů začíná v roce 1930, kdy byla z pomerančů izolována nová látka. V té době se věřilo, že je členem nové třídy vitamínů a byla označena jako vitamin P. Později se však ukázalo, že se jednalo o flavonoid rutin (Kumar a Pandey 2013). Jak již bylo zmíněno, dosud bylo identifikováno více než 4000 různých flavonoidů a jejich seznam neustále roste. Důvodem je skutečnost, že primární substituenty (jako hydroxylová skupina) mohou být a bývají samy substituovány (tj. dodatečně glykosylovány nebo acylovány), což někdy vede k velice složitým strukturám (D'Archivio et al. 2007).

### 2.3.1. Flavony

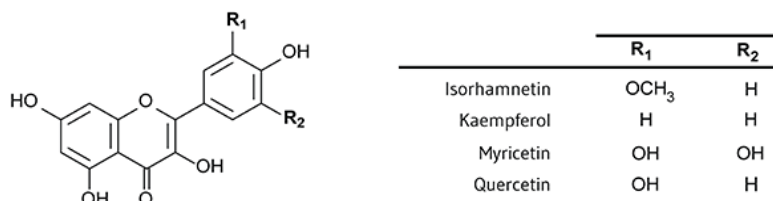
Flavony mají dvojnou vazbu mezi uhlíky C2 a C3 a co se výskytu týče, jsou méně častými flavonoidy (příklady jsou uvedeny v Obr. 3). Jediným důležitým potravním zdrojem flavonů je petržel a celer. Velké množství polymethoxylovaných flavonů je ale také například v kůře mandarinky, kde jejich obsah v éterickém mandarinkovém oleji činí až 6,5 g/l (D'Archivio et al. 2007).



Obr. 3 Chemická struktura flavonů. Převzato z www stránek Oregon State University (2020).

### 2.3.2. Flavonoly

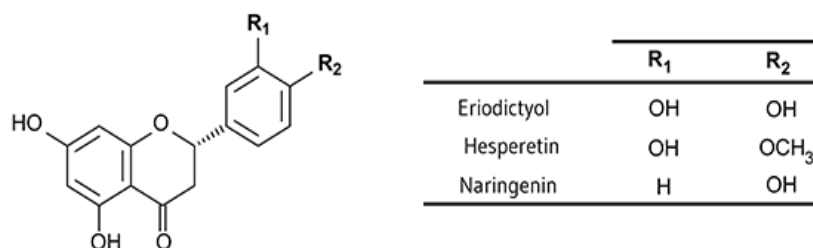
Představují jedny z nejhojněji se vyskytujících flavonoidů (příklady v Obr. 4). Mezi uhlíky C2 a C3 mají dvojnou vazbu a substituentem v poloze C3 je hydroxylová skupina. Nejvýznamnějším zástupcem flavonolů je sloučenina kvercetin. Jejich hlavním zdrojem je cibule (až do 1,2 g/kg), kadeřavá kapusta, pórek, brokolice a borůvky. Také čaj (až 45 mg/l) a červené víno (až 30 mg/l) je obsahují v hojném množství. Je důležité si uvědomit, že biosyntéza flavonolů je stimulována světlem, takže se hromadí ve vnější tkáni ovoce. Zajímavé je, že rozdíly v koncentraci mohou v závislosti na vystavení slunečnímu záření existovat mezi plody stejného stromu, a dokonce i mezi různými stranami jednoho kusu ovoce (D'Archivio et al. 2007).



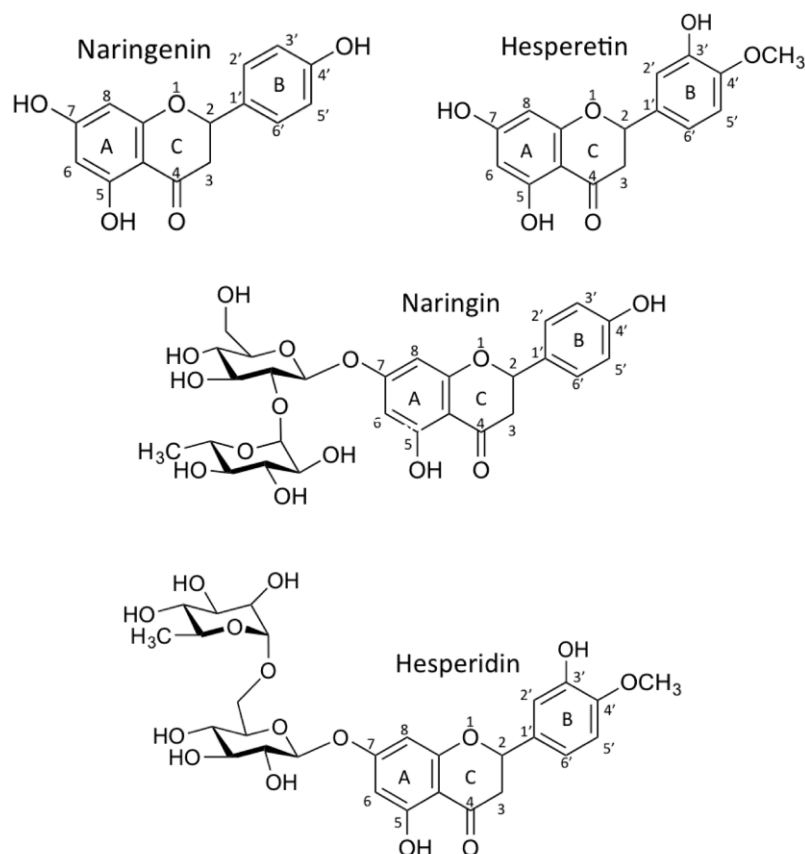
Obr. 4 Chemická struktura flavonolů. Převzato z www stránek Oregon State University (2020).

### 2.3.3. Flavanony

Před několika desetiletími byly flavanony považovány pouze za minoritní flavonoidy (příklady v Obr. 5-6). Během posledních 20 let se však celkový počet známých flavanonů zvýšil natolik, že jsou nyní považovány za jednu z hlavních tříd flavonoidů (Khan et al. 2014). Pro flavanony je typická přítomnost nasyceného tříuhlíkatého řetězce a ketoskupiny v poloze C4. Většinou jsou glykosylovány disacharidem v poloze C7 (Obr. 5). Ve vysokých koncentracích jsou flavanony přítomny pouze v citrusových plodech, méně je jich v rajčatech a v některých aromatických rostlinách, jako například v mátě. Hlavními aglykony jsou naringenin v grapefruitu, hesperetin v pomerančích a eriodictyol v citronech. Pro představu např. pomerančová šťáva obsahuje 470-761 mg hesperidinu a 20-86 mg naringeninů na litr. Pevné části citrusových plodů, a to zejména bílá houbovitá část (albedo), mají velmi vysoký obsah flavanonů, proto tedy celé ovoce může obsahovat až pětkrát více flavanonů než samotná šťáva (D'Archivio et al. 2007).



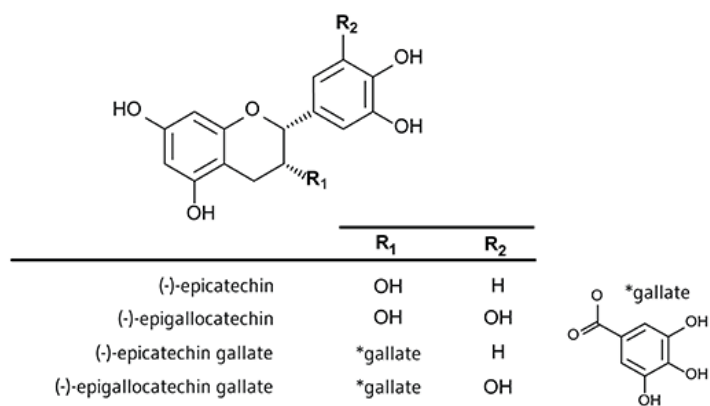
**Obr. 5** Chemická struktura flavanonů. Převzato z [www stránek Oregon State University](http://www.oregonstate.edu) (2020).



**Obr. 6** Flavanony - chemické struktury aglykonů (naringenin a hesperetin) a glykosidů (naringin a hesperidin). Převzato a upraveno ze Su et al. (2017).

### 2.3.4. Flavanoly

Flavanoly, které jsou nejvíce ze všech flavonoidů obsaženy v lidské stravě, mají nasycený tříuhlíkatý řetězec s hydroxylovou skupinou v poloze C3. Existují ve formě monomeru i polymeru (katechiny, respektive proantokyanidiny). Na rozdíl od jiných tříd flavonoidů nejsou flavanoly v potravinách glykosylované. Hlavními reprezentativními flavanoly v ovoci jsou katechin a epikatechin, zatímco galocatechin, epigallocatechin a epigallocatechin gallate se nacházejí zejména v čaji (Obr. 7). Katechiny se nacházejí v mnoha druzích ovoce. Příkladem jsou meruňky a třešně, kde se vyskytují až v množství 250 mg/kg čerstvé hmotnosti. Zelený čaj (do 800 mg/l) a čokoláda (do 600 mg/l) jsou zdaleka nejbohatšími zdroji katechinů, které jsou přítomny také v červeném víně (do 300 mg/l) (D'Archivio et al. 2007).



**Obr. 7** Chemická struktura flavanolů. Převzato z [www stránek Oregon State University](http://www.oregonstate.edu) (2020).

### 2.3.5. Isoflavony

Tato skupina flavonoidů má strukturální podobnost s estrogény. Na pozicích C7 a C4' mají vázané hydroxylové skupiny, které připomínají estradiol. Díky tomu se mohou vázat na estrogenní receptory a jsou tedy klasifikovány jako tzv. fytoestrogeny (D'Archivio et al. 2007, Křížová et al. 2019). Ty nachází uplatnění zejména při terapii menopauzy. Isoflavony jsou téměř výlučně obsaženy v luštěninách. Hlavním zdrojem je sója. Obsahuje tři hlavní molekuly – genistein, daidzein a glycitein (Obr. 8). Vyskytují se buď jako aglykony nebo častěji jako glykosidy, kde je cukerným zbytkem glukóza. Sójové boby obsahují mezi 140 a 1530 mg isoflavonů na kilogram čerstvé hmotnosti a sójové mléko může obsahovat mezi 12 a 130 mg/l (D'Archivio et al. 2007).

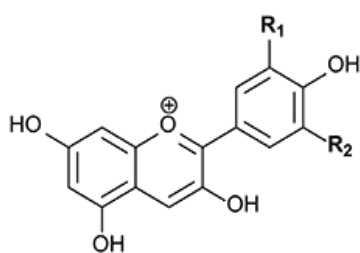


**Obr. 8** Chemická struktura isoflavonů. Převzato z [Oregon State University](http://www.oregonstate.edu) (2020).



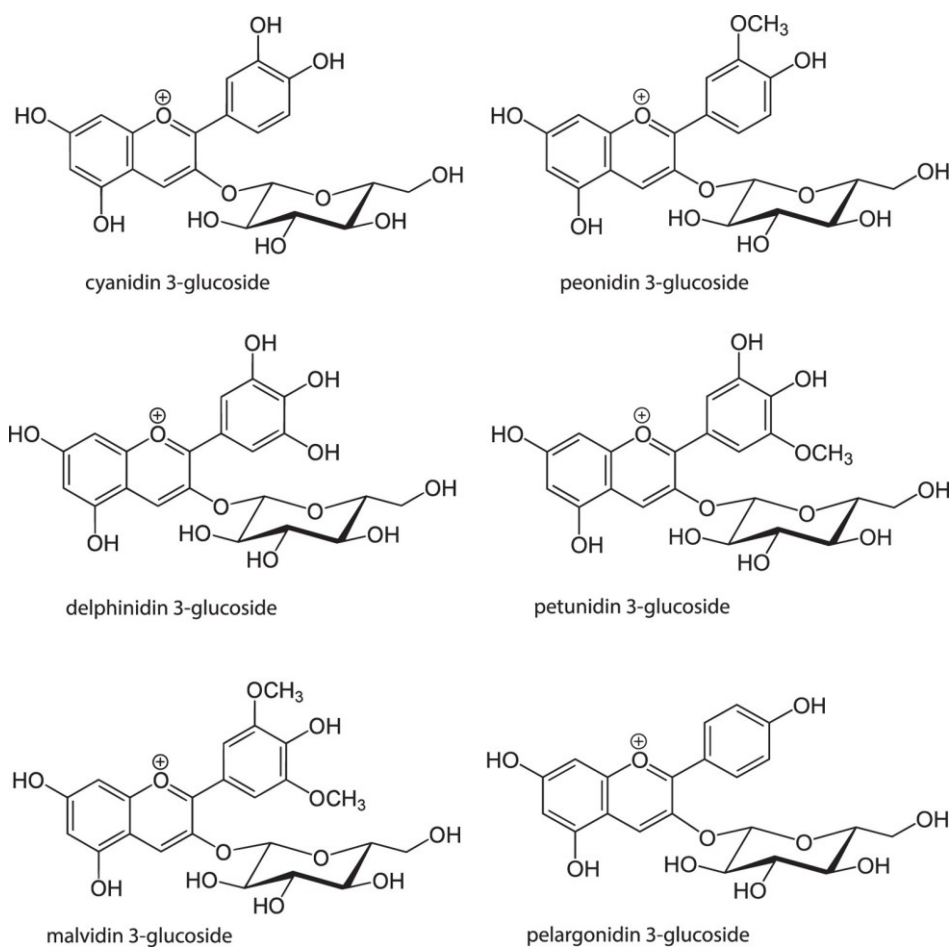
### 2.3.6. Anthokyany

Anthokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty, které jsou odpovědné za většinu červené, modré a fialové barvy ovoce, zeleniny, květin a jiných rostlinných tkání nebo produktů (příklady viz. Obr. 9). Vyskytují se primárně jako glykosidy jejich příslušných aglykonů, které se nazývají anthokyanidiny (Obr. 10), přičemž cukerná část je převážně připojena v poloze C3 na C-kruhu nebo v poloze C5, C7 na A-kruhu. Byla pozorována také glykosylace v poloze C3', C4' a C5' na B-kruhu, i když velmi vzácná. Cukerné skupiny mohou být také acylovány řadou aromatických nebo alifatických kyselin; nejběžnějším acylačním činidlem jsou skořicové kyseliny. Anthokyany jsou v potravě hojně zastoupeny, nacházejí se v červeném víně, některých odrůdách obilovin a určité zelenině (zelí, fazole, cibule, ředkvičky), ale nejvíce se vyskytují zejména v ovoci. Jejich obsah je obecně úměrný intenzitě barvy a s dozráváním ovoce se zvyšuje. Anthokyany se nacházejí hlavně ve slupce, s výjimkou některých červených plodů (třešně a jahody), ve kterých se vyskytují také v dužině. Víno obsahuje až 350 mg anthokyanů/l a tyto anthokyany se během stáří vína transformují do různých složitých struktur (D'Archivio et al. 2007).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH

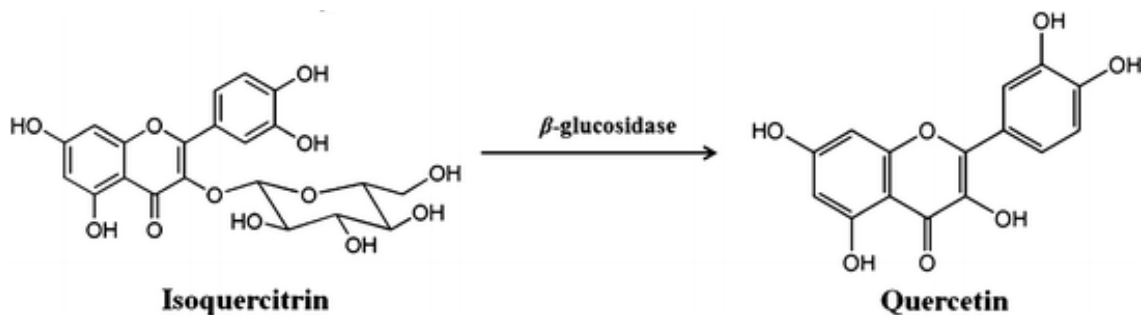
**Obr. 9** Chemická struktura anthokyanů. Převzato z [www stránek Oregon State University](http://www.oregonstate.edu) (2020).



**Obr. 10** Chemická struktura anthokyanidinů. Převzato z Fornasaro et al. (2016).

## 2.4. Metabolismus flavonoidů

Absorpce dietních flavonoidů, které se uvolňují z potravy žvýkáním, závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je velikost molekuly, konfigurace, lipofilita, rozpustnost a pKa. Flavonoid může být absorbován z tenkého střeva nebo prochází až do střeva tlustého, kde může být hydrolyzován nebo jinak metabolizován mikroflórou. To může záviset na struktuře flavonoidu, tedy na tom, zda se jedná o glykosid nebo aglykon. Aglykony mohou být absorbovány v tenkém střevě, zatímco flavonoidní glykosidy musí být pravděpodobně převedeny do formy aglykonu. Jak bylo uvedeno výše, většina flavonoidů, s výjimkou katechinů, je v rostlinách přítomna ve vazbě na cukry (Kumar a Pandey 2013).



**Obr. 11** Struktura quercetinu a jeho 3 – glykosidu isoquercitrinu.

Pomocí  $\beta$ -glucosidázy dochází k rozrušení  $\beta$ -glykosidické vazby a glykosid se mění v aglykon.

Převzato a upraveno z Nam et al. (2012).

Některé hydrofilní flavonoidní glukosidy, jako je quercetin-3-glukosid (isoquercitrin, Obr. 11), jsou transportovány přes tenké střevo  $\text{Na}^+$ /glukózovým kotransportérem 1 (SGLT1). Alternativní mechanismus naznačuje, že flavonoidní glukosidy jsou hydrolyzovány laktázou-phlorizin hydrolázou (LPH),  $\beta$ -glucosidázou na vnější straně okrajové membrány kartáčového lemu tenkého střeva. Uvolněný aglykon může být následně absorbován přes tenké střevo. Substrátová specifita tohoto LPH enzymu se významně liší v širokém rozmezí glykosidů (glukosidů, galaktosidů, arabinosidů, xylosidů a rhamnosidů) flavonoidů. Glykosidy (např. rhamnosidy), které nejsou substráty pro tyto enzymy, jsou transportovány až do střeva tlustého. Tam bakterie tyto flavonoidní glykosidy hydrolyzují, v některých případech ale současně uvolněné aglykony degradují. Protože absorpční kapacita tlustého střeva je mnohem menší než absorpční schopnost tenkého střeva, lze očekávat nižší absorpci těchto glykosidů (Kumar a Pandey 2013).

Při absorpci jsou flavonoidy konjugovány již v tenkém střevě nebo v játrech glukuronidací, sulfatací či methylací. Díky těmto konjugačním reakcím je plazmatická hladina volných flavonoidních aglykonů nízká. V závislosti na zdroji potravy se biologická dostupnost určitých flavonoidů výrazně liší; například absorpce kvercetinu z cibule je čtyřikrát vyšší než absorpce z jablek nebo čaje. Důvodem je právě přítomnost různých glykosidů stejného aglykonu. Oligomerní flavonoidy mohou být hydrolyzovány na monomery a dimery vlivem kyselého prostředí žaludku. Cukerná část flavonoidních glykosidů je důležitým determinantem jejich biologické dostupnosti. Ukázalo se, že dimerizace biologickou dostupnost snižuje. Ze všech tříd flavonoidů vykazují nejvyšší biologickou dostupnost isoflavony (Kumar a Pandey 2013).

## 2.5. Biologické působení flavonoidů

Zájem o výzkum flavonoidů neustále roste díky jejich možným zdravotním přínosům, jež uvádějí různé epidemiologické studie. Ukazuje se, že mnoho flavonoidů má antioxidační aktivitu, která zahrnuje schopnost přímo neutralizovat volné radikály, chelatovat volné kovy a v neposlední řadě také blokovat účinek enzymů produkujících ROS (Mladěnka et al. 2010). Flavonoidy mají také kardio- a hepatoprotektivní, protizánětlivé a protirakovinové účinky a některé z nich vykazují potenciální antivirové působení. V rostlinných systémech flavonoidy pomáhají v boji proti oxidačnímu stresu a působí jako regulátory růstu. Také je známo, že jsou syntetizovány rostlinami v reakci na mikrobiální infekci (Kumar a Pandey 2013).

Jejich účinky jsou závislé na struktuře. Chemická podstata flavonoidů závisí na jejich strukturní třídě, stupni hydroxylace, jiných substitucích, konjugacích a stupni polymerace (Heim et al. 2002). Antioxidační působení a schopnost zachycovat volné radikály flavonoidy zprostředkovávají skrze své funkční hydroxylové skupiny, díky některým z nich jsou současně schopny i chelatovat kovové ionty (Kumar et al. 2013, Mladěnka et al. 2011).

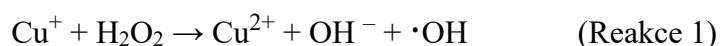
Dříve se předpokládalo, že flavonoidní účinky na lidské zdraví jsou zprostředkovány hlavně přímým antioxidačním působením, které bylo prokázáno jak v systémech *in vivo*, tak *in vitro* (Rice-Evans et al. 1995). Dnes víme, že hlavní účinky flavonoidů budou asi více specifické. Řadíme sem přímou interferenci s některými prooxidačními enzymy, protizánětlivé účinky, chelataci fyziologických kovů nebo přímý vasodilatační potenciál. Flavonoidy mají schopnost indukovat lidské ochranné enzymové systémy. Řada studií naznačuje také ochranné účinky flavonoidů proti mnoha infekčním (bakteriálním a virovým onemocněním) a degenerativním onemocněním, včetně rakoviny a dalších věkově podmíněných nemocí (Kumar a Pandey 2013, Mladěnka et al. 2010).

## 2.6. Měď

Měď je základním stopovým prvkem u lidí a zvířat. Jako kofaktor mnoha metaloenzymů hraje v lidském organismu zásadní roli. Podílí se na velkém množství životně důležitých metabolických procesů. Patří mezi ně například buněčné dýchání, biosyntéza peptidových hormonů, neurotransmiterů a jiných signálních molekul (např. tvorba ATP), ochrana proti volným radikálům, zesíťování elastinu, kolagenu a keratinu. Měď je také nezbytná pro homeostázu železa, a tak nepřímo ovlivňuje krvetvorbu a podílí se na srážení krve a angiogenezi (Lutsenko 2010, Bost et al. 2016).

### 2.6.1. Oxidační stupně mědi

Existují dva základní oxidační stupně mědi: měďný ( $\text{Cu}^+$ ) a měďnatý ( $\text{Cu}^{2+}$ ) kation. V biologických systémech je měď převážně přítomna v oxidované formě  $\text{Cu}^{2+}$  iontu, jelikož v přítomnosti kyslíku nebo jiných akceptorů elektronů  $\text{Cu}^+$  okamžitě a snadno oxiduje na  $\text{Cu}^{2+}$  (Lutsenko 2010). Oxidace Cu je reverzibilní, protože  $\text{Cu}^{2+}$  může v redukčním prostředí buněk přijímat elektron ze silných redukčních činidel, jako je askorbát nebo redukovaný glutathion (Galhardi et al. 2004). Její schopnost reverzibilně přijímat a darovat elektrony hraje hlavní roli při likvidaci volných radikálů z organismu (Lutsenko 2010). Na druhé straně je stejná schopnost předpokladem pro její prooxidační působení. Prostřednictvím Fentonovy reakce (Reakce 1)  $\text{Cu}^+$  totiž transformuje peroxid vodíku na hydroxylový radikál ( $\bullet\text{OH}$ ) - jeden z nejreaktivnějších radikálů v přírodě (Pavelková et al. 2018). Díky těmto schopnostem a jednoduchosti přechodu mezi těmito dvěma stavy je měď ideálním účastníkem redoxních reakcí. Zda dojde k prooxidačnímu nebo antioxidačnímu působení závisí evidentně na více faktorech (Arredondo a Núñez 2005).



## 2.6.2. Fyziologický význam mědi

Studie prokázaly, že měď je nutná pro růst kojenců, obranné mechanismy hostitele, sílu kostí, zrání červených a bílých krvinek, transport železa, metabolismus cholesterolu a glukózy, srdeční kontraktilitu a vývoj mozku (Olivares a Uauy 1996). Měď je nezbytnou součástí celé řady důležitých enzymů, známých jako kuproenzymy. Patří mezi ně cytochrom-c-oxidáza, lisyloxidáza, feroxidázy, superoxidodismutáza, tyrosináza, dopamin- $\beta$ -monooxygenáza, monoaminoxidáza a mnohé další (Angelova et al. 2011).

### **Superoxiddismutáza (SOD)**

Superoxiddismutáza patří do skupiny metaloenzymů a představuje velmi důležitou obranu proti oxidačnímu stresu v těle. Enzym působí jako ochranný prostředek proti chorobám zprostředkovaným ROS. Existují tři formy SOD: 1) Mn-SOD, 2) Cu/Zn-SOD, která se nachází ve většině buněk organismu, včetně červených krvinek a 3) extracelulární Cu/Zn – SOD, jež můžeme najít ve velkém množství v plicích a v nízkých hladinách v plazmě. Tyto proteiny katalyzují přeměnu superoxidových volných radikálů v peroxidu vodíku, které mohou být následně redukovány na vodu jinými antioxidačními enzymy. Tato reakce je doprovázena alternativní oxidací a redukcí kovových iontů přítomných v aktivním místě SOD (Angelova et al. 2011, Keller et al. 1991, Pavelková et al. 2018).

### **Cytochrom-c-oxidáza (COX)**

Cytochrom-c-oxidáza leží uvnitř vnitřní mitochondriální membrány a hraje zásadní roli v buněčné energii. Účastní se buněčného dýchání a je koncovým akceptorem elektronů dýchacího řetězce. Jako katalyzátor redukce molekulárního kyslíku ( $O_2$ ) na vodu ( $H_2O$ ) generuje cytochrom-c-oxidáza elektrický gradient, který je využíván mitochondriemi k vytvoření vitální energie pro organismus a je uložen v molekulách ATP (Angelova et al. 2011, Pavelková et al. 2018).

### **Lisyloxidáza**

Lisyloxidáza, se podílí na síťování kolagenu a elastinu, které tvoří pojivovou tkáň. Účinky lisyloxidázy pomáhají udržovat integritu a pružnost pojivové tkáně v srdci a cévách, ale také hrají roli při tvorbě kostí (Angelova et al. 2011).

### **Ceruloplasmin**

Ceruloplasmin (feroxidáza) je hlavním transportním proteinem mědi v plazmě. Je zodpovědný za dodávání mědi do buněk a její vylučování z těla. Má také zásadní roli v metabolismu železa. Oxiduje  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  a železité kationty jsou následně zabudovány do transferinu, transportního proteinu železa, který je transportuje do červených krvinek (erytropoéza). Ceruloplasmin je jedním z pozitivních proteinových reaktantů akutní fáze. Během patologických stavů, jako je zánět, infekce nebo poranění dochází ke zvýšení jeho koncentrace v plazmě. Ceruloplasmin také funguje jako antioxidant. Měď a ionty železa jsou silnými katalyzátory při neutralizaci volných radikálů. Ačkoli aktivita feroxidázy tohoto kuproenzymu stále není zcela objasněna, byl jasně prokázán fyziologický význam a účast mědi na metabolismu železa (Angelova et al. 2011, Pavelková et al. 2018).

Kuproenzymy katalyzují mnoho enzymatických reakcí, které jsou nezbytné pro správné fungování mozku a nervového systému:

### **Dopamin- $\beta$ -monooxygenáza**

Dopamin- $\beta$ -monooxygenáza katalyzuje přeměnu neurotransmiteru dopaminu na noradrenalin (Angelova et al. 2011).

### **Monoaminoxidáza (MAO)**

Monoaminoxidáza hraje roli v metabolismu neurotransmiterů noradrenalinu, adrenalinu a dopaminu. MAO rozkládá také další neurotransmitter serotonin, což odůvodňuje použití inhibitorů MAO jako antidepresiv (Angelova et al. 2011).

### **Tyrosináza**

Tyrosináza je nutná pro tvorbu melaninového pigmentu. Melanin, který je produkován melanocyty, hraje roli při pigmentaci vlasů, kůže a očí (Angelova et al. 2011).

### **Methalothioneiny**

Jedná se o buněčné bílkoviny, které vážou dvojmocné kovy (kromě železa), pokud jsou přítomny v nadměrném množství. Touto vazbou ionty kovů izolují v neškodné formě a znemožňují tak jejich absorpci střevními buňkami. Například Cd se hromadí v methalothioneinových komplexech (zejména v ledvinách) po celý život.

Přebytek mědi se hromadí ve vazbě na methalothioneiny ve tkáních ovlivněných Wilsonovou chorobou. Expresi methalothioneinů zvyšují zejména hormony glukagon a kortizol, jakož i látky vyvolávající zánět a reakci v akutní fázi. Ačkoli methalothioneiny vážou hlavně ionty Zn, Cu a Cd, mohou také izolovat Hg, Ag nebo Ni. Cu je však vázána nejtěsněji a může tyto další ionty z vazby na bílkoviny vytěsnit. Jelikož ionty Zn a Cd nejsou tak reaktivní jako Cu, pokud jde o tvorbu kyslíkových radikálů, je vazba mědi na methalothionein pro buňku ochranná. Navíc se zdá, že komplex Cu – methalothionein vykazuje určitou aktivitu SOD a při absenci SOD indukuje expresi těchto ochranných bílkovin oxidační stres (Angelova et al. 2011, Tapiero et al. 2003).

### **2.6.3. Přítomnost mědi v potravě**

Obsah mědi v potravinách se liší podle místních podmínek. Její koncentrace v půdě závisí na používání hnojiv, baktericidů, fungicidů nebo také emisích mědi z hutí či sléváren. Tyto činnosti člověka ovlivňují obsah mědi v obilovinách, ovoci a zelenině a v menší míře i v masných a živočišných produktech (Bost et al. 2016).

Nejbohatšími zdroji mědi ve stravě jsou vnitřnosti, ústřice a čokoláda. Mléko není příliš dobrým zdrojem; mateřské mléko má však vyšší obsah mědi než mléko kravské (Lönnerdal 1989). Na druhé straně klesá koncentrace mědi v mateřském mléce s dobou laktace, tzn. že kolostrum a přechodné mléko mají nejvyšší hodnoty. Většina počáteční kojenecké výživy je doplněna mědí. Obsah mědi v kojeneckých výživách se liší v závislosti na potřebě dítěte (např. předčasně narozené má jiné potřeby). Obsah mědi v pitné vodě je také velmi variabilní a je ovlivněn přirozeným obsahem minerálů, pH vody a vodovodním systémem. Měkká, kyselá voda, zejména pokud je vedena přes měděné potrubí, má vyšší koncentraci mědi. Kromě toho se v některých zemích do potrubí přidávají soli mědi pro kontrolu růstu řas. Proto může měď v pitné vodě představovat důležitý zdroj mědi pro dospělou populaci. To vysvětluje, proč existuje jen málo důkazů o nedostatku mědi u dospělých, i když je spotřeba potravin bohatých na měď nízká. U kojenců může být podíl vody na příjmu mědi vyšší, protože kojenci konzumují proporcionálně více vody než dospělí (Olivares a Uauy 1996).

Cu je základní živina. Kojenecké období představuje jedno z nejkritičtějších období v životě, pokud jde o požadavky na Cu, protože rychlý růst zvyšuje nároky na Cu, zatímco strava založená na mléce poskytuje jen malé množství tohoto prvku. Ačkoliv



je nedostatek nejdůležitějším problémem v této fázi života, existuje také vysoké riziko toxických účinků spojených s neschopností zvládnout vyšší expozici Cu z důvodu nezralé funkce jater (Arredondo a Núñez 2005).

Obecně lze za dobré zdroje mědi považovat potraviny, jako jsou vnitřnosti, ořechy, obiloviny, ovoce, zatímco mléko a mléčné výrobky, jak bylo zmíněno, obsahují jen malé množství viz. Tab. 1 (Bost et al. 2016).

**Tab. 1** Obsah mědi ve vybraných potravinách

<b>Potravina</b>	<b>Obsah Cu (mg/kg)</b>
<b>Mléčné výrobky</b>	
Mléko	0.1–0.88
Čerstvý sýr	0.03
Tavený sýr	0.025
<b>Maso a vnitřnosti</b>	
Játra, hovězí	157
Ledviny, hovězí	2.1-4.3
Svalové maso, hovězí	0.1-1.8
Svalové maso, vepřové	0.1-9.1
<b>Cereální produkty</b>	
Kukuřičné produkty	0.6–16.6
Pšeničný chléb	2.9
Celozrnný pšeničný chléb	3.4
Celozrnné těstoviny	0.08-0.52
<b>Zelenina</b>	
Brambora	0.48-16.0
Mrkev	0.37-0.62
Brokolice	0.68-0.87
Hrášek	1.9-2.4
Listový salát	0.1-2.9
Rajče	0.1-3.4
Zelí	0.1-7.7
<b>Plody moře</b>	
Ústřice	0.3-16.0
Tuňák	0.1-1.2
Losos	0.5-0.8
Kreveta	2.0-2.9
Platýs	0.1-2.5
<b>Ovoce</b>	
Jablko	0.1-2.3
Banán	0.7-3.0
Pomeranč	0.8-0.9

Převzato a upraveno z Bost et al. (2016)

## 2.6.4. Farmakokinetika mědi

### Absorpce

Osud mědi v lidském těle je složitý a není zcela pochopen. Normální denní příjem mědi se pohybuje okolo 2 až 5 mg. Z tohoto množství se v žaludku a horní části duodena vstřebá asi 40-60 % (Silbernagl a Lang 2001).

Optimální množství mědi, které dospělý člověk denně potřebuje, je asi 0,9 mg. Neexistují žádné důkazy o tom, že vysoký dietní příjem mědi je problémem pro lidské zdraví (Angelova et al. 2011). Absorpce mědi je totiž ovlivněna právě dietním příjmem. Pokud je její příjem z potravy nízký, absorpce se zvyšuje. Naopak při vysokém příjmu mědi se absorpce snižuje nebo ustává (Collins et al. 2010).

Rychlost absorpce mědi je ovlivněna několika parametry, včetně věku, pohlaví, druhu potravy, množství Cu v potravě, a dokonce i perorálních kontraceptiv. Tyto parametry mohou způsobit, že se míra absorpce pohybuje mezi 12 a 71 % (Bost et al. 2016). Vliv věku a pohlaví na absorpci Cu u dospělých byl popsán ve studii Johnson et al. (1992). V rámci této studie bylo zjištěno, že u žen je absorpce Cu o 10 % vyšší než u mužů, a to zejména vlivem užívání ženských hormonů. U žen se také zvyšuje absorpce mědi během těhotenství a kojení. U mladých dospělých i seniorů byla absorpce podobná, zatímco u kojenců mnohem vyšší než u dvou výše zmíněných věkových skupin (Angelova et al. 2011, Lutsenko 2010).

### Distribuce

Po absorpci z trávicího ústrojí je měď transportována do jater. V portální žíle se z 95 % váže na ceruloplasmin – její hlavní transportní protein. Zbylé ionty mědi jsou vázány na albumin nebo aminokyseliny. Celkový obsah mědi v těle je asi 70–80 mg. Z toho je 10 % distribuováno v plazmě a krevních elementech a 90 % v tkáních. Koncentrace mědi v krvi se liší podle pohlaví; hodnoty pro muže se pohybují od 0,614 do 0,970 mg/l, u žen od 0,694 do 1,030 mg/l. Ženy mají tedy významně vyšší hladiny koncentrace mědi v krvi než muži. U zdravých mužů koncentrace mědi s věkem stoupá, kdežto u mužských kuřáků se množství mědi v krvi významně snižuje. Je zajímavé, že u žen toto neplatí. Dále bylo zjištěno, že zvýšená fyzická aktivita snižuje koncentraci mědi v séru. Silná

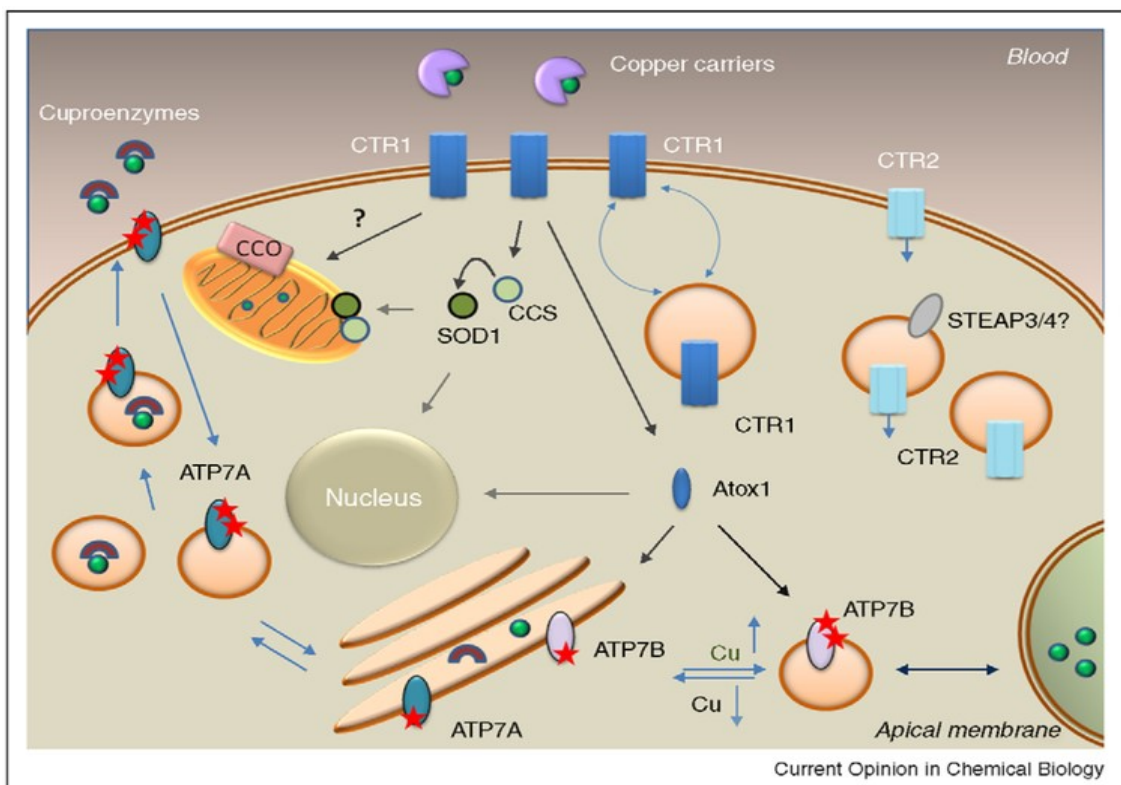
pozitivní korelace existuje mezi hladinou mědi v séru a indexem tělesné hmotnosti (BMI). To bylo prokázáno u velkého vzorku 2233 subjektů ve věku 15-65 let. (Angelova et al. 2011, Lutsenko 2010).

### **Intracelulární kinetika**

Klíčovou roli při absorpci mědi do organismu hraje transportér s vysokou afinitou k mědi CTR1. V buňkách se CTR1 nachází na dvou místech: na plazmatické membráně a v intracelulárních vezikulách. Toto rozmístění CTR1 je buněčně specifické. V játrech, ledvinách, placentě a mléčné žláze je dominantní umístění CTR1 v bazolaterální plazmatické membráně. Zde dochází k transportu mědi z oběhu, a to, s největší pravděpodobností, získáním mědi ze specifického nosiče. Ve střevě má CTR1 další úlohu. Usnadňuje její uvolňování z intracelulárních vezikul, čímž zajišťuje dostupnost mědi přijaté potravou pro její následné využití. V souladu s touto rolí je významná část CTR1 v enterocytech intracelulární a nachází se v blízkosti apikální membrány. Transport mědi uvnitř enterocytů, stejně jako v jiných buňkách, je zajištěn pomocí glutathionu a několika chaperonů (ATOX1, COX17 a CCS1), s jejichž pomocí může být Cu také začleněna do speciálních měď obsahujících proteinů. Intracelulární distribuce CTR1 je dynamická. Zvýšení koncentrace extracelulární mědi indukuje endocytózu CTR1 do vezikul (čímž se snižuje absorpce mědi přes membránu), zatímco snížení extracelulární mědi obnovuje hladiny CTR1 na plazmatické membráně. Kromě akutní modulace plazmatických hladin CTR1 je celkové množství CTR1 regulováno na úrovni mRNA v reakci na prodloužené změny stavu mědi. Homeostatická kontrola hladin mRNA v ustáleném stavu je ilustrována pozorováním, že exprese exogenního lidského CTR1 je doprovázena poklesem množství mRNA pro tento protein. Měď vstupuje do buňky, i když je CTR1 výrazně snížena, i když v tomto případě je množství vstupující mědi nedostatečné, aby plně podporovalo aktivitu enzymů závislých na mědi. Který protein nebo proces zprostředkovává absorpci mědi v nepřítomnosti CTR1, není jisté. Transportér mědi s nízkou afinitou CTR2 je převážně intracelulární a může zprostředkovávat uvolňování mědi z lysozomů nebo lysozomových kompartmentů pro opětovné využití. Malá část CTR2 je však detekována na plazmatické membráně a nadměrná exprese CTR2 je spojena se zvýšenou absorpcí mědi. Za určitých podmínek asi může být CTR2 inkorporován do plazmatické membrány, aby se usnadnil influx mědi.

Zda je CTR2 více přítomen na plazmatické membráně, když je CTR1 downregulován, zbývá prozkoumat (Lutsenko 2010).

CTR1 přijímá měď z extracelulárních transportérů mědi a přenáší ji do cytosolu. Chaperony pak měď distribuují pro syntézu specifických proteinů. CCS distribuuje měď pro syntézu SOD1 v cytosolu a mitochondriích, zatímco ATOX1 přenáší měď k sekreci a do jádra, zatímco soubor proteinů reguluje dodávání mědi pro cytochrom-c-oxidázu v mitochondrii. Měď transportující ATPázy (Cu-ATPázy) transportují měď a zprostředkovávají vylučování mědi sekvestrací přebytečné mědi ve váčcích, čímž udržují hladinu intracelulární mědi. Tento děj je spojen s fosforylací kinázou, která se zvyšuje v reakci na zvýšení hladiny mědi. Aktivita Cu-ATPáz, jejich posttranslační modifikace a intracelulární lokalizace jsou recipročně modulovány intracelulární mědí. Cu-ATPázy přijímají měď z ATOX1 a využívají energii hydrolýzy ATP k přenosu mědi k dalšímu využití jako je zabudování do enzymů závislých na mědi (Obr. 12).



**Obr. 12 Intracelulární kinetika mědi.**

CTR1, transportér s vysokou afinitou k mědi, přijímá měď (zelené kuličky) z extracelulárních nosičů mědi a přenáší ji do cytosolu; změny hladiny mědi vyvolávají reverzibilní přenos mezi plazmatickou membránou a intracelulárními vezikulami. CTR2, přenašeč mědi s nízkou afinitou, je převážně intracelulární, ale lze jej nalézt i na plazmatické membráně. Měď tedy vstupuje do intracelulárního prostředí, kde se o ni dělí jednotlivé chaperony (např. ATOX1, CCS), které ji přerozdělují jednotlivým organelám k dalšímu využití; CCS distribuuje měď do cytosolu a mitochondrií k tvorbě SOD1 (superoxiddismutázy), zatímco ATOX1

přenášá měď do jádra a na ATPázové přenašeče. ATP7A a ATP7B zajišťují vstup mědi do lumen Golgiho aparátu, kde následně dochází k jejímu zabudování do kuproenzymů. Soubor proteinů reguluje dodávání mědi do cytochrom-c-oxidázy (CCO) v mitochondrii. V případě zvýšené intracelulární hladiny mědi přenašeč ATP7A putuje ve váčcích k membráně a usnadňuje exkreci přebytečné mědi. Tento pohyb Cu-ATPáz je spojen s fosforylací kinázou (označenou hvězdami), která se aktivuje v reakci na zvýšení hladiny mědi. Převzato z Lutsenko (2010).

V reakci na zvýšení hladiny intracelulární mědi prochází Cu-ATPázy kinázou zprostředkovanou fosforylací a putují s mědí ve vezikulách do blízkosti buď bazolaterální (ATP7A) nebo apikální (ATP7B) membrány. Měď je následně z buňky exportována fúzí zprostředkovanou vezikulami. Metabolické faktory, které zvyšují absorpci mědi, taktéž zvyšují její transport Cu-ATPázami. Podobně jako u CTR1 je regulace endogenních Cu-ATPáz buněčně specifická. ATP7B je typická pro jaterní, střevních a placentární buňky, na rozdíl od buněk ledvin nebo vaječníků, což naznačuje, že v těchto buňkách je úlohou ATP7B buď udržovat nepřetržitý přísun mědi do kuproenzymů, nebo ji skladovat. V mnoha buňkách jsou společně exprimovány obě dvě Cu-ATPázy. Rozdělení jejich specifických rolí je nezbytné pro lepší pochopení homeostázy mědi v lidském organismu (Lutsenko 2010).

### **Distribuce a exkrece**

Pokud je měď přítomna v nadbytku, může být detoxikována vazbou s metalothioneinem nebo transportována do oběhu specifickým přenašečem (ATP7A). Portální žilou je měď transportována ve své oxidované formě, vázána na albumin,  $\alpha_2$ -macroglobulin nebo aminokyseliny. Tato měď je obecně označována jako volná nebo slabě vázaná. Před přijetím do jater přes transportér mědi, CTR1, by měla být měď znovu redukována. V játrech může být buď začleněna do ceruloplasminu nebo vyloučena do žluči. Oba tyto procesy jsou řízeny ATPázou (ATP7B). Ceruloplasmin váže 6 atomů mědi a jednou z jeho rolí je dodávat měď do periferních tkání. Měď v ceruloplasminu je obecně považována za pevně vázanou. Mohou ji ale uvolnit některé patologické faktory, například oxidační stres (Lutsenko et al. 2010, Jomova a Valko 2011).

Na základě koncentrace Cu v různých gastrointestinálních tekutinách bylo odhadnuto, že přibližně 2,5 mg Cu je denně vylučováno biliárním tokem a že ekvivalentní množství se vylučuje jinými gastrointestinálními sekrety, včetně slin, žaludeční šťávy nebo sekrecí z pankreatu (Bost et al. 2016).

Protože studie zkoumající homeostázu mědi naznačují, že denní ztráty Cu stolicí jsou stejného řádu jako její příjem potravou, lze dojít k závěru, že většina endogenní mědi vylučované do gastrointestinálního lumen je reabsorbována přes střevní epitel. Bylo prokázáno, že gastrointestinální sekrece mědi hraje hlavní roli při kontrole její homeostázy (Bost et al. 2016, Turnlund et al. 1988, Turnlund et al. 2005). Ve srovnání s fekálním vylučováním mědi (0,45-2,46 mg/den), je její vylučování močí nízké (10–25 µg/den). Přestože byla popsána tubulární reabsorpce Cu zahrnující ATP7 protein, neexistují důkazy o tom, že by vylučování mědi močí hrálo v kontrole homeostázy významnou roli (Bost et al. 2016).

### **2.6.5. Patologické stavy spojené s nadbytkem či nedostatkem mědi**

Hladina mědi musí být pečlivě regulována, protože narušení homeostázy mědi na systémové nebo místní úrovni má různé patofyziologické důsledky. Jako příklad systémového narušení homeostázy lze uvést genetické poruchy člověka, konkrétně Wilsonovu a Menkesovu chorobu. Relativní (lokální) porucha homeostázy mědi je spojena s mnoha patologiemi, zejména s neurodegenerativními onemocněními, nádory, zánětlivými onemocněními nebo akutním infarktem myokardu (Angelova et al. 2011, Weiskirchen et al. 2019).

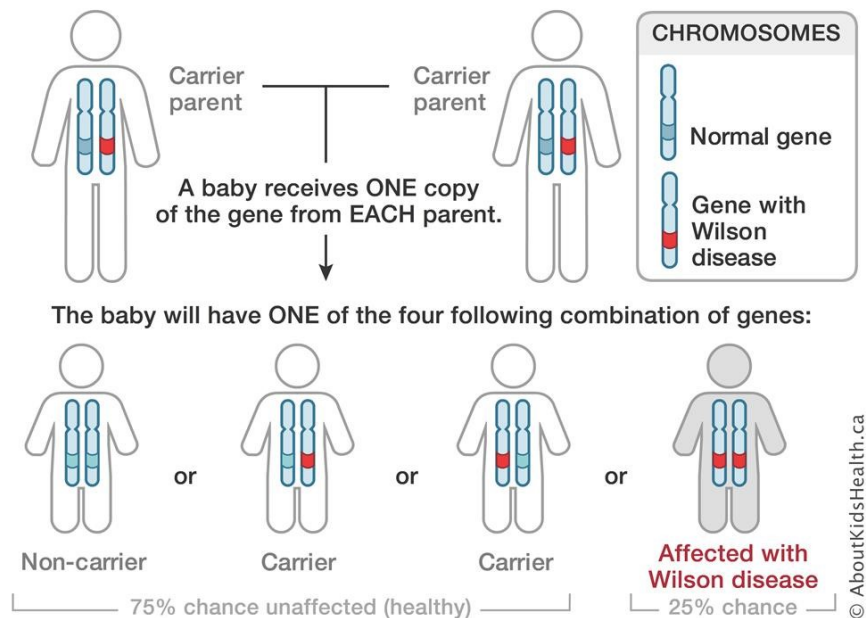
#### **Nadbytek mědi**

Jedná se o potenciálně velmi nebezpečný stav. Volná měď má schopnost potencovat tvorbu reaktivních kyslíkových látek (ROS) a tím podporovat oxidační stres (Jomova a Valko 2011). Sérové hladiny mědi jsou vyšší například u pacientů s cholestázou, při zvýšeném ceruloplasminu v případě zánětů, nádorů, lymfomů, u jaterní cirhózy, myeloidní leukemie nebo u výše zmíněné Wilsonovy choroby (Angelova et al. 2011).

#### ***Wilsonova choroba***

Wilsonova choroba (WD, z angl. Wilson's disease), známá také jako hepatolentikulární degenerace, je vzácná autozomálně recesivní porucha (Obr. 13), při které dochází k narušení metabolismu mědi. Prvním, kdo v roce 1912 toto onemocnění popsal byl Kinnier Wilson. Důsledkem tohoto patologického stavu je hromadění mědi a toxické

poškození buněk především v játrech a mozkové tkáni, ale také v ledvinách, očích, kloubech a jiných orgánech. V některých případech může velké množství mědi zničit mnoho červených krvinek, což vede k těžké anémii (Angelova et al. 2011, Crisponi et al. 2010).



**Obr. 13 Autozomálně recesivní porucha.** WD trpí asi jeden ze 30 000 lidí. Nejčastěji se vyskytuje u Východoevropanů, Sicilanů a jižních Italů. Pokud má člověk jednu kopii tohoto genu, je nositelem nemoci. Tento gen nese asi jeden ze 100 lidí. K rozvoji onemocnění se musí narodit dítě se dvěma kopiemi genu. Pokud gen pro WD nesou oba rodiče, existuje 25 % pravděpodobnost, že jejich dítě onemocní. WD se obvykle objevuje u lidí mladších 20 let. U dětí je diagnostikována zřídka před dosažením věku čtyř let. Mladší děti totiž málokdy vykazují jakékoli příznaky. Převzato z www stránky iniciativy AboutKidsHealth (2020).

Příznaky Wilsonovy choroby se obvykle objevují ve věku 5-6 let. Významným diagnostickým indikátorem hromadění mědi v oku je Kayserův-Fleischerův prstenec (Obr. 14).



**Obr. 14** Kayserův-Fleischerův prstenec. Převzato z www stránky Wilson's Disease (2020).



Neurologické příznaky provázející toto onemocnění zahrnují abnormality chování, třes rukou, nejasnou řeč nebo výraz masky v obličeji. Jakmile se příznaky objeví, obvykle rychle postupují. Diagnóza onemocnění je potvrzena nízkými hladinami proteinu ceruloplasminu, zvýšeným vylučováním mědi močí, vysokými hladinami mědi v játrech nebo potvrzením genetického defektu (Angelova et al. 2011).

Velký průlom v patogenezi WD se odehrál v roce 1993, kdy vědci objevili spojitost mezi vznikem tohoto onemocnění a mutací genu kódujícího enzym ATP7B na chromozomu 13. Enzym ATP7B (Wilsonova ATPáza) funguje jako transmembránový přenašeč atomů mědi. V játrech, klíčovém orgánu metabolismu mědi, je ATP7B exprimován hlavně v Golgiho aparátu hepatocytů, kde zabudovává atomy mědi do kuproenzymů. ATP7B je také lokalizován na žlučovém pólu hepatocytů, což usnadňuje vylučování mědi do žluči. Vlivem mutace jsou tyto funkce ATP7B omezeny. Měď se hromadí v játrech, což vede k chronické hepatitidě, a nakonec cirhóze jater. V důsledku toho mohou stoupat hladiny volné mědi v séru, což má za následek akumulaci mědi v centrálním nervovém systému, v rohovce, v ledvinách a v dalších orgánech. Ztráta funkce proteinu ATP7B je zodpovědná za poruchu inkorporace atomů mědi do apoceruloplasminu, což má za následek snížení hladiny ceruloplasminu v krvi u většiny pacientů s WD. Nízké sérové hladiny feroxidázy ceruloplasminu mohou navíc způsobit závažné změny v metabolismu železa (Crisponi et al. 2010, Pavelková et al. 2018, Veldhuis et al. 2009, Weiskirchen et al. 2019).

V Bulharsku byla provedena retrospektivní studie, která analyzovala klinický a laboratorní profil 13 pacientů s WD po dobu 12 let. K nástupu klinických příznaků patřily převážně neurologické projevy (61,5 %). U 54 % pacientů existovaly klinické a laboratorní důkazy o jaterní cirhóze. Kayserův-Fleischerův prstenec byl pozorován v 69 % případů. Sérová koncentrace ceruloplasminu byla snížena u 92 % pacientů, vylučování mědi močí bylo zvýšeno u 92 % pacientů a volná měď v séru byla zvýšena u všech pacientů. Bylo zjištěno, že hladina mědi v játrech u WD byla asi 25krát vyšší než u zdravých jedinců (Tankova et al. 2007).

Pokud je WD diagnostikována včas, lze ji léčit mnoha různými způsoby (použitím chelatačních činidel, dietou s nízkým příjmem Cu a vysokým příjmem doplňků zinku). Lékem první volby u mírných forem WD je zinek (ve formě  $ZnSO_4$  nebo  $(CH_3COO)_2Zn$ ); částečně blokuje absorpci Cu indukci methalothioneinu, který váže Cu v buňkách sliznice, dokud nejsou deskvamovány a eliminovány. Zinek je navíc netoxická tělu

vlastní látka. Na druhou stranu vykazuje příliš pomalý účinek, což je, zejména v akutní fázi toxicity Cu s neurologickými příznaky, nevyhovující. Proto se v těchto případech používají chelatační činidla D-penicilamin a trientin a zkouší se tetrathiomolybdenan. Posledně jmenovaný vytváří komplexy s bílkovinami ve stravě a Cu, díky čemuž je Cu netoxická. Následně jsou pacienti léčeni udržovací zinkovou terapií. Jsou nutná souběžná dietní omezení, například vyhýbání se potravinám s vysokým obsahem mědi (čokoláda, ústřice, houby aj.). Díky včasné diagnostice a léčbě mohou pacienti s WD žít normálním životem (Pavelková et al. 2018).

### ***Idiopatická Cu – toxikóza***

Tato vzácná porucha je dědičné genetické onemocnění metabolismu Cu, nazývané také indická dětská cirhóza. Vyznačuje se abnormálně vysokými hladinami Cu v játrech, normálními nebo zvýšenými plazmatickými koncentracemi Cu a ceruloplasminu, klinickým nástupem cirhózy ve věku okolo 2 let a smrtí do 5 let. Včasné zahájená léčba D-penicilaminem obnoví jaterní buňky, čímž předchází fatálním následkům (Pavelková et al. 2018).

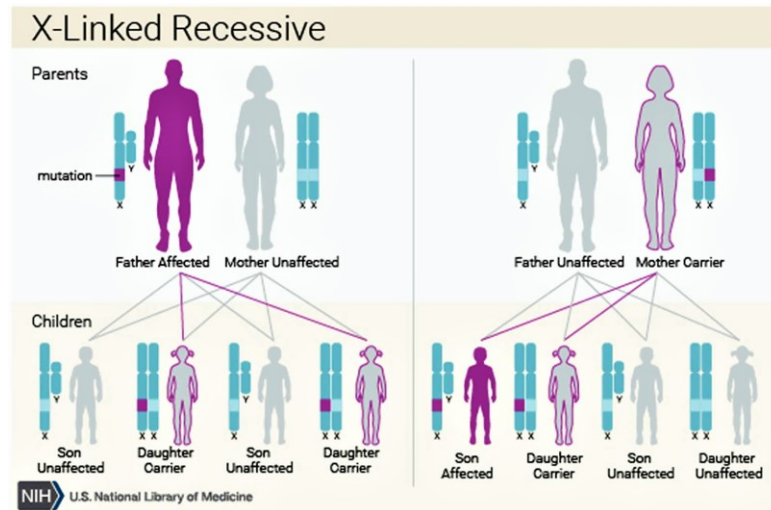
### **Nedostatek mědi**

Nedostatek mědi může být následkem vyjádření dědičné vady, jako je Menkesova choroba. Klinickými projevy nedostatku mědi jsou anémie, neutropenie a kostní abnormality. Dalšími méně častými projevy jsou hypopigmentace vlasů, hypotonie, zhoršený růst, zvýšený výskyt infekcí, kolísání fagocytární kapacity neutrofilů, narušení metabolismu cholesterolu a glukózy a kardiovaskulární alterace (Olivares a Uauy 1996).

V několika studiích autoři dospěli k závěru, že mezi zdravotní stavy, ve kterých se nachází abnormálně nízké koncentrace mědi patří Parkinsonova choroba, zhoršená střevní resorpce, pacienti s parenterální výživou, pacienti ztrácející bílkoviny (například se syndromem nefrózy, exsudativní enteropatie atd.) (Angelova et al. 2011).

## **Menkesova choroba**

Menkesova choroba (MD, z angl. Menkes disease) je vzácné onemocnění spojené s chromozomem X (Obr. 15), způsobené mutací genu kódujícího enzym ATP7A (Menkesovu ATPázu). Vyskytuje se hlavně u chlapců a v raném dětství je často smrtelná. Celkový výskyt MD je uváděn jako jeden na 100 000–250 000 porodů (Angelova et al. 2011, Pavelková et al. 2018, Caicedo-Herrera 2018).



**Obr. 15 Menkesova choroba. X-vázaný recesivní vzor dědičnosti.**

Onemocnění je vázáno na chromozom X. Pokud je otec nemocný a matka zdravá, jejich dcery budou přenašečky a synové zdraví. Tzn., že mají 50 % šanci na zcela zdravého potomka a z 50 % potomka, který sice nese chybný gen, ale onemocněním sám trpět nebude. V případě, že chybný gen nese matka, pravděpodobnost, že budou mít nemocného syna, dceru přenašečku, zdravého syna nebo zdravou dceru je ve všech případech stejná, konkrétně 25 %. Převzato z Blogu HealthJade (2020).

Typickými příznaky jsou mentální retardace, neurologické abnormality, slabý svalový tonus (Obr. 16), ochablé rysy obličeje a degenerace pojivové tkáně (kvůli nedostatku několika enzymů závislých na Cu potřebných pro vývoj mozku). Snížená aktivita cytochrom-c-oxidázy vede k závažné neurologické poruše. Nedostatek tyrosinázy způsobuje nedostatek melaninu, který se projevuje hypopigmentovanými vlasy s ocelovým vzhledem (Obr. 16). Křehké a kudrnaté vlasy („syndrom kudrnatých vlasů“) způsobuje nedostatek neidentifikovaného kuproenzymu potřebného pro zesíťování keratinu viz. Obr. 17. (Angelova et al. 2011, Pavelková et al. 2018).



**Obr. 16** Slabý svalový tonus u dětí postižených MD.  
Převzato z www stránky University of Florida Health (2020).



**Obr. 17** Menkesova choroba - „Syndrom kudrnatých vlasů“.  
Převzato z www stránky Indian Pediatrics (2020).

Léčba se provádí intravenózním podáním komplexu Cu-histidin. Včasná diagnóza a denní injekce Cu-histidinu intraperitoneálně a intratekálně do centrálního nervového systému by však mohly zabránit neurodegeneraci a prodloužit život (Angelova et al. 2011, Pavelková et al. 2018).

K hodnocení stavu mědi se v současné době používá měření koncentrací mědi a ceruloplazminu v séru. Tyto parametry jsou sníženy u těžkého až středního nedostatku mědi; jsou však méně citlivé na hraniční nedostatek mědi. Faktory s menší výpovědní hodnotou pro hodnocení mezního deficitu mědi jsou aktivita erytrocytární superoxiddismutázy nebo destičkového cytochromu C (Olivares a Uauy 1996).

### ***Měď a další neurodegenerativní choroby***

Porucha homeostázy Cu vedoucí k oxidačnímu stresu a tvorbě volných radikálů přispívá k rozvoji Alzheimerovy a Creutzfeldt-Jakobovy choroby. Rovněž je popsán vztah mezi Cu, rozvojem Parkinsonovy a Huntingtonovy choroby. Pokud je dysregulace Cu příčinou nebo důsledkem těchto neurodegenerativních onemocnění, mohla by se zde uplatnit nová léčiva. (Pavelková et al. 2018).

### ***Měď a rakovina***

U rakoviny jsou koncentrace Cu (a současně ceruloplasminu) téměř vždy významně zvýšeny (2–3krát), zatímco koncentrace zinku, železa a selenu jsou významně sníženy. Koncentrace Cu v séru korelují s vývojem nádoru, jeho velikostí, výskytem, progresí a recidivou a lze říci, že maligní nádory mají často vyšší koncentrace Cu. Produkce ROS a oxidační stres jsou pravděpodobně hlavními mechanismy podílejícími se na vývoji rakoviny. Kromě toho Cu indukuje proliferaci a migraci endotelových buněk aktivací různých angiogenních faktorů (např. endoteliální růstový faktor, základní fibroblastový růstový faktor, faktor nekrózy nádoru a interleukin 1). Výsledkem je tvorba nových krevních cév, protože nádory vyžadují bohatý přísun kyslíku a živin. Tvorbu nového krevního oběhu lze zvrátit chelatačními činidly, jako je D-penicilamin, tetrathiomolybdenan, cliochinol a trientin. Tyto látky pak mají antiangiogenní účinky, ale jejich použití ještě není v této indikaci schváleno a je předmětem klinických studií (Pavelková et al. 2018).

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem této rigorózní práce bylo:

- 1) zjistit, zda jsou flavanony (konkrétně hesperidin, hesperetin, naringin a naringenin) schopny chelatovat ionty mědi
- 2) sledovat vztah chelatace k pH prostředí, ve kterém testování probíhá. pH hodnoty byly vybrány s ohledem na patofyziologické hodnoty v lidském organismu.

## 4. METODIKA

### 4.1. Testované flavanony

- Hesperidin
- Hesperetin
- Naringin
- Naringenin, byly zakoupeny ze *Sigma-Aldrich (USA)*.

### 4.2. Chemikálie

- Hematoxylin, *Sigma-Aldrich (USA)*
- Pentahydrát síranu měďnatého ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ), *Sigma-Aldrich (USA)*
- Dimethylsulfoxid (DMSO), *Lach-Ner (ČR)*
- Disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny (BCS), *Sigma-Aldrich (USA)*
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA), *Sigma-Aldrich (USA)*
- Acetátové pufrý o pH 4,5 a 5,5 byly připraveny jako vodné roztoky octanu sodného a kyseliny octové (15 mM), tj. 15 mM octanu sodného a 27,3 nebo 2,7 mM kyseliny octové, respektive. HEPES pufrý o pH 6,8 a 7,5 byly připraveny jako vodné roztoky HEPES 71,7 nebo 14,3 mM, respektive, a jeho sodné soli (15 mM), chemikálie na jejich přípravu byly opět od *Sigma-Aldrich (USA)*.

### 4.3. Pomůcky

- Mikrotitrační destičky, *Brand (Německo)*
- Automatické pipety různých objemů, *Brand (Německo)*
- Vícekanálové pipety různých objemů, *Biohit (Finsko)*

### 4.4. Přístroje

- Analytické váhy (KERN ABT120-5DM, Kern, *Německo*)
- Spektrofotometr (SYNERGY HT Multi-detection microplate reader, BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, *USA*)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky (IKA<sup>®</sup> MS 3 digital; IKA-Werke GmbH & Co. KG, *Německo*)

- Třepačka na zkumavky (IKA® VORTEX GENIUS 3; IKA-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (KRAINTEK®; Kraittek Czech s.r.o., ČR)

## 5. VLASTNÍ CHELATAČNÍ METODIKA

### 5.1. Stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem

#### 5.1.1. Příprava základních roztoků

- **5 mM roztok měďnatých iontů ( $\text{Cu}^{2+}$ )**

Roztok byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého ( $M_w = 249,69 \text{ g/mol}$ ) v destilované vodě. Roztok je stabilní a byl uchováván v lednici.

- **5 mM hematoxylin**

Roztok byl připraven rozpuštěním hematoxylinu ( $M_w = 302,28 \text{ g/mol}$ ) v DMSO. Tento roztok byl použitelný maximálně 5 hodin.

#### 5.1.2. Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky

- **Testovaná látka**

Roztok testovaných flavanonů jsme připravili jejich rozpuštěním v DMSO. Testované látky byly nejdříve ředěny na 10 mM koncentraci, později stejným rozpouštědlem na nižší koncentrace.

- **Roztok  $\text{Cu}^{2+}$  iontů**

Připravili jsme 250  $\mu\text{M}$  roztok měďnatých iontů v destilované vodě.

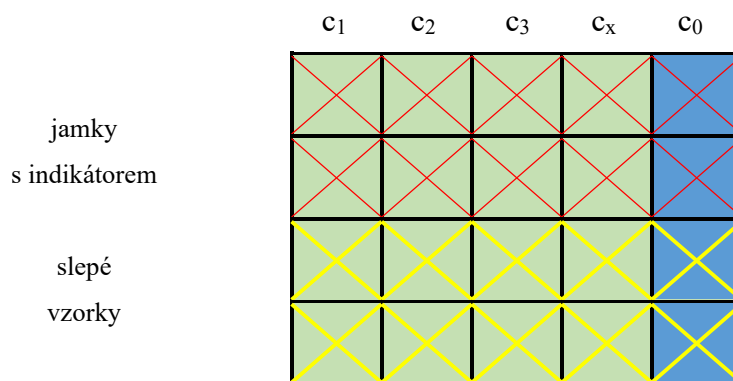
- **Hematoxylin**

Připravili jsme 250  $\mu\text{M}$  roztok v DMSO. Tento roztok se mohl používat maximálně 90 min. Po uplynutí této doby jej bylo nutné znovu naředit.



### 5.1.3. Stanovení chelatace měďnatých iontů v pufru (pH 7,5; 6,8 a 5,5)

Při tomto stanovení jsme napipetovali příslušný pufr (100  $\mu\text{l}$ ) a roztok  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (50  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{M}$ ) do všech jamek mikrotitrační destičky (Obr.18). Jamky této destičky jsme si rozdělili na jamky testovací a jamky kontrolní. Do testovacích jsme přidali roztok testovaného flavanonu v různých koncentracích a do kontrolních rozpouštědlo DMSO. Míchali jsme 2 minuty. V dalším kroku jsme do první poloviny jamek přidali roztok hematoxylinu (jamky s indikátorem, 50  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{M}$ ) a do druhé poloviny rozpouštědlo DMSO (50  $\mu\text{l}$ , slepé vzorky). Následovalo opětovné míchání, tentokrát po dobu 3 minut. Poté jsme měřili absorbanci. První měření se odehrálo ihned po sejmutí ze třepačky (tzn. v čase 3 min), druhé v čase 7 min. Absorbanci jsme měřili při různých vlnových délkách, a to v závislosti na pH pufru. Při 610 nm (pH 7,5), 590 nm (pH 6,8) a při 595 nm (pH 5,5) podle dříve publikované metodiky Říha et al. (2013). Výsledky jsme zaznamenali do tabulek a data vyhodnotili matematickou a statistickou analýzou.



Obr. 18 Schematické znázornění chelatačních experimentů.

Zelené jamky – testovací jamky s roztoky testovaných flavanonů různé koncentrace ( $c_1, c_2, c_3, c_x$ )

Modré jamky – kontrolní jamky s rozpouštědlem ( $c_0 = 0$ )

#### Konečný obsah jamky:

100 $\mu\text{l}$	pufr
50 $\mu\text{l}$	roztok $\text{Cu}^{2+}$
50 $\mu\text{l}$	roztok testovaného flavanonu nebo rozpouštědlo (DMSO)
50 $\mu\text{l}$	roztok hematoxylinu nebo DMSO

## 5.2. Stanovení chelatace iontů mědi BCS

### 5.2.1. Příprava základních roztoků

- **5 mM roztok měďnatých iontů ( $\text{Cu}^{2+}$ )**

Roztok byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého ( $M_w = 249,69 \text{ g/mol}$ ) v destilované vodě. Roztok je stabilní a byl uchováván v lednici.

- **5 mM roztok měďných iontů ( $\text{Cu}^+$ )**

Roztok byl připraven rozpuštěním  $\text{CuCl}$  ( $M_w = 98,99 \text{ g/mol}$ ) nebo  $\text{CuBr}$  ( $M_w = 143,45 \text{ g/mol}$ ) ve vodném roztoku  $0,1 \text{ M HCl}$  a  $1 \text{ M NaCl}$ . Roztok je stabilní a byl uchováván v lednici.

- **100 mM hydroxylamin hydrochlorid (HA)**

Roztok byl připraven rozpuštěním hydroxylamin hydrochloridu ( $M_w = 69,49 \text{ g/mol}$ ) v destilované vodě. Roztok je stabilní a byl uchováván v lednici.

- **5 mM disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny (BCS)**

Roztok byl připraven rozpuštěním BCS ( $M_w = 564,54 \text{ g/mol}$ ) v destilované vodě. Roztok je stabilní a byl uchováván v lednici.

### 5.2.2. Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky

- **Testovaná látka**

Roztok testovaných flavanonů jsme připravili jejich rozpuštěním v DMSO. Testované látky byly nejdříve ředěny na  $10 \text{ mM}$  koncentraci, později stejným rozpouštědlem na nižší koncentrace.

- **Roztoky měďných ( $\text{Cu}^+$ ) a měďnatých iontů ( $\text{Cu}^{2+}$ )**

Připravili jsme  $250 \text{ }\mu\text{M}$  roztoky  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů naředěním jejich  $5 \text{ mM}$  zásobních roztoků v DMSO.

### 5.2.3. Stanovení chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů v pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5)

Při tomto stanovení jsme do všech jamek mikrotitrační destičky napipetovali 100  $\mu\text{l}$  příslušného pufru. Následně jsme do testovacích jamek přidali 50  $\mu\text{l}$  roztoku testovaného flavanonu v různých koncentracích a do jamek kontrolních 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla (DMSO). Poté jsme opět do všech jamek napipetovali 50  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (250  $\mu\text{M}$ ). Míchali jsme 2 minuty. Po skončení míchání jsme přidali 50  $\mu\text{l}$  roztoku HA – 1 mM (pH 7,5 a 6,8) nebo 10 mM (pH 5,5 a 4,5). Tento krok byl nezbytný ke zredukování nezreagovaných měďnatých iontů na měďné ionty. Opět jsme míchali, tentokrát 1 minutu. V dalším kroku jsme do první poloviny jamek napipetovali 50  $\mu\text{l}$  5 mM BCS (jamky s indikátorem) a do druhé poloviny destilovanou vodu (50  $\mu\text{l}$ , slepé vzorky). Měřili jsme absorbanci při 484 nm ihned a po 5 minutách. Schéma bylo stejné jako v případě hematoxylinu (Obr.18), jen se lišil použitý indikátor.

#### **Konečný obsah jamky:**

100 $\mu\text{l}$	pufr
50 $\mu\text{l}$	roztok testovaného flavanonu nebo rozpouštědlo
50 $\mu\text{l}$	roztok $\text{Cu}^{2+}$
50 $\mu\text{l}$	roztok HA
50 $\mu\text{l}$	roztok BCS nebo voda

#### 5.2.4. Stanovení chelatace $\text{Cu}^+$ iontů v pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5)

Do všech jamek mikrotitrační destičky jsme napipetovali 100  $\mu\text{l}$  příslušného pufru. Poté jsme přidali 50  $\mu\text{l}$  1 mM (pH 6,8 a 7,5) nebo 10 mM (pH 4,5 a 5,5) roztoku HA. Následně jsme napipetovali 50  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Cu}^+$  iontů v DMSO (250  $\mu\text{M}$ ) a nechali míchat 1 minutu, aby byl zajištěn redukovaný stav měďných iontů. Po ukončení míchání jsme přidali do testovacích jamek 50  $\mu\text{l}$  roztoku testovaného flavanonu příslušné koncentrace a do kontrolních jamek 50  $\mu\text{l}$  rozpouštědla (DMSO). Míchali jsme 2 minuty. Nakonec jsme přidali 50  $\mu\text{l}$  5 mM roztoku BCS do první poloviny jamek (jamky s indikátorem) a 50  $\mu\text{l}$  vody do druhé poloviny jamek (slepé vzorky). Měřili jsme absorbanci ihned a po 5 minutách při 484 nm. Schéma se opět nelišilo od předchozích experimentů (Obr.18).

##### **Konečný obsah jamky:**

100 $\mu\text{l}$	pufr
50 $\mu\text{l}$	roztok HA
50 $\mu\text{l}$	roztok $\text{Cu}^+$
50 $\mu\text{l}$	roztok testovaného flavanonu nebo rozpouštědlo
50 $\mu\text{l}$	roztok BCS nebo voda

## 6. MATEMATICKÁ A STATISTICKÁ ANALÝZA

### 6.1. Výpočet účinnosti chelatace

Chelatační aktivita testovaných flavanonů byla stanovena na základě naměřené absorbance ( $A_x$ ). Nejdříve byla u každého vzorku odečtena absorbance slepých vzorků (Rovnice 1), tedy vzorků obsahujících místo indikátoru pouze rozpouštědlo (v případě BCS vodu, v případě hematoxylinu DMSO). Absorbance slepých vzorků ( $A_{SLX1}$ ,  $A_{SLX2}$ ) byly zprůměrovány.

$$\Delta A_x = A_x - [(A_{SLX1} + A_{SLX2}) / 2] \quad (\text{Rovnice 1})$$

Stejný postup byl aplikován jak na zkoušené koncentrace testovaných látek, tak na každou pozitivní kontrolu ( $\Delta A_{PK}$ , Rovnice 2), tedy vzorky, kde místo testované látky bylo podáno jen rozpouštědlo DMSO.

$$\Delta A_{PK} = A_{PK} - [(A_{SLX1} + A_{SLX2}) / 2] \quad (\text{Rovnice 2})$$

Množství zbylého (nezchelatovaného) kovu (% x) bylo pak stanoveno z poměru čisté absorbance testované látky ( $\Delta A_x$ ) k průměru pozitivních kontrol ( $\Delta A_{PK1}$ ,  $\Delta A_{PK2}$ , Rovnice 3).

$$\% x = 100 \{ \Delta A_x / [(\Delta A_{PK1} + \Delta A_{PK2}) / 2] \} \quad (\text{Rovnice 3})$$

Množství zchelatovaného kovu % CHEL bylo pak dopočítáno do 100 % od množství zbylého kovu (Rovnice 4).

$$\% \text{ CHEL} = 100 - \% x \quad (\text{Rovnice 4})$$

Na závěr byly výsledky zprůměrovány a jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka vypočtená podle vzorce v rovnici 5.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (\text{Rovnice 5})$$

## 6.2. Výpočet stability chelatace

Vzhledem k malé chelataci naměřené metodikou BCS byl výpočet stability komplexů proveden jen u výsledků hematoxylinové metody. Stabilita (ST) byla stanovena jako poměr chelatace po 7 minutách vs. chelatace po 3 minutách (Rovnice 6).

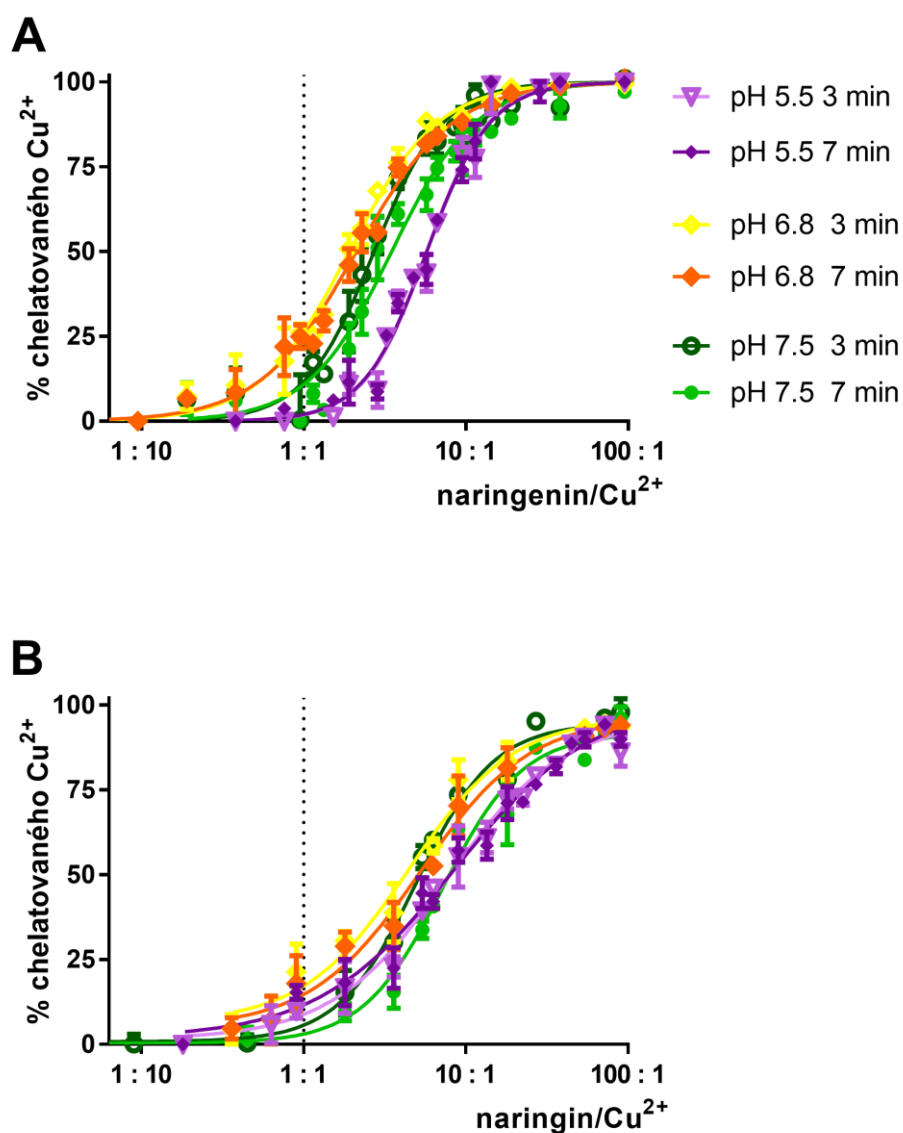
$$ST = \% CHEL_{7\ min} / \% CHEL_{3\ min} \quad (\text{Rovnice 6})$$

## 6.3. Statistická analýza

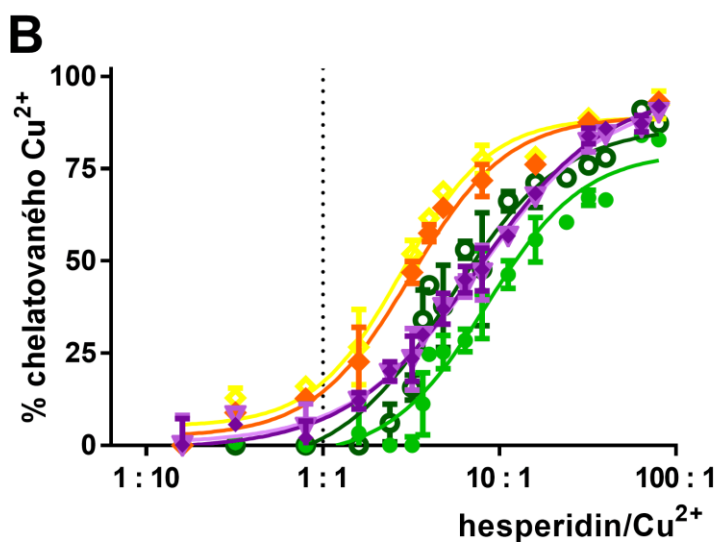
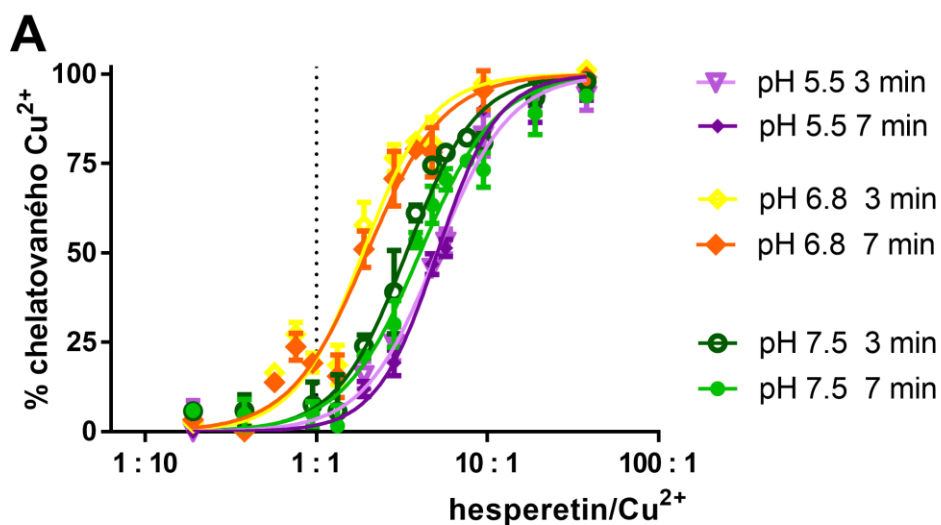
Porovnání účinnosti chelatace bylo provedeno pomocí 95 % konfidenčních intervalů sestavených v programu GraphPad Prism verze 8 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA).

## 7. VÝSLEDKY

Nejdříve jsme provedli screening chelatace iontů mědi ( $\text{Cu}^{2+}$ ) za méně kompetitivních podmínek, tj. za použití hematoxylinu. Všechny testované látky měď chelatovaly, ale jejich chelatační účinky byly poměrně slabé. Při poměru 1:1 dosáhly všechny látky maximálně 25 % chelatace, a to jen při pH 6,8. U ostatních pH byla tato účinnost ještě nižší. Významná chelatace byla pozorována teprve při vyšších poměrech. Většina látek dosáhla v poměru 100:1 prakticky kompletní chelatace (Obr. 19-20).



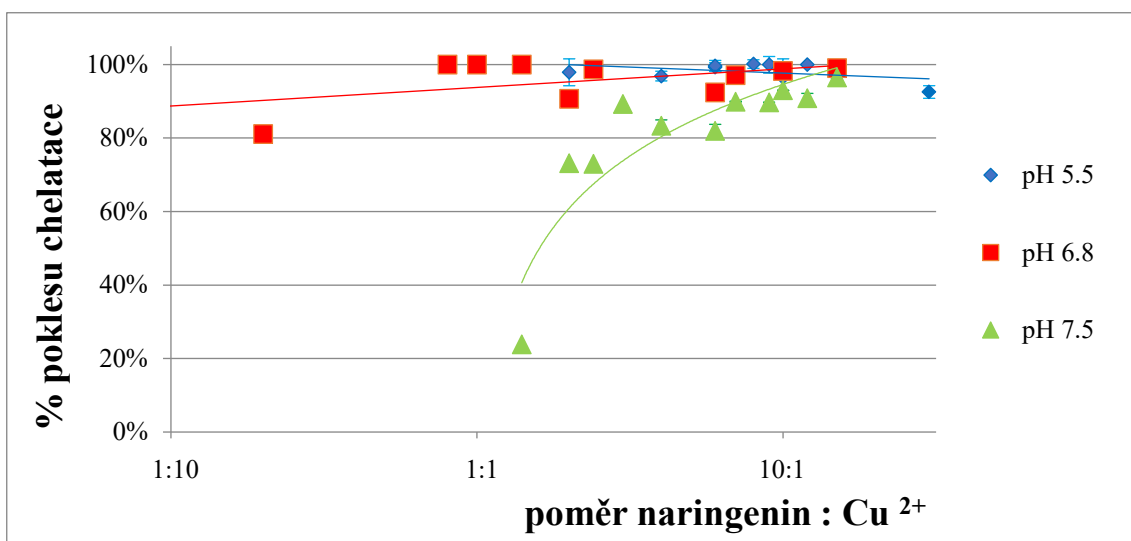
**Obr. 19** Chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  naringeninem (A) a naringinem (B) při všech testovaných pato/fyziologických pH za použití hematoxylinu jako indikátoru.



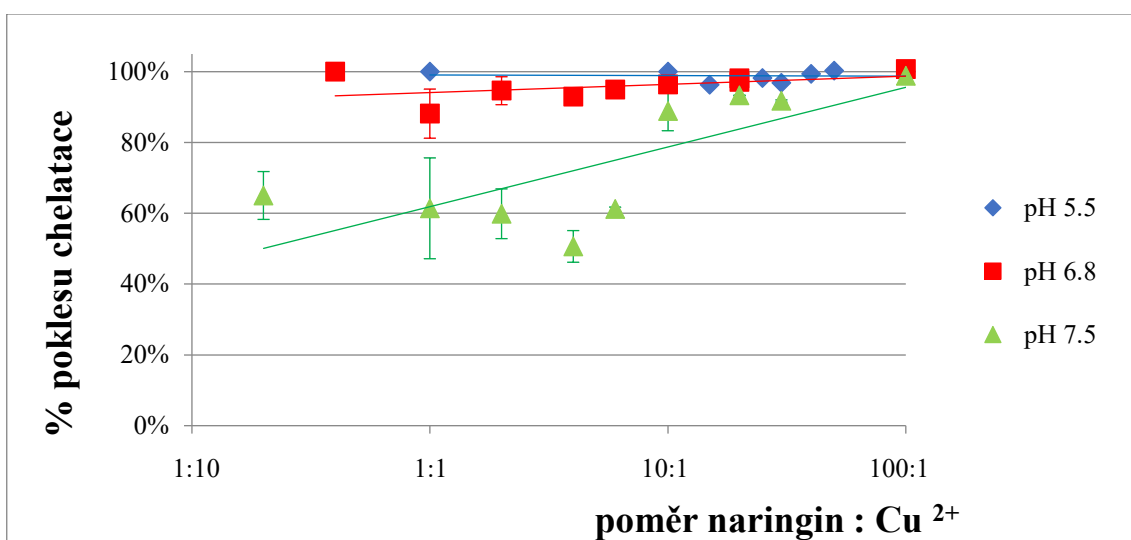
**Obr. 20** Chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  hesperetinem (A) a hesperidinem (B) při všech testovaných pato/fyziologických pH za použití hematoxylinu jako indikátoru.

Vzhledem ke zjevným poklesům chelatace v měření po 7 minutách jsme ještě tyto poklesy graficky zpracovali (Obr. 21-24). Při pH 5,5 byly vzniklé komplexy velmi stabilní s výjimkou hesperetinu, kde byl zaznamenán určitý pokles. Při pH 6,8 byla pozorována u všech komplexů mírná nestabilita, a to zejména v nižších poměrech. Při pH 7,5 stabilita komplexů úměrně klesala se snižujícím se poměrem flavanonu k mědi, a to u všech testovaných látek.

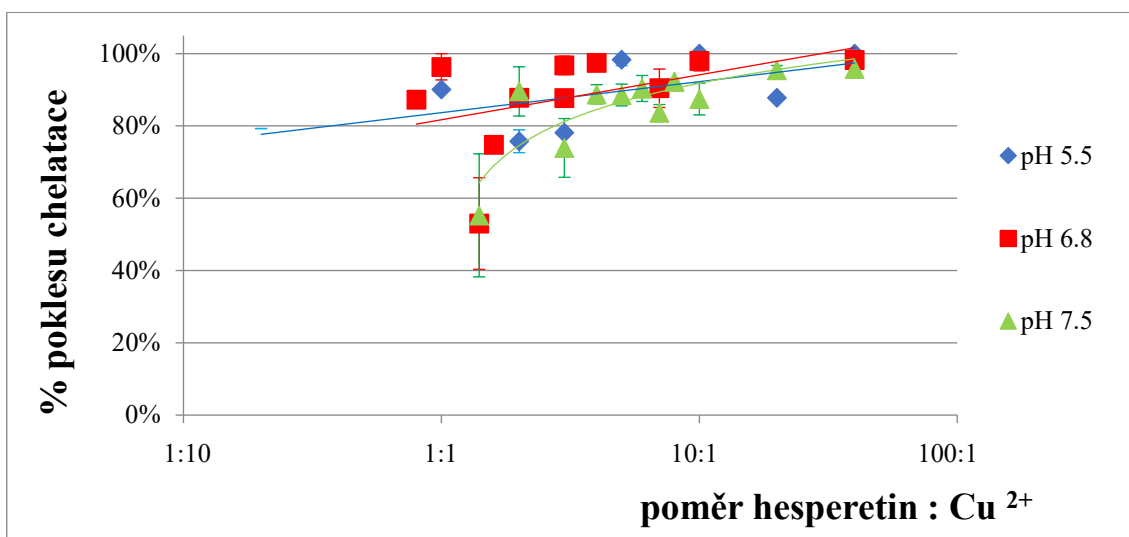




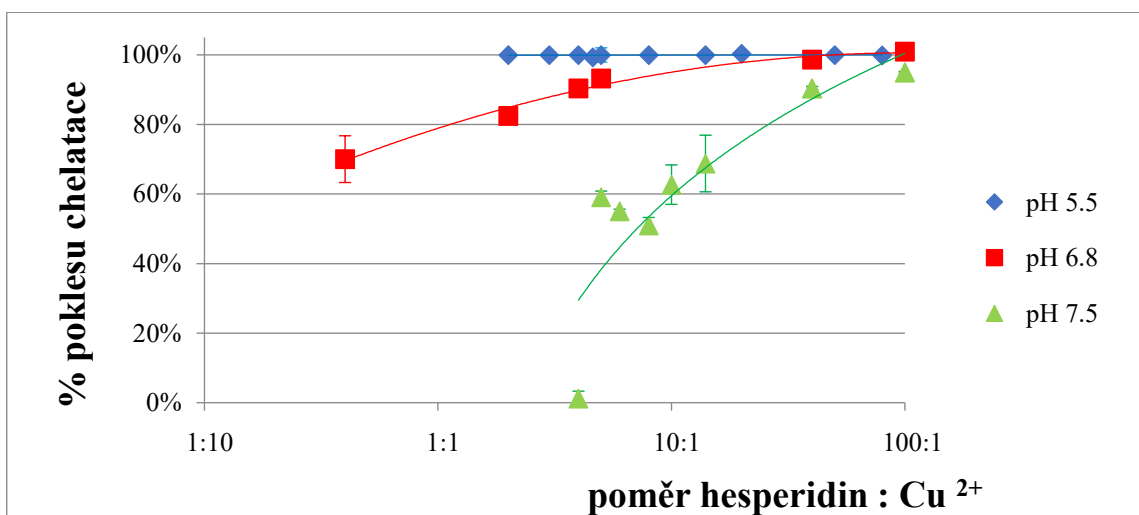
**Obr. 21** Pokles chelatace Cu<sup>2+</sup> naringeninem při různých pato/fyziologických pH mezi prvním měřením a měřením po 7 min za použití hematoxylinu jako indikátoru.



**Obr. 22** Pokles chelatace Cu<sup>2+</sup> naringeninem při různých pato/fyziologických pH mezi prvním měřením a měřením po 7 min za použití hematoxylinu jako indikátoru.

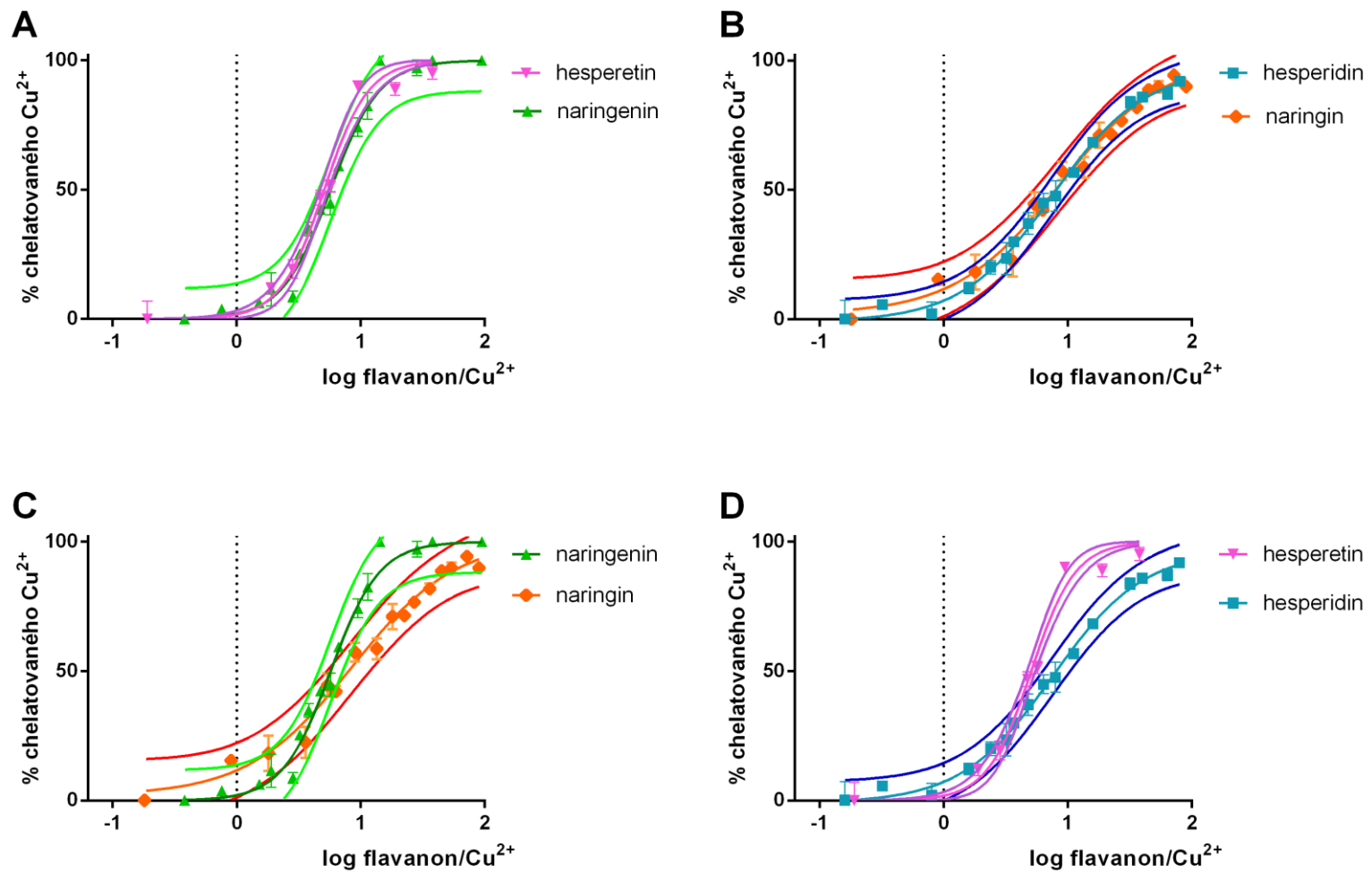


**Obr. 23** Pokles chelatace Cu<sup>2+</sup> hesperetinem při různých pato/fyziologických pH mezi prvním měřením a měřením po 7 min za použití hematoxylinu jako indikátoru.

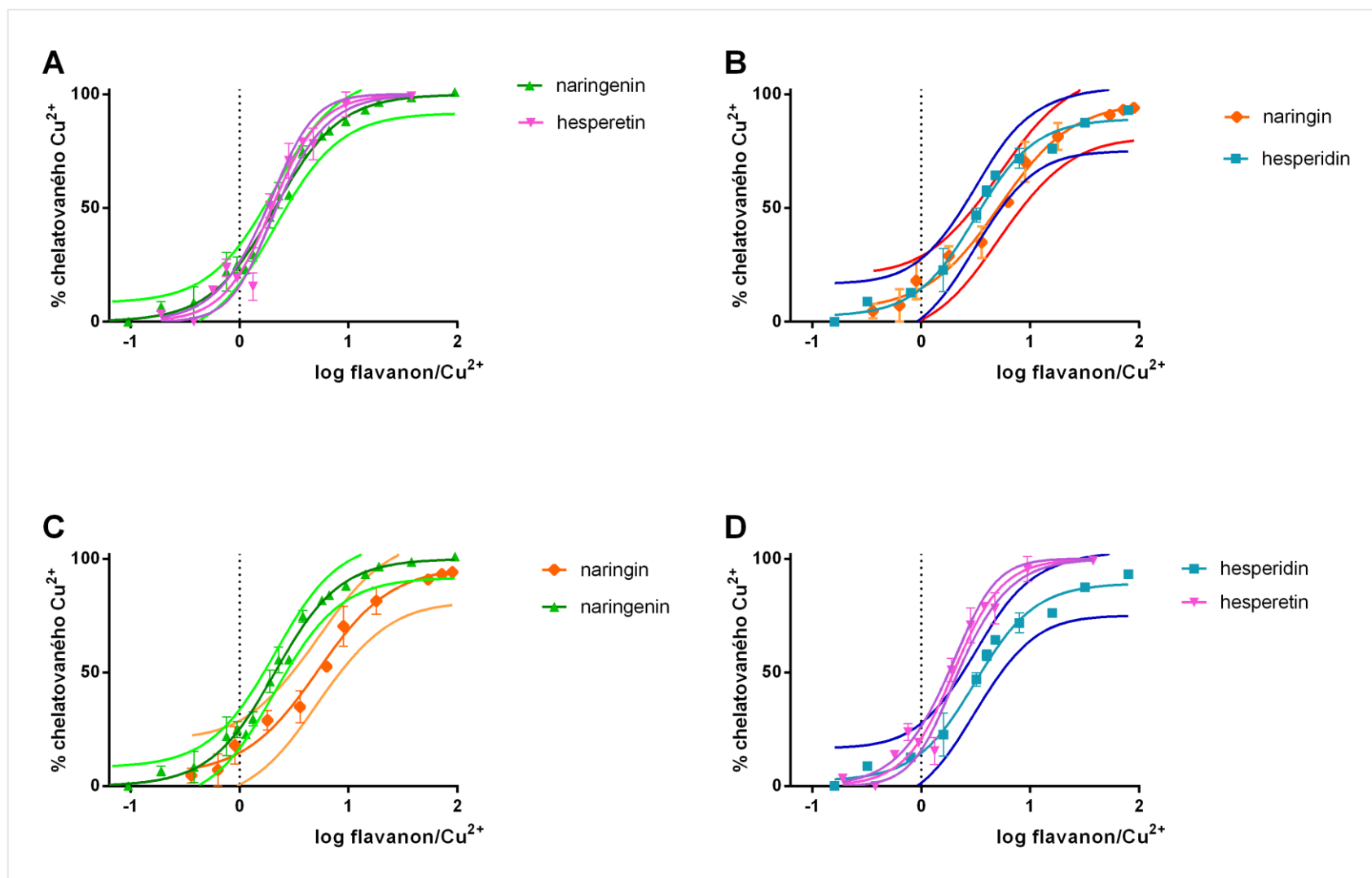


**Obr. 24** Pokles chelatace Cu<sup>2+</sup> hesperidinem při různých pato/fyziologických pH mezi prvním měřením a měřením po 7 min za použití hematoxylinu jako indikátoru.

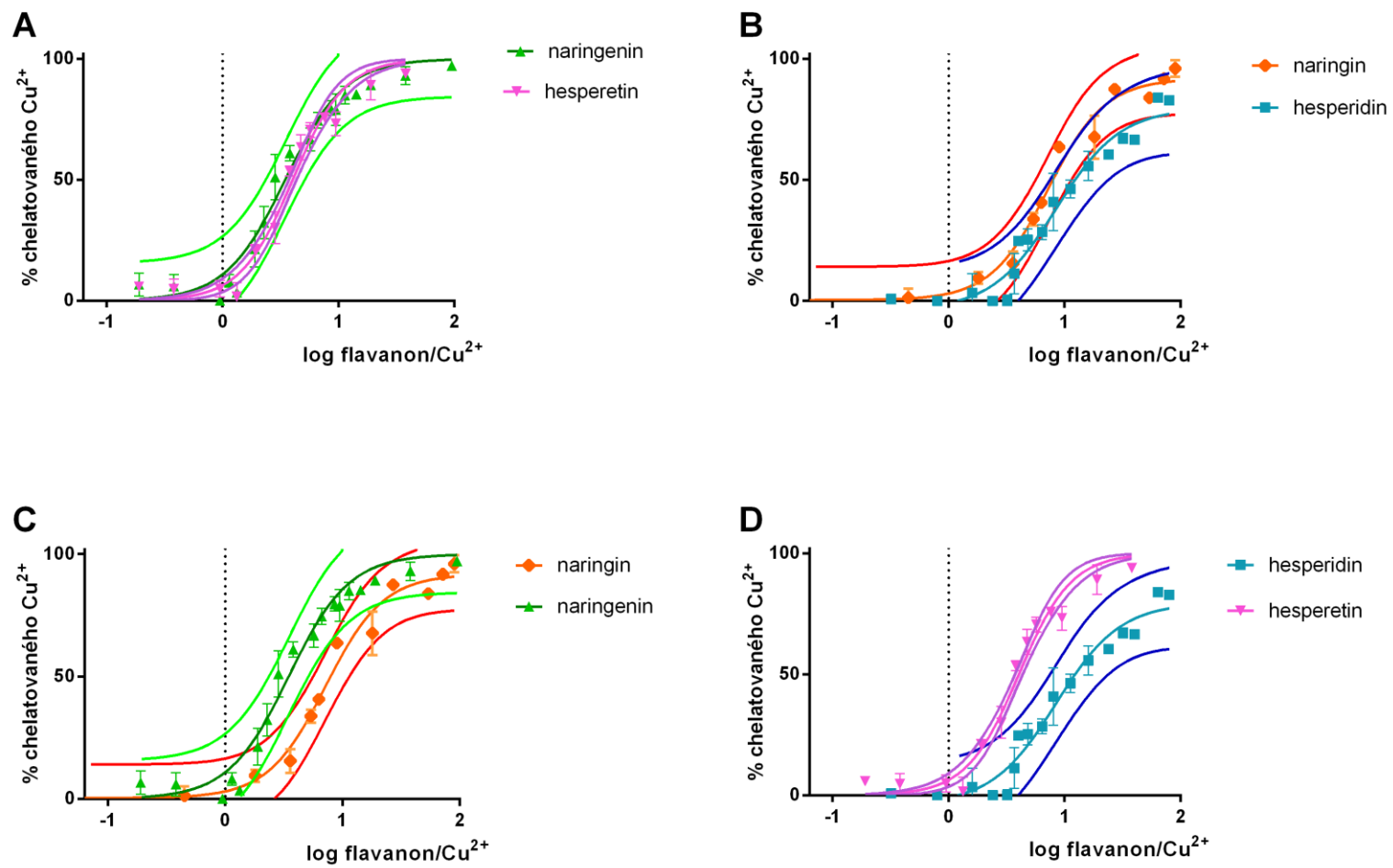
V dalším kroku jsme provedli porovnání výsledků chelatace po 7 minutách pomocí 95 % konfidenčních intervalů. Při všech pH byly rozdíly mezi aglykony a jejich odpovídajícími glykosidy (tj. naringenin *vs.* naringin a hesperetin *vs.* hesperidin), ale ne mezi glykosidy (naringin *vs.* hesperidin) nebo aglykony (naringenin *vs.* hesperetin) navzájem (Obr. 25-27).



**Obr. 25** Porovnání účinnosti chelatace testovaných flavanonů při pH 5,5 u měření po 7 minutách. Graf zobrazuje 95 % konfidenční intervaly.

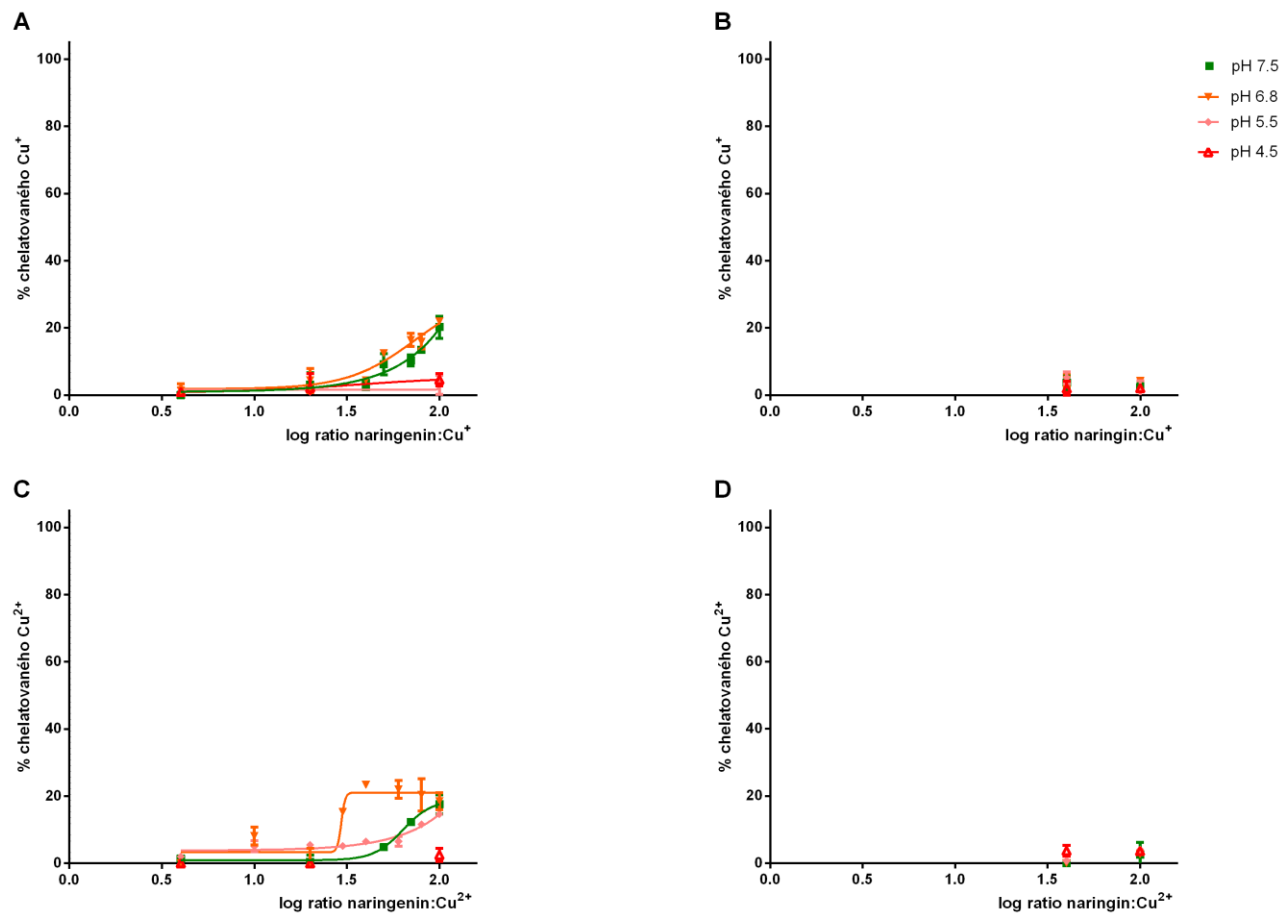


Obr. 26 Porovnání účinnosti chelatace testovaných flavanonů při pH 6,8 u měření po 7 minutách. Graf zobrazuje 95 % konfidenční intervaly.



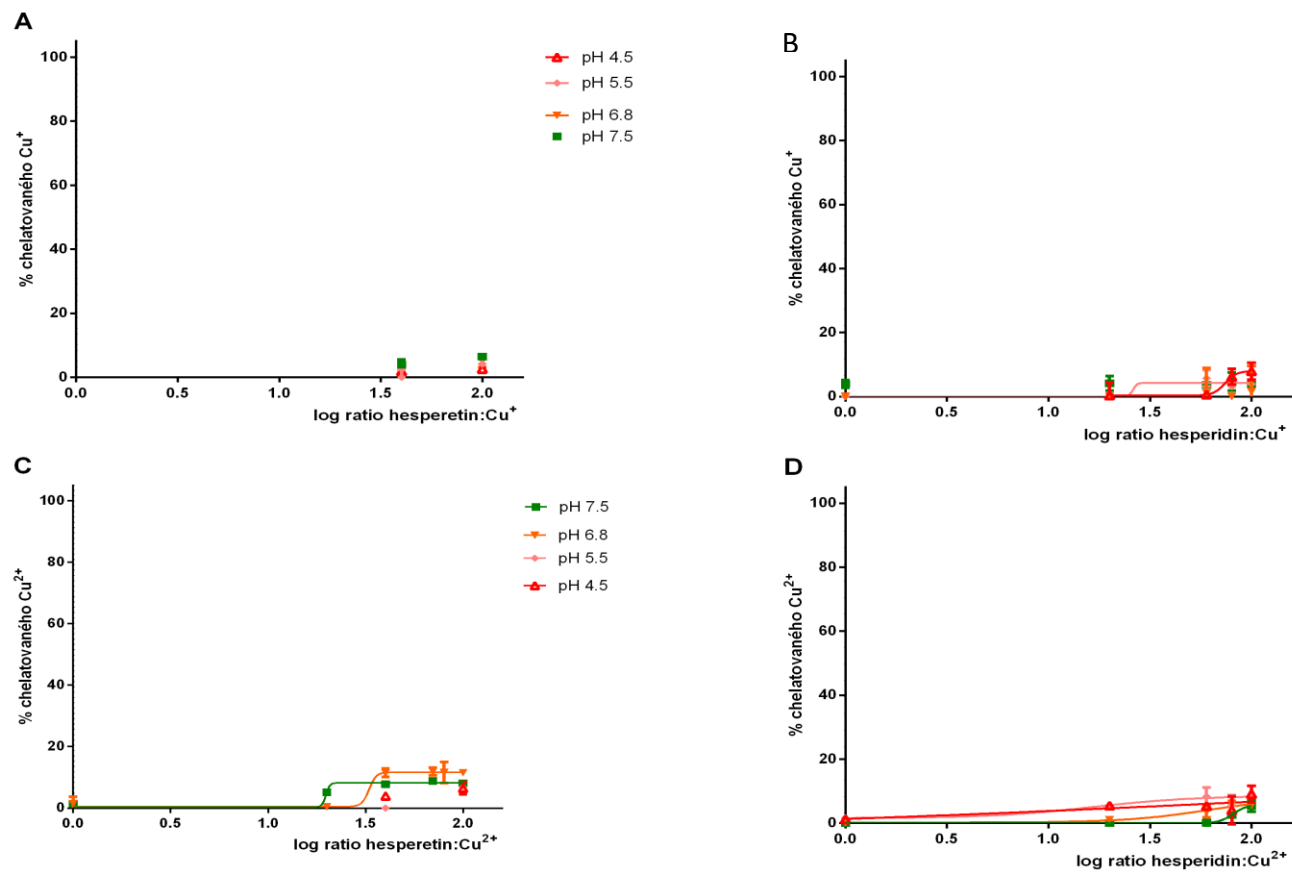
**Obr. 27** Porovnání účinnosti chelatace testovaných flavanonů při pH 7,5 u měření po 7 minutách. Graf zobrazuje 95 % konfidenční intervaly.

V posledním kroku jsme ověřili jejich účinky ve velmi kompetitivním prostředí za použití 5 mM roztoku indikátoru BCS. Ukázalo se, že tyto látky jsou slabými chelátory. U aglykonů byla naměřena chelatace měďnatých iontů, která nedosahovala více než 25 % při poměru 100:1. U glykosidů nebyla pozorována prakticky žádná chelatace. V případě měďných iontů byla i u aglykonů pozorována jen zanedbatelná chelatace (Obr. 28-29).



**Obr. 28** Chelatace a) měďných iontů flavonoidním aglykonem naringeninem, b) měďných iontů glykosidem naringeninem, c) měďnatých iontů flavonoidním aglykonem naringeninem, d) měďnatých iontů glykosidem naringeninem za použití BCS jako indikátoru. Údaje jsou z měření po 5 minutách.



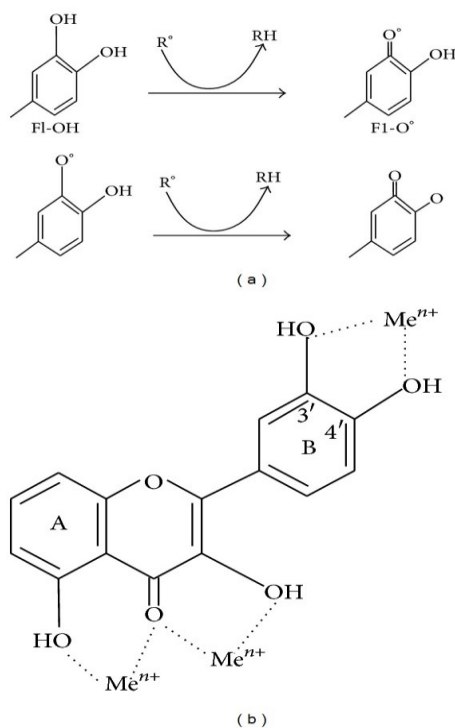


**Obr. 29** Chelatace a) měďných iontů flavonoidním aglykonem hesperetinem, b) měďných iontů glykosidem hesperidinem, c) měďnatých iontů flavonoidním aglykonem hesperetinem, d) měďnatých iontů glykosidem hesperidinem za použití BCS jako indikátoru. Údaje jsou z měření po 5 minutách.

## 8. DISKUSE

V této rigorózní práci jsme zkoumali, zda jsou flavanony schopny chelatovat ionty kovů, konkrétně mědi. Zjistili jsme, že všechny zkoumané látky, jmenovitě hesperidin, hesperetin, naringin a naringenin vlastnost chelatovat měď mají. Jedná se však o slabé chelátory. To je dobře vidět při porovnání výsledků z mírného chelatačního prostředí (hematoxylin, Obr.19, 20) a velmi kompetitivního prostředí (BCS, Obr. 28, 29). Zatímco v prvním případě tyto látky chelatovaly 100 % mědi, ve druhém případě maximálně 10 %.

Díky své schopnosti chelatovat ionty kovů (měď, železo atd.) inhibují flavonoidy tvorbu volných radikálů. Tyto vlastnosti podstatně ovlivňuje konfigurace, substituce a celkový počet hydroxylových skupin v jejich struktuře. Stopové kovy se vážou na specifické pozice různých kruhů flavonoidních struktur (Heim et al. 2002). Nejdůležitějšími chelatačními místy jsou skupiny 3-hydroxy-4-keto, 5-hydroxy-4-keto a 3', 4'-dihydroxy tj. katecholový kruh B viz. Obr. 30 (Kumar a Pandey 2013, Říha et al. 2014).



**Obr. 30** Vychytávání ROS (znázorněny schematicky jako R•) flavonoidy (Fl-OH) (a) a vazebná chelatační místa pro stopové kovy (b), kde Me<sup>n+</sup> značí ionty kovu. Převzato z Kumar a Pandey (2013).

V našem případě přichází v úvahu jen pozice 4-keto-5-hydroxy, která má podle předchozích studií s železem menší potenciál chelátovat kovové ionty (Mladěnka et al. 2011). Navíc vzhledem k velmi výraznému rozdílu v chelataci hematoxylinem a BCS je také možnost falešně pozitivního výsledku, který může někdy metodika s hematoxylinem u antioxidantů poskytnout (Macáková et al. 2019). Flavonoidy s nenasycenou vazbou 2-3 v konjugaci s funkcí 4-oxo jsou skutečně účinnými antioxidanty, a to dokonce více než flavonoidy bez těchto znaků, jelikož vychytávání volných radikálů je přítomností obou těchto funkčních skupin potencováno. Předpokládá se, že hydroxylové skupiny kruhu B tvoří vodíkové vazby s 3-OH skupinou. Díky této intramolekulární vodíkové vazbě je vliv 3-OH skupiny zvýšen přítomností 3',4'-katecholu, což objasňuje silnou antioxidační aktivitu flavonoidů, které tyto skupiny mají (Heim et al. 2002).

Je zajímavé, že hydroxylové skupiny v kruhu B mohou představovat i nevýhodu, která byla prokázána ve vysoce konkurenčním prostředí s BCS. Katecholový kruh nezlepšil chelataci. Naopak spíše schopnost chelátovat měď zhoršil. Pravděpodobné vysvětlení tohoto negativního účinku na chelataci spočívá v současné redukci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. V silně kompetitivním prostředí BCS nejsou flavonoidy s vysoce redukčními vlastnostmi schopny měď v komplexu zadržet, jelikož afinita indikátoru k měďným iontům je vyšší. Redukce mědi je vysoce závislá na počtu hydroxylových skupin v kruhu B, čímž je chelatace mědi zásadně ovlivněna (Říha et al. 2014).

O-methylace hydroxylových skupin flavonoidů, jako je v našem případě u testovaných flavanonů, snižuje jejich schopnost vychytávat radikály. Výskyt, poloha, struktura a celkový počet cukerných složek ve flavonoidu (flavonoidní glykosidy) hrají také důležitou roli v antioxidační aktivitě. Aglykony jsou účinnější antioxidanty než jejich odpovídající glykosidy a ačkoli jsou glykosidy obvykle slabšími antioxidanty, jejich biologická dostupnost je někdy zvýšena glukózovou skupinou. Ve stravě se flavonoidní glykosidické skupiny vyskytují nejčastěji v poloze 3 nebo 7 (Heim et al. 2002).

Cukr na pozici 7 ve flavanonech výrazně snižuje potenciál chelatace mědi. Chelatační schopnost klesá také se zvyšující se kyselostí prostředí. S výrazným poklesem chelatační aktivity je dále spojena substituce volné hydroxylové skupiny v poloze 3. Naopak přítomnost sousedních hydroxylových skupin v kruhu A chelatační účinnost zvyšuje (Heim et al. 2002, Kumar a Pandey 2013, Říha et al. 2014). Tyto strukturální modifikace ale nebyly v této práci testovány.

V každém případě jasný důkaz o chelataci může podat přímá spektrofotometrie – změna absorpčního spektra flavanonů po přidavku mědi. Tato metodika ale není schopna ukázat na afinitu chelátoru, tak jako zmíněné kompetitivní metodiky. Dostupné studie ale ukazují, že přidavek mědi k naringeninu vede ke změně absorpčního spektra a výsledky z této studie jsou tedy potvrzeny (Celiz et al. 2019). Nejde o falešnou pozitivitu, ale testované látky jsou skutečně schopny chelatovat měď, přestože se jedná o slabé chelátory. Praktické využití těchto látek jako chelátorů je nepravděpodobné.

## 9. ZÁVĚR

Za pomoci spektrofotometrických metod potvrdila tato rigorózní práce schopnost testovaných flavanonů chelátovat ionty mědi. Všechny testované látky, ať už aglykony či glykosidy ionty mědi bez výjimky chelatovaly. Zjistili jsme, že se jedná o slabé chelátory, které kovové ionty vážou díky své 4-keto-5-hydroxy skupině.

Dále jsme prokázali, že jsou aglykony účinnějšími chelátory než jejich odpovídající glykosidy, a to při všech testovaných pato/fyziologicky významných hodnotách pH.

I když byly měď chelatuující vlastnosti flavanonů prokázány, je uplatnění testovaných látek jako chelátorů mědi v praxi vzhledem k jejich slabě chelatačním vlastnostem nepravděpodobné.

## **10. LITERATURA A ZDROJE**

### **10.1. Knihy**

1. Minařík J. Farmakognosie. Vyd. 1. Praha: Avicenum; 1979.
2. Silbernagl S, Lang F, Cerman J. Atlas patofyziologie člověka. Vyd. 1. české. Praha: Grada; 2001.
3. Spilková J, Lang F, Cerman J. Farmakognosie. Vyd. 1. české. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum; 2016.
4. Velíšek J, Lang F, Cerman J. Chemie potravin. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS; 2002.

### **10.2. Články a periodika**

5. Angelova M, Asenova S, Nedkova V, Koleva-Kolarova R. Copper in the human organism. *Trakia J Sci.* 2011; 9. 88-98.
6. Arredondo M, Núñez MT. Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med.* 2005;26(4-5):313-327.
7. Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol.* 2016;35:107-115.
8. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-333.
9. Caicedo-Herrera G, Candelo E, Pinilla J, Vidal A, Cruz S, Pachajoa HM. Novel ATP7A gene mutation in a patient with Menkes disease. *Appl Clin Genet.* 2018; 11:151-155.

10. Celiz G, Suarez SA, Arias A, Molina J, Brondino CD, Doctorovich F. Synthesis, structural elucidation and antiradical activity of a copper (II) naringenin complex. *BioMetals*. 2019; 32(4):595-610.
11. Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr Rev*. 2010;68(3):133-147.
12. Crisponi G, Nurchi VM, Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Faa G. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. *Coord Chem Rev* 2010;254(7-8):876-889.
13. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 2007;43(4):348-361.
14. Fernandez MT, Mira ML, Florêncio MH, Jennings KR. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem*. 2002;92(2):105-111.
15. Fornasaro S, Ziberna L, Gasperotti M, et al. Determination of cyanidin 3-glucoside in rat brain, liver and kidneys by UPLC/MS-MS and its application to a short-term pharmacokinetic study. *Sci Rep*. 2016;6:22815.
16. Galhardi CM, Diniz YS, Faine LA, et al. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food Chem Toxicol*. 2004;42(12):2053-2060.
17. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):572-584.
18. Jain P, Kannan L, Chakrabarty B, et al. Menkes disease – An important cause of early onset refractory seizures. *J Pediatr Neurosci*. 2014;9(1):11-16.

19. Johnson PE, Milne DB, Lykken GI. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *Am J Clin Nutr.* 1992;56(5):917-925.
20. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011;283(2-3):65-87.
21. Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7381-7385.
22. Khan MK, Zill-E-Huma, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J Food Compos Anal.* 2014;33(1):85-104.
23. Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. *Molecules.* 2019;24(6):1076.
24. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal.* 2013; 2013:162750.
25. Kumar S, Mishra A, Pandey AK. Antioxidant mediated protective effect of *Parthenium hysterophorus* against oxidative damage using in vitro models. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:120.
26. Lönnerdal B. Trace element absorption in infants as a foundation to setting upper limits for trace elements in infant formulas. *J Nutr.* 1989;119(12 Suppl):1839-1845.
27. Lutsenko S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr Opin Chem Biol.* 2010;14(2):211-217.
28. Macáková K, Catapano MC, Tvrđý V, Klimková K, Karlíčková J, Mladěnka P. Hematoxylin assay of cupric chelation can give false positive results. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;52:29-36.



29. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* 2002;36(11):1199-1208.
30. Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipský T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Rad Biol Med.* 2010;49(6):963-975.
31. Mladěnka P, Macáková K, Filipský T, et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem.* 2011;105(5):693-701.
32. Nam HK, Hong SH, Shin KC, Oh DK. Quercetin production from rutin by a thermostable  $\beta$ -rutosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Lett.* 2012;34(3):483-489.
33. Olivares M, Uauy R. Copper as an essential nutrient. *Am J Clin Nutr.* 1996;63(5):791S-6S.
34. Raffa D, Maggio B, Raimondi MV, Plescia F, Daidone G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *Eur J Med Chem.* 2017; 142:213-228.
35. Pavelková M, Vysloužil J, Kubová K, Vetchý D. Biological role of copper as an essential trace element in the human organism. *Biologická role mědi jako základního stopového prvku v lidském organismu.* *Ceska Slov Farm.* 2018; 67(4):143–153.
36. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res.* 1995;22(4):375-383.

37. Říha M, Karličková J, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *J Inorg Biochem.* 2013;123:80-87.
38. Su C, Haskins AH, Omata C, Aizawa Y, Kato TA. PARP Inhibition by Flavonoids Induced Selective Cell Killing to BRCA2-Deficient Cells. *Pharmaceuticals.* (Basel). 2017;10(4):80.
39. Tankova L, Stoikov S, Todorov T, Piriouva E, Bolest na Willson – retrospektiven klinichen analis. *Suvremenna medicina.* 2007;58(1):12-13.
40. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(9):386-398.
41. Turnlund JR, Keyes WR, Peiffer GL, Scott KC. Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope  $^{65}\text{Cu}$ . *Am J Clin Nutr.* 1998;67(6):1219-1225.
42. Turnlund JR, Keyes WR, Kim SK, Domek JM. Long-term high copper intake: effects on copper absorption, retention, and homeostasis in men. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(4):822-828.
43. Veldhuis NA, Gaeth AP, Pearson RB, Gabriel K, Camakaris J. The multi-layered regulation of copper translocating P-type ATPases. *Biometals.* 2009;22(1):177-190.
44. Weiskirchen S, Kim P, Weiskirchen R. Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Spectrometry: Metal Imaging in Experimental and Clinical Wilson Disease. *Inorganics.* 2019;7(4):54.

### 10.3. Internetové odkazy

45. Blog HealthJade; Menkes Disease. Menkesova choroba X-vázaný recesivní vzor dědičnosti, dostupné na URL: <https://healthjade.net/menkes-disease/>, přístup 11.10.2020
46. Iniciativa AboutKidsHealth. Dostupné na URL: <https://www.aboutkidshealth.ca/Article?contentid=881&language=English>, přístup 11.10. 2020
47. www stránky Indian Pediatrics. Menkes Kinky Hair. Dostupné na URL: <https://www.indianpediatrics.net/jan2016/jan-86.htm>, přístup 22.10. 2020
48. www stránky Oregon State University. Flavonoids. Dostupné na URL: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>, přístup 11.10. 2020
49. www stránky University of Florida Health. Menkes Disease. Hypotonia. Dostupné na URL: <https://ufhealth.org/menkes-disease>, přístup 11.10.2020
50. www stránky Wilson's Disease association. Dostupné na URL: <https://wilsonsdisease.org/about-wilson-disease/kayser-fleischer-rings> , přístup 11.10.2020