

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**MĚD A JEJÍ PATO/FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM V LIDSKÉM
ORGANISMU**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Klára Bechná

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsem uvedla v seznamu použité literatury a v práci řádně citovala. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“

Hradec Králové 15. 5. 2013

Na tomto místě bych ráda poděkovala lidem, bez jejichž pomoci by má práce nemohla být realizována. Velké poděkování patří vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za jeho trpělivost, podporu, inspiraci, nadhled a mnoho cenných rad, kterých se mi od něj dostalo.

Z celého srdce chci poděkovat svým rodičům a manželovi, za jejich láskyplnou podporu a porozumění po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Klára Bechná

Školitel: PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Název diplomové práce: Měď a její pato/fyziologický význam v lidském organismu

Měď je nepostradatelným stopovým prvkem našeho organismu. Tato diplomová práce shrnuje současné poznatky o mědi, její roli v lidském organismu a zároveň o nemocech, které s mědí souvisí.

První část práce se věnuje fyziologickým souvislostem. Podrobně jsou zde popsány funkce mědi v organismu, zejména struktura a vlastnosti enzymů obsahujících měď – tzv. kuproenzymů. V další části jsou shrnuty současné znalosti kinetiky mědi v organismu na buněčné i celotělové úrovni, včetně interakcí s ostatními stopovými prvky. Detailně jsou také představeny jednotlivé faktory podílející se na homeostaze mědi v lidském organismu.

Druhá část práce se zabývá patofyziologií mědi. Je zaměřena na nejvýznamnější onemocnění, které přímo souvisí s poruchami homeostázy mědi v organismu. Největší důraz je kladen hlavně na dvě z nich – Wilsonovu a Menkesovu chorobu. První jmenovaná souvisí s nadbytkem mědi v organismu, naopak Menkesova se pojí s nedostatkem mědi. U obou nemocí jsou komplexně objasněny příčiny, klinické projevy, diagnostické a terapeutické metody. V závěru práce jsou dále popsány některé další neurodegenerativní onemocnění, které s poruchou homeostázy mědi v organismu také souvisí.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Klára Bechná

Supervisor: Přemysl Mladěnka, PharmD., Ph.D.

Title of diploma thesis: Copper and its pato/physiological importance in human organism

Copper is an indispensable trace element of our organism. This thesis summarizes the current knowledge about copper, its role in the human body and diseases connected with copper dysbalance.

The first part of the thesis deals with the physiological aspects. Functions of copper in the body are described here in detail, in particular the structure and properties of copper-containing enzymes – so-called cuproenzymes. The next section summarizes the current knowledge of the kinetics of copper in the body at the cellular and whole-body levels, including interactions with other trace elements. Details are also presented for each of the factors involved in the homeostasis of copper in the human organism.

The second part of the thesis deals with patophysiology of copper. It is focused on the most important diseases that are directly linked to disorders of copper homeostasis in the organism. The greatest emphasis is given mainly on two of them – Wilson's disease and Menkes disease. The former is associated with an excess of copper in the body while the latter leads to a deficiency of copper. Both diseases are thoroughly characterized including causes, clinical manifestations, diagnostic and therapeutic methods. The last part of the thesis further describes additional neurodegenerative diseases, also related to a disorder of copper homeostasis in the body.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Seznam zkratk | 1 |
| 2. Úvod a cíl práce | 2 |
| 3. Teoretická část | 3 |
| 3.1. Fyziologie mědi v lidském organismu | 3 |
| 3.1.1. Měď jako chemický prvek | 3 |
| 3.1.2. Měď jako stopový prvek | 4 |
| 3.1.3. Funkce mědi v organismu | 7 |
| 3.2. Kinetika mědi v organismu | 19 |
| 3.2.1. Homeostáza mědi v organismu | 19 |
| 3.2.2. Homeostáza mědi v buňce | 20 |
| 3.2.3. Regulace homeostázy mědi | 29 |
| 3.3. Patofyziologie mědi v lidském organismu | 32 |
| 3.3.1. Wilsonova choroba | 32 |
| 3.3.1.1. Princip dědičnosti a epidemiologie | 32 |
| 3.3.1.2. Genetické pozadí nemoci | 33 |
| 3.3.1.3. Klinický obraz nemoci | 34 |
| 3.3.1.4. Stanovení diagnózy | 39 |
| 3.3.1.5. Terapie nemoci | 41 |
| 3.3.1.6. Prognóza nemoci | 46 |
| 3.3.2. Menkesova choroba a Occipital Horn Syndrom | 47 |
| 3.3.2.1. Princip dědičnosti a epidemiologie | 47 |
| 3.3.2.2. Genetické pozadí nemoci | 48 |
| 3.3.2.3. Klinický obraz nemoci | 49 |
| 3.3.2.4. Stanovení diagnózy | 52 |

| | |
|--|----|
| 3.3.2.5. Terapie nemoci | 54 |
| 3.3.3. Aceruloplasminémie | 57 |
| 3.3.4. Neurodegenerativní onemocnění | 59 |
| 3.3.4.1. Alzheimerova choroba..... | 59 |
| 3.3.4.2. Parkinsonova choroba | 60 |
| 4. Diskuze..... | 61 |
| 5. Závěr | 63 |
| 7. Použité zdroje..... | 65 |
| 7.1. Odborné časopisy..... | 65 |
| 7.2. Knihy..... | 71 |
| 7.3. Diplomové a bakalářské práce | 71 |
| 7.4. Internetové zdroje | 71 |

1. Seznam zkratek

| | |
|-------|---|
| AK | Aminokyselina |
| ATOX1 | Cu - chaperon, antioxidační protein vázající měď |
| CCS | Cu - chaperon pro SOD |
| CP | Ceruloplasmin |
| CTR1 | Selektivní transportér pro měď |
| DBH | Dopamin - β - monooxygenasa/hydroxylasa |
| DDD | Doporučená denní dávka |
| DEDTC | Diethyldithiokarbamát |
| EC | Enzymová komise pro mezinárodní klasifikaci enzymů |
| GSH | Glutathion |
| IUBMB | International Union of Biochemistry and Molecular Biology |
| K - F | Keyser - Fleischer |
| MAO | Monoaminoxidasa |
| MD | Menkesova choroba z angl. Menkes disease |
| NÚ | Nežádoucí účinky |
| OHS | Syndrom okcipitálního rohu z angl. Occipital Horn Syndrom |
| PAM | Peptidyl - α - aminová monooxygenasa |
| SOD | Superoxid dismutasa |
| SOX | Sulfhydryl oxidasa |
| TTM | Tetrathiomolybdenan amonný |
| WD | Wilsonova choroba z angl. Wilson's disease |

2. Úvod a cíl práce

Měď je základní stopový prvek lidského organismu, který se, díky své schopnosti reverzibilně přijímat a odevzdávat elektrony, účastní mnoha důležitých oxidoredukčních procesů. Přestože lidstvo zná měď už několik tisíc let, stále existuje mnoho nezodpovězených a nejasných otázek kolem. Vědci stále objevují nové poznatky z oborů fyziologie, biochemie, toxikologie a mnohých dalších, které nám pomáhají komplexně pochopit úlohu mědi v našem těle. Přestože je výzkum zaměřený na měď v mnoha ohledech velmi náročný, podařilo se mu v současné době rozkrýt podstatnou část mozaiky a nové poznatky nám stále odhaluje. Efektivní přístup v léčbě onemocnění, vzniklých porušením Cu-homeostázy, vyžaduje znalost a pochopení základních principů v metabolismu mědi, regulačních mechanismů i vzájemných interakcí stopových prvků mezi sebou.

Tato práce si klade za cíl podrobně, přehledně a strukturovaně shrnout současné poznatky o mědi na úrovni lidského organismu, ve snaze získat celkový a komplexní pohled na danou problematiku.

3. Teoretická část

3.1. Fyziologie mědi v lidském organismu

Měď je biogenním prvkem a je nezbytnou součástí lidského těla. Pro organismus je stopovým prvkem, který je, ač ve velmi malé míře, esenciální pro mnohé fyziologické procesy.

3.1.1. Měď jako chemický prvek

Měď, latinsky zvaná *Cuprum*, je kovovým prvkem červenohnědého vzhledu s chemickou značkou Cu a protonovým číslem 29. Patří tedy do přechodných prvků 4. periody a I. B skupiny, s elektronovou konfigurací $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$. V přírodě se vyskytuje v podobě dvou izotopů ^{63}Cu a ^{65}Cu .

Teplota tání mědi je $1\,085\text{ }^\circ\text{C}$ a teplota varu ještě o $1\,500\text{ }^\circ\text{C}$ vyšší. Měď je dobrým elektrickým i tepelným vodičem, ale neprojevuje se magnetickým chováním. Podle Mohsovy stupnice odpovídá tvrdosti 3. Pozoruhodná je její odolnost vůči korozi, kdy se za působení vzdušné vlhkosti a CO_2 pokryje nazelenalou vrstvičkou měďenky, chemicky $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$, která zabrání následným procesům koroze.

Ryzí měď je opravdu vzácná, avšak její soli se nachází v celé řadě sloučenin. Z hlediska četnosti výskytu hlavně v sulfidech (př. chalkosin, chalkopyrit), oxidech (př. kuprit) a v neposlední řadě v uhličitanech (př. malachit, azurit). Najdeme ji i v organismech živočichů včetně člověka, proto ji řadíme k biogenním prvkům.

Měď se vyskytuje ve sloučeninách v široké paletě možných oxidačních stavů, od Cu^+ až do Cu^{4+} . Nejstabilnějším oxidačním stavem je však jen Cu^{2+} . Díky své vazebnosti ochotně a často tvoří barevné komplexní sloučeniny, ve kterých opět nejčastěji nabývá oxidačního stavu Cu^{2+} . Anorganické sloučeniny mědi jsou toxické a jedovaté.

Analytické důkazy Cu^{2+} jsou založeny na několika principech:

- barevnost hydratovaných sloučenin a barvení plamene do zelena;
- vznik barevných komplexních sloučenin (př. Hatthetova hněď);
- jodometrické či chelatometrické stanovení.

3.1.2. Měď jako stopový prvek

Stopové prvky neboli mikroelementy, nejsou stejně jako vitaminy a minerály nositeli energie, ale jsou absolutně nezbytnou složkou naší potravy. Stopové prvky tvoří v organismu přibližně 0,01 % všech atomů. Nerovnováha v množství stopových prvků, ať už v podobě nadbytku nebo nedostatku, má vliv na normální funkci těla a ústí v řadu biochemických a fyziologických změn (Trojan et al. 2003).

Obsah mědi v organismu

Měď je po železu (4 – 7 g) a zinku (2 – 4 g) třetím nejčastěji se vyskytujícím esenciálním prvkem v našem těle. S těmito kovy je také úzce metabolicky spjata. V organismu je zastoupena v množství 0,10 – 0,15 g, z toho 10 % v plasmě a krevních elementech a zbylých 90 % ve tkáních (Trojan et al. 2003).

Hodnoty naměřené v krvi se u jednotlivých pohlaví mírně liší. U mužů dosahují hodnoty intervalu od 0,614 do 0,970 mg/l, u žen jsou tyto data obecně o 10 – 20 % vyšší a to v rozmezí od 0,694 do 1,030 mg/l. Zajímavá čínská studie na zdravých jedincích poukázala na fakt, že koncentrace mědi u mužů s věkem roste, u žen se zvýšení neprokázalo. U mužů kuřáků paradoxně množství mědi v krvi značně klesá (Wang et al. 2011, Angelova et al. 2011).

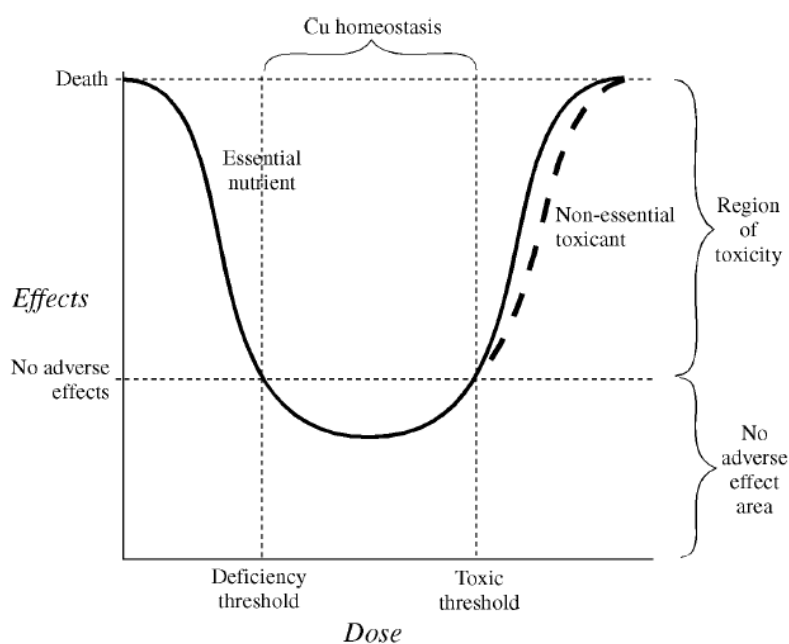
Koncentrace mědi v organismu však není homogenní a jsou orgány, kde se měď vyskytuje ve větším nebo naopak v menším množství. Orgány s nejvyšším obsahem mědi jsou játra, dále pak mozek, ledviny a srdce. Orgánem s nejnižším obsahem mědi je naopak žaludek. Tyto rozdíly plynou z funkce mědi v organismu (Lech a Sadlik 2007).

Denní limity příjmu mědi

Vyvážený příjem mědi je velmi důležitý pro udržení potřebné hladiny kovu v organismu, neboť ustavičně dochází k jeho vylučování. Vztah mezi příjmem mědi a zdravím (**Obr. 1**) je navíc ovlivňován celou řadou 1) fyziologických faktorů spojených s homeostázou mědi, 2) vnějších faktorů, ovlivňujících dostupnost mědi v potravě a 3) individuálním genetickým potenciálem. Pro organismus představují stavy nedostatku či nadbytku mědi velkou zátěž.

Doporučení denní dávky mědi v jednotlivých státech světa velmi kolísají. Podle české vyhlášky č. 450/2004 Sb., o označování výživové hodnoty potravin a její přílohy týkající se doporučených denních dávek (DDD) vitaminů a minerálních látek, je DDD mědi pro dospělého člověka 1 mg. A podle WHO by denní příjem dospělého jednotlivce neměl překročit 0,5 mg/kg hmotnosti. V dětství jsou tyto hodnoty DDD nižší a pohybují se u novorozenců v intervalu od 0,4 – 0,6 mg a u dětí ve věku 1 – 4 roky v intervalu od 0,7 – 1,0 mg (Moore et al. 1996).

Zvýšená potřeba příjmu mědi (1,15 – 1,25 mg) je zejména v těhotenství a při laktaci. Tento zvýšený požadavek není ve všech případech pokryt obsahem mědi v potravě, ale lze jej vyřešit podáváním nutričních doplňků, které měď obsahují (Collins et al. 2010).



OBRÁZEK 1. VZTAH MEZI DÁVKOU MĚDI A JEJÍ HOMEOSTÁZOU V ORGANISMU.

Křivka závislosti koncentrace mědi v organismu na přijímané dávce má tvar písmene U. Fyziologická koncentrace mědi leží v intervalu mezi hranicí nedostatku a toxicity. Zároveň dlouhodobý nedostatek i toxický nadbytek mědi vede ke smrti organismu.

Převzato z: Moore (1996)

Měď v potravě

Obsah mědi v potravinách je většinou nízký a pohybuje se v řádech několik $\mu\text{g/g}$ suché váhy dané pochutiny. V potravinách je měď vázaná v organických komplexech, nejčastěji na aminokyseliny v peptidech a proteinech.

Mezi potraviny s nejvyšším obsahem mědi patří mořské ryby, nejvíce makrela a treska. Dále játra, drůbeží a vepřové maso, brambory a luštěniny, jako fazole, hrách a čočka. Z ovoce jsou dobrým zdrojem pomeranče, jahody, maliny, borůvky, jablka, hrozny a broskve; ze zeleniny rajčata, mrkev, kapusta či bílé zelí. Mezi ostatní přirozené zdroje mědi patří hříby, ovesné vločky, žitná mouka, celozrnné pečivo, špenát, ořechy či červené víno, káva, čaj a čokoláda (**Tab. 1**).

Obsah mědi v potravinách může být zvýšen kontaminací, a to zejména ošetřením plodů pesticidy a používáním měděného zařízení, včetně potrubí, při zpracování potravin. Nejde o teoretickou variantu, jak dokazuje případ z Indie, kde nadojené kravské mléko bylo skladováno v tradičních mosazných nádobách. Vysoké dávky mědi, denně překračující 900 mg/kg, způsobovaly u dětí jaterní onemocnění tzv. indickou dětskou cirhózu. Na tyto problémy začaly v 80. letech minulého století upozorňovat výchovné kampaně, které následně prakticky docílily eradikace poškození jater po celé Indii (Harvey 2005, Moore 1996).

Vyhláška č. 305/2004 Sb., o kontaminantech stanovuje nejvyšší přípustné množství mědi v potravinách. Pro jedlé tuky, oleje a margariny je stanovený limit nejnižší, a to 0,1 $\mu\text{g/g}$. U loupáných brambor a výrobků z nich je limit 0,2 $\mu\text{g/g}$. Naproti tomu nejnižší omezení mají potraviny v plechových obalech (s výjimkou nápojů a kojenecké výživy), a to 1 $\mu\text{g/g}$. Vyhláška č. 252/2004 Sb., stanovující požadavky na pitnou vodu dle směrnice EU 2003/40, ukládá limit pro pitnou vodu na 1 mg/l, stejná hodnota platí i pro minerální vody pro kojence.

TABULKA 1. VYBRANÉ POTRAVINY S ORIENTAČNÍM OBSAHEM MĚDI ($\mu\text{g/g}$).

| | | | |
|--------------------|----------------|-----------------|-----------|
| Ryby - mořské | 2,0 – 3,0 | Zelenina | 0,3 – 3,0 |
| Ryby - sladkovodní | 0,3 – 3,0 | Ovoce | 0,4 – 1,5 |
| Drůbež | 0,5 – 3,0 | Luštěniny | 3,0 – 7,0 |
| Játra | 4,6 – 6,7 | Bílá mouka | 0,6 |
| Oříšky | 6,0 – 37,0 | Obilky a semena | 3,0 – 8,0 |
| Otruby | 15,0 | Klíčky | 6,0 |
| Sladká voda | 0,001 – 0,0001 | Brambory | 2,1 |

Převzato z: Duša (2008)

3.1.3. Funkce mědi v organismu

Měď je nezbytná pro aktivity fyziologické pochody každé buňky v našem organismu. Měď je kofaktorem mnoha metaloenzymů, k nimž je vázaná různě silnou koordinačně kovalentní vazbou. Podílí se na katalýze životně nezbytných enzymatických procesů – buněčného dýchání, biosyntézy neurotransmiterů a peptidových hormonů, ochrany před volnými radikály, síťování elastinu, kolagenu a keratinu. Měď je nepostradatelná pro homeostázu železa, a tudíž se nepřímo podílí na krvetvorbě. Dále se účastní krevní koagulace a angiogeneze (Tümer a Møller 2010).

Hlavní kuproenzymy a transportní proteiny mědi, o kterých se v mé práci zmiňuji, včetně jejich biologické aktivity, jsou uvedeny v následující tabulce (**Tab. 2**).

TABULKA 2. PŘEHLED KUPROENZYMŮ A Cu - TRANSPORTNÍCH PROTEINŮ.

| Kuproenzym/transportní protein | Biologická aktivita |
|---|--|
| Antihemofilický faktor (faktor VIII) | Hemokoagulace |
| Ceruloplasmin | Transport mědi, metabolismus železa |
| Cytochrom c oxidasa | Buněčné dýchání |
| Diaminooxidasa | Metabolismus aminů |
| Dopamin - β - hydroxylasa | Syntéza katecholaminů |
| Hephaestin | Metabolismus železa |
| Lysyl oxidasa | Tvorba kolagenové a elastinové sítě |
| Metallothionein | Transport mědi a dalších kovů |
| Monoaminooxidasa | Syntéza neurotransmiterů |
| Peptidyl - α - aminová monooxygenasa | Syntéza neuropeptidů a peptidových hormonů |
| Primární aminooxidasa | Metabolismus aminů |
| Proakcelerin (faktor V) | Hemokoagulace |
| Superoxid dismutasa | Odstraňování volných radikálů |
| Sulfhydryl oxidasa | Tvorba kreatinu |
| Transkuprein | Transport mědi |
| Tyrosinasa | Tvorba melaninu |

Měď může být za určitých podmínek pro organismus škodlivá. Jedná se především o její toxicitu, která v lidském těle nastává při vysokých koncentracích volné mědi. V těchto situacích nacházíme volné ionty mědi přímo v krevní plasmě. Tyto ionty nejsou vázány na žádnou transportní molekulu a jsou schopny redoxní reakce. Dvoustupňová Haber - Weisova reakce popisuje katalytický vliv mědi na vznik volných hydroxylových radikálů (**Reakce 1 a 2**). Ty následně způsobují poškození buněčných složek – proteinů, lipidů i nukleových kyselin a vedou k významnému porušení homeostázy (Muller et al. 2007).



Jak bylo již zmíněno, měď vykonává roli kofaktoru. Podle biochemické definice zahrnuje pojem kofaktor jak integrovanou ne-bílkovinnou součást enzymu neboli prostetickou skupinu, tak přechodnou ne-bílkovinnou součást enzymu neboli koenzym. Samotný apoenzym bez navázaného kofaktoru je enzymaticky neaktivní.

U Cu - dependentních enzymů jde o kofaktor typu prostetické skupiny. Měď je navázaná na enzym, konkrétně na aminokyselinové zbytky, v pevných kovalentních koordinačních vazbách v průběhu celého vazebného a katalytického procesu. V průběhu reakce se reversibilně mění oxidační stupeň tak, aby byl prvek schopen vstoupit do nové reakce s dalšími molekulovými substráty (Ledvina et al. 2009).

Právě reversibilní přeměna z oxidačního stavu Cu^+ na Cu^{2+} je základním principem enzymatické přeměny. Avšak tento mechanismus zároveň může vést k tvorbě volných radikálů, proto je pro organismus životně důležitá opravdu přesná a citlivá regulace homeostázy mědi (Tümer a Møller 2010).

Následující přehled zahrnuje charakteristiku abecedně uvedených vybraných kuproenzymů.

Cytochrom c oxidasa (EC 1.9.3.1)

Cytochrom c oxidasa je důležitým transmembránovým metaloproteinem mitochondrie. Svou důležitou funkci plní v závěru dýchacího řetězce, kde zajišťuje oxidoredukční reakce. Strukturně se skládá ze třinácti podjednotek a kofaktorem enzymu jsou dva atomy mědi (Cu_A, Cu_B). Úzce spolupracuje s cytochromy *a* a a_3 , se kterými je součástí komplexu IV v dýchacím řetězci.

Předpokládá se, že cytochrom *a* s prvním atomem mědi (tzv. Cu_A) slouží k přenosu elektronů, uvolněných při oxidaci železa z cytochromu c z oxidačního stavu Fe^{2+} na Fe^{3+} . Cytochrom *a* a Cu_A jsou mimo jiné i součástí vazebného místa cytochrom c oxidasy pro cytochrom c. Naproti tomu úkolem druhého atomu mědi (tzv. Cu_B) a cytochromu a_3 je mezi sebe připoutat molekulu kyslíku a přenést na ni postupně čtyři uvolněné elektrony. Vznikne nestálý kyslíkatý anion O^{2-} , který okamžitě s protony okolí vytváří stabilní molekulu vody. Kromě přenosu elektronů na kyslík přispívá k vytvoření elektrochemického potenciálu, který je potřebný pro syntézu ATP (IUBMB 2011, Ledvina et al. 2009, Duška 2006).

Dopamin - β - monoxygenasa (DBH, EC 1.14.17.1)

Tento klíčový enzym je nepostradatelný při syntéze noradrenalinu a tedy i adrenalinu z jejich prekurzoru dopaminu. Nutnými podmínkami činnosti dopamin - β - monoxygenasy je přítomnost mědi a molekulového kyslíku s askorbátem. Enzym je uskladněn v zásobních vezikulech spolupracujícími jak s monokinovými transportéry zajišťujícími transport, tak s protonovými pumpami, které udržují nízké intravezikulární pH (Goldstein 2010).

Nedostatek enzymu má velice rychlou klinickou manifestaci zahrnující ortostatickou hypotenzi, hypotermii a epizodickou hypoglykémii, dechové a srdeční kolapsy. V podstatě se v těchto situacích nedá detekovat žádná hladina noradrenalinu a adrenalinu v krvi (Cheshire et al. 2006).

V mozku, především v mozkové kůře, mozečku a hypofýze, můžeme najít Cu-dependentní monoxygenasu MOXD 1, která je velmi blízká již zmíněné dopamin-hydroxylase. Otázkou však stále zůstává její fyziologická role, která je dosud nejasná (Lutsenko et al. 2010).

Ferroxidasa (EC 1.16.3.1)

Z obecného hlediska katalyzují ferroxidasy oxidaci železnatých kationtů na železité (**Reakce 3**), čímž se účastní vyplavení železa z cytosolu a umožňují vazbu na apo-transferin za vzniku cirkulující formy železa na transferinu. Ferroxidasovou aktivitu má hned několik enzymů (IUBMB 2011).



- *Ferroxidasa I – ceruloplasmin (CP)*

Ceruloplasmin je 132 kDa monomerní sérový α_2 - globulinový protein modré barvy, mající dvě samostatné isoformy. První, membránově vázaná, je glykosylovaná fosfatidyl inositolem. Tento typ je důležitý zejména pro ferroxidasovou aktivitu v metabolismu železa při jeho vazbě na transferin. Je tedy nezbytný pro homeostázu železa a pro udržení krvetvorby. Druhá, volná isoforma CP, která je v krevním séru v koncentraci cca 0,35 g/l krve transportuje měď po organismu. Je nejdůležitějším transportním proteinem mědi v krevní plasmě u zdravého člověka, přenáší až 90 % cirkulující mědi. CP zajišťuje zásobování tkání mědi z jater, zatímco jaterní zásobením je zprostředkováno hlavně ostatními transportními proteiny. CP tak tvoří důležitou křížovátku, protínající metabolismu mědi a železa (Mladenka et al. 2005, Trojan et al. 2003, Mukhopadhyay et al. 1998, Luza et al. 1996).

Historii CP začínáme psát rokem 1948, kdy byl vědci Holmbergem a Laurellem objeven. Později byl zařazen do skupiny tzv. „multicopper“ oxidas. Lidský CP čítá 1046 aminokyselin. Skládá se ze tří homologních jednotek, dále dělitelných do subdomén. Každá funkční molekula CP obsahuje šest atomů mědi, vázaných v celkem třech vazebných místech. Vazebná místa jsou charakterizována dvěma histidiny, cysteinem a metioninem (Hellman a Gitlin 2002).

Zabudování mědi do apoceruloplasminu se děje prozatím ne příliš jasným mechanismem v játrech. Kromě jater, se přítomnost genu pro CP potvrdila i ve slezině, plicích a v mozku. U zdravého dospělého člověka je jen 10% z celkového cirkulujícího CP ve formě enzymaticky neaktivního apoproteinu, který je rychle metabolizován s poločasem kolem pěti hodin (Cabrera et al. 2007).

Studie s radioaktivní mědí upozornily na několik zajímavých faktů. Nejen že prokázaly malou až nulovou výměnu Cu - atomů v CP po dobu jeho životnosti, ale odhalily i jeho sérový poločas, který je skoro šest dní (Hellman a Gitlin 2002).

Řízení syntézy CP je komplexního charakteru, při němž dochází k regulaci transkripce genu pro ceruloplasmin na několika úrovních. Jaterní produkce je stimulována mediátory zánětu, jako jsou interleukiny 1, 6 a také tkáňovým nekrotickým faktorem. Výzkumy potvrzují rychlý vzestup plasmatických hodnot CP v období infekcí, zánětů, traumat včetně akutní fáze infarktu myokardu. V těchto situacích patrně dochází k vyšší produkci volných radikálů. Mechanismem regulace u mediátorů zánětu je aktivace transkripce. Řízení pomocí estrogenů je pravděpodobně založeno na zvyšování stability mRNA transkriptu. V souvislosti s tím můžeme zmínit rostoucí hodnoty CP při hyperfunkci vaječnicků, u žen užívajících perorální kontracepci a zároveň u žen ve třetím trimestru těhotenství. Zvýšená produkce proteinu byla pozorována i u lidí se zvýšenou fyzickou námahou. Při zhoubných nádorových onemocnění lze zvýšenou hladinu CP interpretovat vyššími potřebami esenciálních kovů v důsledku progresivního růstu. Mechanismus této modulace však není znám (Hellman a Gitlin 2002).

Ačkoliv měď nehraje žádnou roli v rychlosti syntézy či při sekreci CP, je na ní činnost CP velmi závislá. Nedostatečná dostupnost mědi, ať už geneticky podmíněná nebo nutriční, či neschopnost začlenit atomy mědi do apoceruloplasminu jsou příčinou patologických projevů, podobných aceruloplasminémii. Dochází při tom mimo jiné ke kumulaci železnatých iontů v játrech a na dalších místech organismu. Nedostatek volného železa snižuje žlučovou exkreci atomů mědi a nepřímou tak stimuluje jejich inkorporaci do apoceruloplasminu (Lutsenko et al. 2010, Collins et al. 2010, Hellman a Gitlin 2002).

- *Ferroxidasa II*

Ferroxidasa II je diméřním kuproenzymem žluté barvy. Ve srovnání s CP vykazuje stejnou enzymatickou aktivitu, v plasmě je však obsažena v mnohem menším množství (Harris 1994).

- *Hephaestin*

I tento Cu-protein s ferroxidasovou aktivitou je velmi nezbytný pro metabolismus železa. Strukturně se od CP příliš neliší a některé odborné prameny hovoří až o 50% sekvenční shodě. Totožně obsahují šest atomů mědi a molekulová hmotnost CP je jen o 2 kDa nižší. Hephaestin se nachází především v oblasti tenkého střeva, kde oxiduje železnaté ionty. Hraje zásadní roli v transferu železa přes bazolaterální membránu enterocytů, a tedy v přenosu železa ze sliznice do krve. Výzkum myši bez genu pro hephaestin zaznamenal přímou souvislost mezi mutací a mikrocytární hypochromní anémií, refrakterní na perorální léčbu železem (Griffiths et al. 2005, Chen et al. 2004).

Měď dependentní aminosy

Tyto enzymy představují heterogenní třídu, která podle mezinárodní klasifikace enzymů patří do skupiny EC 1.4.3. Tato kategorie enzymů je široce rozšířena mezi všemi organismy, ať už prokaryontními, tak eukaryontními.

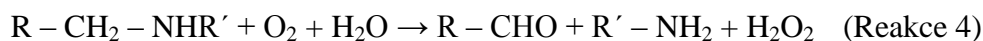
Strukturně se jedná o glykosylované homodimery. Každá podjednotka se skládá z atomu mědi a chinonového kofaktoru, konkrétně 2, 4, 5 - trihydroxyenylalanin chinonu. Velikost podjednotky se pohybuje v rozmezí 70 – 95 kDa (Cardillo et al. 2009).

- *Monoaminoxidasa (MAO, EC 1.4.3.4)*

Tento esenciální enzym je vázaný na vnější mitochondriální membráně. Kofaktorem je kromě mědi i pevně vázaná prostetická skupina flavinu. Flavinová struktura obsahuje 3 kondenzované cykly. Flavohydrochinonový cyklus lze snadno reverzibilně oxidovat, za vzniku flavochinonu (IUBMB 2011).

V našem organismu jsou dvě geneticky podmíněné formy tohoto enzymu, a to MAO A a MAO B. Tyto formy se liší svými substráty a specifickými inhibitory (Bachurin et al. 2001).

Účastní se oxidace primárních, ale i sekundárních a terciárních aminů. Je důležitá především v oxidativní deaminaci neurotransmiterů a biogenních aminů (**Reakce 4**). Tímto způsobem zasahuje do metabolismu katecholaminů a mnoha dalších látek (Angelova et al. 2011).



- *Lysyl-monoaminoxidasa (EC 1.4.3.13)*

Lysyl monoaminoxidasa, známá i pod kratším názvem lysyl oxidasa, je nezbytný enzym pro tvorbu a řetězení kolagenu a elastinu. Obsahuje 2 kofaktory, které jsou nezbytné pro její činnost. Prvním z nich je pevně vázaný atom mědi a druhým je specifický, kovalentně vázaný organický kofaktor lysin-tyrosylchinon (IUBM 2011, Lucero et al. 2006).

Lysyl oxidasa se vyskytuje ve dvou formách – intra a extracelulární. Extracelulární typ katalyzuje oxidativní deaminaci hydroxylsilylových a lisylových zbytků kolagenu a elastinu a je prvním krokem v sérii reakcí, jejichž výsledkem je tvorba kovalentního řetězení kolagenu a elastinu. Intracelulární forma má funkci antionkogenu. Enzym je velmi potřebný pro vznik a remodelaci extracelulární matrix během vývoje a také pro strukturní organizaci tkání. Hraje nepostradatelnou roli v pevnosti, pružnosti a ohebnosti vláknitých bílkovin pojivové tkáně (Lutsenko et al. 2010, Rucker et al. 1999).

Nedostatečná činnost tohoto enzymu ústí v mnohé patologické symptomy, jako jsou arteriální aneurysmata, emfyzémy, hernie, osteoporotické stavy, degenerace CNS nebo divertikly močového měchýře. Pacient je může nejprve vnímat jako špatné hojení ran, petechiální krvácení, volnou kůži a časté kloubní dislokace (Tümer a Møller, 2010).

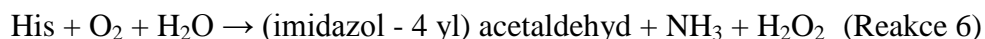
- *Primární aminooxidasy (EC 1.4.3.21)*

Skupina enzymů, mezi jejichž funkcí je oxidace primárních aromatických i alifatických aminů na příslušné produkty (**Reakce 5**). Afinita těchto enzymů k sekundárním aminům a k diaminům je malá (IUBMB, 2011).



- *Diaminoxidasa (EC 1.4.3.22)*

Enzym, jehož hlavní funkcí je oxidace diaminů, jako např. histaminu (**Reakce 6**). Podílí se částečně i na oxidaci monoaminů, ale oxidaci sekundárních a terciárních aminů nekatalyzuje (IUBMB 2011).



Peptidyl - α - aminová monooxygenasa (PAM, EC 1.14.17.3)

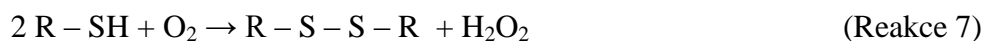
PAM je enzymem, který amiduje α - konce neuropeptidů. Tato amidace je nezbytnou reakcí pro aktivitu mnoha peptidových hormonů a neuropeptidů, např. oxytocinu, vasopresinu, gastrinu, tyreoliberinu nebo kortikoliberinu (Eipper et al. 1992).

PAM je bifunkční protein, skládající se z peptidyl - α - hydroxyglycin - α - amidující lyázy a peptidylglycin - α - hydroxylující monooxygenasy.

Katalytická reakce má dva kroky. Do první fáze se zapojuje monooxygenasová část enzymu, která reaguje za vzniku C-terminálního hydroxyglycinového meziprojektu. K první reakci je nezbytný molekulový kyslík, měď a askorbát. Meziprojekt je pak druhou reakcí za pomoci lyázy přeměněn na C-terminální amid (Dockray et al. 2001).

Sulphydryl oxidasa (EC 1.8.3.2)

Sulphydryl oxidasa je flavin-dependentní enzym, který katalyzuje vznik disulfidických vazeb z volných thiolových skupin, za současné redukce kyslíku. (**Reakce 7**) Tento enzym má jako kofaktor vždy atom kovu a podle něj rozlišujeme dvě formy, jejichž kofaktorem je železo nebo měď. Cu-dependentní typ byl popsán v ledvinách, v tenkém střevu a v kůži (Hooper et al. 1996). Podílí se na procesech zesíťování stavební bílkoviny keratinu. Nedostatečnou činnost enzymu doprovázejí symptomy suché kůže a vlasových abnormalit (Tümer a Møller 2010).



Superoxid dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)

SOD je cytosolický metaloprotein, známý i pod termíny erythrocuprein, hemocuprein nebo cytocuprein. Je důležitým enzymem, který se podílí na antioxidační ochraně organismu. Zháší totiž superoxidové radikály za vzniku peroxidu vodíku. Tyto volné radikály jsou vůbec nejčastěji vyskytující se volné radikály v organismu. Vznikají autooxidací mnoha fyziologických látek, jako např. katecholaminů, flavinů, hydrochinonů, thiolů nebo hemoproteinů. Vytváří se také při mnohých enzymových reakcích, např. katalyzovaných xantinoxidasou a jinými oxidasami, lipoxygenasou, cyklooxygenasou, dále rovněž při přenosu elektronů v dýchacím řetězci (Keele et al. 1971).

Samotný superoxidový radikál není sám příliš toxický, ale jeho nebezpečí tkví v tom, že z něj mohou vznikat další, mnohem toxickejší reaktivní formy kyslíku (př. hydroxylový radikál, peroxyinitrit nebo kyselina chlorná). Proto je preventivně odstraňován dismutací na již zmíněný peroxid (Racek a Holeček 1999).

Podle kofaktoru, tím je vždy atom kovu podílející se na katalytickém účinku, rozeznáváme tři isoformy enzymu SOD: Mn^{2+} SOD, Fe^{2+} SOD a Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD. Cu/Zn dependentní enzym, s celkovou molekulovou hmotností 32 kDa, se vyskytuje v cytoplasmě mnoha somatických buněk, především však v hepatocytech. Představuje 1 % všech bílkovin v buňce. Strukturu má složenou ze dvou podjednotek. Každá z nich obsahuje po jednom atomu z obou kovů, přičemž atom zinku má strukturní funkci a atom mědi katalytickou a slouží jako redoxní centrum v molekule enzymu (Shim a Harris 2003, Harris 1992).

Vlastní reakční mechanismus je podle následujícího schématu (**Reakce 8 a 9**). Atom Cu^{2+} je redukován první molekulou superoxidu na Cu^+ . Další molekula superoxidu je pak v protonizované formě (proton získá z argininu v blízkosti aktivního centra), schopna znovu oxidovat Cu^+ na Cu^{2+} , čímž dojde k regeneraci enzymu. Ve druhé reakci dojde mimo jiné k vytvoření peroxidu vodíku.

Kromě cytosolové Cu - dependentní formy enzymu existuje i varianta vázaná na membrány, zhášeující superoxidové radikály na buněčném povrchu. Podle některých výzkumů se tento enzym dokonce podílí na udržení mozkového cévního tonu a na neurogenezi. Poruchy enzymu vedou k amyotrofické laterální skleróze (Lutsenko et al. 2010, Shim a Harris 2003).



Tyrosinasa (EC 1.14.18.1)

Tyrosinasa je transmembránový kuproenzym, obsahující dva atomy mědi. Ty se přímým způsobem podílí na přenosu atomů kyslíku a tvorby reaktivních meziproductů.

Tyrosinasa je klíčovým, rychlost limitujícím enzymem, katalyzujícím oxidační přeměnu aminokyseliny tyrosinu na 3, 4 - dihydroxyfenolalanin, neboli L - dopa. Stejnou reakci může katalyzovat i enzym tyrosin-hydroxylasa, který však ve své struktuře namísto mědi obsahuje atom železa. L - dopa je pak dále oxidován na dopachinon, který je později ještě dále konvertován. Cílem této metabolické cesty je vznik tmavého pigmentu melaninu, který ve velké míře ovlivňuje barvu lidské kůže (Julien et al. 2007).

Melanin je produkován melanocyty, jež jsou široce rozšířeny v lidském těle, tedy nejen ve svrchní části kůže. Jednou ze specifických organel melanocytů jsou melanosomy, které plní roli zásobních vezikul. Melanocyty jsou potom kanálky propojeny s pokožkovými buňkami keratinocyty.

Přítomnost melanocytů byla dokonce potvrzena i v mozkové kůře, hippokampu, epithalamiu či v substantia nigra. Role tyrosinasy v CNS není dostatečně pochopena. Jednou z možností je preventivní oxidace nadbytečného množství dopaminu. Zabránilo by se tak destrukci katecholaminergních neuronů, způsobenou dopaminovou auto-oxidací (Lutsenko et al. 2010).

Regulaci vzniku melaninu ovlivňuje mnoho faktorů, mezi něž patří i opalování nebo ultrafialové záření. Oba tyto jevy indukují melanogenezi a tvoří tak fotoprotektivní odpověď kůže. Hladina melaninu stoupá v průběhu několika dnů po expozici na slunci a tvoří v kůži tmavou clonu, která tak zvyšuje odolnost pokožky vůči možnému poškození UV zářením (Khlgtian et al. 2002).

Poruchy tyrosinasové aktivity vedou k hypopigmentačním změnám. Vrozená absence se projevuje albinismem, což je výrazné snížení až úplný nedostatek melaninu v organismu. Projevuje se bledou pokožkou, bílými vlasy a ostatním ochlupením, slabozrakostí a světloplachostí. Absence tyrosinasové aktivity je i v oblastech kůže, kde

dochází k nadměrnému odumírání melanocytů. Tuto kožní vadu známe pod názvem vitiligo a projevuje se spojitými okrsky kůže bez pigmentu.

Krevní srážecí faktory - V, VIII

Krevní srážecí faktory V a VIII jsou glykoproteiny produkované játry a fyziologicky se vyskytující v plasmě. Koagulační faktor V, proakcelerin, je kofaktorem v komplexu aktivátoru protrombinu. Koagulační faktor VIII, antihemofilický faktor, má stejně jako faktor V roli kofaktoru při aktivaci faktoru X. Oba srážecí faktory jsou nezbytné pro kaskádovitý proces hemokoagulace. Jejich dysfunkce ústí ve vážné nemoci. Při absenci faktoru VIII se jedná o krvácivý stav – hemofilii A, nebo naopak při nedostatku faktoru V (Leidenská mutace) nastává zvýšená koagulace (Trojan et al. 2003, Silbernagl a Lang 2001).

Oba tyto proteiny váží ve své struktuře měď. Ta podporuje stabilitu proteinových řetězců. Faktor VIII má podle mnoha výzkumů fylogenetickou spojitost s CP, což potvrzuje jejich podobná struktura, ne však jejich funkce (Lutsenko et al. 2010, Cabrera et al. 2008).

3.2. Kinetika mědi v organismu

3.2.1. Homeostáza mědi v organismu

Příjem mědi do organismu je zajištěn výhradně dietou. Pestrá strava je zárukou příjmu dostatečně velkého množství mědi denně (2 – 5 mg), které několikanásobně překračuje DDD. Měď je absorbována zejména horní částí tenkého střeva, tj. duodenem a ileem. Nové výzkumy zmiňují i možnou roli žaludku. Enterocyty jsou tedy v podstatě vstupní branou mědi do organismu, na jejichž apikální straně dochází k prostupu mědi ze střevního lumen do enterocytu a na bazolaterální straně dochází k efluxu mědi do portální žíly. V situacích, kdy je mědi nedostatek, se míra absorpce zvyšuje, v opačných situacích se měď neabsorbuje. Vstřebávání mědi souvisí i s celou řadou faktorů – železo, zinek či kyselina askorbová jej potlačují, zatímco živočišné bílkoviny a fruktóza naopak zvyšují. Rizikovými skupinami s dietně nedostatečným příjmem mědi jsou podvyživené děti, nedonošení novorozenci a nemocní s malabsorpčními syndromy, včetně Crohnovy choroby, ulcerózní kolitidy a chronických průjmů (Angelova et al. 2011, Collins et al. 2010, Harvey 2005, Moore 1996).

Volné ionty mědi se v krvi takřka nevyskytují, koncentrace těchto iontů byla naměřena v desetinách pikomolů na litr krevního séra. Měď je v krevním oběhu navázaná na krevní přenašeče – albumin, transkuprein a CP. Albumin je hlavním transportním proteinem mědi v oblasti portální žíly, což potvrdily testy s radioaktivně značenými ionty mědi. Albumin váže ionty mědi na histidinový zbytek na N-konci molekuly. Dalším proteinem je transkuprein, který se cca z 12 % podílí na transportu mědi v krevním séru. Jedná se o makroglobulin o molekulové hmotnosti 270 kDa. A jak z názvu vyplývá, jde o vysoko-afinitní přenašeč, který opět váže měď do komplexu s histidinem. I když je jeho koncentrace v krevní plasmě nižší, váže přibližně stejné množství mědi jako albumin. Mezi albuminem a transkupreinem dochází navíc k volnému přenášení iontů mědi. Za normálních okolností se koncentrace navázané mědi na transkupreinu v plazmě pohybuje kolem hodnot 2 μM . CP váže nejvyšší množství mědi a je nejdůležitějším transportním proteinem mědi. Avšak měď zabudovaná do CP není lehce uvolnitelná! Navíc se měď neváže se na molekulu CP v krvi, ale je do struktury CP zabudována při jeho syntéze v játrech. V případě aceruloplasminémie, stavu kdy je hladina CP snižena až nulová, zastává transportní

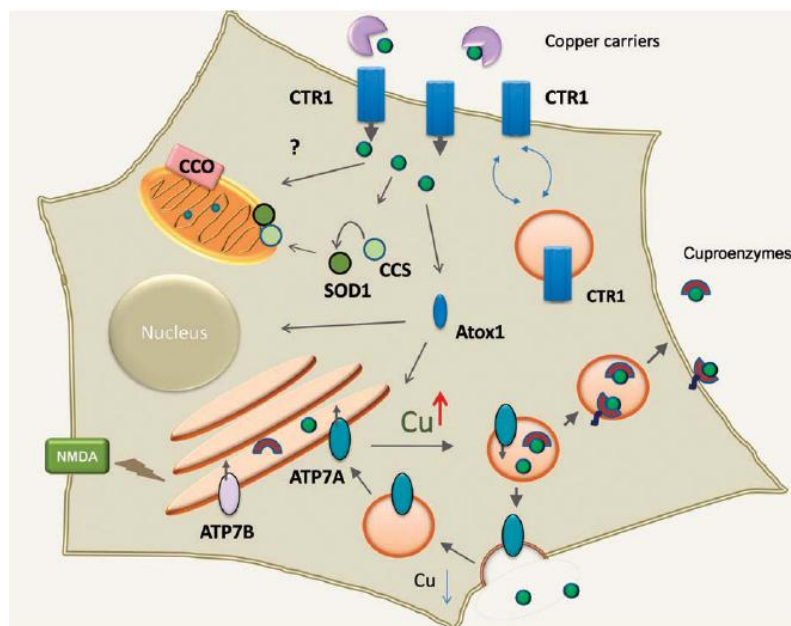
funkci CP albumin spolu s dalšími proteiny plazmy (Collins et al. 2010, Cabrera et al. 2008, Duša 2008, Hanson et al. 2001).

Somatické buňky, kromě hepatocytů, přijímají měď transportovanou především CP. Dodanou měď využívají dle svých potřeb pro tvorbu kuproenzymů. Ve většině buněk probíhá kinetika mědi analogicky, avšak některé specifické skupiny buněk nakládají s mědí s určitými rozdíly. Příkladem jsou erythroidní buňky, které mají specifickou schopnost využívat měď pro syntézu hemoglobinu.

Hepatocyty klíčovým způsobem regulují homeostázu mědi a to dvěma způsoby. Zaprvé, většinu mědi v játrech zabudují do specifických proteinů (CP, krevní faktory), zároveň fungují jako úložiště. Zadruhé, nadbytečnou měď (30 – 60 $\mu\text{g}/\text{den}$) nevratně vyloučí hepatobiliární cestou z organismu stolicí. Za normálních okolností se jedná o nejvýznamnější způsob exkrece mědi (98 %), k minoritním cestám exkrece patří odloučené epitelální buňky (nehty, vlasy), sliny nebo moč. K exkreci mědi dochází na apikální, neboli kanalikulární, straně hepatocytu. A právě tato membrána buňky je vybavena množstvím transportních proteinů zodpovědných za eliminaci mědi. V situacích, kdy je mědi opravdu nadbytek, se v játrech popisují útvary typu lyzozomálních vezikul, naplněných mědí, které svůj obsah vyprazdňují přímo do žluče (Collins et al. 2010, Wijmenga a Klomp 2004).

3.2.2. Homeostáza mědi v buňce

Koncentrace mědi v lidské buňce je velmi striktně udržována. Dlouhou dobu byly poznatky o intracelulárním hospodaření s mědí mlhavé a teprve nedávné studie odhalily detailní principy těchto procesů (**Obr. 2**). Stejně tak i moderní výzkumy na „knockout“ myších identifikovaly množství zúčastněných molekul proteinů a chaperonů. Homeostáza mědi v buňce bude charakterizována třemi procesy – příjmem mědi do buňky, subcelulární distribucí a effluxem (Wang a Guo 2006, Harris 2001).



OBRÁZEK 2. OSUD MĚDI V BUŇCE.

Schéma distribuce mědi (zelené kuličky) v buňce. Extracelulární měď je k membráně buňky přinášena extracelulární tekutinou, navázaná na konkrétním přenašeči. Skrz regulovatelný Cu-transportér (CTR1) vniká do buněčného prostředí, kde se o ni dělí jednotlivé chaperony (např. ATOX1 a CCS). Ty měď přerozdělují buněčným organelám, které ji dále využijí (př. tvorba cytochrom c oxidasy, SOD). ATPasové přenašeče (7A, 7B) zajišťují vstup mědi do lumen Golgiho komplexu, kde dochází k zabudování do kuproenzymů (ať už volných nebo membránově vázaných). V situacích, kdy je množství Cu zvýšené nebo při jiných signálech (aktivace NMDA) se ATP7A ve vezikulách pohybuje k membráně a usnadňuje Cu - exkreci.

Převzato z: Lutsenko et al. (2010)

Příjem mědi

Podmínkou transportu dietou přijatého Cu^{2+} iontu přes membránu buněk, je jeho redukce na Cu^+ . Tento předpoklad byl potvrzen mnohými studiemi, které prokázaly kompetitivní inhibici transportu mědi po přidání iontů Ag^+ . Naopak více vazné ionty (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) žádnou překážku v transportu netvořily. Redoxní reakce před vstupem do buňky zajišťuje na buněčném povrchu cytochrom b reductasa (Collins et al. 2010, Maryon et al. 2007, Wang a Guo 2006).

Redukované měďné ionty jsou pak transmembránovými transportéry přeneseny do cytosolu. První systematické studie vstupu mědi do eukaryontní buňky byly prováděny v Klausnerově laboratoři kolem roku 1990 na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Tehdy byl poprvé yCTR odhalen a později definován i u člověka jako hCTR. Selektivní

transportér pro měď (CTR1), který je nejčastěji exprimovaný v játrech, ve střevech, v ledvinách a v srdci. Studie ověřily, že vstup mědi do buňky je proces energeticky nezávislý na hydrolýze ATP (Collins et al. 2010, Eisses a Kaplan 2005).

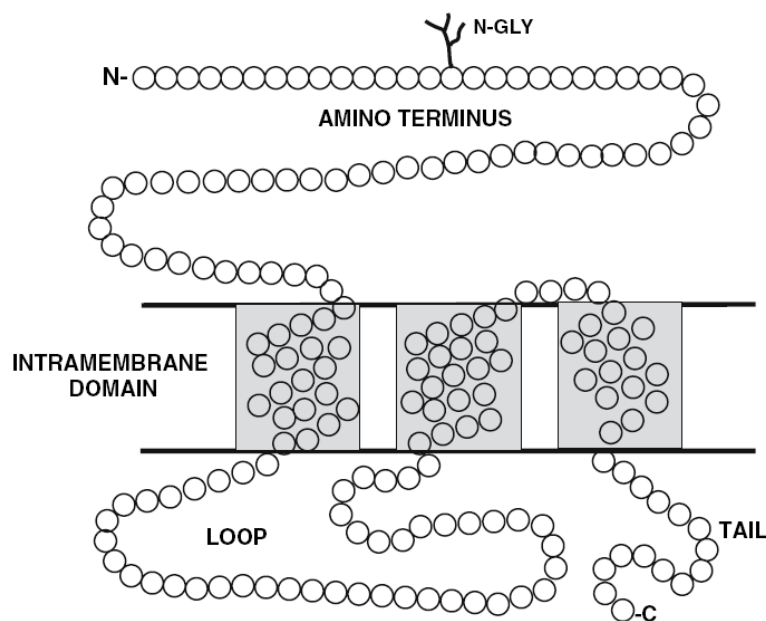
CTR1 se skládá z cca 190 aminokyselinových (AK) zbytků, přičemž převažuje výrazné zastoupení metioninu, cysteinu a histidinu schopných koordinačně vázat měď. Strukturně je CTR1 popisován čtyřmi doménami (**Obr. 3**). První extracelulární N-konec je nejdelší částí proteinu (66 AK zbytků). Patnáctá aminokyselina asparagin nese N-glykosylovaný zbytek, pravděpodobně zodpovědný za vyšší stabilitu proteinu. Sekvence extracelulární části je bohatá na histidinové a metioninové sekvence. Druhou doménu tvoří tři samostatné transmembránové segmenty, vytvářející v membráně póry. Proteinový řetězec uzavírá mezi prvním a druhým transmembránovým segmentem intracelulární smyčku. Ta je tvořena 45 AK zbytky a v porovnání s ostatními částmi řetězce není její sekvence tak konzervativní. Poslední doménou je krátký (15 AK zbytků) intracelulární C - konec, zakončený typickou His - Cys - His sekvencí. Vysoce konzervativní sekvence je pro transportní funkci nezbytná, což bylo mimo jiné dokázáno studii s mutovanými strukturami proteinu (Maryon et al. 2007, Wang a Guo 2006, Eisses a Kaplan 2005).

Vlastní mechanismus transportu přes membránu buňky funguje na principu póru. Měď je k N - konci transportéru přiváděna navázaná na transportní molekule (CP, albumin a další). Vazba mědi na extracelulární část CTR1, která je bohatá na sekvence schopné koordinačně atom mědi připoutat, je impulzem pro konformační změnu transportéru, a to především v oblasti intracelulární smyčky. Význam této konformační změny tkví pravděpodobně v otevření transmembránového póru. Vlastní průnik mědi membránou není příliš objasněn, ale v závěrečné fázi se Cu^+ opět naváže na C - konec transportéru a je připraven pro akceptory, zajišťující subcelulární distribuci. Některé studie přinášejí zajímavé zjištění o prokázané stimulaci transportní činnosti CTR1 zvýšenou hladinou draslíku. Přesto případný Cu^+/K^+ kotransport stále zůstává jen v rovině úvah (Maryon et al. 2007, De Feo et al. 2007, Petris 2004).

Množství transportéru v buněčné membráně i jeho aktivita jsou přímo regulovány hladinou mědi v buňce. Předpokládá se, že při nedostatku mědi dochází ke stimulaci endocytózy prozatím nefungující intracelulární formy transportéru. Nedávná studie s označenými protilátkami proti myší transmembránové CTR1 tento fakt potvrdila. Zvýšené zbarvení se oproti kontrolní skupině projevilo u myších mláďat, krmených

mlékem bez mědi. Naopak zvýšená koncentrace mědi přepravní aktivitu snižuje. Princip regulací je však stále neznámý (Collins et al. 2010, Maryon et al. 2007).

Ačkoliv hraje CTR1 nejdůležitější roli v průniku mědi přes buněčnou membránu, předpokládá se přítomnost také jiných transportérů. Důkazy o tom přináší studie na CTR1 knockoutovaných embryích. Mutovaná embrya umírají již v průběhu gestace, z toho vyplývá nepostradatelnost transportéru pro embryogenezi. Avšak překvapivým zjištěním je fakt, že i u některých zdravých embryích je příjem mědi kompetitivně inhibován dvojmocnými ionty železa, manganu, nejvíce však zinku. Tento způsob přepravy mědi není ještě plně objasněn a možností, které se nabízí je hned několik. Funkci minoritního transportéru pro měď mohou zastávat méně specifické přenašeče kovů, jako transportér DMT nebo Zn - afinitní přenašeč ZIP (Collins et al. 2010, Maryon et al. 2007, Shim a Harris 2003).



OBRÁZEK 3. STRUKTURA hCTR1.

Schéma struktury lidského Cu - selektivního transportéru a jeho čtyř domén – extracelulárního N - konce, tří samostatných transmembránových pórů, intracelulární smyčky a intracelulárního C - konce.

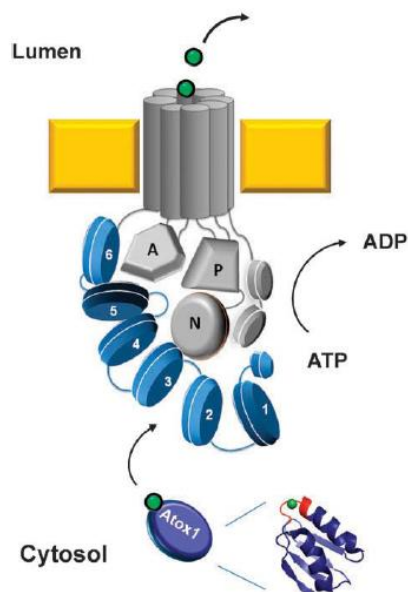
Převzato z: Maryon et al. (2007)

Subcelulární transport

Volné Cu^+ ionty se v buňce vyskytují, pokud vůbec, jen v extrémně nízkých koncentracích. V buněčném prostoru se o atomy mědi a jejich pohyb starají speciální proteiny – chaperony. Ty přebírají měď navázanou na C - terminální část CTR1, transportují ji po buňce a zásobí mědí potřebné organely a umožňují tak na Cu - závislé enzymatické reakce.

V roce 1995 byl jako první identifikován antioxidační protein ATOX1. Strukturně se jedná o malý, kompaktní protein, složený z 68 AK zbytků uzavírající povrchově vystavenou smyčku. Ta obsahuje vysoce konzervativní sekvenci Met-x-Cys-x-x-Cys, ve které cysteiny koordinačně váží měď a metionin celou strukturu stabilizuje. Protein s navázanou mědí má stejnou strukturu, avšak více rigidnější. Funkcí proteinu je detoxikace buněčného prostředí, čemuž odpovídá i zvýšení hladiny ATOX1 u buněk s nedostatkem SOD. ATOX1 spolupracuje se sekrečními drahami Golgiho aparátu, a to především s N - terminálním koncem Cu - ATPas (**Obr. 4**). Nové hypotézy ukazují i na možnou stimulaci katalytického místa ATPas. Kromě toho byl ATOX1 ve velké míře detekován v neuronech, kde se předpokládá možnost protekce před oxidačním stresem (Collins et al. 2010, Wang a Guo 2006, Wijmenga a Klomp 2004, Prohaska a Gybina 2004).

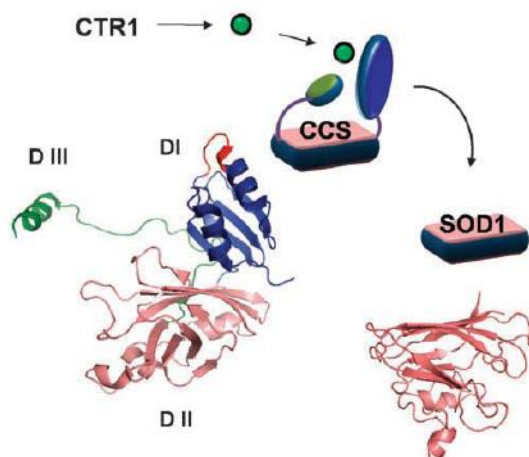
Jako druhý byl popsán CCS (*human copper chaperon for SOD*). Tento rozpustný, především cytosolický protein, je tvořen z 274 AK zbytků. Strukturně je rozdělen do tří odlišných domén – první je zodpovědná za vazbu mědi a opět obsahuje zmíněnou sekvenci Met-x-Cys-x-x-Cys, druhá je strukturní obdobou SOD a nejmenší třetí doména je nezbytná pro funkčnost celého chaperonu (**Obr. 5**). Funkce CCS je pro činnost SOD nepostradatelná. Přináší atomy mědi ke katalytickému místu oxidasy, zároveň usnadňuje tvorbu disulfidické vazby apoenzymu a tím jeho přeměnu na holoenzym. Studie na mutovaných myších bez CCS potvrdily přímý vztah mezi hladinou CCS v cytosolu množstvím SOD, který byl u těchto myší výrazně snížen. Nedostatek chaperonu neovlivňuje jiné buněčné procesy, jako je tvorba CP a další. Koncentrace CCS je v přímé souvislosti s množstvím mědi v buňce – nedostatek mědi vede k velkému zvýšení hladiny tohoto proteinu (Collins et al. 2010, Prohaska a Gybina 2004).



OBRÁZEK 4. CHAPERON ATOX1.

Chaperon ATOX1 v membráně Golgiho aparátu předává atom mědi (zelená kulička) na N - konec Cu - transportéru ATPasy, jejichž aktivita je podmíněna hydrolyzou ATP. Struktura Cu - vázající sekvence ATOX1 (zdůrazněnou červenou barvou) se podobá struktuře jednotlivých ATPasových domén, ve kterých dochází k vazbě mědi.

Převzato z: Lutsenko et al. (2010)

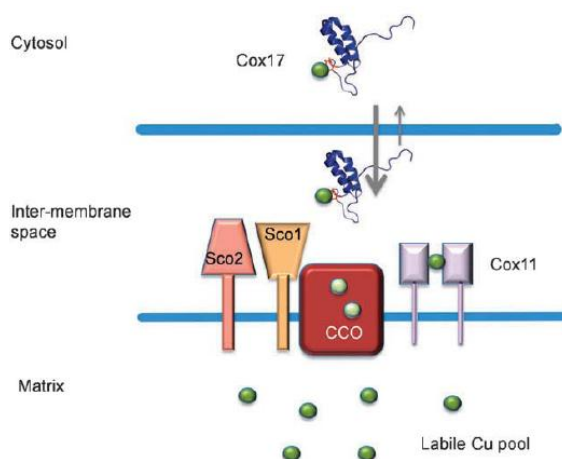


OBRÁZEK 5. CHAPERON CCS A JEHO VZTAH K SOD.

Cytosolický chaperon CCS přejímá měď (zelené kuličky) z transportéru CTR1 a dodává ji SOD. Strukturně je složen ze tří domén (D I – III), z nichž D II je strukturální obdobou samotné SOD. Červená oblast v D I značí Cu - vazebné místo.

Převzato z: Lutsenko et al. (2010)

Třetím známým chaperonem je malý cytosolický protein (68 AK zbytků) – COX17. Má vlásenkovou strukturu, která uvnitř mezi atomy Cys uzavírá vazebné místo pro měď. Jako jediný známý chaperon není COX17 strukturně podobný s cílovým enzymem. Jeho posláním je transportovat měď do mitochondrií, kde je s pomocí dalších membránových proteinů (COX11 a SCO_{1, 2}) zabudována do cytochrom c oxidasy (**Obr. 6**). Studie na myších s geneticky inaktivovaným COX17 podaly důkaz o snížené aktivitě cytochrom c oxidasy (Banci et al. 2010, Collins et al. 2010).



OBRÁZEK 6. CHAPERON COX17.

Chaperon COX17 s navázanou mědí, přenáší měď z cytosolu do intermembranozního prostoru mitochondrie. V tomto prostoru je měď přenesena na transmembránový protein COX11, který je nezbytný pro vznik cytochrom c oxidasy. Stejně tak je nezbytná i oxidoredukční činnost proteinů SCO_{1, 2}. Kromě Cu - vazebných proteinů mají mitochondrie i depo volné mědi v matrixovém prostoru

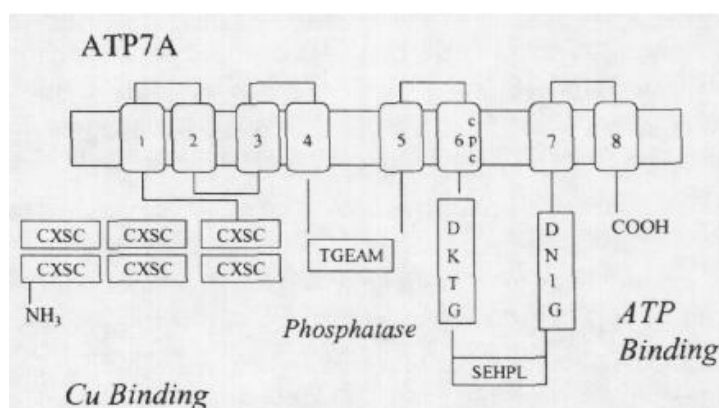
Převzato z: Lutsenko et al. (2010)

Eliminace mědi z buňky

Intracelulární měď přináší své buňce kromě benefitů i určité riziko, jako již zmíněné nebezpečí tvorby volných radikálů. Každá buňka má proto vyvinut vysoce citlivý a efektivní systém ochrany.

Eliminace je spojena s činností antioxidačního chaperonu ATOX1, který měď přímo po vniknutí do buňky přenáší k ATPásovému systému. ATP7A a ATP7B jsou proteiny zodpovědné za regulaci množství mědi v těle. Patří do stejné P1-ATPasové rodiny. Oba jsou transmembránovými proteiny s blízkou molekulovou hmotností (A

175 kDa, B 160 kDa), strukturní příbuzností (65 %) i s identickými sekvencemi a doménami. U obou proteinů je transport iontů mědi přes membránu podmíněn energií, kterou generují defosforylací ATP a následnou fosforylací Asp - zbytku své malé intracelulární smyčky (**Obr. 7**). Přes mnohé podobnosti se však nejedná o „dvojčata“. První náznak odlišností pozorujeme v transportní rychlosti, která je vyšší u ATP7A. Tento důkaz podnítil přesvědčení, že ATP7B je na rozdíl od ATP7A více specializovaný (Lutsenko et al. 2010, Linz a Lutsenko 2007).



OBRÁZEK 7. STRUKTURA ATP7A.

ATP7A je membránový protein s osmi trans - membránovými doménami. Zleva N - terminální konec se šesti sekvencemi pro vazbu mědi. Malá smyčka je katalytickým místem pro fosforylací. Velká smyčka reguluje katalytický cyklus a konformační změny proteinu. Poslední částí je C - terminální konec.

Převzato z: Harris (2001)

ATP7A je transportním proteinem, regulujícím hladinu mědi v organismu již na úrovni enterocytů, kde dochází k její absorpci z potravy. ATP7A na bazolaterální straně enterocytu reguluje efflux Cu^+ ven z buňky směrem do portální krve, respektive příjem mědi do organismu. Díky tomu nefunkčnost ATP7A (např. při Menkesově onemocnění) vede ke zvýšené koncentraci mědi ve střevě a prohlubujícím se deficitu mědi ve vnitřním prostředí. ATP7A se v lidském těle exprimuje ve všech orgánech, kromě jater. Výsledky studií dokazují přítomnost ATP7A v takřka celém embryu během gestace, což zdůrazňuje jeho nepostradatelnou funkci pro homeostázu mědi (Southon et al. 2010, Linz a Lutsenko 2007).

ATP7B je transportérem zaměřeným na exkreci mědi z organismu a játra jsou klíčovým místem, kde k tomuto procesu dochází. ATP7B se podílí na dvou typech

transportu Cu^+ . Zaprvé cestou do Golgiho aparátu, v jehož sekrečních drahách dochází k zabudování mědi do proteinů (př. CP, krevní srážecí faktory). Vedle toho zajišťuje ATP7B exkreční cestu z hepatocytů do žluče. Kromě jater je ATP7B dále exprimován v ledvinách, mozku, bronchiální sliznici i v placentě a prsní žláze. Inaktivace ATP7B (např. při Wilsonově chorobě) je spojena s masivním až toxickým nárůstem koncentrace mědi v játrech a zároveň se snížením hladin kuproenzymů (Southon et al. 2010, Linz a Lutsenko 2007, Wijmenga a Klomp 2004, Prohaska a Gybina 2004).

Hladina obou ATPas úzce koreluje s množstvím mědi v buňce. V rizikových situacích, kdy intracelulární hladina mědi roste, dochází k rychlým reverzibilním avšak rozdílným reakcím u ATPas. Vzestup Cu^+ hladiny způsobí zvýšenou distribuci malých vezikul s ATP7A od Golgiho aparátu směrem k bazolaterální membráně a naopak distribuci větších vezikul s ATP7B na apikální, tedy kanalikulární stranu hepatocytu. V obrácených situacích, při nedostatku mědi, fungují oba procesy opačným směrem. Z toho vyplývá, že v buňkách musí existovat polarizační signály usnadňující orientaci ATPas v buňce, ve skutečnosti o nich však moc informací nemáme (Lutsenko et al. 2010, Linz a Lutsenko 2007).

Malá část Cu^+ není po vstupu do buňky vázána chaperony, ale vytváří komplex s tripeptidem glutationem (GSH). Měď vázaná v tomto komplexu je pak předávána metallothioneinu. Metallothioneiny jsou nízkomolekulární cytoplasmatické polypeptidy s vysokým obsahem kovů a síry. O jejich objev se zasloužili v roce 1957 vědci Margoshes a Vallee. Identifikovali je jako první v kůře ledvin koní, kde metallothioneiny vázaly velké množství kadmia.

Předpokládá se, že jejich významná role tkví v intracelulární fixaci dvoumocných iontů kovů – především zinečnatých, měďnatých a až v menší míře kademnatých a rtuťnatých. Vazba atomů mědi je oproti jiným kovům podstatně silnější a pro její porušení jsou potřeba extrémní podmínky ($\text{pH} < 0,5$ nebo tetrathiomolybdenan amonný jako chelatační činidlo). Metallothioneiny organismu zajišťují regulaci a kontrolu nad volnými ionty kovů a ve svém důsledku poskytují buňkám ochranu před škodlivými účinky toxických kovů. Jsou schopné ionty transportovat na místo potřeby nebo je z buňky eliminovat. S funkcí metallothioneinů souvisí i regulace jejich syntézy. V testech in vivo i in vitro bylo pozorováno výrazné zesílení biosyntézy MT v případech, kdy náhle došlo ke zvýšení kovových iontů. Savčí metallothioneiny se skládají z 60 až 68 aminokyselin s výrazným podílem dvaceti cysteinů (30%). Právě

cysteiny s thiolovou skupinou jsou zodpovědné za vazbu až sedmi atomů již dvoumocných kovů, avšak až 11 – 12 atomů mědi. Molekulová hmotnost proteinu se pohybuje v rozmezí 6 – 7 kDa. V organismu jsou rozšířeny v parenchymatózních tkáních, jako jsou játra, slinivka a střeva. Rozdílné koncentrace MT v organismu jsou ovlivněny mnoha faktory, např. fází vývoje, věkem, dietním režimem a pravděpodobně dalšími, dosud nepoznanými (Wang a Guo 2006, Luza et al. 1996).

3.2.3. Regulace homeostázy mědi

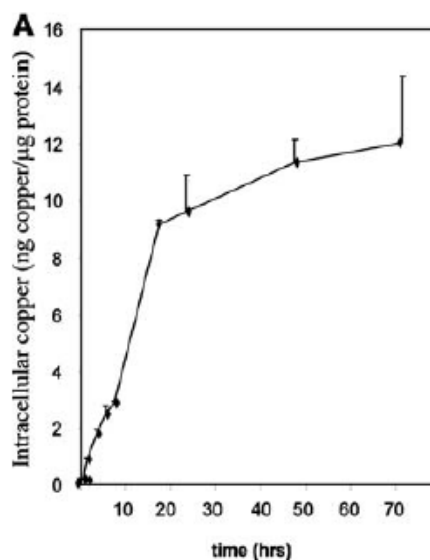
Nadbytek mědi představuje pro organismus velké riziko. Toxický vliv mědi na játra zprostředkovaný volnými radikály, a tedy oxidačním stresem přímo poškozují buněčné komponenty – proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. Nadměrné dávky mědi vyvolávají ve zdravém organismu kaskády reakcí, které brání výkyvům intracelulární mědi. Reakce organismu byly sledovány na mnoha testech *in vitro* na modelové buňce *Saccharomyces cerevisiae* a později i na kultivovaných koloniích myších hepatocytů. Podobnost výsledků měření na obou modelech svědčí o silně konzervativním přístupu ochrany pro mnohé rozdílné organismy.

V jedné studii byly myší hepatocyty inkubovány v prostředí se 100 μM CuCl_2 (**Obr. 8**). Při inkubaci se postupně zvyšovala intracelulární koncentrace mědi v buňkách. Za 24 hodin inkubace byla patrna fáze plató, resp. nasycení. Celkově se množství mědi v buňce zvýšilo 275 krát, a to z hodnoty 0,043 $\text{ng}/\mu\text{g}$ proteinu v čase 0 hodin až na hodnoty 12 $\text{ng}/\mu\text{g}$ proteinu v čase 24 hodin (Muller et al. 2007).

V podobné studii, ale již *in vivo* pily myši po dobu jednoho měsíce vodu s 6 mM CuCl_2 . Intracelulární měď se zvýšila dvojnásobně, ale ve výsledku trpěly jen mírným předávkováním. Nebyly na nich patrné žádné viditelné potíže plynoucí ze stravy s vysokým obsahem mědi, navíc makroskopické ani histopatologické vyšetření neukázalo na poškození organismu, zvláště jater (Muller et al. 2007).

Obecně by se tyto adaptabilní reakce daly rozdělit na dvě fáze. Časná, rychlá reakce, je charakterizována vzestupem metallothioneinů v návaznosti na zvýšení intracelulární koncentraci mědi. Tento vzestup lze pozorovat velmi brzy s maximem po dvou až čtyřech hodinách po zvýšení intracelulární koncentrace mědi. Při druhé, pomalé reakci, (18 – 24 hodin po zvýšení) se indukuje exprese genů, zapojených buď přímo, nebo nepřímo v odpovědi na oxidační stres, např. exprese genů pro tvorbu glutathionu

se až čtyřnásobně zvýší. Dále dochází k expresi genů pro tvorbu antioxidantních proteinů, proteinů tepelného šoku, které renaturují poškozené bílkoviny nebo látek zapojených v ubiquitinaci nevratně poškozených proteinů. Zvýšená aktivace se mimo jiné týká i rodiny cytochromu P 450, konkrétně isoformem 2D a 2C (Muller et al. 2007).



OBRÁZEK 8. ZMĚNY INTRACELULÁRNÍ KONCENTRACE MĚDI V ČASE.

Myší hepatocyty byly kultivovány v médiu se 100 μM CuCl₂. Vzestup intracelulární koncentrace mědi byl měřen plamenovou atomovou absorpční spektrometrií. Měření probíhalo v časech 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 48 a 72 hodin a výsledky byly vztaženy na množství mědi v ng na 1 μg intracelulárních proteinů. Chybové úsečky značí směrodatené odchylky tří měření.

Převzato z: Muller et al. (2007)

V jiných experimentech byly myší hepatocyty inkubovány s chelátory mědi (př. bathocuproin - disulfonová kyselina), které snížily intracelulární koncentraci mědi až na hranici detekovatelné úrovně a způsobily nedostatek mědi v buňce. Výzkumy v této oblasti nepřinášejí jednotné výsledky a závěry. Avšak obecně lze shrnout, že aktivita mnoha kuproenzymů v důsledku nedostatku mědi klesá. Nízké množství mědi v buňce zvyšuje konkurenci chaperonů, a tedy výrazně stimuluje zvýšení jejich hladin. Zvyšuje se citlivost buněk mechanismem stimulace množství i přepravní aktivity hCTR1. Somatická buňka reguluje obsah příjmu Cu - iontů v rozmezí od 5 – 20 μM. 20 μM je zároveň maximální množství, které je buňka schopna přijmout. Mezi příznaky spojené s nedostatkem mědi patřilo snížení tělesné hmotnosti, indukovaná anémie,

hypercholesterolemie, kardiomyopatie, osteomalacie až osteoporóza i poruchy imunity (Maryon et al. 2007, Muller et al. 2007, Bertinato et al. 2003).

Jedna z nejnovějších studií, využívala značené protilátky proti mCTR v testech na myších samcích i samicích trpících nedostatkem mědi, ale i na jejich mláďatech krmených mlékem bez mědi. Oproti kontrolním skupinám byly pozorovány vyšší hladiny CTR v oblasti ledvin, mozku, srdce, střeva, prsní tkáně během gestace a laktace. Interpretace naměřených výsledků je však velmi obtížná díky špatné míře kvantifikace a reakcím protilátek nejen s mCTR1 (Kuo et al. 2006).

3.3. Patofyziologie mědi v lidském organismu

3.3.1. Wilsonova choroba

Wilsonova choroba nebo také hepatolentikulární degenerace nese pojmenování po americkém neurologovi Samueli Alexandr Kinnier Wilsonovi, který ji v roce 1912 jako první charakterizoval.

Jedná se o vzácnou dědičnou autozomálně recesivní poruchu metabolismu mědi. Příčina nemoci byla odhalena až v roce 1993, kdy byl u nemocných objeven mutovaný gen *atb7b*, často nazýván *WND* gen. Lokus pro *WND* gen je na dlouhém raménku 13. chromozomu. Jaterní transportér ATP7B následně selhává a nedodává měď do Golgiho aparátu, v souvislosti s tím se rychle snižuje syntéza a životaschopnost kuproenzymů, včetně CP a značně klesá míra exkrece mědi do žluče. Důsledky selhání vedou 1) ke snížení množství CP, jehož hodnota je zároveň i jedním z diagnostických znaků, 2) k nebezpečné kumulaci mědi v játrech, volné radikály jim navíc způsobují silné oxidační poškození. Extrahepatální kumulace nejvíce poškozuje mozek, ledviny, oční rohovku a mnohé jiné orgány a tkáně v organismu (Burkhead et al. 2011, Roberts a Schilsky 2003).

3.3.1.1. Princip dědičnosti a epidemiologie

Heterozygotní nositelé mutovaného genu jsou zdraví jedinci. Ke klinické manifestaci onemocnění dochází jen v homozygotním stavu. Z principu autozomální recesivní dědičnosti tedy vyplývá, že sourozenci nemocného mají 25 % pravděpodobnost, že mohou být úplně zdraví, stejně jako 25 % pravděpodobnost, že mohou být nemocní a s 50 % pravděpodobností mohou být heterozygotními přenašeči nemoci. U mnoha případů Wilsonovy choroby však nedošlo k dědičnému přenosu vadného genu, ale ke spontánní mutaci zdravého genu u nich samotných (Nevšimalová a Brůha 2006, Stacey a Blachford 2002).

Defektní gen se obecně vyskytuje v populaci velmi často, jeho frekvence je odhadována na 1: 90 – 200 obyvatel. Prevalence onemocnění je v celosvětovém měřítku 1: 30 000 obyvatel. Násobně vyšší četnost onemocnění byla prokázána v oblastech častých příbuzenských sňatků. Nejvyšší endemický výskyt byl pozorován na ostrově

Kréta. V malé vesnici nedaleko města Heraklion byla zaznamenána nejvyšší prevalence defektního genu i nemoci samotné. Vědci sledovali od roku 1978 po dobu 25 let počet nově narozených dětí a nové případy nemocných s WD. Výsledkem bylo zjištění, že na 90 porodů připadlo 6 nových pacientů s WD. Důsledkem toho se v rizikových oblastech doporučuje s větším důrazem intervenovat ve výchově ke zdraví, genetickém poradenství případně novorozeneckém screeningu pro WD (Dedoussis et al. 2005, Roberts a Schilsky 2003).

3.3.1.2. Genetické pozadí nemoci

Od prvního objevu už bylo zjištěno více než 380 různých typů mutací, které jsou příčinou Wilsonovy choroby. Ačkoliv žádnou z mutací vědci nemohou charakterizovat jako nejčastější, některé mutace jsou běžnější i v rámci různých světových populací. Např. nejlépe popsaná varianta typu H1096Q (histidin je na pozici 1 096 zaměněn glutamátem) představuje až 60 % mutací u evropské populace (ČR, Německo, Litva, Maďarsko a další), naproti tomu typ R778L odpovídá za 30 % všech mutací ve východní Asii (Korea, Čína, Japonsko a další). Mnohé mutace jsou velmi vzácné, některé z nich byly popsány jen v určitých státech nebo ostrovech, dokonce i v jednotlivých rodinách. Univerzita v Albertě spravuje nejkompletnější databázi prozatím objevených mutací (Burkhead et al. 2011, Roberts a Schilsky 2003).

Genotypová rozdílnost podmiňuje i různorodost fenotypového projevu. Ale jak se na příkladu geneticky identických jednovaječných dvojčat ukázalo, svou neméně důležitou roli mají i vnější faktory – individuální epigenetické, environmentální a jiné. U jedné z homozygotních sester vyvolala Wilsonova choroba akutní jaterní selhání s neodkladnou potřebou transplantace jater, zatímco druhá s identickou mutací trpěla jen mírným jaterním poškozením. První trpěla anorexií a druhá bulimií, jinak rozdíly v životním stylu takřka neexistovaly. Přesto odlišná progresse onemocnění měla příčinu v tomto detailu – v rozdílném příjmu potravy. Obě podstoupily rehabilitace, jedna úspěšněji (BMI 22) a druhá méně úspěšně (BMI < 20) a právě u této pacientky nastalo akutní jaterní selhání s neodkladnou potřebou transplantace jater (Burkhead et al. 2011, Kegley et al. 2010).

3.3.1.3. Klinický obraz nemoci

Klinický obraz nemoci je velmi proměnlivý. V minulosti se dokonce tvrdilo, že typický obraz Wilsonovy nemoci neexistuje. Ačkoliv je i v dnešní době individuální variabilita nástupu nemoci, projevů i jejich závažnosti velmi vysoká, nemůžeme s historickým tvrzením souhlasit. Neidentifikovatelné asymptomatické období je následováno špatně pozorovatelnými iniciačními symptomy, které bez diagnózy a účinné léčby fulminantně progredují do nebezpečných stádií. Neléčená Wilsonova choroba se pro organismus stává fatální hrozbou (Kolcunová 2011, Ala et al. 2007).

Klinické projevy nemoci se nejčastěji začnou objevovat na přelomu první a druhé dekády života, sporadicky se však může manifestovat v dětském, v dospělém i v senilním věku. Nejmladšímu pacientu s potvrzenou WD byly tři roky, pětiletému dítěti dokonce v důsledku nemoci museli lékaři transplantovat játra. Horní věková hranice pro diagnostiku WD je 40 let, navzdory tomu bývá prováděna i u starších osob a proto nejsou výjimkou šedesátníci s čerstvou diagnózou Wilsonovy nemoci (Nevšímalová a Brůha 2006, Roberts a Schilsky 2003).

Wilsonova nemoc se může manifestovat do 4 základních forem – hepatální, neurologické, psychiatrické a oční včetně jejich vzájemných kombinací (**Tab. 3**).

TABULKA 3. ZÁKLADNÍ MANIFESTACE WILSONOVY CHOROBY.

| FORMA | PŘÍZNAKY |
|----------------------------|--|
| Jaterní forma | Počáteční – steatóza, bolestivost a otok jater Pozdní – akutní/chronická hepatitida, cirhóza a selhání jater |
| Neurologická forma | Počáteční – bolest hlavy, nespavost, zhoršení paměti, mikrografie Pozdní – ataxie, dystonie, tremor, svalová rigidita |
| Psychiatrická forma | Deprese, psychózy, bipolární porucha, změny osobnosti |
| Oční forma | Kayser-Fleischerovy prstence, slunečnicové katarakty |
| Vzácné formy | Endokrinnologické příznaky – amenorea, hypoparathyreoidismus Kardiovaskulární příznaky – kardiomyopatie, arytmie Renální příznaky – aminoacidurie, hyperkalciurie, nefrolitiáza Hematologické příznaky – hemolytická anémie Příznaky na pohybovém aparátu – osteoporóza, osteomalacie Dermatologické příznaky – xeróza, hyperpigmentace, vitiligo |

Hepatální forma WD

Jaterní forma Wilsonovy choroby je typickým projevem dětského a adolescentního věku. Průměrný věk v době diagnózy je 17 let. Příčinou jaterních poškození je nadměrné množství mědi, které se v játrech deponuje.

Asymptomatická stádia jsou detekovatelná jen na biochemické úrovni, charakterizované většinou jen abnormálními hodnotami enzymů. Téměř polovina pacientů rozpoznává první příznaky nemoci právě na jaterních obtížích. Nespecifické symptomy, které zahrnují bolestivost a otok jater, doprovázené horečkou, mohou vést lékaře k mylné diagnóze virové hepatitidy nebo infekční mononukleózy. V iniciálních stádiích se na játrech objevuje mikrosteatóza i neobvyklé, pod ultrazvukem pozorovatelné imunohistochemické skvrny, které vznikají ukládáním mědi v cytosolu hepatocytů (Ala et al. 2007, Nevšimalová a Brůha 2006, Roberts a Schilsky 2003, Stacey a Blachford 2002).

Pokročilé stádia jaterních poškození se můžou manifestovat do několika různých forem (Kodama et al. 2012, Mareček 2009, Ala et al. 2007):

Jaterní makrosteatóza – je sama o sobě němým symptomem, doprovázeným mírnou elevací bilirubinu a transamináz.

Akutní hepatitida – může i o několik let předcházet manifestaci samotné WD, ve většině případů odezní sama i bez terapie.

Chronická aktivní hepatitida – se od jiných typů chronických hepatitid nijak zvlášť neliší. Může být doprovázena zvýšením transaminas a ikterem. Charakteristickým znakem je závažná porucha v krevní koagulaci.

Jaterní cirhóza – je nejčastější formou pokročilé hepatální manifestace. Příznaky zahrnují portální hypertenzi, hepatosplenomegálii, ascites, ikterus a těžkou koagulační poruchu. Onemocnění často rychle progreduje. Vyšetření pro možnost WD by proto mělo být u cirhotiků mladších 45 let automatické.

Fulminantní jaterní selhání – je velmi progresivní, život ohrožující stav. Setkáváme se s ním u velmi mladých, dosud neléčených pacientů nebo naopak u starších nemocných, kteří dlouhodobě přerušili léčbu. Obraz nemoci zahrnuje nebezpečné symptomy, jako hemolytickou anémii nebo silný ikterus. Vyžaduje neodkladnou potřebu transplantace jater.

Jaterní hepatocelulární karcinom byl pozorován u dlouhodobě nemocných. Vzniká pravděpodobně následkem dlouhodobého oxidačního stresu, a tedy jaterního zánětu a cirhózy.

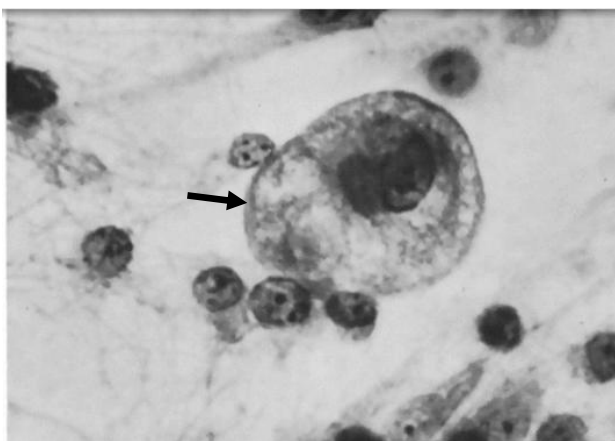
Neurologická forma nemoci

Typickým projevem manifestace neurologické formy WD je nástup příznaků v pozdní adolescenci a v dospělosti. Průměrný věk v době diagnózy je 21 let. Příčinou je opět hromadění mědi v mozku a v nervovém systému.

Počáteční příznaky jsou plíživé a proto mnohdy opomíjené. Zahrnují zprvu nenápadné změny chování, poruchy nálad, zhoršování intelektových funkcí doprovázených pracovními nebo studijními neúspěchy, mikrografii a zhoršení rukopisu. Dalšími nevýraznými symptomy jsou častější bolest hlavy, nespavost, lehký třes, slinění, zhoršení pohybové koordinace (ruka, oko) a dystonie. Čím dříve by došlo

k rozpoznání nemoci, tím rychleji by se mohlo začít s účinnou léčbou. Ve skutečnosti jsou však varovné symptomy nesprávně přičítány doznívající pubertě (Nevšimalová a Brůha 2006, Kicberger et al. 2005, Stacey a Blachford 2002).

Progrese onemocnění je vyvolána postupující degenerací neuronů. Typické velké a vícejaderné Opalskiho buňky (**Obr. 9**) vznikají degenerací astrocytů. Strukturální změny ve formě mozkových lézí jsou patrné v bazálních gangliích, středním mozku a mozečku, zřetelná je i kortikální atrofie bílé hmoty mozkové. Nevýrazné a plíživé symptomy se prohlubují a zviditelňují. Pokročilá neurologická fáze se v mnohém podobá projevům Parkinsonově nemoci – ataxie, svalová rigidita, hypomimie, tremor a nystagmus. Většina nemocných trpí dystonií. Dystonie bývá často zdůrazněna abnormálními emočními nebo stresovými stavy, naopak ve spánku dochází ke zklidnění. V kombinaci se svalovou rigiditou způsobuje dystonie typický výraz obličeje s úšklebkem, včetně hlasových poruch až němoty. Velké spasmy mohou vést k manifestaci epileptických záchvatů. Pacienti zároveň většinou trpí subklinickou jaterní cirhózou (Ala et al. 2007, Nevšimalová a Brůha 2006).



OBRÁZEK 9. OPALSKIHO BUŇKA.

Opalskiho buňka (viz. šipka), typická pro pacienty s WD, vzniká degenerací astrocytů. Opalskiho buňky jsou velké, v průměru až 35 μm , mají jemně zrnitou cytoplasmu a mohou být vícejaderné.

Převzato z: Mossakowski et al. (1971)

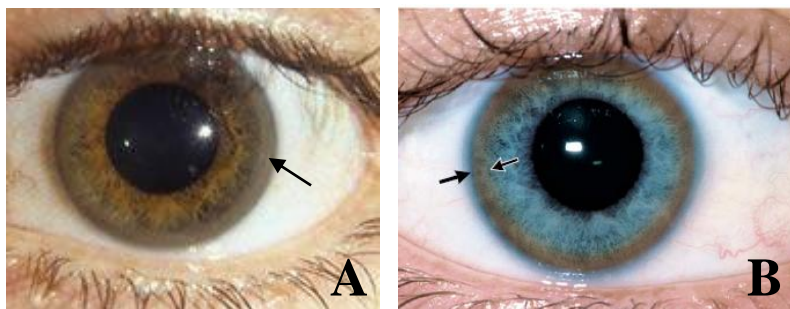
Psychická forma nemoci

Psychiatrické projevy postihují až třetinu nemocných a klinický obraz se mnohdy překrývá s neurologickými problémy. Jsou spojené se změnou osobnosti, životního tempa, zvýšenou iritabilitou a emoční labilitou. Nejčastějším symptomem je deprese (30 – 60%), ale vyskytovat se mohou i úzkostné a psychotické stavy, agrese, bipolární porucha, poruchy příjmu potravy i sexuální exhibicionismus (Carta et al. 2012, Nevšimalová a Brůha 2006, Kicberger et al. 2005).

Oční forma nemoci

Projevem Wilsonovy nemoci je i Keyser - Fleischerův (K - F) prstenec (**Obr. 10**), objevující se u oční duhovky. K - F prstenec je viditelný běžným okem, ale pro přesnější vyšetření se používá štěrbinová lampa. Zrnitý nános mědi, která tvoří prstence, se ukládá ve vnitřní Descemetově membráně, tj. v místě, kde bělima přechází v rohovku. Zlatohnědé kruhy jsou nejdřív patrné při horním okraji oka a postupně obkrouží celou duhovku. Neovlivňují kvalitu vidění. Depozita mědi jsou stejně jako K - F prstence reversibilní, a mizí v případě úspěšné léčby nebo po transplantaci jater. Znovuobjevení pak souvisí se selháním léčby nebo s případným nedodržováním léčebného plánu. K - F prstence patří mezi diagnostické prvky Wilsonovy choroby, ale nesmíme opomenout dvě fakta: 1) Nejsou specifickým symptomem WD, vyskytují se také u vleklých jaterních poruch, jako je chronická cholestáza. 2) Ač jsou prstence patrné u nově diagnostikovaných pacientů s WD, přesto se vyskytují jen 90 % pacientů s neurologickou a psychickou formou nemoci a pouze u 50 % těch, kteří trpí hepatální formou Wilsonovy choroby. U dětí s jaterním poškozením způsobeným WD takřka úplně chybí. Proto absence K - F prstenců nevylučuje diagnózu WD ani u pacientů s převážně neurologickými projevy (Ala et al. 2007, Stacey a Blachford 2002).

Slunečnicové katarakty, opět pozorované štěrbinovou lampou jako pestrobarevné skvrny, představují ložiska mědi v oční čočce. Jsou opět reversibilní a neovlivňují kvalitu vidění. Mezi méně časté doprovodné projevy nemoci patří noční slepota, záněty zrakového nervu nebo strabismus (Ala et al. 2007, Stacey a Blachford 2002).



OBRÁZEK 10. KEYSER - FLEISCHEROVY PRSTENCE.

Na vnějším okraji rohovky (viz. šipky) jsou patrné zlatohnědé kruhy. Jedná se o depozita mědi v Descemetově membráně, tzv. Keyser - Fleischerovy prstence.

Obrázek A – převzato z: Wilson disease association [online]

Obrázek B – převzato z: Schrag a Schott (2012)

3.3.1.4. Stanovení diagnózy

Na vrub bohatého genetického základu, rozmanitého fenotypového projevu a nevýrazných příznaků nemoci je skutečně velmi obtížné stanovit diagnózu. Diagnóza v některých případech falešně ukazuje na jiné onemocnění, v mnohých dalších případech je opožděná a značná část nemocných (až 50%) umírá bez diagnózy na nerozpoznané fulminantní jaterní selhání, juvenilní cirhózu nebo pro nerozpoznané extrapyramidové syndromy v neurologicko - psychiatrických zařízeních (Mareček 2009).

Včasná diagnóza zabraňuje hlubšímu poškození organismu mědí a brzká účinná léčba zlepšuje prognózu nemocných. Nadto preventivní screening predisponovaných jedinců pomůže odhalit a stabilizovat nemoc ještě v asymptomatické fázi nemoci. Skupina Valentina Militaru se snažila odhalit faktory, ovlivňující míru diagnostického zpoždění. Výsledkem jejich bádání bylo, že žádný ze zkoumaných faktorů (jaterní onemocnění, neurologické poruchy, věk, pohlaví, K - F prstence aj.) nezlepšili pravděpodobnost včasné diagnózy (Militaru et al. 2011).

V poslední době byl vypracován přehledný bodový systém hodnocení jednotlivých vyšetření (histologických, biochemických, klinických aj.). I přes potenciální výhody v jednoduchosti, přesnosti a objektivitě měření se neujal. Specialisté se proto stále drží národních, nebo mezinárodních doporučení diagnostiky WD, mezi které patří následující vyšetření (Ala et al. 2007).

Obsah mědi v játrech

Obsah mědi v játrech se hodnotí na vzorku, získaném při technicky náročné biopsii jater. Obsah mědi (μg) se vztahuje na g suché váhy jater a je stále nejlepším biochemickým důkazem WD. Za fyziologických podmínek obsahují játra méně než 55 $\mu\text{g/g}$ mědi. Hodnoty naměřené pacientům s WD jsou vyšší než 250 $\mu\text{g/g}$, ale ani menší obsah mědi než 250 $\mu\text{g/g}$ nemoc nevyklučuje a často poukazuje na heterozygotního přenašeče. U pozdních stádií WD není obsah mědi v játrech stejnoměrný! Falešně pozitivní hodnoty mohou mít játra s chronickou cholestázou, naopak u cirhotických jater byly naměřeny falešně negativní výsledky s nízkým obsahem mědi (Ala et al. 2007).

Na vzorku jaterní biopsie lze pozorovat i změny v morfologii tkáně – steatózy, glykované jádra hepatocytů, nekrózy, fibrózy, nodulární cirrhózy aj. Analýza tak může být užitečným doplňkem k ostatním vyšetřením (Roberts a Schilsky 2003).

Sérová stanovení

Stanovení CP v séru opět patří mezi základní screeningové vyšetření. Měření může probíhat dvojitou metodou – enzymaticky, měření Cu-dependentní oxidasové aktivity nebo imunologicky, pomocí protilátek. Výsledky jsou obecně považovány za rovnocenné, nicméně existuje možnost nadhodnocení imunologické metody, která nerozlišuje holoceruloplasmin a strukturu bez Cu, apoceruloplasmin. Hodnoty CP jsou u 80 % nemocných sníženy, avšak nejsou konstantní ani u zdravých jedinců. Fyziologicky se hladina CP pohybuje v intervalu od 0,2 do 0,5 g/l. U novorozenců a kojenců do 6. měsíce jsou hodnoty velmi nízké, ale po 2. roce života se téměř podobají hodnotám dospělých. Diagnostickým signálem pro WD je koncentrace CP $< 0,2$ g/l. Snížené hodnoty CP mají nemocní s pancytopenií, Menkesovou chorobou, malabsorpčními stavy a aceruloplasminémií. Snížené hodnoty byly naměřeny i heterozygotním přenašečům. Koncentrace CP v séru stoupá při zánětu, v těhotenství i při užívání kontracepce (Ala et al. 2007, Roberts a Schilsky 2003).

Měď, která není v séru vázaná na CP, dosahuje fyziologických hodnot menších než 15 $\mu\text{g/dl}$ séra. U neléčených nemocných se koncentrace mědi zvyšuje nad 25 $\mu\text{g/dl}$. Zvýšené hodnoty mědi nevázané na CP mohou být kromě WD způsobeny i akutním

jaterním selháním nebo intoxikací. Sérová hladina mědi $> 200 \mu\text{g/dl}$ ukazuje na hemolytickou anémii a může souviset s WD (Schilsky 2009, Roberts a Schilsky 2003).

Diagnóza WD s takřka 100 % jistotou může být stanovena u pacientů s akutním jaterním selháním, pokud mají poměr alkalické fosfatázy a bilirubinu nižší než čtyři a zároveň poměr aspartátaminotransferasy a alaninaminotransferasy vyšší než 2,2 (Schilsky 2009).

Stanovení mědi v moči

Měď, která se vylučuje močí, není vázaná na CP a za normálních situací se pohybuje pod hranicí $40 \mu\text{g}$ za 24 hodin (což odpovídá $0,6 \mu\text{mol/24h}$). U pacientů s WD je močová exkrece mědi zvýšená až ke $100 \mu\text{g/24h}$ (což odpovídá $1,6 \mu\text{mol/24h}$). Falešně pozitivních výsledků dosáhli pacienti s chronickým jaterním onemocněním, autoimunitní hepatitidou a heterozygotní přenašeči. Proto byl u dětí standardizován test s D-penicilaminem. Dětem je podávána dávka 500 mg 12 hodin před i během vyšetření. Pokud je následná exkrece mědi vyšší než $1\,600 \mu\text{g/24h}$ (což odpovídá $25 \mu\text{mol/24h}$) má dítě Wilsonovu chorobu. Obdobné testování dospělých však neexistuje (Roberts a Schilsky 2003, Ala et al. 2007)

Další možné metody

Mezi další metody řadíme detekci K - F prstenců, kterou provádí zkušený oftalmolog štěrbinovou lampou. Možnou alternativou je finančně i technicky náročné genetické vyšetření. Toto vyšetření je vhodné u rodin postižených WD, kde napomáhá preventivnímu screeningu. V současné době se provádí vyšetření zaměřené na nejčastěji vyskytující se mutace genů, a tedy ani negativní výsledek nevyklučuje onemocnění způsobného vzácnějším typem mutace. Testy radioaktivní mědi se v České Republice neprovádí (Mareček 2009, Ala et al. 2007).

3.3.1.5. Terapie nemoci

Cíl léčby Wilsonovy choroby je snížit hladinu mědi v organismu k fyziologické hranici, a tak zabránit komplikacím, které nadbytečná měď orgánům a tkáním způsobuje. Do roku 1951 byla Wilsonova nemoc fatální bez jakékoliv možnosti léčby,

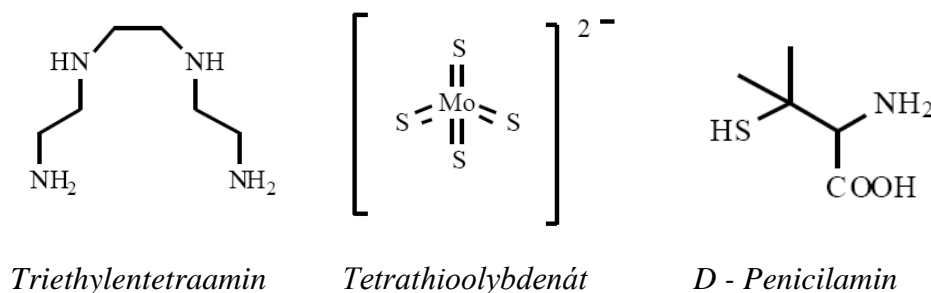
až s použitím prvního chelátoru mědi, intramuskulárně podaného dimerkaptolu, se nemoc stala léčitelnou. Revoluci v léčbě WD však přinesl John Walshe, který v roce 1956 jako první použil k léčbě WD perorálně podávaný D - penicilamin. I dnes je základem terapie WD farmakologická léčba, která však znamená celoživotní terapii. Její nedodržování vede k recidivě symptomů až k jaternímu selhání (Ala et al. 2007, Roberts a Schilsky 2003).

Součástí léčby WD jsou zároveň nefarmakologická opatření. Dieta s nízkým obsahem mědi (do 1 mg/den) má sice jen okrajový význam, ale v prvním roce léčby bývá nařizována striktně. Pacientům je doporučeno vyhnout se potravinám s vysokým obsahem mědi a zároveň bývají poučeni o obsahu mědi v pitné vodě (Mareček 2009, Roberts a Schilsky 2003 Stacey a Blachford 2002).

K dosažení cíle léčby je dnes možné volit mezi několika strategiemi:

Podávání Cu - chelátorů

Chelátory obecně zvyšují rozpustnost mědi, odbourávají její reverzní depozita z tkání a usnadňují exkreci mědi z těla močí. Chelátory mědi (**Obr. 11**) způsobují v úvodu léčby masivní uvolnění mědi z depozit a mohou způsobit přechodné zhoršení neurologických a jaterních příznaků. Základním principem je proto začínat terapii nízkými dávkami a plnou účinnou dávkou lze pacientům podat ve 3. až 5. měsíci. Plný efekt léčby chelátory je možno očekávat s prodlením, a to čtyř až šesti měsíců. Léčba není účinná u nemocných s pokročilým stádiem nemoci, u kterých jsou depozita mědi ireverzibilní. Terapeutický efekt léčby u pacientů s neurologickou formou nemoci není zcela zaručený. V mnohých případech nedocházelo ke zlepšení klinického obrazu, dokonce ojediněle se neurologické symptomy dále zhoršovaly. (Mareček 2009, Nevšímalová a Brůha 2006, Cai et al. 2005).



OBRÁZEK 11. STRUKTURY KLINICKY POUŽÍVANÝCH CHELÁTORŮ MĚDI.

Chemické struktury Cu - chelátorů, využívaných v léčbě WD.

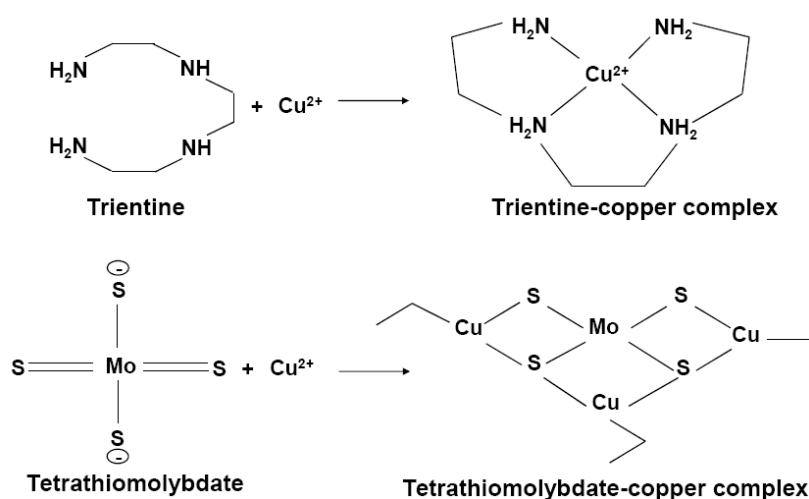
Převzato od Wang a Guo (2006)

D - penicilamin (β , β - dimethylcystein) je lék s největšími zkušenostmi v počáteční i udržovací léčbě WD po celém světě, u mnoha nemocných stále lék volby. Volné thiolové skupiny penicilaminu jsou podmínkou chelatační vazby. Penicilamin navíc stimuluje syntézu metallothioneinu, který poté chrání buňky tím, že ve větší míře naváže intracelulární ionty mědi. Imunosupresivní účinky penicilaminu se využívají v léčbě revmatoidní artritidy. Z farmakokinetického hlediska má penicilamin variabilní biodostupnost (40 – 70 %), která se jídlem ještě o polovinu sníží. Až 80 % penicilaminu je v krevním oběhu navázáno na plazmatické bílkoviny. Exkrece probíhá ze 70 % močí. Terapie se začíná dávkami 150 – 300 mg/den, plná dávka se pohybuje mezi 900 – 1 200 mg/den a je rozdělená do dvou denních dílů podávaných hodinu až dvě po jídle. Používání penicilaminu je spojeno s řadou nežádoucích účinků (NÚ), pro závažné NÚ je až 30 % pacientů donuceno lék vysadit. Mezi časné NÚ (1. – 3. týden léčby) řadíme horečku, vyrážku, neutropenii, trombocytopenii. Pokud se u pacienta objeví tyto časné NÚ, měla by být léčba okamžitě přerušena. Pozdní reakce zahrnují proteinurii jako známku nefrotoxicity, degenerativní změny kůže, poruchy kostní dřeně vedoucí až k aplazii i silné alergické reakce. Narušení pyridoxinového metabolismu přispívá k progeriatrickým změnám. Proto je doporučena pravidelná suplementace vitamínu B₆ v dávce 25 – 50 mg denně (Schilsky 2009, Ala et al. 2007, Stacey a Blachford 2002).

Trientin (2, 2, 2 - triethylentetraamin neboli trien) je šetrnější alternativou penicilaminu, představenou v roce 1969. Používá se při nesnášenlivosti penicilaminu, v zahraničí je dokonce schvalován jako lék volby. V polyaminové struktuře jsou pro

chelatační vazbu nezbytné čtyři vázané atomy dusíku (**Obr. 12**). Oproti penicilaminu má trientin nižší klinickou účinnost v mobilizaci mědi. Biodostupnost trientinu je špatná, jen 1 % trientinu a 8 % aktivního metabolitu acyltrientinu bylo nalezeno v moči. Mezi NÚ řadíme zhoršení neurologických příznaků, výjimečně pancytopenii. Protože trientin vychytává kromě mědi i atomy železa, dlouhodobá terapie může vést k sideroblastické anémii. Pro udržovací terapii slouží dávky 750 – 1 000 mg/den, opět podávané po jídle (Ala et al. 2007, Roberts a Schilsky 2003).

Tetrathiomolybdenan amonný (TTM) je novou perspektivní látkou v léčbě WD ze skupiny chelátorů a navíc se zdá velmi účinný v počáteční léčbě pacientů s neurologickými příznaky (**Obr. 12**). Čtyři sírné funkční skupiny umožňují s mědí vytvořit stabilní produkt. Podání s jídlem vytvoří TTM s ionty mědi nevstřebatelný komplex. Při podání mezi jídly se vstřebá a tvoří větší komplex TTM-Cu-albumin, vylučovaný hepatobiliární cestou z organismu. Tým vědců, vedený Thomasem Brewerem, vedl dvojité zaslepenou studii pro porovnání účinku trientinu a TTM a výsledky byly skutečně povzbudivé. Zatím co trientin u 26 % pacientů zhoršil neurologické příznaky, TTM je zhoršil jen u 4 % z nich. Možným NÚ pacientů léčených TTM je častý vznik epileptických záchvatů a potenciální skeletální poškození. Jako perspektivní se potvrdila kombinace TTM se zinečnatými solemi (Kodama et al. 2012, Schilsky 2009, Brewer et al. 2006, Wang a Guo 2006, Kitzberger et al. 2005).



OBRÁZEK 12. CHELATAČNÍ REAKCE TRIENTINU A TETRATHIOMOLYBDENÁTU

Převzato z: Kodama et al. (2012)

Podávání Zn - solí

Nejčastější alternativou chelátorů jsou v léčbě WD zinečnaté soli, které byly poprvé použity v léčbě WD v roce 1960. Účinkují dvěma mechanismy. Kompetují s mědí o klíčový střevní transportér, proto snižují střevní absorpci mědi a nevstřebaná měď odchází stolicí z organismu. Zinek současně zvyšuje obsah buněčných metallothioneinů, které mají větší afinitu k mědi než k zinku samotnému. Sloučeniny zinku se používají hlavně k udržovací léčbě a ve výhodné kombinaci s penicilaminem zvláště u pacientů s jaterními poruchami. Podávají se nemocným s asymptomatickou fází nemoci. Nemocným se podává třikrát denně 50 mg zinečnatých solí. Typ soli (sírany, acetáty, glukonáty aj.) ovlivňuje žaludeční snášenlivost. Léky se s ohledem na mechanismus účinku doporučují brát s jídlem. Mezi NÚ řadíme dyspepsii, imunosupresi (snížení chemotaxe lymfocytů) a opatrnost se doporučuje u pacientů s poruchou funkce ledvin. Zinečnaté soli nemají na rozdíl od penicilaminu teratogenní účinky, a proto jsou lékem volby u těhotných (Nevšimalová a Brůha 2006, Kitzberger et al. 2005, Roberts a Schilsky 2003).

Transplantace jater

Transplantace jater je možností volby u pacientů s náhlým nebo dlouhodobě nekompenzovaným jaterním selháním. Příznivý vliv transplantace při péči o pacienty s neurologickou formou nemoci je nejistý. První pacient podstoupil kvůli Wilsonově chorobě transplantaci jater před 30 lety a od té doby proběhlo víc než 370 takových operací s úspěšností 79 – 87 % pacientů přežívajících první rok po operaci. Přestože je transplantace možným řešením WD, je zároveň spojena s řadou nepříznivých rizik (rejekce orgánu, dlouhodobá imunosuprese, apod.), a proto by k ní mělo docházet ve skutečně výjimečných případech (Schilsky 2009, Ala et al. 2007).

Dárceem jater, nebo jejich částí se obvykle stává zemřelá osoba. Vzhledem k nedostatku orgánů pro transplantaci se přistoupilo i k variantě živého dárcovství. Tento postup je využíván zejména u dětí, kterým část zdravého orgánu poskytují rodiče. Přesto, že rodiče nemocného jsou obligátní heterozygoti, transplantace se ukázaly jako bezpečné a účinné v metabolismu mědi nemocných. V literatuře nejsou údaje o recidivách nemoci u transplantovaných jedinců (Česká transplantáční společnost, Schilsky 2009, Nevšimalová a Brůha 2006).

Symptomatická a podpůrná léčba

Symptomatická léčba usnadňuje především pacientům s těžkou neurologickou symptomatologií. Extrapiramidové hypokinetické a dystonické projevy tlumí vysoké dávky anticholinergik, u případů symptomatické epilepsie je indikováno antiepileptická léčba. Pro zlepšení kognitivních funkcí lze užít vasodilatancia v kombinaci s nootropiky (Nevšimalová a Brůha 2006).

Mezi podpůrnou léčbu patří kromě zmíněného vitamínu B₆ i vitamin E, jehož sérové hodnoty byly u pacientů s WD nízké. Antioxidační aktivita vitamínu E by měla ve zvýšené míře chránit buňky před volnými radikály. Symptomatické zlepšení pacientů užívajících vitamin E však není podpořeno žádnou studií (Ala et al. 2007).

3.3.1.6. Prognóza nemoci

Před rokem 1951 umírali nemocní do jednoho až šesti let od prvních projevů nemoci. Díky efektivní léčbě se prognóza nemoci zásadně změnila. V případě zahájení léčby v asymptomatické fázi můžeme projevům nemoci zabránit zcela. U naprosté většiny nemocných vede správně řízená léčba spolu s dodržováním dietních opatření k ústupu až vymizení projevů nemoci a nemoc tak není pro většinu pacientů velkým handicapem (Nevšimalová a Brůha 2006, DP ČHS).

3.3.2. Menkesova choroba a Occipital Horn Syndrom

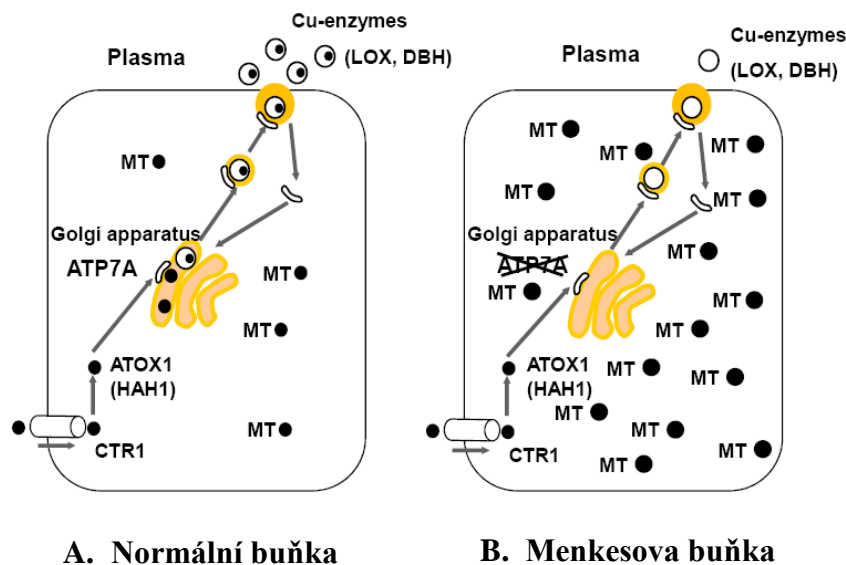
Genetické poruchy spojené s mutací genu *atp7a* lze rozdělit do dvou kategorií – vzácnější mírnější forma Occipital Horn Syndrom (OHS) a klasická Menkesova choroba (MD). Menkes se svým týmem poprvé popsal onemocnění v roce 1962 a o deset let později označil Danks s kolektivem abnormální metabolismus mědi jako pravou příčinu nemoci (Ghosh a Chaudhuri 2012, Tümer a Møller 2010).

Jedná se o multisystémové dědičné onemocnění metabolismu mědi, recesivně vázané na chromozom X. Vadný gen *atp7a*, označovaný i jako *MD* gen, leží v oblasti Xq 13.3. Transportér ATP7A na trans - Golgiho membráně tedy není schopen zajistit nejprve přepravu dietní mědi, což vede k nízkým sérovým hladinám, ani efektivní vylučování mědi. Dochází tak k nadměrné kumulaci mědi v cytosolu enterocytů (**Obr. 13**). MD a OHS jsou převážně systémová onemocnění, zatímco WD postihuje převážně játra (Kodama et al 2012).

Snížené množství mědi lze u pacientů s MD pozorovat v játrech a mozku. Jaterní nedostatek se vysvětluje vysokými požadavky ostatních tkání a orgánů a souvisí opět s poklesem tvorby a životaschopnosti kuproenzymů. Naproti tomu snížené množství mědi v mozku má zcela odlišný a prozatím ne zcela pochopený důvod. Možnou příčinou bude souvislost s transportérem ATP7A. Nejnovější studie poukazují na součinnost ATP7A s N - methyl - D - aspartamovým receptorem. U pacientů s MD je měď sevřena do pasti, z jedné strany hematoencefalickou a ze strany druhé hematolivorovou bariérou. Proto jsou neurony a gliové buňky mědi takřka zbaveny, což vede k progresi neuronální demyelinizace (Tümer a Møller 2010, Kaler 2008).

3.3.2.1. Princip dědičnosti a epidemiologie

Ke klinické manifestaci nemoci podle očekávání dochází jen u mužů, přesto bylo hlášeno několik případů nemocných žen. Heterozygotní nositelky vadného X - chromozomu jsou zdravé. Prevalence MD se na jednotlivých kontinentech liší, přesto je to nemoc vzácná. V evropských zemích se uvádí jako 1: 300 000 živě narozených dětí, v Japonsku ještě méně jako 1: 360 000. Vyšší prevalence je hlášena např. z Austrálie, kde se jedná o 1: 50 000 – 100 000 obyvatel. Prevalence OHS je ještě nižší (Tümer a Klomp 2011, Tümer a Møller 2010).



OBRÁZEK 13. BUNĚČNÝ METABOLISMUS Cu VE ZDRAVÉ A MENKESOVĚ BUŇCE

Měď vstupující do buňky (černé kuličky) přes transportér CTR1 se uvnitř váže na chaperony (ATOX1). Ty jí přivádějí ke Golgiho aparátu, kde za normálního stavu (obrázek A) dojde k zabudování mědi do kuproenzymů – např. LOX a DBH. U Menkesovy buňky (obrázek B), která má geneticky podmíněnou vadu v ATP7A, k zabudování do kuproenzymů nedojde. Množství kuproenzymů výrazně klesá, což je patrné na klinickém obraze nemocného. Měď se hromadí uvnitř buňky, kde se ve zvýšené míře váže na metalothioneiny (MT).

Převzato z: Kodama et al. (2012)

3.3.2.2. Genetické pozadí nemoci

Paleta mutací MD genu je široká – do roku 2012 bylo rozpoznáno více než 357 odlišných mutací. Specifický typ mutace není známý, z 22 %, jsou zastoupeny mutace typu inserce a delece, takřka po 18 % shodně parciální delece, nonsense a missence a mutace. U formy OHS se jedná především o missence mutace. Genetická analýza překvapivě ukazuje, že jen asi 75 % všech postižených pacientů má heterozygotní matky, zatímco u zbytku došlo k novým mutacím MD genu (Kodama et al. 2012).

Mezi typem mutace a klinickým projevem nemoci neexistuje žádný přímý vliv. Nicméně platí, že u pacientů s mírnějším fenotypem (OHS) vedou mutace ke vzniku částečně funkčního proteinu a výsledkem je tedy snížené množství (2 – 5 %) jinak normálního proteinu. Teprve nedávno byly popsány další dvě rodiny, u nichž se v důsledku missence mutací projeví pozdní symptomy X - vázané MD, bez

jakýchkoliv předchozích známek deficitu mědi v organismu (Moizard et al. 2011, Tümer a Klomp 2011).

3.3.2.3. Klinický obraz nemoci

Klinický obraz Menkesovy nemoci je oproti Wilsonově chorobě daleko zřetelnější, zároveň mnohem vážnější.

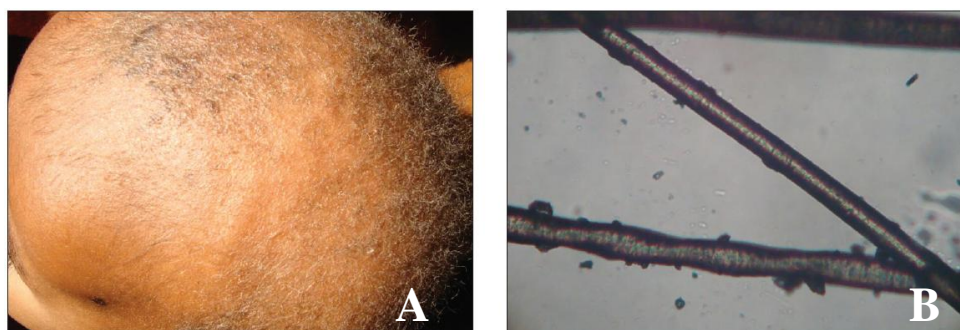
Klasická Menkesova choroba

U pacientů s klasickým typem MD probíhá těhotenství většinou bez komplikací, mnohdy doprovázené předčasným porodem. Při porodu nejsou výjimkou spontánní zlomeniny, cefalohematomy nebo tříselné kýly. V časném novorozeneckém období může být patrný prolongovaný průběh žloutenky, dále hypotermie, hypoglykémie a obtíže s krmením. První výraznější problémy lze vypořádat v průběhu 2. až 4. měsíce života, kdy se nedostatek mědi prohloubí. Zprvu se jedná o nenápadné abnormality jako nedostatek úsměvů, které jsou falešně přičítány na vrub individuálnímu psychomotorickému vývoji. Postupem času se progredují symptomy neprospívání, vývojového opoždění, svalových hypotonií, slabostí končetin i epileptických záchvatů. Motorické dysfunkce vedou k omezení spontánních pohybů, k ospalosti a letargii. Rutinní oftalmoskopie je obvykle normální, ale mnoho matek přichází k lékaři právě proto, že jejich dítě nedokáže sledovat vizuální podnět (Kodama et al. 2012, Tümer a Møller 2010).

Podezřením na diagnózu jsou neurologické symptomy doprovázené charakteristickými změnami vlasů – odtud označení *kinky hair disease* (**Obr. 14**). Hypopigmentované nebo depigmentované vlasy podobné ocelové vlně jsou důsledkem insuficience tyrosinasy. Vlasy jsou řídké až drobné zvláště v oblastech vystavených tření, kde lze pozorovat alopecii. Vyšetření vlasů pod mikroskopem odhalí řadu abnormalit – nejčastěji pili torti (kroucené vlasy až o 180° na ose vlasu), monilethrix (různé průměry na témže vlasu) a trichorrhexis nodosa (zlomeniny vlasu na pravidelné intervaly). Depigmentace se týká také pokožky. Kojenec trpí často seborrhoickou dermatitidou, jeho kůže může být mnohdy volná a suchá (Ghosh a Choudhary 2012, Choudhary et al. 2012).

Mezi další, ne zcela viditelné symptomy patří pokročilá osteoporóza, vaskulární, urogenitální a kosterní abnormality. Anémie souvisí s porušenou funkcí ferroxidasy. V důsledku vadné lysyl oxidasy dochází k defektům cévního řečiště, včetně mozkových tepen a progresivní cévní změny vedou k nedostatečnému zásobení krví, subdurálním krvácením a trombózám. Magnetická rezonance (**Obr. 15**) mozku odhaluje atrofii včetně demyelinizačních procesů (Kodama et al. 2012, Tümer a Møller 2010).

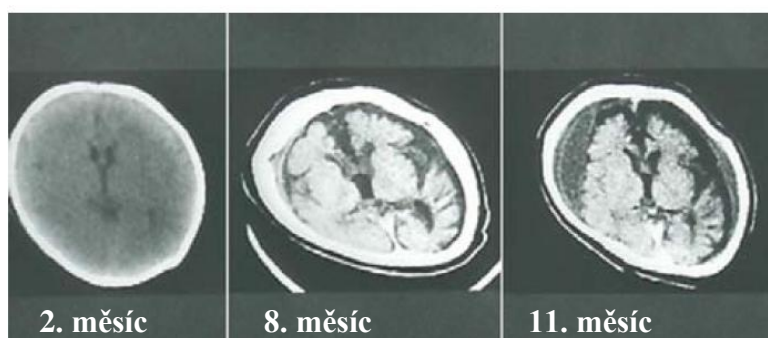
Mezi pozdní projevy nemoci patří slepota, subdurální hematom a respirační selhání. Většina pacientů umírá do třetího roku života v důsledku infekce, vaskulárních nebo degenerativních neurologických komplikací (Tümer a Møller 2010).



OBRÁZEK 14. VLASOVÉ ZMĚNY U PACIENTŮ S MENKESOVOU CHOROBOU.

Na obrázku A jsou patrné hypopigmentované, krátké, řídké, tenké a křehké vlasy temene hlavy. Na obrázku B je mikroskopický detail pili torti (dole), tzv. rotujícího vlasu oproti zdravému vlasu (nahore).

Obrázky převzaty z: Choudhary et al. (2012)



OBRÁZEK 15. CT ZMĚNY U DÍTĚTE S MENKESOVOU CHOROBOU.

CT záznam v druhém měsíci života byl pořízen v důsledku zranění hlavy, v té době ještě nebyla MD diagnostikována a pacient byl zcela bez obtíží. V osmém měsíci byla pacientovi diagnostikována MD, na CT je patrná postupující atrofie mozku. V 11. měsíci lze zpozorovat subdurální krvácení.

Převzato z: Kodama et al. (2012)

Occipital Horn Syndrom

OHS je nejmírnější uznávanou formou MD a jeho hlavní klinické znaky souvisí s pojivovou tkání. Hlavní rozdíl OHS a klasické formy MD lze spatřit při rentgenovém pozorování lebky jako tzv. okcipitální rohy (**Obr. 16**). Jedná se o symetrické klínové kalcifikace v místech uchycení trapézového a sternokleidomastoidálního svalu na okcipitální kost (Kaler online).

Symptomy onemocnění jsou takřka shodné s klasickou formou MD s rozdílem, že neprobíhají tak bouřlivě. Věkový vývoj včetně puberty je normální. Intelekt je u pacientů popisován spodní hranicí normálu. Motorický vývoj je opožděn díky svalové hypotonii a je spojen s typickými těžkopádnými pohyby. Mezi skeletální abnormality zahrnujeme deformity hrudníku, thorakolumbální kyfózu nebo skoliózu. U těchto pacientů jsou častější loketní dislokace a kloubní nestability v důsledku laxních kloubních spojů. Abnormality vlasů i kůže i cévní defekty jsou přítomny ve stejné míře jako MD. Typickým problémem OHS je ortostatická hypotenze, doprovázená ortostatickou synkopou. U pacientů s MD lze pozorovat i atypické divertikly močového měchýře, k jejichž komplikacím patří opakované infekce močových cest nebo spontánní ruptury stěny měchýře. Neuropatologické projevy se v mnohém podobají MD – cerebrální a kortikální ztráta neuronů, redukce bílé hmoty mozkové a generalizované mozkové a mozečkové atrofie (Kaler online, Tümer a Møller 2010, Palmer a Percy 2001).

Přestože je u těchto pacientů naděje na dožití různá, dožívají se podstatně vyššího věku než pacienti s klasickou formou nemoci. Obecně se jedná o desítky let, přesto existují případy pacientů starších padesáti let. Zdravotní stav mnohých – mitrální insuficience, spontánní ablace sítnice či stavy vážné kyfózy – však vyžaduje chirurgické zákroky (Tümer a Møller 2010).



OBRÁZEK 16. OKCIPITÁLNÍ ROH NA RENTGENOVÉM SNÍMKU.

Na rentgenovém snímku lebky lze pozorovat tzv. okcipitální roh (viz. šipka). Jedná se o hlavní klinický znak OHS.

Převzato z: Palmer a Percy (2001)

3.3.2.4. Stanovení diagnózy

Stanovení diagnózy není obtížné v době, kdy se objeví klinické příznaky (neřešitelné záchvaty, abnormality pojivové tkáně, subdurální krvácení aj.). Nicméně v té době je již příliš pozdě na to, aby léčba zabránila progresi neurologických symptomů. Proto je klíčové určit diagnózu a zahájit léčbu, tolik důležitou pro neurologickou prognózu MD, včas. Před dosažením 2. měsíce života je to však obtížné, protože vlasové abnormality a hypotermii mají i zdravé, předčasně narozené děti (Kodama et al. 2012).

Pomocné vyšetření pomocí rentgenu, počítačové tomografie, magnetické rezonance, arteriografie aj. pomohou s rozpoznáním různých klinických projevů MD. Jedná se o osteoporózu a s ní souvisejících častých zlomenin žeber, kosterních ostruh, mozkové atrofie a subdurální krvácení. U pacientů s OHS jsou důležitým prvkem diagnózy okcipitální rohy. Tyto útvary mohou být hmatné už kolem 1. až 2. roku života, ale obvykle jsou patrné a detekovatelné až po 5. roce života. Světelná mikroskopie odhaluje na individuální transformace vlasů (Tümer a Møller 2010).

Podstatným prvkem diagnózy je stanovení množství CP a sérové koncentrace mědi, které bývají značně sníženy. Ale v porovnání s hodnotami zdravých novorozenců jsou důkazy ne vždy přesvědčivé (**Tab. 4**). Rychlou a spolehlivou diagnostickou metodou je orientační určení DBH, které se stanovuje poměrem dopaminu a noradrenalinu, jehož zvýšení je diagnostickým signálem (**Obr. 17**). U pacientů s vrozenou dysfunkcí DBH je

poměr dopaminu k noradrenalinu přibližně 50 : 1, u pacientů s MD je poměr stabilně o něco málo nižší (Kodama et al. 2012, Tümer a Møller 2010, Kaler et al. 2008).

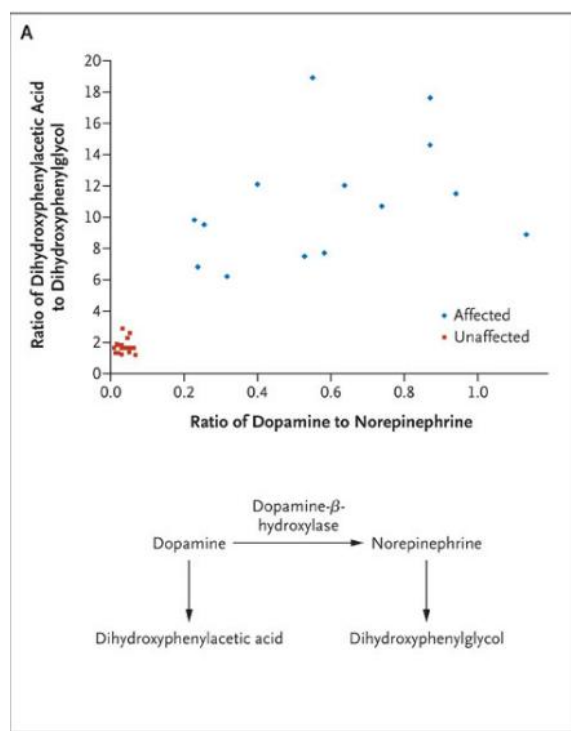
Další biochemický test je založen na intracelulárním hromadění mědi v důsledku nedostačující eliminace. Stanovení se provádí na kultivovaných buňkách pacienta, zejména fibroblastech a lymfoblastech. Kultivace buněk probíhá s radioaktivní mědí (^{64}Cu), obsah mědi v buňkách se hodnotí po 20 hodinách přímé kultivace a po dalších čtyřech hodinách se hodnotí míra eliminace. Přesto se tato analýza neprovádí plošně, vyžaduje totiž práci expertů ve speciálních laboratorních centrech (Ghosh a Choudhary 2012, Kodama et al. 2012, Tümer a Møller 2010).

TABULKA 4. POROVNÁNÍ SÉROVÝCH KONCENTRACÍ Cu A CP.

| Sérová koncentrace | Zdravé dítě | Zdravé dítě (0 – 6 měsíců) | Dítě s MD | Dítě s OHS |
|----------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Měď | 70 - 150 $\mu\text{g/dl}$ | 20 - 70 $\mu\text{g/dl}$ | 0 - 55 $\mu\text{g/dl}$ | 40 - 80 $\mu\text{g/dl}$ |
| Ceruloplasmin | 200 - 450 $\mu\text{g/l}$ | 50 - 220 $\mu\text{g/l}$ | 10 - 160 $\mu\text{g/l}$ | 110 - 240 $\mu\text{g/l}$ |

Upraveno podle Kaler (2010)

Testování gravidních žen nepatří mezi plošné vyšetření těhotných. Matky, heterozygotní přenašečky, jsou typicky asymptomatické, ale v ojedinělých případech (př. náhodná X inaktivace) se u nich mohou projevit neurologické nebo jiné klinické poruchy. V ohrožených rodinách se co nejdříve určí pohlaví plodu, a to pomocí Y - chromozomové specifické DNA sekvence. Typ rodinné mutace může být zjištěn na postiženém přeživším jedinci mužského pohlaví. Pokud je však typ mutace u rodiny neznámý, zůstává prozatím jediná možnost identifikace nemocného jedince biochemickou analýzou. Např. atomovou absorpční analýzou lze detekovat obsah mědi v choriových klíčích, odebraných v prvním trimestru gravidity. Ve druhém trimestru se naakumulovaná měď měří v kultivovaných buňkách plodové vody. Ačkoliv existuje možné úskalí těchto analýz, v Dánském Kennedyho centru je rutinně provádí již od roku 1975 (Kaler 2010, Tümer a Møller 2010).



OBRÁZEK 17. POMĚR DOPAMIN: NORADRENALIN U POTENCIÁLNĚ NEMOCNÝCH

U 36 potenciálně postižených dětí se provedla biochemická diagnostika MD, založená na stanovení poměru dopamin: noradrenalin a dihydroxyfenylactové kyseliny: dihydroxyfenylglykolu. Nedostatek DBH u nemocných s MD způsobuje hromadění proximálních metabolitů biosyntetické dráhy katecholaminů a zjišťované poměry tyto jevy dokazují. Zvýšené hodnoty pomohly oddělit 14 jedinců s MD (modré skvrny) od zdravých 22 jedinců (červené skvrny).

Převzato z Kaler et al. (2008)

3.3.2.5. Terapie nemoci

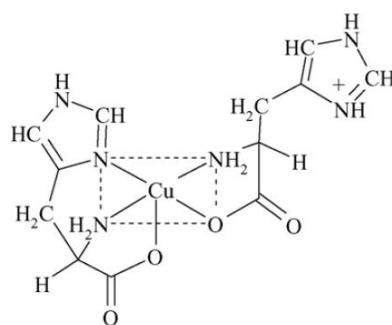
Neléčená Menkesova choroba představuje pro pacienty letální nebezpečí. Účinná symptomatická léčba, kterou představuje přímé podávání mědi, je pro pacienta nezbytná stejně jako péče o něj samotného. Tyto dva faktory zvyšují naději na přežití o 13 i více let.

Abychom dosáhli účinné terapie MD a OHS suplementací mědi musíme splnit tři kritéria (Sheela et al. 2005):

- 1) Terapeuticky podaná měď musí být aplikovaná tak, aby obešla střevní absorpci, ale v systémovém řečišti dosáhla dostatečně účinných hodnot.

- 2) Měď se musí dostat do buňky, aby ji intracelulární enzymy mohly využít jako kofaktor.
- 3) U postižených dětí musí co nejrychleji dojít k identifikaci nemoci a k zahájení léčby, aby se zabránilo progresi nenapravitelných neurodegenerativních změn.

Přijímání dostatečného množství mědi stravou není, stejně jako perorální suplementace mědi, resp. Cu - solemi vhodným řešením dodávání mědi organismu. Parenterální a subkutánní podání je výhodnější, protože obchází poškozenou střevní absorpce. Komplex mědi a histidinu (**Obr. 18**) se postupem let ukázal jako nejúčinnější sloučenina pro léčbu MD. Každodenní terapií se zvyšuje sérová koncentrace mědi i CP, roste i koncentrace mědi v játrech. Dochází ke zlepšení vlasové struktury, pigmentace vlasů i kůže (Kodama et al. 2012, Tümer a Møller 2010).



OBRÁZEK 18. STRUKTURA KOMPLEXU $[Cu(His)_2]$.

Převzato z: Deschamps et al. (2004)

Účinnost terapie na neurologické poruchy je sporná. Při testování na skvrnitých myších, jakožto modelu MD, zabránila neurologickému postižení terapie, která začala do 7. dne po narození, avšak podání Cu - histidinu 10. den bylo již proti neurologickým symptomům neúčinné. Možným vysvětlením může být míra zralosti hematoencefalické a hematolivorové bariéry. Měď podávaná prenatálně a v brzkých postnatálních dnech prostoupí ne zcela vyvinutými bariérami bez problému, což neplatí o prostupu mědi v pozdějším věku. Rozdílný účinek farmakoterapie navíc souvisí i s individuálním typem mutace, resp. závisí na zbytkové aktivitě transportéru ATP7A (Kodama et al. 2012, medicabaze.cz).

Včasně zahájení terapie u narozených dětí zabrání rozvoji silných záchvatů a ataxií a podpoří běžný intelektuální vývoj. Pozdější nástup terapie přece jen může souviset se

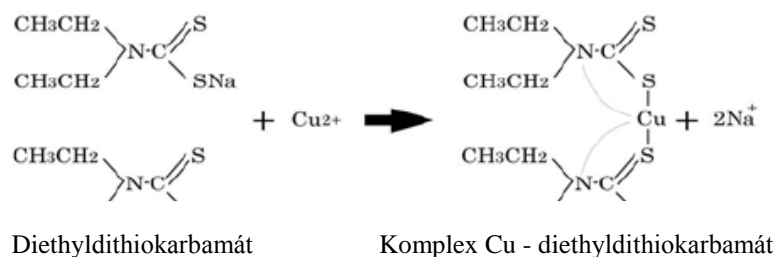
sníženou dráždivostí a frekvencí záchvatů. Ani včasné nasazená léčba však neovlivňuje příznaky typu posturální hypotenze, chronického průjmu ani skeletálních abnormalit u pacientů s OHS (Tümer a Møller 2010, Sheela et al. 2005).

Dlouhodobě podávané Cu - histidinové injekce zvyšují riziko renálního poškození pacienta. Renální toxicita se projevuje zvýšením exkrece mědi i kyseliny močové, tubulární acidózou a aminoacidurií. Nefrotoxicita je reversibilní a postupně mizí do několika let po ukončení terapie. Mezi další NÚ spojené s léčbou patří infekce a zánětlivé kožní reakce v místě vpichu. Tomu lze zabránit používáním tenkých inzulinových stříkaček, které minimalizují nežádoucí reakce pokožky na pravidelné injekce (Kaler et al. 2008, Sheela et al. 2005).

Optimální doba terapie většinou představuje jen 2 – 3 roky nepřetržité léčby. Delší terapie nemusí být žádoucí z ohledu na progredující nefrotoxicitu, navíc myelinizace nervové soustavy bývá obvykle dokončena během prvních dvou let života. Při následném sledování zdravotního stavu pacientů po skončení léčby nebyla potvrzena domněnka opětovného zhoršení symptomů ani po několika letech bez terapie. Někteří rodiče však žádají o dřívější ukončení pro jejich děti neúčinné léčby (Kaler et al. 2008, Sheela et al. 2005).

Perspektivní možnost zlepšení terapie MD a OHS nabízí kombinace Cu - histidinu s diethyldithiokarbamátem (DEDTC). DEDTC (**Obr. 19**) je lipofilní chelátor mědi, který usnadňuje průchod navázané mědi skrz membrány. U zkoumaných myši zlepšil koncentraci mědi v mozku, stejně jako zvýšil mozkovou aktivitu cytochrom c oxidasy a katecholaminů. U tříletého pacienta, který byl po dobu dvou let léčen injekčně podávaným Cu - histidinem a perorálně podávaným disulfiramem, dimerem DEDTC, byl nárůst sérové koncentrace Cu a CP několikrát vyšší než u pacientů s monoterapií Cu - histidinu (Kodama et al. 2012)

Součástí komplexní péče je i parenterální výživa, která zajišťuje nemocnému správný nutriční i kalorický příjem a pomocná léčba symptomů (př. antikonvulzivní terapie aj.)



OBRÁZEK 19. CHELATAČE MĚĎNATÝCH IONTŮ DIETHYLDITHIOKARBAMÁTEM.

Převzato z: Kodama et al. (2012)

3.3.3. Aceruloplasminémie

Snížení sérové koncentrace CP představuje jeden ze symptomů několika nemocí (př. WD i MD). Navíc se také může jednat o dědičné onemocnění, tzv. hypoceruloplasminemii, při níž dochází až k 50 % snížení CP. Avšak v roce 1987 byla u 52 let staré Japonky poprvé popsána úplná absence CP, tzv. aceruloplasminémie (Hellman a Gitlin 2002).

Postižená žena trpěla degenerací sítnice, diabetem mellitem, anémií a neurodegenerativními projevy. Všechny tyto potíže souvisí s absencí CP v séru. Mutace genu kódujícího CP byla zjištěna nejen u ní, ale i u ostatních členů její rodiny. Aceruloplasminémie, byla nejprve označena jako atypická Wilsonova choroba, je charakterizována jako autozomálně recesivní onemocnění související s mutacemi genu pro CP a kompletní nepřítomností apoceruloplasminu i holoceruloplasminu v organismu (Harris 2003).

Membránově vázaný CP hraje v metabolismu železa důležitou roli. Díky feroxidasové aktivitě oxiduje na buněčné membráně železnaté ionty na železité, které se potom vážou na apotransferin. V nepřítomnosti CP je tento proces blokován a železnaté ionty zůstávají uvězněny v buňce. To se navenek projeví snížením sérové koncentrace železa a počínající anémií. Tyto jevy byly potvrzeny i experimentálně na prasatech, kterým se podávala strava bez mědi. Vzniklá mikrocytární hypochromní anémie byla neúspěšně léčena suplementací železa, naproti tomu překvapivé výsledky vyvolala suplementace mědi. Aceruloplasminémie navíc souvisí s přetížením většiny tkání železnatými ionty (Collins et al. 2010, Harris 2003).

Přetížení mozku, konkrétně bazálních ganglií železem se projevuje neurologickými příznaky, objevujících se nejčastěji ve čtvrté až páté dekádě života. Zahrnují různé formy demence, dysartrie a dystonie, které postupem času progredují. Hromaděním železa v pankreatu dojde k ireverzibilnímu poškození β - buněk Langerhansových ostrůvků a k rozvoji inzulin - dependentního typu diabetu, kterým většina nemocných trpí ještě před dřív než jim je diagnostikována aceruloplasminémie. Obdobně kumulace železa v sítnici způsobuje ireverzibilní degeneraci oční retiny a v játrech vyvolává hemochromatózu (Kono et al. 2006, Harris 2003, Hellman a Gitlin 2002).

Aceruloplasminémie je smrtelná nemoc, včasná diagnóza a účinná terapie jsou ve zvládnutí nemoci klíčové. Přítomnost diabetu mellitu I. typu v kombinaci s anémií a neurologickými poruchami by měly lékaře dostatečně varovat. Diagnostika aceruloplasminémie je založena na biochemických testech – stanovení sérové koncentrace CP, feritinu, železa a mědi (Miyajima 2012).

Terapie aceruloplasminémie je založena na symptomatickém snižování hladiny železa v tkáních. Deferoxamin je vysoko afinitní chelátor železa. Snižuje sérovou hladinu feritinu, stejně jako jaterní, mozkové a jiné tkáňové zásoby iontů železa a zvyšuje jejich eliminaci močí. U pacientů léčených deferoxaminem se léčbou zastavila progresse neurologických příznaků, u některých jedinců došlo dokonce k jejich objektivnímu zlepšení. Současně s poklesem tkáňových depozit iontů železa roste koncentrace železa v séru, což přispívá ke zlepšení anémie. Deferoxamin se pacientům podává podkožní infuzí obvykle dvakrát týdně po dobu bezmála jednoho roku. Obvyklá terapeutická dávka deferoxaminu činí 500 mg, ale u tzv. nárazové chelatační zkoušky může dávka dosáhnout až 1,5 g (Loréal et al. 2002, Harris et al. 1998).

Dalším možným způsobem léčby je intravenózní podávání lidské plazmy, která CP obsahuje ve fyziologickém množství. Během několika hodin po infuzi dojde ke zvýšení sérové koncentrace železa. Obsah železa v játrech klesá mnohem více, pokud dojde ke kombinovanému podání plasmy a deferoxaminu (Miyajima 2012).

Kuhn se svým týmem popisují úspěchy s perorálně podávanými Zn - solemi v terapii heterozygotní, přesto nemocné šestnáctileté dívky! Lék na Wilsonovu chorobu byl účinný i u této pacientky. Dávka 50 mg sulfátu zinečnatého byla nemocné podávána čtyřikrát denně a v období 18 měsíců došlo ke zlepšení mnoha symptomů (držení těla, všední aktivity i písmo). Terapie byla pacientkou tolerována bez NÚ (Kuhn et al. 2007).

3.3.4. Neurodegenerativní onemocnění

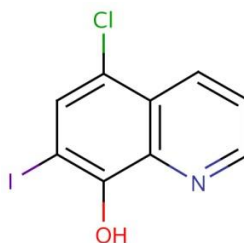
Ionty mědi, spolu s dalšími ionty kovů, nesou odpovědnost za progresi neurodegenerativních onemocnění. Jedná se o Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu, ale i o Huntigtonovu nemoc a amyotrofickou laterální sklerózu.

3.3.4.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova nemoc je neurodegenerativní onemocnění, které způsobuje progresivní ztrátu kognitivních funkcí a neúprosně vede k demenci. Příčinou je vznikající β - amyloid polypeptid, který v mozku vytváří ložiska, v nichž dochází k nadměrnému uvolňování excitačních aminokyselin, které intenzivněji stimulují N - methyl - D - aspartátový receptor.

V amyloidálních ložiscích byly naměřeny vysoké koncentrace kovových iontů, hlavně měďnatých, železitých a zinečnatých. K Cu^{+2} a k Fe^{+3} má β - amyloid polypeptid vysokou afinitu a právě tyto ionty jsou zodpovědné prostřednictvím volných radikálů za neurotoxicitu a kumulaci polypeptidu (Buccosi et al. 2011).

Extrakce mědi z β - amyloidu pomocí vhodného chelátoru tedy znamená novou, perspektivní možnost terapie Alzheimerovy choroby. Takovým to chelátorem může být např. klichinol (**Obr. 20**), který se s vysokou selektivitou váže na ionty mědi, železa a zinku a kompetitivním způsobem je odstraňuje z vazebných míst, čímž podporuje solubilizaci a clearance β - amyloid polypeptidu. Pilotní fáze klinických studií dokazují, že klichinol skutečně snižuje plazmatické hladiny β - amyloidu a zároveň u pacientů zlepšuje kognitivní funkce (Wang a Guo 2006).



OBRÁZEK 20. STRUKTURA KLIOCHINOLU.

Chemická struktura 5- chlor - 7 - jód - 8 - hydroxychinolinu, tzv. klichinolu.

Převzato z: Drugs.com

3.3.4.2. Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je druhým nejrozšířenějším neurodegenerativním onemocněním na světě. Souvisí s degenerací dopaminergních neuronů v substantia nigra. Projevuje se zejména motorickými dysfunkcemi, jako je třes, rigidita, hypokineze a bradykineze. Etiologie nemoci je stále neznámá, mimo jiné závisí na genetických a environmentálních faktorech. Dalším rizikovým faktorem jsou podle nejnovějších studií opět měďnaté a železité ionty (Rivera-Mancía et al. 2010).

Železité ionty se u pacientů nadměrně kumulují v substantia nigra, čímž zvyšují neurotoxicitu. Avšak přímý vliv mědi na progresi Parkinsonovy nemoci není stále plně objasněn. Toxický vliv Cu^{2+} iontů byl popisován u periferních tkání, naopak protektivní účinky byly nalezeny na poškozených neuronech. Hladina mědi je u pacientů s Parkinsonovou chorobou v substantia nigra snižena, ale v retikulárních formacích, v putamenu či v mozečku je množství mědi signifikantně vyšší. Dříve se předpokládalo, že měď negativně indukuje oxidaci a oligomeraci α - synukleinu, výsledky nedávných studií však tvrdí opak a hovoří o tzv. neuroprotektivitě mědi. Dokonce samice potkanů, krmených během těhotenství stravou s nedostatkem mědi, rodily mláďata, která měla snížený obsah dopaminu ve striatu (Rivera-Mancía et al. 2010, Wang a Guo 2006).

K terapii Parkinsonovy choroby asi může přispět chelatace železitých iontů, u kterých se opakovaně prokázal přímý vliv na zvýšení neurotoxicity. U mědi nejsou závěry tak jednoznačné, což opět dokazuje jak je organismus, zvláště mozek náchylný k nedostatku či nadbytku mědi. A právě strategie, vedoucí k obnově rovnováhy v obsahu mědi, představují správný přístup léčby. Rojas a její tým (2009) preventivně podali definovanou směs účinných látek z listů Ginkgo biloby (tzv. směs EGb761, obsahující 24 % flavonoidů a 6 % terpenoidů ve formě ginkgolidů a bilobalidů) testovaným myším, u kterých pak vyvolali pomocí methylfenylpiperidinu Parkinsonovu chorobu. Výsledky byly překvapivé, preventivní užívání EGb761 zabránilo změnám v obsahu mědi ve striatu, středním mozku a hippocampu. Zatímco podávání chelátorů (př. trientinu) neurotoxické symptomy nemoci více prohlubovaly (Rivera-Mancía et al. 2010, Rojas et al. 2009).

4. Diskuze

Na poli výzkumu v oblasti fyziologie a patofyziologie iontů mědi došlo v průběhu několika desítek let k obrovskému rozmachu, jež stojí za množstvím nových poznatků, a který stále ještě není u konce. Díky většímu množství stále sofistikovanějších analytických metod můžeme snáze rozluštit záhady, které obklopovaly a v mnohých oblastech stále obklopují působení mědi v lidském organismu. Více se tedy zdokonaluje naše představa o funkci mědi v organismu, jednotlivých prvcích metabolismu i homeostázy.

Přestože obecný náhled a pochopení fyziologické role v organismu jsou již známy, mnohé otázky zůstávají i nadále nezodpovězeny. Jak konkrétně prostupuje měď buněčnou membránou? Na čem přesně závisí regulace Cu - homeostázy? Proč jsou výsledky mnoha studií rozporuplné a nejednoznačné? Výzkum úlohy mědi v organismu člověka je velmi náročný, a to nejen po finanční stránce. Mnohé vzorky tkání nebo orgánových soustav, jsou obtížně získatelné a mnohé lze zkoumat až postmortálně. Výzkumy probíhají na rozdílných organismech, a to jak na zvířecích modelech třídy savců, tak na jednoduchých organismech, kterými jsou v tomto případě většinou kvasinky. Extrapolace získaných výsledků na člověka je velmi svízelná a obtížná. Navíc patrné rozdíly lze pozorovat i na jedincích téhož druhu, např. na lidech různých etnik. Obtížně detekovatelné množství stopového prvku v biologických vzorcích vyžaduje skutečně citlivé metody. Navíc je ve výzkumu potřeba se zaměřovat na stále menší a detailnější struktury, kterými jsou např. jednotlivé transportéry a Cu - chaperony, jejich funkci, vlastnosti i regulaci.

Komplexní pochopení fyziologie mědi nám usnadní lépe porozumět opačným stavům, tedy nemocem, které s porušeným metabolismem a homeostázou mědi souvisí. Diagnostika a léčba Wilsonovy a Menkesovy choroby dosáhla v posledních desetiletích velkých pokroků. Přesto i dnes je diagnostika pacientů s WD a MD mnohdy nesprávná nebo opožděná. Standardní postupy a jednoduché diagnostické metody jsou stále propracovanější, nicméně jsou rozšířeny často jen v ordinacích specialistů, přestože praktičtí a dětští lékaři jsou mnohdy prvními odborníky, na které se rodiče nemocného nebo sám nemocný s problémy obrátí. Náročné individuální metody (př. genetická vyšetření) slouží jednotlivým rizikovým pacientům. Nadějně řešení představuje

mezinárodní „guidelines“ – standardní postupy v metodice diagnostických vyšetření. Ty, které existují, však nejsou kompletní, ani zcela mezinárodně uznávané a používané. Terapie WD a MD je obvykle opožděná a často svízelná. Ani u jedné z nemocí není dostupná léčba dostatečně účinná na všechny projevy nemoci, navíc bez NÚ. U obou nemocí jsou ve výzkumu nové, terapeuticky nadějnější molekuly (TTM a DEDTC). Výzkum nových chelátorů mědi jakožto účinných léčivých látek, optimálních lékových forem i nových kombinací jednotlivých léčivých látek přináší v terapii WD i MD perspektivní řešení a mohou pomoci tyto nemoci účinněji, bezpečněji a snadněji léčit.

Pochopení funkce mědi u ostatních neurodegenerativních nemocí, kterými jsou hlavně Alzheimerova demence a Parkinsonova choroba, nám pořád z části uniká. Terapie, kompenzující patologické změny iontů mědi i železa, představuje pro pacienty novou, perspektivní možnost léčby, byť je prozatím stále ve výzkumu.

Tyto a další podrobné studie o vzájemném vztahu Cu - homeostázy a fyziologických procesů, budou stále přinášet nové a nadějně terapeutické možnosti.

5. Závěr

Tato diplomová práce podrobně shrnuje současné poznatky o mědi na úrovni lidského organismu.

Měď představuje důležitý stopový prvek organismu. Jako kofaktor kuproenzymů zajišťuje mnoho fyziologických funkcí, včetně buněčného dýchání, syntézy neurotransmiterů, tvorby pojivových tkání a melaninu, krvetvorby, hemokoagulace a mnoha dalších. Na druhé straně je ve vysokých koncentracích sama toxická. Podporuje totiž vznik volných radikálů.

Udržení optimální Cu - homeostázy v lidském organismu je proto velmi důležitým aspektem. Dostatečný příjem mědi je zajištěn pestrou stravou. Nejdůležitějším orgánem řídícím kinetiku Cu v organismu jsou játra. Víme, že v nich dochází 1) k zabudování mědi do apoenzymů (př. CP, srážecí faktory), 2) uskladňování mědi (př. MT) a 3) k efektivní eliminaci mědi hepatobiliární cestou z organismu. Vstup mědi do buňky je zajištěn dobře prostudovaným specifickým přenašečem CTR1. Specifické Cu-chaperony (př. ATOX1, CCS, COX17), poté odevzdávají intracelulární měď proteinům, které měď buď zabudují do své struktury a stanou se tak kuproenzymy (SOD, cytochrom c oxidasa) nebo ji transportují z buňky (ATPasy). Celý mechanismus je velmi citlivě a efektivně regulován vnitřními mechanismy, poznáno bylo ale jen několik z nich. Nadbytek mědi je ve zvýšené míře vyvážen MT a GSH. Nedostatek mědi naopak zvyšuje přepravní aktivitu CTR1 i množství intracelulárních chaperonů.

Geneticky podmíněné vady klíčových ATPas (ATP7A a ATP7B) vedou k progresi nemocí, souvisejících s narušeným metabolismem mědi.

Wilsonova choroba (WD) je autozomálně recesivní genetická vada genu, kódujícího transportér ATP7B, což má za následek snížení exkrece mědi a pokles tvorby CP. Měď se kumuluje v játrech, které oxidativním působením poškozují, ale i v mozku, ledvinách a jiných orgánech. Díky klinickým projevům nemoci lze charakterizovat různé formy nemoci – nejčastěji hepatální, ale i neurologická, psychická a oční forma, včetně jejich vzájemných kombinací. Kauzální terapie má za cíl snížit obsah mědi v organismu. Používají se k tomu chelátory mědi (D - penicilamin a trientin) nebo Zn - soli. Možným, ne však ideálním řešením je kompletní transplantace jater nemocného.

Mnohem závažnější onemocnění způsobuje poškození genu, kódujícího ATP7A – Menkesova choroba (MD). Toto gonozomálně recesivní onemocnění je vázané na chromozom X a postihuje především mužskou linii populace. MD je charakterizovaná naopak nedostatkem sérové koncentrace mědi v organismu i zvýšenou kumulací mědi v cytosolu buněk. Nemoc se klinicky projevuje dříve než WD a to hlavně defekty pojivových tkání a cévního řečiště, neurodegenerativními příznaky, kožními a vlasovými abnormalitami a anémií. Symptomatickým injekčním podáváním Cu - histidinového komplexu byla dosažena optimalizace sérových koncentrací mědi i CP. Zároveň došlo k objektivnímu zlepšení většiny symptomů nemoci, ne však neurologických projevů.

Mezi další nemoci, související s poruchou Cu - homeostázy patří Alzheimerova demence, Parkinsonova choroba, Huntingtonova chorea a další nemoci, u nichž není prozatím úloha mědi zcela přesně vysvětlena.

7. Použité zdroje

7.1. Odborné časopisy

1. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease Lancet 2007;369:397-408.
2. Angelova M, Asenova S, Nedkova V, Koleva - Kolarova R. Copper in the Human Organism. Trakia Journal of Sciences 2011;9(1):88-98.
3. Bachurin SO, Byzova NA, Dubova LG, Yaropolov AI. Monooxidase Catalysis of Amine Oxidation by Organic Electron Acceptors. Doklady Akademii Nauk 2001;376(2):200-203.
4. Banci L, Bertini I, Cantini F, Ciofi-Baffoni S. Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach. Cellular and Molecular Life Sciences 2010;67:2563-2589.
5. Bertinato J, Iskandar M, L'Abbe MR. Copper Deficiency Induces the Upregulation of the Copper Chaperone for Cu/Zn Superoxide Dismutase in Weanling Male Rats. The Journal of Nutrition 2003;133:28-31.
6. Brewer T et al. Treatment of Wilson Disease With Ammonium Tetrathiomolybdate – Comparison of Tetrathiomolybdate and Trintine in a Double-blind Study of Treatment of Neurologic Presentatin of Wilson Disease. American Medical Association – Archives of Neurology 2006;63:521-527.
7. Buccosi S et al. Copper in Alzheimer's disease: A Meta-Analysis of Serum, Plasma and Cerebrospinal Fluid Studies. Journal of Alzheimer's Disease 2011;24:175-185.
8. Burkhead JL, Gray LW, Lutsenko S. System biology approach to Wilson's disease. Biometals 2011;24:455-466.
9. Cabrera A et al. Copper binding components of blood plasma and organs and their responses to infix of large doses of ⁶⁵Cu, in the mouse. Biometals 2008;21:525-543.
10. Cai L, Li XK, Song Y, Cherian MG. Essentiality, Toxicology and Chelation Therapy of Zinc and Copper. Current Medicinal Chemistry 2005;12:2753-2763.

11. Cardillo S, De Iuliis A, Battaglia V, Toninello A, Stevanato R, Vianello F. Novel copper amine oxidase activity from rat liver mitochondria matrix. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 2009;485:97-101.
12. Carta MG et al. Bipolar disorders and Wilson's disease. *BMC Psychiatry* 2012;52(12):1-7.
13. Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews* 2010;68(3):113-147.
14. De Feo ChJ, Aller SG, Unger VM. A structural perspective on copper uptake in eukaryotes. *Biometals* 2007;20:705-716.
15. Dedoussis GV et al. Wilson disease: high prevalence in a mountainous area of Crete. *Annals of Human Genetics* 2005;69:268-274.
16. Deschamps P, Kulkarni PP, Gautam-Basak M, Sarkar B. The saga of copper (II) – L-histidine. *Coordination Chemistry Reviews* 2005;249:895-909.
17. Dockray GJ, Varro A, Dimaline R, Wang T. The Gastrins: Their Production and Biological Activities. *Annual Review of Physiology* 2001;63:119-139.
18. Eipper BA, Stoffers DA, Mains RA. The Biosynthesis of Neuropeptides: Peptide alpha-Amidation. *Annual Review of Neuroscience* 1992;15:57-85.
19. Eisses JF, Kaplan JH. The Mechanism of Copper Uptake Mediated by Human CTR1. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(44):37159-37168.
20. Ghosh S, Chaudhuri S. Menkes kinky hair syndrome: A Case Report. *Dermatology Online Journal* 2012;18 (11):4.
21. Goldstein DS. Catecholamine 101. *Clinical Autonomic Research* 2010;20:331-352.
22. Griffiths TAM, Mauk AG, MacGillivray RTA. Recombinant Expression and Functional Characterization of Human Hephaestin: A Multicopper Oxidase with Ferroxidase Activity. *Biochemistry* 2005;44:14725-14731.
23. Hanson SR, Donley SA, Linder MC. Transport of silver in virgin and lactating rats and relation to copper. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2001;15(4):243-253.
24. Harris ED. Copper Homeostasis: The Role of Cellular Transporters. *Nutrition Reviews* 2001;51(9):281-285.
25. Harris ED. Iron-Copper Interactions: Some New Revelations. *Nutrition Reviews* 1994;52(9):311-315.

26. Harris ED. Copper as a Cofactor and regulator of Copper, Zinc Superoxide Dismutase. *The Journal of Nutrition* 1992;122:636-640.
27. Harris ZL. Aceruloplasminemia. *Journal of the Neurological Sciences* 2003;207:108-109.
28. Harris ZL, Klomp LWJ, Gitlin JD. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *The Journal of Clinical Nutrition* 1998;67:972-977.
29. Harvey L. Clinical review - Disorders of copper metabolism. *GP* 2005;55-56.
30. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition* 2002;22:439-458.
31. Hooper KL, Joneja B, White HB, Thorpe CA. Sulfhydryl Oxidase from Chicken Egg White. *The Journal Of Biological Chemistry* 1996;271(48):30510-30516.
32. Chen H et al. Hepaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in six-linked anemia mice. *Blood* 2004;103:3933-3939.
33. Cheshire WP, Dickson DW, Nahm KF, Kaufmann HC, Benarroch EE. Dopamine β -hydroxylase deficiency involves the central autonomic network. *Acta Neuropathology* 2006;112:227-229.
34. Choudhary SV, Gadegone RW, Koley S. Menkes Kinky Hair Disease. *Indian Journal of Dermatology* 2012;57(5):407-409.
35. Julien S et al. Tyrosinase biosynthesis and trafficking in adult human retinal pigment epithelial cells. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2007;245:1495-1505.
36. Kaler SG et al. Neonatal Diagnosis and Treatment of Menkes Disease. *New England Journal of Medicine* 2008;358(6):605-614.
37. Keele BB, McCord JM, Fridovich I. Further Characterization of Bovine Superoxide Dismutase and Its Isolation from Bovine Heart. *The Journal of Biological Chemistry* 1971;246(9):2875-2880.
38. Kegley KM, Sellers MA, Ferber MJ, Johnson MW, Joelson DW, Shrestha R. Fulminate Wilson's Disease Requiring Liver Transplantation in One Monozygotic Twin Despite Identical Genetic Mutation. *American Journal of Transplantation* 2010;10:1325-1329.
39. Khlgtian MK et al. Tyrosinase Gene Expression is Regulated by p53. *The Society for Investigative Dermatology* 2002;118:126-132.

40. Kitzberger R, Madl Ch, Ferenci P. Wilson Disease. *Metabolic Brain Disease* 2005;20(4):295-302.
41. Kodama H, Fujisawa Ch, Bhadhprasit W. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanism, Diagnosis and Treatment. *Current Drug Metabolism* 2012;13:237-250
42. Kono S et al. Hepatic Iron Overload Associated With a Decreased Serum Ceruloplasmin Level in a Novel Clinical Type of Aceruloplasminemia. *Gastroenterology* 2006;131:240-245.
43. Kuhn J, Bewermeyer H, Miyajima H, Takahashi Y, Kuhn KF, Hoogenraad TU. Treatment of symptomatic heterozygous aceruloplasminemia with oral zinc sulphate. *Brain & Development – Official Journal of the Japanese Society of Child Neurology* 2007;29:450-453.
44. Kuo YM, Gybina AA, Pyatskowitz JW, Gitschier J, Prohaska JR. Copper Transport Protein (CTR1) Levels in Mice Are Tissue Specific and Dependent on Copper Status. *Journal of Nutrition* 2006;136(1):21-26.
45. Lech T, Sadlik JK. Copper concentration in Body Tissues and Fluids in Normal Subjects of Southern Poland. *Biological Trace Element Research* 2007;118(1):10-15.
46. Lintz R, Lutsenko S. Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2007;39:403-407.
47. Loréal O et al. Aceruloplasminemia: new clinical, pathophysiological and therapeutical insights. *Journal of Hepatology* 2002;36:851-856.
48. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006;63:2304-2316.
49. Lutsenko S, Bhattacharjee A, Hubbard AL. Copper handling machinery of the brain. *Metallomics* 2010;2(9):596-608.
50. Luza SC, Speisky HC. Liver copper storage and transport during development: Implications for cytotoxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1996;63(5):812.
51. Maryon EB, Molloy SA, Zimnicka AM, Kaplan JH. Copper entry into human cells: progress and unanswered questions. *Biometals* 2007;20:355-364.
52. Militaru V et al. The delay of the diagnosis in Wilson's disease. *Clujul Medical* 2011;84:274-277.

53. Mladenka P, Hrdina R, Hübl M, Simůnek T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2005;48(3-4):124-135.
54. Moizard M-P et al. Twenty-five novel mutations including duplications in the *ATP7A* gene. *Clinical Genetics* 2011;79:243-253.
55. Mossakowski MJ, Borowicz JW, Krašnicka Z, Gajkowska J. Ultrastructure of Opalski cells cultured in vitro. *Acta Neuopathologica* 1971;19(4):301-306.
56. Muller P, van Bakel H, van de Sluis B, Holstege F, Wijmenga C, Klomp LWJ. Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *Journal of Biologic Inorganic Chemistry* 2007;12:495-507.
57. Mukhopadhyay ChK, Attieh ZK, Fox PL. Ceruloplasmin in Cellular Iron Uptake. *Science* 1998;279:714-717.
58. Palmer ChA, Percy AK. Neuropathology of Occipital Horn Syndrome. *Journal of Child Neurology* 2001;16(10):764-766.
59. Petris MJ. The SLC31 (CTR) copper transporter family. *European Journal of Physiology* 2004;447:752-755.
60. Prohaska JR, Gybina AA. Intracellular Copper Transport in Mammals. *The Journal of Nutrition* 2004;134(5):1003-1007.
61. Racek J, Holeček V. Enzymy a volné radikály. *Chemické listy* 1999;93:774-780
62. River-Mancía S, Pérez-Neri I, Ríos C, Tristán-López L, Rivera-Espinosa L, Montes S. The transition metals copper and iron in neurodegenerative disease. *Chemico-Biological Interactions* 2010;186:184-199.
63. Roberts EA, Schilsky ML. A Practice Guideline on Wilson Disease. *AASLD Practice Guidelines – Hepatology* 2003.
64. Rojas P, Montes S, Serrano-García N, Rojas-Castaneda J. Effect of EGb761 supplementation on the content of copper in mouse brain in an animal model of Parkinson's disease. *Nutrition* 2009;25(4):482-485.
65. Rucker RB, Rucker BR, Mitchell AE, Chang Tai Cui et al. Activation of Chitotriosidase in response to dietary copper. *The Journal of Nutrition* 1999;129:2143-2146.

66. Sheela SR, LathaM, Liu P, Lem K Kaler SG. Copper-replacement treatment for symptomatic Menkes disease: ethical considerations. *Clinical Genetics* 2005;68:278-283.
67. Shim H, Harris ZL. Regulation of Intracellular Trace Element Metabolism – Genetic Defects in Copper Metabolism. *The Journal of Nutrition* 2003;133:1527-1532.
68. Schilsky ML. Wilson disease: Current status and the future. *Biochimie* 2009;91:1278-1281.
69. Schrag A, Schott JM. Kayser-Fleischer Rings in Wilson's Disease. *The New England Journal of Medicine* 2012;366:18.
70. Southon A, Palstra N, Veldhuis N, Gaeth A, Robin Ch. Burke R, Camakaris J. Conservation of copper-transporting P(IB)-type ATPase function. *Biometals* 2010;23:681-694.
71. Stacey E, Blachford L. Wilson disease. *The Gale Encyclopedia of Genetic Disorders* 2002;2:1198-1202.
72. Tümer Z, Klomp L. Clinical utility gene card for: Menkes disease. *European Journal of Human Genetics* 2011;19.
73. Tümer Z, Møller LB. Menkes disease. *European Journal of Human Genetics* 2010;18:511-518.
74. Wang K, Chen X, Cui Y, Gao X. The reference interval of zinc, copper, selenium and zinc/copper ratio of healthy adult in Licang. *The Elements and Electrolytes* 2011;28(1):1-10.
75. Wang T, Guo Z. Copper in Medicine: Homeostasis, Chelation Therapy and Antitumor Drug Design. *Current Medicinal Chemistry* 2006;13:525-537.
76. Wijmenga C, Klomp LWJ. Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proceedings of the Nutrition Society* 2004;63:31-39.

7.2. Knihy

1. Duška F. Biochemie v souvislostech, I. díl – základy energetického metabolismu. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2006:29-34. ISBN 80-246-1116-3.
2. Moore MR, Imray P, Dameron Ch, Callan P, Langley A, Mangas S. Copper. National Environmental Health Forum – Metal Series. Brisbane: Openbook publisher, 1996:1-110.
3. Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. Biochemie pro studující medicíny I. díl. 2. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1416-8.
4. Silbernagl S, Lang F. Atlas patofyziologie člověka. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2001. ISBN 80-7169-968-3.
5. Trojan S a kolektiv. Lékařská fyziologie. 4. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003. ISBN 80-247-0512-5.

7.3. Diplomové a bakalářské práce

1. Duša F. Studium hladiny mědi vázajících proteinů a metalothioneinu u pacientů se zhoubnými nádory. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2008.
2. Kolcunová V. Wilsonova choroba – dědičná porucha metabolismu mědi. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita v Brně, Lékařská fakulta, Brno, 2011.

7.4. Internetové zdroje

1. Clioquinol. In: *Drugs.com - Drug Information Online*. 2013. Dostupné na URL: <http://www.drugs.com/ingredient/cliouquinol.html>. Přístup 19. 2. 2013
2. Evropská směrnice 203/40/ES. In: *EUR-Lex*. 2003. Dostupné na URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003L0040:CS:HTML> Přístup 10. 11. 2011

3. Kaler SG. ATP7A-Related Copper Transport Disorders. In: *Gene Reviews*. 2010. Dostupné na URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1413/>. Přístup 19. 1. 2013
4. Mareček Z. Doporučený postup ČHS pro diagnostiku a léčbu Wilsonovy choroby. In: *Česká hepatologická společnost*. 2009. Dostupné na URL: <http://www.ces-hep.cz/guidelines>. Přístup 30. 10. 2012
5. Miyajima H. Aceruloplasminemia. In: *Gene Reviews*. 2012. Dostupné na URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1493/>. Přístup 18. 2. 2013
6. Metallothionein. In: *Department of Biochemistry, University of Zurich and Swiss Institute of Bioinformatics*. 2003. Dostupné na URL: <http://www.bioc.unizh.ch/mtpage/MT.html>. Přístup 20. 3. 2012
7. Nevšimalová S, Brůha R. Wilsonova choroba. In: *Postgraduální medicína*. 2006. Dostupné na URL: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/wilsonova-choroba-271477>. Přístup 30. 10. 2012
8. Oficiální webové stránky České transplantační společnosti. Transplantace jater. In: *Česká transplantační společnost*. 2007. Dostupné na URL: <http://www.transplantace.eu/jatra/index.php>. Přístup 2. 11. 2012
9. Oficiální webové stránky Mezinárodního svazu biochemie a molekulární biologie (IUBMB). Enzyme nomenclature. In: *International union of Biochemistry and Molecular Biology* 2011. Dostupné na URL: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>. Přístup 7. 12. 2011
10. Vyhláška 450/2004 Sb. O označování výživové hodnoty potravin ve znění vyhlášky č. 330/2009. In: *Ministerstvo zdravotnictví ČR*. 2013. Dostupné na URL: http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/hygiena-vyzivy-a-predmetu-bezneho-uzivani_3545_1789_11.html. Přístup 25. 2. 2013

11. Menkesova choroba. In: *Medicabaze.cz – lékařské repetitorium online*. 2010.
Dostupné na URL:
http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&tname=Choroba+Menkesova&termId=2530&h=menkesova+choroba#jump. Přístup 15. 2. 2013
12. Wilson Disease Association. In: *WDA – Wilson Disease Association*. 2009.
Dostupné na URL: <http://www.wilsonsdisease.org/>. Přístup 30. 10. 2012
13. Wilson Disease Mutation Database. In: *Wilson Disease Mutation Database University of Alberta*. 2009. Dostupné na URL:
<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp>. Přístup 29. 10. 2012