



**FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**
Univerzita Karlova

Katedra farmakologie a toxikologie

Porovnání interakce cyanidinu a cyanidin-3-glukosidu s mědí
a železem

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Mgr. Lucie Gavurová

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

V Hradci Králové, 2021

Lucie Gavurová

OBSAH

ABSTRAKT	5
ABSTRACT.....	6
1. SEZNAM ZKRATEK	8
2. TEORETICKÝ ÚVOD.....	9
2.1. Úloha mědi v organismu	9
2.2. Homeostáza mědi	10
2.2.1. Metaloenzymy.....	12
2.3. Poruchy metabolismu mědi	14
2.3.1. Menkesova choroba	14
2.3.2. Wilsonova choroba.....	16
2.4. Úloha železa v organismu	18
2.5. Vstřebávání železa z trávicího traktu	19
2.6. Homeostáza železa	20
2.7. Poruchy metabolismu železa	23
2.7.1. Nemoci z nedostatku Fe	23
2.7.2. Nemoci z přetížení železem (iron overload diseases)	26
2.8. Reaktivní formy kyslíku	28
2.8.1. Vznik ROS	28
2.8.2. Volné kyslíkové radikály	30
2.9. Anthokyaniny	31
2.9.1. Vliv chemické struktury na stabilitu anthokyaninů.....	32
2.9.2. Biodostupnost.....	33
2.9.3. Antioxidační aktivita anthokyaninů	35
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1. Použité materiálové a přístrojové vybavení	37
3.1.1. Chemikálie	37

3.1.2.	Přístroje a pomůcky.....	39
3.2.	Stanovení redukce Cu^{2+} iontů.....	40
3.2.1.	Příprava základních roztoků.....	40
3.2.2.	Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky	40
3.2.3.	Experimentální stanovení redukce Cu^{2+} v pufrch (pH 4,5 - 7,5)..	41
3.3.	Stanovení chelatace Cu^{2+} hematoxylinem.....	42
3.3.1.	Příprava základních roztoků.....	42
3.3.2.	Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky	42
3.3.3.	Experimentální stanovení chelatace Cu^{2+} hematoxylinem	43
3.4.	Stanovení chelatace Cu^{2+} a Cu^+ BCS	44
3.4.1.	Příprava základních roztoků.....	44
3.4.2.	Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky	44
3.4.3.	Experimentální stanovení chelatace Cu^{2+} s BCS	45
3.4.4.	Experimentální stanovení chelatace Cu^+ s BCS.....	45
3.5.	Stanovení redukce Fe^{3+} iontů	46
3.5.1.	Příprava základních roztoků.....	46
3.5.2.	Příprava pracovních roztoků a roztoků testovaných látek	47
3.5.3.	Kontrolní test železitých iontů	47
3.5.4.	Experimentální stanovení redukce Fe^{3+} v pufrch (pH 4,5 – 7,5) .	47
3.6.	Stanovení chelatace Fe^{3+} iontů	49
3.6.1.	Příprava základních roztoků.....	49
3.6.2.	Příprava pracovních roztoků a roztoků testovaných látek	49
3.6.3.	Kontrolní test železitých iontů	49
3.6.4.	Experimentální stanovení chelatace Fe^{3+} v pufru (pH 4,5).....	50
3.7.	Stanovení chelatace Fe^{2+} iontů	51
3.7.1.	Příprava základních roztoků.....	51
3.7.2.	Příprava roztoků testovaných látek	51

3.7.3.	Kontrolní test železnatých iontů.....	51
3.7.4.	Chelatace Fe^{2+} v pufrech (4,5, - 7,5).....	52
3.8.	Matematické a statistické zpracování výsledků	53
4.	VÝSLEDKY	54
5.	DISKUSE	66
6.	ZÁVĚR	70
7.	LITERÁRNÍ ZDROJE.....	71

ABSTRAKT

Železo a měď jsou stopové prvky, které mají nezastupitelnou roli v lidském organismu. Měď je součástí velmi důležitých enzymů, např. superoxiddismutázy a ceruloplasminu. Je také důležitá pro správnou homeostázu železa. Železo je obsaženo nejen v hemu červených krvinek, ale také v řadě enzymů, a je důležité pro transport kyslíku, buněčné dýchání, syntézu DNA. V těle se měď vyskytuje ve formě měďnatého (Cu^{2+}) a měďného (Cu^+) iontu. Železo existuje také ve dvou oxidačních stavech, železnatý (Fe^{2+}) nebo železitý iont (Fe^{3+}). Díky silnému redoxnímu potenciálu mohou být oba prvky pro organismus potenciálně toxické. V případě kumulace nebo dysbalance zmíněných iontů může docházet k závažným poškozením životně důležitých orgánů jako jsou játra, srdce, ledviny atd. Typickým příkladem nemoci z nadbytku mědi je Wilsonova choroba, jejíž příčinou je patologická mutace genu *ATP7B*. Ke kumulaci železa dochází při onemocněních jako je hereditární hemochromatóza nebo při léčbě některých chorob častými krevními transfúzemi (např. u thalasémie). V takových případech se využívají léčiva s chelatačním nebo redukčním účinkem.

Cílem této práce bylo stanovení a porovnání chelatační a redukční účinnosti u dvou látek ze skupiny anthokyanů. Těmito látkami byly cyanidin a jeho glykosid cyanidin-3-glukosid. Pro práci byly zvoleny spektrofotometrické metody za použití indikátorů: ferozin pro železo, hematoxylin a disodná sůl kyseliny bathokuproindisulfonové (BCS) pro měď.

V experimentech se prokázala u obou testovaných látek velmi silná redukční aktivita vůči Cu^{2+} , která se blížila 100 % v koncentračním poměru 1:1 při všech hodnotách pH. Mezi cyanidinem a jeho glukosidem nebyly v tomto aspektu zjištěny statisticky významné rozdíly. Při redukci Fe^{3+} iontů byly obě látky méně účinné než při redukci mědi, cyanidin byl ale významně účinnější v tomto případě. Cyanidin chelatoval Fe^{2+} ionty při pH 7,5 v poměru 3:2, zatímco cyanidin-3-glukosid v poměru 2:1. S poklesem pH se jejich chelatační schopnost snižovala. Za použití hematoxylinové metody obě látky tvořily komplexy 2:1 s Cu^{2+} ionty při všech hodnotách pH. Při ověření jejich měď-chelatační schopnosti více kompetitivní metodou BCS se ukázalo, že jde o slabé chelátory mědi. Obě látky jsou schopny chelatovat i redukovat měď i železo, a proto není možné z těchto výsledků usuzovat na jejich biologické účinky.

ABSTRACT

Iron and copper are trace elements involved in many essential processes in the human body. Copper plays an important role in human metabolism, primarily as a cofactor of many metalloenzymes, like superoxide dismutase and ceruloplasmin. Copper is also essential for iron homeostasis. Iron is incorporated into many biomolecules like heme or enzymes and is hence vital for cellular processes like oxygen transport, energy production and DNA synthesis. In biological systems, copper is present in both the oxidised form of cupric (Cu^{2+}), and the reduced form as cuprous ion (Cu^+). Iron as well exists in two stable oxidation states as ferrous (Fe^{2+}) or ferric ion (Fe^{3+}). Due to their strong redox potential, both elements can be potentially toxic to the body. Iron accumulates in vital organs such as the liver, heart and kidneys. Wilson's disease is an example of copper overload disease resulting from pathogenic mutations in gene *ATP7B*. The iron excess in the body is usually associated with iron overloading conditions, such as hereditary hemochromatosis or repeated treatments with blood transfusions (e.g. in thalassemia). In such cases, drugs with chelating or reducing effect are convenient for clinical use.

The aim of this thesis was to compare the interaction of the chelating and reducing efficacy of two substances from the group of anthocyanins, specifically cyanidin and cyanidin-3-glucoside. Spectrophotometric methods using indicators: ferrozine for iron, hematoxylin and bathocuproinedisulphonic acid disodium salt (BCS) for copper were chosen.

Experiments showed a very strong reducing activity against Cu^{2+} ions in both substances tested, which was approximately complete in the stoichiometry 1:1 under all pH conditions. There was no significant difference between these substances. Both substances were less effective in reducing Fe^{3+} ions than Cu^{2+} ions. In this case, cyanidin was more effective than its glucoside. Cyanidin showed chelating activity against ferric ions at pH 7.5 with stoichiometry 3:2, while cyanidin-3-glucoside formed a complex with a stoichiometry of 2:1. As the pH decreased, their chelating ability decreased. The assessment of Cu^{2+} chelation with hematoxylin showed, that both substances were able to form stable complexes with Cu^{2+} ions at all pH conditions with corresponding stoichiometry of 2:1. However, based on the assessment of their copper-chelating abilities

in a more competitive BCS method, it appears that both substances are mildly active copper chelators. In conclusion, both substances are able to chelate and reduce copper and iron, and therefore from the results, it is not possible to infer their biological effects.

1. SEZNAM ZKRATEK

ACD	anemie chronických onemocnění (z angl. anaemia of chronic diseases)
ALS	amyotrofická laterální skleróza
CP	ceruloplasmin
DMT1	transportér dvojmocných kovů (z angl. divalent metal transporter 1)
DCYTB	duodenální cytochrom B
DOPA	dihydroxyfenylalanin
GSH	glutathion
hCTR1	lidský transportér pro měď 1 (z angl. human copper transporter protein)
HIF1	hypoxií indukovatelný faktor 1
HH	hereditární hemochromatóza
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
IRPs	regulační proteiny pro železo (z angl. iron regulatory proteins)
IREs	regulační genová místa pro železo (z angl. iron responsive elements)
IDA	anemie z nedostatku železa (z angl. iron deficiency anemia)
ID	deficit železa (z angl. iron deficiency)
LOX	lysoxidáza
MD	Menkesova choroba
MT	metalothionein
NO	oxid dusnatý
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SOD1,2	superoxiddismutáza 1,2
SGLT1	sodíko-glukózový transportér 1
Tf	transferin
TfR1	transferinový receptor 1
XO	xanthinoxidáza
WD	Wilsonova choroba (z angl. Wilson's disease)

2. TEORETICKÝ ÚVOD

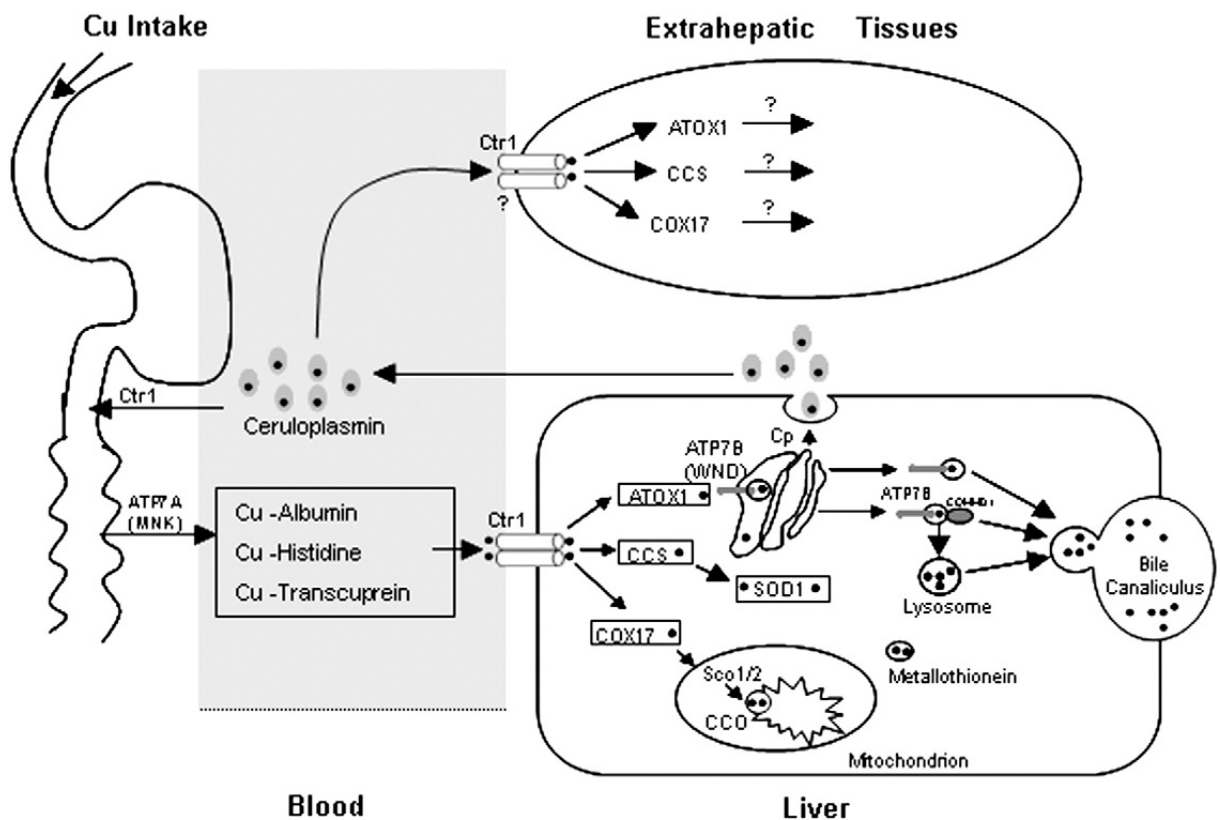
2.1. Úloha mědi v organismu

Měď (Cu) je esenciální stopový prvek, který je velmi důležitý pro všechny živé organismy, včetně člověka. Po železe a zinku je u lidí třetím nejčastějším stopovým prvkem, který je zahrnut do řady fyziologických a biochemických procesů, a to ve funkci kofaktoru řady metaloenzymů jako jsou např.: ceruloplasmin, superoxiddismutáza a lysyloxidáza. Tyto kuproenzymy katalyzují dohromady velké množství enzymatických procesů, jako je buněčné dýchání, biosyntéza neurotransmiterů a peptidových hormonů, ochrana před volnými radikály, zesíťování kolagenu, elastinu a keratinu (Kang 2011; Devi *et al.* 2016; Pavelková *et al.* 2018). Cu je tedy nezbytná pro správný buněčný růst, správnou funkci pojivové tkáně, mj. i pro kosti a svaly. Také je zapojena do metabolismu cholesterolu a glukózy (Devi *et al.* 2016). Dále se podílí na homeostáze Fe a díky tomu má nepřímý vliv na hematopoézu, podílí se na koagulaci krve a angiogenezi (Pavelková *et al.* 2018). Schopnost Cu přecházet mezi oxidovanou formou (Cu^{2+}) a redukovanou formou (Cu^+) je klíčovou vlastností nutnou pro redoxní reakce. Za fyziologických podmínek se nachází převážně v redukované formě (Cu^+) (Burkhead *et al.* 2009; Bhattacharjee *et al.* 2017).

Pokud je však Cu přítomna v nadbytku, může být současně i velmi toxická. Její nahromadění, v důsledku inhibice exkrece, může překročit buněčnou pufrovací kapacitu a vyústit tak v oxidační stres (Bhattacharjee *et al.* 2017). Cu katalyzuje produkci reaktivních sloučenin kyslíku (ROS), které mohou způsobit oxidační poškození lipidů, proteinů, DNA a dalších molekul (Kang 2011). Nejvýznamněji se chronický nadbytek projevuje poškozením jater, a to včetně nekrózy, cirhózy a kancerogeneze (de Romaña *et al.* 2011). Mnoho klinických studií prokázalo spojitost mezi nízkými hladinami Cu a incidencí kardiovaskulárních onemocnění. Nízký příjem Cu je spojován s incidencí srdečních příhod a hypertrofickou kardiomyopatií (Kang 2011). Nezbytnost, ale i toxicita Cu, je dobře charakterizována vzácnými geneticky podmíněnými onemocněními jako je Menkesova nebo Wilsonova choroba. Bohužel dokud není deficit či přebytek Cu takto dramatický, jsou projevy nedostatku nebo nadbytku velmi nespecifické a tím i obtížně diagnostikovatelné (de Romaña *et al.* 2011).

2.2. Homeostáza mědi

Cu se vstřebává převážně v duodenu, ale v menší míře může k absorpci docházet i v žaludku a distálnějších částech tenkého střeva. Míra absorpce je závislá jak na obsahu Cu v potravě, ale i na dalších složkách stravy, jako jsou proteiny nebo určité druhy prebiotik, např.: fruktooligosacharidy s krátkým řetězcem a inulin (de Romaña *et al.* 2011). Aminokyseliny, zejména histidin, methionin a cystein vážou Cu a umožňují její vstřebání přes transportéry pro aminokyseliny. Absorpce je dále ovlivněna příjmem vitamínu C a složením sacharidů ve stravě (Ferns *et al.* 1997).



Obr.1 Stručné schéma kinetiky mědi v organismu. Zkratky jsou vysvětleny dále v textu. Převzato z Kang, 2011

Absorpce Cu enterocytem probíhá za pomoci proteinu, známého jako lidský transportér mědi 1 (human copper transporter protein 1, hCTR1). Tento transmembránový protein je lokalizován na apikální membráně intestinálních buněk a ve nitrobuňčných vezikulech (viz **Obr.1**) a má velkou afinitu právě k Cu (Devi *et al.* 2016; Bhattacharjee *et al.* 2017; Nose *et al.* 2010). CTR1 se nachází také v jiných částech

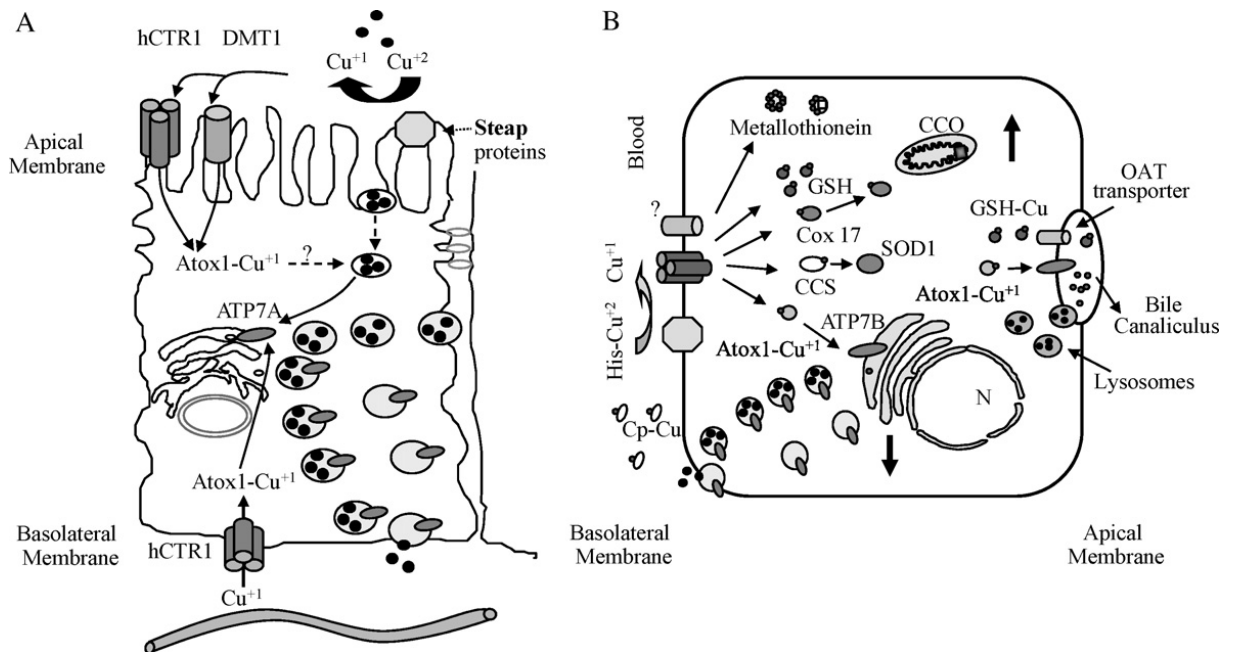
těla a to na bazolaterální membráně v játrech, ledvinách, placentě a mléčných žlázách, kde vychytává Cu^+ z krevního oběhu (Pavelková *et al.* 2018). K redukci Cu^{2+} ze stravy na Cu^+ dochází působením reduktáz (STEAP2, DCYTB), které jsou na apikální straně membrány enterocyty. Podle posledních studií (Arredondo *et al.* 2000; Tennant *et al.* 2002) dochází k přenosu Cu i transportérem pro železo (transportérem dvojmocných kovů, DMT1).

Měďné ionty (Cu^+) jsou nerozpustné ve vodném roztoku, a proto je většina Cu uvnitř buněk vázána na další molekuly, zejména proteiny. Na ty se váže pomocí postranních aminokyselinových řetězců, které mají afinitu k pozitivně nabitým iontům (Doguer *et al.* 2018). Tato vazba zajišťuje přenos Cu k různým intracelulárním organelám (viz **Obr.1**) (de Romaña *et al.* 2011; Devi *et al.* 2016; Bhattacharjee *et al.* 2017). Cu může být dále uvnitř buňky chelatována metalothioneinem (MT). MT je nízkomolekulární cytosolický protein vázající Cu a zinek (Zn) svými cysteinovými zbytky (Ferns *et al.* 1997). MT má však vyšší afinitu k Cu (Doguer *et al.* 2018). Jeho koncentrace v enterocyty je závislá na příjmu kovových iontů v potravě. Např. vyšší dietní příjem Zn může snížit vstřebatelnost mědi (Ferns a *et al.* 1997). Převážná většina zásoby Cu v hepatocytech je navázaná na MT (Gaetke a Chow 2003).

Volná Cu je velmi reaktivní a je téměř okamžitě vázána kromě MT také řadou buněčných proteinů, tzv. chaperonů vázajících měď. Tyto proteiny snižují volnou frakci Cu v buňce a tím i její reaktivitu. Současně mají další důležité funkce v buňce. Např. chaperon mědi pro cytochrom c oxidasu (COX17) transportuje měď do mitochondrie, kde podporuje biosyntézu cytochrom c oxidázy (CCO), která hraje důležitou roli v dýchacím řetězci (Doguer *et al.* 2018). Chaperon mědi pro superoxid dismutázu (CCS) umožňuje inkorporaci Cu do Cu-Zn superoxid dismutázy 1 (SOD1) v cytosolu a mitochondriálním mezimembránovém prostoru (Bhattacharjee *et al.* 2017). Další chaperon pro Cu, ATOX1, přenáší Cu ke transportéru ATP7A, který je známý také jako Menkesův protein. Analogickým transportérem je ATP7B. Ten je známý jako Wilsonův protein (Muller a Klomp 2009; Devi *et al.* 2016). Pomocí těchto transportérů dochází nejen k intracelulárnímu transportu do organel, ale také k efluxu Cu.

ATP7A hraje důležitou roli v pohybu Cu organismem. Je součástí hematoencefalické a placentární bariéry, protože Cu je nezbytná pro vývoj plodu. V játrech, ale i několika dalších tkáních, je důležitý protein ATP7B (de Romaña *et al.* 2011; Pavelková *et al.* 2018). V Golgiho aparátu zajišťuje připojení Cu na ceruloplasmin (viz **Obr.2**) a zprostředkovává transport Cu do žluči, čímž tvoří hlavní exkreční cestu a

kontrolní bod homeostázy Cu v celém těle (de Romaña *et al.* 2011). Cu se vylučuje téměř výhradně stolicí. Asi 70 % Cu je vyloučeno žlučí. Zbýlých 30 % je nevstřebaná Cu ze stravy a odumřelých epitelových buněk střeva. Močí vylučovaný podíl je zanedbatelný (Pavelková *et al.* 2018).



Obr.2 Schématické znázornění homeostázy mědi v enterocyty (A) a hepatocyty (B). OAT – transportér organických aniontů, další zkratky jsou vysvětleny v textu. Převzato z de Romaña *et al.* 2011.

2.2.1. Metaloenzymy

SOD1

SOD1 je antioxidační enzym, který katalyzuje dismutaci superoxidu. Při této reakci dochází k dismutaci superoxidového radikálu na vodu a peroxid vodíku. SOD1 je přítomna v celé buňce, ale nejhojněji je zastoupena v cytosolu. Zde plní enzymatickou funkci. SOD1 váže na svém aktivním místě ionty Cu, které v závislosti na zhášení superoxidových radikálů, přechází mezi Cu⁺ a Cu²⁺ redoxními stavy. Mutace genu kódujícího SOD1 jsou spojovány s dědičnou formou amyotrofické laterální sklerózy (ALS) (Pavelková *et al.* 2018; Boyd *et al.* 2020).

Lysyloxidáza (LOX)

LOX je Cu aminosyloxidáza, která katalyzuje posttranslační modifikaci složek pojivové tkáně (Smith-Mungo a Kagan 1998). Je to nezbytný extracelulární enzym, který katalyzuje kovalentní zesíťení kolagenu a elastinu v extracelulární matrix (Vallet a Ricard-Blum 2019). S aktivací LOX je spojován chaperon ATOX1. Aktivovaná LOX je zahrnuta také v procesu angiogeneze (Chen *et al.* 2015; Devi *et al.* 2016; Pavelková *et al.* 2018). Hypoxie indukuje LOX a HIF1 (hypoxií indukibilní faktor 1), což vede k invazi rakovinných buněk a tvorbě metastáz. Hypoxie je rysem téměř všech solidních nádorů. Zvýšené hladiny LOX jsou často nacházeny u rakoviny prsu a mohou napovědět o jak pokročilé stádium kancerogeneze se jedná (Johnston a Lopez 2018).

Dopamin β -hydroxyláza

Je nezbytná pro přeměnu dopaminu na noradrenalin v adrenergních neuronech locus coeruleus, v postgangliových sympatických vláknech nebo chromafinních buňkách ve dřeni nadledvin. Úloha Cu v katalytickém místě enzymu spočívá v přenosu elektronu z kyseliny askorbové a následné hydroxylaci substrátu. Změna v aktivitě tohoto enzymu může vést k celé řadě psychiatrických a neurologických onemocněních. Např.: Alzheimerova choroba, ADHD (porucha pozornosti s hyperaktivitou), depresivní poruchy, ale i zánětlivá onemocnění střev (Gonzalez-Lopez a Vrana 2020).

Tyrosináza

Tento transmembránový enzym se nachází na membráně melanosomu a na svém katalytickém místě má dvě vazebná místa pro Cu. Tyrosináza katalyzuje první dva kroky Raper-Masonovy dráhy vedoucí k tvorbě melaninu (Solano 2018).

Ceruloplasmin (CP)

Jeho strukturu tvoří jediný polypeptidový řetězec. Slouží jako hlavní plazmatický protein vázající 7 atomů Cu. Je tedy obecně zodpovědný za transport Cu. Tvoří součást proteinů akutní fáze a jeho plazmatická koncentrace se zvyšuje při zánětu, poraněních nebo infekcích. Je důležitým antioxidantem a má schopnost oxidovat železo a aminoskupiny. Tyto vlastnosti jsou za fyziologických podmínek velmi důležité, protože oxiduje železnaté ionty (Fe^{2+}) na ionty železité (Fe^{3+}) před jeho vazbou na transferin. Jeho exprese je regulována prozánětlivými cytokiny. Vysoké koncentrace ceruloplasminu jsou spojovány s rozvojem aterosklerózy a sníženou dostupností NO v plazmě. To má za

následek zvýšení tvorby ROS a oxidativní buněčné poškození (Ferns *et al.* 1997; Pavelková *et al.* 2018; Romuk *et al.* 2020).

Hephaestin (HP)

Hephaestin je membránově vázaný protein, který ve své molekule váže jako kofaktor Cu. Tento enzym plní funkci feroxidázy a má tak podobné vlastnosti jako ceruloplasmin, Zapojuje se do metabolismu železa (Mladěnka *et al.* 2005).

2.3. Poruchy metabolismu mědi

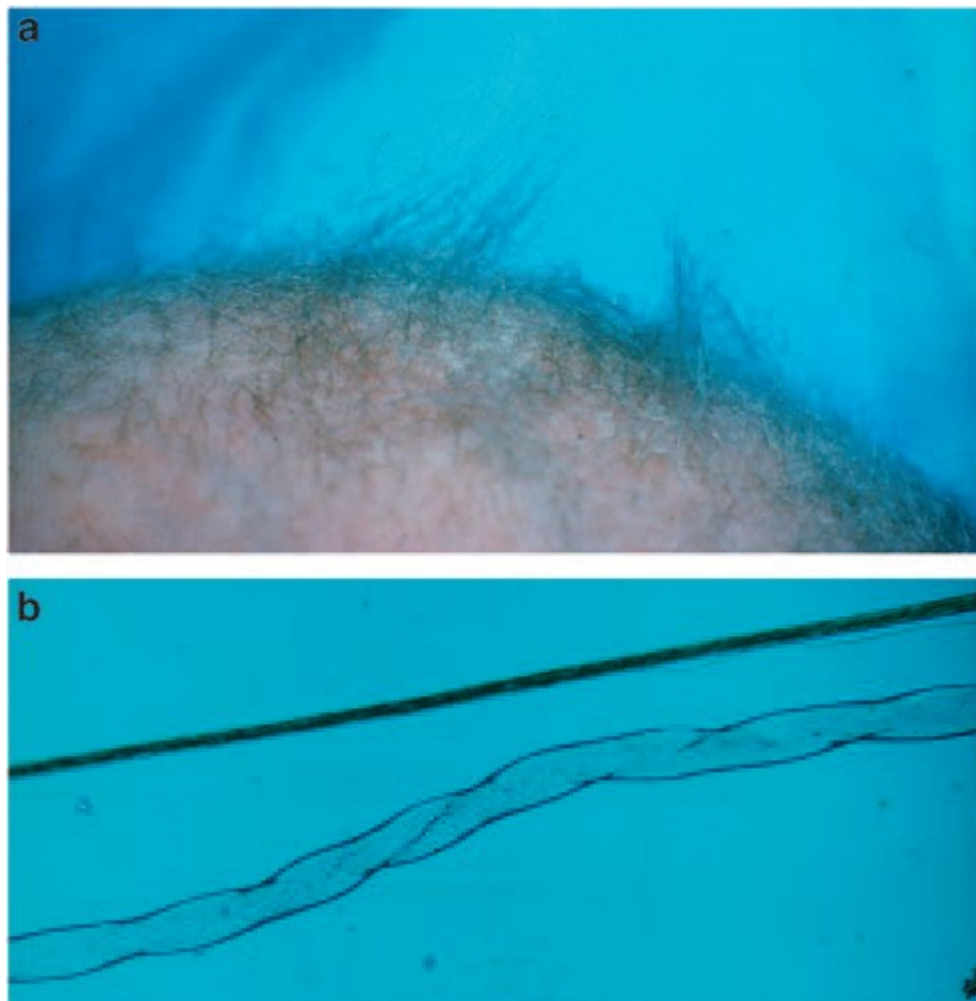
Množství Cu přijaté v potravě nebo ve vodě je relativně malé. Organismus je tak za fyziologických podmínek schopen jeho množství regulovat (Gaetke a Chow 2003). Nedostatek Cu je u lidí poměrně vzácný. Příčina může být jak v neadekvátním dietním příjmu, tak i nedostatečné absorpci Cu ve střevě (Pavelková *et al.* 2018). Častěji se tyto poruchy vyskytují např. u předčasně narozených dětí, které mají zvýšené nároky kvůli rychlému růstu a jejichž jaterní kapacity jsou nedostatečné (de Romaña *et al.* 2011). Potencionální riziko nedostatku Cu může také nastat u specifických populačních skupin jako jsou těhotné a kojící ženy, pacienti na parenterální výživě bez adekvátního minerálového zajištění, diabetici, alkoholici, pacienti s poruchou příjmu potravy nebo vegetariáni (Pavelková *et al.* 2018).

2.3.1. Menkesova choroba

Menkesova choroba (Menkes disease, MD) je vzácnou poruchou metabolismu mědi. Toto dědičné multisystémové onemocnění je recesivně vázané na chromozom X, kde dochází k různým mutacím genu pro ATP7A (Menkesův protein). MD vykazuje velkou variabilitu co do závažnosti projevů a genových mutací. Projevuje se téměř převážně u chlapců (Stern *et al.* 2007). Klasický typ MD se vyznačuje velmi závažnými neurodegenerativními příznaky a výraznou dysfunkcí pojivové tkáně (Bertini a Rosato 2008; Tümer a Møller 2010; Thomas *et al.* 2017; Pavelková *et al.* 2018). Choroba má řadu dalších projevů včetně těch vizuálně pozorovatelných (viz **Obr.3**). Dysfunkce ATP7A vede k poruše absorpce Cu ve střevě a posléze k závažnému nedostatku mědi, nutné pro Cu-dependentní enzymy ve tkáních (viz **Obr.4**) (Wang *et al.* 2019).

Příznaky choroby vyplývají právě z poruchy Cu-dependentních enzymů. Projevují se již týdnů po porodu. Jedním z prvních příznaků mohou být neobvykle řídké, málo

pigmentované, ocelově lesklé, kudrnaté vlasy (viz **Obr.3**) (Wang *et al.* 2019; Stern *et al.* 2007). Cu je esenciální pro neuronální diferenciaci. ATP7A je exprimována v axonech během synaptogeneze a projevy jejího nedostatku jsou zejména neurologické (Bhattacharjee *et al.* 2017). Již v prvních dvou měsících života se mohou objevit epileptické záchvaty, často nereagující na léčbu (Thomas *et al.* 2017). Opožděný psychomotorický a mentální vývoj se projevuje později, a to v 5.-6. měsíci života. Vyskytují se potíže s krmením, zvracení a průjem (Tümer a Møller 2010; Wang *et al.* 2019).



Obr.3 Abnormální vzhled vlasů u pacientů s klasickou MD. A) pahýlovité málo pigmentované vlásky na pokožce hlavy. B) Vlasová mikroskopie (x100), zkroucený nemocný vlas (pili torti) a normální vlas (nad ním). Převzato z Tümer a Møller 2010.

Snížená aktivita LOX vede k poškození polymerizace kolagenu a elastinu, a tím k odpovídajícím abnormalitám pojivové tkáně, jako např. aneurysmata aorty, volná kůže, hyperextenze kloubů a křehkosti kostí (Stern *et al.* 2007). Osteoporóza vede ke spontánním frakturám kostí, četné jsou i urogenitální abnormality. Jednou z posledních manifestací této choroby je slepota a respirační selhání. Většina pacientů umírá na infekční komplikace (časté jsou pneumonie) nebo vaskulární komplikace (rozsáhlá krvácení do mozku, hemoragická cévní mozková příhoda) (Tümer a Møller 2010). Časná diagnostika a každodenní podávání intravenózní Cu, nebo lépe jejího komplexu s histidinem intraperitoneálně nebo intratekálně, může předejít neurodegeneraci a prodlužuje přežívání (Thomas *et al.* 2017; Pavelková *et al.* 2018).

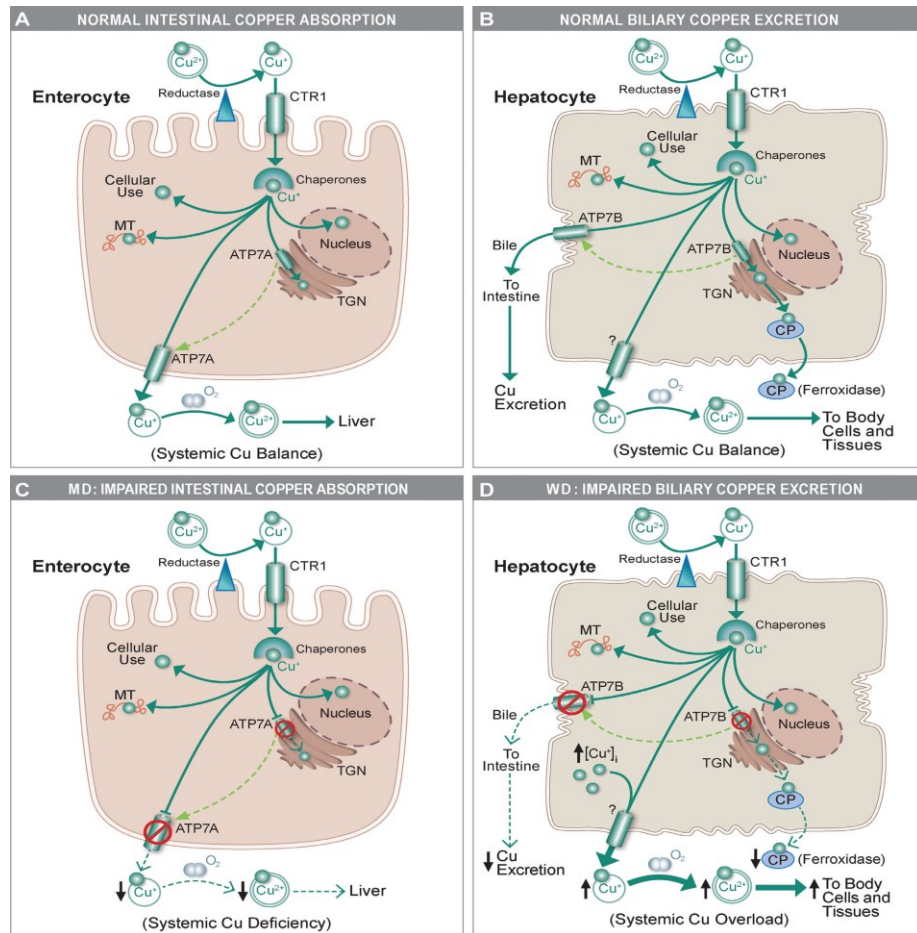
2.3.2. Wilsonova choroba

Wilsonova choroba (Wilson's disease, WD) je vzácné autozomálně recesivní dědičné onemocnění, při kterém dochází k narušení biliární exkrece Cu a jejímu hromadění v organismu (Wang *et al.* 2019). Je způsobená mutací v genu kódujícím transportér *AT7B* (Wilsonova ATPáza) na chromozómu 13 (Pavelková *et al.* 2018). Četné mutace tohoto genu mohou způsobit dysfunkci tohoto Cu transportujícího proteinu, který je zodpovědný mj. za exkreci Cu do žluči (viz **Obr.4**). Cu se ukládá nejprve v játrech. Když se skladovací kapacita jater nasatí, tak se Cu uvolní do oběhu a může se ukládat do tkání, kde způsobuje oxidativní stres až tkáňové poškození (Wang *et al.* 2019, Medici *et al.* 2007).

WD se u pacientů projevuje především během první až čtvrté dekády života, ačkoliv jsou známé příklady jedinců ve věku 2 nebo 70 let (Medici *et al.* 2007). Klinické projevy tohoto onemocnění mohou být velmi různorodé: hepatální, neurologické, psychiatrické, až po velmi řídké se vyskytující renální, kosterní a endokrinologické projevy (Stern *et al.* 2007).

Cu se hromadí v hepatocytech, což vede ke zvýšení jaterních transamináz, hepatomegalii, žloutence a cirhóze (Medici *et al.* 2007; Chen *et al.* 2020). Mimo játra se tvoří depozita Cu. Např. v membráně rohovky tzv. Kayserovy–Fleischerovy kruhy, rezavě hnědé zabarvení na vnější straně duhovky (Stern *et al.* 2007). Mezi neurologické projevy onemocnění patří třes horních končetin, pomalé pohyby, dysfagie a dystonie (Stern *et al.* 2007; Pavelková *et al.* 2018). Psychiatrické příznaky se mohou vyskytnou dříve než hepatální nebo neurologické. Patří mezi ně zejména deprese, změny v chování,

halucinace nebo paranoia. Tyto změny mohou být reverzibilní, při léčbě se může klinický stav optimalizovat zhruba do dvou let (Medici *et al.* 2007).



Obr.4 Fyziologická a patofyziologická homeostáza Cu v enterocytech a hepatocytech. Protein ATP7A je za fyziologických podmínek transportním systémem Cu pro syntézu Cu-dependentních enzymů v trans-Golgiho aparátu (TGN). Nadbytek Cu v buňce se transportuje na bazolaterální membránu enterocyty a zajišťuje její sekreci (A). Při MD dochází k mutaci ATP7A a tím poruše absorpce Cu ve střevě. Následkem toho je systémová deplece Cu s následnými patofyziologickými změnami (C). ATP7B za normálních okolností v hepatocyty dodává Cu do TGN a podporuje tím tvorbu ceruloplasminu (CP), který je sekretován do cirkulace a zaujímá své místo v metabolismu Fe. Pokud dojde k nadbytku Cu v hepatocyty, tak ATP7B transportuje Cu ke kanalikulární membráně, odkud je secernována do žluči (B). Vyloučená Cu tvoří komplexy se žlučovými kyselinami a z organismu je exkretována stolicí. Při WD je mutovaný protein ATP7B neschopný efektivně transportovat Cu do žluči, která se poté

kumuluje v hepatocytu (D). ATP7A – ATPáza transportující Cu α , ATP7B – ATPáza transportující Cu β , CTR1 – transportér pro Cu 1, MT – metalothionenin, WD – Wilsonova choroba. Převzato z Wang *et al.* 2019.

Cílem léčby je snížit akumulaci Cu, čehož se snažíme docílit sníženým dietním příjmem/systémovým vstřebáváním Cu anebo použitím chelátorů. Mezi tyto léčebné možnosti patří např. zinečnaté sloučeniny (síran zinečnatý, octan zinečnatý), které snižují absorpci Cu ve střevě, D-penicilamin, trientin nebo tetrathiomolybdát (Pavelková *et al.* 2018; Wang *et al.* 2019). Nadbytek Cu se váže na tyto chelátory s následnou eliminací ledvinami.

Tuto terapii však provází řada nežádoucích účinků, a to zvláště u D-penicilaminu. Na začátku léčby může docházet k hypersenzitivním reakcím (horečka, vyrážka, lymfadenopatie) a nauze. Mezi pozdní komplikace léčby patří kožní degenerativní změny, nefrotoxicita, arthropatie, „lupus-like syndrom“ s proteinurií, útlum kostní dřeně a mírná sideroblastická anemie (Medici *et al.* 2007; Wang *et al.* 2019; Chen *et al.* 2020). Chelátory mohou také snižovat množství vstřebávaného železa, a proto je doporučována substituce železem. Při dodržování dietních opatřeních, vyloučení potravin s vysokým obsahem Cu (čokoláda, houby, ústřice) a užíváním léků, mohou pacienti s tímto onemocněním žít téměř bez dalších omezení (Stern *et al.* 2007).

2.4. Úloha železa v organismu

Železo (Fe) je přechodný kov, který podobně jako Cu lehce přijímá a odevzdává elektrony. V organismu se podílí na oxidačně-redukčních procesech, jako je transport kyslíku, buněčné dýchání, syntéza DNA, růst buněk, zánětlivé reakce nebo buněčná smrt. Slouží jako nepostradatelný kofaktor ve všech savčích buňkách (Huang *et al.* 2011; Dev a Babitt 2017). Fe je včleněno do řady enzymů: např. NADPH-oxidázy, xanthinoxidázy, lipooxygenázy, cytochromu P450, nebo i do tzv. „FeS-cluster“ obsahujících proteinů (Dixon a Stockwell 2014). Největší množství Fe je uloženo ve feritinu jaterních hepatocytů nebo retikuloendoteliálních buněk (Dev a Babitt 2017; Nakamura *et al.* 2019). Ve velmi malém množství se však může nacházet také jako volné, redoxně aktivní dvojmocné železo (Fe²⁺), tzv. labilní železo. Toto aktivní Fe způsobuje poškození řady buněčných funkcí a je velmi toxické. Může se podílet na tvorbě ROS a železem indukovaném oxidativním poškození DNA, proteinů a lipidů. Takto poškozené molekuly

mohou vést k mnoha onemocněním, např.: rakovině nebo neurodegenerativním onemocněním, jako jsou Alzheimerova a Parkinsonova nemoc (Nakamura *et al.* 2019).

2.5. Vstřebávání železa z trávicího traktu

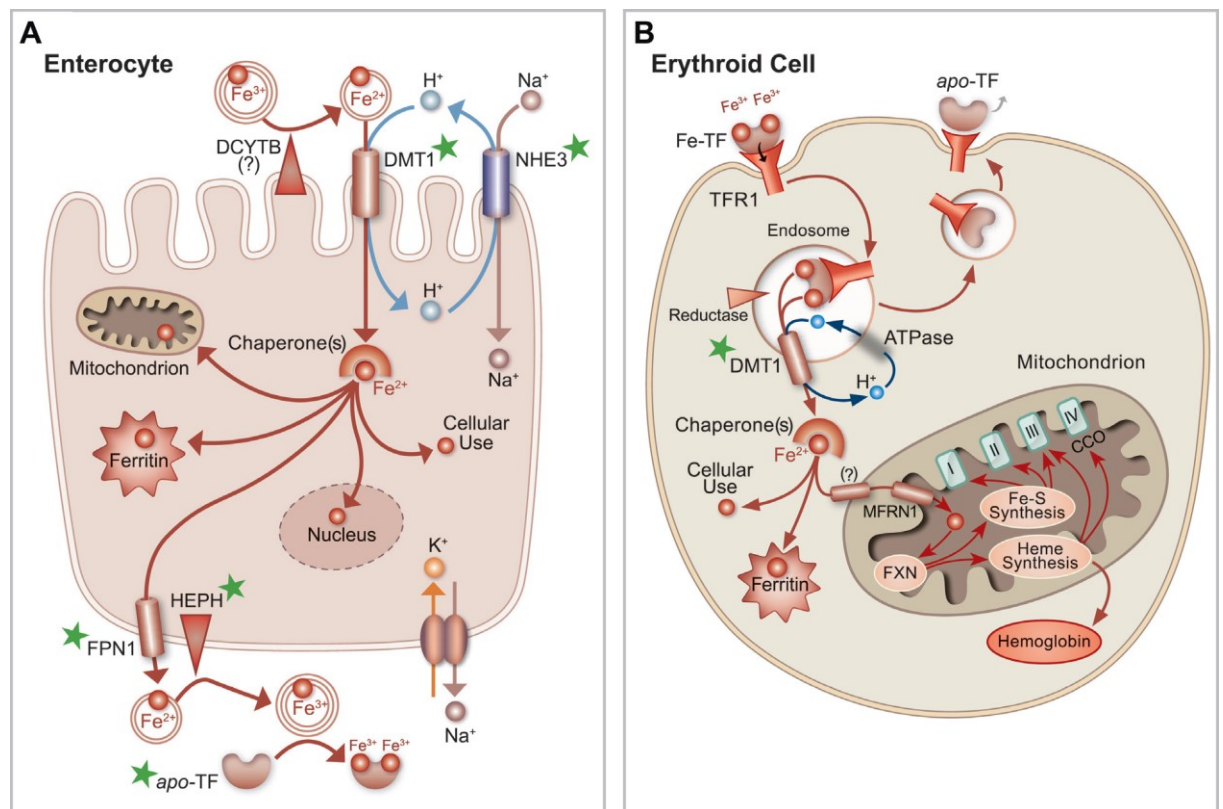
Absorpce železa z potravy kompenzuje jeho ztráty, fyziologické i patologické. Železo je vylučováno např. odlupováním buněk sliznic, krvácením, nebo je zvýšeně využíváno během těhotenství a vývoje dítěte. V menší míře dochází k jeho ztrátám také pocením a močí. Jaterní zásoby železa pomáhají udržovat jeho stálou hladinu v těle (Muckenthaler *et al.* 2017). Jelikož savci postrádají aktivní mechanismy pro exkreci Fe, je právě absorpce ve střevech a jeho následná recyklace velmi regulovaným procesem. Denně se z duodena vstřebá okolo 1-3 mg Fe (Anderson *et al.* 2012; Dev a Babitt 2017). Největším zdrojem je organický hem (součást hemoglobinu a myoglobinu), který je obsažen v mase (Philpott a Jadhav 2019). Na vstřebávání hemového Fe pravděpodobně nemají ostatní složky potravy výrazný vliv a je tak velmi dobře absorbovatelné (Gulec *et al.* 2014).

Nehemové anorganické Fe je nejčastěji přijímané v trojmocném stavu (Fe^{3+}). Aby mohlo být absorbováno do enterocyty, musí dojít k jeho redukci (Fe^{2+}). K redukci dochází na apikální straně enterocyty (viz **Obr.5**) pomocí železo-reduktáz např.: duodenálního cytochromu b (DCYTB) (Anderson *et al.* 2012; Dev a Babitt 2017). DCYTB usnadňuje redukci Fe přenosem elektronu z kyseliny askorbové (vitamin C). K upregulaci DCYTB dochází při deficitu Fe nebo hypoxii (Gulec *et al.* 2014).

Zredukováno Fe^{2+} je vstřebáváno prostřednictvím transmembránového proteinu, DMT1. Tento transport je usnadněn kyselým prostředím, které vytváří Na^+/H^+ ATPáza kartáčového lemu střeva (Dev a Babitt 2017). Uvnitř enterocyty je Fe vázáno chaperony a distribuováno do cytosolu, mitochondrií, jádra nebo je skladováno navázané na feritin (Wang *et al.* 2019). Feritin je hlavním skladovacím proteinem Fe v buňkách. Je tvořen 24 H a L podjednotkami, které v různých poměrech tvoří komplex. Před začleněním Fe do feritinu musí být Fe^{2+} enzymaticky oxidováno na Fe^{3+} (Kawabata 2019). Fe, které je využito k tvorbě hemoglobinu je skladováno v kostní dřeni pro vývoj erytrocytů (Doguer *et al.* 2018).

Fe, které není jinak využito nebo uloženo, je transportováno na bazolaterální stranu enterocyty. Aktivní přenos do krve zde zajišťuje ferroportin (Anderson *et al.* 2012).

Tato efluxní pumpa se nachází i v hepatocytech nebo makrofázích (Gulec *et al.* 2014; Bogdan *et al.* 2016). Tento aktivní transport je závislý na oxidaci železa membránově vázaným hephaestinem (Anderson *et al.* 2012). Hephastin (Hp) je feroxidáza, která ve své struktuře obsahuje měď. Nejvíce je exprimována v tenkém střevě a oproti jiným proteinům podílejících se na homeostáze Fe, není regulována regulačními proteiny Fe (IRPs – iron regulatory proteins) po jejich vazbě na regulační genová místa (IREs – iron responsive elements) (Petрак a Vyoral 2005).



Obr.5 Absorpce a metabolismu Fe v enterocytu (A) a erytrocytu (B). DCYTB – duodenální cytochrom B, DMT1 – transportér dvojmocných kovů, NHE3 – natrium/hydrogen exchanger – Na⁺/H⁺ ATPáza, HEPH – hephaestin, FPN1 – ferroportin 1, Fe-TF – železo vázané na transferrin, TFR1 – transferrinový receptor 1. Převzato z Wang *et al.* 2019.

2.6. Homeostáza železa

Mezi procesy zodpovědné za homeostázu Fe v krevním oběhu patří zejména výše zmíněná absorpce ve střevě, ale podílí se na ní také transport Fe mezi orgány. Savci

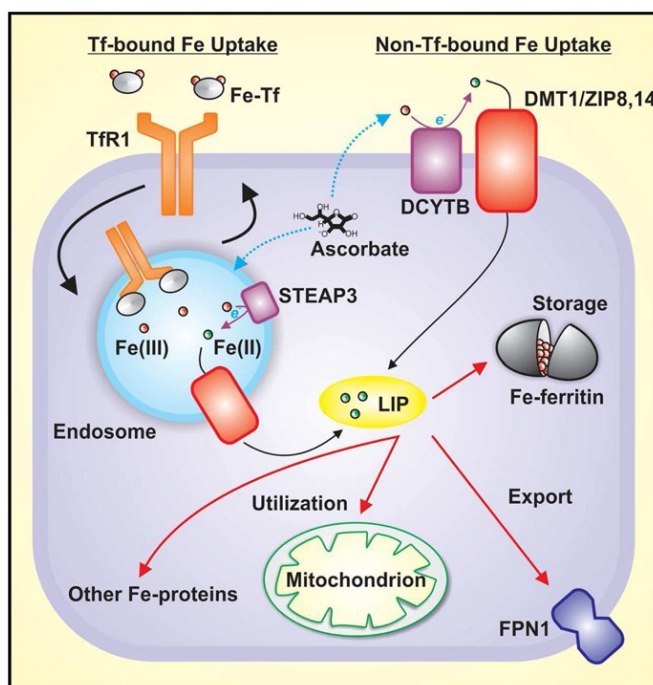
disponují proteiny, které usnadňují absorpci, přenos a skladování Fe (Eisenstein a Blemings 1998). V krvi se Fe vyskytuje ve dvou formách. Erytrocytární, které zaujímá polovinu obsahu Fe v těle (okolo 1,5 – 2 g) a plazmatické, kterého je podstatně méně (okolo 5 mg celkem). Plazmatické Fe je vázáno na transportní protein transferin (Tf). Je to glykoprotein se dvěma vazebnými místy pro Fe^{3+} . Díky této vazbě se železo stává pro organismus netoxické a z krevního oběhu lehce dostupné pro jeho další využití různými tkáněmi (Muckenthaler *et al.* 2017). Tf tedy zajišťuje transport Fe mezi enterocyty, erytrocyty, hepatocyty a ostatními buňkami ve tkáních. Za fyziologických podmínek je Tf v krvi saturován ze 30-45 % (Petrat *et al.* 2002; Huang *et al.* 2011; Anderson *et al.* 2012; Bogdan *et al.* 2016; Brissot *et al.* 2019).

Během patofyziologických stavů při nadbytku železa může dojít k plné saturaci Tf. V plazmě se pak nachází volné netransferinově vázané Fe (non-Tf-bound iron, NTBI) (viz **Obr.5**). NTBI je vysoce reaktivní a účastní se Fentonovy reakce, kterou jsou produkovány reaktivní sloučeniny kyslíku. Vznikající radikály a oxidativní sloučeniny poškozují zejména játra, pankreas a srdce (Gulec *et al.* 2014; Dev a Babitt 2017).

Ačkoliv je Fe důležité pro všechny buňky v těle, nejvíce potřebné je pro červenou krevní řadu v kostní dřeni. Erytrocyty a jejich prekurzory mají extrémní požadavky na dostatečné množství železa pro syntézu hemu (Muckenthaler *et al.* 2017). V červených krvinkách je uloženo více jak 2/3 z celkového množství železa (3-5 g pro dospělé). Erytrocyty vyžadují kolem 20 mg železa denně, ale pouze 1-2 mg se absorbuje v tenkém střevě (Pietrangelo 2002).

Tf transportuje Fe ke všem tkáním organismu, kde je absorbováno pomocí transferinového receptoru (TfR). Tf se váže s velkou afinitou na TfR erytrocytů. Tato vazba vede k receptorem zprostředkované endocytóze (viz **Obr.5 B**) (Pietrangelo 2002). Po absorpci komplexu Tf-Fe do buňky, dochází působením kyselého prostředí endozomu k uvolnění Fe^{3+} z vazby na Tf a jeho následné redukci (Pietrangelo 2002; Lane *et al.* 2015). Poté pomocí transportéru DMT1 prostupuje železo do cytoplazmy. Mitochondrie v erytrocytech zabudovávají Fe do hemu, který je vložen do 4 globinových molekul, které tvoří makromolekulu hemoglobinu. K recirkulaci železa dochází ve slezině, odkud je získáváno ze stárnoucích erytrocytů (Brissot *et al.* 2019).

Za klíčovou regulační molekulu homeostázy Fe je považován hepcidin, který je primárně produkován hepatocyty. Působí jako negativní regulátor dostupnosti Fe. Inhibuje transport Fe z enterocytů, hepatocytů, makrofágů a placentárních trofoblastů (Ritama a Khaled 2018). Tento peptidový hormon cirkulující v krvi se váže na ferroportin na povrchu buňky a indukuje jeho fosforylaci. Ta vede k endocytóze komplexu ferroportin-hepcidin do buňky a jeho následné degradaci v lysozomu (Kono *et al.* 2010). Pokud je Fe v nadbytku, dochází k upregulaci exprese hepcidinu. Naopak při nedostatku Fe se jeho exprese snižuje a uvolňované Fe saturuje Tf. Po překročení vazebné kapacity se Fe kumuluje v plazmě jako NTBI (Ritama a Khaled 2018).



Obr.6 Dvě hlavní cesty vychytávání Fe: transferinově vázané Fe (Tf-Fe) a netransferinově vázané Fe (NTBI). TfR1 – transferinový receptor 1, LIP – labilní intracelulární železo (labile iron pool), FPN1 – ferroportin 1, DCYTB – duodenální cytochrom B. Převzato z Lane *et al.* 2015.

Na buněčné úrovni koordinují metabolismu Fe regulační proteiny – IRPs. IRP1 a IRP2 jsou strukturně specifické, cytosolické proteiny o velikosti 28 nukleotidů, které se váží na IRE v 5' a 3' netranslatovaných částech mRNA (Eisenstein a Blemings 1998). Takto ovlivňované mRNA kódují proteiny zapojené do absorpce Fe (TfR1, DMT1), skladování (ferritin) a exportu (ferroportin) (Anderson *et al.* 2012; Galaris *et al.* 2019). Nedostatek Fe v buňce způsobí konformační změny IRPs, které se pak s velkou afinitou

váží na IRE mRNA. Když mají buňky nedostatek Fe IRPs se váží na 5' IRE mRNA feritinu a ferroportinu, čímž potlačují translaci. Zároveň se vážou na 3' IRE mRNA TfR1 a blokují jeho degradaci. A naopak, IRPs se neváží na IRE mRNA, pokud je Fe v nadbytku. Tím se zvyšuje syntéza feritinu, ferroportinu a podporuje se degradace TfR1 mRNA. Koordinování regulace příjmu, skladování a vylučování Fe proteiny IRPs zajišťuje dostatečné množství Fe pro buňky podle jejich potřeby (Anderson *et al.* 2012).

2.7. Poruchy metabolismu železa

Poruchy metabolismu Fe zahrnují heterogenní skupinu onemocnění s různými klinickými projevy. Těmi může být asymptomatický deficit Fe, nebo naopak závažný nadbytek Fe, kdy neléčené onemocnění může skončit fatálně (Födinger a Sunder-Plassmann 1999).

2.7.1. Nemoci z nedostatku Fe

Deficit Fe (iron deficiency, ID) je nejčastěji způsoben jeho nedostatečným příjmem (dieta, malnutrice apod.), zvýšenými potřebami organismu (těhotenství, puberta) nebo zvýšenými krevními ztrátami. Deficit Fe se vyskytuje ve dvou formách: 1) absolutní, kdy jsou celkové zásoby Fe nízké nebo vyčerpané; 2) funkční deficit, kdy jsou celkové zásoby Fe v organismu normální nebo zvýšené, ale jeho přísun do kostní dřeně je nedostatečný (Munoz *et al.* 2011; Lopez *et al.* 2016). Tyto dva stavy se mohou vyskytovat současně, což ztěžuje diagnostiku a účinnou léčbu. Funkční deficit se nejčastěji vyskytuje při různých akutních či chronických zánětlivých stavech, kde hraje klíčovou roli protein hepcidin (Lopez *et al.* 2016).

Mezi všeobecně přijímaná kritéria systémového ID patří hladina sérového feritinu <100 µg/L. Funkční ID se vyznačuje poklesem sérového feritinu na 100-300 µg/L se saturací Tf <20 %. Samotný feritin ale není plnohodnotným ukazatelem, protože jeho hladiny mohou být sníženy nezávisle na hladinách Fe, zejména při zánětu a oxidativním stresu. Podobně ani saturace Tf nemusí mít vždy dostatečnou vypovídající hodnotu, protože katabolismus či malnutrice snižují sérové hladiny TF, které pak uměle navyšují saturaci Tf při nízkých hladinách Fe (Zhang *et al.* 2019).

Anemie

Anemie je stav, kdy je koncentrace hemoglobinu (Hb) a červených krvinek nižší než obvyklá a nestačí uspokojit potřeby organismu. Anemie se vyskytují až u jedné třetiny světové populace (Kassebaum *et al.* 2014) a jsou často indikátorem chudé stravy a špatného zdravotního stavu (Steinbicker a Muckenthaler 2013). Jsou spojovány se zvýšením morbidity a mortality. Důležitou rolí Hb v organismu je přenos kyslíku ke tkáním (Chaparro a Suchdev 2019).

Symptomy závisí na závažnosti anémie, věku, komorbiditách a rychlosti vzniku. Vyskytnout se mohou i anémie bezpříznakové, které se prokáží pouze laboratorním poklesem Hb (Lopez *et al.* 2016). Častěji se však projevují příznaky, které jsou následkem hypoxických změn ve tkáních jako je únava, vertigo, synkopy, bolesti hlavy, námahová až klidová dušnost a tachykardie (Lopez *et al.* 2016). Dále se mohou na anémii podílet faktory jako deficit Fe, hemoglobinopatie nebo malárie.

Nejčastěji se anémie klasifikují dle vyvolávající příčiny, tvaru a velikosti červených krvinek nebo podle množství Hb v erytrocytech (WHO, 2017). Při sledování hladiny Hb je potřeba vzít v úvahu věk, pohlaví, případné těhotenství, genetické a environmentální faktory a rasu (Chaparro a Suchdev 2019). Hladiny Hb, které definují anemii jsou odlišné u žen (Hb<120 g/L) a u mužů (<130 g/L) starších 15 let (Steinbicker a Muckenthaler 2013). Anemii mohou sekundárně způsobovat i onemocnění jako HIV, tuberkulóza a různá parazitická onemocnění, např. malárie, schistosomiáza nebo některé jiné druhy helmintóz (Chaparro a Suchdev 2019).

Anemie z nedostatku železa

Deficit Fe je nejčastější příčinou anemie. Odhaduje se, že tvoří až 50 % případů anemií u těhotných žen nebo žen ve fertilním věku a až 42 % případů u dětí mladších pěti let. U kojenců a dětí, kterým v raných fázích vývoje chybí dostatečné množství Fe z potravy, se mohou vyvinout nevratné kognitivní deficity. ID se vyskytuje až u 66 % pacientů se srdečním selháním a vede ke snížené toleranci námahy, k progresi selhávání a zvyšuje mortalitu (Zhang *et al.* 2019; WHO 2017).

ID a anemie z nedostatku Fe (iron deficiency anaemia - IDA) bývají způsobeny nejčastěji třemi faktory: zvýšenými požadavky na Fe, omezeným příjmem Fe nebo nadměrnými krevními ztrátami. K funkčnímu deficitu Fe dochází také např. při nemožnosti mobilizace zásob Fe z makrofágů při různých akutních nebo chronických zánětlivých procesech (viz také dále v kapitole **Anemie chronických onemocnění**)

(Munoz, Garcia-Erce a Remacha 2011; Lopez *et al.* 2016). V rámci hematologického vyšetření se IDA projevuje malými erytrocyty (tzv. mikrocytární anemie) se sníženým množstvím krevního barviva v erytrocytech (tzv. mikrochromní anemie) atd.

ID může také ovlivnit metabolismus mědi řadou mechanismů. Jedním je exprese DMT1 systémem IRP/IRE. Tento regulační děj je odpovědí na snížení intracelulární hladiny Fe a exprese souvisejících genů aktivovaných při hypoxii. Dále může docházet k silné indukci exprese transportéru pro měď (ATP7A) při depleci Fe, což může ovlivňovat intracelulární homeostázu mědi a biosyntézu kuproenzymů (Doguer *et al.* 2018).

Anemie z nedostatku vitaminů skupiny B

Vitamíny skupin B se podílejí na biosyntéze Hb a metabolismu Fe. Patří mezi ně riboflavin (B₂), pyridoxin (B₆), kobalamin (B₁₂) a foláty (B₉). Deficit těchto vitaminů je spojen s anemií. Deficit B₁₂ a folátu vede k makrocytární (megaloblastické) anemii. Takovýto deficit vede k poruše syntézy DNA a dělení buněk v kostní dřeni. Dochází k ní při sníženém příjmu těchto nutrientů ve stravě. Mezi nejcitlivější skupiny patří těhotné a kojící ženy, děti a senioři (Chaparro a Suchdev 2019; WHO 2017). Kobalamin je obsažen v živočišných produktech, proto dochází k depleci nejvíce u vegetariánů a veganů. Perniciózní anemie může být způsobena nejen deficitem vit. B₁₂, ale i na podkladě protilátek proti parietálním buňkám žaludeční sliznice a tzv. intrinsic faktoru, který je důležitý pro absorpci B₁₂ ze žaludku (Davenport 1996). Deficit folátů bývá často spojován s málo pestrou stravou založenou na rýži nebo pšenici (Chaparro a Suchdev 2019).

Anemie chronických onemocnění

Anemie chronických onemocnění (anemia of chronic disease – ACD) je druhým nejčastějším typem anemií po IDA. Zahrnuje široký soubor onemocnění, která způsobují anemii: malignity, chronická autoimunitní zánětlivá onemocnění, cytotoxické léky atd. Tyto stavy jsou spojeny s uvolněním cytokinů, které ovlivňují metabolismus Fe. Následkem je blokáda získávání Fe z buněk retikuloendoteliálního systému (slezina, játra) a enterocytů. Vyvolaný nedostatek Fe způsobuje sníženou tvorbu erytrocytů (Madu a Ughasoro 2017; Chaparro a Suchdev 2019). Následkem aktivace hepcidinu prozánětlivými cytokiny dochází ke snížení sérové hladiny Fe a saturace Tf. Hladiny feritinu zůstávají důsledkem zánětu zvýšené. Intestinální absorpce je hepcidinem blokována, tzn., že perorální substitute Fe je neefektivní. Terapeutický účinek má intravenózně podané Fe (Steinbicker a Muckenthaler 2013) nebo podávání erythropoetinu.

2.7.2. Nemoci z přetížení železem (iron overload diseases)

Přetížení Fe by se dalo definovat jako nadbytek Fe v těle bez ohledu na to, zda je přítomné poškození tkáně. Postupné ukládání Fe v orgánech a tkáních zvyšuje riziko hepatální, kardiální nebo pankreatické dysfunkce (Oliveira *et al.* 2014).

Mezi hlavní příčiny systémového přetížení železem patří hereditární hemochromatóza, anemie vedoucí k vyšší absorpci železa (thalasémie, sideropenická anémie, myelodysplastický syndrom), časté krevní transfúze při některých anemiích, např. při léčbě thalasémie nebo při nadměrné substituci Fe u dialyzovaných pacientů (Kelly *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2019).

Hereditární hemochromatóza

Hereditární hemochromatóz (HH) je způsobená mutacemi v 5 genech kódujících různé proteiny související s metabolismem Fe. HH s mutací genu HFE (human hemochromatosis protein) je známá jako HH typu 1a je to nejčastější forma, která postihuje pouze kavkazskou populaci. Mutace genu hemojuvelinu (HJV) souvisí s typem 2 A, tzv. juvenilní HH. Mutace v genu pro hepcidin (HAMP) způsobuje HH typu 2 B. HH typu 3 je spojena s mutací genu pro TfR2. HH typu 1-3 mají společný fenotyp, který se klinicky projevuje jako hypersiderémie. HH typu 4 je autozomálně dominantní onemocnění způsobené tzv. aktivační mutací ferroportinu (gain of function). Ferroportin ztrácí schopnost interagovat s hepcidinem a vede k hepcidinové rezistenci. Nefunkčním transportem z jaterních makrofágů dochází ke kumulaci Fe a může být narušen i transport z enterocytů (Brissot *et al.* 2012, 2019; Ritama a Khaled 2018; Zhang *et al.* 2019).

Příznakem tohoto onemocnění je zvýšená saturace Tf (50-60 %) a ukládání Fe v parenchymatózních orgánech, jako jsou játra, srdce a pankreatické acinové buňky (Brissot *et al.* 2019).

Klasická HH typu 1 je dědičná autozomálně recesivní porucha, kterou charakterizuje nadměrná absorpce Fe ze stravy (Oliveira *et al.* 2014). HFE gen je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 6. Existuje několik různých mutací a polymorfismů tohoto genu, který kóduje transmembránový protein podobný β -2-mikroglobulinu (Andrews 2000; Oliveira *et al.* 2014). Tento protein reguluje interakce mezi Tf a transferinovým receptorem.

Počáteční příznaky onemocnění bývají nespecifické: únava, bolesti břicha, artralgie (Neff 2003). Jak neléčená nemoc progreduje, objevují se příznaky jako hyperpigmentace kůže, polydipsie, hypogonadismus, osteoporóza a cirhóza. Postižení

orgánů může vyústit až v život ohrožující stavy jako jsou arytmie, insulin dependentní diabetes nebo jaterní a srdeční selhání (Andrews 2000; Neff 2003).

Formy HH typu 2, známé historicky jako juvenilní hemochromatózy, jsou vzácnými dědičnými onemocněními. Klinické projevy se vyskytují do 30 let věku (Kelly *et al.* 1998). Časné přetížení Fe může působit fatálně již v takto nízkém věku. Oproti HH 1 typu jsou stejně postiženi muži i ženy. Ke klinickým projevům patří hypogonadotropní hypogonadismus, kardiomyopatie, glukózová intolerance a diabetes, artropatie a jaterní fibróza až cirhóza (Piperno A. *et al.* 2005). Metabolický defekt vede k rychlejšímu ukládání Fe, které se přirozeně zvyšuje při rychlém růstu zejména v pubertě (Andrews 2000). Morbidita a mortalita se významně snižuje díky včasné diagnostice onemocnění a pravidelné léčbě opakovanými venopunkcemi (Piperno A. *et al.* 2005).

Thalasémie

Thalasémie je dědičné onemocnění s mnoha genetickými formami, zahrnující α -thalasémii, β -thalasémii, hemoglobin E/ β -thalasémii a další. Příčinou je defektní gen pro α -globin na 16. chromozomu nebo pro β -globin na 11. chromozomu (Taher a Saliba 2017). Při thalasémii dochází ke snížené expresi jednoho ze dvou globinových řetězců hemoglobinu, α - nebo β -řetězce. Následkem genetické mutace je snížená syntéza a stabilita jednoho z těchto proteinů. Důsledkem toho dochází k akumulaci toho řetězce, který není touto mutací ovlivněn. Tato nevyváženost způsobuje abnormální zránění červených krvinek (Sabath 2017). Dochází k časně apoptóze dozrávajících jaderných erytrocytárních buněk a kompenzatorní expanzi (neúčinná erythropoéza), která vede k chronické hemolytické anémii a přetížení železem (Taher a Saliba 2017).

Tyto mechanismy vedou k řadě klinických projevů, které zasahují řadu orgánů. Dle nutnosti léčby opakovanými krevními transfuzemi se thalasémie rozdělují na transfuzi závislé (transfusion-dependent thalassemia, TDT) a nezávislé (non-transfusion dependent thalassemia, NTDT) (Bou-Fakhredin *et al.* 2017). Díky neúčinné erythropoéze se u NTDT zvyšuje absorpce Fe v gastrointestinálním traktu a dochází k jeho ukládání do jater. U TDT je situace ve vztahu k železu ještě horší, protože je nutno podávat časté krevní transfúze. Základním vyšetřením pro změření koncentrace Fe v játrech je magnetická rezonance, ale cena tohoto vyšetření snižuje jeho dostupnost v řadě rozvojových zemí (Tantiworawit *et al.* 2016). I přes účinnou léčbu chelátory, zůstává přetížení železem hlavní příčinnou morbidity a mortality tohoto onemocnění. Chelatační

terapie s sebou nese řadu nežádoucích účinků a častým problémem je i nízká compliance pacientů (Ganz a Nemeth 2011).

2.8. Reaktivní formy kyslíku

Za reaktivní formy kyslíku (ROS) se považují produkty aerobního buněčného metabolismu produkované při částečné redukci molekulárního kyslíku (Moloney a Cotter 2018). Ačkoliv je kyslík nezbytným prvkem pro buňky, může být i poměrně toxický.

Volným radikálem rozumíme atom nebo skupinu atomů s alespoň jedním nepárovým elektronem (Jimenez-Del-Rio a Velez-Pardo 2012). Chemická přeměna kyslíku v živém organismu může vést k produkci ROS nebo reaktivních forem dusíku, různorodé skupině reaktivních molekul často obsahujících volné radikály (Ye *et al.* 2015).

ROS patří mezi intracelulární signální molekuly nezbytné pro buněčnou homeostázu. Jako mediátory intracelulárního přenosu regulují děje jako autofagii, imunitní odpověď, proliferaci a diferenciaci buněk, transdukcii hypoxického signálu nebo růstového hormonu. Specifická v přenosu signálu ROS využívá různých biologických vlastností jednotlivých druhů radikálů, jako je např. jejich chemická reaktivita, stabilita a schopnost difúze lipidů (Reczek a Chandel 2015).

Zvýšené hladiny ROS mají onkogenní potenciál. Způsobují poškození DNA, proteinů a lipidů, produkují a podporují genetickou nestabilitu a karcinogenezi (Moloney a Cotter 2018). Větší množství těchto sloučenin může vznikat díky snížené hladině enzymů zachycujících volné radikály, zvýšenému metabolismu glukózy, přítomností většího množství růstových faktorů a cytokinů. Vznik ROS může být také důsledkem zvýšené aktivity mitochondriálních oxidáz, NADPH oxidáz, cyklooxygenáz, lipooxygenáz, xantinoxidázy, dysfunkční endotelové NO-syntázy (eNOS) nebo cytochromu P-450 (Poprac *et al.* 2017; Moloney a Cotter 2018).

2.8.1. Vznik ROS

Tyto nestabilní molekuly vznikají částečnou redukcí molekuly kyslíku (O_2). Vzniklé kyslíkové radikály, např. superoxid ($O_2^{\bullet-}$) nebo hydroxyl (OH^{\bullet}), jsou velmi rychle přeměněny ve stabilnější peroxid vodíku (H_2O_2) a kyselinu chlornou (Reczek a Chandel 2015; Moloney a Cotter 2018).

Mitochondrie

Patří mezi největších zdroje ROS v organismu. Mitochondrie mají až deset různých míst, která mohou produkovat reaktivní sloučeniny. Asi 1 % O_2 spotřebovaného mitochondrií vede k produkci $O_2^{\bullet-}$. Ztrátou elektronu z molekuly O_2 vzniká superoxidový kationtový radikál ($O^{\bullet 2+}$). Naproti tomu přijmutím jednoho elektronu vzniká superoxidový aniontový radikál ($O^{\bullet-}$). Přijmutím dalšího elektronu vzniká dále superoxidový iont ($O_2^{\bullet-}$). K redukci dochází pomocí NADPH oxidáz a v komplexech mitochondriálního elektronového transportního řetězce (transportních systémech v dýchacím řetězci, ETC). Největším zdrojem $O_2^{\bullet-}$ v mitochondrii je komplex ETC I a III.

Komplex ETC I produkuje $O_2^{\bullet-}$ při nadbytku NADH, např. při poškození dýchacího řetězce pomalým dýcháním nebo ischemií (Madamanchi a Runge 2013). V prostředí roztoku, např. cytosolu, se $O_2^{\bullet-}$ protonuje ($2 H^+$) pomocí enzymatické katalýzy SOD1 za vzniku H_2O_2 . Naproti tomu $O_2^{\bullet-}$ tvořený mitochondriálním ETC je uvolňován do matrix, kde podléhá rychlé dismutaci na superoxidodismutázou 2 (SOD2).

Komplex ETC III tvoří $O_2^{\bullet-}$ který uvolňuje do mezimembránového prostoru. Odtud pak může procházet napěťově řízenými aniontovými kanály do cytosolu, kde je následně konvertován SOD1 na H_2O_2 (Jimenez-Del-Rio a Velez-Pardo 2012; Reczek a Chandel 2015; Moloney a Cotter 2018). Ke zvýšené produkci ROS dochází při snížení mitochondriálního redoxního potenciálu (hypoxie) nebo při výrazné oxidaci (např. u srdečního selhání) (Madamanchi a Runge 2013).

NADPH oxidáza

Tento enzymový komplex katalyzuje vznik $O_2^{\bullet-}$ během fagocytózy v neutrofilech a makrofázích. Tvorba ROS NADPH oxidázou závisí na druhu biologické membrány, na které je exprimován intra- nebo extracelulárně (plazmatická membrána, endozom, endoplazmatické retikulum, mitochondrie, jádro) (Madamanchi a Runge 2013).

Xantinoxidáza

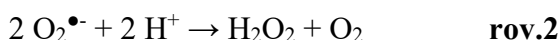
Xantinoxidáza (XO) je pravděpodobně hlavním zdrojem $O_2^{\bullet-}$ v procesu aterosklerózy. Tento enzym, ze skupiny xantinoxidoreduktáz, katalyzuje poslední dva kroky degradace purinů. Za patofyziologických podmínek jako je např. ischemie-hypoxie je XO tvořena nevratnou konverzí z xantindehydrogenázy, která je dominantní formou v dobře okysličených tkáních. Díky pozitivnímu náboji glykosaminu se XO cirkulující v oběhu váže na endoteliální buňky, produkuje ROS a snižuje dostupnost oxidu dusného

(NO), čímž způsobuje endoteliální dysfunkci a zhoršuje vazodilataci hladkých svalů cév (Madamanchi a Runge 2013).

2.8.2. Volné kyslíkové radikály

Superoxid

Superoxid má krátký poločas ve vodném roztoku. Je průběžně produkován mitochondriálním elektronovým transportním systémem, buňkami červené krevní řady a řadou jiných reakcí. Může sloužit jako druhý posel, toxický produkt nebo jako nebezpečný meziprodukt, k jehož rozkladu dochází spontánně. Za fyziologického pH dochází k jeho rychlé dismutaci na peroxid vodíku (viz **rov.1, 2**) (Formanowicz *et al.* 2018).

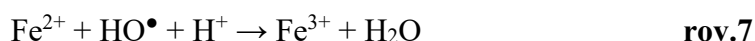
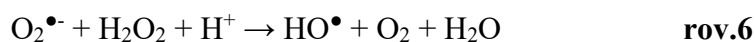
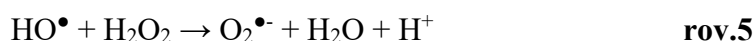
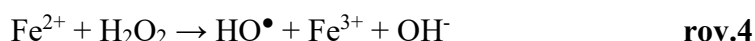


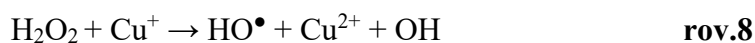
Peroxid vodíku

Na rozdíl od superoxidu je peroxid vodíku silný oxidant a vysoce stabilní molekula, která je schopna procházet membránami. Je metabolizován katalázou, endogenním enzymem, na vodu a kyslík. Tento enzym je zodpovědný za udržení stabilní intracelulární hladiny peroxidu vodíku v nanomolárním rozmezí koncentrací (Formanowicz *et al.* 2018).

Hydroxylový radikál

Během Fentonovy reakce katalyzuje Fe^{2+} tvorbu HO^\bullet za jeho současné oxidace na Fe^{3+} (viz **rov.4**). Fentonova reakce iniciuje sled reakcí, tzv. Haberovu-Weissovu reakci, (viz **rov.5, 6**) (Wardman *et al.* 2019). Konec řetězové reakce je reprezentován **rov.7** (Koppenol 2001). Tyto zmíněné reakce tvoří tzv. Haberův-Weissův okruh. Stejně tak probíhá i reakce s Cu^+ , za vzniku hydroxylového radikálu (viz **rov.8**). Superoxidový radikál může reagovat s Fe^{3+} , kdy je redukováno Fe^{2+} a kyslík (viz **rov.9**) a celá Haber-Weissova reakce tak může pokračovat.



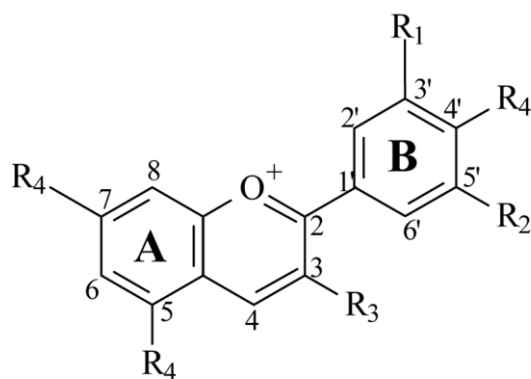


Všechny tyto reakce mohou vést k poruše tvorby proteinů, proliferaci buněk, poškození DNA a k peroxidaci lipidů (Formanowicz *et al.* 2018). Železo přímo reaguje s mastnými nenasycenými kyselinami. Způsobuje závažná poškození buněčné integrity a zprostředkovává oxidaci LDL částic, což je faktor vedoucí k ateroskleróze (Vinchi *et al.* 2014). Tento proces je závislý na redukčních činidlech jako je superoxidový anion a/nebo redukce železitého kationtu. K tomu je zapotřebí produkce peroxidu vodíku i hydroxylového radikálu, a to již zmiňovanou Fentonovou reakcí (Vinchi *et al.* 2014; Formanowicz *et al.* 2018).

2.9. Anthokyny

Anthokyny (z řeckého slova anthos = květina a kyanos = modrá) jsou jednou z nejrozšířenějších skupin polyfenolických barviv náležících do třídy flavonoidů (McGhie a Walton 2007). Jako sekundární metabolity rostlin dodávají barvu plodům, květům a listům v různých odstínech červeno-oranžové až modro-fialové. Díky svým možným profylaktickým a léčebným účinkům se v poslední době těší zájmu vědců po celém světě (Cavalcanti *et al.* 2011; Fernandes *et al.* 2014; Wallace a Giusti 2015).

Dle řady studií mají široké spektrum farmakologických účinků, jako jsou např. antimikrobiální, protizánětlivé, antioxidační, neuroprotektivní a protimutagenní (Khoo *et al.* 2017; Lee *et al.* 2017). V lidovém léčitelství se využívaly k léčbě revmatismu, nachlazení, zánětů horních a dolních cest dýchacích, bolestí břicha apod. (Strugała *et al.* 2018). Dle studií na potkanech snižuje potrava bohatá na flavonoidy postischemické poškození myokardu. To dokládají i některé studie poukazující na nižší mortalitu u pacientů s onemocněním koronárních tepen nebo nižší incidenci infarktu myokardu u starších mužů (Heim *et al.* 2002). Velký zájem vyvolávají hlavně jejich antioxidační účinky potencované schopností chelatovat ionty kovů jako jsou Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (Heim *et al.* 2002).



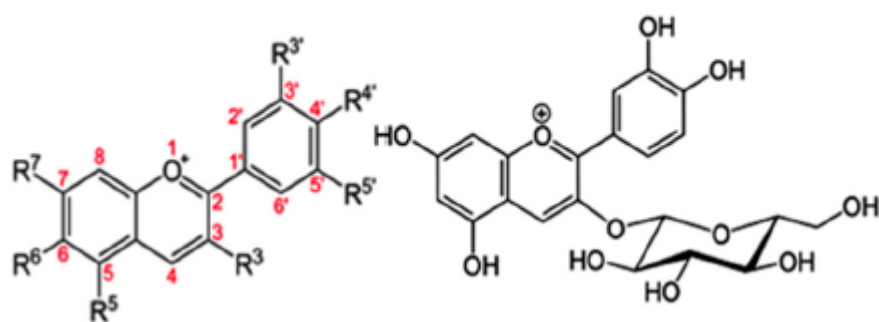
Obr.7 Flavyliový kationt, cyanidin $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$; $R_4 = \text{OH}$. Převzato z McGhie a Walton, 2007.

2.9.1. Vliv chemické struktury na stabilitu anthokyanů

Anthokyany jsou glykosylované produkty anthokyanidinů, tzn. oxygenovaných derivátů 2-fenylbenzopyriliového kationtu. Tato flavyliová sůl obsahuje dva benzoylové kruhy (A a B) oddělené šestičlenným heterocyklickým kruhem (viz **Obr.7**) Vyskytují se primárně jako glykosidy příslušných aglykonů anthokyanidinů (Prior a Wu 2006; McGhie a Walton 2007; Zhao *et al.* 2017). Anthokyany se strukturně liší počtem hydroxylových skupin, stupněm metylace hydroxylových skupin, počtem připojených molekul cukrů a jejich polohou napojení na aglykon (McGhie a Walton 2007). Nejčastějším glykosidicky vázaným cukrem bývá glukóza, rhamnóza, galaktóza, méně často arabinóza a xylóza.

Nejčastěji bývají anthokyany glykosylovány v poloze 3-OH (3-O-monoglykosidy), méně současně v polohách 3-OH a 5-OH (3,5-O-diglykosidy) (McGhie a Walton 2007; Fernandes *et al.* 2014). V přírodě se vyskytuje okolo 17 druhů anthokyanidinů, ale pouze šest z nich je všudypřítomných: cyanidin, delphinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin a malvidin. Jejich chemická struktura se liší v poloze 3' a 5' na kruhu B (viz **Obr.8**). Navázané cukry mohou být také dále acylované širokým spektrem aromatických a alifatických kyselin (Prior a Wu 2006).

Anthokyaniny jsou ale reaktivní a rychle degradovatelné molekuly. Rozkladu podléhají v přítomnosti kyslíku a působením vysokých teplot. Na jejich stabilitu a barvu má vliv světlo, mnohé enzymy a hlavně pH. Ve vodném prostředí, např. buněčných vakuol (prostředí o pH 2,5 – 7,5), dochází vlivem pH k dynamické rovnováze pěti různě barevných struktur aglykonu (červený flavyliový kationt, bezbarvá karbinolová báze, červená neutrální a modrá aniontová chinoidní báze, žlutý chalkon) (McGhie a Walton 2007; Fernandes *et al.* 2014; Spilková 2016). Proto bude molekulární složení roztoku anthokyanů vždy závislé na pH, teplotě a čase. Rozdílné pH podmínky mohou mít patofyziologický význam. Tkáňová acidóza je přítomná při zánětlivých stavech, zejména infarktu myokardu nebo tumorech. Jednoznačnou roli hrají také fyziologické rozdíly pH v různých částech lidského těla (např. žaludek, lysozomy).



		R3'	R4'	R5'	R3	R5	R6	R7
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	H	OH
Delphinidin	Dp	OH	OH	OH	OH	OH	H	OH
Malvidin	Mv	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	H	OH
Pelargonidin	Pg	H	OH	H	OH	OH	H	OH
Peonidin	Pn	OCH ₃	OH	H	OH	OH	H	OH
Petunidin	Pt	OH	OH	OCH ₃	OH	OH	H	OH

Obr.8 Struktura nejběžnějších anthokyanů (vlevo) a cyanidin-3-O-glukosidu (vpravo).
Převzato z Olivas-Aguirre *et al.* 2016.

2.9.2. Biodostupnost

Průchod anthokyanů trávicím traktem je důležitým parametrem jejich účinnosti. Biologické vlastnosti zjištěné z *in vitro* studií nemusí korelovat s účinností *in vivo*, kde bude záležet na absorpci, metabolismu, tkáňové distribuci a exkreci. Jejich nestabilita

komplikuje různé druhy experimentů, například standartní antioxidační testy, které se provádějí při různých pH. Výsledky mohou záviset na pH, teplotě, čase od zředění testované látky a typu testu Tyto vlastnosti je odlišují od ostatních flavonoidů, které se vstřebávají převážně formou svých aglykonů pasivní difuzí po předchozí enzymatické deglykosylaci. (Hassimotto *et al.* 2008). Anthokyany mají oproti jiným flavonoidům ještě nižší biodostupnost. Anthokyany a jejich metabolity včetně aglykonů podléhají ale enterohepatální cirkulaci. Vylučují se převážně močí (Fernandes *et al.* 2014).

Dle řady studií na zvířecích i humánních modelech se anthokyany v určité míře vstřebávají i v žaludku ačkoliv přesný mechanismus není znám (McGhie a Walton 2007; Fernandes *et al.* 2012, 2014). V kyselém prostředí žaludečních šťáv se vyskytují ve formě kationtu, který není schopen prosté difuze. Ke vstřebávání by patrně mohlo docházet saturovatelným aktivním transportem v žaludečních epitelálních buňkách (Smeriglio *et al.* 2016). Dle řady studií by tímto transportérem mohl být membránový přenašeč organických aniontů (OAT), ale i sodíko-glukózový transportér 1 (SGLT1), glukózový transportér 1 a 3 (GLUT1 a GLUT3) a monokarboxylový transportér (MCT1). Za vazbu anthokyan-transportér by mohla zodpovídat specifická konformace na kruhu B a připojený cukerný zbytek (Olivas-Aguirre *et al.* 2016).

Při průchodu střevem mění anthokyany své strukturní uspořádání v závislosti na změně pH. Dále zde dochází ke spontánní degradaci na fenolické kyseliny a aldehydy, protokatechovou kyselinu a fluoroglucinol aldehyd. Tyto metabolity se podílejí na biodostupnosti anthokyanů a mohou se spolupodílet na jejich antioxidačních a zdraví prospěšných účincích (Smeriglio *et al.* 2016). Na celém procesu absorpce ve střevě se může také podílet enzym laktáza-floridzin hydroláza (LPH), která se nachází na kartáčovém lemu epitelových buněk v lumen tenkého střeva. Zde dochází k hydrolýze glykosidické vazby, čímž se uvolní lipofilnější aglykon, který může projít do buňky pasivní difuzí.

Alternativně může dojít k rozštěpení molekuly anthokyanu pomocí cytosolové β -glukosidázy (CBG), která se nachází uvnitř enterocyty. Aby došlo k této glykolýze, musí být ale polární glykosid transportován do epitelové buňky např. výše zmíněnými transportéry jako SGLT1 (Crozier, Del Rio a Clifford 2010). Dle experimentů *in vitro* se na metabolismu v tlustém střevě spolupodílí i mikrobiální enzymy střevního mikrobiomu (Hassimotto *et al.* 2008). Poznání a lepší pochopení absorpce a metabolismu anthokyanů pomůže umožnit lepší vysvětlení jejich případné zdravotní prospěšnosti.

V experimentech s podáváním extraktů bohatých na anthokyany byly naměřené koncentrace cyanidinu v plazmě nízké, ale antioxidační kapacita plazmy byla i přesto zvýšená. Ačkoliv by tento účinek mohl být podpořen jinými antioxidanty jako je vitamin C, E nebo kyselina močová, dle výsledků Hassimotta a spol. se zdá, že je tento fenomén spojen právě s anthokyany (Hassimotto *et al.* 2008). Zdá se tedy, že i přes nízké hodnoty detekovatelné v plazmě či moči, mohou být anthokyany biologicky účinné. Není ale jasné, jestli se na tom výrazně nepodílejí jejich metabolity.

2.9.3. Antioxidační aktivita anthokyanů

Je řada důkazů pro to, že oxidativní stres je příčinou mnoha onemocnění jako jsou např. ateroskleróza, ischemické stavy, zánětlivá onemocnění, karcinogeneze, stárnutí a neurodegenerativní onemocnění (Acquaviva *et al.* 2003). Antioxidační potenciál anthokyanů je závislý na počtu a na pozici navázaných hydroxylových skupin (-OH), konjugovaných skupinách, stupni glykosylace a schopnosti aromatické skupiny poskytnout elektron (Reis *et al.* 2016).

Aby docházelo k chelataci kovových iontů, musí mít anthokyanidin ve struktuře alespoň dvě hydroxylové skupiny navázané na kruhu B (Sigurdson *et al.* 2016). Hydroxylace v pozici C3' a C4' na kruhu B a C3 na kruhu C základní struktury flavyliového kationtu je zodpovědná za antioxidační aktivitu (viz **Obr.7**). Díky 3',4'- dihydroxy skupinám anthokyany rychle chelatují ionty např. Fe a Cu. Inhibují tím oxidaci LDL částic indukovanou mědí nebo peroxidovým radikálem, se stechiometrií reakce 1:1 (Noda *et al.* 2002; Reis *et al.* 2016). Že by antioxidační působení anthokyanů bylo pouze díky chelataci iontů kovů se však zdá nepravděpodobné. Tento mechanismus vyžaduje disociaci OH skupin anthokyanů, které se chovají jako slabé kyseliny. Výsledky studie Yi *et al.* 2010 ukázaly lineární korelaci mezi antiradikálovou aktivitou anthokyanů a inhibičním účinkem na oxidační poškození epitelii. Čím více OH skupin bylo navázaných na kruh B, tím vyšší byl inhibiční účinek na oxidační poškození endotelu (Yi *et al.* 2010).

Methylace v pozicích C3', C4' a C3 tuto schopnost snižuje. Při srovnání vlivu navázaných cukerných zbytků na molekulu anthocyanidinu, se jako nejúčinnější v antioxidačním působení jeví substituce monosacharidy (glukóza, galaktóza) (Yi *et al.* 2010). Glykosylace anthocyanidinů na atomech uhlíku v polohách 3,5,7,3' a 5' výrazně zvyšuje stabilitu molekuly. Zvyšuje se polarita a velikost molekuly, čímž roste jejich

odolnost vůči fyzikálně-chemickým faktorům (světlo, teplo, změny pH, peroxid vodíku) a biochemickým faktorům (trávicí enzymy žaludku a pankreatu) (Smeriglio *et al.* 2016).

Anthokyany mají schopnost přímo vychytávat volné radikály díky jejich schopnosti odevzdat elektron. Zvyšují endogenní antioxidační aktivitu obnovením nebo zvýšením aktivity antioxidačních enzymů jako je SOD a glutathionperoxidázy (Smeriglio *et al.* 2016). Redukční potenciál cyanidin-3-glukosidu je závislý na pH. Díky deprotonizaci hydroxylových skupin se snadno oxiduje při vyšším pH (Olivas-Aguirre *et al.* 2016). Silná antioxidační aktivita je důsledkem elektronového deficitu uvnitř chemické struktury anthokyanů (Reis *et al.* 2016).

Anthokyany mají vysokou vaznost k albuminu při pH 7,0 a nízkou při pH 4,0, a to díky různým elektrostatickým silám. Cyanidin-3-glukosid se váže na albumin pomocí slabých vazeb jako jsou vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly nebo hydrofobní interakce (Olivas-Aguirre *et al.* 2016).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité materiálové a přístrojové vybavení

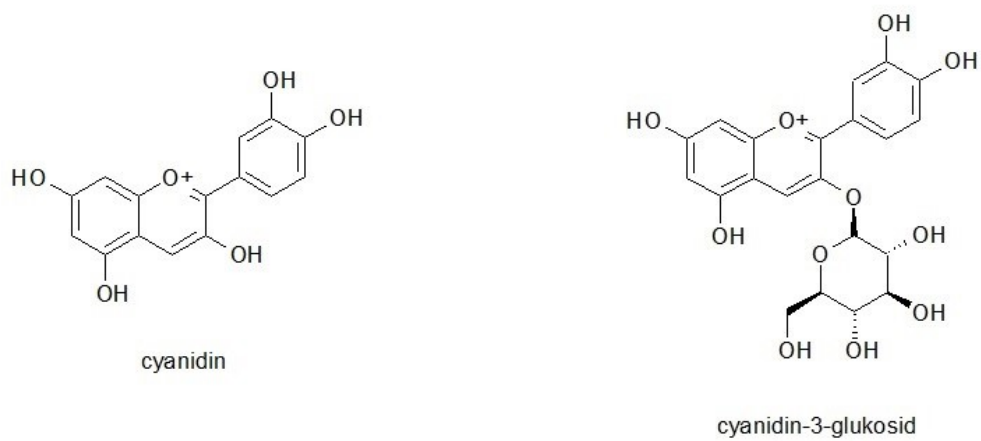
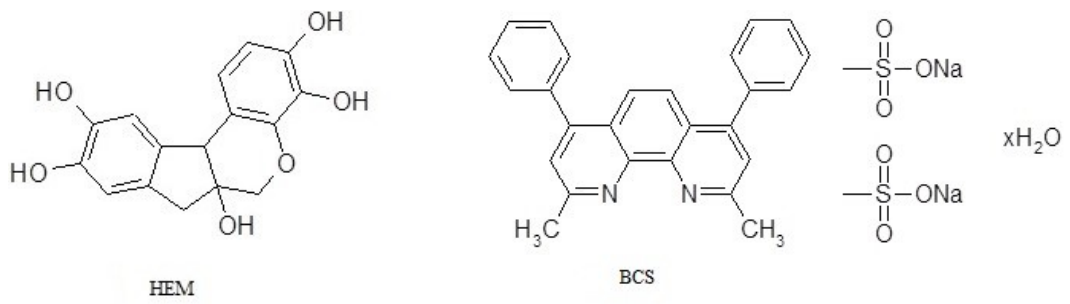
3.1.1. Chemikálie

Reagencia a pufrý

- hematoxylin (HEM, **Obr.9**), Sigma – Aldrich (USA)
- hydroxylamine hydrochlorid (HA), Sigma – Aldrich
- dimethylsulfoxid (DMSO), Lach – Ner (ČR)
- pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Sigma – Aldrich
- chlorid měďný (CuCl), Penta (ČR)
- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) a její sodná sůl, Sigma – Aldrich
- disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny (BCS, **Obr.9**), Sigma – Aldrich
- kyselina octová a octan sodný, Sigma – Aldrich
- ferozin ([4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonová kyselina, disodná sůl], **Obr.9**), Sigma - Aldrich
- heptahydrát síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), Penta
- hexahydrát chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), Penta

Testované látky

- cyanidin, Sigma Aldrich
- cyanidin-3-glukosid, Sigma Aldrich, struktury viz **Obr.9**.



Obr. 9 Strukturní vzorce indikátorů (hematoxylin, BCS, ferozin) a testovaných látek (cyanidin, cyanidin-3-glukosid).

3.1.2. Přístroje a pomůcky

Přístroje

- spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTecInstruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- analytické váhy KERN ALT 220-4NM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- třepačka pro mikrotitrační destičky IKA[®]MS 3 digital (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- ultrazvuková lázeň KRAINTEK[®] (Kraintek Czech s.r.o., Hradec Králové, Česká republika)

Pomůcky

- automatické pipety (Brand, Německo)
- vícekanálová pipeta (Biohit, Německo)
- mikrotitrační destičky, 96 jamek (Brand, Německo)

3.2. Stanovení redukce Cu^{2+} iontů

3.2.1. Příprava základních roztoků

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (pentahydrát síranu měďnatého)

Základní roztok byl připraven rozpuštěním navážky pentahydrátu síranu měďnatého v takovém množství destilované vody, aby výsledná koncentrace Cu^{2+} iontů byla 5 mM ($M_w = 249,69$ g/mol).

Hydroxylamin hydrochlorid (HA)

Základní roztok byl připraven rozpuštěním navážky hydroxylaminu v takovém množství destilované vody, aby výsledná koncentrace byla 100 mM ($M_w = 69,49$ g/mol). Dále byl tento základní roztok naředěn na koncentraci 1 mM (pro pH 6,8 a 7,5) a 10 mM (pro pH 5,5 a 4,5).

Disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny (BCS)

Základní roztok byl připraven rozpuštěním navážky BCS v takovém množství destilované vody, aby výsledná koncentrace byla 5 mM ($M_w = 564,54$ g/mol).

Octanový a HEPES pufr

Vždy bylo připraveno 250 ml 15mM pufru. HEPES pufr o pH 6,8 a 7,5 obsahoval konkrétně 15 mM sodné soli HEPES ($M_w = 260,29$ g/mol) a 71,7; respektive 14,3 mM HEPES ($M_w = 238,306$ g/mol). Na 100 ml roztoku pufru bylo potřeba 0,390 g sodné soli HEPES a 0,340 g, resp. 1,700 g HEPES.

Octanové pufrы o pH 4,5 a 5,5 obsahovaly vždy 15 mM octanu sodného ($M_w = 136,1$ g/mol) a 27,3; respektive 2,7 mM kyseliny octové ($M_w = 60,05$ g/mol). Na 100 ml roztoku pufru bylo potřeba cca 0,204 g octanu sodného a 0,164 g, resp. 0,016 g kyseliny octové.

3.2.2. Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky

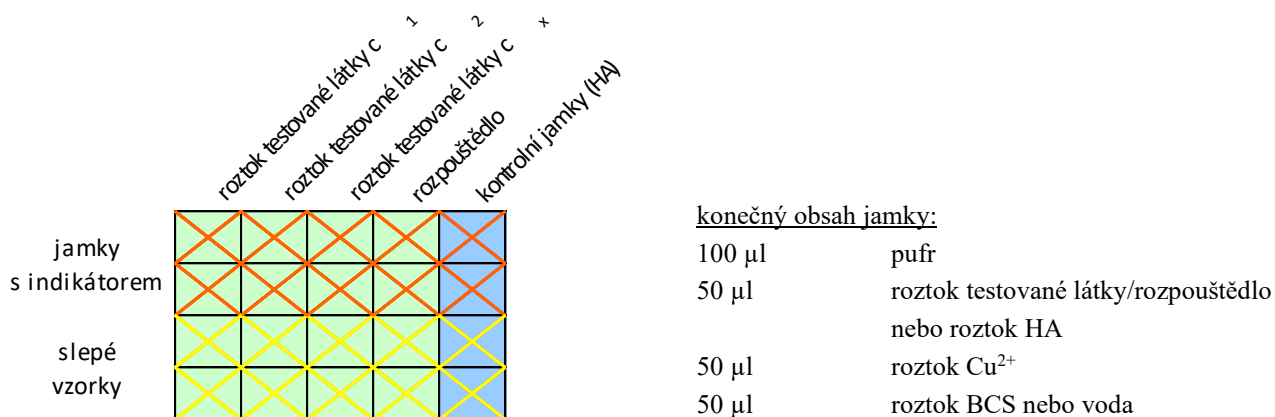
Pracovní roztok měďnatých (Cu^{2+}) iontů byl připraven naředěním vypočítaného množství 5 mM základního roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ roztokem DMSO tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 250 μM do objemu 15 ml.

Roztoky testovaných látek (cyanidin, $M_w = 287,24$ g/mol; cyanidin-3-glukosid, $M_w = 484,8$ g/mol) byly připraveny rozpuštěním navážky (vždy 5-10 mg) v DMSO tak, aby výsledná koncentrace byla vždy 10 mM. Tento roztok byl následně ředěn v DMSO dle potřeby experimentu.

3.2.3. Experimentální stanovení redukce Cu^{2+} v pufrch (pH 4,5 - 7,5)

Provedení experimentu (Obr.10)

- Pomocí multikanálové mikropipety bylo na mikrotitrační destičku do všech jamek napipetováno 100 μl příslušného pufru.
- Následně bylo do **testovacích jamek** ve sloupcích 1-4 automatickou pipetou přidáno 50 μl roztoku příslušné koncentrace testované látky.
- Do předposledního sloupce bylo pipetováno pouze rozpouštědlo DMSO. V posledním sloupci bylo do **kontrolních jamek** přidáno 50 μl roztoku hydroxylaminu hydrochloridu v různé koncentraci dle pH. Dle předchozích výsledků (Říha *et al.* 2013) byla použita koncentrace 1 mM pro pH 6,8 a 7,5 nebo koncentrace 10 mM pro pH 4,5 a 5,5.
- Následně bylo přidáno do všech jamek 50 μl 250 μM roztoku Cu^{2+} iontů.
- Aby se roztoky kvalitně smísily, byl obsah destičky promícháván 2 minuty na třepače pro mikrotitrační destičky.
- Po promíchání se přidalo nejprve 50 μl vody do druhé poloviny jamek, tzn. do 3. a 4. řady (x). Do prvních dvou řad se pak ihned přidalo 50 μl připraveného základního roztoku BCS (x).
- Absorbance byla měřena okamžitě a pak po 5 minutách při 484 nm.



Obr.10 Obecné schéma uspořádání pipetovaných roztoků v mikrotitrační destičce pro stanovení redukce měďnatých iontů BCS.

$c_1 - c_x$: roztoky testovaných látek, které byly připravované v koncentrační řadě vždy dle potřeby experimentu; rozpouštědlo = roztok DMSO (negativní kontrola); jamky s indikátorem BCS (x) a slepé vzorky s vodou (x)

3.3. Stanovení chelatace Cu^{2+} hematoxylinem

3.3.1. Příprava základních roztoků

CuSO₄·5H₂O (pentahydrát síranu měďnatého)

Základní roztok měďnatých iontů byl připraven rozpuštěním navážky pentahydrátu síranu měďnatého v takovém množství destilované vody, aby výsledná koncentrace Cu^{2+} iontů byla 5 mM ($M_w = 249,69$ g/mol).

Hematoxylin (HEM)

Základní roztok byl připraven rozpuštěním navážky hematoxylinu v takovém množství DMSO, aby výsledná koncentrace byla 5 mM ($M_w = 302,28$ g/mol). Tento základní roztok mohl být použit maximálně po dobu 5 hodin.

Octanový a HEPES pufr

Oba pufrы byly připraveny dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Cu^{2+} iontů (viz kapitola 3.2.1.).

3.3.2. Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky

Pracovní roztok měďnatých (Cu^{2+}) iontů byl připraven naředěním vypočítaného množství 5 mM základního roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ destilovanou vodou tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 250 μM do objemu 15 ml.

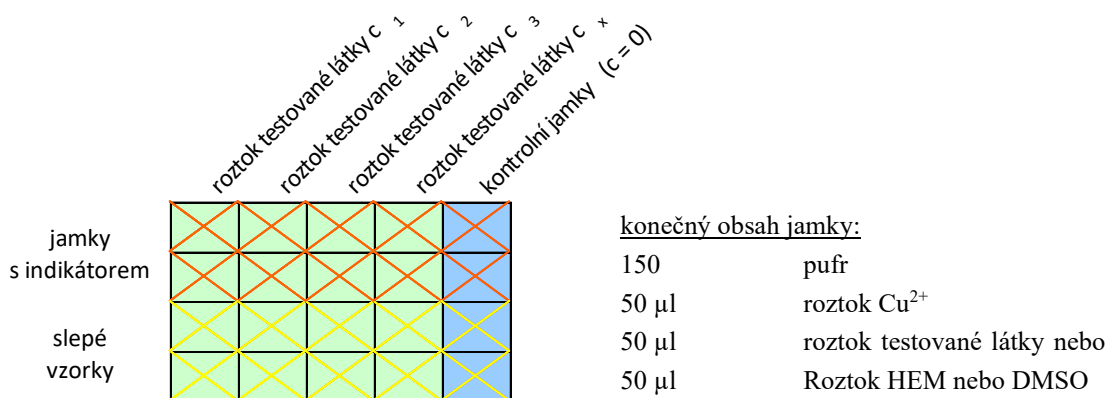
Pracovní roztok hematoxylinu byl připraven naředěním vypočítaného množství hematoxylinu roztokem DMSO tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 250 μM . Po 90 minutách bylo potřeba si v případě potřeby tento roztok připravit znovu.

Roztoky testovaných látek (cyanidin, cyanidin-3-glukosid) byly připraveny stejně jako v případě stanovení redukce Cu^{2+} iontů (viz kapitola 3.2.2.).

3.3.3. Experimentální stanovení chelatace Cu^{2+} hematoxylinem

Provedení experimentu (Obr.11)

- Pomocí multikanálové mikropipety bylo na mikrotitrační destičku do všech jamek napipetováno 100 μl příslušného pufru (pH 7,5, 6,8, 5,5).
- Poté bylo do všech sloupců přidáno 50 μl 250 μM roztoku měďnatých iontů.
- Následně bylo do **testovacích jamek** ve sloupcích 1-4 automatickou pipetou přidáno 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci. Do **kontrolních jamek** v posledním sloupci bylo přidáno rozpouštědlo DMSO.
- Aby došlo k důkladnému promíchání jamek, byla mikrotitrační destička promíchávána 2 minuty na třepačce.
- Po promíchání obsahu jamek bylo nejprve přidáno 50 μl rozpouštědla DMSO do druhé poloviny jamek, tzn. do 3. a 4. řady (x). Tato skupina jamek sloužila jako slepý vzorek.
- Následně bylo do prvních dvou řad přidáno 50 μl 250 μM roztoku hematoxylinu (x).
- Takto připravené roztoky byly promíchávány ještě 3 minuty na třepačce. Poté byla ihned (tzn. v čase 3 min.) změřena absorbance při 610 nm pro pH 7,5, při 590 nm pro pH 6,8, při 595 nm pro pH 5,5 a následně v čase 7 minut.



Obr.11 Obecné schéma uspořádání pipetovaných roztoků v mikrotitrační destičce pro stanovení chelatace iontů mědi hematoxylinem.

$c_1 - c_x$: roztoky testovaných látek, které byly připravované v koncentrační řadě vždy dle potřeby experimentu; $c = 0$: kontrolní jamky (roztok DMSO); jamky s indikátorem HEM (x) a slepé vzorky s DMSO (x)

3.4. Stanovení chelatace Cu^{2+} a Cu^+ BCS

3.4.1. Příprava základních roztoků

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (pentahydrát síranu měďnatého)

Pro přípravu byl použit stejný postup jako ve stanovení Cu^{2+} hematoxylinem (viz kapitola 3.3.1.).

CuCl (chlorid měďný)

Pro přípravu základního roztoku měďných iontů bylo potřeba připravit nejprve vodný roztok 0,1 M HCl a 1 M NaCl. Nejprve bylo připraveno potřebné množství 0,1 M vodného roztoku HCl ($M_w = 36,46 \text{ g/mol}$) z 32 % roztoku HCl (hustota roztoku 1,16 kg/l). V takto připraveném roztoku bylo rozpuštěno vypočítané množství NaCl tak, aby výsledná koncentrace byla 1 M ($M_w = 58,44 \text{ g/mol}$). Za pomoci ultrazvukové lázně byla v tomto roztoku rozpuštěna navážka CuCl tak, aby vznikl roztok o koncentraci měďných iontů 5 mM ($M_w = 98,99 \text{ g/mol}$).

Disodná sůl bathokuproindisulfonové kyseliny (BCS) a hydroxylamin hydrochlorid (HA)

Oba roztoky byly připraveny dle stejné metodiky jako pro stanovení Cu^{2+} (viz kapitola 3.3.1.).

Octanový a HEPES pufr

Oba pufrы byly připraveny dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Cu^{2+} iontů (viz kapitola 3.2.1.).

3.4.2. Příprava pracovních roztoků a roztoků testované látky

Pracovní roztok Cu^+ iontů byl připraven naředěním základního roztoku CuCl roztokem DMSO na výslednou koncentraci 250 μM do objemu 15 ml.

Pracovní roztok Cu^{2+} iontů byl připraven stejně jako při chelataci hematoxylinem (viz kapitola 3.3.2.).

Roztok testované látky (cyanidin) byl připraven stejně jako v případě stanovení redukce Cu^{2+} iontů (viz kapitola 3.2.2.).

3.4.3. Experimentální stanovení chelatace Cu^{2+} s BCS

Provedení experimentu:

- Pomocí multikanálové mikropipety bylo na mikrotitrační destičku do všech jamek napipetováno 100 μl příslušného pufru (pH 7,5, 6,8, 5,5, 4,5).
- Poté bylo do všech sloupců přidáno 50 μl 250 μM roztoku měďnatých iontů.
- Následně bylo do **testovacích jamek** ve sloupcích 1-4 automatickou pipetou přidáno 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci. Do **kontrolních jamek** v posledním sloupci bylo přidáno rozpouštědlo DMSO.
- Aby došlo k důkladnému promíchání jamek, byla mikrotitrační destička promíchávána 2 minuty na třepačce.
- Po promíchání obsahu jamek bylo přidáno 50 μl roztoku HA. Pro pH 7,5, 6,8 o koncentraci 1 mM a pro koncentraci 10 mM při pH 5,5, 4,5, dle dříve provedených experimentů (Říha et. al. 2013).
- Následně byla směs promíchávána 1 minutu na třepačce.
- Po promíchání roztoku bylo do druhé poloviny mikrotitrační destičky (slepé vzorky) přidáno 50 μl vody (x). Do první poloviny destičky bylo ihned pipetováno 50 μl 5 mM roztoku BCS, tzn. jamky s indikátorem (x).
- Absorbance byla měřena ihned (tzn. v čase 0 min.) při vlnové délce 484 nm a druhé měření bylo provedeno v čase 5 minut.

3.4.4. Experimentální stanovení chelatace Cu^+ s BCS

Provedení experimentu:

- Pomocí multikanálové mikropipety bylo na mikrotitrační destičku do všech jamek napipetováno 100 μl příslušného pufru (pH 7,5, 6,8, 5,5, 4,5).
- K obsahu jamek bylo přidáno 50 μl roztoku HA. Pro pH 7,5 a 6,8 o koncentraci 1 mM a pro pH 5,5 a 4,5 o koncentraci 10 mM dle dříve provedených experimentů (Říha et. al. 2013).
- Poté bylo do všech sloupců pipetováno 50 μl 250 μM roztoku měďných iontů.
- Pro řádné promíchání byla mikrotitrační destička třepána 1 minutu.
- Následně bylo do **testovacích jamek** přidáno 50 μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci. Do **kontrolních jamek** v posledním sloupci bylo přidáno rozpouštědlo DMSO.
- Pro důkladné smísení byla mikrotitrační destička promíchávána 2 minuty na třepačce.

- Po promíchání roztoku bylo do druhé poloviny mikrotitrační destičky, tzn. slepé vzorky (x), přidáno 50 μ l vody. Do první poloviny destičky bylo poté ihned pipetováno 50 μ l 5 mM roztoku BCS, tzn. jamky s indikátorem (x) (viz obecné schéma mikrotitrační destičky **Obr.11**).
- Absorbance byla měřena ihned (tzn. v čase 0 min.) při vlnové délce 484 nm a druhé měření bylo provedeno v čase 5 minut.

Schéma obou experimentů bylo analogické jako v experimentu s hematoxylinem (viz kapitola 3.3.3.). V tomto experimentu byl použit BCS jako indikátor a HA jako redukční činidlo, které redukovalo přebytečné Cu^{2+} ionty.

3.5. Stanovení redukce Fe^{3+} iontů

3.5.1. Příprava základních roztoků

Ferozin

Základní roztok byl připraven rozpuštěním navážky ferozinu v takovém množství destilované vody, aby výsledná koncentrace roztoku byla 5 mM ($M_w = 492,5$ g/mol).

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (hexahydrát chloridu železitého)

Základní roztok železitých iontů byl připraven rozpuštěním daného množství hexahydrátu chloridu železitého v destilované vodě tak, aby vznikl roztok o výsledné koncentraci 2,5-7,5 mM ($M_w = 69,49$ g/mol). Tento roztok byl následně ředěn v destilované vodě dle potřeby experimentu.

Hydroxylamin hydrochlorid (HA)

Základní roztok byl připraven rozpuštěním navážky hydroxylaminu v takovém množství destilované vody, aby výsledná koncentrace byla 100 mM ($M_w = 69,49$ g/mol). Dále byl tento základní roztok naředěn na koncentraci 1 mM (pro pH 6,8 a 7,5) a 10 mM (pro pH 5,5 a 4,5).

Octanový a HEPES pufr

Oba pufrы byly připraveny dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Cu^{2+} iontů (viz kapitola 3.2.1.).

3.5.2. Příprava pracovních roztoků a roztoků testovaných látek

Pracovní roztok Fe^{3+} iontů byl připraven naředěním vypočítaného množství základního roztoku $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ destilovanou vodou tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla $250 \mu\text{M}$ o objemu 15 ml. Tento roztok byl připravován vždy čerstvý, před každým použitím v experimentu.

Roztoky testovaných látek (cyanidin, $M_w = 287,24 \text{ g/mol}$; cyanidin-3-glukosid, $M_w = 484,8 \text{ g/mol}$) byly připraveny rozpuštěním navážky (vždy 5-10 mg) v DMSO tak, aby výsledná koncentrace byla vždy 10 mM, 1 mM a 0,1 mM. Tento roztok byl následně ředěn v DMSO dle potřeby experimentu.

3.5.3. Kontrolní test železitých iontů

Před provedením vlastního experimentu muselo být ověřeno, že došlo ke správnému naředění pracovního roztoku železitých iontů.

Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno do dvou jamek:

- 100 μl DMSO
- 50 μl pracovního roztoku čerstvě připravených železitých iontů o koncentraci $250 \mu\text{M}$
- 50 μl roztoku hydroxylaminu o koncentraci 10 mM
- 50 μl roztoku ferozinu o koncentraci 5 mM

Následně byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Výsledná absorbance musela být v rozmezí 1.0 ± 0.2 , v jiném případě musel být navážen a naředěn nový roztok.

3.5.4. Experimentální stanovení redukce Fe^{3+} v pufrch (pH 4,5 – 7,5)

Vlastní provedení experimentu (Obr. 12)

- Multikanálovou pipetou bylo na mikrotitrační destičku pipetováno 150 μl daného pufru (pH 4,5, 5,5, 6,8, 7,5) do všech **testovacích jamek**. Do **kontrolních jamek** v posledním sloupci bylo pipetováno 150 μl pufru (pH 4,5).
- Dále bylo do všech **testovacích jamek** přidáno 50 μl roztoku testované látky, do předposledního sloupce ($c = 0 \text{ mM}$) bylo přidáno stejné množství daného rozpouštědla (destilovaná voda), a do **kontrolních jamek** v posledním sloupci bylo napipetováno 50 μl HA.

- Pro další část experimentu musel být vždy opět připraven čerstvý roztok železitých iontů o koncentraci 250 μM , ze kterého bylo dále pipetováno vždy 50 μl do všech jamek.
- Poté byla mikrotitrační destička promíchávána na třepačce 2 minuty, aby došlo k řádnému promíchání obsahu všech jamek.
- Po promíchání obsahu jamek bylo nejprve přidáno 50 μl roztoku ferozinu do prvních dvou řad (x), a do druhé poloviny jamek, tzn. do 3. a 4. řady (x) bylo pipetováno 50 μl destilované vody. Tato skupina jamek sloužila jako slepý vzorek.
- Absorbance byla měřena při 562 nm, a to ihned a po 5 minutách.

	testovaný roztok - c = 10 mM	testovaný roztok - c = 1 mM	testovaný roztok - c = 0,1 mM	testovaný roztok - c = 0 mM rozpuštědlo	kontrola (HA)	<u>konečný obsah jamek:</u>	
jamky s ferozinem	X	X	X	X	X	150 μl	pufr
	X	X	X	X	X	50 μl	roztok testované látky / HA
slepé vzorky	X	X	X	X	X	50 μl	Fe^{3+} 0,25mM ve všech jamkách
	X	X	X	X	X	50 μl	roztok ferozinu 5mM / voda

Obr. 12 Obecné schéma uspořádání pipetovaných roztoků v mikrotitrační destičce pro stanovení redukce železitých iontů ferozinem.

c = roztoky testovaných látek o koncentraci 10 mM, 1 mM, 0,1 mM; c = 0; kontrolní jamky (roztok pufru); jamky s indikátorem ferozin (x) a slepé vzorky s vodou (x)

3.6. Stanovení chelatace Fe^{3+} iontů

3.6.1. Příprava základních roztoků

Ferozin

Základní roztok byl připraven dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Fe^{3+} iontů (viz kapitola 3.5.1.)

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (hexahydrát chloridu železitého)

Základní roztok železitých iontů byl připraven rozpuštěním vypočítané navážky hexahydrátu chloridu železitého v destilované vodě tak, aby vznikl roztok o výsledné koncentraci nejčastěji 2,5-7,5 mM ($M_w = 69,49$ g/mol) v objemu 15 ml. Tento roztok byl následně ředěn v destilované vodě dle potřeby experimentu vždy těsně před jeho použitím.

Hydroxylamin hydrochlorid (HA)

Základní roztok byl připraven dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Fe^{3+} iontů (viz kapitola 3.5.1.)

Octanový a HEPES pufr

Oba pufrы byly připraveny dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Cu^{2+} iontů (viz kapitola 3.2.1.).

3.6.2. Příprava pracovních roztoků a roztoků testovaných látek

Pracovní roztok železitých (Fe^{3+}) iontů byl připraven naředěním vypočítaného množství základního roztoku $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ destilovanou vodou tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 250 μM v objemu 15 ml. Tento roztok byl připravován vždy čerstvý před každým použitím v experimentu.

Roztoky testovaných látek (cyanidin, cyanidin-3-glukosid) byly připraveny dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Fe^{3+} iontů (viz kapitola 3.5.2.).

3.6.3. Kontrolní test železitých iontů

Postup byl zcela shodný jako v případě redukce Fe^{3+} iontů (viz kapitola 3.5.3.).

3.6.4. Experimentální stanovení chelatace Fe³⁺ v pufru (pH 4,5)

Provedení experimentu (Obr.13)

- Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno pomocí multikanálové pipety 150 µl pufru o pH 4,5 do všech jamek.
- Poté bylo pipetováno 50 µl roztoku testované látky do **testovacích jamek**. Do posledního sloupce, tzv. **kontrolních jamek**, bylo pipetováno stejné množství 50 µl roztoku rozpouštědla.
- Pro další část experimentu musel být vždy připraven čerstvý roztok železitých iontů o koncentraci 250 µM, ze kterého bylo dále pipetováno vždy 50 µl do všech jamek.
- Následně byla mikrotitrační destička promíchávána 2 minuty na třepačce, aby došlo k řádnému promíchání obsahu všech jamek.
- Poté bylo přidáno 50 µl HA do všech jamek a destička promíchávána další 1 minutu na třepačce.
- Po důkladném promíchání roztoků bylo do prvních dvou řad (**x**) pipetováno 50 µl roztoku ferozinu a do druhé poloviny jamek (**x**), tzn. 3-4. řady, bylo napipetováno 50 µl vody (viz **Obr.13**). Tato skupina jamek sloužila jako slepý vzorek.
- Absorbance byla měřena při 562 nm ihned a po 5 minutách.

	testovaný roztok - c = 10 mM	testovaný roztok - c = 1 mM	testovaný roztok - c = 0,1 mM	testovaný roztok - c = 0 mM voda	konečný obsah jamky:	
jamky s ferozinem					150 µl	Pufr
					50 µl	roztok testované látky
slepé vzorky					50 µl	Fe ³⁺ 0,25 mM ve všech jamkách
					50 µl	roztok hydroxylaminu 10 mM
					50 µl	roztok ferozinu 5 mM / voda

Obr.13 Obecné schéma uspořádání pipetovaných roztoků v mikrotitrační destičce pro stanovení chelatace železitých iontů ferozinem.

c = roztoky testovaných látek o koncentraci 10 mM, 1 mM, 0,1mM; c = 0: kontrolní jamky (destilovaná voda); jamky s indikátorem ferozin (**x**) a slepé vzorky s vodou (**x**)

3.7. Stanovení chelatace Fe^{2+} iontů

3.7.1. Příprava základních roztoků

Ferozin

Základní roztok byl připraven dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Fe^{3+} iontů (viz kapitola 3.5.1.).

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (heptahydrát síranu železnatého)

Základní roztok železnatých iontů byl připraven rozpuštěním navážky pentahydrátu síranu železnatého v destilované vodě tak, aby vznikl roztok o výsledné koncentraci 5 mM ($M_w = 278,02 \text{ g/mol}$) v objemu 15 ml. Tento roztok bylo potřeba uchovávat ve tmě. Z něj byl připraven naředěním destilovanou vodou roztok o koncentraci 250 μM , který je stabilní celý den.

Hydroxylamin hydrochlorid (HA)

Základní roztok byl připraven rozpuštěním navážky hydroxylaminu v takovém množství destilované vody, aby výsledná koncentrace byla 100 mM ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$). Tento roztok byl využíván pouze pro stanovení při pH 7,5 z důvodu zabránění oxidace železnatých iontů na železité při tomto pH (Mladěnka *et al.*, 2010).

Octanový a HEPES pufr

Oba pufrы byly připraveny dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Cu^{2+} iontů (viz kapitola 3.2.1.).

3.7.2. Příprava roztoků testovaných látek

Roztoky testovaných látek (cyanidin, cyanidin-3-glukosid) byly připraveny dle stejné metodiky jako pro stanovení redukce Fe^{3+} iontů (viz kapitola 3.5.2.).

3.7.3. Kontrolní test železnatých iontů

Před provedením vlastního experimentu muselo být ověřeno, že došlo ke správnému naředění pracovního roztoku železnatých iontů.

Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno do dvou jamek:

- 100 μl DMSO
- 50 μl pracovního roztoku železnatých iontů o koncentraci 250 μM

- 50 µl roztoku ferozinu o koncentraci 5 mM

Následně byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Výsledná absorbance musela být v rozmezí 1.0 ± 0.1 , v jiném případě musel být navážen a naředěn nový roztok.

3.7.4. Chelatace Fe^{2+} v pufrch (4,5, - 7,5)

Vlastní provedení experimentu (Obr.14)

- Na mikrotitrační destičku bylo pomocí multikanálové mikropipety pipetováno nejprve 150 µl pufru (pH 4,5, 5,5, 6,8, 7,5) do všech jamek.
- Dále bylo do **testovacích jamek** přidáno 50 µl roztoku testovaných látek a stejné množství roztoku destilované vody do posledního sloupce **kontrolních jamek**.
- Při provádění experimentu při pH 7,5 bylo do všech jamek navíc přidáno 50 µl roztoku HA.
- Následně bylo přidáno do všech jamek 50 µl roztoku železnatých (Fe^{2+}) iontů.
- Následně byla mikrotitrační destička promíchávána 2 minuty na třepačce, aby došlo k řádnému promíchání obsahu všech jamek.
- Po důkladném promíchání bylo nejprve přidáno 50 µl roztoku ferozinu do jamek prvních dvou řad (x) a 50 µl roztoku destilované vody do jamek posledních dvou řad (x), které sloužily jako slepý vzorek.
- Poté byla mikrotitrační destička umístěna do spektrofotometru, kde byla v čase 5 minut měřena absorbance při vlnové délce 562 nm.

	testovaný roztok - c = 10 mM	testovaný roztok - c = 1 mM	testovaný roztok - c = 0,1 mM	testovaný roztok - c = 0 mM rozpuštědlo	konečný obsah jamky:	
jamky s ferozinem					150 µl	pufr
					50 µl	roztok testované látky
slepé vzorky					50 µl	Fe^{2+} 0,25 mM ve všech jamkách
					50 µl	roztok ferozinu 5 mM / voda

Obr.14 Obecné schéma uspořádání pipetovaných roztoků v mikrotitrační destičce pro stanovení chelatace železnatých iontů ferozinem.

c = roztoky testovaných látek o koncentraci 10 mM, 1 mM, 0,1 mM; $c = 0$: kontrolní jamky (roztok rozpouštědla); jamky s indikátorem ferozin (x) a slepé vzorky s vodou (x)

3.8. Matematické a statistické zpracování výsledků

K provedení statistické analýzy byl použit program MS Excel a GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, USA). Výsledky byly zpracovány jako průměr \pm směrodatná odchylka vypočítaná podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$.

Množství nezchelatovaného nebo redukováného železa/mědi bylo počítáno z rozdílu absorbance testovaného vzorku a slepého vzorku a děleno podílem rozdílu absorbancí kontrolního vzorku a jeho odpovídajícího slepého vzorku (Mladěnka *et al.* 2016). Při srovnání účinnosti jednotlivých chelátorů byly porovnány 95 % konfidenční (predikční) intervaly chelatačních křivek a lineárních přímek redukce (Říha *et al.*, 2013; Mladěnka *et al.*, 2016).

Výpočty navážek a objemů potřebných pro experiment byly vypočítány podle vzorce $c = \frac{m}{Mw*V}$.

Výpočty objemů potřebných pro přípravu pracovních roztoků byly vypočítány dle vzorce $m1 * c1 + m2 * c2 = (m1 + m2) * c$.

Výpočty objemů a navážek pro přípravu pufrů byly vypočítány podle vzorce $pH = pKa + \log \frac{m(s\acute{u}l)/Mw(s\acute{u}l)}{m(kys)/Mw(kys)}$.

4. VÝSLEDKY

V provedených experimentech byla zjišťována a porovnávána redukční a chelatační aktivita vůči mědi a železu. Tyto experimenty byly prováděny na dvou potencionálních chelátorech ze skupiny anthokyanů, a to aglykonu cyanidinu a jeho glykosidu cyanidin-3-glukosidu.

V první screeningové metodě jsme testovali redukční aktivitu obou látek za pomoci indikátoru BCS (**Obr.15**). Tento indikátor nám pomohl spolehlivě prokázat množství zredukované mědi. V koncentračním poměru 1:1 se obě testované látky blížily ke 100 % redukční aktivity ve všech pH prostředích. Při nižších koncentracích vzorků, např. v poměru 1:100 (anthokyan : měď), byla zjištěna o něco větší redukční aktivita cyanidinu v porovnání s jeho glukosidem (cca 50 % a 30 % zredukované mědi).

V druhé metodě jsme zkoumali železo – redukční aktivitu. Použitým indikátorem byl ferozin, který nám pomohl určit množství, testovanou látkou zredukovaných Fe^{3+} iontů (viz **Obr.16**). V koncentračním poměru 1:1 oba anthokyany projevily největší redukční aktivitu v prostředí o pH 4,5. Ta sahala přibližně k 70 % zredukovaných Fe^{3+} iontů. V prostředí pH 5,5 byla u cyanidinu naměřena taktéž nezanedbatelná redukční aktivita, cca 40 %. Při vyšších pH již nebyla pozorována žádná významná redukce železitých iontů.

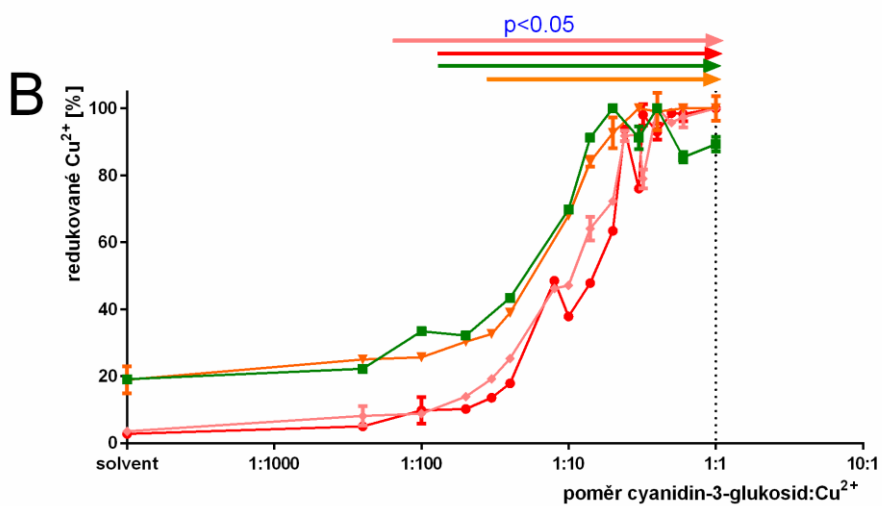
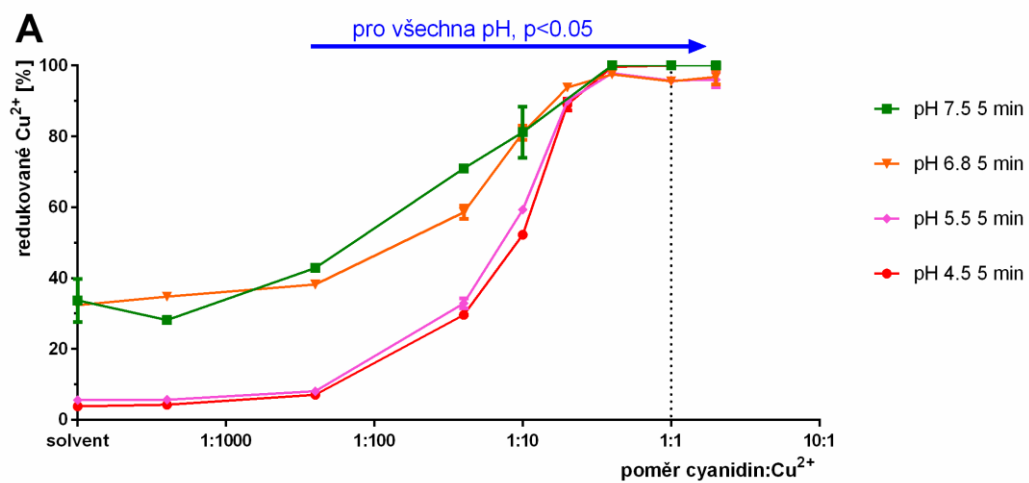
Schopnost chelatovat měď byla zkoumána za použití indikátoru hematoxylinu v pH prostředích 5,5–7,5 (viz **Obr.17**). Nejvyšší chelatace bylo dosaženo u cyanidin-3-glukosidu. Zde byla při pH 6,8–7,5 zjištěna chelatační aktivita odpovídající přibližné stechiometrii reakce 2:1 (cyanidin-3-glukosid : Cu^{2+}). Nepatrně nižší chelatace byla naměřena při pH 5,5–6,8 u cyanidinu. Pro ilustraci byl proveden i experiment chelatační účinnosti pomocí více kompetitivní chelatační metody s BCS. Jak je patrné z **Obr.18**, nebyla zde zaznamenána téměř žádná chelatační aktivita cyanidinu : Cu^+ / Cu^{2+} .

V poslední metodě byly provedeny experimenty zjišťující chelatační aktivitu zkoumaných látek vůči železu, ve formě Fe^{2+} a Fe^{3+} iontů (viz **Obr.19** a **20**). Zde byl použitým indikátorem zbylých nezchelatovaných kationtů ferozin. Nejúčinnějším chelátorem Fe^{2+} iontů byl cyanidin (viz **Obr.19 A**), u kterého byla zjištěna chelatace se stechiometrií reakce 3:2 (cyanidin : Fe^{2+}) při pH 7,5. Při pH 6,8 byla prokázána chelatace v poměru 2:1. Nejvyšší chelatace u cyanidin-3-glukosidu bylo dosaženo při pH 7,5, kde zkoumaný chelátor vykazoval aktivitu v přibližném chelatačním poměru 2:1

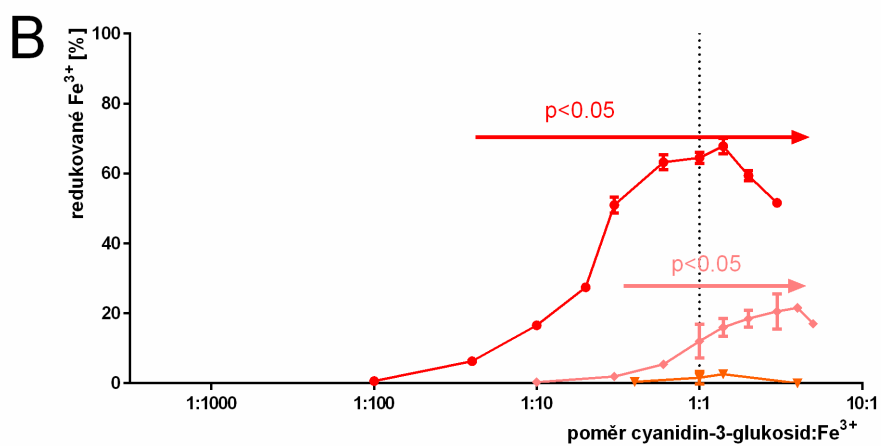
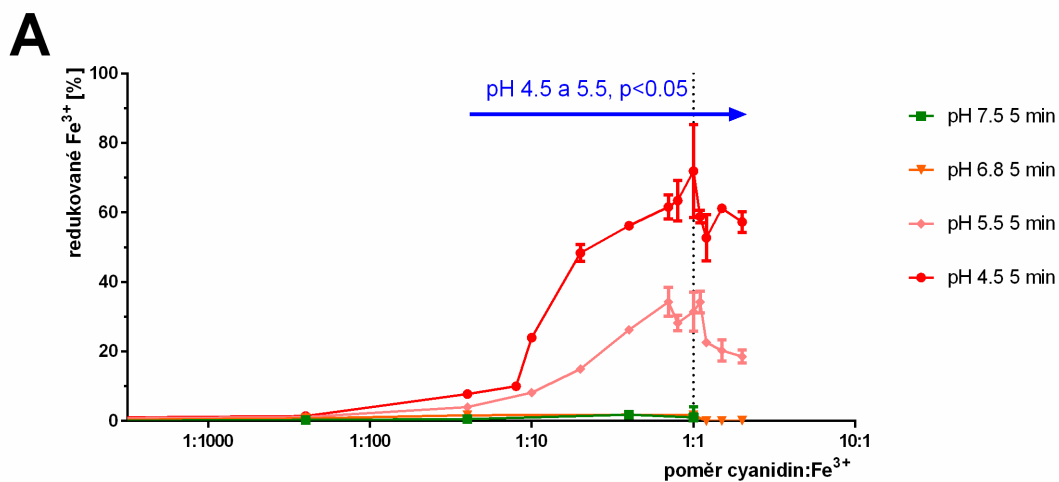
(viz **Obr.20 A**). Fe^{3+} ionty byly testovány pouze v pH 4,5 kvůli limitaci metodiky (viz **Obr.19 B**, **Obr.20 B**) (Mladěnka *et al.* 2010). U cyanidinu byla naměřena pouze nízká chelatační aktivita (cca 20 %). U cyanidinu-3-glukosidu byla chelatace ještě nižší.

Pro přesné porovnání chelatační aktivity byla zpracována statistická analýza. Za pomoci 95 % konfidenčních intervalů byla poté vyhodnocována a porovnávána závislost chelatace na pH prostředí. Přestože v chelatačních křivkách byly mezi oběma látkami určité rozdíly, ty se většinou neprokázaly být statisticky významné. U chelatace mědi nebyly nalezeny žádné rozdíly (viz **Obr.21**). U chelatace železnatých iontů byly tyto rozdíly významné jen u pH 5,5 (viz **Obr.22 C**). Ani u chelatace železitých iontů při pH 4,5 nebyly v účinnosti chelatace nalezeny u těchto látek rozdíly (viz **Obr.23**).

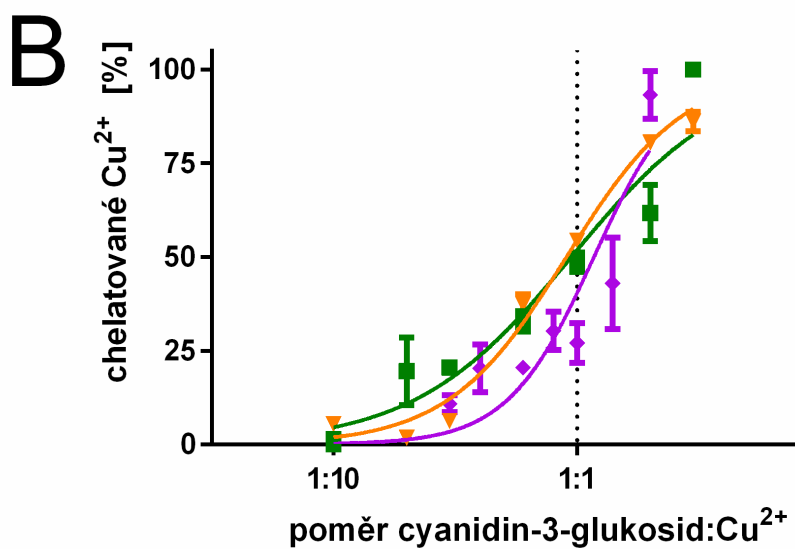
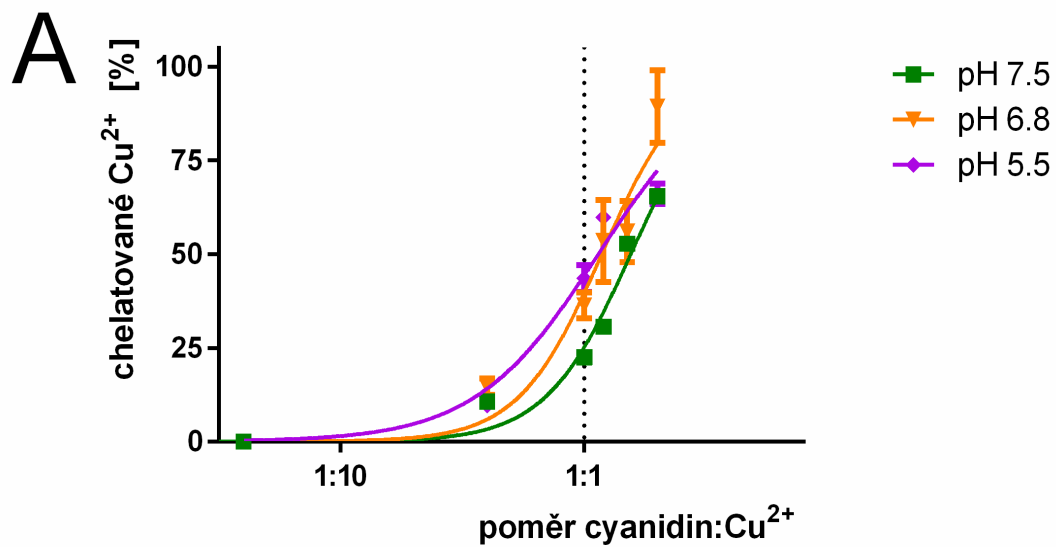
Pro porovnání redukčních vlastností u zkoumaných derivátů byl využit sklon přímky připravený regresní analýzou. Bylo využito faktu, že od určitého bodu redukce lineárně stoupá. Sklon přímky přímo udává množství železa redukované jednotkovým množstvím testované látky. Z **Obr.24** je patrné, že skutečné rozdíly v redukci mědi u obou testovaných látek jsou minimální. U Fe^{3+} již můžeme sledovat významnější rozdíl v redukční aktivitě testovaných látek (viz **Obr.25**).



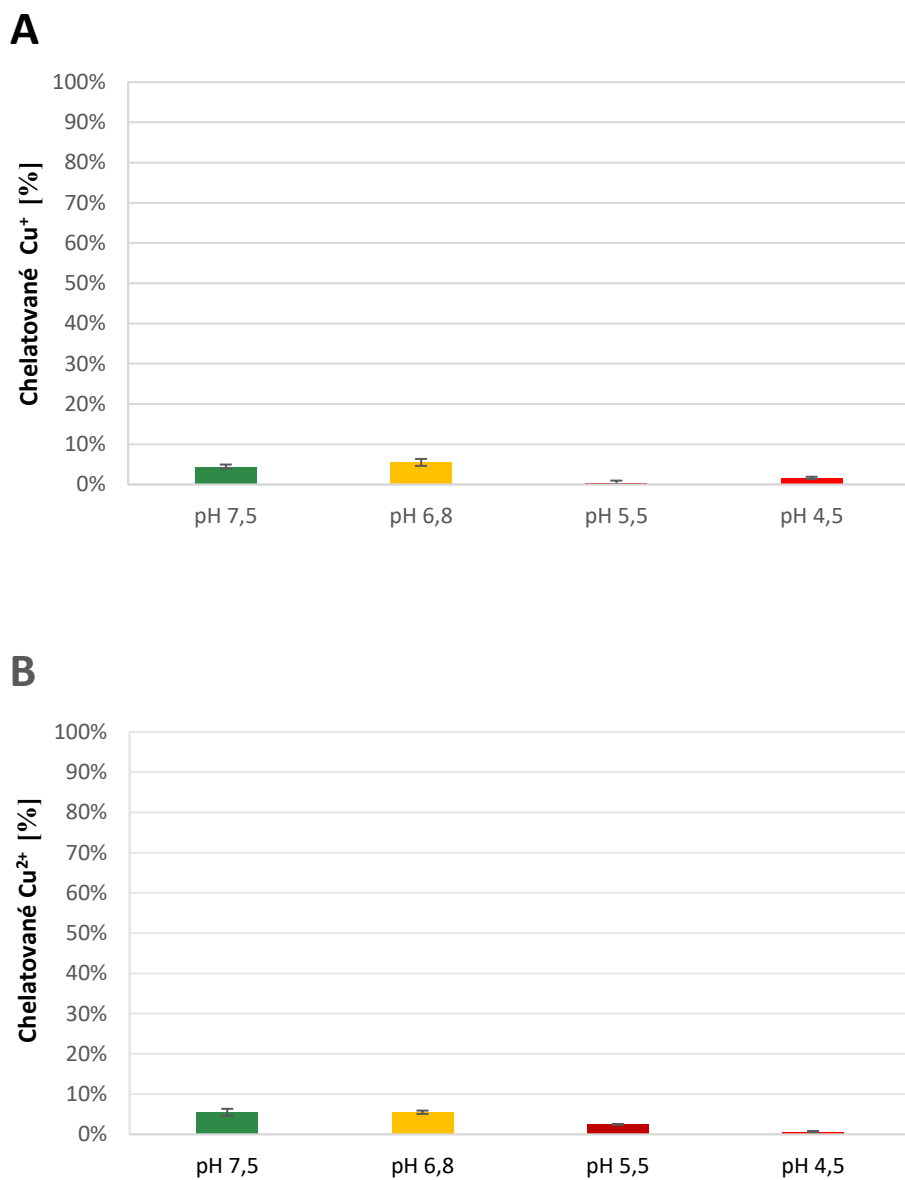
Obr.15 Grafy znázorňující měř redukční aktivitu cyanidinu (**A**) a cyanidin-3-glukosidu (**B**) v pH rozmezí 4,5 – 7,5. Statistická významnost vs. rozpouštědlo je zobrazena pro $p < 0.05$ formou šipek, jejichž barvy v případě cyanidin-3-glukosidu odpovídají pH.



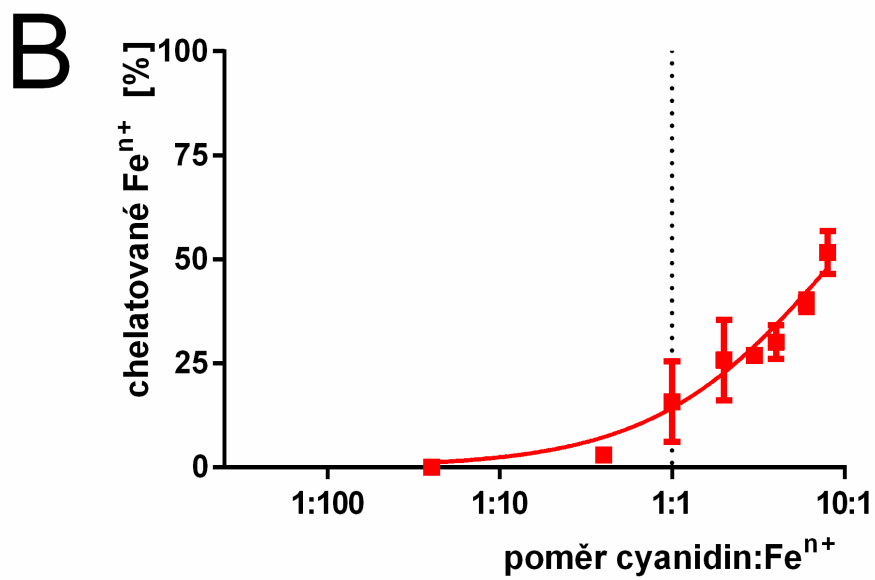
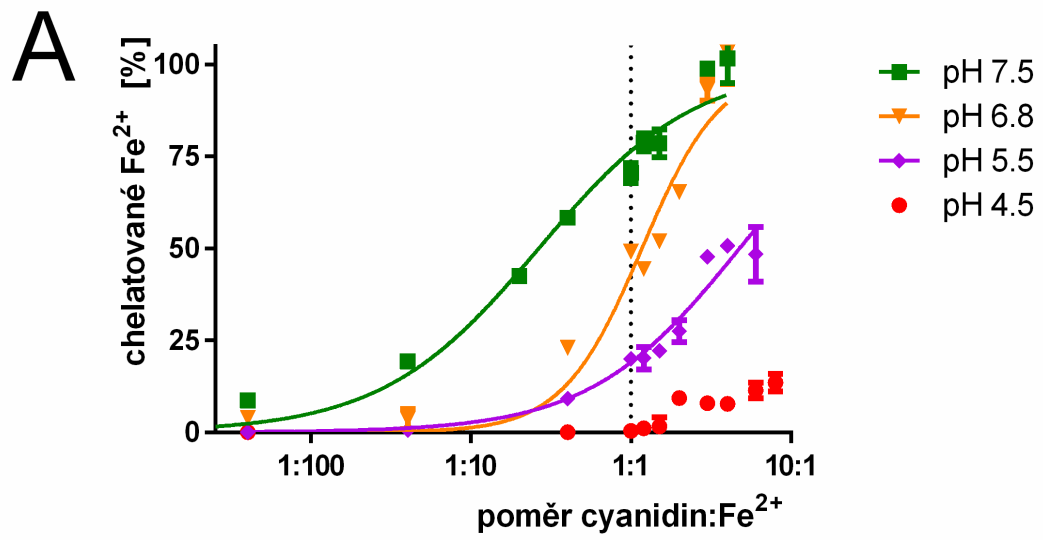
Obr.16 Grafy znázorňující železo redukční aktivitu cyanidinu (A) a cyanidin-3-glukosidu (B) v pH rozmezí 4,5 – 7,5. V případě pH 7,5 nebyla žádná redukce pozorována. Statistická významnost je analogická jako u **Obr.15**.



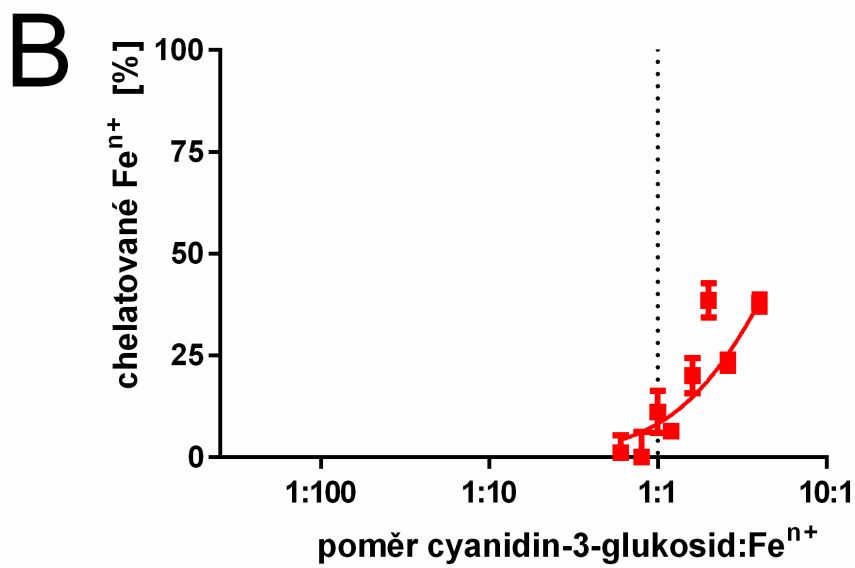
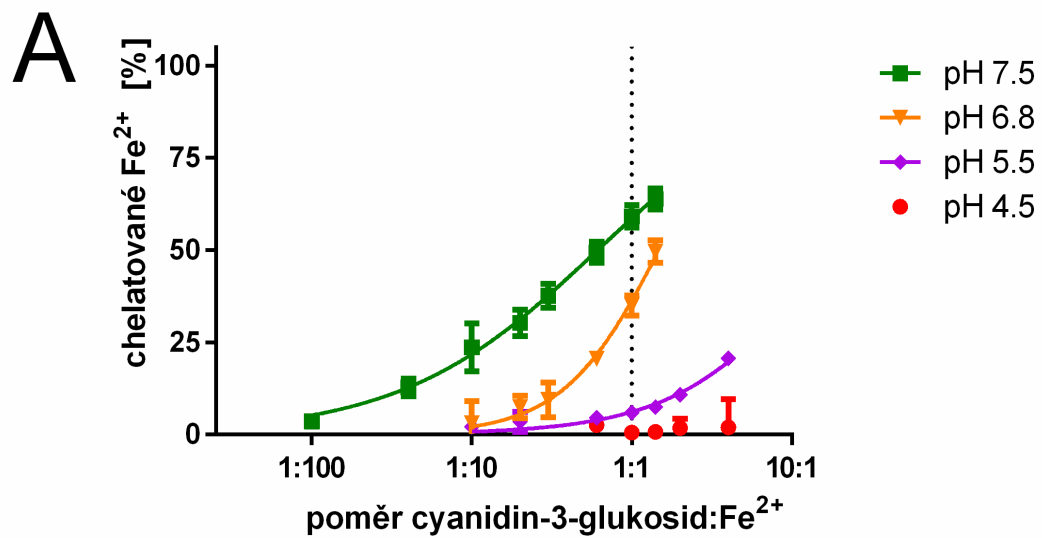
Obr.17 Grafy znázorňující měď chelatační aktivitu cyanidinu (**A**) a cyanidin-3-glukosidu (**B**) v pH rozmezí 5,5 – 7,5 za použití hematoxylinové metody.



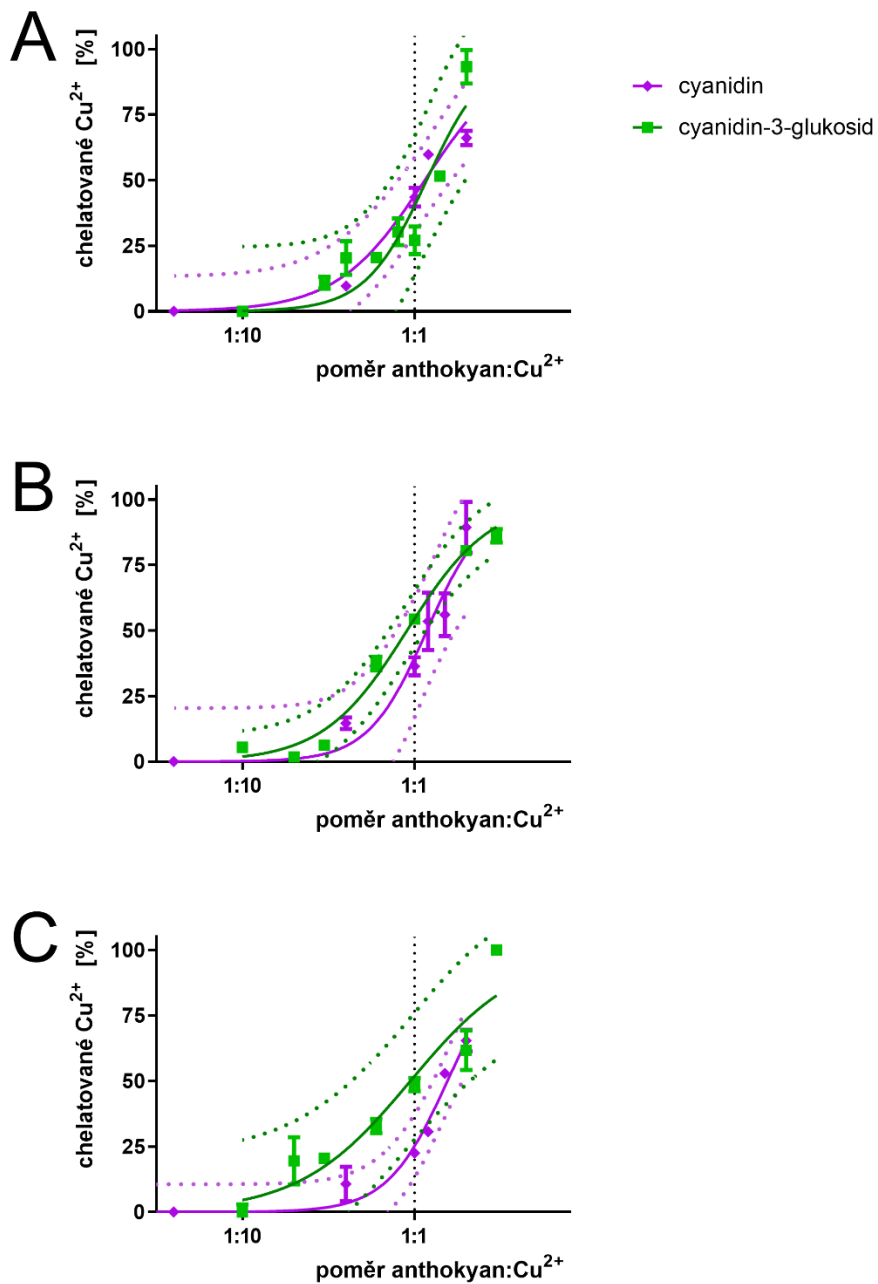
Obr.18 Grafy znázorňující velmi nízkou účinnost chelatace Cu⁺ (A) a účinnost chelatace Cu²⁺ (B) cyanidinem v poměru 1:1, anthokyan:měď, metodou BCS.



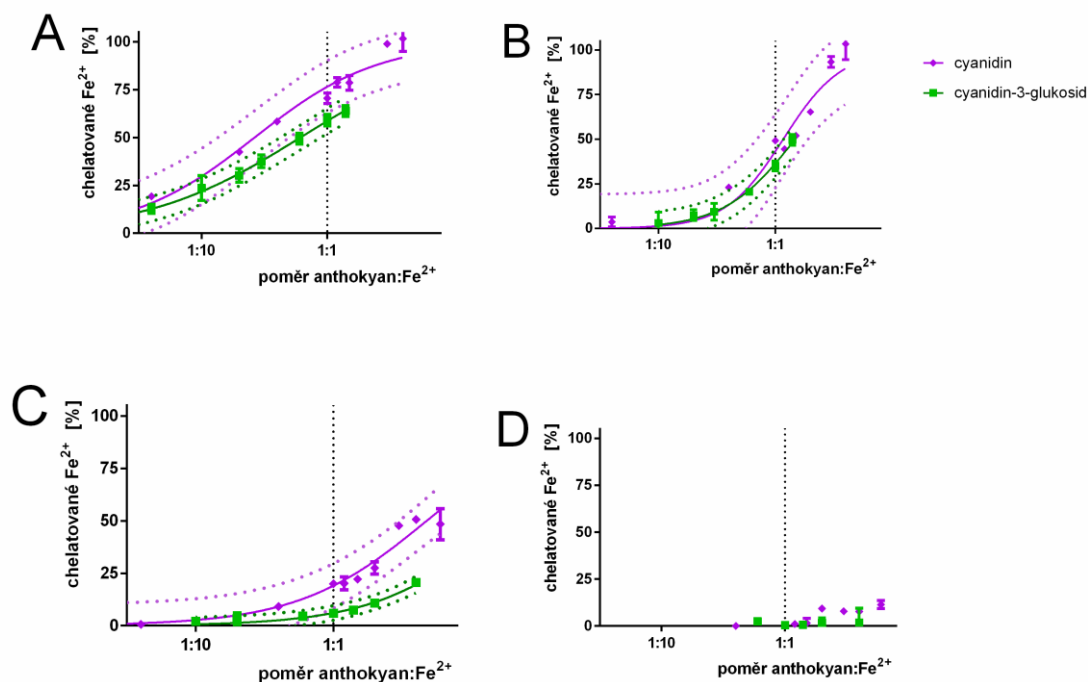
Obr.19 Grafy znázorňující železo-chelatační aktivitu cyanidinu: Fe^{2+} (A) a Fe^{3+} (B).



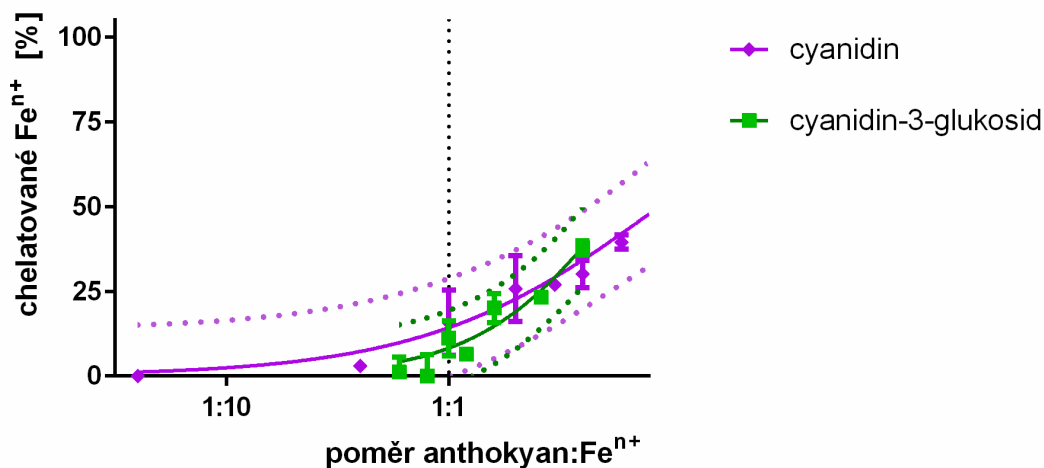
Obr.20 Grafy znázorňující chelatační aktivitu cyanidin-3-glukosidu: Fe²⁺ (A) a Fe³⁺ (B).



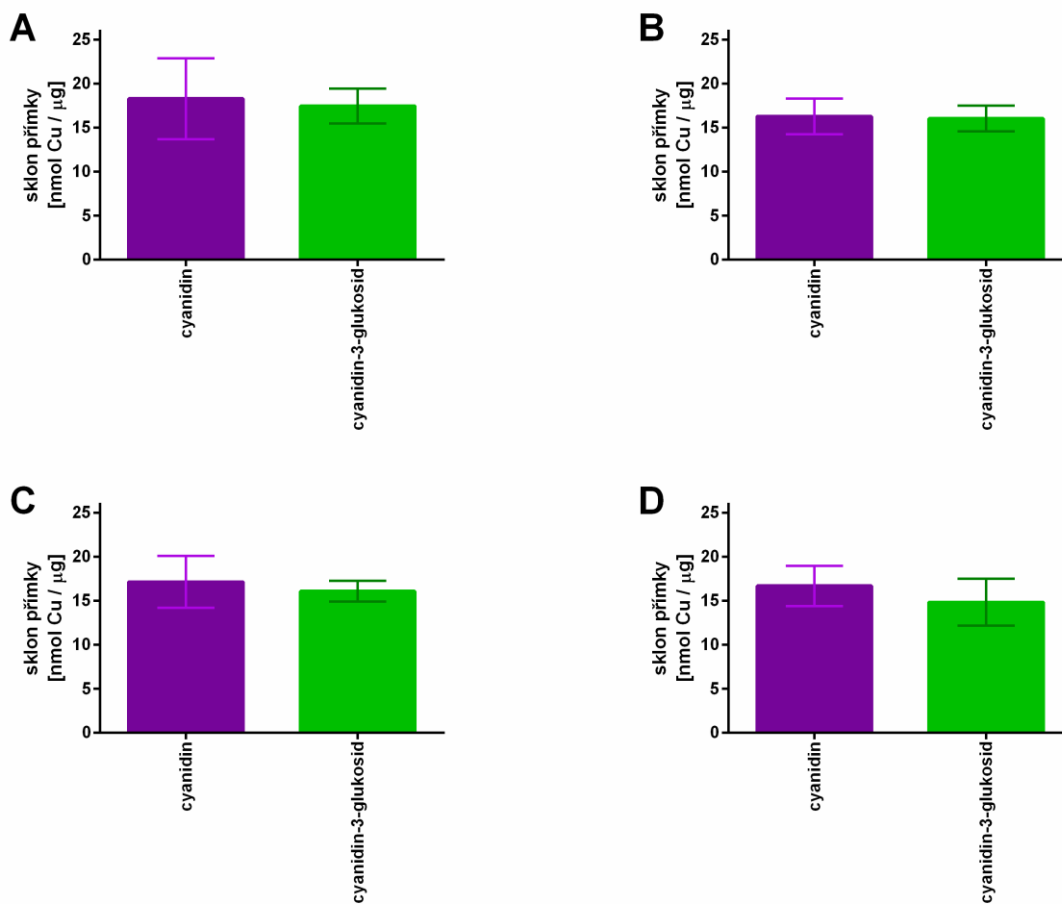
Obr.21 Grafy znázorňující 95 % konfidenční intervaly pro chelatační aktivitu Cu^{2+} u cyanidinu a cyanidin-3-glukosidu při pH 5.5 (A), 6.8 (B), 7.5 (C) u hematoxylinové metody. Mezi oběma anthokyany nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.



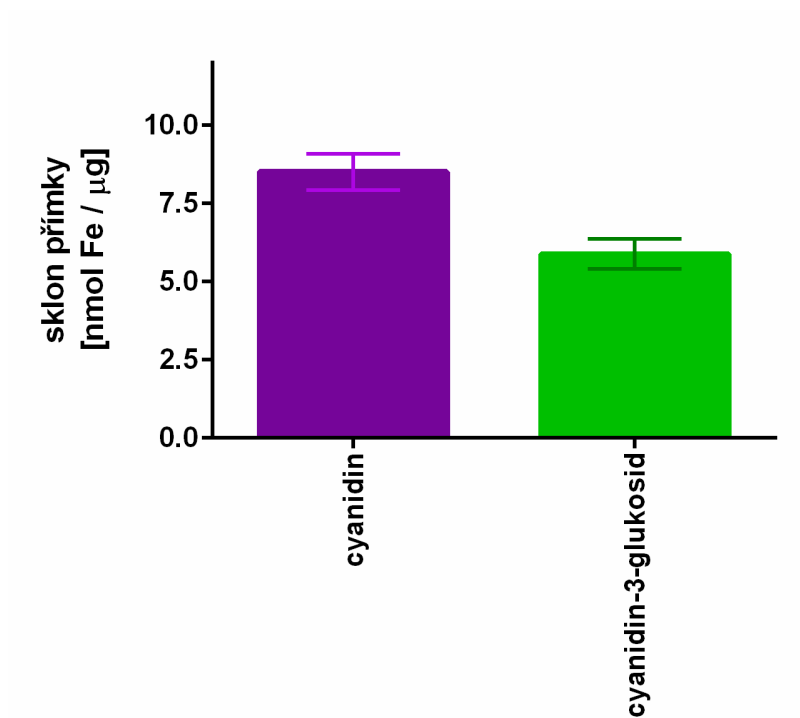
Obr.22 Grafy znázorňující 95 % konfidenční intervaly pro porovnání chelatační aktivity Fe^{2+} u cyanidinu a cyanidin-3-glukosidu při pH 7,5 (A); 6,8 (B); 5,5 (C) a 4,5 (D). Jen v případě pH 5.5 byl cyanidin významně účinnější.



Obr.23 Grafy znázorňující 95 % konfidenční intervaly pro porovnání Fe^{3+} chelatační aktivity u cyanidinu a cyanidin-3-glukosidu při pH 4,5. Rozdíly nebyly statisticky významné.



Obr.24 Grafy znázorňující sklon přímky u testovaných látek s 95 % konfidenčními intervaly při měření redukující aktivity vůči Cu^{2+} při pH 4,5 (A); 5,5 (B); 6,8 (C) a 7,5 (D). Statistické rozdíly nebyly mezi těmito látkami nalezeny při žádném pH.



Obr.25 Grafy znázorňující sklon přímky redukce Fe^{3+} iontů u testovaných látek při pH 4,5. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr a 95 % konfidenční interval. V tomto případě byl cyanidin evidentně více účinný než jeho 3-glukosid ($p < 0.05$).

5. DISKUSE

Anthokyany jsou polyfenolické sloučeniny patřící do skupiny flavonoidů. V přírodě se vyskytují jako barevné pigmenty, které mají ztraktivnit plody a květy pro opylovače. Strava bohatá na jejich obsah je považována za prevenci mnoha civilizačních onemocnění. Není tedy divu, že se tyto látky těší velkému vědeckému zájmu. Předmětem této práce byl screening a porovnání chelatačních a redukčních vlastností dvou vybraných látek ze skupiny anthokyanů. Těmito látkami byly cyanidin a jeho derivát cyanidin-3-glukosid.

V mikrotitračních metodách byly použity indikátory dle toho, zda jsme stanovovali měď nebo železo. Pro stanovení chelatace mědi byly zvoleny indikátory hematoxylin a BCS. Rozdíl mezi těmito indikátory je mimo jiné v tom, že hematoxylin váže měďnaté ionty, zatímco BCS ionty měďné (Shirai a Matsuoka 1996; Ding *et al.* 2011; Říha *et al.* 2013). K redukci mědi (Cu^{2+}) jsme proto pro potřeby stanovení používali HA. Toto redukční činidlo vede totiž k redukci měďnatých iontů na měďné a samo v měřené viditelné oblasti spektra neabsorbuje. Pro chelataci železitých (Fe^{3+}) a železnatých iontů (Fe^{2+}) byl použitým indikátorem ferozin. Tento indikátor byl uplatněn i pro stanovení redukce Fe^{2+} . Jde totiž o specifický indikátor, který s železnatými ionty vytváří barevné komplexy s absorpčním maximem při 562 nm (Stokey 1970; Mladěnka *et al.* 2010).

Principem měření chelatace je reakce zbylých iontů, které nebyly chelatovány po předchozím přidání roztoku testované látky (v našem případě cyanidinu nebo cyanidin-3-glukosidu), s indikátorem. V případě hematoxylinu lze tyto experimenty uskutečnit jen v pH rozmezí 5,5 – 7,5. Při pH 4,5 totiž prakticky nedochází ke tvorbě komplexu hematoxylin-měď (Říha *et al.* 2013). Další nevýhodou je omezená doba použitelnosti jak základního (5 hodin), tak pracovního roztoku (1,5 hodiny). Tyto roztoky se musí kvůli stabilitě uchovávat v průběhu měření ve tmě. Při znalosti těchto limitací však zmíněná omezení nijak neovlivní přesnost metodiky.

Principem měření redukce Cu^{2+} iontů bathokuproinovou metodou bylo přímé stanovení podílu Cu^+ iontů, které vznikaly redukcí měďnatých iontů po přidání roztoku testovaného vzorku (Říha *et al.* 2013). Stanovení lze provést ve všech pro nás patofyziologicky relevantních pH (4,5 – 7,5). Jak bylo uvedeno výše, využívá se faktu, že BCS reaguje jen s redukovánými Cu^+ ionty. BCS je velmi citlivé a spolehlivé činidlo, které nemá žádná omezení, jako je tomu u již zmíněného hematoxylinu. Obecnou

výhodou BCS je stabilita a použitelnost v širším rozmezí pH prostředí. Pro testování redukce a chelatace železa byl jediným použitým indikátorem již zmíněný ferozin. U experimentů pro stanovení chelatace Fe^{3+} byl za pomoci ferozinu dokazován nezchelatovaný zbytek těchto iontů. Fe^{3+} ionty musely být, ale předtím zredukovány pomocí redukčního činidla hydroxylaminu na Fe^{2+} . Zde se opět využívá afinita ferozinu k redukované formě, tj. Fe^{2+} iontům. Pro stanovení Fe^{3+} iontů je tedy nutné po proběhnutí předpokládané chelatace přidat ještě hydroxylamin. Analogicky je tomu u pH 7,5, kdy bez přídavku redukčního činidla dochází ke spontánní oxidaci železnatých iontů na železité (Mladěnka *et al.* 2010). U veškerých experimentů s ionty železa byla zapotřebí kontrola a ověření správnosti přípravy pracovních Fe^{2+} / Fe^{3+} roztoků (viz kap. 3.5.3. a 3.7.3.).

Základní struktura anthokyanů je tvořena tzv. flavyliovým kationtem, který je značně nestabilní a v závislosti na pH přechází na stabilnější formy. Vykazuje vysoký antioxidační účinek potencovaný schopností chelatovat dvojmocné ionty kovů jako např. Cu^{2+} , Fe^{2+} a Zn^{2+} . Nejdůležitější se z tohoto hlediska jeví substituce OH skupinami zejména v polohách 3' a 4' na aromatickém kruhu B. Oproti příbuzným flavonoidům se však očekává nižší chelatační aktivita díky absenci ketoskupiny v poloze 4 a také dvou OH skupin na kruhu A (McGhie a Walton 2007; Říha *et al.* 2014; Mladěnka *et al.* 2016; Reis *et al.* 2016; Sigurdson *et al.* 2016). Kvůli nepřítomnosti zmíněných skupin u cyanidinu a cyanidin-3-glukosidu se ukázala měď-chelatační účinnost měřená pomocí kompetitivní BCS metodiky jako velmi malá (viz **Obr.17**).

Po zpracování výsledků chelatačních experimentů s hematoxylinem se dalo konstatovat, že obě testované látky byly středně silnými chelátory Cu^{2+} iontů. Chelatační účinnost se u cyanidinu i cyanidin-3-glukosidu v pH 5,5 a 6,8 pohybovala kolem 50 % při poměru 1:1. Chelatační reakce tedy probíhala v přibližné stechiometrii 2:1 (chelátor : Cu^{2+}). Mírně zajímavějším rozdílem v těchto testech byly výsledky u pH 7,5. U cyanidinu byla prokázána chelatace se stechiometrií 3:1, oproti tomu u cyanidin-3-glukosidu byla v nejvyšším pH prokázána chelatace vyšší, se stechiometrií reakce 2:1 (viz **Obr.17**). Kvůli nízké afinitě indikátoru hematoxylinu k mědi při pH 4,5 nebyly vzorky v této metodě při takto nízkém pH testovány.

V druhé skupině experimentů byla testována chelatační účinnost vůči Fe^{2+} a Fe^{3+} iontů za použití výše zmíněného indikátoru ferozinu. Nejprve byla testována chelatace Fe^{2+} iontů. V pH 4,5 nebyla prokázána v koncentračním poměru 1:1 žádná znatelná chelatační účinnost (viz **Obr.19** a **Obr.20**). V ostatních pH (pH 5,5 – 7,5) byla v porovnání

obou testovaných látek chelatační účinnost sice o něco vyšší u aglykonu cyanidinu, ale bez statistické významnosti. Jedinou výjimkou je pH 5,5, kdy byl cyanidin ze statistického hlediska účinnější. Při pH 6,8 je možné takto odhadnout stechiometrii u obou látek 2:1. Nejvyšší chelatační účinnost obecně i v porovnání s mědí byla naměřena u cyanidinu při pH 7,5. Chelatační reakce probíhala v přibližném poměru 3:2, u cyanidin-3-glukosidu se účinnost blížila spíše stechiometrii reakce 2:1. Celkově by se tedy dalo zkonstatovat, že obě sloučeniny byly středně silnými až silnými chelátory, zejména v prostředích o vyšším pH (**Obr.19** a **Obr.20**). Dále byla testována ještě chelatační účinnost vůči Fe^{3+} iontům při pH 4,5. V tomto případě nebyla zjištěna téměř žádná chelatační účinnost. U cyanidinu byla naměřena aktivita cca 15 % (**Obr.19 B**), u jeho glukosidu byla zjištěna ještě nižší účinnost (**Obr.20 B**).

V dalších experimentech byla ověřována redukční aktivita testovaných vzorků vůči Cu^{2+} a Fe^{3+} iontům. V experimentech s Cu^{2+} ionty byla u cyanidinu zjištěna v koncentračním poměru 1:1 (cyanidin : Cu^{2+}) velmi silná redukční aktivita, sahající ve všech pH prostředích až ke 100 %. U cyanidin-3-glukosidu byla u všech pH v poměru 1:1 prokázána velmi podobná redukční aktivita. Pouze u pH 7,5 bylo možno sledovat zanedbatelně nižší výsledek při koncentračním poměru 1:1 (cca 90 %). Testování vyšších koncentrací zkoumaných anthokyanů již tedy nemělo velký význam, protože kompletní redukce již bylo dosaženo. Vždy platilo, že při vyšších pH (6,8 – 7,5) byla redukční aktivita o něco vyšší než u nižších pH. U cyanidinu sahala tato aktivita při vyšších pH až k 80 % a při nižších byla kolem 50-60 % (**Obr.15 A**). U cyanidin-3-glukosidu byla dále zjištěna aktivita kolem 70 % při vyšších pH, u nižších kolem 45 % (**Obr.15 B**).

Poslední provedené experimenty se týkaly zjišťování redukční aktivity vůči Fe^{3+} iontům. Zde bylo vyhodnocení o poznání jednodušší, protože zanedbatelná aktivita byla zjištěna u obou vzorků pouze při pH 4,5 – 5,5. V prostředí pH 4,5 byla zaznamenána v koncentračním poměru 1:1 (cyanidin/cyanidin-3-glukosid : Fe^{3+}) o poznání vyšší redukční aktivita, než při pH 5,5. U cyanidinu to bylo asi 75 %, u jeho glukosidu kolem 65 %. V koncentračním poměru 1:1 při pH 5,5 byla prokázána u cyanidinu redukce kolem 40 %, zatímco u cyanidin-3-glukosidu to bylo asi jen 15 % (**Obr.16**). V poměru 1:10 byla redukční aktivita vůči železu u obou testovaných látek velmi nízká a v poměru 1:100 a nižších již absolutně zanedbatelná. Tyto rozdíly v redukcí železitých iontů byly mezi oběma testovanými anthokyany statisticky významné (**Obr.25**).

Anthokyany jsou ve vodě dobře rozpustné, ale jejich biodostupnost je nízká. Nízká míra absorpce může mít vliv na jejich biologickou aktivitu. Absorpce je závislá na

jejich fyzikálně chemických vlastnostech, kdy se např. při různém pH vyskytují v odlišných strukturních formách. Ve střevech dochází působením enzymů ke vzniku metabolitů, které se mohou podílet na biologických vlastnostech a biodostupnosti anthokyanů (McGhie a Walton 2007; Smeriglio *et al.* 2016). Se vzrůstajícím pH se snižuje jejich biodostupnost a stabilita. Stabilitu molekule poskytuje navázaný cukr, zejména v poloze 3 jako je tomu u cyanidinu-3-glukosidu. Glykosylace zvyšuje polaritu a velikost molekuly a činí jí stabilnější vůči vlivům jako je teplo, světlo a pH (Yi *et al.* 2010; Olivas-Aguirre *et al.* 2016; Smeriglio *et al.* 2016).

Proto jsme v experimentu testovali a porovnávali chelatační a redukční vlastnosti cyanidinu a cyanidin-3-glukosidu. Z výše zmíněného vyplývá, že možná interakce cyanidinu a jeho glykosidu nastane spíše v trávicím traktu než v systémovém řečišti. Určitě bude zajímavé provést další experimenty, aby bylo možné zjistit, zda budou tyto látky zvyšovat, nebo naopak snižovat biodostupnost mědi a železa. Vzhledem k tomu, že tyto látky oba kovy jak redukují, tak chelatují, nelze výsledný vliv na jejich vstřebávání z trávicího traktu odhadnout.

6. ZÁVĚR

Tato práce porovnávala chelatační a redukční účinnost testovaných látek cyanidinu a cyanidin-3-glukosidu vůči mědi a železu. Závěrem lze konstatovat, že cyanidin i cyanidin-3-glukosid vykazovaly silnou měď-redukční aktivitu, která se v koncentračním poměru 1:1 blížila až 100 % ve všech pH prostředích a mezi oběma anthokyany nebyly nalezeny ze statistického hlediska rozdíly. Naproti tomu železo-redukční aktivita byla zjištěna pouze v kyselém prostředí (pH 4,5-5,5). Nejvyšší redukce byla okolo 70 % při pH 4,5. Cyanidin byl účinnějším redukčním činidlem než jeho glukosid, v případě železitých iontů.

Oba anthokyany jsou schopny chelatovat jak ionty železa, tak mědi. Největší chelatační aktivita byla zjištěna u Fe^{2+} iontů při pH 7,5, kde byla pozorována stechiometrie komplexu v poměru 3:2 u cyanidinu, a 2:1 u jeho glukosidu. Chelatační aktivita vůči Fe^{3+} byla naměřená pouze nízká, až zanedbatelná.

V testech měď-chelatační aktivity s hematoxylinem byly naměřeny u obou látek podobné výsledky. Téměř při všech pH (5,5-7,5) se chelatační účinnost blížila pravděpodobné stechiometrii komplexu 2:1 (cyanidin/cyanidin-3-glukosid : Cu^{2+}). Při použití více kompetitivní BCS metody byla ale zaznamenána jen minimální aktivita ukazující na fakt, že měď-chelatační aktivita těchto látek je nízká.

7. LITERÁRNÍ ZDROJE

- Acquaviva R, Russo A, Galvano F *et al.* Cyanidin and cyanidin 3-O- β -D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biol Toxicol* 2003;19:243–52.
- Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS *et al.* Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2012;1823:1468–83.
- Andrews NC. Inherited iron overload. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:596–602.
- Arredondo M, Uauy R, González M *et al.* Regulation of copper uptake and transport in intestinal cell monolayers by acute and chronic copper exposure. *Biochim Biophys Acta* 2000;1474:169–76.
- Bertini I, Rosato A. Menkes disease. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:89–91.
- Bhattacharjee A, Chakraborty K, Shukla A *et al.* Cellular copper homeostasis: current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases. *Metallomics* 2017;9:1376–88.
- Bhattacharjee A, Shukla Al KC and A, *et al.* Cellular copper homeostasis: Current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases. *Metallomics* 2017;9:1376–88.
- Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K *et al.* Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem Sci* 2016;41:274–86.
- Bou-Fakhredin R, Bazarbachi AH, Chaya B *et al.* Iron overload and chelation therapy in non-transfusion dependent thalassemia. *Int J Mol Sci* 2017;18.
- Boyd SD, Ullrich MS, Calvo JS *et al.* Mutations in Superoxide Dismutase 1 (Sod1) Linked to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Can Disrupt High-Affinity Zinc-Binding Promoted by the Copper Chaperone for Sod1 (Ccs). *Molecules* 2020;25:1086.
- Brissot P, Ropert M, Le Lan C *et al.* Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2012;1820:403–10.

- Brissot P, Troadec M, Loréal O *et al.* Pathophysiology and classification of iron overload diseases ; update 2018. *Transfus Clin Biol* 2019;26:80–8.
- Burkhead JL, Gogolin Reynolds KA, Abdel-Ghany SE *et al.* Copper homeostasis. *New Phytol* 2009;182:799–816.
- Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles MAA. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Res Int* 2011;44:499–509.
- Chaparro C, Suchdev SP. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. *Ann N Y Acad Sci* 2019;1450:15–31.
- Chen GF, Sudhakar V, Youn SW *et al.* Copper Transport Protein Antioxidant-1 Promotes Inflammatory Neovascularization via Chaperone and Transcription Factor Function. *Sci Rep* 2015;5:1–20.
- Chen J, Jiang Y, Shi H *et al.* The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2020, 472:1415-1429.
- Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med* 2010;31:446–67.
- Davenport J *et al.* Macrocytic anemia. *Am Fam Physician* 1996;53:155–62.
- Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int* 2017;21:S6–20.
- Devi SRB, Dhivya M A, Sulochana *et al.* Copper transporters and chaperones: Their function on angiogenesis and cellular signalling. *J Biosci* 2016;41:487–96.
- Ding X, Xie H, Kang YJ *et al.* The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *J Nutr Biochem* 2011;22:301–10.
- Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol* 2014;10:9–17.
- Doguer C, Ha JH, Collins JF. Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. *Compr Physiol* 2018;8:1433–61.
- Eisenstein RS, Blemings *et al.* Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J Nutr* 1998;128:2295–8.

- Fernandes I, Faria A, Calhau C *et al.* Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *J Funct Foods* 2014;7:54–66.
- Fernandes I, Nave F, Gonçalves R *et al.* On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: Flavanol-anthocyanin dimers. *Food Chem* 2012;135:812–8.
- Ferns G, *et al.* The possible role of copper ions in atherogenesis: The Blue Janus. *Atherosclerosis* 1997;133:139–52.
- Födinger M, Sunder-Plassmann G. Inherited disorders of iron metabolism. *Kidney Int Suppl* 1999;55:22–34.
- Formanowicz D, Radom M, Rybarczyk A *et al.* The role of Fenton reaction in ROS-induced toxicity underlying atherosclerosis – modeled and analyzed using a Petri net-based approach. *BioSystems* 2018;165:71–87.
- Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003;189:147–63.
- Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2019;1866:118535.
- Ganz T, Nemeth E. Heparin and Disorders of Iron Metabolism. *Annu Rev Med* 2011;62:347–60.
- Gonzalez-Lopez E, Vrana KE. Dopamine beta-hydroxylase and its genetic variants in human health and disease. *J Neurochem* 2020;152:157–81.
- Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2014;307:397–409.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1–14.
- Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutr Res* 2008;28:198–207.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13:572–84.
- Huang MLH, Lane DJR, Richardson DR. Mitochondrial mayhem: The mitochondrion as

- a modulator of iron metabolism and its role in disease. *Antioxidants Redox Signal* 2011;15:3003–19.
- Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:1-13.
- Johnston KA, Lopez KM. Lysyl oxidase in cancer inhibition and metastasis. *Cancer Lett* 2018;417:174–81.
- Kang YJ. Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* 2011;129:321–31.
- Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M *et al.* A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* 2014;123:615–24.
- Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic Biol Med* 2019;133:46–54.
- Kelly AL, Rhodes DA, Roland JM *et al.* Hereditary juvenile haemochromatosis: A genetically heterogeneous life-threatening iron-storage disease. *QJM - Mon J Assoc Physicians* 1998;91:607–18.
- Khoo HE, Azlan A, Tang ST *et al.* Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res* 2017;61:2-21.
- Kono S, Yoshida K, Tomosugi N *et al.* Biological effects of mutant ceruloplasmin on hepcidin-mediated internalization of ferroportin. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2010;1802:968–75.
- Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle - 70 years later. *Redox Rep* 2001;6:229–34.
- Lane DJR, Merlot AM, Huang MLH *et al.* Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2015;1853:1130–44.
- Lee Y-M, Yoon Y, Yoon H *et al.* Dietary Anthocyanins against Obesity and Inflammation. *Nutrients* 2017;9:1089.
- Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC *et al.* Iron deficiency anaemia. *Lancet* 2016;387:907–16.

- Macáková K, Mladěnka P, Filipský T *et al.* Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chem* 2012;135:2584–92.
- Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med* 2013;61:473–501.
- Madu AJ, Ughasoro MD. Anaemia of Chronic Disease: An In-Depth Review. *Med Princ Pract* 2017;26:1–9.
- McGhie TK, Walton MC. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:702–13.
- Medici V, Rossaro L, Sturniolo GC. Wilson disease-A practical approach to diagnosis, treatment and follow-up. *Dig Liver Dis* 2007;39:601–9.
- Mladěnka P, Hrdina R, Hübl M *et al.* The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta medica (Hradec Kralové* 2005);48:127–35.
- Mladěnka P, Macáková K, Zatloukalová L *et al.* In vitro interactions of coumarins with iron. *Biochimie* 2010;92:1108–14.
- Mladěnka P, Říha M, Martin J *et al.* Fruit extracts of 10 varieties of elderberry (*Sambucus nigra* L.) interact differently with iron and copper. *Phytochem Lett* 2016;18:232–8.
- Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2018;80:50–64.
- Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW *et al.* A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* 2017;168:344–61.
- Muller PAJ, Klomp LWJ. ATOX1: A novel copper-responsive transcription factor in mammals? *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1233–6.
- Munoz M, Garcia-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism . Part II : iron deficiency and iron overload. *J Clin Patol* 2011;64:287–96.
- Nakamura T, Naguro I, Ichijo H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2019;1863:1398–409.
- Neff LM. Current directions in hemochromatosis research: Towards an understanding of the role of iron overload and the HFE gene mutations in the development of clinical

- disease. *Nutr Rev* 2003;61:38–42.
- Noda Y, Kaneyuki T, Mori A *et al.* Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: Delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem* 2002;50:166–71.
- Nose Y, Wood LK, Kim BE, *et al.* Ctr1 is an apical copper transporter in mammalian intestinal epithelial cells in vivo that is controlled at the level of protein stability. *J Biol Chem*. 2010;285(42):32385-32392.
- Olivas-Aguirre F, Rodrigo-García J, Martínez-Ruiz N *et al.* Cyanidin-3-O-glucoside: Physical-Chemistry, Foodomics and Health Effects. *Molecules* 2016;21:1264.
- Oliveira F, Rocha S, Fernandes R. Iron metabolism: From health to disease. *J Clin Lab Anal* 2014;28:210–8.
- Pavelková M, Vysloužil J, Kubová K *et al.* Biological role of copper as an essential trace element in the human organism. *Ces a Slov Farm* 2018;67:143–53.
- Petrak J, Vyoral D. Hephaestin - A ferroxidase of cellular iron export. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1173–8.
- Petrat F, de Groot H, Sustmann R *et al.* The chelatable iron pool in living cells: A methodically defined quantity. *Biol Chem* 2002;383:489–502.
- Philpott CC, Jadhav S. The ins and outs of iron: Escorting iron through the mammalian cytosol. *Free Radic Biol Med* 2019;133:112–7.
- Pietrangelo antonello. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G403–14.
- Piperno A, Bertola F, Bentivegna A. Juvenile Hemochromatosis. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, eds. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; February 17, 2005.1-24.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M *et al.* Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2017;38:592–607.
- Prior RL, Wu X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res* 2006;40:1014–28.
- Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*

- 2015;33:8–13.
- Reis JF, Monteiro VVS, Souza Gomes R *et al.* Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: A systematic review of animal and human studies. *J Transl Med* 2016;14:315.
- Říha M, Karlíčková J, Filipický T *et al.* Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *J Inorg Biochem* 2013;123:80–7.
- Říha M, Karlíčková J, Filipický T *et al.* In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Adv* 2014;4:32628–38.
- Ritama G, Khaled MM *et al.* Ineffective Erythropoiesis, Anemia and Iron Overload. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018;32:213–21.
- de Romaña DL, Olivares M, Uauy R *et al.* Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *J Trace Elem Med Biol* 2011;25:3–13.
- Romuk E, Jacheć W, Zbrojkiewicz E *et al.* Ceruloplasmin, NT-proBNP, and Clinical Data as Risk Factors of Death or Heart Transplantation in a 1-Year Follow-Up of Heart Failure Patients. *J Clin Med* 2020;9:137.
- Sabath DE. Molecular diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies: An ACLPS critical review. *Am J Clin Pathol* 2017;148:6–15.
- Shirai K, Matsuoka M. Structure and properties of hematein derivatives. *Dye Pigment* 1996;32:159–69.
- Sigurdson GT, Robbins RJ, Collins TM *et al.* Evaluating the role of metal ions in the bathochromic and hyperchromic responses of cyanidin derivatives in acidic and alkaline pH. *Food Chem* 2016;208:26–34.
- Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E *et al.* Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phyther Res* 2016;1286:1265–86.
- Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: Properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 1998;16:387–98.
- Solano F. On the metal cofactor in the tyrosinase family. *Int J Mol Sci* 2018;19(2): 633.
- Spilková J. *Farmakognozie*. Vydání prv. Praha: Univerzita Karlova v Praze,

- nakladatelství Karolinum, 2016.
- Steinbicker AU, Muckenthaler MU. Out of balance-systemic iron homeostasis in iron-related disorders. *Nutrients* 2013;5:3034–61.
- Stern BR, Solioz M, Krewski D, et al. Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2007;10(3):157-222.
- Stookey LL. Ferrozine-A New Spectrophotometric Reagent for Iron. *Anal Chem* 1970;42:779–81.
- Strugała P, Loi S, Bazanów B *et al.* A Comprehensive study on the biological activity of elderberry extract and cyanidin 3-o-glucoside and their interactions with membranes and human serum albumin. *Molecules* 2018;23:2566.
- Taher AT, Saliba AN. Iron overload in thalassemia: Different organs at different rates. *Hematology* 2017;2017:265–71.
- Tantiworawit A, Charoenkwan P, Hantrakool S *et al.* Iron overload in non-transfusion-dependent thalassemia: association with genotype and clinical risk factors. *Int J Hematol* 2016;103:643–8.
- Tennant J, Stansfield M, Yamaji S *et al.* Effects of copper on the expression of metal transporters in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett* 2002;527:239–44.
- Thomas P, Mathew M, Roshni PR. Menkes disease - A rare case report. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 2017;7:1447–8.
- Tümer Z, Møller LB. Menkes disease. *Eur J Hum Genet* 2010;18:511–8.
- Vallet SD, Ricard-Blum S. Lysyl oxidases: From enzyme activity to extracellular matrix cross-links. *Essays Biochem* 2019;63:349–64.
- Vinchi F, Muckenthaler MU, Da Silva MC *et al.* Atherogenesis and iron: From epidemiology to cellular level. *Front Pharmacol* 2014;5:1–20.
- Wallace TC, Giusti MM. Anthocyanins. *Adv Nutr* 2015;6:620–2.
- Wang X, Garrick MD, Collins JF. Animal Models of Normal and Disturbed Iron and Copper Metabolism. *J Nutr* 2019;149:2085–100.

- Wardman P, Candeias LP, May N *et al.* Fenton Chemistry: An Introduction. 2019;145:523–31.
- World Health Organization. *Nutritional Anaemias : Tools for Effective Prevention and control*, 2017. ISBN: 9789241513067.
- Ye ZW, Zhang J, Townsend DM *et al.* Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2015;1850:1607–21.
- Yi L, Chen C ye, Jin X *et al.* Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. *FEBS Lett* 2010;584:583–90.
- Zhang H, Zhabyeyev P, Wang S *et al.* Role of iron metabolism in heart failure: From iron deficiency to iron overload. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2019;1865:1925–37.
- Zhao CL, Yu YQ, Chen ZJ *et al.* Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chem* 2017;214:119–28.