

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**SCHOPNOSTĚ CHELÁTOROV MEDI INTERAGOVATĚ SO ŽELEZOM A
ZINKOM**

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce:

doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, PhD.

Hradec Králové 2018

Lucia Hanuščinová

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri vypracovávaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo podobného titulu.

V Hradci Králové, dňa

.....

Lucia Hanuščinová

Pod'akovanie

Touto cestou by som chcela srdečne pod'akovať môjmu školiteľovi doc. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, PhD., za ochotu, odborné vedenie a podnetné rady. Rada by som taktiež pod'akovala Mgr. Václavovi Tvrďému za neustálu pomoc a všetkým ostatným, ktorí akokoľvek prispeli k vypracovaniu tejto diplomovej práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Študentka: Lucia Hanuščinová

Školiteľ: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, PhD.

Názov diplomovej práce: Schopnosť chelátorov medi interagovať so železom a zinkom

Med' zastáva v ľudskom organizme úlohu prvku s nepostradateľným významom, ktorého vplyv a účinky závisia od jeho množstva. Pri zvýšených hodnotách koncentrácie v ľudskom tele sa med' stáva toxickou, čím dochádza aj k vzniku patologických stavov. Medzi najznámejšie ochorenia patrí Wilsonova choroba, ktorej liečba spočíva v p.o. podávaní chelátorov, teda chemických zlúčenín, ktoré sú schopné v rôznom pomere viazať meďnaté ióny a vylúčiť ich tým z organizmu. Chelatačná terapia je v súčasnosti prvou voľbou pri potvrdení diagnózy. Toxicita chelátorov vyplýva z viacerých faktorov, napr. inhibície enzýmov závislých na medi alebo nízkej selektivitě ku kovom. Práve selektivitou chelátorov sa zaoberá táto diplomová práca. Ideálny chelátor by neinteragoval so žiadnym z ostatných iónov iných prvkov, potrebných pre správnu funkciu organizmu. Pre praktickú časť záverečnej práce bolo vybraných päť najčastejšie terapeuticky alebo experimentálne využívaných látok: trientin, D-penicillamin, bathocuproin (respektíve jeho blízky derivát disulfonát sodný - BCS), tetrathiomolybdát amónny (ATM) a dimerkaprol, pričom sledovaným javom bola schopnosť interakcie s dvoma inými, v tele prirodzene sa vyskytujúcimi sa iónmi: železom a zinkom. Interakcie zahrňovali nielen možnosť chelatacie železnatých, železitých a zinočnatých iónov, ale rovnako aj ich redukčnú aktivitu voči železitým katiónom. K určení miery chelatacie bola využívaná spektrofotometrická metóda. Všetky testy prebiehali v prostredí štyroch rôznych pH, definovaných ako fyziologické či patologické. Chelatačnú schopnosť prejavili všetky skúmané zlúčeniny. ATM a dimerkaprol chelatovali najvýraznejšie železo aj zinok. Namerané dáta taktiež poukázali na skutočnosť, že BCS a trientin nedisponujú redukčnou schopnosťou. Z tejto štúdie interakcií chelátorov medi so železom a zinkom vyplynulo, že ani jedna z testovaných látok nie je dostatočne selektívna.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Lucia Hanuščinová

Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, PharmDr., PhD.

Title of diploma thesis: Ability of copper chelators to interact with iron and zinc

Copper plays in the human organism a role of an element with indispensable significance, whose biological influence and effects depend on its quantity. With elevated concentrations in the human body, copper becomes toxic, resulting in pathological conditions. The most well-known disease is the Wilson's disease, whose treatment consists of oral administration of chelators, i.e. chemical compounds, which are capable of binding copper ions in various proportions and eliminating them from the organism. Chelation therapy is currently the first choice after confirmation of the diagnosis. Chelation toxicity results from several factors, e.g. inhibition of copper dependent enzymes or low selectivity to metals. And precisely the selectivity of chelators is being discussed in this diploma thesis. An ideal chelator should not interact with any of the other physiological ions, that are necessary for the proper functioning of the organism. Five of the most frequently therapeutically or experimentally used substances /trientine, D-penicillamine, bathocuproine (or more precisely, its sodium disulfonate salt, BCS), ammonium tetrathiomolybdate (ATM) and dimerkaprol/ were chosen for the study. The ability to interact with two other, in the body naturally occurring ions iron and zinc, was monitored. Interactions include not only the chelation of ferrous, ferric and zinc ions, but also their reductive activity toward ferric cations. The spectrophotometric method was used. All tests were conducted in four different pH settings, defined as physiological or pathological. All investigated compounds exhibited chelating ability, which means insufficient selectivity. ATM and dimerkaprol chelated iron and zinc most efficiently. The measured data also pointed to the fact that BCS and trientine do not have reductive capacity. From this study of interactions of copper chelators with iron and zinc, it ensued that none of the tested substances was sufficiently selective.

Obsah

1. Použité skratky	1
2. Úvod.....	2
3. Teoretická časť	3
3.1. Fyziológia medi.....	3
3.2. Fyziológia zinku.....	5
3.3. Fyziológia železa	6
3.4. Chelátory medi	7
3.4.1. Tetrathiomolybdát amónny.....	9
3.4.2. Dimerkaprol.....	10
3.4.3. Bathocuproin	11
3.4.4. Trientin.....	11
3.4.5. D-penicillamin.....	12
3.5. Patológia medi.....	14
3.6. Patológia zinku	15
3.7. Patológia železa.....	16
4. Cieľ práce.....	18
5. Praktická časť.....	19
5.1. Materiál a prístroje	19
5.1.1. Použité chemikálie.....	19
5.1.2. Prístroje.....	19
5.2. Metodika vzťahujúca sa k meraniu chelatacie železnatých a železitých iónov ...	20
5.2.1. Príprava zásobných roztokov železa.....	20
5.2.2. Príprava testovaných roztokov	20
5.2.3. Štandardný operačný postup – kontrola železa.....	20
5.2.4. Meranie kalibračnej krivky železnatých iónov.....	20
5.2.5. Meranie chelatacie železnatých iónov.....	21
5.2.6. Meranie chelatacie železitých iónov.....	22
5.2.7. Meranie redukcie železitých iónov.....	23
5.3. Metodika vzťahujúca sa k meraniu chelatacie zinočnatých iónov	24
5.3.1. Príprava zásobných roztokov zinočnatých iónov	24
5.3.2. Príprava testovaných roztokov	24
5.3.3. Meranie chelatacie zinočnatých iónov	24
5.4. Matematické výpočty	25
5.4.1. Výpočet chelatacie železa.....	25

5.4.2.	Výpočet redukcie železa.....	26
5.4.3.	Výpočet chelatácie zinku	27
5.5.	Štatistická analýza.....	27
6.	Výsledky.....	28
7.	Diskusia	37
8.	Záver	41
9.	Literatúra.....	42

1. Použité skratky

ATM	tetrathiomolybdát amónny
ATP7A	aktívny transportér medi 7A
ATP7B	aktívny transportér medi 7B
BAL	britský anti Lewisit, z anglického „British anti Lewisit“
BCS	bathocuproindisulfonát sodný
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT1	dvojmocný transportér kovov 1, z anglického „divalent metal transporter 1“
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
HA	hydroxylamin chlorid
MT	metalothionein
p.o.	perorálny

2. Úvod

Meď, železo aj zinok sú kovovými prvkami, ktoré sú často označované ako stopové, a to z dôvodu, že ich koncentrácia v tkanivách je nižšia ako 50 ppm ($< 50 \times 10^{-6}$ g/g). Ako esenciálne prvky ľudského organizmu zohrávajú dôležitú úlohu v imunitnom systéme, pričom ich hlavná biologická úloha sa pripisuje účasti ako katalyzátorov v enzýmoch i modulácii enzýmových aktivít.

Meď má v ľudskom tele mnoho funkcií, okrem tých metabolických sú to napríklad tvorba červených krviniek (spolu so železom) a hemoglobínu, či podpora vstrebávania železa. Jej nezastupiteľný význam môžeme pozorovať pri syntéze myelínu, spojivového tkaniva či produkcii pigmentu (melanínu) (Arredondo a Nunez, 2005). Vyskytuje sa v rozličných potravinách ako obilniny, ovocie a orechy. Preto je jeho alimentárny nedostatok veľmi vzácny. Rovnako aj jeho nadbytok spôsobuje ojedinelé ochorenie, známe ako Wilsonova choroba. Terapia tohto ochorenia má základ v zamedzení príjmu medi, či už v potravinách alebo v predmetoch, ktoré sa pri konzumácii používajú. Nadbytok medi pôsobí na ľudský organizmus toxicky. Medikamentózna terapia je efektívna len pokiaľ sa začne v skorých štádiách, ideálne v presymptomatických (Huster, 2018). Tam sa uplatňujú chelátory medi - látky schopné naviazať kation medi, vytvoriť komplex a vylúčiť ho z organizmu. Chelatačná stratégia liečby má však množstvo nežiaducich účinkov a teoreticky môže viesť k deplécii iónov prvkov, ku ktorým je daný chelátor viac selektívnejší. Práve v tejto hypotéze spočívala myšlienka tejto diplomovej práce, pričom boli skúmané interakcie voči zinku a železu.

Hypoteticky by sa terapiou zapríčinený nedostatok zinku prejavil zo začiatku nešpecificky, ako nechut' do jedla, ale neskôr až patologickými zmenami na koži alebo zvýšením rizika degeneratívnych ochorení nervového systému (Hambidge, 2000).

Nedostatočná koncentrácia železa v organizme sa prejavuje sústavnou únavou, ťažkosťami so sústredením a najznámejším deficitom železa je anémia (Andrews, 1999).

3. Teoretická časť

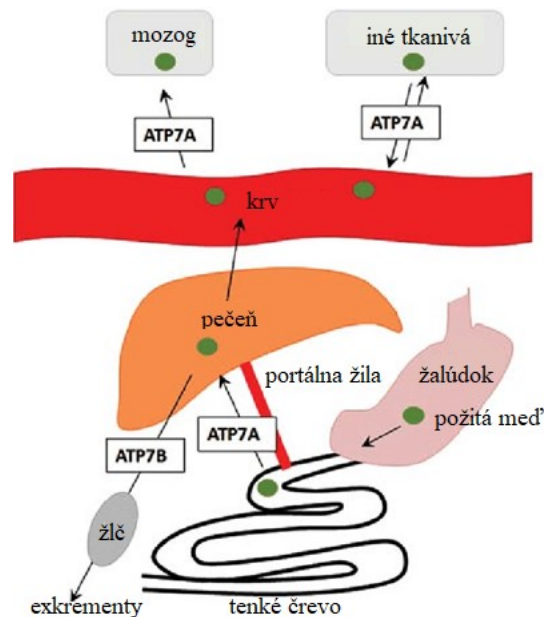
3.1. Fyziológia medi

Meď (Cu) je dôležitým esenciálnym anorganickým mikronutrientom (stopovým prvkom) pre správnu fyziológiu organizmu. Ľudské telo obsahuje približne 100 – 150 mg medi, rozdistribuovaných do rôznych orgánových systémov. Najviac Cu sa nachádza vo svaloch, cca 35 mg, mozog obsahuje 20 mg, pečeň 20 mg, obličky 5 mg a 10 mg medi je obsiahnutých v krvi (Dítě, 2007). Doporučená denná dávka sa udáva okolo 1 mg (Filippini et al., 2018).

Homeostáza je zabezpečená gastrointestinálnou absorpciou a biliárnou exkréciou. Meď sa vstrebáva zo žalúdka a duodena zo 40-60 %. Účinnosť absorpcie medi sa výrazne líši v závislosti od príjmu potravy. Dôležitú rolu pri absorpcii zohráva miera intestinálnej expresie metalothioneínu, proteínu, ktorý viaže meď. Kompetícia o tento proteín medzi meďou a zinkom, hlavne pri zvýšenom príjme zinku, spôsobenom napríklad dlhodobým užívaním potravinových doplnkov obsahujúcich zinok, vedie k zníženiu vstrebávania medi.

Transport medi v našom tele je prísne regulovaný komplexom proteínov, ktorých poškodenie má za následok zdraviu škodlivé hladiny medi (Gupta a Lutsenko, 2009). Hlavný orgán regulácie homeostázy medi je pečeň, kde je Cu inkorporovaná do plazmatického transportného proteínu ceruloplazmínu a časť do metalothioneínu (predovšetkým pri vysokých hladinách medi). Meď viazaná na ceruloplazmín je uvoľňovaná do krvi a prenášaná k bunkám, kde sa transportuje do vnútra buniek pomocou špecifických proteínov. ATP7A a ATP7B zohrávajú kľúčovú úlohu pri prijímaní, transporte a vylučovaní Cu v našom tele (Obr. 1). Hoci ATP7B je exprimovaný v niekoľkých tkanivách, zastáva najdôležitejšiu úlohu v hepatocytoch, kde prepravuje meď do Golgiho aparátu a zachytáva nadbytok medi do vezikúl, ktorých obsah je následne vylúčený cez biliárny systém (Weiss a Stremmel, 2012). Nadbytok medi je teda exkretovaný do žlče, a tak touto hepatobiliárnou cestou nevratne vylúčený z organizmu. V prípade zvýšeného príjmu diétnej medi sa zvyšuje aj jej absorpcia, a práve endogénna exkrécia ochráni telo pred nadmerným nahromadením tohto kovu. Obrátená situácia nastáva, logicky, pri nízkom príjme medi, kedy sa jej takto vylučuje len málo. Ide o mechanizmus chrániaci organizmus pred vyčerpaním medi. Avšak pri veľmi malom

množstve medi v strave je táto regulácia nedostatočná (0,38 mg/d) a nie je schopná zabrániť nedostatku. V prípade, že je prívod medi vysoký, je regulácia veľmi pomalým procesom (Turnlund et al., 1989).



Obr. 1 Transport medi v organizme. Vlastné spracovanie podľa: Tegoni et al., 2014

Meď sa uplatňuje ako súčasť mnohých typov enzýmov a väčšina fyziologických funkcií medi vyplýva z reakcií, ktoré katalyzujú dané enzýmy: prinášajúce elektróny (cytochromy), enzýmy s priamou alebo nepriamou antioxidačnou aktivitou (superoxiddismutáza, ceruloplazmín) alebo sa meď podieľa vysokou mierou na ich aktivite (tyrozináza, melanínsyntetáza, elastínsyntetáza). Oxidázová aktivita ceruloplazmínu v plazme je esenciálna pre oxidáciu Fe^{2+} na Fe^{3+} . To umožní vstavenie Fe^{3+} do transferínu a následné použitie, napr. pre syntézu hemoglobínu. Ako súčasť krvného zrážacieho faktoru V je meď taktiež dôležitá pre zrážanie krvi. Prítomnosťou v enzýme tyrozináze je Cu navyše zapojená do syntézy melanínu, podieľa sa na pigmentácii kože, vlasov a očí (Kazda, 2012).

Na úrovni CNS ovplyvňuje tvorbu myelinu v nervovom tkanive a tvorbu katecholamínov, preto je zapojená priamo alebo nepriamo v patogenéze početných neurologických ochorení, ako napríklad Alzheimerovej choroby, amyotrofnej laterálnej sklerózy, Huntingtonovej či Parkinsonovej choroby (Desai a Kaler, 2008).

3.2. Fyziológia zinku

Zinok je základným stopovým minerálom, dôležitým pre všetky formy života. Jeho význam bol ale vo výžive rozpoznáný len pomerne nedávno. Vo všetkých tkanivách ľudského tela sa nachádza 2 - 3 g, pričom takmer 90 % je uložených vo svaloch a kostiach. Zinok sa preukázateľne vyskytuje aj v pečeni, koži, gastrointestinálnom trakte, prostate, mozgu, obličkách, srdci a pľúcach. V tele však nie je žiadne úložisko zinku v pravom slova zmysle, ukladá sa v kostiach, koži a kožných derivátoch, z ktorých môže byť, v prípade potreby, znova resorbovaný a opätovne využitý (Wastney et al., 1986).

Doporučené denné dávky pre kojencov sú 5 mg/d, deti 10 mg/d, dorast, dospelí a tehotné ženy 15 mg/d (Dítě, 2007).

Potravou prijímaný zinok je resorbovaný z 20 – 40 %, pričom resorpcia môže byť redukovaná zvýšeným prísunom železa, medi, fyátov, vlákniny a fosfátu, ktorý spolu aj s aminokyselinami, organickými kyselinami, a teda vo všeobecnosti aj s rôznymi endogénnymi i exogénnymi ligandami môže so Zn uvoľňovaným v priebehu trávenia tvoriť koordinčné komplexy. Perorálne aplikovaný zinok sa absorbuje v tenkom čreve, predovšetkým v jejune, a distribuuje sa v sére, kde sa prednostne viaže na niekoľko proteínov, ako je albumín, α -mikroglobulín a transferín (Scott a Bradwell, 1983). Zinok viažúci sa na transportné plazmatické proteíny funguje ako najpodstatnejšia prístupná zásoba Zn v tele. Hlavnou cestou exkrécie zinku je gastrointestinálny trakt, najmä pankreatické šťavy, žlč, gastroduodenálne sekréty a odlupovanie buniek sliznice. Menšia časť Zn (2 – 10 %) je exkretovaná močom, stratou vlasov, pri potení alebo odlupovaní kožného epitelu.

Zinok je zložkou viac ako 300 enzýmov a ešte väčšieho počtu ďalších bielkovín nájdených u rôznych živočíšnych druhov, čo zdôrazňuje jeho nevyhnutnú potrebu. Svojim účinkom na syntézu nukleových kyselín je nevyhnutný pri raste a regenerácii tkanív (Vallee a Falchuk, 1993). Zinok vplýva vo vysokej miere na imunitný systém, je rozhodujúci pre správny vývoj a funkciu buniek, sprostredkovanie vrodenej imunity, činnosť neutrofilov a NK buniek (Haase a Rink, 2014). Schopnosť zinku fungovať ako antioxidant a stabilizovať membrány, predpokladá jeho dôležitú úlohu pri prevencii poškodenia, vyvolaného voľnými radikálmi počas zápalových procesov (Shankar a Prasad, 1998). Zinok je taktiež esenciálny pre zdravú kožu (Rostan et al., 2002). Bolo

zistené, že existuje korelácia koncentrácie zinku v krvi s apetítom, pravdepodobne v dôsledku ovplyvnenia hladiny leptínu (Mantzoros et al., 1997).

3.3. Fyziológia železa

Železo je jedným zo základných esenciálnych, stopových prvkov v každej živej bunke. Jeho nevyhnutnosť vyplýva z participovania na životne dôležitých reakciách spojených s transportom kyslíka (hemoglobín), tvorbou ATP (cytochrómy) a syntézou DNA.

Celkové množstvo Fe v ľudskom tele sa pohybuje od 3 do 4 g u bežných dospelých, čo je najviac zo všetkých prechodných kovov (Hirayama a Nagasawa, 2017). Viac ako dve tretiny obsahu železa sú inkorporované do hemoglobínu. Každý erytrocyt obsahuje miliardu atómov železa, a preto je anémia hlavným znakom nedostatku železa. Väčšina nadbytočného železa je uložená v hepatocytoch a retikuloendoteliálnych makrofágoch (Andrews, 1999). Makrofágy zabezpečujú znovu využitie železa fagocytovaním starých erytrocytov degradovaním hemoglobínu. Takto uvoľnené železo sa následne transportuje systémovým obehom alebo skladuje (Collins et al., 2010).

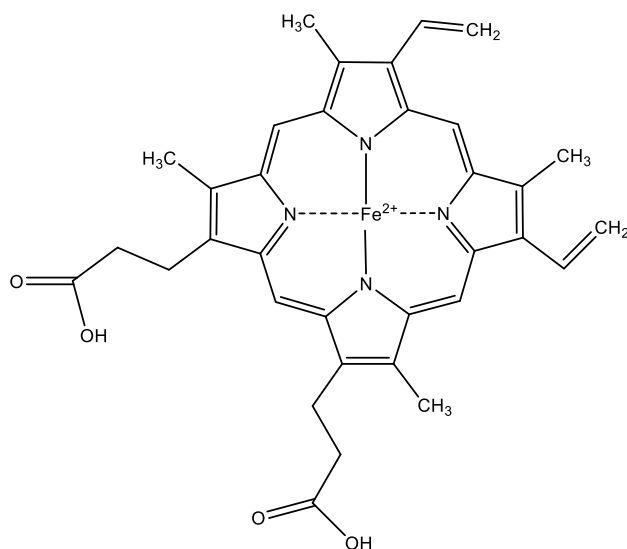
Železo je prijímané z potravy v dvoch formách: viazané na hem alebo ako anorganické viazané na inú molekulu. K vlastnému vstrebávaniu dochádza v hornej časti tenkého čreva (Donovan a Andrews, 2004). Hemové železo je relatívne dobre dostupné, ale jeho obsah v potrave je výrazne nižší než tomu je u anorganického železa. Keďže sa vstrebáva len anorganické železo v druhom oxidačnom stupni (Fe^{2+}), je nevyhnutná redukcia Fe^{3+} pomocou duodenálneho cytochromu b (McKie et al., 2002), a následne sa železo dostáva transportným proteínom DMT1 (divalent metal transporter 1) do vnútra enterocyту, kde sa môže za daných okolností zúžitkovať, uschovať alebo uvoľniť do obehu. Trojmocné železo spolu s bielkovinou apoferitínom vytvára komplex feritín, ktorý zabezpečuje vnútrobunkovú zásobu Fe. Do cirkulácie sa ďalej dostáva využitím transmembránového proteínu ferroportinu 1. Následne sa železo viaže na transferín, ktorý je hlavným extracelulárnym transportným proteínom železa. Tento komplex putuje do pečene alebo tkanív, kde transferinovým receptorom 1 (TFR1) na membráne plazmatických buniek dochádza k endocytóze, a po redukcii uľahčenej nízkym endosomálnym pH prestupuje cez DMT1 do cytosolu. Ďalšia úloha železa môže spočívať v tvorbe bielkovín, uchovávaní železa ako feritín, alebo sprístupnené opäť do krvného

obehu za pomoci efluxného transportéru ferroportinu (Collins et al., 2010; Mladenka et al., 2005). Ľudia nemajú špecifický mechanizmus pre exkréciu železa. Dochádza k nej len pasívne, a to exfoliáciou enterocytov alebo menštruačným krvácaním. Množstvo vylúčeného železa sa približne rovná miere vstrebávania a teda 1 až 2 mg/deň (Mladenka et al., 2005).

Pretože nedostatkom železa vzniká, mimo iné, anémia, a jeho nadbytkom dochádza k oxidatívne mu poškodeniu buniek, je jeho homeostáza prísne riadená. Deje ako absorpcia, recyklácia a doplňovanie zásobných foriem sú riadené peptidom hepcidínom. Hepcidínová expresia sa zvyšuje v reakcii na vysoké cirkulujúce a tkanivové hladiny železa, ako aj u osôb s infekciou. Produkcia hepcidínu je inhibovaná nedostatkom železa a hypoxiou tkaniva v reakcii na signály pochádzajúce z kostnej drene, pečene, pravdepodobne aj svalového tkaniva a adipocytov. Zvýšenie hladín hepcidínu, ktoré sú indukované zápalovými cytokínmi, najmä interleukínom-6, vysvetľujú uväznenie železa a zníženu dodávku železa, pochádzajúceho z hemoglobínu, ku ktorému dochádza pri anémii chronických ochorení. V bežnej populácii sú hladiny hepcidínu nízke u dievčat a mladých žien, stredné u mužov a najvyššie koncentrácie nachádzame u postmenopauzálnych žien (Galesloot et al., 2011).

3.4. Chelátory medi

Chelácia je typom väzby, ktorá vzniká medzi dvoma alebo viacerými ligandami (väčšinou organického pôvodu) a centrálnym atómom (zväčša kation kovu). Termín chelát zaviedol prvýkrát Sir Gilbert T. Morgan vchádzajúc z gréckeho slova označujúceho klepeto. Príkladom môže byť železo v hemovej skupine hemoglobínu (Obr. 2).



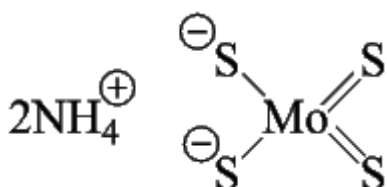
Obr. 2 Molekula hemoglobínu

Chelácia medi je priamym prístupom vedúcim k zlepšeniu stavu preťaženia alebo akumulácie medi v organizmoch (Ding et al., 2011). Avšak nielen to. Chelátory pôsobia ako neoceniteľný regulátor redoxného cyklu závislého od medi alebo ako chaperony vedia poskytnúť nový mechanizmus redistribúcie Cu v tele. Chelácia je možnosťou aj v procese získavania informácií o bunkových cykloch (Juarez et al., 2006).

S úspechom sa využíva chelačná terapia v rámci liečby Wilsonovej choroby (WD z angl. Wilson disease). V súvislosti s týmto ochorením sa používajú tri chelátory, D-penicilamin, trientin a zatiaľ len experimentálne tetrathiomolybdát amónny (ATM), pričom všetky tri dosiahli uspokojivú terapeutickú účinnosť. Existuje niekoľko ďalších terapeutických aplikácií chelátorov medi v klinických skúškach i pri liečbe niektorých ochorení (Bush a Tanzi, 2008; DeBerardinis et al., 2008). Klinická prax poskytla dôležité poznatky týkajúce sa rozdielu v prístupe k terapii rôznymi chelátormi medi pri liečbe konkrétnych ochorení. Napríklad, chelačná liečba Alzheimerovej choroby ukázala, že jednoduché odstránenie medi v plazme nemusí byť nevyhnutne účinné. Pacienti majú vyššie hladiny medi v plazme, ale všeobecne nižšie hladiny v mozgu s výnimkou amyloidových plakov, kde sa naopak med' akumuluje, čo vedie k jej nerovnomernému rozdeleniu v mozgu. Pri podaní klockvinolu u myšieho modelu tejto choroby bola preukázaná jeho účinnosť, pretože na rozdiel od vysoko afinitných chelátorov medi, ako je trientin a EDTA, disponuje schopnosťou mobilizovať Cu z plakov a preniesť ju do iných tkanív (Cherny et al., 2001).

3.4.1. Tetrathiomolybdát amónny

Účinnosť ATM (Obr. 3) pri znižovaní hladín medi v tele sa prvýkrát pozorovala u prežívavcov Austrálie a Nového Zélandu ako dôsledok prítomnosti vysokých hladín molybdénu v pôde (Brewer a Merajver, 2002).



Obr. 3 Chemická štruktúra tetrathiomolybdátu amónneho

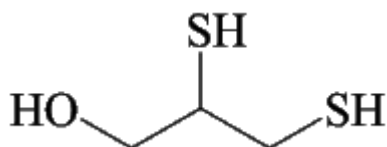
Tetrathiomolybdát reaguje s anorganickou meďou a tvorí heterobimetalické komplexy cez kmeň Mo-S-Cu, pričom vytvára tripartitný komplex s meďou a bielkovinami. ATM selektívne a priamo vyvážuje meď viazanú v metalothioneine (MT), čím sa vytvorí MT-Cu-ATM komplex, solubilizáciou komplexu Cu-ATM dôjde k uvoľneniu MT a vylúčeniu Cu-ATM (Ogra et al., 2000). ATM sa môže viazať aj na Cu-ceruloplazmín, Cu-hovädzí sérový albumín (Cu-BSA). Keď sa ATM podáva s jedlom, tvorí komplexy s meďou a potravinovými proteínmi, čím zabraňuje absorpcii medi. Pri podávaní medzi jedlami sa ATM absorbuje do krvi a viaže meď a sérový albumín, a tvorí komplex, ktorý nie je bunka schopná absorbovať. ATM inhibuje niekoľko enzýmov medi vrátane ceruloplazmínu, askorbátovej oxidázy, cytochrómoxidázy, superoxid-dismutázy 1 (SOD1), tyrozinázy a adenzinotrifosfatázy z *Enterococcus hirae*. Ďalšie štúdie naznačujú, že ATM môže znižovať angiogézu, fibrózu a zápal inhibíciou rôznych cytokínov závislých od medi.

Potenciálne nežiaduce účinky zahŕňajú depresiu kostnej drene, hepatotoxicitu (Medici et al., 2006) a pri príliš agresívnom odstránení medi spôsobuje neurologickú dysfunkciu. ATM je tretí významný liek pri liečbe Wilsonovej choroby po D-penicilamine a trientine (Brewer et al., 2003), avšak len ako experimentálna terapia. V posledných 35 rokoch sa ATM používa ako experimentálny liek v rámci výskumu. Ako amónne ATM, tak nedávno vyvinuté cholínové ATM, ktoré sú v rámci mnohonárodných

klinických skúšok fázy 2 a 3, ešte nie sú komerčne distribuované, sú sľubnou terapiou pre Wilsonovu chorobu (Rupp et al., 2017).

3.4.2. Dimerkaprol

Dimerkaprol (2,3-dimercapto-1-propanol, Obr. 4) bol vyvinutý v roku 1940 vo Veľkej Británii ako protilátka chemickej organoarzénovej zbrane (lewisit) počas druhej svetovej vojny (Peters et al., 1945). Preto je vo svete známy ako British anti Lewisit (BAL). Dimerkaprol je alkohol s dvoma substituovanými sulfhydrylovými skupinami (ditiolom), ktoré môžu tvoriť stabilný päťčlenný kruh s trojmocným arzénom a neutralizovať jeho toxicitu. Krátko po jeho zavedení ako antidota arzénu sa ukázalo, že dimerkaprol zvyšuje vylučovanie iných kovov, ako je zlato, ortuť, striebro a meď, pričom prednostne vylučuje meď (Denny-Brown a Porter, 1951). Po zistení príčiny Wilsonovej choroby sa následne začal dimerkaprol používať aj v tejto oblasti.

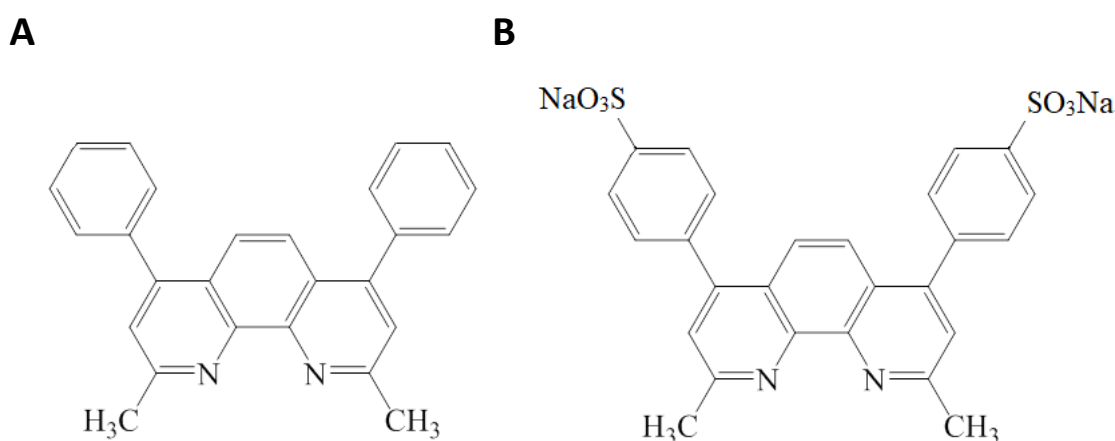


Obr. 4 Chemická štruktúra dimerkaprolu

V súčasnosti je dimerkaprol takmer úplne nahradený a používa sa iba vo výnimočných situáciách popísaných v kazuistikách (Chakor et al., 2015), a to z dôvodu jeho nežiaducich účinkov, ktoré sa pozorovali u približne 50% pacientov. Pozorované boli, mimo iné, tachykardia, úzkosť, nepokoj, GIT dyskomfort. Približne u 30% detí sa vyvinula horúčka vyvolaná liekmi (Vilensky a Redman, 2003). Rozvoj tachyfyliaxie bol vysvetlený tým, že opakované cykly dimerkaprolu mali za následok indukciu pečenej enzýmov a autooxidáciu dvoch sulfhydrylových skupín liečiva (Walshe, 1999).

3.4.3. Bathocuproin

Bathocuproin (Obr. 5) je dobre známe chelatačné činidlo bežne používané v experimentoch bunkovej biológie na selektívne chelatovanie Cu^{1+} (Rasoloson et al., 2004). Má však aj schopnosť prechodne viazať Cu^{2+} , vnútiť mu tetraedrálnu geometriu a indukovať jeho redukciu na Cu^{1+} . Dôležitým aspektom je, že akonáhle sa dosiahne redukovaný stav komplexu medi, je bathocuproin stabilizovaný a nezúčastňuje sa na redoxnom cykle (Patel et al., 1997).



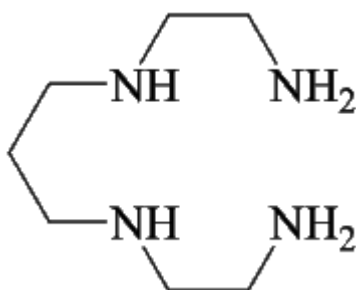
Obr. 5 Chemická štruktúra bathocuproinu (A) a BCS (B)

BCS (Obr. 5B), sulfónovaný derivát, bol vyvinutý aby ponúkol vo vode rozpustnú verziu bathocuproinu. Pretože je BCS nabitý a membránovo nepriepustný, bežne sa používa v štúdiách, ktoré vyžadujú extracelulárne činidlo obmedzujúce med' (Itoh et al., 2008; Rasoloson et al., 2004; Xiao et al., 2004). BCS sa využíva na kvantifikáciu Cu^+ alebo detekciu Cu^+ tvorby v Cu^{2+} iniciovaných oxidačných reakciách. Komplex BCS- Cu^+ je ľahko detekovateľný (kvantifikovateľný) spektrofotometricky vďaka jeho schopnosti absorbovať svetlo pri 480 nm (Laggner et al., 2006; Riha et al., 2013).

3.4.4. Trientin

Trientin (N,N'-bis(2-aminoethyl)ethan-1,2-diamin, Obr. 6) slúži ako alternatíva k D-penicilaminu (Walshe, 1982). Je to silný chelatačný prostriedok s polyamínovou štruktúrou, ktorý tvorí stabilný komplex s med'ou štyrmi dusíkmi v rovinnom kruhu. Hoci je počet donorových skupín v trientine nižší ako EDTA, afinita k

medi je výrazne vyššia, vďaka väčšej stabilite komplexu med'-chelát so štvorcovými rovinnými geometrickými konformáciami. Štruktúra trientinu obsahuje externé (primárne) aminoskupiny viac zásadité ako vnútorné (sekundárne) aminoskupiny. Pri neutrálnom alebo mierne kyslom pH je táto zlúčenina kladne nabitá, čo odôvodňuje jej slabú intestinálnu absorpciu. Zhruba 1 % aplikovaného trientinu a asi 8 % jeho zmetabolizovaného produktu - acetyltriénu sa nakoniec objavia v moči. Rozsah vylúčeného trientinu koreluje so zvýšenou stratou medi, železa a zinku močom (Kodama et al., 1997). Trientin skutočne chelatuje železo, preto je dôležité vyhnúť sa ich súčasnému podávaniu, pretože komplex so železom je toxický (Roberts et al., 2008). Reverzibilná sideroplastická anémia môže byť dôsledkom predávkovania a následného nedostatku medi.

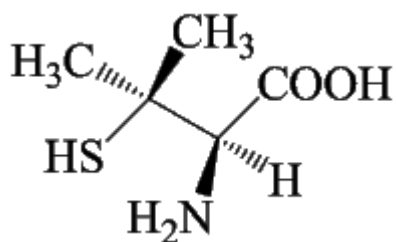


Obr. 6 Chemická štruktúra trientinu

Predchádzajúce pozorovania potvrdzujú (Sarkar et al., 1977), že trientin súťaží o med' viazanú na albumín v sére s vysokou účinnosťou. Klinická aplikácia trientinu na liečbu Wilsonovej choroby, je využívaná niekoľko desaťročí. S rozvojom pochopenia mechanizmu medi v angiogenéze sa uskutočnilo mnoho pokusov s aplikáciou trientinu na liečbu rakoviny (Hayashi et al., 2007). Alternatívne sa skúša na liečbu diabetickej srdcovej choroby (Cooper et al., 2004), hoci mechanizmus účinku v tejto konkrétnej aplikácii pochopený nebol.

3.4.5. D-penicillamin

Penicillamin, ako hydrofilná aminokyselina s tiolovou skupinou v bočnom reťazci je degradačným produktom penicilínu. Len D-izomér (Obr. 7), označovaný ako D-penicillamin sa klinicky používa, L-izomér pôsobí viac toxicky a zapríčiňuje, mimo iné, optickú neuritídu (Walshe, 2009).



Obr. 7 Chemická štruktúra D-penicillaminu

D-penicillamin je schopný mobilizovať meď z vnútra buniek, redukovať Cu^{2+} na Cu^{1+} v procese chelácie a súčasne sa sám oxidovať na disulfid. Sulfhydrylová skupina viaže meď vytvárajúc stabilný, vo vode rozpustný komplex, ktorý sa následne vylúči z tela renálnou cestou (Litin et al., 1960). Na druhej strane je treba poznamenať, že schopnosť D-penicillaminu chelatovať Cu bola spochybnená v minulosti a v nedávnej dobe (Riha et al., 2013). Bolo zistené, že v myšej pečeni, zvyšuje expresiu MT, ktorá viaže meď tvoriac netoxický produkt (Balamurugan a Schaffner, 2006). Na druhej strane sa ale zistilo, že u potkanov s Wilsonovou chorobou je hladina MT a jeho mRNA zvýšená nadmernou meďou v hepatocytoch a znížená po liečbe D-penicilaminom (Xu et al., 2004).

Gastrointestinálna absorpcia tejto látky je u ľudí v rozmedzí od 40 % do 70 % perorálnej dávky, pričom je nutné podanie medzi jedlami, pretože jedlo zapríčiňuje zníženie o 50 % (Osman et al., 1983). Minimálne množstvo je v pečeni metabolizované na disulfidy, zatiaľ čo väčšina lieku sa vylučuje nezmenená v moči, čo je hlavná cesta eliminácie (Wiesner et al., 1981).

Vďaka vlastnosti dostatočne chelatovať meď je D-penicillamin roky využívaný v liečbe Wilsonovej choroby (Walshe, 1956), avšak kvôli množstvu a závažnosti nežiaducich účinkov, ako sú trombocytopenia a zriedkavo aplastická anémia, lymfocytopenia, agranulocytóza či leukopénia (Cooper et al., 2004), už nie je preferovanou terapiou (Weiss et al., 2018). Nežiaduce účinky taktiež zahrňovali gastrointestinálne, neurologické a autoimunitné poruchy (Grasedyck, 1988). Výnimočnou nebola ani dermatologická toxicita, ktorá sa prejavovala ako *elastosis perforans serpiginosa* (Becuwe et al., 2005; Liang et al., 2016).

Zistilo sa, že D-penicillamin je prínosom pri otravách arzénom (Kuruvilla et al., 1975). Používa sa tiež u pacientov s cystinúriou (DeBerardinis et al., 2008) a u pacientov s reumatoidnou artritídou (Williams et al., 1983).

Na základe vyššie uvedeného je zjavné, že chelatačná terapia je súčasťou bežnej klinickej praxe. Preto vyvstáva myšlienka na hodnotenie selektivity jednotlivých chelátorov. Pri chronickej liečbe chelátormi a zároveň pri ich neselektivite k určitému kovu, môže dochádzať ku chronickej deplícii niektorých z ostatných kovov. Touto ústrednou myšlienkou sa zaoberá táto diplomová práca, ktorá poskytuje výsledky pri hodnotení selektivity vybraných chelátorov medi.

3.5. Patológia medi

Nerovnováha v homeostáze medi v tele vedie k jej nadbytku alebo nedostatku. Oba stavy sú definované ako patologické a vyžadujú patričnú liečbu. Keďže je to pomerne rozsiahla téma, pre účely tejto diplomovej práce sa budem zaoberať len nadbytkom medi, v rámci ktorého sa využívajú chelátory medi ako liečivá.

Wilsonova choroba (*Morbus Wilsoni*) alebo inak nazývaná hepatolentikulárna degenerácia, je dedičná autozomálne recesívna metabolická vada, spojená s hromadením medi v pečeni, bazálnych gangliách a Descemetovej membráne rohovky. Svoje pomenovanie nesie po Samuelovi Alexandrovi Kinnier Wilsonovi, neurológovi, ktorý prvýkrát popísal tento stav v roku 1912.

Pri Wilsonovej chorobe dochádza v dôsledku mutácie ATP7A k znemožneniu exkrécie medi do žlče, je teda poškodená eliminácia, a zároveň k poruche inkorporácie medi za účelom vytvorenia ceruloplazmínu (Rosencrantz a Schilsky, 2011). V dôsledku tohto je meď hromadená v pečeni, plazme a iných citlivých orgánoch, pričom sa viaže na bielkoviny, hlavne -SH skupiny, podporuje vznik kyslíkových radikálov a spôsobuje apoptózu hepatocytov (Silbernagl Stefan, 2012). To vedie k poškodzovaniu pečene, ktoré sa môže viesť k masívnej až submasívnej nekróze (Povýšil Ctibor, 2007).

Viditeľným prejavom tohto ochorenia je väčšinou, ale nie vždy Kayserov-Fleischerov prstenec (nazelenalé sfarbenie obvodu rohovky). Ochorenie pečene zahŕňa recidivujúcu žltáčku, jednoduché akútne obmedzené ochorenie podobné hepatitíde, autoimunitnú hepatitídu, chronické ochorenie pečene. Prejavy Wilsonovej choroby zahŕňujú aj neurologické prejavy ako tras, stratu jemnej motorickej kontroly, poruchy chôdze či psychické poruchy prejavované v depresii či neurotickom správaní. Prejavy alebo ich kombinácie sú ale variantné aj u blízkych príbuzných (Weiss, 1993).

Diagnóza je vo väčšine prípadov stanovovaná na základe biochemických nálezov (nízka koncentrácia medi v sére a ceruloplazmínu a zvýšená exkrécia medi v moči) a klinických nálezov (spomenutý Kayserov-Fleischerov prstenec), prípadne genetickým testovaním (European Association for Study of, 2012).

Cieľom terapie je čo najskôr zahájiť liečbu, pričom liečivami prvej voľby sú chelátory medi (D-penicilamin a trientin), ktoré majú schopnosť naviazať meď, čím dochádza k zvýšeniu jej exkrécie z organizmu (European Association for Study of, 2012). V budúcnosti je možné očakávať rozšírenie liečebnej palety o ATM. Liečba je možná aj pomocou zinku, ktorého mechanizmus účinku je založený na kompetícii s meďou a teda znížení absorpcie. Doplnková terapia zahŕňa antioxidanty, hlavne vitamín E, a vhodnú úpravu stravy (obmedzenie pečene, čokolády, húb a orechov). K transplantácii pečene sa pristupuje v prípade, že pacient liečbu netoleruje zo závažných nežiaducich účinkov alebo ak liečba zlyhala (Sutcliffe et al., 2003).

3.6. Patológia zinku

Patologickým môže byť nadbytok aj nedostatok zinku v ľudskom organizme. Táto kapitola sa bude zaoberať len nedostatkom zinku, potenciálne spôsobeným neselektívnymi chelátormi medi.

Výživový a dedičný nedostatok zinku vytvára podobné symptómy. Nedostatok zinku bol prvýkrát zaznamenaný v roku 1961 u iránskych mužov, ktorých diagnostikované symptómy retardácia rastu, hypogonádizmus, abnormality kože a mentálna letargia sa pripísali výživovej nedostatočnosti zinku (Prasad et al., 1961). Celková frekvencia nedostatku zinku na celom svete môže byť vyššia ako 20% (Wuehler et al., 2005). V rozvojových krajinách môže byť postihnutých viac ako 2 miliardy ľudí. Odhaduje sa, že iba 42,5% starších (≥ 71 rokov) v Spojených štátoch má dostatočný príjem zinku (Briefel et al., 2000). Tento rozšírený výskyt v kombinácii s rôznymi klinickými prejavmi spôsobuje, že nedostatok zinku predstavuje vážny výživový problém, ktorý má oveľa väčší vplyv na ľudské zdravie ako relatívne zriedkavé otravy zinkom.

Dostatočná dostupnosť zinku má mimoriadny význam pre imunitný systém. Zinok totižto ovplyvňuje reakciu lymfocytov na mitogény a cytokíny, slúži ako kofaktor pre hormón thymulin a podieľa sa na transdukcii signálu leukocytov (Haase a Rink, 2009). V

niekoľkých štúdiách in vitro sa pozoroval vplyv nadbytku zinku na funkciu T buniek a zistilo sa, vysoké koncentrácie zinku (nad 100 μM) inhibujú funkcie T buniek (Wellinghausen et al., 1997).

Danboltov syndróm (*acrodermatitis enteropathica*) je ochorenie spôsobené narušením homeostázy zinku v dôsledku čiastočného blokovania intestinálnej absorpcie zinku, čo vedie k vážnemu stavu nedostatku zinku so zhoršenou funkciou kovových enzýmov. Je zdedený autozomálne recesívnym spôsobom a zodpovedný génom je SLC39A4, ktorý kóduje ZIP4, transportný proteín zinku (Schmitt et al., 2009). Príznaky tohoto ochorenia zahŕňujú kožné lézie, alopeciu, hnačky, neuropsychologické poruchy, stratu hmotnosti a zníženú imunitnú funkciu (Maverakis et al., 2007).

Získaný ťažký nedostatok zinku bol pozorovaný u pacientov, ktorí dostávali úplnú parenterálnu výživu bez doplnenia zinku, po nadmernej konzumácii alkoholu, závažnej malabsorpcii a iatrogénnych príčinách, ako je liečba histidínom alebo D-penicillaminom (Prasad, 1985). Symptómy sú väčšinou podobné tým, ktoré vznikajú počas *acrodermatitis enteropathica*.

Klinické príznaky mierneho nedostatku zinku sa vyskytujú predovšetkým u pacientov s nízkym príjmom zinku v potravinách, nadmerným užívaním alkoholu, malabsorpciou, chronickým ochorením obličiek a chronickou slabosťou. Symptómy zahŕňajú spomalenie rastu (u rastúcich detí a dospelých), hypogonadizmus u mužov, zmeny pleti, nechúť k príjmu potravy, duševnú letargiu, oneskorené hojenie rán a abnormality chuti.

3.7. Patológia železa

Rovnako, ako v prípade zinku bude nasledujúca kapitola obsahovať informácie o nedostatku daného kovu, železa, v prípade užívania chelátorov v nízkej selektivitou.

Nedostatok železa postihuje viac ľudí ako akýkoľvek iný stav, čo predstavuje zdravotný stav epidemických rozmerov. Okrem toho, že postihuje veľké množstvo detí a žien v rozvojových krajinách, je to jediný nedostatok živín, ktorý je tiež výrazne rozšírený v priemyselných krajinách. V rozvojových krajinách je nedostatok železa a anémia s nedostatkom železa je zvyčajne výsledkom nedostatočného príjmu potravy. V rozvinutých krajinách sú najčastejšie príčiny určité stravovacie návyky (napríklad

vegetariánska strava alebo žiadny príjem červeného mäsa) a patologické stavy (napr. malabsorpcia) (Camaschella, 2015, 2017).

Chronické krvácanie je častou príčinou negatívnej bilancie železa. K takémuto úbytku môže dôjsť pri chronickom krvácaní z nosa, zo sliznice žalúdka alebo z hemoroidov.

Najzávažnejším dôsledkom je anémia z nedostatku železa – sideropenická anémia. Sideropénia je stav spojený s relatívnym či absolútnym nedostatkom železa. Postihnutí sú bledí, majú bolesti hlavy, pocit slabosti, únavy a nevykonnosti. V dôsledku nedostatku kyslíka je zhoršená funkcia mnohých orgánov, pričom obzvlášť závažné je zhoršenie srdcovej činnosti. Pri nedostatku železa pri erytopoéze v kostnej dreni sa tvorí menej červených krviniek. Krvinky, ktoré vznikajú, obsahujú menej hemoglobínu, sú menšie a menej farebné. Najskôr dochádza k vyčerpaniu železa zo zásob. Ich vyčerpanie signalizuje pokles feritínu v sére, pri ďalej pokračujúcej deplícii stúpa množstvo transferínu, ale klesá jeho saturácia, a stúpa aj tzv. TIBCO (total iron binding capacity) krvi. Pre manifestnú fázu sideropenickej anémie sú charakteristické výraznejšie klinické príznaky (De Andrade Cairo et al., 2014).

4. Cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce je zistenie a zhodnotenie interakcie chelátorov medzi s inými iónmi, konkrétne so železom a zinkom. Pri nízkej selektivitě chelátorov, by takéto interakcie, v rámci terapeutického užívania, mohli viesť k narušeniu homeostázy a k prípadným nežiaducim účinkom. Analýza sa zameriava na päť najčastejších chelátorov (trientin, D-penicillamin, bathocuproin, tetrathiomolybdát amónny a dimerkaprol) využívaných či už terapeuticky alebo experimentálne. Posudzuje sa železo a zinok-chelatačná aktivita a zároveň schopnosť chelátorov redukovať železité ióny, pri rôznych relevantných pato(fyziologických) pH.

5. Praktická časť

5.1. Materiál a prístroje

5.1.1. Použité chemikálie

Heptahydrát síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), hexahydrát chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), chlorid zinočnatý (ZnCl_2), ferrozín (disodná soľ kyseliny 4,4'- (3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfónovej, dithizon (1,5-difenylothiokarbazon), DMSO, HA, metanol, acetát sodný, kyselina octová, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES), sodná soľ HEPES a chelátory medi (trientín, D-penicillamin, BCS, ATM, dimerkaprol) boli získané od Sigma-Aldrich (Nemecko).

Využívané acetátové pufrý pH 4,5 a 5,5 a HEPES-pufrý pH 6,8 a 7,5 sa pripravili ako 15 mM vodné roztoky príslušných solí, tj. acetátové pufrý obsahovali 15 mM octanu sodného a 27,3 alebo 2,7 mM kyseliny octovej, respektíve pre pH 4,5 a 5,5, zatiaľ čo HEPES pufrý obsahovali 15 mM sodnej soli HEPES a 71,7 alebo 14,3 mM HEPES, respektíve pre pH 6,8 a 7,5. Ultračistá voda sa pripravovala využitím prístroja Milli-Q.

5.1.2. Prístroje

V rámci merania sa využívali analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern, Nemecko). Absorbancia sa merala pomocou prístroja Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., USA). K spracovaniu výsledkov sa použil počítačový program Microsoft Excel.

5.2. Metodika vzťahujúca sa k meraniu chelatácie železnatých a železitých iónov

5.2.1. Príprava zásobných roztokov železa

Zásobné roztoky sa pripravujú vo vyšších koncentráciách, spravidla 5 mM, a následne sú podľa potreby nariadené na požadovanú koncentráciu. Vodné roztoky železnatých i železitých iónov o koncentrácií 5 mM a vyšších sú stabilné celý deň. Dôležitou podmienkou uchovávanía roztoku železitých iónov je jeho chránenie pred svetlom.

5.2.2. Príprava testovaných roztokov

Testované látky sa rozpustia a ďalej nariaedia v DMSO.

5.2.3. Štandardný operačný postup – kontrola železa

Po každej príprave zásobného roztoku železa sa vykonáva skúška železnatých iónov s využitím spektrofotometrie. Do mikrotitračnej doštičky sa postupne pridajú 100 μ l DMSO, 50 μ l roztoku so železnatými iónmi v koncentrácii 250 μ M a 50 μ l ferrozínu v koncentrácii 5 mM. Absorbancia sa premeriava pri 562 nm, pričom za vyhovujúcu sa považuje hodnota $1,0 \pm 0,05$. Kontrola železitých iónov prebieha obdobne, pričom sa pridá navyše 50 μ l HA (10 mM) a roztok železitých iónov musí byť pripravený tesne pred prevedením skúšky.

5.2.4. Meranie kalibračnej krivky železnatých iónov

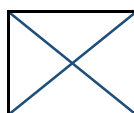
Do všetkých určených jamiek na mikrotitračnej doštičke sa napipetuje 150 μ l pufru a 50 μ l zvolenej koncentrácie železnatých iónov, pripravených nariadením zo zásobného roztoku síranu železnatého. Koncentrácia 0 μ M predstavuje rovnaké množstvo ultračistej vody, ktorá je zároveň rozpúšťadlom pre železnaté ióny. K hornej polovici sa pridá 50 μ l roztoku ferrozínu, k spodnej polovici vzoriek 50 μ l ultračistej vody, vid' Tab. 1. Následne sa zmeria absorbancia pri vlnovej dĺžke 562 nm.

Tab. 1 Tabuľka znázorňujúca rozloženie roztokov v mikrotitračnej doštičke pri meraní kalibračnej krivky

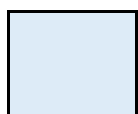
	koncentrácie testovanej látky					
	$c(\text{Fe}^{2+}) = 75 \mu\text{M}$	$c(\text{Fe}^{2+}) = 150 \mu\text{M}$	$c(\text{Fe}^{2+}) = 250 \mu\text{M}$	$c(\text{Fe}^{2+}) = 500 \mu\text{M}$	$c(\text{Fe}^{2+}) = 750 \mu\text{M}$	$c(\text{Fe}^{2+}) = 0 \mu\text{M}$
Ferrozín	X	X	X	X	X	X
Testované vzorky	X	X	X	X	X	X
Ultračistá voda	X	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X	X



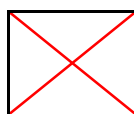
testované vzorky
(rôzna koncentrácia Fe^{2+})



testované vzorky s indikátorom
(roztok ferrozínu)



kontrolné vzorky
(bez Fe^{2+})



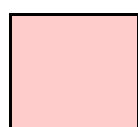
slepé vzorky bez indikátoru
(ultračistá voda)

5.2.5. Meranie chelatácie železnatých iónov

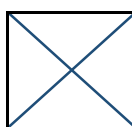
Do všetkých zvolených jamiek sa napipetuje 150 μl príslušného pufru, pridá sa 50 μl roztoku chelátora v žiadaných koncentráciách a rovnaké množstvo rozpúšťadla do kontrolných jamiek. Výnimkou je pH 7,5, kde sa do všetkých jamiek pridá navyše 50 μl HA v koncentrácii 10 mM, a to z dôvodu obmedzenia oxidácie železnatých iónov. Do každej jamky sa napipetuje 50 μl roztoku železnatých iónov, a zmes sa mieša 2 minúty, pričom následne sa pridá 50 μl roztoku ferrozínu do hornej polovice jamiek a 50 μl destilovanej vody do spodnej polovice (viď Tab. 2). Absorbancia sa meria okamžite pri 562 nm, po 5 minútach sa meranie opakuje.

Tab. 2 Tabuľka znázorňujúca rozloženie roztokov v mikrotitračnej doštičke pri meraní chelatácie železnatých iónov

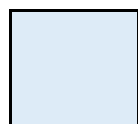
	koncentrácie testovanej látky			
	c_1	c_2	c_x	$c = 0$ mM (kontrolný)
Ferrozín Testované vzorky	X	X	X	X
Ultračistá voda Slepé vzorky	X	X	X	X



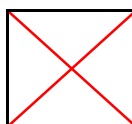
testované vzorky
(rôzna koncentrácia Fe^{2+})



testované vzorky s indikátorom
(roztok ferrozínu)



kontrolné vzorky
(bez Fe^{2+})



slepé vzorky bez indikátoru
(ultračistá voda)

$c_1, c_2, c_x \dots$ rôzne koncentrácie testovanej látky

5.2.6. Meranie chelatácie železitých iónov

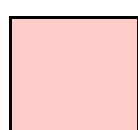
Do zvolených jamiek sa napipetuje 150 μ l príslušného pufru, pridá sa 50 μ l roztoku chelátoru v žiadaných koncentráciách a rovnaké množstvo rozpúšťadla do kontrolných jamiek. Z dôvodu nestability sa pripraví čerstvý 250 μ M roztok Fe^{3+} a 50 μ l sa pridá do všetkých jamiek. Po 2 minútach miešania sa všade pridá 50 μ l HA v koncentrácii 10 mM z dôvodu redukcie zostávajúcich (nezchelatovaných) železných iónov na železnaté ióny. Následne sa zmes opäť mieša 1 minútu. Pridá sa 50 μ l roztoku ferrozínu (5 mM) do jamiek nachádzajúcich sa na doštičke v hornej polovici a 50 μ l ultračistej vody do jamiek označených ako slepá vzorka. Absorbancia sa meria okamžite pri 562 nm a po 5 minútach sa meranie opakuje.

5.2.7. Meranie redukcie železitých iónov

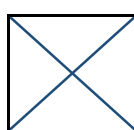
V prvom kroku sa napipetuje 150 μl požadovaného pufru do všetkých jamiek okrem kontrolných. Tam sa pridá 150 μl pufru o hodnote pH 4,5. Následne sa pridá 50 μl rozličných koncentrácií roztoku chelátora (koncentráciu 0 mM prezentuje rovnaké množstvo rozpúšťadla DMSO) alebo 50 μl HA (10 mM) do kontrolných jamiek. Pripraví sa čerstvý 250 μM roztok zo zásobného roztoku Fe^{3+} a pridá sa ho 50 μl . Po 2 minútach miešania na trepačke sa napipetuje 50 μl ferrozínu (5 mM) do prvých dvoch riadkov doštičky a 50 μl ultračistej vody do spodných dvoch riadkoch (viď Tab. 3). Meria sa okamžite pri vlnovej dĺžke 562 nm. Po uplynutí 5 minút sa meranie opakuje.

Tab. 3 Tabuľka znázorňujúca rozloženie roztokov v mikrotitračnej doštičke pri redukcii železitých iónov

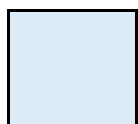
	koncentrácie testovanej látky				
	$c(\text{Fe}^{3+}) = 10 \text{ mM}$	$c(\text{Fe}^{3+}) = 1 \text{ mM}$	$c(\text{Fe}^{3+}) = 0,1 \text{ mM}$	$c(\text{Fe}^{3+}) = 0 \text{ mM}$	kontrola HA
Ferrozín	X	X	X	X	X
Testované vzorky	X	X	X	X	X
Ultračistá voda	X	X	X	X	X
Slepé vzorky	X	X	X	X	X



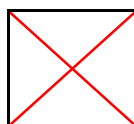
testované vzorky
(rôzna koncentrácia Fe^{3+})



testované vzorky s indikátorom
(roztok ferrozínu)



kontrolné vzorky
(bez Fe^{3+})



slepé vzorky bez indikátoru
(ultračistá voda)



použitie rozpúšťadla miesto
chelátora

Zvolené koncentrácie sú ilustračné, ďalšie koncentrácie sa volia podľa získaných výsledkov.

5.3. Metodika vzťahujúca sa k meraniu chelatacie zinočnatých iónov

5.3.1. Príprava zásobných roztokov zinočnatých iónov

Zásobné roztoky sa pripravujú vo vyšších koncentráciách, spravidla 5 mM, a následne sú podľa potreby nariadené na požadovanú koncentráciu 60 μ M.

5.3.2. Príprava testovaných roztokov

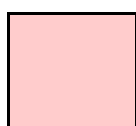
Testované látky sa ako v prípade chelatacie železa (4.1.2) rozpustia a ďalej nariaďia v DMSO.

5.3.3. Meranie chelatacie zinočnatých iónov

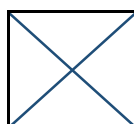
Do titračnej doštičky sa napipetuje 150 μ l pufru o vybranom pH (4,5; 5,5; 6,8; 7,5). Následne sa do všetkých jamiek, okrem posledného stĺpca, pridá 50 μ l chloridu zinočnatého v koncentrácii 60 μ M. Do posledného uvedeného sa napipetuje 50 μ l ultračistej vody. Postupne sa všade pridáva 50 μ l rozličných - predom zvolených - koncentrácií testovanej látky, okrem posledných dvoch stĺpcov, kde sa pridá rovnaký objem rozpúšťadla DMSO. Do trepačky umiestnená doštička sa nechá 2 minúty miešať. Následne sa do poslednej rady pridá 50 μ l DMSO a do zostávajúcich horných jamiek 50 μ l dithizonu rozpusteného v DMSO v koncentrácii 250 μ M (viď Tab. 4). Posledným krokom je meranie doštičky spektrofotometrom. Pri experimente s využitím pH 5,5, 6,8 a 7,5 sa absorbanca meria pri vlnových dĺžkach 540 nm a 590 nm. Pri využití pH 4,5 pri vlnových dĺžkach 530 a 570 nm. Meranie sa opäť vykonáva okamžite a po 5 minútach (Catapano et al., 2018).

Tab. 4 Tabuľka znázorňujúca rozloženie roztokov v mikrotitračnej doštičke pri meraní chelatácie zinočnatých iónov

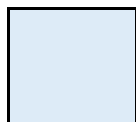
	koncentrácie testovanej látky				
	c_1	c_2	c_x	$c = 0 \text{ mM}$	$c = 0 \text{ mM}$ bez Zn
Dithizon Testované vzorky	X	X	X	X	X
Ultračistá voda Slepé vzorky	X	X	X	X	X



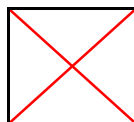
testované vzorky
(rôzna koncentrácia Zn^{2+})



testované vzorky s indikátorom
(roztok dithizonu)



kontrolné vzorky
(bez Zn^{2+})



slepé vzorky bez indikátoru
(ultračistá voda)



použitie rozpúšťadla miesto
roztoku chelátoru

$c_1, c_2, c_x \dots$ rôzne koncentrácie testovanej látky

5.4. Matematické výpočty

5.4.1. Výpočet chelatácie železa

Pri výpočte percent chelatovaného železa sa najskôr vypočíta rozdiel absorbancií. Prvým rozdielom (ΔA , indexy potom pre jednotlivé vzorky) je rozdiel absorbancie testovaného vzorku s ferrozínom (A_1) a priemeru absorbancií bez ferrozínu (teda slepých vzoriek) rovnakej koncentrácie chelátoru (A'_1, A'_2).

$$\Delta A_1 = A_1 - \frac{(A'_1 + A'_2)}{2}$$

Druhý rozdiel (ΔA_K) sa vypočíta analogicky z absorbancií so známymi koncentraciami železnatých iónov bez testovanej látky (kontrola), čo predstavuje 100% nezchelatovaného, teda voľného, železa.

$$\Delta A_{K1} = A_{K1} - \frac{(A'_{K1} + A'_{K2})}{2}$$

Finálne percentá chelatovaného železa ($x_{\%}$) sa následne vypočítajú podľa rovnice a získané výsledky sa spriemerujú.

$$x_{\%} = \left(1 - \frac{\Delta A_1}{\frac{1}{2}(\Delta A_{K1} + \Delta A_{K2})} \right) * 100$$

5.4.2. Výpočet redukcie železa

Percento zredukovaného železa R sa vypočíta na základe použitého vzorca nižšie. Vzorec je obdobný ako pri chelatacii železa s rozdielom, že ako pozitívna kontrola sa použijú vzorky s HA, ktoré redukujú vzorku na 100%. Výsledky sa opäť spriemerujú.

$$R(\%) = \left(\frac{A_1 - \Delta A'}{\frac{1}{2}[(A_{HA1} - \emptyset A_{HA}') + (A_{HA2} - \emptyset A_{HA}')] } \right) * 100$$

A_1 – absorbancia testovaného vzorku

$\Delta A'$ – rozdiel absorbancií slepých vzoriek, tj. obsahujúcich železité ióny a testovanú látku, ale nie indikátor ferrozín

$A_{HA1,2}$ – absorbancia kontrolných vzoriek (obsahujú len známe množstvo železa ale neobsahuje testovanú látku) s indikátorom

$\emptyset A_{HA}'$ – priemer absorbancií kontrolných vzoriek bez indikátora a bez testovanej látky

5.4.3. Výpočet chelatácie zinku

Množstvo zchelatovaného zinku x sa vypočíta podobne ako je vysvetlené v prípade železa. Vzhľadom k tomu, že absorbanca indikátoru dithizonu nie je i bez pridaného zinku zanedbateľná, je výpočet komplikovanejší. Je nutné použiť nižšie uvedený vzorec. Výsledky sa opäť spriemerujú.

$$x(\%) = \left(1 - \frac{A_x - A_{blank\ x} - \emptyset A_{dithizon}}{\emptyset A_0 - A_{blank\ 0} - \emptyset A_{dithizon}}\right) * 100$$

A_x – absorbanca testovaného vzorku, tj. zinok s testovanou látkou a dithizonom

$A_{blank\ x}$ – absorbanca slepého vzorku testovanej látky, teda obsahujúceho zinok s testovanou látkou ale bez indikátoru dithizonu

$\emptyset A_0$ – priemer absorbancií vzorku so zinkom a dithizonom ale bez testovanej látky, tj. pozitívna kontrola so 100% zinku vo vzorku.

$A_{blank\ 0}$ – absorbanca slepého vzorku s koncentráciou chelátora 0 mM a bez dithizonu

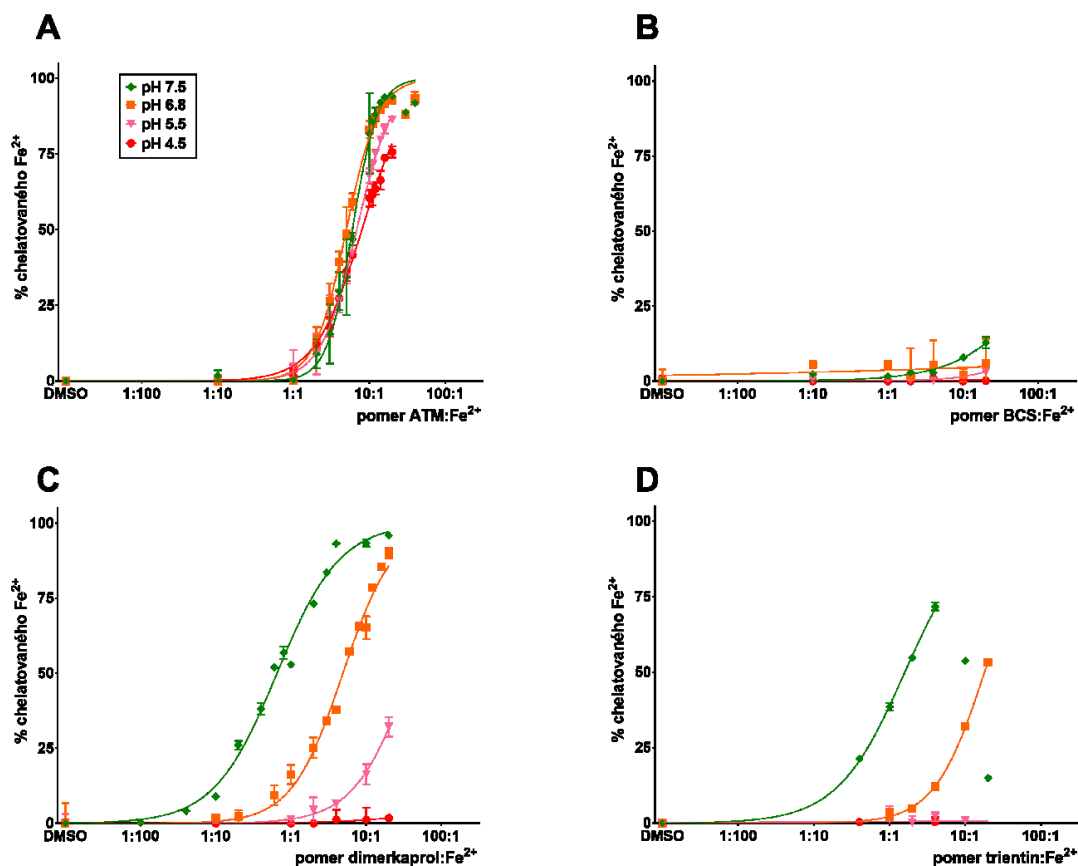
$A_{dithizon}$ – absorbanca dithizonu, teda absorbanca „pozadia“, vzorka neobsahovala zinok

5.5. Štatistická analýza

Získané výsledky sú prezentované ako priemer \pm smerodajná odchýlka. Rozdiely medzi chelatačnou schopnosťou vybraných látok sa porovnávali pomocou 95% konfidenčných intervalov chelatačných kriviek vytvorených programom, využívajúcim sa v rámci všetkých štatistických analýz, GraphPad Prism verzia 7 pre Windows (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia, U.S.A.). Analogicky boli pripravené pre porovnanie redukcie priamky lineárnej regresie s 95% konfidenčnými intervalmi.

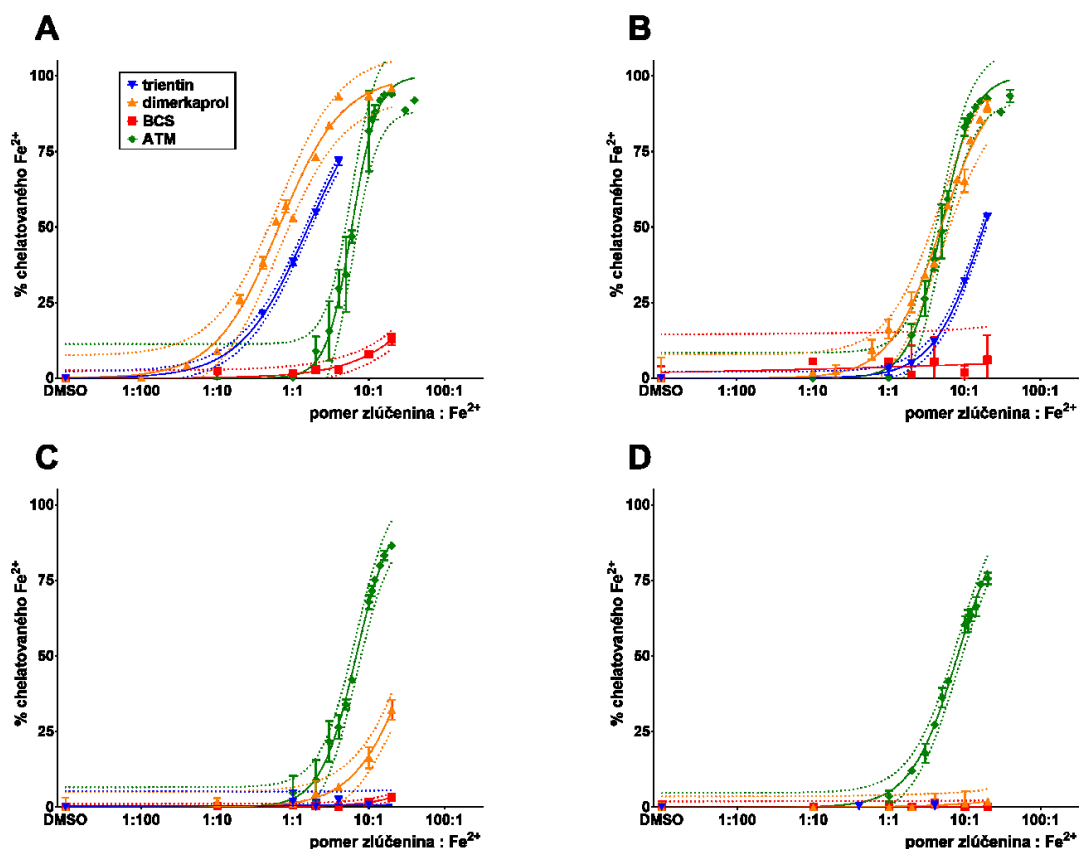
6. Výsledky

V prvom kroku bola u 4 testovaných látok otestovaná ich schopnosť chelatovať železnaté ióny (Obr. 8). Výsledky s D-penicillaminom už boli publikované (Riha et al., 2016).



Obr. 8: Závislosť percentuálneho množstva chelatovaného železa Fe^{2+} na koncentrácii jednotlivých chelátorov medzi pri štyroch pH (7,5; 6,8; 5,5; 4,5) v čase 5 minút. **A:** ATM, **B:** BCS, **C:** dimerkaprol a **D:** trientin

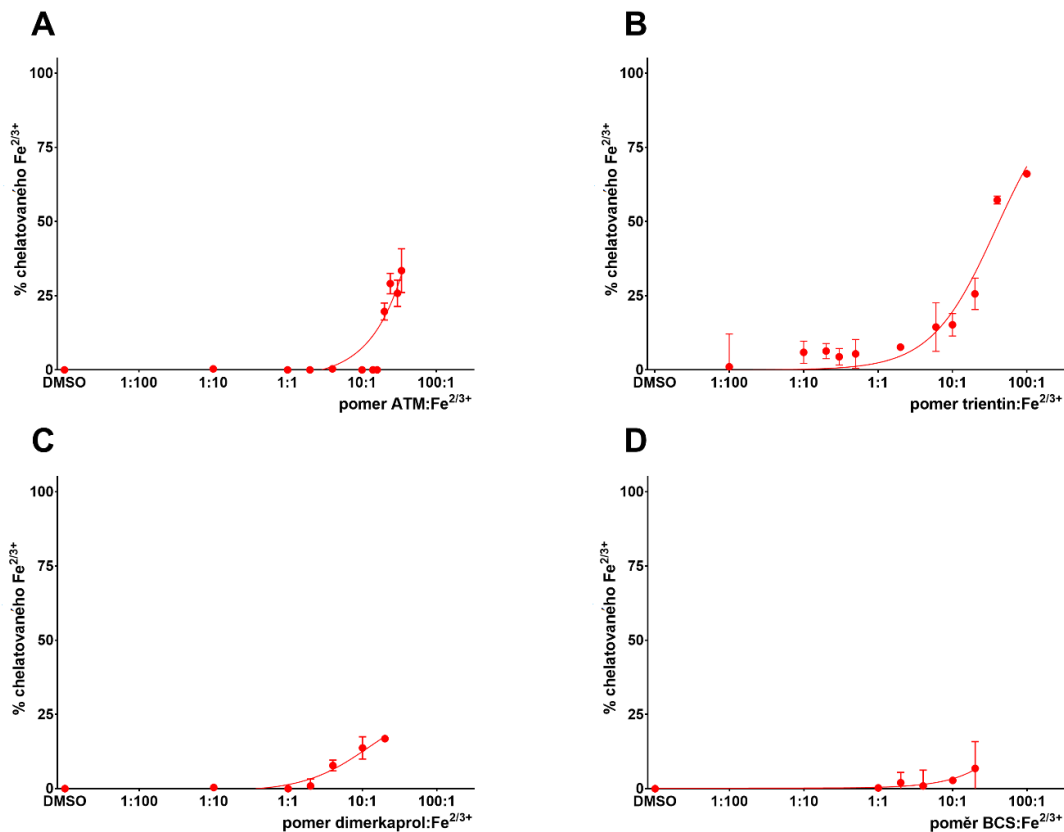
ATM chelatuje Fe^{2+} s malými rozdielmi medzi jednotlivými pH, tj. v podstate nezávisle na pH (Obr. 8A). BCS naopak chelatuje železnaté ióny len minimálne (Obr. 8B). V prípade dimerkaprolu sa ukázala veľmi dobrá chelatačná schopnosť najmä v pH 7,5, kedy v pomere 1:1, dimerkaprol: Fe^{2+} ióny, bolo zchelatovaných zhruba 50 % kovu, čo naznačuje stechiometriu komplexu 2:1. Chelatačný potenciál dimerkaprolu ale výrazne klesal s pH, pri pH 4,5 bola chelatacia zanedbateľná (Obr. 8C). Trientin chelatoval železnaté ióny efektívne len v pH 7,5 a 6,8 (Obr. 8D). Pri pH 7,5 pri pomere 1:1 chelatoval zhruba 33% iónov železa, čo naznačuje tvorbu komplexu v pomere 3:1.



Obr. 9: Porovnanie Fe²⁺-chelatačnej aktivity testovaných chelátorov medzi spoločne v rámci jedného pH s využitím 95% konfidenčných intervalov. A: pH 7,5; B: pH 6,8; C: pH 5,5 a D: pH 4,5

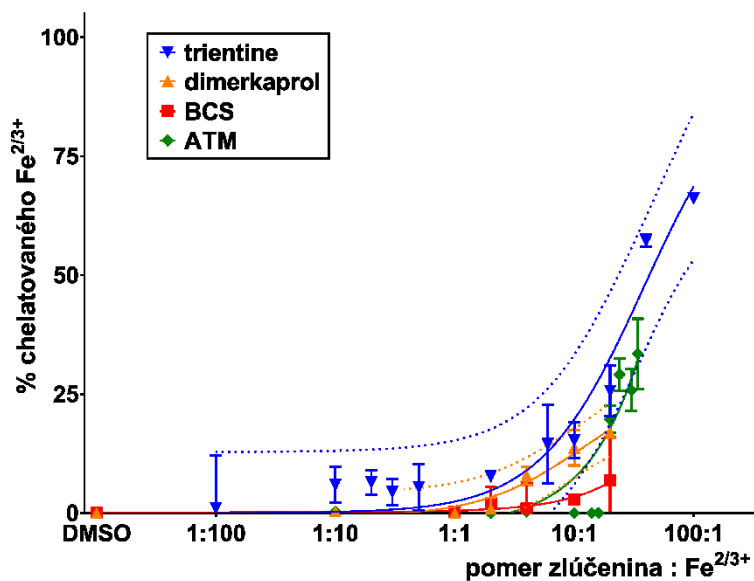
Porovnanie všetkých 4 chelátorov (Obr. 9) ukázalo, že dimerkaprol bol pri vyšších pH najúčinnnejší. Pri pH 6,8 sa efektívnosť väčšiny chelátorov znižuje, pričom ATM dosahuje rovnakú efektívnosť ako dimerkaprol (Obr. 9B). Pri ďalšom znižovaní pH (5,5) sa analogicky znižuje efektívnosť, BCS a trientín už nechelatujú prakticky vôbec, naopak ako najúčinnnejší sa javí ATM (Obr. 9C). Hodnota pH 4,5 je pre chelatáciu najmenej výhodná, čo je evidentné z grafu (Obr. 9D). Jedine ATM prejavilo výraznú schopnosť chelatovať aj v takomto prostredí.

V ďalšom kroku bola stanovená chelatačná aktivita testovaných chelátorov vo vzťahu k železitým iónom (Obr. 10). Výsledky s D-penicillaminom už boli opäť publikované (Riha et al., 2016).



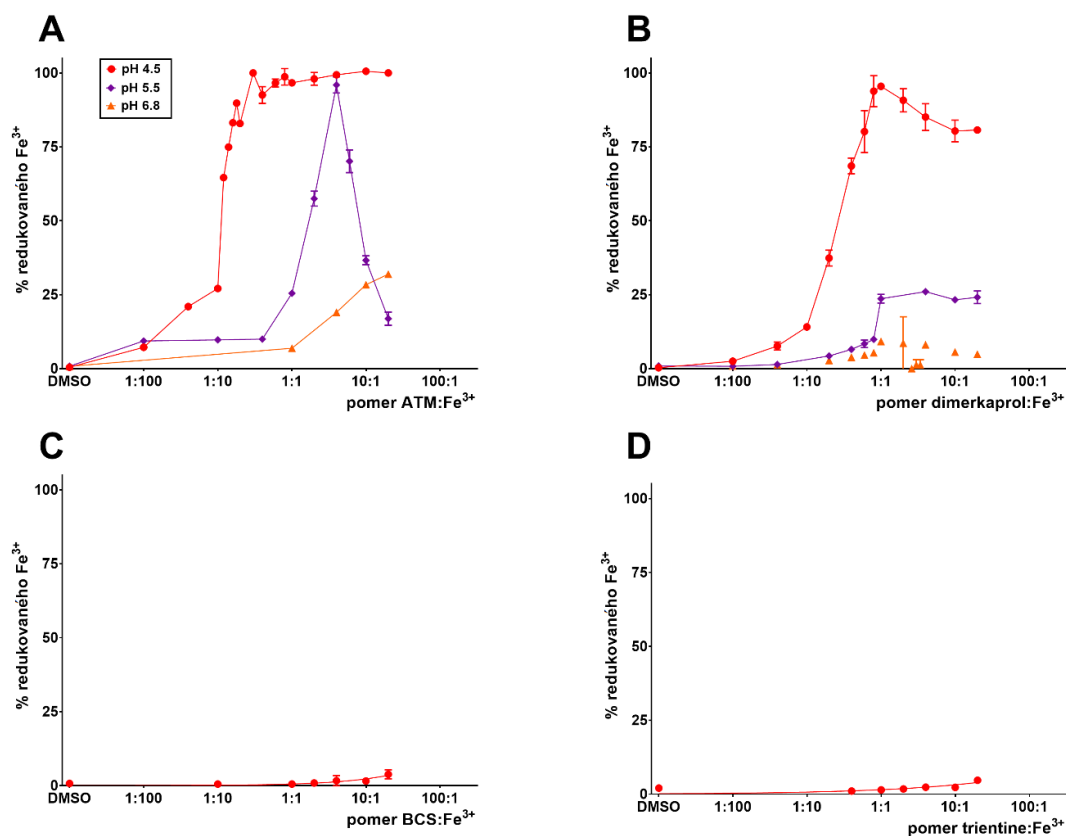
Obr. 10: Závislosť percentuálneho množstva chelatovaných iónov železa na koncentrácii jednotlivých chelátorov medi pri pH 4,5 v čase 5 minút. **A:** ATM, **B:** trientin, **C:** dimerkaprol a **D:** BCS

Všetky chelátory neboli v chelatacii železitých iónov príliš účinné. Ich schopnosť chelatovať tieto ióny bola zaznamenaná až pri pomeroch 10:1 a vyšších. Ich porovnanie (Obr.11) neukázalo významnejšie rozdiely, len BCS sa javí ako najslabší chelátor.



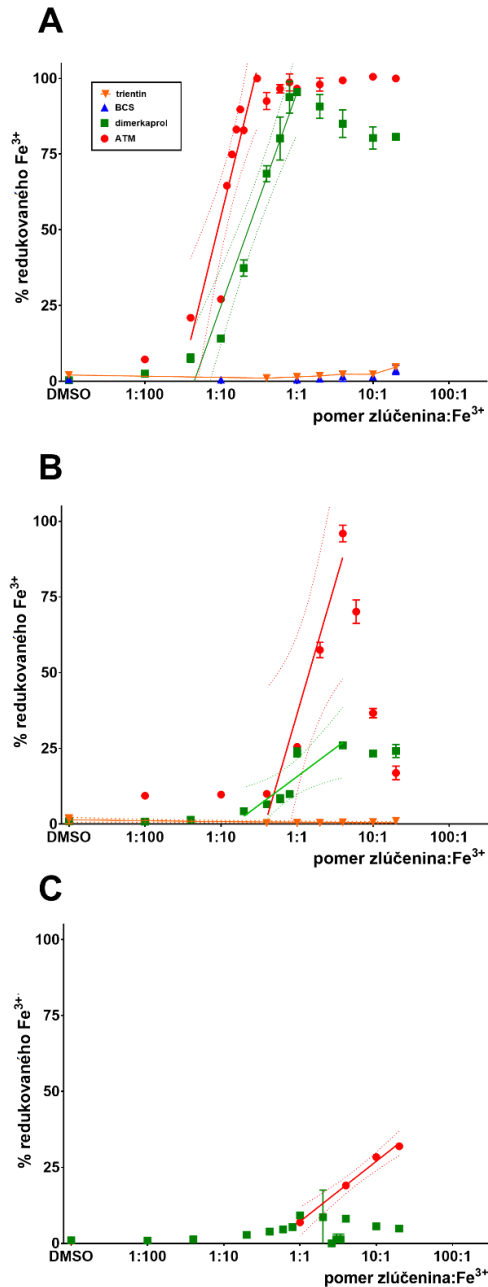
Obr. 11: Porovnanie Fe³⁺-chelatačnej aktivity testovaných chelátorov medzi spoločne v pH 4,5 s využitím 95% konfidenčných intervalov.

Taktiež bola stanovená schopnosť redukcie železitých iónov jednotlivými chelátormi (Obr.12). I tieto výsledky boli už s D-PEN publikované (Riha et al., 2016) . Pre jednoduchšie porovnanie sú ďalej uvedené redukčné grafy umiestnené dohromady podľa jednotlivých pH (Obr.13).



Obr. 12: Graf závislosti percentuálneho množstva zredukovaného železa na koncentrácii testovaných chelátorov medi v čase 5 minút. **A:** ATM, **B:** dimerkaprol, **C:** BCS a **D:** trientin

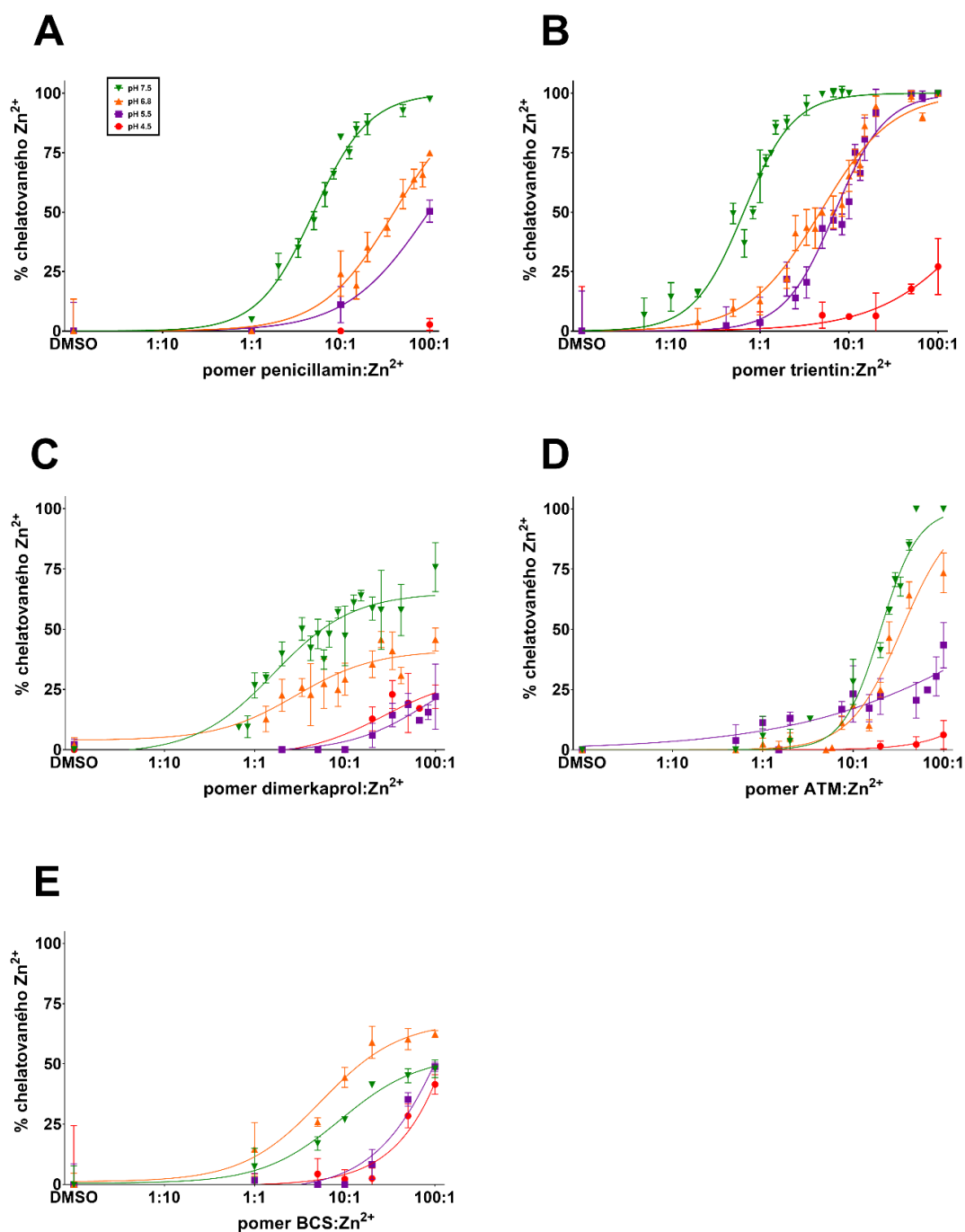
Graf ATM v pH 4,5 (Obr. 12A) ukazuje významnú schopnosť aj nízkych koncentrácií chelátora redukovať Fe^{3+} ióny, kde približne pri pomere 1:5, ATM: Fe^{3+} ióny, je zredukovaných už 100% železitých iónov. ATM sa preukázal ako najúčinnjší v najnižšom pH. So zvyšujúcim sa pH, sa výrazne znižuje schopnosť chelátora redukovať a pri pH 6,8 je už železo redukované len minimálne. Zároveň, je možné pozorovať na grafe pokles krivky, ktorá znamená, že vo vyšších koncentráciách dochádza k chelatacii. Dimerkaprol sa správal veľmi podobne ako ATM, avšak jeho redukčné schopnosti pri vyšších hodnotách pH boli výrazne nižšie. Redukčné krivky BCS (Obr. 12C) a trientinu (Obr. 12D) dokazujú len minimálnu schopnosť redukovať železité katióny Fe^{3+} na železnaté Fe^{2+} i v najnižšom, teda pre redukciu najvýhodnejšom, pH.



Obr. 113: Porovnanie redukčných schopností testovaných chelátorov medzi spoločne v rámci jedného pH s využitím 95% konfidenčných intervalov. **A:** pH 4,5; **B:** pH 5,5 a **C:** pH 6,8

Pri vzájomnom porovnaní chelátorov (Obr. 13) je zrejmé, že silné redukčné schopnosti majú ATM a dimerkaprol v najnižšom pH (Obr. 13A), zatiaľ čo BCS a trientin, ako bolo uvedené vyššie, skoro neredukujú vôbec. Vo vyššom pH si ATM zachoval vysokú účinnosť, na rozdiel od dimerkaprolu, ktorý ju má výrazne nižšiu (Obr. 13B). V pH 6,8 má z uvedených chelátorov vyššiu účinnosť už len ATM, pričom miera redukcie železitých kationov ostatných chelátorov je zanedbateľná.

Postupne bol otestovaný aj chelatačný potenciál všetkých piatich chelátorov vo vzťahu k zinočnatým kationóm (Obr. 14).

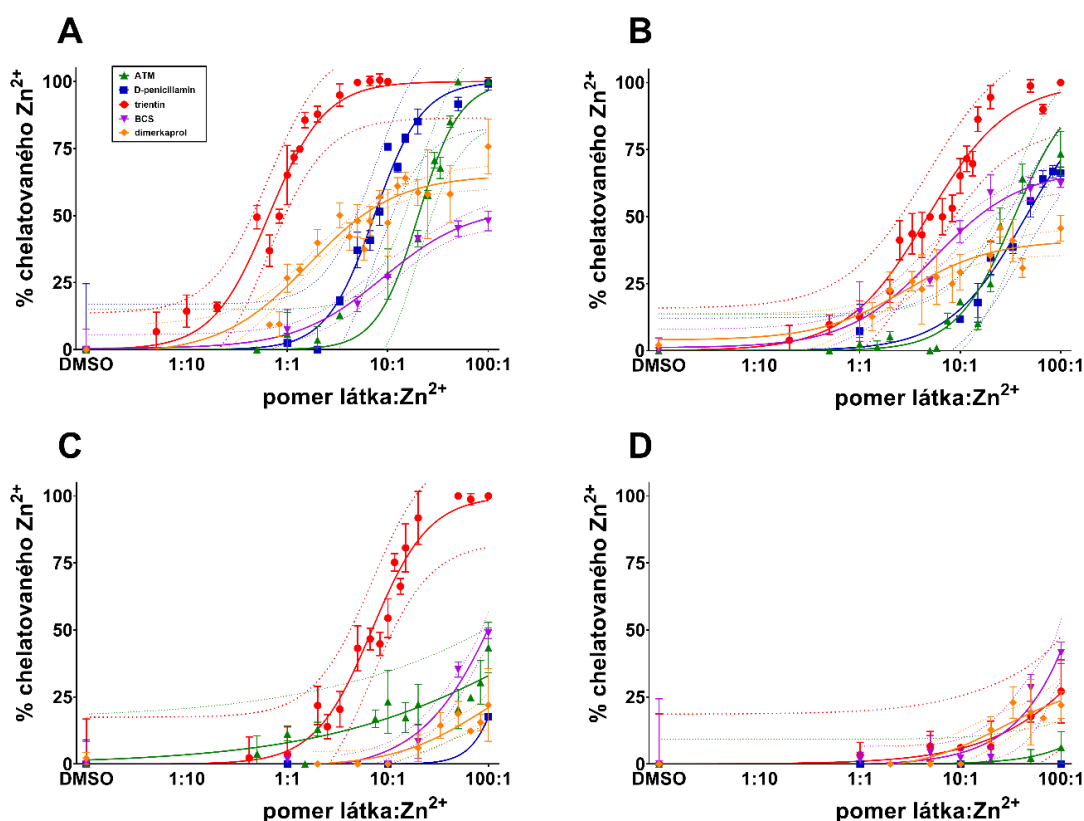


Obr. 14: Závislosť percentuálneho množstva chelatovaného Zn²⁺ na koncentrácii jednotlivých chelátorov medi v štyroch pH (7,5; 6,8; 5,5 a 4,5) v čase 0 minút. **A:** D-penicillamin, **B:** trientin, **C:** dimerkaprol, **D:** ATM a **E:** BCS

D-penicillamin preukázal dostatočnú chelatačnú aktivitu, ktorá sa znižuje so znižujúcim sa pH, pričom v prostredí pH 4,5 je aktivita zanedbateľná (Obr. 14A). Trientin

sa ukázal ako veľmi účinný chelátor (Obr. 14B). Pri pomere 1:1, trientín: Zn^{2+} je chelatovaných približne 50% zinočnatých iónov, čo naznačuje stechiometriu vytvoreného komplexu 2:1. Graf patriaci dimerkaprolu (Obr. 14C) ukazuje, že tvar chelatačných kriviek sa viac-menej pravidelne mení so znižujúcim sa pH, a látka na rozdiel od prvých dvoch látok dosahuje 100% chelatacie len pri pH 7,5. Je zaujímavé, že pri tomto pH, účinnosť ATM nastupuje až vo vyšších koncentráciach chelátoru, následne sa ale veľmi rýchlo zvyšuje (Obr. 14D). Pri pomere 10:1, ATM: Zn^{2+} je zchelatovaných menej ako 25% iónov, avšak pri pomere 100:1 je to už 100% zinočnatých iónov. Z grafu (Obr. 14E) je zrejmé, že BCS nie je schopný ani v pomere 100:1 zchelatovať všetky zinočnaté ióny. Látka si ale udržuje i určitú chelatačnú aktivitu v nižších pH.

Pre lepšie porovnanie bol pripravený obrázok s konfidenčnými intervalmi vo všetkých pH (Obr. 15).



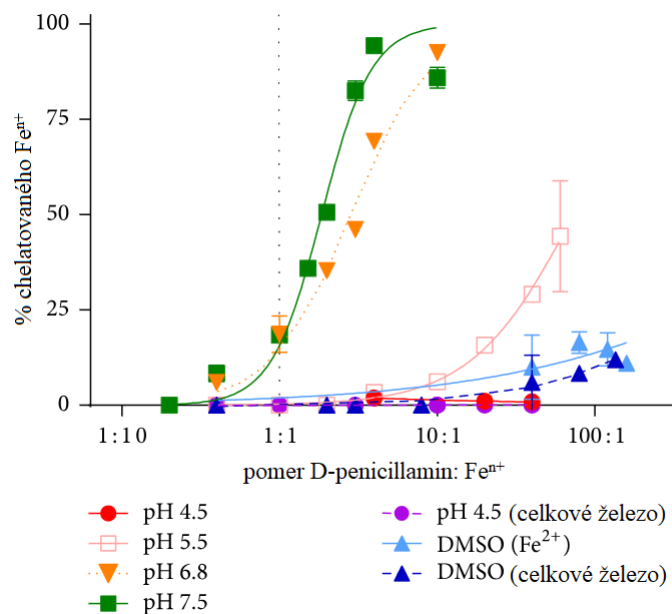
Obr. 15: Porovnanie Zn^{2+} -chelatačnej aktivity piatich testovaných chelátorov medzi spoločne v rámci jedného pH s využitím 95% konfidenčných intervalov. **A:** pH 7,5; **B:** pH 6,8; **C:** pH 5,5 a **D:** pH 4,5

Ako najúčinnjší chelátor tohto kovu sa ukázal, pri najvyššej hodnote pH (Obr. 15A) jednoznačne trientín. Z ďalších uvedených grafov chelatačných kriviek (Obr. 15B-C) vyplýva, že so znižovaním pH sa postupne znižuje aj chelatačná aktivita, pričom pozíciu najaktívnejšieho chelátora si zachováva trientín. Pri najnižšom pH 4,5 (Obr. 15D) je chelatačná schopnosť všetkých testovaných látok najnižšia a s výnimkou D-penicilaminu zo štatistického hľadiska porovnateľná.

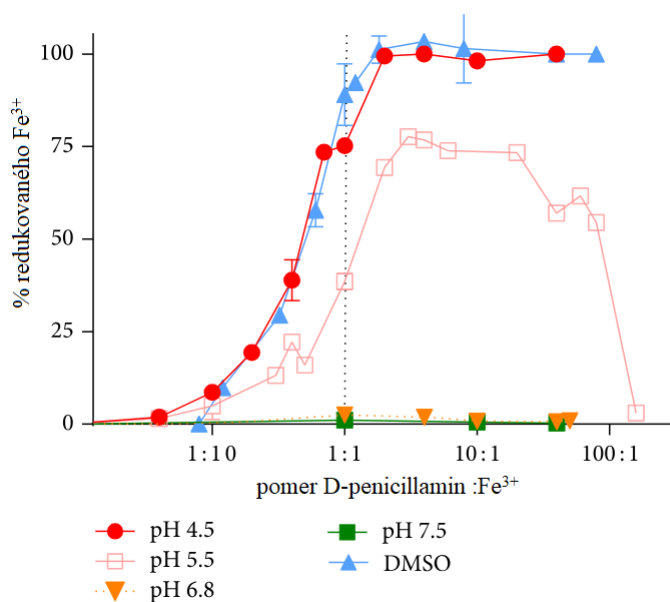
7. Diskusia

Chelátory medi sa v medicíne využívajú k odstraňovaniu nadbytočnej koncentrácie tohto prvku v organizme (Ding et al., 2011). Keďže ide o odstraňovanie určitého iónu z tela, veľmi dôležitou vlastnosťou je selektivita danej látky, aby nedochádzalo zároveň k nedostatku iónov iných, telu potrebných. Úlohou tejto diplomovej práce bolo otestovať schopnosť piatich chelátorov medi interagovať so železom a zinkom. Látky, ktoré s týmito dvoma kovmi najmenej interagujú, sú z teoretického hľadiska najlepšou voľbou terapie.

Sledované interakcie zahrňovali skúmanie chelatačnej aktivity 4 chelátorov vo vzťahu k železu, konkrétne železnatým a železitým iónom, a taktiež potenciál týchto látok redukovať Fe^{3+} na Fe^{2+} . Piatym chelátorom bol D-penicillamin, ktorého interakcie so železom už boli publikované a tak sú verejnosti známe (Obr. 16 a 17) (Riha et al., 2016). Z tohto dôvodu sa analýza tejto látky zameriavala len na testovanie jeho zinok-chelatačných vlastností. Zinok-chelatačná schopnosť látok sa teda analyzovala u všetkých piatich látok. Ak porovnáваме tieto výsledky, je zreteľné, že ani D-penicillamin nie je najsilnejším chelátorom železa, na druhej strane je nutné dodať, že je schopný chelatovať v pomeroch 10:1 100% železa a to ako v pH 6,8, tak 7,5. Vďaka tomu by sa umiestnil v rámci 5 testovaných chelátorov medzi tými najúčinnjšími pri pH 6,8. Pri nižších pH už sú jeho účinky malé. Jeho redukčné účinky sú ale taktiež výrazné, i keď z testovaných chelátorov by nebol najúčinnjší, pretože pri pH 6,8 už tieto vlastnosti nemá.



Obr. 16 Chelatácia iónov železa D-penicillaminom. Prevzaté z Riha et al., 2016.



Obr. 17 Redukcia iónov železa D-penicillaminom. Prevzaté z Riha et al., 2016

Všetky postupy analýzy sa uskutočňovali využívaním spektrofotometrie, ktorá poskytla relatívne jednoduché a rýchle prevedenie jednotlivých testov, ale zároveň aj ich dostatočnú presnosť. Testovanie prebiehalo v prostredí 4 rôznych pH, ktoré sa môžu vyskytnúť v ľudskom organizme pri fyziologických alebo patologických stavoch. Konkrétne neutrálne pH predstavovala hodnota 7,5, ďalšími boli tri kyslé hodnoty 6,8, 5,5 a 4,5, ktoré môžu simulovať patologickú acidózu, spôsobenú napríklad závažnou ischémiou, alebo tiež fyziologicky nižšie pH žalúdka (Mladenka et al., 2010; Riha et al.,

2013). Nie je nutné dodávať, že v prípade p.o. podania neselektívneho chelátora by mohlo dôjsť k zníženiu alebo dokonca i zvýšeniu absorpcie iného, fyziologicky významného kovu, napr. železa.

Z nameraných hodnôt a z nich zostavených grafov uvedených vyššie vyplýva, že dimerkaprol a ATM sú látky, ktoré majú vysokú chelatačnú schopnosť nielen so železom, ale aj zinkom. Pre ich preukázanú nízku selektivitu sú teoreticky, v dôsledku rizika nežiaduceho zníženia železa v tele, najmenej vhodné. Nízku afinitu chelátorov medi so železitými kationmi, je možné vysvetliť teóriou, že dané látky interagujú najintenzívnejšie s meďou, ktorá sa vyskytuje v podobe meďných a meďnatých kationov. Možno teda predpokladať, že interakcia s trojmocnými iónmi bude omnoho nižšia, čo nakoniec potvrdili aj naše výsledky.

Za najvhodnejší chelátor možno z hľadiska ovplyvňovania hladiny železa považovať BCS, ktorý aj pri najvyššom pH, teda pre chelataciu najvýhodnejšom, chelatoval len minimálne. Avšak aj ten, rovnako ako ostatné, interagoval so zinkom. Napr. penicillamin prejavil vysokú chelatačnú schopnosť, čo odôvodňuje jeho užívanie vo veterinárnom lekárstve pri liečbe nadbytku zinku v organizme (Lee et al., 2016). Jeho nedostatočnú selektivitu naznačuje aj fakt, že pri exkrécii močom dochádza k znižovaniu koncentrácií nielen medi ale aj zinku a železa (Kodama et al., 1997). Na druhú stranu je treba uviesť, že pri chelatacii zinku bol trientin oveľa viac účinný než D-penicillamin a môže byť v tejto indikácii účinnejší. V porovnaní s našimi nameranými výsledkami bola jeho chelatacia Fe v mierne vyšších hodnotách (viď Obr. 8D, Obr. 16), avšak redukčná schopnosť bezvýznamná, na rozdiel od D-penicillaminu, ktorý je silným redukčným činidlom (Obr. 17). V štúdiu interakcií chelátorov medi so zinkom teda nevyhoveli ani jeden chelátor.

Redukčné vlastnosti týchto zlúčenín sú v rámci terapie nežiaduce, pretože by mohli viesť k potenciácii Fentonovej reakcie v tele, s výnimkou tých, kde sa naopak ich redukčných schopností využíva (Filipsky et al., 2012; Kalinowski a Richardson, 2007). Tie sú založené na princípe zvýšenej tvorby ROS (reactive oxygen species) a následne k oxidatívnej modifikácii DNA a tvorbe zlomov, čo sa uplatňuje v terapii onkologických ochorení. Z vybraných chelátorov medi prejavili schopnosť redukcie železnatých iónov dva: dimerkaprol a ATM. Preto by boli teoreticky vhodnejšími chelátormi pre testovanie v tejto indikácii. Je potrebné taktiež dodať, že schopnosť redukovať železité ióny pri pH

6,8 nie je bežná, väčšine známych antioxidantov táto schopnosť chýba, ako bolo potvrdené v štúdií s 26 flavonoidmi (Macakova et al., 2012).

8. Záver

Vychádzajúc z dosiahnutých výsledkov tejto analýzy je možné konštatovať, že ani jeden z vybraných testovaných chelátorov nepreukázal jednoznačnú selektivitu k medi. Súčasne všetky chelátory prejavili tendenciu interagovať v rôznej miere so železnatými iónmi a zinkom. Súčasne taktiež 3 z nich boli schopné účinne redukovať železité ióny na železnaté. Naopak, miera chelatácie železitých iónov bola minimálna. Pri užívaní chelátorov ako liečiv, je tak na základe týchto informácií možné predvídať niektoré nežiaduce reakcie v tele. Eventuálne, rozšíriť ich indikáciu aj na ochorenia súvisiace s preťažením organizmu iným kovom.

9. Literatúra

- Andrews, N. C. (1999). Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, 341(26), 1986-1995. doi:10.1056/NEJM199912233412607
- Arredondo, M., Nunez, M. T. (2005). Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med*, 26(4-5), 313-327. doi:10.1016/j.mam.2005.07.010
- Balamurugan, K., Schaffner, W. (2006). Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), 737-746. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.001
- Becuwe, C., Dalle, S., Ronger-Savle, S., Skowron, F., Balme, B., Kanitakis, J., Thomas, L. (2005). Elastosis perforans serpiginosa associated with pseudo-pseudoxanthoma elasticum during treatment of Wilson's disease with penicillamine. *Dermatology*, 210(1), 60-63. doi:10.1159/000081487
- Brewer, G. J., Hedera, P., Kluin, K. J., Carlson, M., Askari, F., Dick, R. B., . . . Fink, J. K. (2003). Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate: III. Initial therapy in a total of 55 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy. *Arch Neurol*, 60(3), 379-385.
- Brewer, G. J., Merajver, S. D. (2002). Cancer therapy with tetrathiomolybdate: antiangiogenesis by lowering body copper--a review. *Integr Cancer Ther*, 1(4), 327-337. doi:10.1177/1534735402238185
- Briefel, R. R., Bialostosky, K., Kennedy-Stephenson, J., McDowell, M. A., Ervin, R. B., Wright, J. D. (2000). Zinc intake of the U.S. population: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Nutr*, 130(5S Suppl), 1367S-1373S. doi:10.1093/jn/130.5.1367S
- Bush, A. I., Tanzi, R. E. (2008). Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics*, 5(3), 421-432. doi:10.1016/j.nurt.2008.05.001
- Camaschella, C. (2015). Iron-Deficiency Anemia. *N Engl J Med*, 373(5), 485-486. doi:10.1056/NEJMc1507104
- Camaschella, C. (2017). New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev*, 31(4), 225-233. doi:10.1016/j.blre.2017.02.004
- Catapano, M. C., Tvrdy, V., Karlickova, J., Micolini, L., Mladenka, P. (2018). A simple, cheap but reliable method for evaluation of zinc chelating properties. *Bioorg Chem*, 77, 287-292. doi:10.1016/j.bioorg.2018.01.015
- Collins, J. F., Prohaska, J. R., Knutson, M. D. (2010). Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr Rev*, 68(3), 133-147. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00271.x
- Cooper, G. J., Phillips, A. R., Choong, S. Y., Leonard, B. L., Crossman, D. J., Brunton, D. H., . . . Baker, J. R. (2004). Regeneration of the heart in diabetes by selective copper chelation. *Diabetes*, 53(9), 2501-2508.
- De Andrade Cairo, R. C., Rodrigues Silva, L., Carneiro Bustani, N., Ferreira Marques, C. D. (2014). Iron deficiency anemia in adolescents; a literature review. *Nutr Hosp*, 29(6), 1240-1249. doi:10.3305/nh.2014.29.6.7245
- DeBerardinis, R. J., Coughlin, C. R., 2nd, Kaplan, P. (2008). Penicillamine therapy for pediatric cystinuria: experience from a cohort of American children. *J Urol*, 180(6), 2620-2623. doi:10.1016/j.juro.2008.08.057
- Denny-Brown, D., Porter, H. (1951). The effect of BAL (2,3-dimercaptopropanol) on hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *N Engl J Med*, 245(24), 917-925. doi:10.1056/NEJM195112132452401
- Desai, V., Kaler, S. G. (2008). Role of copper in human neurological disorders. *Am J Clin Nutr*, 88(3), 855S-858S. doi:10.1093/ajcn/88.3.855S

- Ding, X., Xie, H., Kang, Y. J. (2011). The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *J Nutr Biochem*, 22(4), 301-310.
doi:10.1016/j.jnutbio.2010.06.010
- Dítě, P. (2007). *Vnitřní lékařství: učebnice pro lékařské fakulty* (Vol. 2., dopl. a přeprac. vyd.). Praha: Galén.
- Donovan, A., Andrews, N. C. (2004). The molecular regulation of iron metabolism. *Hematol J*, 5(5), 373-380. doi:10.1038/sj.thj.6200540
- European Association for Study of, L. (2012). EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol*, 56(3), 671-685. doi:10.1016/j.jhep.2011.11.007
- Filippini, T., Cilloni, S., Malavolti, M., Violi, F., Malagoli, C., Tesauro, M., . . . Vinceti, M. (2018). Dietary intake of cadmium, chromium, copper, manganese, selenium and zinc in a Northern Italy community. *J Trace Elem Med Biol*.
doi:10.1016/j.jtemb.2018.03.001
- Filipsky, T., Mladenka, P., Macakova, K., Hrdina, R., Saso, L., Marchetti, F., Pettinari, C. (2012). In vitro characteristics of 1-phenyl-3-methyl-4-acylpyrazol-5-ones iron chelators. *Biochimie*, 94(1), 125-131. doi:10.1016/j.biochi.2011.09.024
- Galesloot, T. E., Vermeulen, S. H., Geurts-Moespot, A. J., Klaver, S. M., Kroot, J. J., van Tienoven, D., . . . Swinkels, D. W. (2011). Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood*, 117(25), e218-225.
doi:10.1182/blood-2011-02-337907
- Grasedyck, K. (1988). [D-penicillamine--side effects, pathogenesis and decreasing the risks]. *Z Rheumatol*, 47 Suppl 1, 17-19.
- Gupta, A., Lutsenko, S. (2009). Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem*, 1(6), 1125-1142.
doi:10.4155/fmc.09.84
- Haase, H., Rink, L. (2009). Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. *Annu Rev Nutr*, 29, 133-152. doi:10.1146/annurev-nutr-080508-141119
- Haase, H., Rink, L. (2014). Multiple impacts of zinc on immune function. *Metallomics*, 6(7), 1175-1180. doi:10.1039/c3mt00353a
- Hambidge, M. (2000). Human zinc deficiency. *J Nutr*, 130(5S Suppl), 1344S-1349S.
doi:10.1093/jn/130.5.1344S
- Hayashi, M., Nishiya, H., Chiba, T., Endoh, D., Kon, Y., Okui, T. (2007). Trientine, a copper-chelating agent, induced apoptosis in murine fibrosarcoma cells in vivo and in vitro. *J Vet Med Sci*, 69(2), 137-142.
- Hirayama, T., Nagasawa, H. (2017). Chemical tools for detecting Fe ions. *J Clin Biochem Nutr*, 60(1), 39-48. doi:10.3164/jcbtn.16-70
- Huster, D. (2018). [Wilson disease]. *Internist (Berl)*, 59(2), 159-174.
doi:10.1007/s00108-017-0378-x
- Chakor, R. T., Bharote, H., Eklare, N., Tamboli, K. (2015). Unilateral rubral tremors in Wilson's disease treated with dimercaprol. *Ann Indian Acad Neurol*, 18(1), 115-116. doi:10.4103/0972-2327.144286
- Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., . . . Bush, A. I. (2001). Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron*, 30(3), 665-676.
- Itoh, S., Kim, H. W., Nakagawa, O., Ozumi, K., Lessner, S. M., Aoki, H., . . . Fukai, T. (2008). Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J Biol Chem*, 283(14), 9157-9167.
doi:10.1074/jbc.M709463200

- Juarez, J. C., Betancourt, O., Jr., Pirie-Shepherd, S. R., Guan, X., Price, M. L., Shaw, D. E., . . . Donate, F. (2006). Copper binding by tetrathiomolybdate attenuates angiogenesis and tumor cell proliferation through the inhibition of superoxide dismutase 1. *Clin Cancer Res*, 12(16), 4974-4982. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0171
- Kalinowski, D. S., Richardson, D. R. (2007). Future of toxicology--iron chelators and differing modes of action and toxicity: the changing face of iron chelation therapy. *Chem Res Toxicol*, 20(5), 715-720. doi:10.1021/tx700039c
- Kazda, A. (2012). *Kritické stavy* (Vol. 1). Praha: Galén.
- Kodama, H., Murata, Y., Iitsuka, T., Abe, T. (1997). Metabolism of administered triethylene tetramine dihydrochloride in humans. *Life Sci*, 61(9), 899-907.
- Kuruvilla, A., Bergeson, P. S., Done, A. K. (1975). Arsenic poisoning in childhood. An unusual case report with special notes on therapy with penicillamine. *Clin Toxicol*, 8(5), 535-540. doi:10.3109/15563657508988097
- Laggner, H., Hermann, M., Gmeiner, B. M., Kapiotis, S. (2006). Cu²⁺ and Cu⁺ bathocuproine disulfonate complexes promote the oxidation of the ROS-detecting compound dichlorofluorescein (DCFH). *Anal Bioanal Chem*, 385(5), 959-961. doi:10.1007/s00216-006-0498-y
- Lee, Y. R., Kang, M. H., Park, H. M. (2016). Treatment of zinc toxicosis in a dog with chelation using d-penicillamine. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 26(6), 825-830. doi:10.1111/vec.12414
- Liang, J., Wang, D., Xu, J., Chen, L. (2016). Two cases of D-penicillamine-induced elastosis perforans serpiginosa. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 82(4), 452-454. doi:10.4103/0378-6323.178907
- Litin, R. B., Goldstein, N. P., Randall, R. V., Power, M. H., Diessner, G. R. (1960). Effect of D,L-penicillamine on the urinary excretion of copper and calcium in hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Neurology*, 10, 123-126.
- Macakova, K., Mladenka, P., Filipicky, T., Riha, M., Jahodar, L., Trejtnar, F., . . . Saso, L. (2012). Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chem*, 135(4), 2584-2592. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.107
- Mantzoros, C. S., Moschos, S., Avramopoulos, I., Kaklamani, V., Liolios, A., Doulgerakis, D. E., . . . Flier, J. S. (1997). Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(10), 3408-3413. doi:10.1210/jcem.82.10.4323
- Maverakis, E., Fung, M. A., Lynch, P. J., Draznin, M., Michael, D. J., Ruben, B., Fazel, N. (2007). Acrodermatitis enteropathica and an overview of zinc metabolism. *J Am Acad Dermatol*, 56(1), 116-124. doi:10.1016/j.jaad.2006.08.015
- McKie, A. T., Latunde-Dada, G. O., Miret, S., McGregor, J. A., Anderson, G. J., Vulpe, C. D., . . . Simpson, R. J. (2002). Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport. *Biochem Soc Trans*, 30(4), 722-724. doi:10.1042/
- Medici, V., Trevisan, C. P., Bigotto, M. A., D'Inca, R., Martines, D., Dal Pont, E., Sturniolo, G. C. (2006). Adverse reaction after tetrathiomolybdate treatment for Wilson's disease: a case report. *Mov Disord*, 21(11), 2030-2032. doi:10.1002/mds.21109
- Mladenka, P., Hrdina, R., Hubl, M., Simunek, T. (2005). The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 48(3-4), 127-135.
- Mladenka, P., Macakova, K., Zatloukalova, L., Rehakova, Z., Singh, B. K., Prasad, A. K., . . . Saso, L. (2010). In vitro interactions of coumarins with iron. *Biochimie*, 92(9), 1108-1114. doi:10.1016/j.biochi.2010.03.025

- Ogra, Y., Chikusa, H., Suzuki, K. T. (2000). Metabolic fate of the insoluble copper/tetrathiomolybdate complex formed in the liver of LEC rats with excess tetrathiomolybdate. *J Inorg Biochem*, 78(2), 123-128.
- Osman, M. A., Patel, R. B., Schuna, A., Sundstrom, W. R., Welling, P. G. (1983). Reduction in oral penicillamine absorption by food, antacid, and ferrous sulfate. *Clin Pharmacol Ther*, 33(4), 465-470.
- Patel, R. P., Svistunenko, D., Wilson, M. T., Darley-Usmar, V. M. (1997). Reduction of Cu(II) by lipid hydroperoxides: implications for the copper-dependent oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem J*, 322 (Pt 2), 425-433.
- Peters, R. A., Stocken, L. A., Thompson, R. H. (1945). British anti-lewisite (BAL). *Nature*, 156, 616-619.
- Povýšil Ctibor, I. Š., et al. (2007). *Speciální patologie* (Vol. 2). Praha: Galén, Karolinum.
- Prasad, A. S. (1985). Clinical manifestations of zinc deficiency. *Annu Rev Nutr*, 5, 341-363. doi:10.1146/annurev.nu.05.070185.002013
- Prasad, A. S., Halsted, J. A., Nadimi, M. (1961). Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med*, 31, 532-546.
- Rasoloson, D., Shi, L., Chong, C. R., Kafsack, B. F., Sullivan, D. J. (2004). Copper pathways in Plasmodium falciparum infected erythrocytes indicate an efflux role for the copper P-ATPase. *Biochem J*, 381(Pt 3), 803-811. doi:10.1042/BJ20040335
- Riha, M., Haskova, P., Martin, J., Filipisky, T., Vanova, K., Vavrova, J., . . . Mladenka, P. (2016). Protective Effects of D-Penicillamine on Catecholamine-Induced Myocardial Injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 5213532. doi:10.1155/2016/5213532
- Riha, M., Karlickova, J., Filipisky, T., Macakova, K., Hrdina, R., Mladenka, P. (2013). 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*, 123, 80-87. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.02.011
- Roberts, E. A., Schilsky, M. L., American Association for Study of Liver, D. (2008). Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*, 47(6), 2089-2111. doi:10.1002/hep.22261
- Rosencrantz, R., Schilsky, M. (2011). Wilson disease: pathogenesis and clinical considerations in diagnosis and treatment. *Semin Liver Dis*, 31(3), 245-259. doi:10.1055/s-0031-1286056
- Rostan, E. F., DeBuys, H. V., Madey, D. L., Pinnell, S. R. (2002). Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *Int J Dermatol*, 41(9), 606-611.
- Rupp, C., Stremmel, W., Weiss, K. H. (2017). Novel perspectives on Wilson disease treatment. *Handb Clin Neurol*, 142, 225-230. doi:10.1016/B978-0-444-63625-6.00019-7
- Sarkar, B., Sass-Kortsak, A., Clarke, R., Laurie, S. H., Wei, P. (1977). A comparative study of in vitro and in vivo interaction of D-penicillamine and triethylenetetramine with copper. *Proc R Soc Med*, 70 Suppl 3, 13-18.
- Scott, B. J., Bradwell, A. R. (1983). Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clin Chem*, 29(4), 629-633.
- Shankar, A. H., Prasad, A. S. (1998). Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*, 68(2 Suppl), 447S-463S. doi:10.1093/ajcn/68.2.447S

- Schmitt, S., Kury, S., Giraud, M., Dreno, B., Kharfi, M., Bezieau, S. (2009). An update on mutations of the SLC39A4 gene in acrodermatitis enteropathica. *Hum Mutat*, 30(6), 926-933. doi:10.1002/humu.20988
- Silbernagl Stefan, L. F. (2012). *Atlas patofyziologie* (Vol. 2). Praha: Grada.
- Sutcliffe, R. P., Maguire, D. D., Muiesan, P., Dhawan, A., Mieli-Vergani, G., O'Grady, J. G., . . . Heaton, N. D. (2003). Liver transplantation for Wilson's disease: long-term results and quality-of-life assessment. *Transplantation*, 75(7), 1003-1006. doi:10.1097/01.TP.0000055830.82799.B1
- Tegoni, M., Valensin, D., Toso, L., Remelli, M. (2014). Copper chelators: chemical properties and bio-medical applications. *Curr Med Chem*, 21(33), 3785-3818.
- Turnlund, J. R., Keyes, W. R., Anderson, H. L., Acord, L. L. (1989). Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu. *Am J Clin Nutr*, 49(5), 870-878. doi:10.1093/ajcn/49.5.870
- Vallee, B. L., Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*, 73(1), 79-118. doi:10.1152/physrev.1993.73.1.79
- Vilensky, J. A., Redman, K. (2003). British anti-Lewisite (dimercaprol): an amazing history. *Ann Emerg Med*, 41(3), 378-383. doi:10.1067/mem.2003.72
- Walshe, J. M. (1956). Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Am J Med*, 21(4), 487-495.
- Walshe, J. M. (1982). Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride. *Lancet*, 1(8273), 643-647.
- Walshe, J. M. (1999). Penicillamine: the treatment of first choice for patients with Wilson's disease. *Mov Disord*, 14(4), 545-550.
- Walshe, J. M. (2009). The conquest of Wilson's disease. *Brain*, 132(Pt 8), 2289-2295. doi:10.1093/brain/awp149
- Wastney, M. E., Aamodt, R. L., Rumble, W. F., Henkin, R. I. (1986). Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *Am J Physiol*, 251(2 Pt 2), R398-408. doi:10.1152/ajpregu.1986.251.2.R398
- Weiss, K. H. (1993). Wilson Disease. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. Seattle (WA).
- Weiss, K. H., Czlonkowska, A., Hedera, P., Ferenci, P. (2018). WTX101 - an investigational drug for the treatment of Wilson disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 27(6), 561-567. doi:10.1080/13543784.2018.1482274
- Weiss, K. H., Stremmel, W. (2012). Evolving perspectives in Wilson disease: diagnosis, treatment and monitoring. *Curr Gastroenterol Rep*, 14(1), 1-7. doi:10.1007/s11894-011-0227-3
- Wellinghausen, N., Martin, M., Rink, L. (1997). Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur J Immunol*, 27(10), 2529-2535. doi:10.1002/eji.1830271010
- Wiesner, R. H., Dickson, E. R., Carlson, G. L., McPhaul, L. W., Go, V. L. (1981). The pharmacokinetics of D-penicillamine in man. *J Rheumatol Suppl*, 7, 51-55.
- Williams, H. J., Ward, J. R., Reading, J. C., Egger, M. J., Grandone, J. T., Samuelson, C. O., . . . Plotz, P. H. (1983). Low-dose D-penicillamine therapy in rheumatoid arthritis. A controlled, double-blind clinical trial. *Arthritis Rheum*, 26(5), 581-592.
- Wuehler, S. E., Peerson, J. M., Brown, K. H. (2005). Use of national food balance data to estimate the adequacy of zinc in national food supplies: methodology and regional estimates. *Public Health Nutr*, 8(7), 812-819.

- Xiao, Z., Loughlin, F., George, G. N., Howlett, G. J., Wedd, A. G. (2004). C-terminal domain of the membrane copper transporter Ctr1 from *Saccharomyces cerevisiae* binds four Cu(I) ions as a cuprous-thiolate polynuclear cluster: sub-femtomolar Cu(I) affinity of three proteins involved in copper trafficking. *J Am Chem Soc*, 126(10), 3081-3090. doi:10.1021/ja0390350
- Xu, H., Nakagawa, A., Aoyama, Y. (2004). Suppressive effects of dietary D-penicillamine on the gene expression of hepatic metallothionein-1 and protein level of hepatic metallothionein in Long-Evans Cinnamon rats. *Nutrition Research*, 24(11), 935-944. doi:10.1016/j.nutres.2004.04.007