

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie



Farmakologický screening látek s železo chelatační aktivitou

Diplomová práce

Vypracovala: Havránková Lenka

Školitel: Mgr. Mladěnka Přemysl

Akademický rok 2008/2009

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, u nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

Děkuji Mgr. Přemyslu Mladěnkovi, školiteli mé diplomové práce, za poskytnuté materiály, rady a pomoc při řešení a zpracování diplomové práce. Děkuji také slečně Mgr. Libuši Zatloukalové za pomoc během měření, a také oběma za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Také děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy, díky její pomoci byla tato diplomová práce uskutečněna (grant 53707 B).

Abstrakt.....	6
Abstrakt v anličtině	8
1. Úvod.....	10
2. Železo	11
2.1. Fyziologie železa	11
2.2. Patologické stavy spojené primárně s železem.....	15
2.2.1. Nedostatek železa	15
2.2.2. Nadbytek železa.....	15
2.2.2.1. Železo a reaktivní formy kyslíku	17
2.3. Chelatace železa.....	18
2.3.1. Deferoxamin (DFO).....	19
2.3.2. Další klinicky používané chelátory železa.....	20
3. Flavonoidy	21
4. Experimentální část.....	24
4.1. Cíl práce	24
5. Materiál a metodika	25
5.1. Použité chemikálie.....	25
5.2. Přístroj.....	28
5.3. Postup.....	28
5.3.1. Příprava zásobních roztoků.....	28
5.3.2. Kalibrace železnatých iontů.....	29
5.3.3. Stanovení optimálního prostředí pro redukci železitých iontů	30
5.3.4. Stanovení optimální koncentrace hydroxylaminu pro redukci železitých iontů	31
5.3.5. Měření chelatace železnatých iontů.....	31
5.3.6. Změření schopnosti vázat celkové železo.....	32
5.4 Statistická analýza.....	33
6. Výsledky.....	35
6.1. Standardizace postupu pro chelataci železa.....	35
6.2. Stanovení chelatační účinnosti vybraných flavonoidů	38
7. Diskuze	41
8. Závěr.....	44

Seznam zkratek	45
Seznam použité literatury.....	46

Abstrakt

Železo je důležitým prvkem, který se účastní mnoha životně důležitých procesů. Jeho nedostatek způsobuje zastavení buněčného růstu a může vést až k buněčné smrti. Naopak nadbytek železa je pro organismus nebezpečný v důsledku jeho katalytické činnosti při tvorbě volných radikálů. Proto musí být množství železa v organismu přísně regulováno. Při přetížení organismu železem jsou používány tzv. chelátory železa.

Flavonoidy jsou rostlinné polyfenoly odvozené od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu. Jsou důležitou součástí antioxidačního systému, mající schopnost přímo reagovat s volnými radikály a chelatovat některé kovové ionty.

V této studii byla vyzkoušena chelatační aktivita u 9 flavonoidů (apigeninu, kaempferolu, quercetinu, rutinu, hesperetinu, hesperidinu, naringeninu, naringinu a katechinu) a srovnána s klinicky používaným chelátorem železa deferoxaminem.

Pro spektrofotometrické stanovení chelatační účinnosti byly nalezeny vhodné experimentální podmínky za použití ferozinu jako indikátoru železnatých iontů. Pro stanovení celkové chelatace byl využit hydroxylamin jako redukční činidlo.

Chelátorem s největší chelatační aktivitou se ukázal klinicky používaný deferoxamin, ze zkoušených flavonoidů byl nejúčinnější apigenin. Prakticky neúčinnými flavonoidy se ukázaly katechin, hesperetin, hesperidin, naringin a naringenin. Závěrem lze z této studie usoudit, že pro chelatační aktivitu je

nutná přítomnost hydroxyskupiny v poloze 5, případně v poloze 3,
oxoskupina v poloze 4 a dvojná vazba v poloze 2-3.

Abstrakt v anličtině

Iron is an important element involved in many vital processes. Its deficiency stops cell growth and can lead even to a cell death. On the other hand excess of iron is dangerous for organism because of its catalytic participation on free radical formation. Therefore the amount of iron in the organism has to be meticulously regulated. Iron chelators are used when the organism is iron-overloaded.

Flavonoids are vegetal polyphenols derivated from a heterocyclic compounds named flavan. They are an important components of the antioxidant system and are able to react with free radicals and to chelate some metal ions.

In this study, nine flavonoids (apigenin, kaempferol, quercetin, rutin, hesperetin, hesperidin, naringenin, naringin and catechin) were tested for their chelation activity and compared with clinically used iron chelator desferrioxamine.

Suitable experimental conditions with use of ferrozine as an ferrous ion indicator were found for spectrophotometric assesment of iron-chelation efficiency. For assesment of the total chelation, hydroxylamine was used as the reductant.

Chelator with the highest chelation activity was clinically used desferrioxamine, from tested flavanoids was the most effective apigenin. Practically ineffective flavanoids were catechin hesperetin, hesperidin, naringin and naringenin. In conclusion the presence of 5-OH group,

eventually 3-OH group, 4-oxo group and 2-3 double bond is essential for iron-chelation activity.

1. Úvod

Železo je důležitým makroelementem pro organismus, podílí se na základních fyziologických dějích jako je transport kyslíku, produkce ATP a syntéza DNA. Při jeho nedostatku dochází k zastavení buněčného růstu a nakonec až k buněčné smrti. Na druhé straně může být nadbytek železa toxický. Při patologických stavech, kdy množství železa přesahuje normální hodnotu, může docházet k reakcím železa s reaktivními formami kyslíku (ROS) za vzniku volných radikálů, které jsou pro organismus nebezpečné. Nadbytek železa je spojen s onemocněním nazývaným hemochromatóza . S podobným nadbytečným nárůstem zásob železa se setkáváme u pacientů s β -talasemií, kteří musí být kvůli poruchy globinových polypeptidových řetězců léčeni krevními transfúzemi. V obou případech představují tzv. chelátory železa, tj. látky vytvářející s železem komplex, který je následně vylučován, nepostradatelnou součástí terapie. Dosud nejpoužívanějším chelátorem je desferoxamin, který má ale celou řadu nevýhod, proto je screening látek s železo-chelatační aktivitou, který je tématem této diplomové práce, velmi žádoucí. Některé flavonoidy, které jsou netoxickými přírodními metabolity, mají určité železo-chelatační vlastnosti, a proto se tato diplomová práce zabývá hledáním flavonoidních metabolitů s touto aktivitou.

2. Železo

2.1. Fyziologie železa

Železo je nepostradatelný prvek, který je zapojený v mnoha životně důležitých procesech, jako je transport kyslíku, produkce ATP a syntéza DNA. Nedostatek železa v buňkách způsobuje zastavení buněčného růstu a nakonec vede až k buněčné smrti. Tělo dospělého člověka obsahuje normálně 35 až 45mg železa na kilogram. Železo se vyskytuje především ve vázané formě, zejména jako součást hemu a jako zásobní železo uložené v bílkovině feritinu, malá část železa cirkuluje vázaná v krvi na transportní bílkovinu transferin. Největší množství železa je uloženo v cirkulujících červených krvinkách, parenchymatických buňkách jater, retikuloendoteliálních makrofázích, kostní dřeni a ve svalech (1).

Schopnost železa dodávat a přijmout elektron, tj. přecházet mezi železnatými a železitými ionty, je důležitou vlastností, která predisponuje železo pro jeho rozsáhlé využití v organismu. Nicméně tato vlastnost může být v některých situacích nebezpečná, protože železo je také známé tvorbou volných radikálů, na které se může podílet volné tj. nevázané nebo slabě vázané železo (2). Vzniklé volné radikály mohou mít užitečné fyziologické funkce (31,32), jsou-li ale vytvořeny v nadbytku mohou poškodit biomolekuly, a proto jsou zapleteny do etiologie několika nemocí (9-12). Množství železa v organismu proto musí být pečlivě regulováno, a to zejména na úrovni vstřebávání a distribuce. Na těchto procesech se podílí řada proteinů (2).

Železo se vstřebává zejména v počáteční části tenkého střeva, v duodenu. Lépe se vstřebává železo vázané v hemu (např. jako součást masa) než železité/železnaté ionty v anorganické podobě. V potravě přijímáme denně zhruba 10 mg železa, z nichž se vstřebá asi 10 %. Protože lidské tělo nemá mechanismus, kterým by bylo schopno nadbytečné železo odstranit, je množství železa v organismu regulováno na úrovni jeho vstřebávání. Při nedostatku železa či jeho zvýšené potřebě (růst, těhotenství apod.) se procento resorpce zvýší, při nadbytku se sníží. Porucha těchto regulačních mechanismů vede k patologickým změnám množství železa v organismu - k jeho nedostatku či nadbytku (3).

Absorpce hemového železa je méně známá než absorpce iontů železa v anorganické podobě. Železité ionty musí být nejprve redukovány na železnaté. Tato redukce se uskutečňuje pomocí specifické reduktázy (duodenální cytochrom b) a/nebo reduktantů (např. vitamín C). Po přeměně jsou tyto ionty transportovány přes apikální membránu dvojmocným kovovým transportérem 1 (ang. divalent metal transporter, DMT -1) , který je lokalizovaný na stejné membráně (22). Uvnitř enterocytu může železo zůstat nebo být přeneseno do krve. Za tento děj je zodpovědný jediný známý exportér železa z buňky – ferroportin(2). V krvi se takto přenesené železo váže na transportní protein transferin. Jedna molekula transferinu je schopna přenášet dva atomy železa v trojmocné formě. Při efluxu z enterocytů pomocí ferroportinu se železo musí nejprve oxidovat na trojmocnou formu, tuto oxidaci zajišťuje membránový protein haephastin.

Železo v organismu prochází rozsáhlou recirkulací, větší část železa pro pokrytí denní potřeby (cca 20 mg ve srovnání s 1 až 2 mg železa nově vstřebaného) pochází ze zanikajících stárnoucích červených krvinek, které jsou odstraněny z krve pohlcením makrofágy. Tento děj probíhá především ve slezině. Železo se v makrofázích uvolňuje z hemoglobinu a může v nich být uskladněno či je uvolněno za pomoci ferroportinu do krve, kde se váže rovněž na transferin. Jeho oxidaci na trojmocné železo zajišťuje plasmatický protein ceruloplasmin, který je analogem haepastinu (2).

Výchyt železa buňkou se uskutečňuje pomocí specifických receptorů pro transferin, respektive železo-nesoucí transferin. Je to transferin-receptor 1 (TfR1) nebo cubilin-receptor (4). Vazba železem nasyceného transferinu k TfR1 má za následek endocytózu celého komplexu do endosomů, kde se díky okyselení ATP-dependentní protonovou pumpou železo, transferin a TfR1 uvolní z komplexu (5). Transferinový receptor a transferin jsou recyklovány, TfR1 na povrch buňky a transferin do krve (2). Železité ionty jsou redukovány na železnaté, protože pouze železnaté ionty mohou být transportovány přes membránu do cytoplasmy prostřednictvím zmíněného DMT-1 (5). Další osud železa uvnitř buňky je nejasný. Může být skladováno ve feritinu, přesunuto do mitochondrie, kde může být použito pro syntézu hemu nebo Fe-S klastrů nebo se může stát součástí vnitrobuněčného poolu železa, tj. cytosolického železa nevázaného feritinem (6).

Apoferitin je bílkovina skládající se z 24 lehkých podjednotek (L), které jsou zásadité a kyselých těžkých (H) podjednotek, která má uvnitř jádro, kde je železo uloženo jako hydrát oxidu železitého. Toto jádro může

uskladnit až 4500 atomů železa, ale obvykle jich pojme okolo 2000. Železo prochází ve formě železnatého iontu skrz jeden z 6 průchodů vnitřní dutiny apoferitinu a je oxidováno na iont železitý feroxidasovou aktivitou těžké podjednotky. Jestliže je železo potřebné, může být snadno z feritinu uvolněno, ale přesný mechanismus jeho uvolnění a opětná redukce na železnatou formu ještě není známá (6). Při velkém nadbytku železa může vznikat v buňkách z feritinu pigment hemosiderin, z něhož na rozdíl od feritinu není železo mobilizovatelné v případě potřeby.

Lidé nemají žádný specifický mechanismus pro vylučování železa. Železo je vylučováno pouze exfoliací buněk z enterocytů, ženy mají navíc zvýšené ztráty železa menstruací. Vyloučené množství obvykle odpovídá absorbovanému množství, které je normálně 1-2 mg za den.

V regulaci metabolismu železa na úrovni organismu má klíčovou roli peptid hepcidin a další molekuly, které ovlivňují jeho tvorbu, patří k nim zejména HFE-protein, hemojuvelin (HJV) a transferinový receptor 2 (TfR2). Tyto molekuly se vyskytují především v játrech, která jsou i místem tvorby hepcidinu a která jsou tak orgánem z hlediska železa nejen zásobním, ale i regulačním. Hepcidin snižuje resorpci železa ve střevě, čímž zabraňuje nadbytku železa v organismu. Dále způsobuje zadržení železa v makrofágovém systému. Tyto účinky vedou k poklesu koncentrace železa v plasmě a dlouhodobě k nedostatku železa. Naopak při nedostatku železa množství hepcidinu klesá. Mechanismus účinku hepcidinu spočívá ve vazbě na exportér železa ferroportin, který je následně buňkou pohlcen a

degradován. Buňky tak železo nemohou uvolnit a železo se v nich hromadí (2).

2.2. Patologické stavy spojené primárně s železem

2.2.1. Nedostatek železa

Nedostatek železa vzniká z důvodu nedostatečného příjmu (např. při špatné výživě), špatného vstřebávání (při nemocech trávicího systému) či nadměrných ztrát (krvácení). Nejprve dochází k vyčerpání zásob železa v organismu, poté vznikají projevy jeho nedostatku. Nejvýraznější je nedostatek červených krvinek (anemie) se zvýšenou únavností, bledostí, v těžších případech dušností. Anemií charakterizujeme jako mikrocytární (krvinky jsou menší) a hypochromní (obsahují méně krevního barviva hemoglobinu). Přítomny jsou i změny na kůži, v ústních koutcích, na nehtech a sliznicích (42).

2.2.2. Nadbytek železa

Nadbytek železa je pro organismus škodlivý. Při dlouhodobě zvýšených hladinách železa v organismu dochází k jeho ukládání v některých orgánech a jejich následnému poškození (poškození jater až cirhóza, žláz s vnitřní sekrecí, kardiomyopatie aj.) Nadbytek železa může být geneticky podmíněný nebo získaný. Kromě zvýšeného příjmu a vstřebávání se na něm může podílet i nedostatečná utilizace železa (2).

Dědičné onemocnění s nadměrnou a trvale zvýšenou absorpcí železa ve střevě se nazývá hereditární (genetická) hemochromatóza. Má několik forem podmíněných mutacemi proteinů, které se podílí na metabolismu a vstřebávání železa. Nejčastější je forma podmíněná mutací HFE-proteinu (7). Patří k mírným formám s projevy vznikajícími většinou ve středním věku, častěji u mužů. Dále může být způsobena mutací TfR2, HJV a hepcidinu (velmi vzácně). Poslední dvě formy patří k těžkým onemocněním, s projevy vznikajícími již v mládí - tzv. juvenilní hemochromatóza. U všech těchto forem je zřejmě nedostatečná tvorba hepcidinu, na jehož regulaci se výše uvedené molekuly podílejí. Poněkud odlišná forma je způsobena mutací ferroportinu (2).

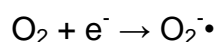
Mezi nejčastější příznaky hemochromatózy patří únava, slabost, apatie, bolesti břicha, svalová bolest, srdeční obtíže, ztráta libida, impotence, poruchy menstruačního cyklu, bolesti kloubů, dýchací obtíže, zvýšená pigmentace kůže, vypadávání vlasů, ubývání hmotnosti. Onemocnění se léčí zejména opakovanými odběry krve, které vedou ke snížení obsahu železa v organismu. K získanému nadbytku železa také vedou např. některé anemie ze zvýšeného rozpadu červených krvinek (tzv. hemolytické anemie) a stavy s nadměrným podáváním transfuzí. V posledním případě se totiž do organismu dostává přímo železo ve formě hemoglobinu, obchází se tak absorpční regulační mechanismus a dochází k akumulaci železa. Typickým případem je léčba β -talasemie. V takových případech se v léčbě uplatňují léky, které železo vyvazují a následně se s ním vylučují z těla, jsou to tzv. chelátory železa (2) – viz kapitola 2.3.

2.2.2.1. Železo a reaktivní formy kyslíku

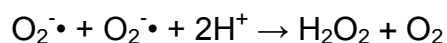
U člověka a ostatních zvířat je za normální situace železo uvězněné specifickými proteiny, které jej vážou a činí je tak nedostupné pro reakce s ROS. Nicméně, při některých patologických dějích dochází k poruše homeostázy železa s jeho mobilizací z těchto proteinů, uvolněné železo se může účastnit redoxních reakcí tvořící ROS. V zásadě, antioxidační systém tvořený jak enzymy (superoxid dismutasa - SOD, katalázy, glutathion peroxidasa - GPX) tak malými antioxidanty jako glutationem, vitamínem C, E, je schopen zabránit šíření ROS. Pokud ale produkce ROS překoná kapacitu antioxidačního systému dochází k tzv. oxidačnímu stresu (8,9,10).

Chemická reakce mezi ROS a volným železem může mít za následek poškození tkání a orgánů. Mezi ROS řadíme superoxid ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($\cdot OH$), alkoxylový radikál ($RO\cdot$), radikál oxidu dusnatého ($NO\cdot$), hydroperoxylový radikál ($HO_2\cdot$) a různé peroxidy lipidů ($RO_2\cdot$) (11).

Superoxid je produkován téměř ve všech aerobních buňkách reakcí:



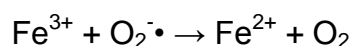
Enzymy SOD jej mění na kyslík:



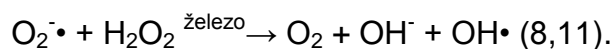
Přítomnost redukčního železa katalyzuje tvorbu hydroxylového radikálu přes Fentonovu reakci:



a superoxid může redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} :



Konečným výsledkem obou chemických reakcí, které mají za následek tvorbu hydroxylového radikálu je tzv. Haber-weisova reakce:



Poškození volným radikálem je považováno za první krok tkáňového poškození u lidských onemocnění (8, 9, 10). U pacientů s přesytností železem přispívá chelatace železa k prevenci poškození způsobené hydroxylovými radikály (12).

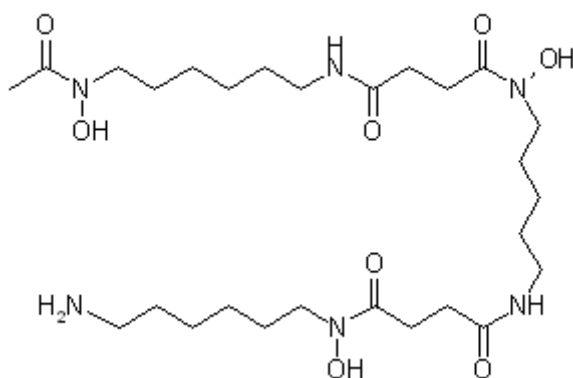
2.3. Chelatace železa

Přetížení železem, jak bylo uvedeno v kapitole 2.2.2., může vést k závažnému poškození orgánů v důsledku hromadění se železa. V současné době je základem léčby tohoto přetížení včasné podání dostatečné dávky chelátoru železa (13).

Železo má koordinační číslo 6, centrální atom železa může navázat až 6 jednovazných ligandů. Výsledkem je osmistěnný chelát (14). Ligandy mající více atomů, které mohou být navázány na centrální atom se nazývají podle jejich počtu dvojjazné, trojjazné a šestivazné. Zvýšená stabilita v chelataci dvojjazných, trojjazných a šestivazných chelátorů nad jednovaznými je dobře dokumentovaná (15). Klinicky nejpoužívanějším chelátorem železa je deferoxamin.

2.3.1. Deferoxamin (DFO)

Deferoxamin (viz.obr.1.) je šestivazný chelátor železa, který byl izolován ze *Streptomyces pilosus* (16). Má vysokou afinitu k Fe^{3+} iontům a tvoří s nimi metabolicky neaktivní komplex v poměru 1:1, který není schopen redoxní aktivity. Následkem toho může DFO snížit přetížení buněk a zmírnit symptomy doprovázené přetížení železem (17). Nicméně vysoce hydrofilní povaha DFO omezuje efektivitu tohoto ligandu. Po perorálním podání je absorpce z gastrointestinálního traktu nízká a jeho plazmatický poločas je jen 12 min kvůli rychlému metabolismu (18). Pro účinnou terapii musí pacient dostávat časté infuze (pravidelné nitrožilní nebo subkutánní) nebo časté intramuskulární injekce, které mohou způsobit bolest a/nebo jiné lokální reakce v místě injekce (19). V současné době je tento chelátor první volbou pro léčení nemocí způsobených přetížením železa jako je terapie pacientů trpících β -talasemií léčených krevními transfúzemi (18, 20).



Obr. č. 1. Deferoxamin

2.3.2. Další klinicky používané chelátory železa

Mezi další chelátory, které jsou používány při přetížení organismu železem patří deferipron (L1, FerriproxTM ,) a deferasirox (Exjade). Oba tyto léky se podávají perorálně a vylučují železo močí a stolicí v chelatované formě (3).

3. Flavonoidy

Flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných polyfenolů. V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny. Přírodní flavonoidy mají nejčastěji podobu O-glykosidů, jejich molekula se tedy dá „rozdělit“ na cukernou a necukernou část (tzv. aglykon) (21). Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem (viz. obr. 2.). Běžně bývají všechny tři kruhy různě substituovány (hydroxyskupiny, methoxyskupiny, ketoskupina v poloze 4). Jednotlivé deriváty dělíme hlavně podle přítomnosti zmíněné 4-keto skupiny, dvojně vazby v poloze 2-3, hydroxyskupiny v poloze 3 a polohy fenylového zbytku na následující základní skupiny: flavanoly (katechiny), flavanony, flavanonoly, flavony, isoflavonoly, flavonoly a anthokyanidiny. Flavonoly jsou nejčastější skupinou flavonoidů zastoupených v ovoci a zelenině (21).

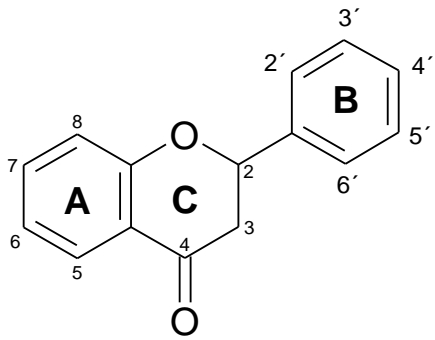
Flavonoidy jsou významnou součástí antioxidantního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé kovové ionty (železo, měď). Jejich antioxidantní aktivita je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace (21). Antioxidantní mechanismus flavonoidů vyplývá ze schopnosti těchto látek přímo reagovat s volnými radikály a také pravděpodobně díky interakci s kovovými ionty, zejména železem případně i mědí. Vzniklé komplexy pak pravděpodobně zabrání účasti těchto redoxně aktivních kovů v produkci ROS (28-30). Jak je uvedeno výše (kapitola

2.2.2.1.) hlavní roli v produkci velmi reaktivního hydroxylového radikálu (HO•) přes Fentonovu a Haber-Weissovu reakci má železo (33,34). Proto chelatace kovových iontů (železa) může být rozhodující v prevenci tvorby radikálů, které poškozují cílové biomolekuly. Flavonoidy jsou běžnou součástí potravy, měly by být tedy velmi dobře tolerovány bez významnějších nežádoucích účinků a v případě vysoké účinnosti by mohly nahradit současně používané chelátory železa, jejichž podávání má nízkou compliance (35).

Ukazuje se, že přírodní flavonoidy s popsányými antioxidačními vlastnostmi mohou významným způsobem působit při prevenci chorob majících svůj původ v oxidačním poškození biologických struktur (ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění, nádorová onemocnění). Ukazuje se ale, že zvýšení příjmu komplexů antioxidantů je vhodnější než podávání samotných antioxidačních preparátů jako je vitamín C a E (21).

O flavonoidy je také zájem díky jejich farmakologickým efektům jako je vasodilatační, protizánětlivý, antivirotický, antifungální, antihepatotoxický, protialergický a antiosteoporotický účinek (26). Mnoho z těchto farmakologických efektů flavonoidů souvisí s jejich interakcí s enzymy a s jejich antioxidační aktivitou (27).

Největší množství flavonoidů se nachází v luštěninách, sóji, ořeších a semenech, koření, ale i v čaji (zejména zeleném), kávě a nebo v červeném víně. Denně je možno přijmout v potravě okolo 23mg flavonoidů (24, 25).



Obr.č.2. Základní struktura flavonoidů

Flavonoidy jsou deriváty 2-fenyl-1,4-benzopyronu

4. Experimentální část

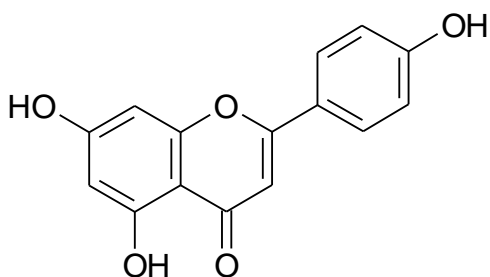
4.1. Cíl práce

Tato diplomová práce měla hlavní dva cíle: i) vytvořit a standardizovat postup pro screening látek s potenciálem chelatovat železo a ii) na malém vzorku různých flavonoidů stanovit základní strukturní součásti těchto sloučenin nutné pro chelataci železa.

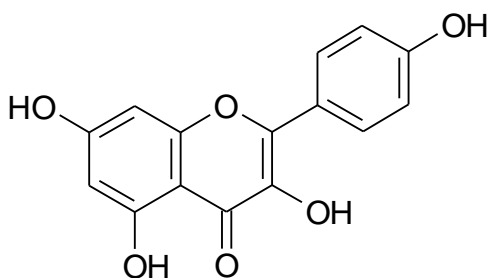
5. Materiál a metodika

5.1. Použité chemikálie

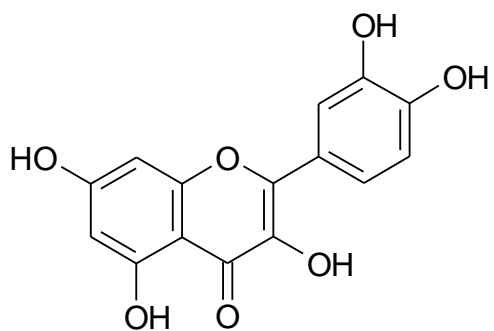
Síran železnatý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), chlorid železitý ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ferozin (sodná sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové kyseliny), flavonoidy (flavon - apigenin, flavonoly - kaempferol, quercetin, rutin, flavanony - hesperetin, hesperidin, naringenin, naringin, flavanol – katechin) (viz.obr.3-11), dimethylsulfoxid (DMSO), methanol, hydroxylamin chlorid (HA) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Německo).



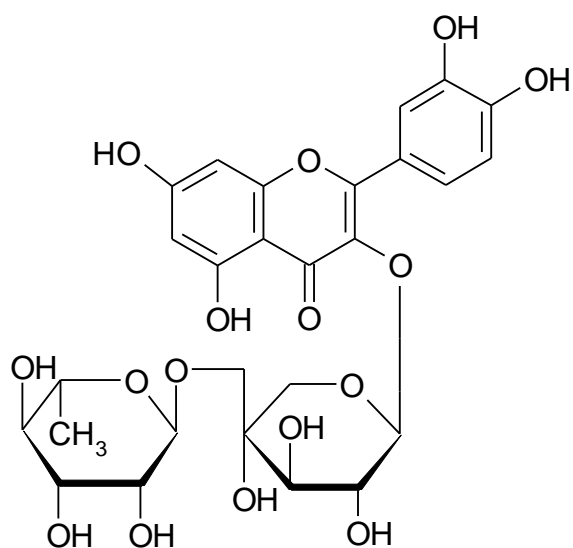
Obr.č.3. Strukturní vzorec apigeninu



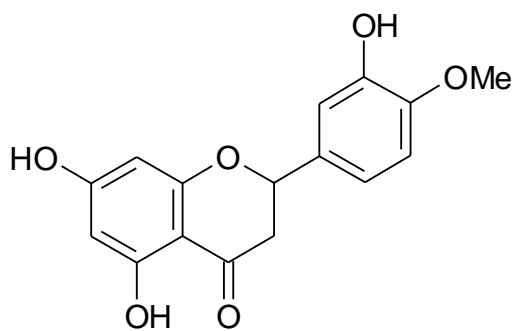
Obr.č.4. Strukturní vzorec kaempferolu



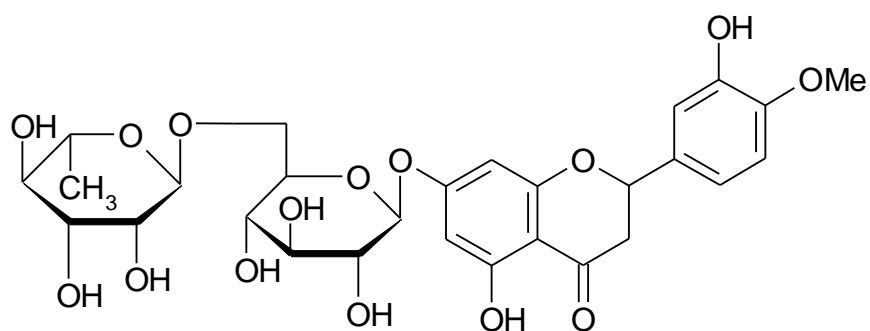
Obr.č.5. Strukturní vzorec quercetinu



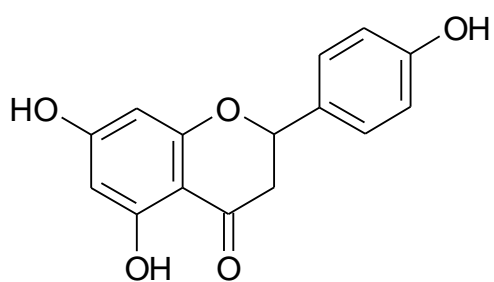
Obr.č.6. Strukturní vzorec rutinu



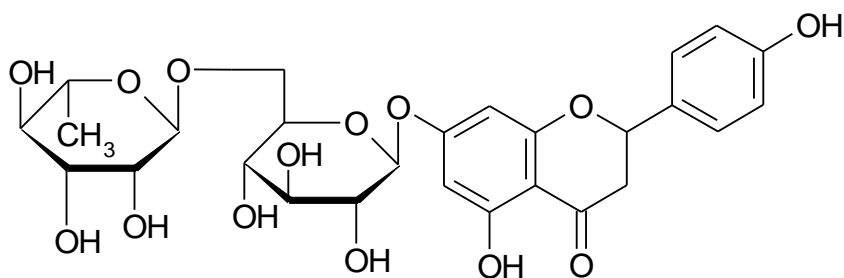
Obr.č.7. Strukturní vzorec hesperetinu



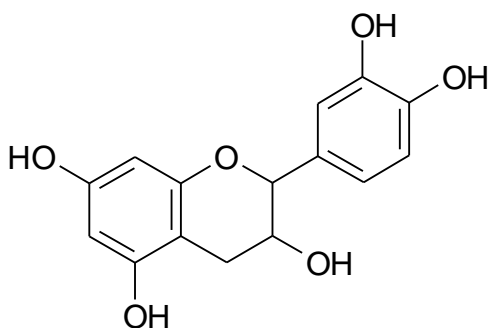
Obr.č.8. Strukturní vzorec hesperidinu



Obr.č.9. Strukturní vzorec naringenin



Obr.č.10. Strukturní vzorec naringinu



Obr.č.11. Strukturní vzorec katechinu

5.2. Přístroj

Všechna měření byla uskutečněna na spektrofotometru Anthos reader 2010 (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Rakousko)

5.3. Postup

5.3.1. Příprava zásobních roztoků

a) ferozin 5mM v destilované vodě (Mw= 492,5 g/mol)

b) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5mM v destilované vodě ($M_w = 207,3 \text{ g/mol}$) – zásobní roztok Fe^{3+}

c) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mM v destilované vodě ($M_w = 278,02 \text{ g/mol}$) – zásobní roztok Fe^{2+}

d) HA 10mM v destilované vodě ($M_w = 69,49 \text{ g/mol}$)

5.3.2. Kalibrace železnatých iontů

Kalibrační křivka (viz.obr.12) byla připravována podle tab.č.1. Ze zásobního roztoku síranu železnatého byly naředěny rozdílné koncentrace železnatých iontů (v rozmezí 0-150 μM v destilované vodě). Tyto roztoky byly napipetovány v množství 50 μl na 96-jamkovou mikrodestičku. Postupně k nim bylo připipetováno rozpouštědlo (podle testované sloučeniny – metanol, DMSO nebo voda) v objemu 150 μl . K jedné polovině byl přidán roztok ferozinu (50 μl), ke druhé polovině vzorků voda (slepý vzorek).

Po 5 minutách byla změřena absorbance při 562 nm na uvedeném přístroji.

Kalibrace roztoku železa					
Koncentrace přidaných železnatých iontů / μM /	150	125	75	50	0
Finální koncentrace železnatých iontů / μM /	30	25	15	10	0
Absorbance					

Tabulka č.1. Formulář pro kalibrační křivku železnatých iontů.

5.3.3. Stanovení optimálního prostředí pro redukci železitých iontů

1. Na mikrodestičku byla nejdříve nepipetována různá rozpouštědla v objemu 100 μl (4 vzorky pro každé rozpouštědlo).
2. Ke všem vzorkům bylo přidáno 50 μl Fe^{3+} iontů o koncentraci 250 μM a 50 μl 10mM roztoku HA.
3. Směs byla míchána po dobu 2 minut.
4. K jedné polovině vzorků bylo přidáno 50 μl ferrozinu do druhé poloviny vzorků bylo přidáno pouze 50 μl destilované vody.
5. Okamžité změření absorbance při 562 nm.

5.3.4. Stanovení optimální koncentrace hydroxylaminu pro redukci železitých iontů

1. Na mikrodestičku bylo napipetováno 100 μl vody do všech vzorků.
2. Ke všem vzorkům bylo přidáno 50 μl Fe^{3+} iontů o koncentraci 250 μM .
3. Poté bylo přidáno 50 μl různých koncentrací HA (4 vzorky pro jednu koncentraci).
4. Směs byla míchána po dobu 2 minut.
5. Do jedné poloviny bylo přidáno 50 μl ferrozinu do druhé poloviny vzorků bylo přidáno 50 μl destilované vody.
6. Okamžité změření absorbance při 562 nm

5.3.5. Měření chelatace železnatých iontů

1. Ze zásobního roztoku železnatých iontů byl připraven testovací roztok železa o koncentraci 250 μM .
2. Příprava roztoků chelátorů železa - obvykle 10-1-0,1-0,01mM v DMSO, jen v případě deferoxaminu v destilované vodě.
3. Chelatační test v mikrodestičkách (viz.tab.č.2)
 - smíchání 150 μl roztoku chelátoru s 50 μl roztoku železa (4 vzorky). Pro slepý vzorek (chelátor 0) bylo použito rozpouštědlo chelátoru (DMSO, případně voda).
 - směs byla míchána po dobu 2 minut

- bylo přidáno 50 μl ferozinu do poloviny vzorků, do zbývající poloviny bylo napipetováno 50 μl destilované vody.

koncentrace chelátoru	Přidána /mM/	10	0,1	0,01	0,001	0
	Finální / μM /	6000	60	6	0,6	0
Absorbance ferozinem	směsi s					
Absorbance (bez ferozinu)	směsi s vodou					

Tabulka č.2. Formulář pro stanovení chelatace železnatých iontů.

- Absorbance byla změřena při 562 nm okamžitě a po 5 minutách.

5.3.6. Změření schopnosti vázat celkové železo.

Tato metoda měří schopnost látky chelatovat jak železnaté, tak železité ionty.

1. Příprava roztoků chelátorů železa – obvykle 10-1-0,1mM ve vodě nebo v DMSO.
2. Chelatační test (viz.tab. 3)
 - napipetování 100 μl roztoku chelátoru (pro koncentraci = 0, rozpouštědlo)
 - příprava čerstvého roztoku 250 μM Fe^{3+} ze zásobního roztoku
 - přidání 50 μl roztoku Fe^{3+} do všech vzorků kromě kontrolního vzorku, kde byla napipetována stejná koncentrace a stejné množství Fe^{2+} iontů

- směs byla míchána po dobu 2 minut
- přidání 50 μ l HA do všech vzorků
- přidání 50 μ l roztoku ferozinu do dvou stejných vzorků a 50 μ l vody do zbývajících (slepý vzorek)
- okamžité změření absorbance při 562 nm
- měření absorbance po 5 minutách při 562 nm

Koncentrace testovaného roztoku /mM/	10	1	0,1	0	kontrolní
Absorbance směsi s ferozinem	X	X	X	X	X
Absorbance směsi s vodou (bez ferozinu) – slepý vzorek	X	X	X	X	X

Tabulka č.3. Chelatace celkového železa



testované řádky



c chelátoru = 0, místo chelátoru použití vhodného rozpouštědla

(voda nebo DMSO)



kontrolní vzorky s Fe^{2+}

X roztok ferozinu

X voda

5.4 Statistická analýza

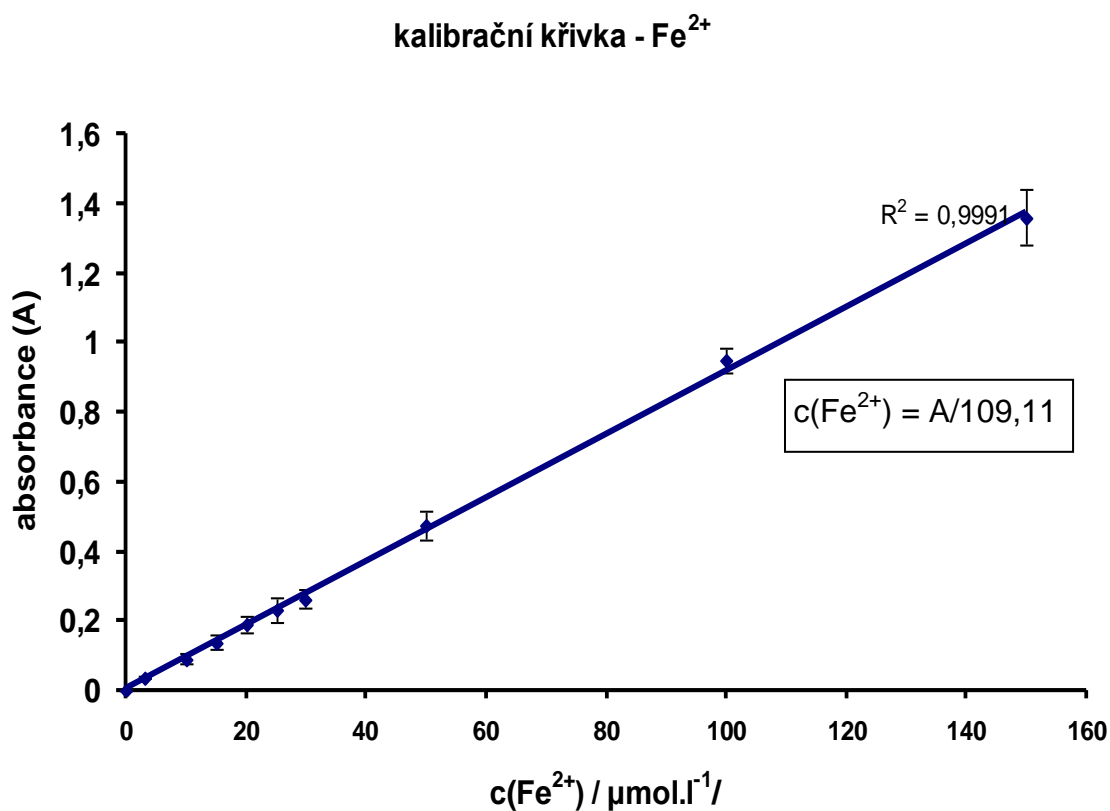
Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm standardní odchylka

(vypočítaná podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$). Při srovnání účinnosti jednotlivých chelátorů byl využit test ANOVA s Bonferroniho post-testem za pomoci programu GraphPad Prism verze 4.00 pro Windows, GraphPad Software (San Diego California USA).

6. Výsledky

6.1. Standardizace postupu pro chelataci železa

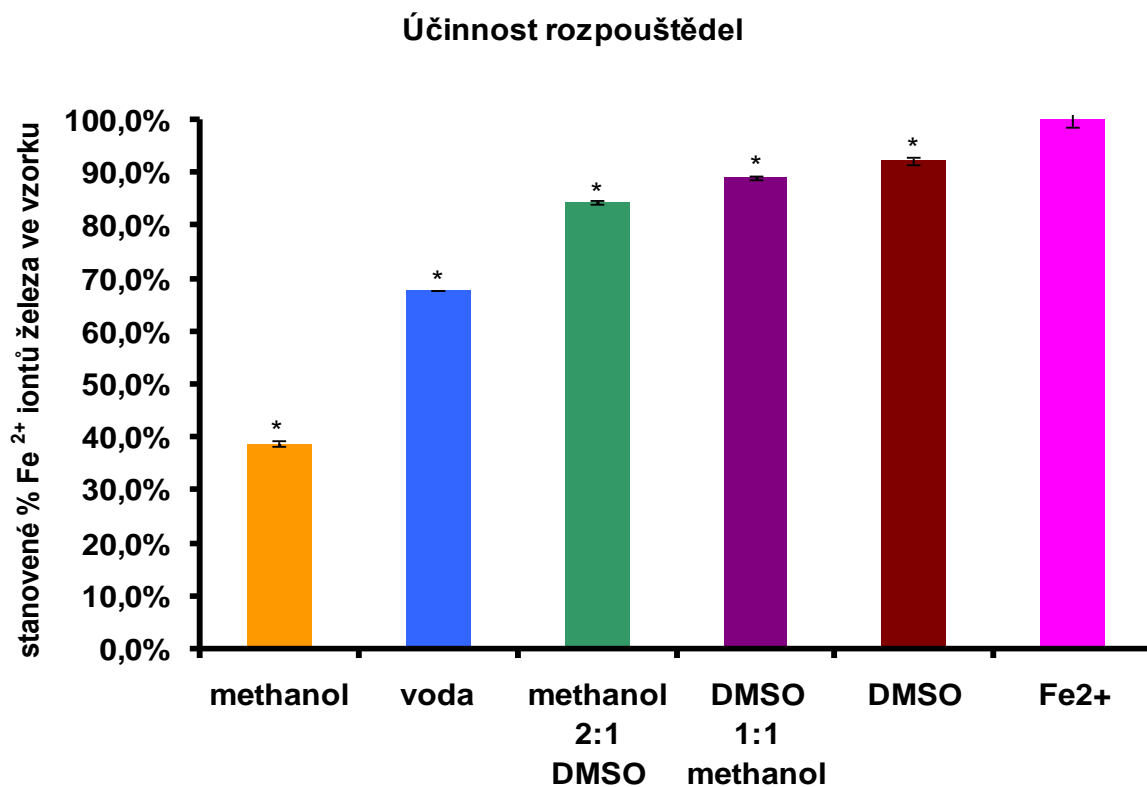
Nejprve byla stanovena kalibrační křivka (viz.obr.12.)



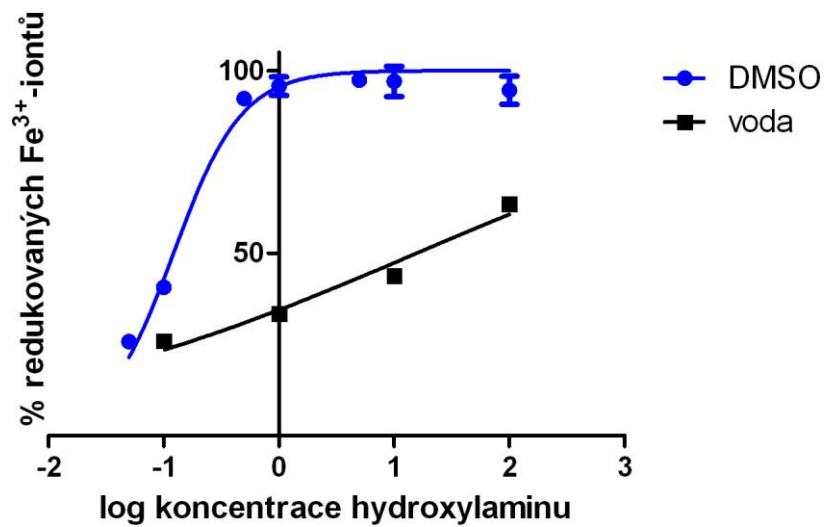
Obr.č.12. Kalibrační křivka železnatých iontů zobrazuje závislost absorbance (A) na finální koncentraci železnatých iontů /c(Fe²⁺)/

Poté bylo stanoveno vhodné prostředí pro cheletaci železitých iontů

(viz.obr.13.) a stanovena optimální koncentrace HA (viz.obr.14.).



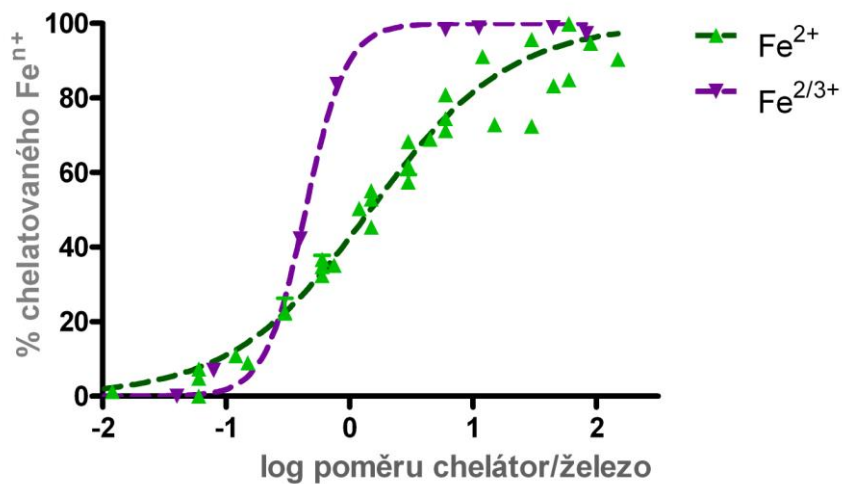
Obr.č.13. Porovnání redukce železitých iontů v různých rozpouštědlech s kontrolním vzorkem železnatých iontů. Železnaté ionty byly stanoveny jak v DMSO, tak ve vodě.



Obr.č.14. Stanovení optimální koncentrace HA

Byla porovnána chelatace Fe²⁺ a Fe^{2/3+} iontů deferoxaminem (viz.obr.15.)

DEFEROXAMIN ve vodě

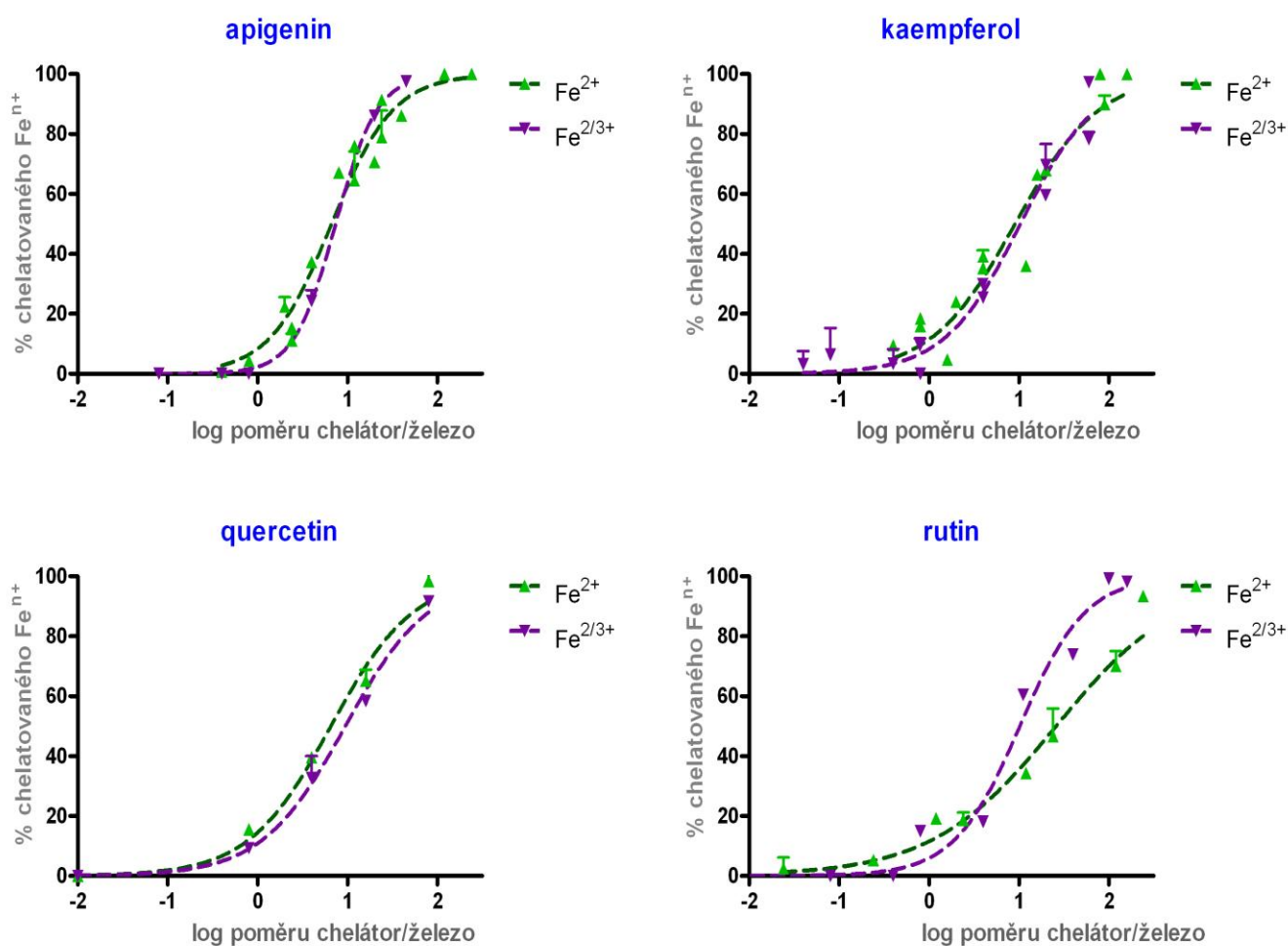


Obr.č.15. Chelatace železnatých a celkových iontů deferoxaminem.

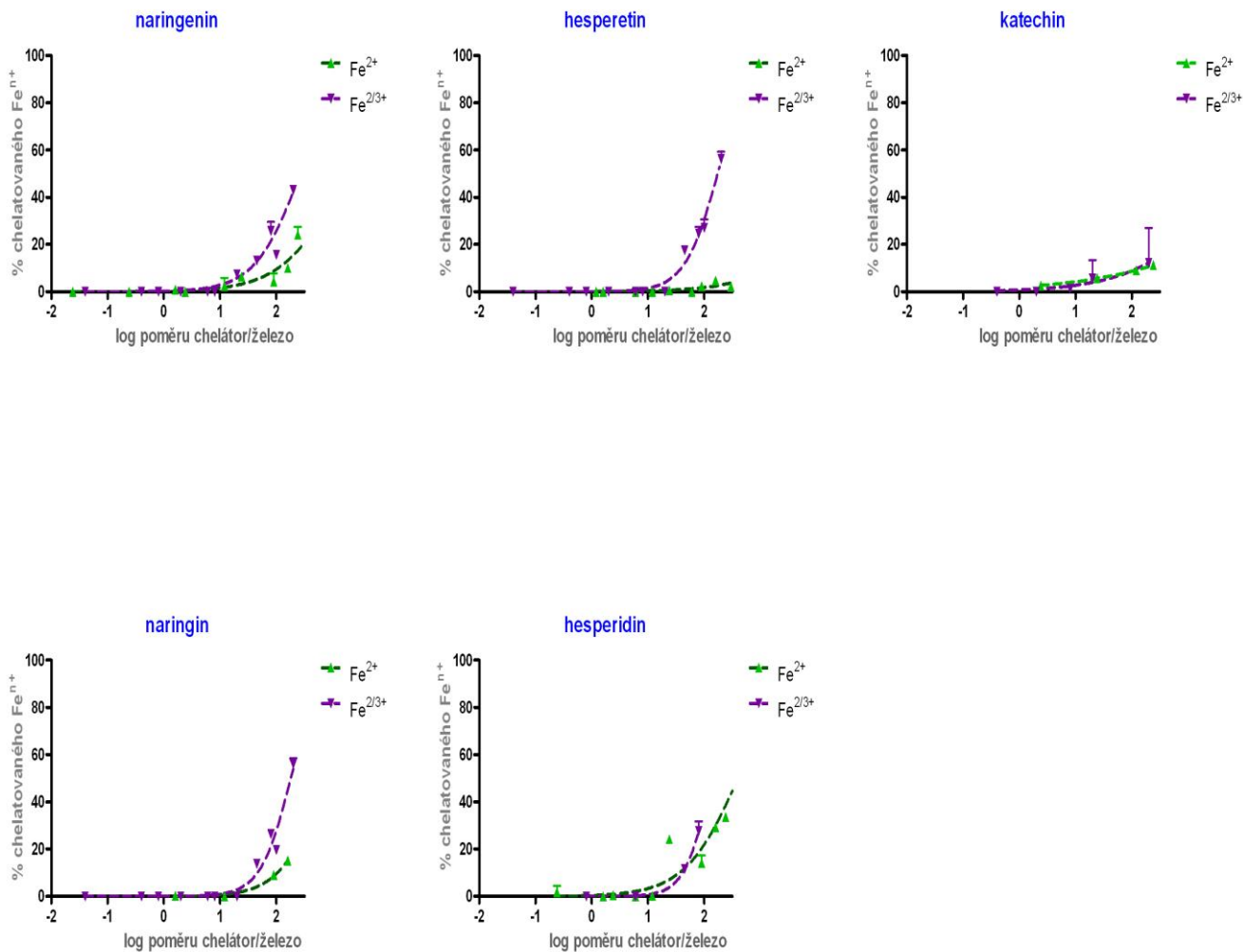
6.2. Stanovení chelatační účinnosti vybraných flavonoidů

flavonoidů

Byla stanovena chelatační účinnost vybraných flavonoidů (viz.obr.16,17.) a procentualně srovnána (viz.obr.18.)

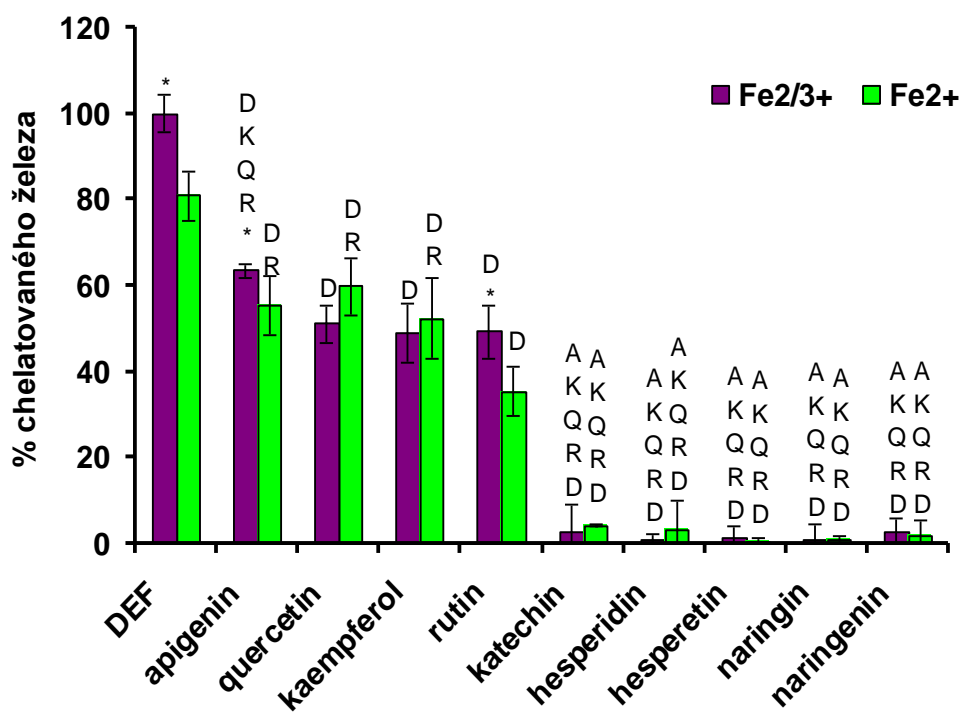


Obr.č.16. Účinné flavonoidy – látky mající společnou 5-OH, 4-oxoskupinu a 2-3 dvojnou vazbu



Obr.č.17. Slabě účinné flavonoidy – nemají 2-3 dvojnou vazbu

poměr koncentrace chelátor:železa 10:1



Obr.č.18. Procentuální srovnání účinnosti chelátorů. Statistická významnost $p < 0.001$, Symboly A: vs apigenin, Q: vs quercetin, K: vs kaempferol, R: vs rutin, D: vs deferoxamin, *: celkové železo ($Fe^{2/3+}$) vs Fe^{2+}

7. Diskuze

Ferozin je indikátor, který má vysokou afinitu k Fe^{2+} iontům, tvoří s nimi stabilní komplex s vysokým extinkčním koeficientem při 562nm (23). Při zkoušení chelatační aktivity flavonoidů byla vybrána právě metodika využívající ferozin jako indikátor. Byla ověřena lineární závislost s vysokou hodnotou spolehlivosti ($R^2 = 0,9991$) mezi koncentrací Fe^{2+} iontů a absorbcí (viz.obr.12). Ferozinová metoda byla modifikována a standardizována pro stanovení chelatace celkových iontů železa. Je známo, že Fe^{3+} ionty nejsou ve vodném roztoku dobře rozpustné, pravděpodobně tvoří komplexy s molekulami vody, a dochází k tvorbě oxidu železitého (41). Z tohoto důvodu je voda nevhodné prostředí pro redukci všech Fe^{3+} iontů, jak bylo prokázáno i v této DP (viz.obr.č.13). Mnohem vhodnějším rozpouštědlem Fe^{3+} iontů byl DMSO. V tomto prostředí dochází k redukci 90% železitých iontů na železnaté při použití vhodného redukujícího činidla. Jako redukující činidlo byl vybrán hydroxylamin. Byla stanovena jeho ideální koncentrace pro redukci Fe^{3+} iontů, která byla 10mM (viz.obr.14). Při stanovení chelatace celkových iontů železa je nutné nejprve zredukovat Fe^{3+} ionty, které zůstanou nezchelatovány po přidání chelátoru, a tyto zredukované Fe^{2+} ionty jsou poté stanoveny pomocí ferozinu. Z tohoto důvodu, je možné danou metodikou podat informace o chelataci celkových a Fe^{2+} iontů železa, ale není možné stanovit kolik iontů Fe^{3+} bylo chelatováno.

Nejúčinnějším chelátorem jak celkových tak železnatých iontů se ukázal klinicky používaný deferoxamin. Ze zkoušených flavonoidů měl

největší chelatační aktivitu apigenin následovaný quercetinem s kaempferolem a rutinem. Metabolity, které se ukázaly prakticky neúčinné jsou katechin, hesperetin, hesperidin, naringin a naringenin. Předchozí studie provedené různými metodikami (ultrafialové spektroskopie, elektrosprejové ionizace hmotnostní spektrometrie - ESI-MS) poukazují na nutné předpoklady pro chelataci iontů železa flavonoidy (36, 37). Komplex železa s daným flavonoidem pravděpodobně vznikne mezi hydroxyskupinou v poloze 5 a oxoskupinou v poloze 4 nebo hydroxyskupinou v poloze 3 a oxoskupinou v poloze 4 (36, 37) .

Výsledky této DP jsou v souladu s těmito nálezy v odborných publikacích. Při porovnání účinnosti flavonoidů z hlediska struktury (viz. kapitola 3.1.) vyplývá, že chelatační aktivitu nalézáme u těch flavonoidů, které mají v poloze 2-3 dvojnou vazbu, 3 nebo 5-hydroxyskupinu a 4-ketoskupinu. Jedná se o apigenin, kaempferol, quercetin a jeho glykosid rutin, který má sice svou cukernou část navázanou na hydroxyskupinu v poloze 3 kruhu C, ale hydroxyskupinu v poloze 5 má volnou. Při porovnání chelatační aktivity posledních dvou zmíněných látek nebyl zjištěn rozdíl v celkové chelataci železa ukazující na pravděpodobné chelatační místo mezi 5-hydroxy a 4-ketoskupinou. 3-OH skupina může mít spíše negativní vliv v přítomnosti 5-OH a 4-keto-uskupení, jak se dá usoudit z výsledků: - neúčinnější ze zkoušených flavonoidů apigenin nemá 3-OH skupinu na rozdíl od quercetinu a kaempferolu, a přesto je jeho účinnost vyšší než u těchto flavonoidů mající komplexní 3,5-hydroxyskupiny a 4-ketoskupinu. Při srovnání účinnosti kaempferolu a quercetinu, kteří se liší pouze v katecholové

skupině vidíme, že jejich chelatační aktivita je prakticky stejná, z toho vyplývá, že katecholová skupina kruhu B nehraje v chelataci železa za testovaných podmínek žádnou roli. V souladu s tímto zjištěním, byla chelatační aktivita katechinu, který má zmíněnou katecholovou skupinu, prakticky nulová. Další zkoušené flavonoidy (hesperidin, naringin) obsahující ve své molekule glykosidicky navázaný cukr na hydroxyskupinu v poloze 7 kruhu A vykazují minimální aktivitu v chelataci železa, stejně jako jejich aglykony (hesperetin, naringenin). Žádný z těchto flavonoidů nemá v poloze 2-3 dvojnou vazbu. Z toho vyplývá nezbytnost dvojně vazby v poloze 2-3 pro chelatační aktivitu flavonoidů.

Některé studie vysvětlují chelatační aktivitu flavonoidů jejich schopností redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} před jejich navázáním (37, 39). Flavonoidy s redukční aktivitou jsou ty s dvojnou vazbou v poloze 2-3, katecholovou skupinou na B kruhu a hydroxyskupinou v poloze 3 (38). Toto ale není pravděpodobné u molekuly apigeninu, který postrádá hydroxyskupinu v poloze 3 a skupinu katecholovou. Skutečně studie ukázaly, že apigenin postrádající výše zmíněné předpoklady pro redukční aktivitu, není schopen redukce (40).

8. Závěr

V rámci této DP byla upravena a standardizována metodika pro chelataci železnatých a celkových iontů železa pomocí indikátoru železnatých iontů ferrozinu. V případě stanovení chelatace celkového železa je nutné použít jako rozpouštědlo DMSO a HA o koncentraci 10mM k dosažení uspokojivé redukce.

Nejúčinnějším chelátorem se ukázal známý a klinicky používaný deferoxamin. Ze zkoušených flavonoidů má největší chelatační aktivitu apigenin. Metabolity, které se ukázaly prakticky neúčinné jsou katechin, hesperetin, hesperidin, naringin a naringenin. Závěrem lze z této studie usoudit že, pro chelatační aktivitu v těchto podmínkách je nutná přítomnost hydroxyskupiny v poloze 5, případně v poloze 3, oxoskupina v poloze 4 a dvojná vazba v poloze 2-3.

Seznam zkratek:

DFO – deferoxamin

DMSO – dimethylsulfoxid

DMT-1 – dvojmocný kovový transportér 1

GPX – glutathion peroxidasa

HA – hydroxylamin chlorid

HJV – hemojuvelin

ROS – reaktivní formy kyslíku

SOD – superoxid dismutasa

TfR1 – transferinový receptor 1

TfR2 - transferinový receptor 2

Seznam použité literatury:

1. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999;341(26): 1986–95. Erratum in: *N Engl J Med* 2000;342(5):364.
2. Mladenka P, Hrdina R, Hübl M, Simůnek T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 2005;48(3-4):127-35
3. Liu D. Y. Liu Z. U. Hider, R. C. *Best Prac. Res. Clin.Haemtol.* 2002, 15(2), 369-384.
4. Kozyraki R, Fyfe J, Verroust PJ et al. Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(22):12491–6.
5. Gaber BP, Aisen P. Is divalent iron bound to transferrin? *Biochim Biophys Acta* 1970;221(2):228–33.
6. Jacobs A, Worwood M. Ferritin in serum. Clinical and biochemical implications. *N Engl J Med* 1975;292(18):951–6.
7. Camaschella C, Roetto A, Cali A et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000;25(1):14–5.
8. Voest E. E.; Vreugdenhil, G.; Marx, J. J. M. Iron-Chelating Agents in Non-Iron Overload Conditions. *Ann. Intern.Med.* 1994, 120, 490-499.
9. Galey J. P. Recent Advances in the Design of Iron Chelators Against Oxidative Damane, *Mini Rev. Med. Chem.* 2001, 1(5), 233-242.

10. Weinberg, E. D. J. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. *Pharm. Pharmacol.* 2001, 53(10), 1303-1310.
11. Gutteridge, J. M.; Halliwell, B. in *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*, Gilbert, Daniel, L., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers. 1999, 189-218.
12. Yegorov, D. Y.; Kozlov, A. V.; Azizova, O. A.; Vladimirov, Y. A. Simultaneous determination of Fe(III) and Fe(II) in water solutions and tissue homogenates using Desferal and 1,10-phenanthroline. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, 15(6), 565-574.
13. Oficiální stránky České lékařské společnosti J.E.Purkyně: www.clsjep.cz
14. Liu ZD and Hider RC. Design of iron chelators with therapeutic application. *Coord Chem Rev*, 2002, 232:151–171.
15. Davies, J. A. *Synthetic Coordination Chemistry: Principles and Practice*, World Scientific Pub. Co.; Singapore, 1997.
16. Bickel, H.; Hall, G. E.; Keller-Schierlein, W.; Prelog, V.; Vischer, E.; Wettstein, A. The total synthesis of desferrioxamines E and G. *Helv. Chim. Acta* 1960, 43, 2129-2138.
17. Olivieri NF a Brittenham GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997; 89: 739-761
18. Aouad F, Florence A, Zhang Y, Collins F, Henry C, Ward RJ, and Crichton RR. Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorg Chim Acta*, 2002, 339:470–480.

19. Hedlund, B. E.; Hallaway, P. E.; Panter, S. S.; Eaton, J. W.
Composition for the stabilization of deferoxamine to chelate free ions
in physiological fluid. US Patent. 1993, 217,998
20. Brittenham GM. Iron chelators and iron toxicity. *Alkohol*. 2003,
30:151–158.
21. Oficiální stránky Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
(zemědělská fakulta): www.home.zf.jcu.cz
22. Raja KB, Simpson RJ, Peters TJ. Investigation of a role for reduction
in ferric iron uptake by mouse duodenum. *Biochim Biophys Acta*.
1992;1135(2):141–6.
23. Stookey, L.L. “Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron”,
Anal. Chem. 1970, 42, 779–781.
24. Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. “Content of
potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits
commonly consumed in The Netherlands”, *J. Agric. Food Chem.* 1992,
40, 2379–2383.
25. Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. and van de Putte, B. “Content of
potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit
juices”, *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1242–1246.
26. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A. and Capasso, F. “Flavonoids: old
and new aspects of a class of natural therapeutic drugs”, *Life Sci.*
1999, 65, 337–353.

27. Filipe, P., Lanc¸a, V., Silva, J.N., Morlie`re, P., Santus, R. and Fernandes, A. "Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress", *Mol. Cell. Biochem.* 2001, 221, 79–87.
28. Afanas'ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A. and Potapovitch, A.I. "Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation", *Biochem. Pharmacol.* 1989, 38, 1763–1769.
29. I. Morel, G. Lescoat, P. Cillard, J. Cillard, Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods Enzymol.* 1994, 234, 437–443.
30. Miller, N.J., Castelluccio, C., Tijburg, L. and Rice-Evans, C. "The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters—radical scavengers or metal chelators?", *FEBS Lett.* 1996, 392, 40–44.
31. Suzuki, Y.J., Forman, H.J. and Sevanian, A. "Oxidants as stimulators of signal transduction", *Free Radic. Biol. Med.* 1997, 22, 269–285.
32. Babior, M.B. "Phagocytes and oxidative stress", *Am. J. Med.* 2000, 109, 33–44.
33. McCord, J.M. and Day, Jr, E.D. "Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalysed by iron-EDTA complex", *FEBS Lett.* 1978, 86, 139–142.
34. Halliwell, B. "Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates", *FEBS Lett.* 1978, 92, 321–326.
35. Arouma O., Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20, 675–705.

36. Morel, I., Cillard, P. and Cillard, J. "Flavonoid–metal interactions in biological systems", In: Rice-Evans, C. and Packer, L., eds, *Flavonoids in Health and Disease* (Marcel Dekker, New York), 1998, pp 163–177.
37. Fernandez, M.T., Silva, M.M., Mira, L., Florencio, M.H., Gill, A. and Jennings, K.R. "Iron and copper complexation by angiotensin-converting enzyme inhibitors. A study by ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry", *J. Inorg. Biochem.* 1998, 71, 93–98.
38. Hotta, H., Sakamoto, H., Nagano, S., Osakai, T. and Tsujino, Y. "Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants", *Biochim. Biophys. Acta.* 2001, 1526, 159–167.
39. Koppenol, W.H. "The centennial of the Fenton reaction", *Free Radic. Res.* 1993, 15, 645–651.
40. Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 18;1721(1-3):174-84
41. Crichton, R.R. and Ward, R.J. "Structure and molecular biology of iron binding proteins and the regulation of "free" iron pools", In: Lauffer, R.B., ed, *Iron and Human Disease* (CRC Press, Boca Raton, FL), 1992, pp. 23–75.
42. Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Antoniadi G, Kartsios C, Stefanidis I. The role of hepcidin in iron homeostasis and anemia in hemodialysis patients. *22(1):70-7*