

TOXIKOLOGICKÝ VÝZNAM ATÓMOV ŽELEZA A MEDI A ICH VZŤAH K REAKTÍVNYM METABOLITOM KYSLÍKA

ĎURAČKOVÁ Z.

TOXICOLOGIC IMPORTANCE OF IRON AND COPPER ATOMS AND THEIR RELATION TO REACTIVE OXYGEN METABOLITES

Free radicals are, on the one hand, necessary for the physiological function of some systems but, on the other hand, they play an important pathologic role. The formation of free radicals can be the result of various conditions and can initiate various diseases. Their formation may also be a consequence of certain pathological state of the organism. In this way generated free radicals can cause in the secondary to the damage organism.

The metabolism of free radicals is significantly influenced by transition metals. These metals are present in the organism at given oxidative state chelated in the proteins. In this form the metalloproteins to have unique catalytical and redox properties. The transition metals are a part of an active centre of many enzymes. Iron and copper are the predominant transition metals in human organism. These metals are vitally important, but if present in high concentration, in unsuitable oxidative state and at improper site, they can catalyse the formation of highly toxic reactive metabolites of oxygen, for example hydroxyl radicals. The toxic damage may be direct if the metals are present in high oxidative state Fe(IV) or Fe(V). These "ferryl" compounds are strong prooxidants.

The organism maintains the iron metabolism in equilibrium. If the iron plasma concentration reaches 40 $\mu\text{mol/L}$, it is a sign, that iron is released from physiological protein structures and forms so called "catalytically active iron". In this form iron can be involved in Fenton reaction in which hydroxyl radical is formed.

The article discussed the toxic effect of "catalytically" active iron at a given oxidative state with its influence on some diseases. (Tab. 2, Fig. 3, Ref. 30.)

Key words: iron, copper, toxicology, oxidative reactive metabolites.

Bratisl Lek Listy 1998; 99: 351–358

Volné radikály sú na jednej strane nevyhnutné pre správnu funkciu niektorých systémov, ale na druhej strane majú aj významnú toxikologickú úlohu. Volné radikály sa môžu v organizme tvoriť rôznymi príčinami a vyvolávať mnohé ochorenia. Ich tvorba môže byť aj dôsledok určitého patologického stavu organizmu. Takto tvorené voľné radikály a reaktívne metabolity kyslíka spôsobujú sekundárne poškodenia organizmu.

Do metabolismu voľných radikálov významne zasahujú prechodné prvky. Tieto kovy sa v organizme vyskytujú v určitom oxidačnom stupni chelátovo viazané v proteínoch, ktorým týmto dávajú jedinečné katalytické a redoxné vlastnosti. Sú súčasou aktívneho centra mnohých enzýmov. Ľudský organizmus z prechodných kovov obsahuje najviac železa a medi. Tieto prvky sú na jednej strane životne dôležité, ale ak sú prítomné vo zvýšenej koncentrácii, v nevhodnom oxidačnom stupni a na nesprávnom mieste, môžu katalyzovať tvorbu vysokotoxických reaktívnych metabolitov kyslíka, napr. hydroxylového radikálu. Môžu toxicky poškodzovať aj priamo, ak sa vyskytujú vo vyšších oxidačných stupňoch, napr. Fe(IV) alebo Fe(V). Tieto ferylové zlúčeniny sú silno prooxidatívne.

Organizmus veľmi starostlivo udržiava rovnováhu v metabolizme železa. Ak koncentrácia železa v plazme stúpne na 40 $\mu\text{mol/L}$ plazmy, môže sa predpokladať, že sa v organizme vyskytuje železo uvoľnené z fyziologických proteínových štruktúr a tvorí tzv. katalyticky účinné železo, ktoré môže vstupovať do Fentonovej reakcie a tvoriť hydroxylový radikál.

V práci sa diskutuje o toxikologickom účinku katalyticky účinných atómov železa v danom oxidačnom stupni s jeho vplyvom na niektoré ochorenia. (Tab. 2, obr. 3, lit. 30.)

Kľúčové slová: železo, meď, toxikológia, reaktívne metabolity kyslíka.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 7, s. 351–358

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave

The Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava

Address for correspondence: Z. Ďuračková, Ing, PhD, Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, Sasinkova 4, 813 72 Bratislava, Slovakia.

Phone: +421.7.5357411 Fax: +421.7.5357557 Internet: durackova@fmed.uniba.sk

Anorganická biochémia (bioanorganická chémia) je v posledných rokoch veľmi intenzívne rozvíjané interdisciplinárne odvetvie prírodných vied, ktoré priťahuje vedcov z rôznych odborov, ako je biológia, fyzika, farmakológia aj medicína. Z tejto oblasti sú významné štúdie prírodných makromolekulových látok s naviazanými atómami kovov v určitom oxidačnom stupni, ako aj modelové systémy nízkomolekulových zlúčenín, s ktorými sa in-

teragujú ióny kovov, čím tieto zlúčeniny nadobúdajú významnú biologickú funkciu.

Kovy vďaka svojim špecifickým vlastnostiam, ako aj kofaktory obsahujúce kov dodávajú proteínom jedinečné katalytické a redoxné vlastnosti. Naopak, proteín môže svojou neobvyklou štruktúrou stabilizovať určitý oxidačný stupeň kovu. Táto funkčná a štruktúrna medzihra robí z metaloproteínov fascinujúce objekty skúmania. Význam interakcie kov—proteín je zaujímavý práve z biologického hľadiska. Biologicky významné aktivity preukazujú kovové prvky oboch skupín periodickej tabuľky A aj B. Napríklad (i) ión vápnika môže stabilizovať proteín a sprostredkovať interakciu proteínu s membránou; (ii) horčík je stabilizujúcim kofaktorom konformácie a ovplyvňuje jej redoxné vlastnosti; (iii) prechodné kovy sú redoxne aktívne prvky v peroxidázach, oxidázach a elektrónovotransportných bielkovinách; (iv) zinok môže polarizovať ligand v hydrolázach; (v) molybdén je osobitným katalyzátorom prenosu dvoch elektrónov v oxidázach (Huber, 1997).

Atómy všetkých prvkov prvého prechodného rádu Mendelejevovej periodickej tabuľky (*d*-prvky) obsahujú nespárený elektrón (okrem zinku), a preto sa môžu formálne označiť ako radikály. Meď má plne obsadené 3-*d* orbitály, preto celkom nevhovuje definícii prechodných prvkov. Ak sa však vyskytuje vo forme Cu^{2+} iónu, kedy stratí dva elektróny, jeden z 4*s*- a jeden z 3*d*-orbitálu, má aj ión Cu^{2+} nespárený elektrón na *d*-orbitále. Všetky prechodné prvky sú kovy. Významnou vlastnosťou prechodných prvkov je ich schopnosť vyskytovať sa vo viacerých oxidačných stupňoch.

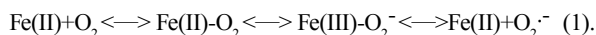
Kovové prvky (M) sa nevyskytujú v organizme v oxidačnom stupni (0). Ak sa používa pomenovanie kovu, ako napríklad železo, meď a podobne, rozumie sa, v závislosti od podmienok, buď chelátovo viazaný atóm kovu s určitým oxidačným číslom (napr. *M*(II)) alebo nechelátovaný akvaión kovu s určitým kladným nábojom (M^{n+}).

Železo sa vyskytuje najčastejšie v dvoch oxidačných stupňoch (II) a (III) (obr. 1). V biologických systémoch sa predpokladá výskyt Fe aj v oxidačnom stupni (IV), prípadne (V), hlavne pri tvorbe oxo-komplexov. V roztoku za aeróbných podmienok je stabilnejší oxidačný stupeň Fe(III), hoci jeho zlúčeniny, napr. $\text{Fe}(\text{OH})_3$, sú málo rozpustné. Železo v oxidačnom stupni (II) je slabým reduktantom. Napr. FeSO_4 vo vodnom roztoku sa oxiduje relatívne ľahko už vzdušným kyslíkom (reakcia 1). Zlúčeniny železa s vyšším oxidačným číslom (IV) a (V) sú silné oxidačné činidlá.

	3d	4s
Fe	Ar $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	\uparrow
Fe(II)	Ar $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	
Fe(III)	Ar $\uparrow\uparrow\uparrow$	
Cu	Ar $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	\uparrow
Cu(I)	Ar $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	
Cu(II)	Ar $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	

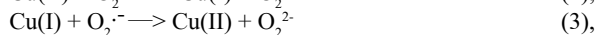
Obr. 1. Elektrónové konfigurácie železa a medi v rôznych oxidačných stupňoch.

Fig. 1. Electron configurations of iron and copper in different oxidation states.

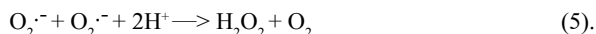


Táto reakcia predstavuje jedoelektrónovú oxidáciu Fe(II), pričom kyslík rozpustený vo vode sa redukuje na superoxid.

Pre meď sú typické dva oxidačné stupne (I) a (II) (obr. 1). Ión Cu^+ na rozdiel od Cu^{2+} nemá radikálový charakter. Jedoelektrónový rozdiel v uvedených oxidačných stupňoch dovoľuje medzi zúčastňovať sa na oxidačno-redukčných radikálových reakciách. Meď môže byť akceptorom aj donorm elektrónu:



Reakcie (2) a (4) sa uplatňujú pri katalyzovanej dismutácii superoxidového aniónového radikálu (krátko superoxidu), ktorá sa môže vyjadriť rovnicou (5):



Variabilita oxidačného stupňa pri prechodných prvkoch je ich všeobecná vlastnosť, ktorá im dovoľuje zúčastniť sa na mnohých oxidačno-redukčných reakciách. Prechodné prvky v určitom oxidačnom stupni sú často súčasťou aktívneho centra mnohých enzýmov, alebo sú ako aktívna časť významných proteínov (tab. 1). Katalytickým účinkom prechodné kovy pomáhajú prekonať spinové obmedzenie kyslíka v jeho reakciách s neradikálovými molekulami. Spinové obmedzenie molekulového kyslíka sa môže obísť tromi cestami:

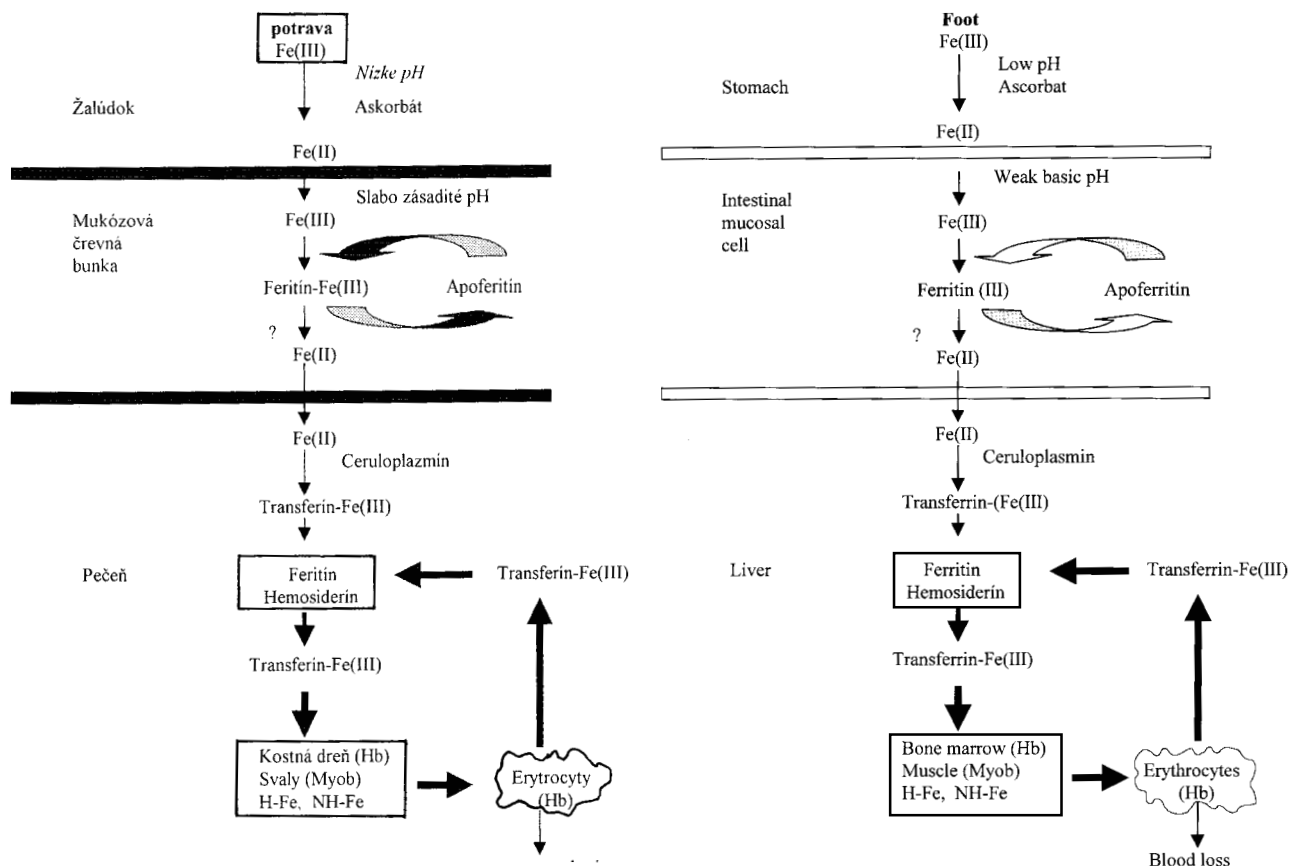
1. Elektróny kyslíka sa môžu premiestniť do iného orbitálu alebo môžu zmeniť spin, napr. ionizujúcim žiarením.
2. Jedoelektrónovou redukciou molekulového kyslíka za tvorby superoxidu.
3. Tvorbou komplexov s iónmi prechodných prvkov, ktoré majú schopnosť akceptovať alebo odovzdávať elektróny vďaka nespáreným elektrónom v *d*-orbitáloch (obr. 1). Táto vlastnosť umožňuje prechodným prvkom veľmi dobre katalyzovať fyziologické oxidačno-redukčné reakcie, ale na druhej strane sa môže jej prostredníctvom tvoriť redukčnými reakciami vysokotoxický hydroxylový radikál (Koster a Sluiter, 1994).

Čo by bolo zaujímavé vedieť o železe a medi?

Železo

V Číne už približne roku 2700 p.n.l. a v Európe približne roku 1500 p.n.l. sa zlúčeniny železa používali na liečebné účely (Spiro a Saltman, 1969). Podľa záznamov z roku 1681 n.l. lekári v Anglicku úspešne používali na niektoré ochorenia liek vyrábaný zo solí železa, cukru a vína. Pri týchto chorobách sa ako príčina, či sprievodný znak neskôr potvrdil nedostatok železa. Prítomnosť atómov železa v krvi sa zistila v 18. storočí n.l. Roku 1832 sa prvýkrát pozoroval nízky obsah železa v krvi pacientov s anémiou a soli železa sa odporúčali na orálne požitie (Koster a Sluiter, 1994).

Dospelý človek prijíma denne asi 1 mg železa z potravy a asi také isté množstvo vylučuje, čím sa v organizme zachováva rovnováha obsahu železa. Fyziologická koncentrácia železa v plazme mužov je 14–26 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a žien 10–21 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. V organiz-



Obr. 2. Prehľad metabolizmu železa. Hrubšie šípky znázorňujú cestu reutilizácie železa. Hb — hemoglobín, Myob — myoglobín, H-Fe — železo v hémových proteínoch, NH-Fe — železo v nehémových proteínoch.
Fig. 2. Overview of iron metabolism. Bold arrows represent the iron reutilization pathway. Hb — hemoglobin, Myob — myoglobin, H-Fe — iron in hemoproteins, NH-Fe — iron in nonheme proteins.

me priemerného dospelého človeka je asi 4–5 g železa a jeho obrat v plazme je asi 35 mg/deň.

Železo sa v kyslom prostredí žalúdka uvoľňuje z chelátových štruktúr prítomných v potrave a redukuje sa na Fe(II) (obr. 2). Na to potrebuje prítomnosť reduktantov, ako je askorbát alebo glutatión. Železo z potravy sa absorbuje v tenkom čreve, kde je vďaka prítomnému hydrogénuhlčitanu uvoľňovanému z pankreasu slabozásadité prostredie, v ktorom sa Fe(II) oxiduje na Fe(III). V alkalickom prostredí je železo stabilnejšie v oxidačnom stupni (III) (redoxný potenciál $Fe^{3+}/Fe^{2+} = -0,56 V$). V tejto forme je potom železo absorbované mukóznymi bunkami prostredníctvom apoferritínu, ktorého biosyntéza je stimulovaná prítomnými atómami Fe(III). Apoferritín preto významne zasahuje do regulácie absorpcie železa v zažívacom trakte. Po naviazaní železa na apoferritín vzniká feritín. Prestup železa z mukózných buniek do kapilár, ako aj jeho uvoľňovanie z feritínu, vyžaduje redukciu železa na Fe(II), pretože v tomto oxidačnom stupni je železo viac rozpustné. Mechanizmus tejto redukcie nie je presne známy. Po prenose železa do kapilár je Fe(II) oxidované ceruloplazmínom na Fe(III) (ceru-

loplazmín sa označuje aj ako *ferooxidáza*) a v tejto forme sa efektívne vychytáva transferínom, ktorý dopravuje železo na miesta potreby, predovšetkým do kostnej drene, kde sa v erytroblastoch syntetizuje hemoglobín, a do buniek, kde sa železo zabudováva do proteínov (obr. 2).

V organizme živočíchov a človeka je veľmi citlivý ochranný systém, ktorý stráži fyziologické koncentrácie železa. Už malý výkyv v rovnováhe obsahu železa vedie buď k nedostatku alebo k zvýšenému obsahu. Oboje prináša so sebou patologické dôsledky. Na svete sa registruje viac ako 500 miliónov ľudí s nedostatčným množstvom železa a niekoľko miliónov s jeho nadbytkom (Octave a spol., 1983). Niektoré látky v potrave viažu železo tak pevne, že sa železo v žalúdku neuvoľňuje, a preto sa nemôže absorbovať. Takouto potravínou je napr. špenát, ktorý sa mylne považuje za dobrý zdroj železa. Železo sa v ňom pevne viaže na inozitolhexafosfát, z ktorého sa ťažko uvoľňuje (Devlin, 1992).

Nedostatok železa v organizme môže nastať pri dlhotrvajúcom malom obsahu železa v potrave, napr. aj pri vylúčení mäsa

z potravy, alebo pri nedostatočnom vstrebávaní mukóznymi bunkami tenkého čreva, prípadne u žien počas tehotnosti a dojčenia.

Zvýšený obsah železa v organizme sa môže vyskytovať po jeho zvýšenej absorpcii z potravy, alebo pri niektorých patologických stavoch, keď obsah železa v organizme môže byť až 100 g (Devlin, 1992). V organizme nie sú špecifické mechanizmy na vylučovanie nadbytočného železa. Fyziologicky sa vylučovanie uskutočňuje čiastočne zbavovaním sa červených krviniek v lúmene čreva, epitelmi zažívacieho traktu, ale aj kožou, vlasmi a u žien v priebehu menštruačného krvácania. Malé množstvo železa sa vylučuje močom a žľou.

Väčšina železa v organizme sa viaže v hemoglobíne (68 %), menej v myoglobíne (4 %). Tkanivový feritín viaže 27 % celkového obsahu železa v organizme, kým sérový feritín len 0,004 %. Transferín viaže asi 0,1 % železa prítomného v organizme a v enzýmoch sa nachádza asi 0,6 % železa. Proteíny obsahujúce železo sa môžu rozdeliť do troch skupín:

1. *hemové proteíny*, napr. hemoglobín alebo cytochrómy;
2. *Fe-S proteíny*, v ktorých je železo viazané cysteinovými zvyškami;
3. *železité proteíny*, v ktorých je železo viazané priamo na proteíny, pričom to nemusí byť len cez síru (Škarka a Ferenčík, 1992).

Železo, ktoré nie je momentálne potrebné, sa v oxidovanej forme Fe(III) ukladá v nehemových proteínoch *feritíne a hemosideríne*. Krvou sa železo transportuje pomocou bielkoviny *transferínu*.

Meď

Meď je esenciálny stopový prvok nevyhnutný pre zdravý vývoj človeka. Podobne ako železo, aj atóm medi je často v aktívnom centre enzýmov, ktoré využívajú ako substrát kyslík (tab. 1). Meď sa nachádza napr. v enzýme *superoxiddismutáza* (SOD) (EC

1.15.1.1), *cytochrómoxidáze* (EC 1.9.3.1), *dopamín-β-hydroxyláze* (EC 1.14.2.1) alebo *ceruloplazmíne* (EC 1.10.3.2). Väčší výskyt medi je v pečeni a mozgu. V krvi mužov je priemerná koncentrácia medi 16,7 μmol.l⁻¹ (Halliwell a Gutteridge, 1989). Dospelý jedinec obsahuje priemerne celkovo 80–100 mg medi. Znížený prísun medi potravou alebo nedostatočná resorpcia v črevách má za následok rôzne poruchy v organizme vrátane ovplyvnenia metabolizmu železa. Meď z potravy sa absorbuje v žalúdku a v tenkom čreve. Transport do pečene sa zabezpečuje väzbou na albumín, ktorý má vekú väzbovú schopnosť pre meď (Stuffa spol., 1992). V pečeni sa meď inkorporuje do ceruloplazmínu. Ide o bielkovinu s najväčším obsahom medi. Ceruloplazmín je extracelulárny proteín s molekulovou hmotnosťou 134 000 a so šiestimi alebo siedmimi atómami medi v molekule. Atómy medi sa pevne viažu na proteín. Pri malej hodnote pH sa len jeden atóm uvoľňuje, a to v prítomnosti redukčných činidiel. Ceruloplazmín môže dodávať meď do buniek za účelom jej zabudovania do iných, meď obsahujúcich bielkovín, ako *superoxiddismutáza a cytochrómoxidáza*. V plazme sa z celkového množstva medi takmer všetka viaže v ceruloplazmíne a len veľmi malé množstvo sa viaže na albumín alebo na aminokyseliny, napr. histidín. Prísun medi v nadbytku do organizmu je toxický.

Podobne ako v prípade železa, aj atómy medi v určitom oxidačnom stupni katalyzujú na jednej strane tvorbu reaktívnych metabolitov kyslíka a na druhej strane sú aktívne pri ich odstraňovaní napr. v enzýme Cu/Zn superoxididismutáza (reakcie 2 a 4). Ióny medi môžu katalyzovať peroxidáciu lipidov (Chan a spol., 1982) a poškodenie DNA (Yourtee a spol., 1992; Li a Trush, 1993). Hoci je množstvo medi v organizme v porovnaní s obsahom železa 50-krát menšie, nemal by sa podceňovať katalytický účinok zlúčenín medi v tvorbe hydroxylového radikálu a iniciá-

Tab. 1. Príklady proteínov s obsahom prechodných kovov a ich význam v metabolizme kyslíka.

Funkcia/Proteín	Kov	Substrát
Ochranná funkcia		
Superoxiddismutáza	Cu(II), Zn(II), Mn(III), Fe(III)	O ₂ ⁻
Kataláza	Fe(III)	H ₂ O ₂
Peroxidázy	Fe(III)	H ₂ O ₂ /donor elektrónov
Ceruloplazmín	Cu(II)	Fe ²⁺
Kyslík, železo a elektrón transportné proteíny		
		Funkcia
A. s obsahom hemového železa		
cytochrómy	Fe(III)	transport elektrónov
hemoglobín	Fe(II)	transport kyslíka
myoglobín	Fe(II)	uschovanie kyslíka
cytochrómoxidáza	Fe(III)/Cu(I)	terminálna oxidáza
B. s obsahom nehemového železa		
hemeritrín	Fe(II)	transport kyslíka
feredoxín	Fe(III)	transport elektrónov
feritín	Fe(III)	uschovanie železa
transferín	Fe(III)	transport železa
laktoferín	Fe(III)	väzba železa
C. s obsahom medi		
hemocyanín	Cu(I)	transport kyslíka

Tab. 1. Protein with high contents of transient metals and their role in oxygen metabolism.

Function/Protein	Metal	Substrate
Protective function		
Superoxid dismutase	Cu(II), Zn(II), Mn(III), Fe(III)	O ₂ ⁻
Catalase	Fe(III)	H ₂ O ₂
Peroxidases	Fe(III)	H ₂ O ₂ /electron donor
Ceruloplasmin	Cu(II)	Fe ²⁺
Oxygen, iron and electron	Transporting proteins	Function
A. containing heme iron		
cytochromes	Fe(III)	electron transport
hemoglobin	Fe(II)	oxygen transport
myoglobin	Fe(II)	oxygen storage
cytochrome oxidase	Fe(III)/Cu(I)	terminal oxidase
B. containing nonheme iron		
hemeritrin	Fe(II)	oxygen transport
feredoxin	Fe(III)	electron transport
ferritin	Fe(III)	iron storage
transferrin	Fe(III)	iron transport
lactoferrin	Fe(III)	iron binding
C. containing copper		
hemocyanine	Cu(I)	oxygen transport

cie lipoperoxidácie, pretože H₂O₂ reaguje s meďou rýchlejšie ako železo (reakcia 7) (Gutteridge, 1984).

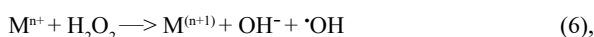
Organizmus na zabezpečenie správneho chodu mnohých fyziologických funkcií nevyhnutne potrebuje prechodné kovy, aj keď často vo veľmi malých množstvách. Atómy kovov v určitom oxidačnom stupni sa viažu v aktívnom centre niektorých enzýmov, kde majú priamu katalytickú funkciu, alebo sú štruktúrnou zložkou molekúl. Môžu tiež zasahovať regulačne do rôznych metabolických procesov. Prechodné prvky majú významnú úlohu aj v metabolických premenách kyslíka. Príklady niektorých funkcií prechodných kovov v metabolizme kyslíka sú v tabuľke 1.

Toxicita prechodných kovov

Toxicita prechodných kovov sa prejavuje dvojakým spôsobom:

1. priamym oxidačným poškodením významných biomolekúl tzv. ferylovými zlúčeninami, čo sú oxozlúčeniny železa s vyšším oxidačným stupňom (IV alebo V),
2. toxicky môžu prechodné kovy pôsobiť aj nepriamo, katalytickou tvorbou reaktívnych metabolitov kyslíka, najmä hydroxylového radikálu, ktorý veľmi rýchlo poškodzuje biologicky významné molekuly.

Väčšina [•]OH radikálu tvoreného *in vivo* pochádza z rozkladu peroxidu vodíka katalyzovaného iónmi prechodných prvkov Fentonovou reakciou podľa všeobecnej reakcie:



kde Mⁿ⁺ môže byť ión kovu alebo atóm kovu s určitým oxidačným číslom, napr. Fe(II) a Cu(I), viazaný v komplexných zlúčeninách. Napriek viacerým teoretickým možnostiam v bunkách má pravdepodobne toxikologický význam tvorba [•]OH z peroxidu vodíka

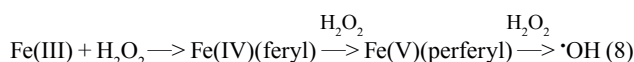
katalyzovaná iba atómami Fe(II) vzhľadom na relatívne vysokú koncentráciu železa v organizme.

Fentovova reakcia za účasti iónov Fe²⁺ sa uskutočňuje podľa rovnice:



Klasická Fentonova reakcia pravdepodobne takýmto jednoduchým mechanizmom v bunkách neprebíha. Rýchlosť Fentonovej reakcie je veľmi malá na to, aby mohla *in vivo* prebiehať podľa tohto mechanizmu. Preto akvaióny Fe²⁺ v bunkách nevstupujú priamo do klasickej Fentonovej reakcie, ale okamžite tvoria komplexné zlúčeniny s vysokomolekulovými (napr. proteínmi) alebo nízkomolekulovými (fosfáty, citráty, nukleotidy atď.) chelátormi, a preto sa v bunkách v iónovej forme takmer nevyskytujú. Mechanizmus reakcie takýchto komplexov s H₂O₂ môže byť v závislosti od podmienok zložitejší, ako sa uvádza v klasickej Fentovovej reakcii. V týchto reakciách môžu vznikáť rôzne kyslíkové medziprodukty, napr. Fe(II)=O, ktoré majú tiež významnú oxidačnú aktivitu.

V tvorbe [•]OH môže mať určitú iniciačnú funkciu aj atóm Fe(III) viazaný v komplexných zlúčeninách. Pri týchto reakciách sa predpokladá tvorba ferylových zlúčenín, ktoré sú silnými oxidantmi (Halliwell a Gutteridge, 1990; Rush a spol., 1990; Liochev a Fridovich, 1994):



Pritom môžu prebiehať aj ďalšie reakcie:



Tab. 2. Úloha železa a iných kovov v premene menej reaktívnych na viac reaktívne metabolity.

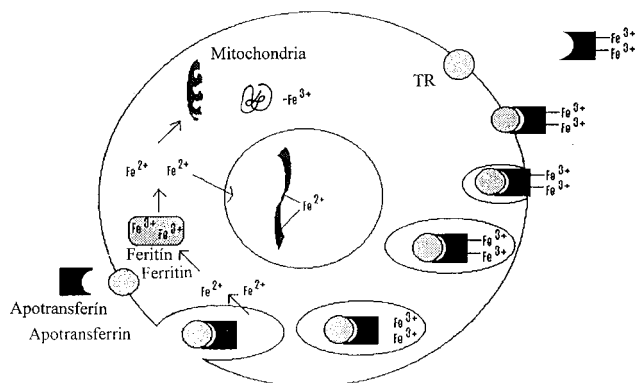
	Fe ^(a)	
	O ₂ ^{•-} +H ₂ O ₂	→ [•] OH
Lipoperoxidy (ROOH)	Cu/Fe ^(b)	→ RO [•] , ROO [•] , cytotoxické aldehydy
Tioly (RSH)	Fe/Cu+O ₂ ^(c)	→ O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , [•] OH, RS [•] → RSO [•] , RSO ₂ ^{•(d)}
NAD(P)H	Fe/Cu+O ₂ ^(c)	→ NAD(P) [•] , O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , [•] OH
Askorbát	Cu/Fe ^(e)	→ semidehydroaskorbátový radikál, [•] OH, H ₂ O ₂ , degradačné produkty askorbátu
Katecholamíny a podobne oxidovatené látky	Fe/Cu/Mn+O ₂ ^(c)	→ O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , [•] OH, semichinóny (alebo) iné radikály odvodené od oxidovaných látok

Uvedené prechodné kovy účinkujú v reakciách v iónovej forme alebo ako atómy s určitým oxidačným stupňom koordinačne viazané v chelátových štruktúrach.

Tab. 2. The role of iron and other metals in conversion of less reactive to more reactive metabolites.

	Fe ^(a)	
	O ₂ ^{•-} +H ₂ O ₂	→ [•] OH
Lipoperoxids (ROOH)	Cu/Fe ^(b)	→ RO [•] , ROO [•] , cytotoxic aldehydes
Thiols (RSH)	Fe/Cu+O ₂ ^(c)	→ O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , [•] OH, RS [•] → RSO [•] , RSO ₂ ^{•(d)}
NAD(P)H	Fe/Cu+O ₂ ^(c)	→ NAD(P) [•] , O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , [•] OH
Ascorbate	Cu/Fe ^(e)	→ semidehydroascorbate radical, [•] OH, H ₂ O ₂ , degradation products of ascorbate
Catecholamines and similarly oxidated substances	Fe/Cu/Mn+O ₂ ^(c)	→ O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , [•] OH, semichinones (or) other radicals derived from oxidated substances

The named transient metals act in reactions in ionic forms or as atoms with certain oxidation state bound in chelate structures.



Obr. 3. Uvoľňovanie železa z transferrínu.
Fig. 3. Release of iron from transferrin.

Na poškodení biomolekúl *in vivo* sa pravdepodobne zúčastňujú viaceré z uvedených oxidantov v závislosti od celkových podmienok (koncentrácia reaktantov, pH, prítomnosť reduktantov atď.).

Za určitých okolností do tvorby $\cdot\text{OH}$ môžu zasahovať významne aj zlúčeniny medi. Rýchlosť tvorby $\cdot\text{OH}$ v systéme $\text{Cu(I)}/\text{H}_2\text{O}_2$ v porovnaní s $\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$ je oveľa väčšia ($k=4,7 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ proti $< 10^2 \text{ L} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Walling, 1982).

Toxicita niektorých prechodných kovov vyplýva ešte z ďalšej skutočnosti. Tieto kovy, najmä železo, majú schopnosť za určitých okolností v oxidačných degradačných procesoch premeniť relatívne málo účinné látky na vysokotoxické reaktívne metabolity (tab. 2) (Halliwell a Gutteridge, 1990).

V tabuľke 2 reakcia (a) predstavuje iónmi železa katalyzovanú Haberovu a Weissovu reakciu. Rozklad lipoperoxidov závisí od prechodných kovoch a pravdepodobne pritom vzniká vysokocytotoxický produkt, ako napr. 4-hydroxy-2,3-*trans*-nonenal a menej toxický malondialdehyd (reakcia b). Väčšina, ak nie všetky, tzv. autooxidačné reakcie stimulujú stopy iónov prechodných prvkov, pričom tieto reakcie sa uskutočňujú voľnoradikálovými mechanizmami (reakcia c). Sulfanylový radikál môže reagovať s kyslíkom a tvorí reaktívnejší alkyltioxylový (RSO \cdot) alebo alkyltiope-roxylový radikál (RSOO \cdot) (reakcia d). Pri rozklade kyseliny askorbovej je špeciálne účinný ión medi. Zmesi askorbát-meď, prípadne askorbát-železo sú cytotoxické. Za túto toxicitu pravdepodobne zodpovedá $\cdot\text{OH}$ -radikál (reakcia e).

Nedávno sa potvrdila tvorba hydroxylového radikálu z peroxidu vodíka v reakcii katalyzovanej iónmi Fe^{2+} v experimentoch *in vitro*, v ktorých sa požíval atóm ^{17}O . Použitím techniky EPR sa dokázalo, že kyslík v $\cdot\text{OH}$ je skutočne z H_2O_2 a nie H_2O (Lloyd a spol., 1997). Autori pritom nevyklúčili tvorbu ferrylových reaktívnych metabolitov odvodených od H_2O_2 , z ktorých sa následne môže uvoľňovať $\cdot\text{OH}$ radikál dokázaný ERP signálom.

V súčasnosti zďaleka nie sú zodpovedané všetky otázky na účasť iónov prechodných kovov v oxidačnom poškodení biologicky významných molekúl. Len ďalšie experimenty vnesú svetlo do poznania skutočných mechanizmov týchto reakcií.

Zdroje iónov prechodných kovov *in vivo*

V čase, keď sa zistilo, že toxicita superoxidu a peroxidu vodíka sa uskutočňuje prostredníctvom $\cdot\text{OH}$ radikálu, nebol známy zdroj iónov kovov s katalytickou účinnosťou (Halliwell, 1982). Niektorí autori v minulosti o ich existencii dokonca pochybovali (Winterbourn, 1981). Dnes je pohľad na účasť iónov prechodných prvkov v oxidačnom poškodení jasnejší, aj keď nie úplný.

Organizmus veľmi starostlivo narába s iónmi železa. Využíva transportné proteíny, napr. transferrín a zásobné proteíny, napr. ferritín na ukladanie iónov Fe^{2+} . Intracelulárna metabolická zásoba akvaiónu železa sa takto minimalizuje. K tomu prispievajú aj iné fyziologické chelatačné činidlá, napr. albumín. Schopnosť organizmu schovať ióny železa do chelátov umožňuje využívať voľné radikály a reaktívne metabolity v kontrolovaných fyziologických procesoch bez významného poškodenia vlastných buniek a tkanív (Halliwell a spol., 1992).

Do bunky sa atóm Fe(III) dopravuje transferrínom. Významnú funkciu v kontrole prísunu železa do bunky má membránový proteínový receptor (TR) (obr. 3) (Meneghini, 1997). V plazme sa jednou molekulou transferrínu prenášajú dva ióny Fe(III) . Za fyziologických podmienok je transferrín v nadbytku a koncentrácia akvaiónov železa sa rovná takmer nule. Transport železa transferrínom má dva významy. Väzbou iónov Fe(III) na transferrín sa vo vode málo rozpustné železité ióny menia na rozpustný komplex Fe(III)_2 -transferrín. Druhý význam transferrínu je v tom, že umožní rozpoznanie komplexu Fe(III)_2 -transferrín membránovým receptorom TR. Vytvorený komplex Fe(III)_2 -transferrín-TR sa endocytózou dostáva dovnútra bunky, kde sa Fe(III) uvoľňuje a redukuje sa na viac vo vode rozpustný Fe(II) . Apotransferrín (transferrín, z ktorého sa oddisociovali ióny železa) sa potom fúziou endozómu s cytoplazmovou membránou recykluje do plazmy (Meneghini, 1997). Redukovaný Fe(II) sa môže ďalej metabolizovať tromi spôsobmi (Bali a spol., 1991):

1. dopravuje sa k proteínom, do ktorých sa potom inkorporuje;
2. uskladňuje sa vo ferritíne, kde je eventuálnou metabolickou zásobou;
3. môže byť substrátom pre tvorbu chelátovaného železa, kde ligandmi sú rôzne nízkomolekulové štruktúry. Môžu to byť napr. citrát, fosfáty, ATP, ADP a iné nukleotidy, ktoré viažu železo v oboch oxidačných stupňoch (II, III) (Sigel, 1993).

Železo viazané v nízkomolekulových chelátoch sa označuje ako *nízkomolekulové* (LMW, low molecular weight), alebo *katalyticky účinné*, prípadne nie celkom správne voľné železo (myslí sa tým železo neviazané vo fyziologických proteínových štruktúrach). Katalyticky účinné železo účinkuje ako katalyzátor v Haberovej a Weissovej reakcii, alebo je reaktantom vo Fentonovej reakcii (Stohs a Bagchi, 1995).

Ak má nízkomolekulové železo plniť katalytickú funkciu, vytvorený chelát musí mať schopnosť vstupovať do oxidačnoredukčných reakcií a prenášať jeden elektrón. Toto je spojené so zmenou konformácie koordinačnej sféry komplexu. Preto musí byť jedna väzba chelátu obsadená ľahko disociovatelným ligandom (Koster a Sluiter, 1994). Štruktúra komplexu teda určuje spolu s inými podmienkami (napr. koncentračný pomer ligandu a iónu kovu), či komplex bude katalyzovať tvorbu reaktívnych metabolitov kyslíka, alebo na druhej strane bude vykazovať opačné vlast-

nosti, teda inhibíciu radikálových reakcií. Frakcia katalyticky účinného železa je dialyzovateľná, čo potvrdzuje predpoklad, že toto železo je chelátované nízkomolekulovými chelátormi. Železo viazané v nízkomolekulových chelátoch môže byť z nich vytrhnuté silnejšími chelatačnými činidlami, ako je napr. desferoxamín alebo 1,10-fenantrolín. Zistilo sa, že atómy železa (II) viazané v nízkomolekulových chelátoch v systémoch *in vitro* strácajú schopnosť katalyzovať tvorbu $\cdot\text{OH}$ v prítomnosti napr. desferoxamínu.

Do skupiny nízkomolekulového železa nepatrí železo viazané vo feritíne, hémových štruktúrach, alebo v zhlukoch Fe-S-proteínov. Pri určitých patologických stavoch alebo pôsobením niektorých xenobiótik (napr. paraquat, nitrofurantoin, adriamycín, daunomycín) (Ryan a Aust, 1992) a účinkom reaktívnych metabolitov kyslíka (Halliwell a spol., 1992) sa železo môže uvoľňovať z jeho fyziologických proteínových štruktúr. Napr. z hemu sa Fe(II) môže uvoľňovať účinkom peroxidu vodíka a z feritínu pôsobením superoxidu. Oxidačný stres tak môže sám osebe zvyšovať koncentráciu železa s katalytickým účinkom. Ak hodnota celkového železa v plazme dosiahne hodnotu $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, s veľkou pravdepodobnosťou sa dokáže prítomnosť katalyticky účinného železa.

Nízkomolekulové železo sa môže v organizme stanoviť metódou, ktorá využíva bleomycín ako chelatačné činidlo (Gutteridge a Halliwell, 1987). Ak železo stanovené touto metódou dosiahne v plazme koncentráciu $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, musí sa počítať s možnosťou tvorby hydroxylového radikálu reakciou katalyzovanou nízkomolekulovými Fe(II)-chelátmi (Halliwell a spol., 1992).

Dnes sa prijíma názor, že tvorba hydroxylového radikálu a ďalších reaktívnych metabolitov je limitovaná zásobou „katalyticky účinných“ iónov železa a že akékoľvek poškodenie tkanív môže vyvolať aj radikálové reakcie, ak je „katalyticky účinné“ železo uvoľňované z porušených buniek do okolitého prostredia.

Nefyziologické uvoľňovanie železa z biologických chelátorov sa uskutočňuje vtedy, ak sa železo vyskytuje v organizme v extrémne vysokom množstve. Fyziologické proteínové chelatačné štruktúry nestačia svojou kapacitou a železo sa z nich uvoľňuje. Nadmernú absorpciu železa v zažívacom trakte a zvýšené ukladanie železa do buniek môžu spôsobiť genetické poruchy, nadmerný príjem železa potravou, prípadne iné metabolické poruchy. Medzi tieto poruchy patrí napr. *hemochromatóza kmeňa Bantu*, *alkoholová cirhóza*, *transfúzna hemosideróza a Kashinova–Berkova choroba* (Halliwell a Gutteridge, 1990).

Medzi genetické ochorenia, pri ktorých sa železo ukladá do buniek vo zvýšenej miere, patrí *idiopatická hemochromatóza*. Táto choroba sa spája so zvýšenou absorpciou železa vnútornosťami a jeho ukladáním v mnohých orgánoch a tkanivách. Obsah železa v organizme môže byť až 100 g (Devlin, 1992). Väzbová kapacita transferínu v sére je nedostatočná, železo sa viaže na nízkomolekulové chelátory a v organizme sa dá dokázať prítomnosť nízkomolekulového železa (Halliwell a Gutteridge, 1990).

Degeneratívne ochorenie centrálného nervového systému, napr. *neuronálna ceroidná lipofuscínóza* sa charakterizuje akumuláciou pigmentov ceroidu a lipofuscínu v neurónoch. Pre toto ochorenie je typické markantné zvýšenie absorpcie železa v črevách (Westermarck a spol., 1984). Železo katalyzuje zvýšenú tvorbu reaktívnych metabolitov a stimuluje lipoperoxidáciu a tvorbu „stareckých“ pigmentov, ktoré sa ukladajú v mozgu a iných bunkách CNS, čím spôsobujú ich poškodenie. Mozgovomiechový mok nemá veľ-

kú väzbovú schopnosť pre železo. Preto pri mechanickom poškodení mozgu sa uvoľnené železo nemôže dostatočne viazať v proteínových chelátoch. Viaže sa preto v nízkomolekulových chelátových štruktúrach a ako také môže stimulovať peroxidáciu lipidov, ktoré sa v mozgu vyskytujú vo vysokej koncentrácii. Inhibícia posttraumatického degeneratívneho poškodenia mozgu a miechy u experimentálnych zvierat sa dosiahla železo-chelátujúcimi činidlami, napr. lazaroidom U74006F (Halliwell, 1991).

Pri *reumatickej artritíde* sa dokázala prítomnosť katalyticky účinného železa v synoviálnej tekutine kĺbov. Prítomné neutrofile, monocyty a makrofágy produkujú zvýšené množstvo reaktívnych metabolitov kyslíka, ktoré v prítomnosti nízkomolekulového železa tvoria toxický $\cdot\text{OH}$ radikál zodpovedný za degradáciu kyseliny hyalurónovej (Halliwell, 1992).

Ako dôsledok podávania cytotoxických liekov pacientom s akútnou *myeloidnou leukémiou* v priebehu chemoterapie sa dokázalo zvýšené uvoľňovanie bleomycínom dokázateľného železa. Chemoterapeutická liečba často využíva lieky s redoxnou schopnosťou, napr. antracyklíny, ktoré môžu redukovať Fe(III) na Fe(II). Pri autooxidácii chemoterapeutík sa môže tvoriť $\text{O}_2^{\cdot-}$. Reaktívne metabolity môžu reagovať s uvoľneným železom a spôsobovať rôzne sekundárne poškodenia (Halliwell a Gutteridge, 1990).

U špičkových športovcov a experimentálnych zvierat po určitých extrémnych fyzických cvičeniach sa vyskytli poškodenia niektorých tkanív, zníženie kontroly mitochondriovej respirácie a poškodenie štruktúrnej integrity endoplazmového retikula (Davies a spol., 1982). V priebehu dlhého fyzického cvičenia sa zvyšuje spotreba kyslíka, čím sa zvyšuje možnosť tvorby kyslíkových radikálov. U experimentálnych potkanov sa dokázal trikrát väčší signál EPR vo svaloch po zvýšenej fyzickej záťaži v porovnaní s kontrolou. U ľudí sa potvrdila zvýšená hladina jedného z produktov lipoperoxidácie — etánu vo vydychovanom vzduchu po zvýšenom fyzickom cvičení. Koncentráciu etánu inhiboval podaný vitamín E. Tieto pozorovania poukazujú na zvýšený oxidačný stres u špičkovito trénovaných jedincov, pričom sa predpokladá účasť prechodných kovov v týchto procesoch. Dokázala sa totiž prítomnosť nízkomolekulového železa v pote trupu a zvýšená hladina nízkomolekulovej medi v pote rúk u intenzívne trénovaných atlétov. Vylučovanie nízkomolekulových atómov prechodných kovov sa špekulatívne môže považovať za pokus organizmu inhibovať možnosť priebehu redoxných radikálových reakcií katalyzovaných nízkomolekulovým železom v priebehu extrémneho fyzického zaťaženia (Halliwell a Gutteridge, 1990).

Dostupnosť **katalytickej medi** v porovnaní so železom je viac obmedzená. Pre ochranu organizmu to má svoj význam, lebo katalytická meď je silnejší promótor voľnoradikálového poškodenia lipidov, proteínov a hlavne DNA ako železo. Keďže však železa je v organizme 50-krát viac ako medi, jeho účasť v oxidačnom strese je nebezpečnejšia.

Železo viazané v proteínových chelátoch nemôže katalyzovať tvorbu hydroxylového radikálu. Na rozdiel od železa, meď (II) viazaná na albumín môže reagovať so superoxidom a H_2O_2 za tvorby Cu(III)-metabolitov, ktoré môžu čiastočne poškodzovať molekuly albumínu v mieste väzby medi. Toto poškodenie je však zanedbateľné vzhľadom na vysokú koncentráciu albumínu ($0,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) v plazme. Ak sa Cu(II) alebo Cu(I) viažu na DNA, enzýmy, ale aj vírusy, spôsobujú oxidačné poškodenia vo väzbových miestach

špecifických pre ión medi. Vysoká väzbová schopnosť a prebytok albumínu voči iónom medi má naopak veľký antioxidantný význam. Vďaka veľkej koncentrácii albumínu v plazme uvoľnené ióny medi z iných štruktúr sa môžu viazať do chelátu. V mieste väzby Cu(II) sa môže albumín len čiastočne oxidačne poškodzovať.

„Katalyticky účinná“ meď sa dá stanoviť fenantrolínovou metódou (Gutteridge, 1984).

Proti toxickému pôsobeniu „katalytických“ iónov kovov sa využíva antioxidantná schopnosť viacerých prírodných (desferoxamín) alebo syntetických (kaptopril) chelatačných činidiel, ktoré viažu ióny kovov pevnejšie ako nízkomolekulové chelatačné činidlá, tým inhibujú schopnosť iónov kovov katalyzovať tvorbu reaktívnych metabolitov a poškodzovať biologicky významné molekuly.

Atómy železa a medi sú na jednej strane životne dôležité prvky, ktoré zabezpečujú správnu fyziologickú funkciu biologicky dôležitých proteínov. Ak sú však prítomné na nesprávnom mieste, v nevhodnej forme a čase, môžu byť tieto prechodné prvky extrémne toxické (Ďuračková, 1998).*

Literatúra

Bali P.K., Zak O., Aisen P.: A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochem.*, 30, 1991, s. 324–328.

Davies K.J.A., Quintanilha A.T., Brooks G.A., Packer L.: Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 107, 1982, s. 1198–1205.

Devlin T.M. (Ed.): Textbook of biochemistry with clinical correlations. New York—Chichester—Brisbane—Toronto—Singapore, Wiley-Liss, Inc. 1992, 1185 s.

Ďuračková Z.: Voľné radikály a antioxidanty I. Bratislava, Slovak Academic Press 1998, 282 s.

Gutteridge J.M.C.: Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett.*, 128, 1981, s. 343–346.

Gutteridge J.M.C.: Copper-phenantroline-induced site-specific oxygen radical damage to DNA. *Biochem. J.*, 218, 1984, s. 983–985.

Gutteridge J.M.C.: Iron-EDTA stimulated phospholipid peroxidation: A reaction changing from alkoxy to hydroxyl radical dependent initiation. *Biochem. J.*, 224, 1984, s. 697–701.

Gutteridge J.M.C., Halliwell B.: Radical promoting loosely-bound iron in biological fluids and the bleomycin assay. *Life Chem. Rep.*, 4, 1987, s. 113.

Halliwell B.: Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxyl radicals in vivo. *Biochem. J.*, 205, 1982, č. 2, s. 461–462.

Halliwell B.: Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Amer. J. Med.*, 91, 1991, Suppl. 3C, s. 14S–22S.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon Press 1989, 335 s.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth. Enzymol.*, 186, 1990, s. 1–85.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E.: Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, 119, 1992, č. 6, s. 598–620.

Huber R.: Proteins and metals, their functional and structural interaction in metalloproteins. *J. Inorg. Biochem.*, 67, 1997, č. 1–4, s. 2.

Chan P.C., Peller O.G., Kesner L.: Copper(II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membrane. *Lipids*, 17, 1982, s. 331–337.

Koster J.F., Sluiter W.: Physiological relevance of free radicals and their relation to iron. S. 409–427. In: Nohl H., Esterbauer H., Rice-Evans C. (Eds.): Free radicals in the environment, medicine and toxicology. London, Richelieu Press 1994.

Li Y., Trush M.A.: DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: Role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis*, 7, 1993, s. 1303–1311.

Liochev S.I., Fridovich I.: The role of O₂ in the production of HO[•]: in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 1994, s. 29–33.

Lloyd R.V., Hanna P.M., Mason R.P.: The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 1997, č. 5, s. 885–888.

Meneghini R.: Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, 23, 1997, č. 5, s. 783–792.

Octave J.N., Schneider Y.-J., Trouet A., Crichton R.R.: Iron uptake and utilization by mammalian cells. I: Cellular uptake of transferrin and iron. *Trends Biochem. Sci.*, 8, 1983, s. 217–220.

Rush J.D., Maskos Z., Koppenol W.H.: Distinction between hydroxyl radical and ferryl species. *Meth. Enzymol.*, 186, 1990, s. 148–156.

Ryan T.P., Aust S.D.: The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22, 1992, s. 119–141.

Sigel H.: Interactions of metal ions with nucleotides and nucleic acids and their constituents. *Chem. Soc. Rev.*, 22, 1993, s. 255–267.

Spiro G., Saltman P.: Polynuclear complexes of iron and their biological implications. *Struct. Bonding*, 6, 1969, s. 116–156.

Stohs S.J., Bagchi D.: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 1995, č. 2, s. 321–336.

Stuff S.T., Chowdhary P., Khan M.F., Sorenson J.R.J.: Stable superoxide dismutase (SOD)-mimetic ternary human serum albumin-Cu(II)(3,5-diisopropylsalicylate)₂/Cu(II)2(3,5-

diisopropylsalicylate)₄ complexes in tissue distribution of the binary complex. *Biochem. Pharmacol.*, 43, 1992, č. 7, s. 1601–1612.

Škárka B., Ferencík M.: *Biochémiá*. Bratislava, Alfa 1992, 846 s.

Westermark T., Gutteridge J.M.C., Heiskala H., Santavuori P., Rahoila T., Suomela M.: Involvement of iron in the pathogenesis of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Life Chem. Rep.*, 1, 1984.

Winterbourn C.C.: Hydroxyl radical production in body-fluids. Roles of metal ions, ascorbate and superoxide. *Biochem. J.*, 198, 1981, č. 1, s. 125–131.

Yourtee D.M., Elkins L.L., Nalvarte E.L., Smith R.E.: Amplification of doxorubicin mutagenicity by cupric ion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 116, 1992, s. 57–65.

Do redakcie došlo 13.3.1998.

* Ďakujem za technickú pomoc L. Chandogovej a L. Míkovej. Práca sa čiastočne sponzorovala z grantu MŠ SR 1/4110/97 a 95/5195/641.