

EVOLUȚIA NANOPARTICOLELOR CUPRU-CERULOPLASMINĂ (CU-CP) ȘI FIER-TRANSFERINĂ (FE-TR) ÎN INFECȚIILE RESPIRATORII VIRALE ȘI BACTERIENE

Doinița Pop¹, Cristiana Cristea², Mădalina Boldescu¹, Anda Dragodan¹, P. Calistru²

¹Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau“, București

²Spitalul Clinic de Boli Infecțioase „Dr. Victor Babeș“, București

REZUMAT

Ceruloplasmina (CP) și transferina (TR) sunt două metalo-proteine cu capacități antioxidante conferite de nanoparticolele (ionii de cupru, respectiv de fier), încorporați în structura lor. În această lucrare ne-am propus să investigăm relația dintre Cu-CP și Fe-TR la pacienții cu infecții respiratorii acute, prin realizarea grafică a evoluției parametrilor determinați la fiecare pacient.

Corelația pozitivă Cu-CP, Fe-TR a corespuns cu evoluția favorabilă vindecării, pe când corelația negativă, a caracterizat evoluția trenantă dificilă/severă a infecției respiratorii acute. Diferențierea pacienților după tipul de afecțiune și explicațiile date în reprezentarea grafică la fiecare pacient, au făcut posibilă observarea evoluției bolii.

S-a realizat o reprezentare grafică prin integrarea valorilor parametrilor Fe-TR, Cu-CP pentru fiecare pacient în parte obținându-se următoarele două cazuri:

1. 27 din pacienți au prezentat stres oxidativ din care viral (n = 5), mixt (n = 3) și bacterien (n = 19), (Fe↓ TR↑ și Cu↓ CP↑).

S-a constatat că bolnavii internați cu pneumonie au prezentat numai *infecții bacteriene sau mixte*.

2. Ceilalți 9 pacienți se aflau în faza tardivă și cronicizantă a bolii, s-au depistat cazuri virale (n = 3), mixte (n = 2) și bacteriene (n = 4), (Fe↑TR↑ și Cu↑CP↓).

S-au luat în studiu 36 de pacienți (14 bărbați și 22 femei, cu vârsta medie de 45,3 ani) internați la Spitalul „Victor Babeș“ în perioada 19.02-15.04.2003 cu infecții respiratorii acute. Probele de sânge s-au recoltat în a 4-a zi și a 8-a zi de la internare. Pacienții au fost împărțiți în grupele A și B cu subgrupele A1 [infecție cu virus gripal de tip B confirmată serologic (F. Topârceanu), n = 12], A2 (infecție cu alt virus respirator, n = 12), B1 (infecție bacteriană cu agent identificat, n = 4), B2 (infecție bacteriană cu agent neidentificat, n = 8), precum și grupa C (infecție virală suprainfectată bacterian). TR s-a evaluat prin imunodifuzie radială, iar CP prin metoda Ravin cu p-fenilendiamină ca substrat enzimatic. Ionii de cupru, respectiv de fier, s-au determinat spectrofotometric prin reacția cu 3, 5-Di Br PAESA (kitul/RAME-Siero, Italia) și respectiv ferozină (kitul/Biocom, Germania).

Corelația pozitivă Cu-CP, Fe-TR a corespuns cu evoluția favorabilă vindecării, pe când corelația negativă a caracterizat evoluția trenantă/severă a infecției respiratorii acute.

Diferențierea pacienților după tipul de afecțiune și explicațiile date, în reprezentarea grafică la fiecare pacient, au făcut posibilă urmărirea evoluției bolii în funcție de concentrațiile serice de Cu-CP, Fe-TR. Este un posibil mod de explicare a modificărilor, care apar în cursul evoluției bolii și în viitor un mod de diagnosticare mai rapidă.

ABSTRACT

TR and CP are two metal proteins containing iron and copper nanoparticle in their structure. Correlation between cooper-ceruloplasmin and iron-transferrin was by graphically represented for several respiratory infections of patients.

We investigated 36 patients from „Victor Babeș“ Hospital of Infections Diseases (14 men and 22 woman) between 19.02-15.04.2003 are suffering from respiratory infections.

The blood samples were taken in the fourth and the eighth day of hospitalization. The patients were separated in 3 groups, A1 (viral), B (bacterial), and C (mixed viral/bacterial). There were also subgroups: A1 (B influenza virus serologically confirmed), A2 (another influenza virus serologically confirmed), B1 (bacterial infection with identified agent) and B2 (bacterial infection with unidentified agent). Transferrin was evaluated through radial imunodifusion, and CP through Ravin method with enzymatic substrate p-phenilendiamin. The copper and iron ions were determined with the spectrophotometer from the kit reaction with 3, 5-Di Br PAESA (kit/RAME-Siero, Italia) and ferozin (kit/Biocom, Germany).

Positive correlation between Cu-CP, Fe-TR was favorable for the holding, and the negative correlation matched the severe and acute phase of the respiratory infections. The classification of patients by type of affections and the explanations given in the graphic representations for each patient made possible to observe the elovution of the disease.

A graphic representation was made by integrating the values of Fe-TR, Cu -CP parameters for each patient and it are separate between oxidative stress and chronic diseases.

1. 27 of the patients suffered from oxidative stress viral (n = 5), complex (n = 3) and bacterium (n = 19), (Fe↓TR↑ și Cu↓ CP↑). Pulmonian diseases have only mixt and bacterial infections.

2. The ather 9 patients were in the late(final) and cronic phase of the disease and we found cases of viral (n = 3), complex (n = 2) and bacterien (n = 4), (Fe↑TR↑ și Cu↑CP↓).

Positive correlation between Cu-CP, Fe-TR matched the holding, and the negative correlation was matched the severe and acute phase of the respiratory infections. The classifications of the patients by type of affections given in the graphic representations for each patient made possible to follow the evolution of the disease according to the serum concentrations of Cu-CP, Fe-TR. It is possible way to explain the modifications which appear during the evolution of the disease and for the future, it is foster, direct method of diagnostic.

INTRODUCERE

Infecțiile căilor respiratorii superioare (ICRS) constituie o problemă importantă de sănătate, ocupând 40-60% din totalul morbidității copilului și 20% din cel al adultului. Entitățile cuprinse în ICRS sunt: rinitele, adenoiditele, faringoamigdalitele, otitele, sinuzitele, laringitele. Etiologia ICRS este predominant virală (80-90%): rinovirusuri, virusuri gripale, paragripale, adenovirusuri, reovirusuri, coronavirusuri, herpesvirusuri, enterovirusuri, virusul sincițial respirator. Bacteriile pot fi cauză primară a ICRS, dar mai frecvent ele complică infecția virală. Agenții bacterieni mai frecvent implicați sunt: *Streptococcus pyogenes*, streptococi piogeni de grup B, C, G, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Arcanobacterium hemolyticum*, asociații fuso-spirochetozice.

Infecțiile căilor respiratorii inferioare (ICRI) cuprind traheobronșite, bronșiolite, pneumonii și supurații bronhopulmonare. Agenții infecțioși cei mai frecvenți ai ICRI sunt: virusurile respiratorii (sincițial respirator, paragripale, gripale A, B, C, adenovirusuri, enterovirusuri, virusul rujeolic, varicelo-zosterian, herpes simplex, virusul citomegalic), bacteriile (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Proteus* spp, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* etc.), fungii.

Frecvent pneumoniile inițial virale se supra-infectează cu bacterii realizând aspectul de pneumonie mixtă, în care componenta bacteriană răspunde prompt la tratamentul cu antibiotice, persistând în continuare componenta virală pulmonară.

Nanomedicina reprezintă un instrument de diagnosticare, testare și prevenire a îmbolnăvirii, traumatismelor, sau fricii, contribuind astfel la îmbunătățirea stării de sănătate a populației. Ea utilizează instrumente pentru înțelegerea structurii moleculare a corpului uman, adresându-se problemelor medicale, ce implică structura nano a unor componente ale serului uman, și interacțiunea lor cu sistemele biologice. Dintre ele mai studiate sunt ceruloplasmina (CP) și transferina (TR), metalloproteine cu capacități antioxidante conferite de nanoparticule (ioni de cupru, sau fier încorporați în structura lor).

Tendința actuală în medicină și biologie este de a valoriza aplicațiile feroelectrice. Apariția inflamației induce modificări locale de pH producând modificări ale momentului magnetic de spin

sau înmagazinarea energiei rezultate din reacțiile de oxidare absorbite în infra roșu (IR), iar în zona afectată provoacă mărirea volumului și creșterea temperaturii cu 2-4°C, peste limita normală de 36,6°C. Potrivirea dimensiunilor nano ale fierului respectiv cuprului și a canalelor de permeabilitate ale membranelor biologice, facilitează inflamația producând disconfort, febră și toate celelalte fenomene asociate (producere și secreție de chemokine, citokine etc.).

Obiectivul acestei lucrări este investigarea relației dintre Cu-CP și Fe-TR la pacienții cu infecții respiratorii acute și monitorizarea evoluției parametrilor determinați la fiecare pacient.

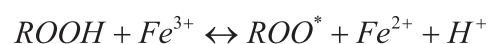
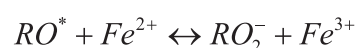
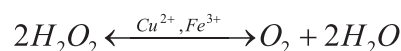
Pe baza momentului magnetic și a conductivității moleculare a fierului la temperatura camerei, studiile de spectrometrie din IR au relevat o structură octaedrică a Fe²⁺ [8]. La această temperatură au loc modificări ale conductivității, a captării energiei în IR, prin variația momentului magnetic, și interacțiunea complexă a ionului de fier cu ionii de cupru din legăturilor oxalo (la raportul 4 Cu²⁺/1 Fe³⁺). În cazul legăturilor oxalo dintre Cu²⁺ și Fe³⁺, existența unui singur spin de antisens, creează un moment antiferomagnetic [9].

Acest proces cuprinde 3 faze:

1. Prima fază presupune suprasaturarea transferinei cu fier în proporție de 30%, prin inserarea Fe³⁺ în cei doi lobi de transferină. Interacțiunea fierului cu receptorii de transferină produce în medii alcaline efecte anti-tumorale și o creștere a arderilor în celulele tumorale. [3,4] Efectele mediate de interacțiunea cuprului cu aceste molecule sunt antagonice, între cele două minerale existând o competiție a absorbției în organism. [5]
2. Existența în ser a formei saturate de transferină (inactivă în reacția redox), promovează formarea de radicali hidroxil (Baldwin *et al.*, 1984) confirmând inabilitatea ei de a mai lega fierul.
3. Fierul în exces nu este hidrolizat, astfel că poate exista în formă liberă, ca sare și poate fi captat de celulele care absorb fierul. [4]

În formulele, A și B sunt sumarizate principalele reacții chimice implicate în aceste fenomene.

A. Reacțiile HABER- WEISS



Ionii cupros, feros și hidroxil sunt toxici și foarte instabili.

B. Feroxidaza I

$Fe^{2+} + Cu^{2+} + \text{Feroxidaza I} \ll Fe^{3+} + Cu^{+} + \text{Feroxidaza I} + O_2 + 4H^{+} + 4Cu^{+} + \text{Feroxidaza I} \ll 2H_2O + 4Cu^{2+} + \text{Feroxidaza I}$

Feroxidaza I are rol în modularea captării Fe^{2+} în organism și a afinitatea Fe^{3+} de a intra în lobi de transferină.

TR și CP, au factori transcripționali cu secvențe specifice de legare în regiunile promotor ale genelor, care se înfășoară cu proteine captatoare de fier și cupru.

Transferina umană face parte din familia glicoproteinelor, fiind formată dintr-un singur lanț bilobal, care conține 679 de amino acizi, prin legare fierul, cu masa moleculară de 90 kDa. Cei doi lobi sunt omologi și conțin două domenii de mare afinitate pentru încorporarea metalului în pozițiile dintre despicăturile interdomeniilor. Pozițiile lobi N și C sunt similare, dar nu identice. Acestea, leagă ionul feric mare cu spin octoedric (ale cărui grupări fenolice au două tirozine), cu un grup de imidazone histaminic, cu o gruparea carbonică aspacart și doi oxigeni ai ionului (bi)carbonat. Transferina leagă o serie de metale nefiziologice ca (Cu, In, Al și Hf) [17]. Singur, lobul N-terminal nu dă măsura legării transferinei de receptorii celulari, ci servește ca donor al ionului de fier pentru celule, iar lobul C-terminal (121-760 reziduri), are ambele funcții [13]. Cele patru reziduri ale lobului C (Asp392, Tyr426, Tyr517 și His585), servesc la legarea fierului, prin complementul anionului de bicarbonat legat de proteine prin punți de hidrogen [13].

75% din energia legării fierul de transferină, este realizată prin lobul C de transferina receptor.

Saturarea transferinei constă din:

- i. legarea a 2 moli de Fe^{3+} la 1 mol de transferină (Morgan, 1992);
- ii. saturarea (%)TR = 3,98 x concentrația serică de Fe^{3+} ($\mu\text{mol/l}$)

unde: masa moleculară a TR este 79570 Da

Blocarea capacității transferinei de a lega fierul în exces, generată de creșterea concentrației serice de fier liber are efecte patologice, influențând starea de sănătate a pacienților cu o serie de afecțiuni virale sau maligne (Breuer *et al.*, 2000a).

În infecția microbială, prognosticul apariției inflamației este dependent de tendința fierului de a forma lanțuri polimerice complexe de 17-19 ioni

de fier (Archibald, 1983). S-au acumulat dovezi privitoare la implicarea TR și CP în patologie.

A. *Haemophilus influenzae* (Gray-Owen and Schryvers, 1996; Schryvers and Stojiljkovic, 1999) are pe suprafață receptori care se leagă direct de transferină.

B. Suprasaturarea transferinei conduce la creșterea riscului de generare a unor infecții letale cu *Streptococcus pneumoniae*. (Lambert and Hunter 1990)

Situația reversă, absența legării Fe și existența ionului fieros liber în exces, crește riscul de infecție. Prin urmare inactivarea transferinei, generează premisele unor infecții acute, crește riscul de declanșare a unor septicemii, Ward and Bullen, 1999 și inactivează reacțiile redox. S-a observat o corelație între rezistența la antibiotice și la suprasaturarea transferinei la pacienții cu infecții recurente.

Absorbția fierului este importantă pentru realizarea acestor procese. La pH-ul fiziologic el se prezintă sub formă de Fe^{2+} , solubil; capabil să interacționeze cu feritina, prin oxidare el devine Fe^{3+} , foarte insolubil. Feritina și bacterioferitina (Bcf) cu cele două funcții în dezintoxicare a ionului feros în soluții și de captarea/sechestrarea ionului prin oxidare, el devine feric. Feritina face parte din marea familie de fiero-proteine existente în toate organismele. Bcf este o hem proteină, de tipul b a hemul dimeric. Forma în exces este reprezentată de Fe^{2+} , are o toxicitate mare și este eliberat de transferina serică prin diferite mecanisme. Uzual fiind endocitarea și degradarea mediată de receptorul pentru transferină.

Ceruloplasmina este o cupro-proteină a plasmii, care este produsă prin oxidări multiple (Feroxidaze) fiind esențială în homeostaza normală a fierului. Structura ceruloplasminei este formată din secvențe complete de reziduri de amino acizi ≈ 500 , care realizează limitarea clivajele proteolitice, iar prin caracterului hidrolitic/hidrofobic ne arată prezența unei structuri secundare [20]. Fiecare subunitate este formată din trei domenii A1, A2 și B, cu structuri și funcții diferite. Tipul A1 singur are o absorbție intensă la 600 nm, conferind proteinelelor o culoare albastră. Tipul A2 singur este coordonat de cele patru nitrogen imidazol, ce închid în ele cele două momente antiferomagnetice care cupleză cu tipul B a ionilor de cupru absorbind la 330 nm. Tipul A2 și B prezintă o structură triunghiulară de ciorchine, care încorporează cuprul (creedind benzi ligand cu amino acizi) cu oxigenul prin cicluri catalitice, fapt confirmat prin studii de cristalografie cu raze X [24].

Ceruloplasmina umană este formată din secvențe de amino acizi cu un terminal amino de 67 kDa. Acest fragment conține 480 de reziduri amino acizi și de trei oligozaharide glucozilate. Lanțul de polipeptide este de 1046 de reziduri de amino acizi, care leagă în situsurile sale patru oligozaharide glucozilate, astfel că masa moleculară a ceruloplasminei umane este de 132 kDa [15].

Feroxidazele sunt un grup de oxidarii multiple al cuprului, prin excitarea activității ionului feros, dar nu face parte din familia de cupro-proteine. Această familie este distinctă și au trei lăcașuri, unde se înserează ionului cupric (tip I, II și III). Toate enzimele, care participă la oxidare cuplează cu 4 molecule de cupru la un ion de fier, prin donarea unui electron formând o moleculă de oxigen și două de apă. Prin oxidare se reduce substratul ocupat de tipul I al ionului de Cu^{2+} , la tipul II prin altă oxidare, urmată de altă oxidare a tipului III, grupând atomi de cupru în cele trei lăcașuri [22]. Feroxidaza III și CP umană, este deficitară de cupru, deoarece creează dezordine în metabolismul fierului [19]. Studiile cu această nouă proteină au indicat aspectul fundamental al cuprului fiziologic, prin supra încărcarea citoplasmei cu cupru secvențial. Feroxidază III este o glicoproteină, care conține mulți ioni de cupru, care catalizează reacția de oxidare a ionului feros în ion feric. Această feroxidază împreună cu Fe^{2+} ajută la transportul ionului feric spre celule și creează deficiența fierului. Feroxidaza III produce ionul feros, care se transferă în Feroxidaza I, fiind transportată din citosol. Hemostaza face înserarea post transcripțională a patru ioni de cupru în Feroxidaza III, care este esențială în activitatea de legare a cuprului și fierului [6,14]. Cele două feroxidaze au un rol major și complex în menținerea balanței reacției redox între ionul cupros și cupric [6]. Prezența toxicității cuprului se explică prin *absența* Feroxidazei III în plasmă. S-a demonstrat că activitatea Cu^+ în substrat poate fi baza propulsării activității expresive *in vivo* și joacă un rol esențial în supresia cuprului și a toxicității fierului [22].

PACIENȚI ȘI METODE

S-au luat în studiu 36 de pacienți (14 bărbați și 22 femei, cu vârsta medie de 45,3 ani) internați la Spitalul „Victor Babeș” în perioada 19.02-15.04.2003 cu infecții respiratorii acute. Probele de sânge s-au recoltat în a 4-a zi și a 8-a zi de la internare. Pacienții au fost împărțiți în grupele A și B cu subgrupele A1 [infecție cu virus gripal de

tip B confirmată serologic (F. Topârceanu), n = 12], A2 (infecție cu alt virus respirator, n = 12), B1 (infecție bacteriană cu agent identificat, n = 4), B2 (infecție bacteriană cu agent neidentificat, n = 8), precum și grupa C (infecție virală suprainfectată bacterian). TR s-a evaluat prin imunodifuzie radială, iar CP prin metoda Ravin cu p-fenilendiamină ca substrat enzimatic. Ioni de cupru, respectiv de fier, s-au determinat spectrofotometric prin reacția cu 3,5-Di Br PAESA (kitul/RAME-Siero, Italia) și respectiv ferozină (kitul/Biocom, Germania).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele determinării prin spectofotometrie a concentrațiilor fierului și cuprului au fost confirmate serologic prin proteinele de fază acută [proteina C reactivă (CRP), α_1 -antitripsina (α_1 AT), componenta 3 a complementului (C3), transferina (TR), ceruloplasmina (CP)] și al claselor de imunoglobuline (IgG, IgM și IgE).

S-au evidențiat modificări generate de stresul oxidativ (faza incipientă) și saturarea transferinei (tardiv), prin integrarea valorilor parametrilor Fe-TR, Cu -CP pentru fiecare pacient, permițând gruparea lor în următoarele categorii:

27 din pacienți au prezentat stres oxidativ din care viral (n = 5), mixt (n = 3) și bacterian (n = 19), ($\text{Fe} \downarrow \text{TR} \downarrow$ și $\text{Cu} \downarrow \text{CP} \downarrow$). În acest caz Fe, care se încorporează în TR are proprietăți antitumorale și depinde de temperatura din IR, când are loc tranziția între $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$, precum și de pH mediului [3,4], iar saturarea transferinei este de 30% [4].

Existența feroelectricității face posibilă coexistența celor două forme (Fe^{2+} și Fe^{3+}), (Cu^{2+} și Cu^+), care se leagă de benzile de hidrogen ale TR și CP [4,7,11]. Schimbările de molaritate și de conductivitate, care au loc la temperatura camerei, conduc la schimbarea momentului magnetic de spin, prin crearea unui singur moment antiferomagnetic [1,9].

Etiologia pneunopatiilor diagnosticate a fost bacteriană sau mixtă.

Algorimului de reprezentare grafică a fost ales pentru parametri integrați Cu-CP și Fe-TR, ai fiecărui pacient, la timpi diferiți, prin stabilirea curbei de regresie logaritmică și a ratei acesteia. Axele graficului reprezintă:

$$x = \text{parametrii integrați Fe-TR, Cu-CP}$$

$$y = \text{intensitățile parametrilor mg\%}$$

Prezența maximului al doilea mult mai mare decât primul, este un caz de excepție, (indică existența antagonismului între ionii de fier și de cupru), unde Cu este în exces față de Fe, datorat probabil din medicația de întreținere a pacientului (CI). Rata curbei de regresie este mică, ceea ce indică o mai rapidă vindecare a pacientului.

Existența celui de al treilea maxim este dat de existența *Staphylococcus aureus*.

Dublă etiologie existentă se remarcă prin prezența minimului, care coboară sub zero, indicând o vindecare mai trenantă, cu complicații.

Combinăție dintre cele două virusuri, constă într-o creștere a ratei de regresie de peste 0,5 ($r = 0,639$), transferina este în stare de suprasaturare, la fel ca și ceruloplasmina.

În aceste cazuri când Fe crește excesiv, iar TR nu mai încorporează fierul în cei doi lobi, apar manifestări patologice, neexistente în antecedentele bolii pacientului [4].

Figurile 1,2,3, și 4 reprezintă *stresul oxidativ*.

La ceilalți 9 pacienți, care se aflau în faza tardivă și cronicizantă a bolii, s-a depistat etiologie virală ($n = 3$), mixtă ($n = 2$) și bacteriană ($n = 4$), ($Fe \uparrow TR \uparrow$ și $Cu \uparrow CP \downarrow$).

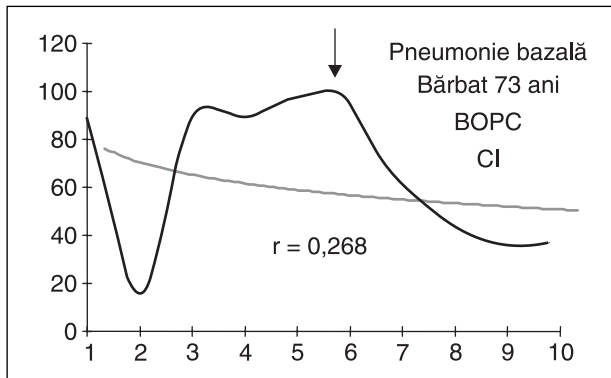


Figura 1.

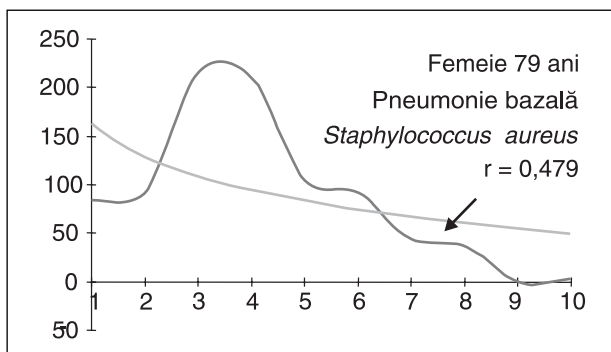


Figura 2.

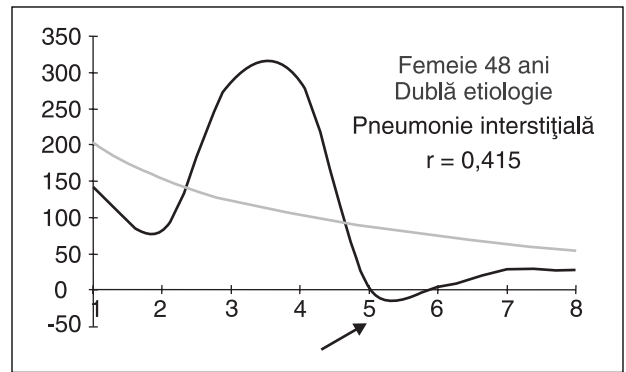


Figura 3.

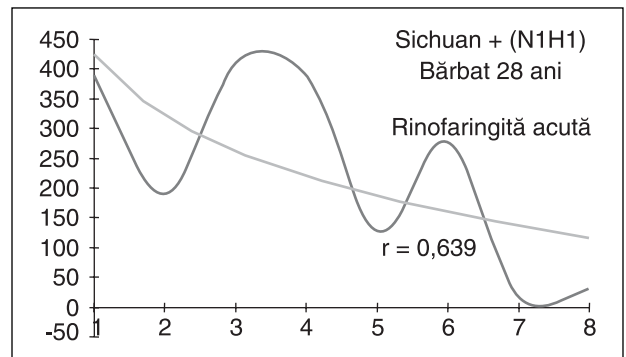


Figura 4.

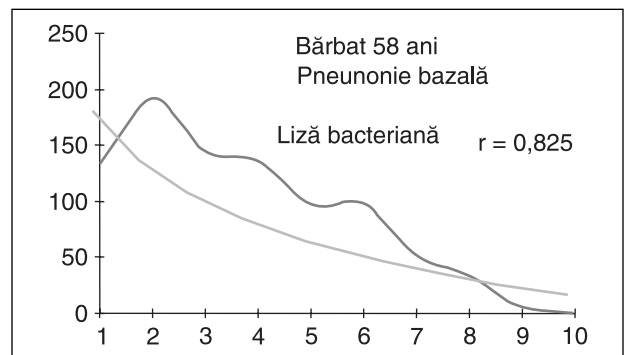


Figura 5.

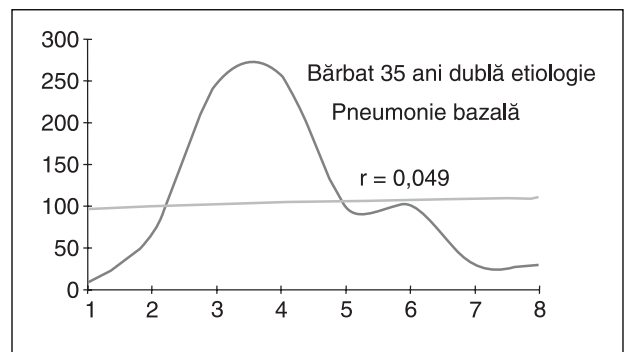


Figura 6.

Suprasaturarea transferinei prin creșterea fierului în exces, conduce la existența concurenței antagonice între cupru și fier la absorbția în organism, cu posibile cronicizări ale bolii, ulterior ducând la complicații majore [5].

Liza bacteriană este prezentă prin multe maxime. Rata fiind de 0,825 indică existența complicațiilor cu o posibilă cronicizare a bolii, conduce la o vindecare trenantă și dificilă (recidive). (Figura 5)

Prezența ratei de 0,049 indică o vindecare rapidă este cazul suprasaturării transferinei. (Figura 6)

Cazurile 6 și 7 sunt în *faza tardivă*.

CONCLUZIE

Corelația pozitivă Cu-CP, Fe-TR a corespuns cu evoluția favorabilă vindecării, pe când corelația negativă a caracterizat evoluția trenantă/severă a infecției respiratorii acute.

Diferențierea pacienților după tipul de afecțiune și explicațiile date, în reprezentarea grafică la fiecare pacient, au făcut posibilă urmărirea evoluției bolii în funcție de concentrațiile serice de Cu-CP, Fe-TR. Este un posibil mod de explicare a modificărilor, care apar în cursul evoluției bolii și în viitor un mod de diagnosticare mai rapidă.

BIBLIOGRAFIE

1. Rocha, T.C.R., Ximenes F., Zanchet D. – „Optical properties of metal nanoparticles“ World Conference on Magic Bullets Celebrating Paul Ehrlich's 150th Birthday Nürnberg, Germany, September 9-11, 2004
2. Gupta Ak, Gupta M – „Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Magic Bullets for Cell Targeting“ World Conference on Magic Bullets Celebrating Paul Ehrlich's 150th Birthday Nürnberg, Germany, September 9-11, 2004
3. Keppler Bk – „Antitumor Active Metal Coordinated Compounds – New Concepts For Cancer Chemotherapy“ World Conference on Magic Bullets Celebrating Paul Ehrlich's 150th Birthday Nürnberg, Germany, September 9-11, 2004
4. Leni von Bonsdorff – „A Pharmaceutical Human Apotransferrin Product for Iron Binding Therapy“ Finnish Red Cross Blood Service and Laboratory of Biochemistry and Microbiology, Department of Chemical Technology, Helsinki University of Technology, Finland 2003.
5. Judit Varkonyi, Terezia Szabo, A. Tordai, Piroška Sebestyen, Hajnalka Andrikovics, P. Farcas, S. Benedek, G. Tarkovacs, I. Karadi – „The Significance of Serum Copper Levels in the Myelodysplastic Syndromes“ World Conference on Magic Bullets Celebrating Paul Ehrlich's 150th Birthday Nürnberg, Germany, September 9-11, 2004 World Conference on Magic Bullets Celebrating Paul Ehrlich's 150th Birthday Nürnberg, Germany, September 9-11, 2004
6. Cristophor Stoj, Daniel J. Kosman – „Cupros Oxidase Activity of Yeast Fet3p and Human Ceruloplasmin: Implication for Function“ FEBS 554, 2003, p 422-426
7. V. Bystrov, Natalia Bzstrova, Y. Dekhtyar, Glina Ovtchinnikova, Tatyana Baumuratova – „Models in Biology, Medicine and Nanotechnology“
8. Y.-T. Li, C. W. Yan, J.-F. Lou¹, C.Y. Zhu¹ – „Synthesis and Magnetic Studies of Copper(II)–Iron(II) Heterodinuclear Complexes with N,N-Bis[2-(dimethylamino)ethyl]oxamido Dianion as Ligand“ *Polish J. Chem.*, 78, 635–644 (2004)
9. C. -W. Yan, Y.-T. Li, C.-Y. Zhu – „Synthesis, Characterization and Magnetic Properties of Copper (II)–Iron (III) Heterotetranuclear Complexes Bridged by Tris (oxalato) ferrate (III)“ *Polish J. Chem.*, 78, 653–661 (2004)
10. Halliwell B, Gutteridge JMC. – „Free radicals in biology and medicine“ 3rd ed. New York: Oxford, 1999.
11. Xie JX, Tsoi YK, Chang YZ, Ke Y, Qian ZM. – „Effects of ferroxidase activity and species on ceruloplasmin mediated iron uptake by BT325 cells“ Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Kowloon, Hong Kong.
12. S. Samar Hasnain, – „X-ray structural studies of some metalloproteins“ *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 66, No. 1, pp. 51-56, 1994.
13. Rutao Liu, Jing-Qu Guan, Olga Zak, Philip Aisen, Mark R.Chance – „Structural Reorganization of the Transferrin C-Lobe and Transferrin Receptor upon Complex Formation: The C-Lobe Binds to the Receptor Helical Domain“ *Biochemistry* 2003, 42, 12447-12454 Accelerated Publications.
14. Alexander. B. Taylor, Christopher S. Stoj, Lynn Ziegler, Daniel. J. Kosman, P. John Hart – „The Copper-Iron Connection in Biology: Structure of the Metallo-Oxidase Fet3p“ *PNAS* October 25, 2005 , vol. 102 , no. 43 , 15459–15464
15. Nabuhiro Takahashi, Thomas. L. Ortel, Frank W. Putnam – „Single-Chain Structure of Human Ceruloplasmin: The Complete Amino Acid Sequence of the Whole Molecule“ *PNAS*, January 15, 1984, vol. 81, no. 2, 390-394
16. David Rinaldo, Martin J. Field – „Structural Mechanism Shows How Transferrin Receptor Binds Multiple Ligands and Sheds Light on a Hereditary Iron Disease“ *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 70: 677-701, 2001
17. Fernando Mateos, Jeremyh. Brock, Jose luis Perez-Arellano – „Iron Metabolism in the Lower respiratory Tract“ *Thorax* 1998; 53; 594-600
18. Daniel J. Kosman – „Cellular Copper and Iron Metabolism and Gene Regulation“ [www: camkos@buffalo.edu](http://www.camkos@buffalo.edu)
19. David L. Huffman, Thomas V. O'Halloran – „Function, Structure, and Mechanism of Intracellular Copper Trafficking Proteins“ *A. Rev. Biochem.* Vol. 70: 677-701, July 2001
20. T L. Ortel, N Takahashi, F W Putnam – „Structural model of human ceruloplasmin based on internal triplication, hydrophilic/hydrophobic character, and secondary structure of domains“ *Natl Acad Sci USA* 1984 August; 81(15): 4761-4765
21. David Rinaldo, Martin J. Field – „A Density Functional Theory Study of the Iron-Binding Site of Human Serum Transferrin“ *Annual Review of Biochemistry*, DOI:10.1146, December 22, 2003
22. Masuru Harada, Hiroto Kumemura, Shotaro Sakisaca, Shoichiro Shishido, Eitaro Taniguchi, Takumi Kawaguchi, Shinichiro Hanada, Hironori Koga, Ryukichi Kumashiro, Takato Ueno, Tatsuo Suganuma, Koh Furuta, Masayoshi Namba, Toshihiro Sugiyama, Michio Sata – „Wilson Disease Protein ATP7B is Localized in the Late Endosomes in a Polarized Human Hepatocyte Cell Line“ *International Journal of Molecular Medicine*, vol 11, p 293-298, 2003
23. Nathan E. Hellman, Satoshi Kono, Grazia M. Mancini, A. J. Hoogeboom, G. J. de Jong, Jonathan D. Gitlin – „Mechanisms of Copper Incorporation into Human Ceruloplasmin“ *J. Biol. Chem.* Vol. 277, No. 48, 29, pp. 46632–46638, 2002
24. Hoon Shim, Z. Leah Harris – „Genetic Defects in Copper Metabolism“ *American Society for Nutritional Sciences* 2003.
25. Ruth Danzeisen, C.E. Fosset, Chariana Zehane, K. Page, S. David, H. J. Mcardle – „Placental Ceruloplasmin Homolog is

- Regulated by Iron and Copper and Is Implicated in Iron Metabolism"
Am J Physiol Cell Physiol 282: C472–C478, 2002.
26. **Liliana Quintanar, Mark Gebhard, Tzu-Pin Wang, Daniel J. Kosman Edward I. Solomon** – „Ferrous Binding to the Multicopper Oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and Human Ceruloplasmin: Contributions to Ferroxidase Activity" J. AM. CHEM. SOC. 9 VOL. 126, NO. 21, p 6579-6589, 2004
27. **Nathan Nelson** – „Metal Ion Transporters and Homeostasis" EMBO Journal Vol. 18 No.16, 4361-4371, 1999
28. **David Rinaldo, Martin J. Field** – „A Density Functional Theory Study of the Iron-Binding Site of Human Serum Transferrin" Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 August; 81(15): 4761–4765
29. **Eliza Huntter, Janos Fendler** – „Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance" Adv. Mater. 2004, 16 ,no19,1685-1706.
30. **Nancy C, Andrews, Mark D. Fleming, Hiromi Gunshin**, – „Iron Transport Across Biologic Membranes" Nutrition Reviews, Vol. 57, No. 4, 1999.