

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**HLEDÁNÍ ÚČINNÝCH CHELÁTORŮ KOBALTU –
8-HYDROXYCHINOLINY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Václav Tvrдый a Mgr. Marcel Hrubša

Hradec Králové 2021

Karolína Pelnářová

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

V Hradci Králové dne

Karolína Pelnářová

Na tomto místě bych ráda poděkovala Prof. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za velice vstřícnou a odbornou pomoc, cenné rady a trpělivost během vypracování této diplomové práce. Mé poděkování patří také Mgr. Václavovi Tvrdému za konzultaci při chelatačních experimentech a ochotu kdykoli poradit a pomoci v laboratoři, Mgr. Marcelovi Hrubšovi při konzultacích, spojených s lyzačními experimenty a spolupráci při experimentálních měřeních a Mgr. Monice Moravcové za pomoc s lyzačními experimenty.

V neposlední řadě patří velký dík mé rodině za jejich obrovskou podporu a porozumění během celého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Karolína Pelnářová

Školitel: Prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Václav Tvrđý, Mgr. Marcel Hrubša

Název diplomové práce: Hledání účinných chelátorů kobaltu - 8-hydroxychinoliny

Kobalt patří mezi esenciální stopové prvky přítomné v lidském těle. Je součástí organokovového komplexu vitamínu B₁₂, který je podstatný pro mnoho fyziologických funkcí. Jak nedostatek, tak nadbytek kobaltu v těle je spojen s patologickými stavy. Projevy nedostatku mohou vést až k perniciózní anémii či hypofunkci štítné žlázy. Intoxikace kobaltem může vzniknout v průmyslovém prostředí, např. kovovým prachem kobaltu při zpracování těžkých kovů nebo jeho uvolněním následkem koroze z ortopedických implantátů. Systémová toxicita se projevuje řadou endokrinních, kardiovaskulárních a neurologických příznaků.

Hlavním cílem této diplomové práce byla snaha o nalezení účinných chelátorů kobaltu ze skupiny látek odvozených od 8-hydroxychinolinu. Ke stanovení míry chelatace bylo použité spektrofotometrické *in vitro* měření. Vliv chelatace byl také sledován *ex vivo* u potkaních erytrocytů.

U všech testovaných chelátorů – 8-hydroxychinolinu, nitroxolinu, chloroxinu, kliočinolu a jodočinolu byla v poměru 1:1 (chelátor:kobalt) zjištěna určitá chelatace při všech testovaných pH. Jedinou výjimkou byl jodočinol, který při tomto poměru až na pH 7,5 prakticky nechelatoval. Obecně lze chelatační účinnosti popsat následovně: chloroxin = kliočinol > nitroxolin > 8-hydroxychinolin > jodočinol. Kobalt sám o sobě sice nezvyšoval lýzu potkaních erytrocytů, ale přídavek chloroxinu ke kobaltu ji výrazně zvýšil. Kliočinol také zvyšuje lýzu erytrocytů, jeho účinek se jeví ale hlavně na kobaltu nezávislý. Jodočinol, opět na kobaltu nezávisle, alespoň částečně ochránil erytrocyty před lýzou. Vliv ostatních testovaných látek na lýzu červených krvinek v přítomnosti kobaltu nebyl významný.

Závěrem lze konstatovat, že všechny 8-hydroxychinoliny *in vitro* chelatují ionty kobaltu, ale je třeba jejich vlastnosti také ověřit ve více biologických podmínkách, protože některé chelátory mohou paradoxně navozovat lýzu erytrocytů v přítomnosti iontů kobaltu.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Karolína Pelnářová

Supervisor: Prof. Přemysl Mladěnka, PharmD., Ph.D.

Consultant: Václav Tvrdý, MSc.; Marcel Hrubša, MSc.

Title of diploma thesis: Searching of effective cobalt chelators – 8-hydroxyquinolines

Cobalt is one of the essential trace elements present in the human body. It forms a part of the organometallic complex of vitamin B₁₂, which is essential for many physiological functions. Both overload and lack of cobalt in the body is associated with pathological conditions. Manifestations of deficiency can lead up to pernicious anemia or hypofunction of the thyroid gland. Cobalt intoxication can occur in an industrial environment, such as by cobalt metal dust during heavy metal processing, or by its release due to corrosion from orthopedic prostheses. Systemic toxicity is manifested by a number of endocrine, cardiovascular and neurological symptoms.

The main aim of this diploma thesis was to find effective chelators of cobalt from the group of substances derived from 8-hydroxyquinoline. *In vitro* spectrophotometric measurement was used to determine the degree of chelation. The effect of chelation was also monitored *ex vivo* in rat erythrocytes.

All tested chelators – 8-hydroxyquinoline, nitroxoline, chloroxine, clioquinol and iodoquinol, were able to chelate cobalt in the ratio 1:1 (chelator: cobalt) at all tested pH. The only exception was iodoquinol, which was practically inactive at this ratio with an exception of pH 7.5. In general, chelating efficacies can be ranged as follows: chloroxine = clioquinol > nitroxoline > 8-hydroxyquinoline > iodoquinol. Cobalt alone did not increase the lysis of rat erythrocytes, but an addition of chloroxine to cobalt significantly increased it. Clioquinol also increases the lysis of erythrocytes, but its effect appears to be mainly independent of cobalt. Iodoquinol, again independently of cobalt, at least partially protected erythrocytes from lysis. The effect of other test substances on the lysis of red blood cells in the presence of cobalt was insignificant.

In conclusion, all 8-hydroxyquinolines chelate cobalt ions *in vitro*, but their properties also need to be verified under more relevant biological conditions, as some chelators may paradoxically induce lysis of erythrocytes in the presence of cobalt ions.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	1
2. ÚVOD	2
3. TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1 FYZIOLOGIE KOBALTU.....	3
3.1.1 VÝZNAM KOBALTU PRO LIDSKÝ ORGANISMUS.....	3
3.1.2 FARMAKOKINETIKA KOBALTU	6
3.2 INTOXIKACE KOBALTEM.....	8
3.3 CHELATÁTORY KOVŮ A LÉČBA INTOXIKACE KOBALTEM	12
3.3.1 CHELATUJÍCÍ VLASTNOSTI 8-HYDROXYCHINOLINŮ.....	15
4. CÍL PRÁCE	18
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
5.1 MATERIÁL.....	19
5.1.1 CHEMIKÁLIE.....	19
5.1.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	20
5.1.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	20
5.2 METODICKÝ POSTUP.....	21
5.2.1 PUFRY.....	21
5.2.2 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHELÁTORŮ KOBALTU..	22
5.2.3 LÝZA ČERVENÝCH KRVINEK	24
5.3 MATEMATICKÉ A STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	26
5.3.1 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHELÁTORŮ KOBALTU..	26
5.3.2 LÝZA ČERVENÝCH KRVINEK	26
6. VÝSLEDKY	27
6.1 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHELÁTORŮ KOBALTU.....	27
6.2 LÝZA ČERVENÝCH KRVINEK	37

7. DISKUZE	40
8. ZÁVĚR	44
9. LITERATURA	45

1. SEZNAM ZKRATEK

DMPS - 2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonát

DMSO - dimethylsulfoxid

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová

LDH - laktátdehydrogenáza

Na₂EDTA – disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

Na₂NFDSA – disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové z angl. disodium
salt of 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulphonic acid

NAD⁺ - nikotinamidadenindinukleotid

NaHEPES – sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonové

NFDSA - kyselina 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonová

ROS – reaktivní formy kyslíku z anglického reactive oxygen species

RONS – reaktivní formy kyslíku a dusíku z anglického reactive oxygen and nitrogen
species

SOD – superoxiddismutáza

TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan

2. ÚVOD

Kobalt je esenciální stopový prvek přítomný v lidském těle. Celkové množství kobaltu se u lidí odhaduje na 1,1 mg, přičemž největší množství je ve formě organokovového komplexu vitamínu B₁₂. Narušení kobaltové homeostázy tak nepříznivě ovlivňuje jednotlivé orgánové systémy. Jeho nedostatek může zapříčinit až perniciózní anémii. Nadbytek může vést k systémové toxicitě, která se projevuje různými neurologickými příznaky, hypotyreózou, polycytémií, vznikem astmatu a kardiomyopatií.

Historicky se chlorid kobaltnatý používal k terapii perniciózní anémie, avšak jeho užívání bylo spojeno s občasnými nežádoucími účinky, a proto se tato terapie již nepoužívá. V současné době je jeho užívání omezeno na doplňky stravy, radiologii a homeopatii, kdy je některými homeopatickými lékaři doporučován k léčbě hypersekrece estrogenu. Stále je zneužíván ve sportu jako doping k dosažení lepšího aerobního výkonu.

Kobalt a jeho slitiny jsou dále využívány jako základ ortopedických implantátů, ze kterých se ale za určitých podmínek mohou kovové částice uvolnit a způsobit tak systémovou toxicitu. Byly popsány případy fatální toxicity kobaltu z endoprotézy kyčle. K intoxikacím může však docházet i v průmyslovém prostředí, kde se kobalt používá na barvení skla, keramiky, šperků nebo při zpracování těžkých kovů. Předpokládá se, že k toxicitě kobaltem dochází různými mechanismy, které závisí na interakci volných kobaltnatých iontů s různými cíli, včetně iontových kanálů.

Preferovanou léčbou ke snížení toxických účinků kovů je chelatační terapie. Doposud však nebyl stanoven standardní režim pro odstranění toxického kobaltu ven z těla. Terapie intoxikace kobaltem chelátory zatím nepřinesla jednoznačné výsledky a vyžaduje další studium. Existuje pouze pár kazuistik, kde byla při intoxikaci kobaltem využita chelatační terapie. Cílem mé diplomové práce byla snaha o nalezení účinných chelátorů kobaltu ze skupiny látek odvozených od 8-hydroxychinolinu. Tyto látky jsou známy svými chelatačními účinky.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 FYZIOLOGIE KOBALTU

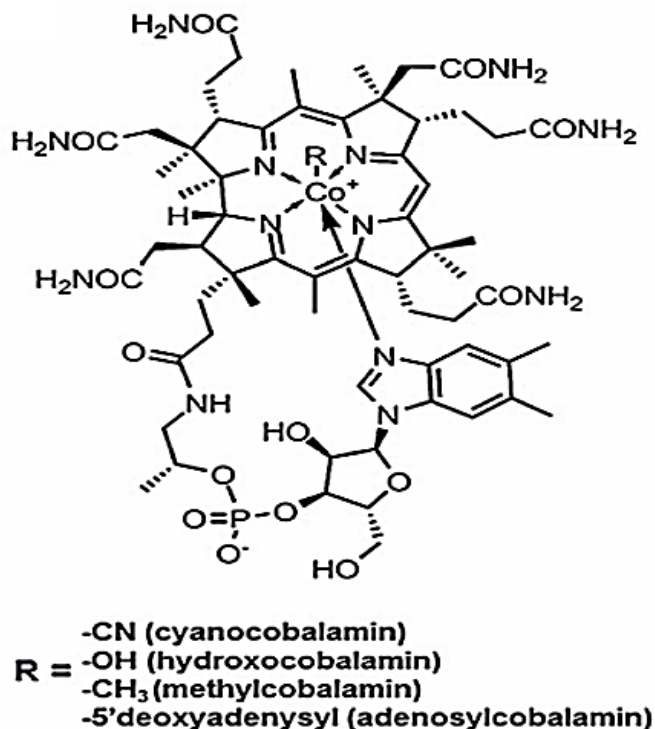
Kobalt je relativně vzácný a málo reaktivní kovový prvek. V suchém ani vlhkém prostředí se za normální teploty neoxiduje. Přirozeně se vyskytuje v mnoha různých chemických formách v celém našem životním prostředí. Je přítomný ve stopových množstvích v rostlinách, půdě, povrchových a podzemních vodách i v naší stravě. Do životního prostředí se uvolňuje také spalováním uhlí a ropy, z výfuků automobilů či letadel a z výrobního průmyslu. Některé radioaktivní izotopy kobaltu, jako je kobalt 60, se používají při léčbě pacientů v nukleární medicíně a ve výzkumu. V periodické tabulce prvků se nachází vedle železa a niklu, proto se vyznačuje podobnými vlastnostmi. Může se vyskytnout v různých oxidačních stupních, a to od +1 do +5. Největší zastoupení mají oxidační čísla +2 a +3, ostatní formy jsou velice vzácné (*Barceloux 1999, Czarnek et al. 2015, Valko et al. 2005*).

3.1.1 VÝZNAM KOBALTU PRO LIDSKÝ ORGANISMUS

Kobalt je jeden ze základních stopových prvků v lidském těle. Může se vyskytovat jak v organické, tak v anorganické formě. Prvně zmiňovaná – organická, je potřebná pro normální fyziologickou funkci lidského těla. Tento esenciální stopový prvek je nezbytnou součástí vitamínu B₁₂ (Obr. 1) neboli kobalaminu. Celkové množství kobaltu se u lidí odhaduje na zhruba 1,1 mg, přičemž až 85 % pochází právě z organokovového komplexu vitamínu B₁₂. Nejvyšší koncentrace jsou v srdci, játrech, ledvinách, slezině a v podstatně menší míře i ve slinivce, mozku a séru (*Czarnek et al. 2015, Paustenbach et al. 2013*). Společně s kyselinou listovou hraje velmi důležitou roli při tvorbě nukleových kyselin a některých aminokyselin. Samostatně je pak nutný k syntéze a udržování myelinové pochvy v nervových buňkách. Neurologické problémy způsobené nedostatkem vitamínu B₁₂ jsou důsledkem poškození myelinové pochvy. Účastní se také jako koenzym při buněčné mitóze a tvorbě neurotransmiterů, které jsou nepostradatelné pro správné fungování organismu. Vitamin B₁₂ je nezbytný pro tvorbu červených krvinek a prevenci perniciózní anémie. Soli kobaltu stimulují tvorbu erythropoetinu (*Czarnek et al. 2015, Leyssens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013, Black 2008*).

Doporučený denní příjem vitamínu B₁₂ pro dospělého člověka je 2,4 µg, z čehož je 0,1 µg tvořeno kobaltem (*Leyssens et al. 2017*). Jeho nadbytek či nedostatek nepříznivě ovlivňuje celý organismus. Nedostatek kobaltu v lidském těle silně souvisí s vitamínem B₁₂. Může zapříčinit perniciózní anémii, hypofunkci štítné žlázy a riziko vzniku vývojových vad u

kojenců. Přičemž přebytek tohoto kovu může naopak zvýšit činnost štítné žlázy a kostní dřeně. To může následně vést ke zvýšené produkci erytrocytů, fibróze v plicích a vzniku astmatu (Czarnek et al. 2017).



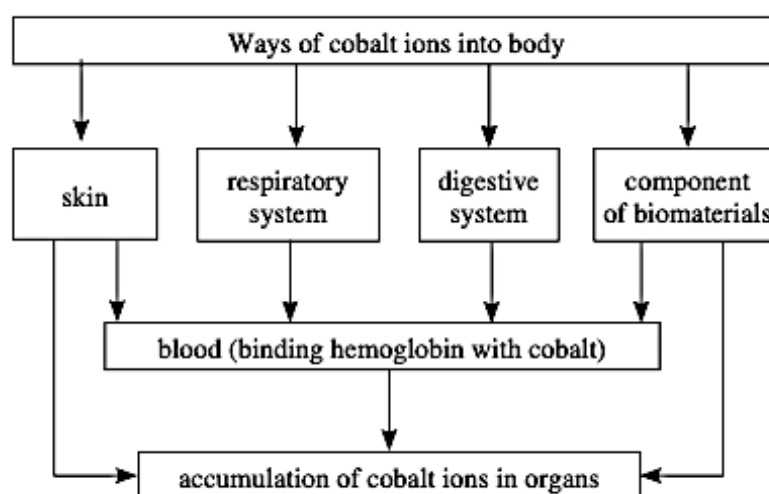
Obr. 1 – Strukturní vzorec vitamínu B₁₂ (kobalaminu). Na obrázku jsou znázorněny čtyři formy vitamínu B₁₂: methylkobalamin a adenosylkobalamin – formy aktivních koenzymů; kyanokobalamin a hydroxykobalamin – formy přijímané dietou a užívané terapeuticky. *Převzato z Okamoto a Eltis (2011).*

Historicky se dlouhou dobu soli kobaltu používaly k léčbě perniciózní anémie. Typické dávky pro dospělé se pohybovaly od 25 do 150 mg chloridu kobaltnatého za den, ale byly podávány i dávky dosahující až 300 mg chloridu kobaltnatého za den (Tvermoes et. al 2013). Terapeutické užívání bylo spojeno s občasnými nežádoucími účinky, primárně s dysfunkcí štítné žlázy u dětí a v menší míře s reverzibilním poškozením zraku a sluchu u dospělých. Terapie anémie solemi kobaltu byla ukončena v 70. letech, kdy byly objeveny účinnější látky. Další využití kobaltu v minulosti je spojeno s pivním průmyslem. Anorganické formy kobaltu se v šedesátých letech využívaly jako stabilizátory pивní pěny. U některých jedinců, zejména silných konzumentů piva, byla diagnostikována kardiomyopatie a porucha diastolické funkce levé komory. Z toho důvodu se již jako stabilizátor nepoužívá. Některými homeopatickými

lékaři je doporučováno podávání chloridu kobaltnatého perorálně po několik týdnů v rozmezí od 0,5-1,12 mg/den k léčbě hypersekrece estrogenu, která se často objevovala u některých žen, podstupujících hormonální substituční léčbu. Stále je zneužíván ve sportu jako doping, přičemž dochází ke výše zmíněné zvýšené syntéze erythropoetinu, a následně ke zvýšení množství erytrocytů v krvi, což vede k lepšímu aerobnímu výkonu (*Paustenbach et al. 2013, Leyssens et al. 2017, Czarnek et al. 2015, Unice et al. 2012, Wright 2005*).

Pro běžnou populaci je strava jedním z hlavních zdrojů expozice kobaltem. Stovky potravin obsahují kobalt v různých koncentracích. Největší množství kobaltu bylo nalezeno v čokoládě, kávě, rybách, ořechách, másle, listové zelenině a v cereáliích. Zato nejvíce vitamínu B₁₂ přijmeme z masných a mléčných výrobků. Kobalt i jiné stopové prvky, které se vyskytují v potravinách, mohou pocházet ze znečištěného životního prostředí nebo ze zpracování a balení potravin. Kromě neúmyslného příjmu kobaltu ve stravě, lidé často suplementují jak kobalt, tak vitamin B₁₂ ve formě doplňků stravy (*Leyssens et al. 2017*). Vitamin B₁₂ najdeme často ve velkém množství i v energetických nápojích (*Tvermoes et al. 2013*).

Potrava však není jediná cesta možného výskytu kobaltu v lidském těle. Kobalt může pronikat také pokožkou, dýchacím systémem nebo jako součást biomateriálů – ortopedických implantátů (Obr. 2). Kobalt a jeho slitiny se používají jako základ ortopedických implantátů již zhruba 40 let (*Czarnek et al. 2015*).



Obr. 2 – Možné cesty proniknutí kobaltu do lidského těla.

Převzato z Czarnek et al. (2015).

3.1.2 FARMAKOKINETIKA KOBALTU

Uvádí se, že gastrointestinální absorpce kobaltu u lidí je přibližně 25 % podané dávky, přičemž interindividuální rozdíly jsou značně velké. Pohybují se mezi 5–95 % v závislosti na několika faktorech, jako je množství požití dávky, rozpustnost sloučeniny a nutriční stav jedince. Podle studie *Christensen et al. (1993)* sloučeniny kobaltu rozpustné ve vodě – např. CoCl_2 jsou mnohem více absorbovány než sloučeniny ve vodě nerozpustné – např. Co_3O_4 . Dle této studie je také pravděpodobné, že ženy, zejména s nižší průměrnou tělesnou hmotností, vykazují rychlejší absorpci kobaltu v porovnání s muži. Nedostatek železa a užívání na lačný žaludek zvyšuje absorpci kobaltu, zato užívání po jídle absorpci kobaltu snižuje. Také u některých aminokyselin je, v důsledku tvorby komplexních sloučenin, absorpce snížena. Mezi iontovými formami Co^{2+} a Co^{3+} není v míře gastrointestinální absorpce značný rozdíl (*Paustenbach et al. 2013, Layssens et al. 2017, Tvermoes et al. 2013*).

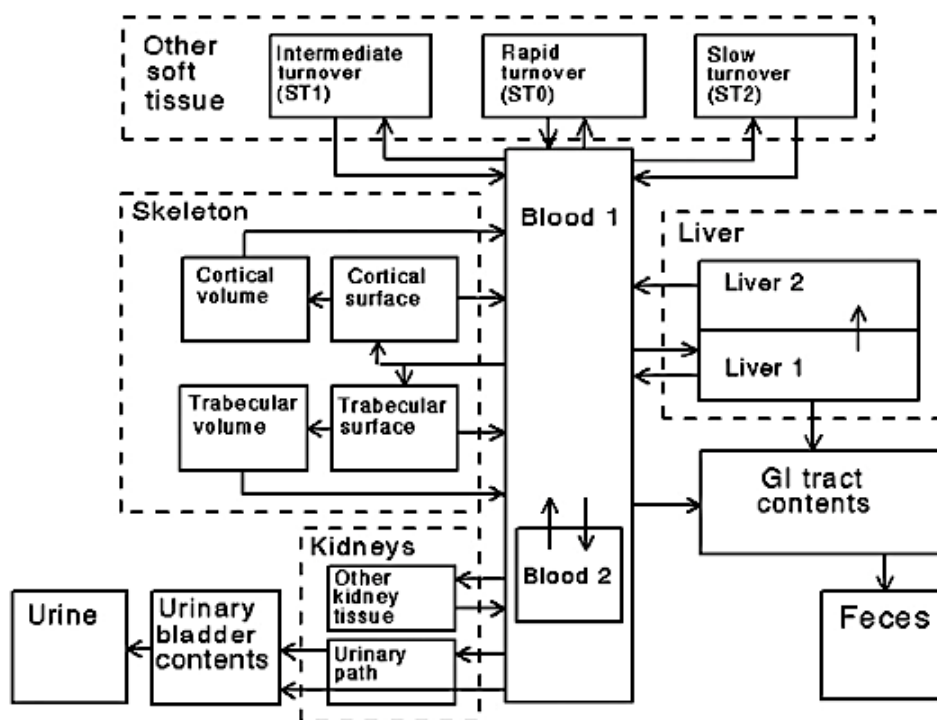
Mechanismus gastrointestinální absorpce pravděpodobně začíná v proximálním jejunu saturovatelným procesem. Kobalt prostupuje přes slizniční mukózu s následným přenosem z enterocytů do krve (*Leyssens et al. 2017*). Železo s kobaltem mají velmi podobné atomové průměry a valenční charakteristiky. Na základě těchto vlastností nejspíše sdílí podobný mechanismus absorpce a dochází ke vzájemné kompetici o vazebná místa. Proto lidé, trpící anémií, nedostatkem železa nebo zvýšenou poptávkou po železe, vykazují zvýšenou koncentraci kobaltu v krvi (*Paustenbach et al. 2013, Leyssens et al. 2017, Meltzer et al. 2010*).

Po následné absorpci kobaltu do krevního řečiště ze všech možných cest (inhalačně, kůží, gastrointestinálním traktem, uvolněním z biomateriálů) dochází k distribuci hlavně do ledvin, jater, srdce a sleziny, v menší míře také do mozku, slinivky břišní, vlasů, kostí a mízy (Obr. 3). V krvi se kobaltnaté ionty váží z 90–95 % na krevní proteiny, zejména na albumin a α_2 -makroglobulin, nevylučuje se ani vazba Co^{2+} iontů na lipoproteiny a haptoglobin. Co^{2+} ionty mají k určitým místům lidského albuminu vázajícím dvojmocné kationty relativně vysokou afinitu, proto je nepravděpodobné, že dojde k významnému vytěsnění kobaltu konkurenčními kovy, pokud jejich koncentrace v krvi nebude vyšší než 1000 $\mu\text{g/l}$. Ionty kobaltité se mohou vázat na transferin a bránit tak navázání železa (*Paustenbach et al. 2013, Czarnek et al. 2015*).

Volná frakce kobaltu v séru se odhaduje na 5–12 % (*Simonsen et al. 2012*). Distribuce a akumulace kobaltu v tkáních závisí především na koncentraci volné frakce v séru. Kobalt vázaný na krevní bílkoviny je biologicky méně dostupný než kobalt volný (*Paustenbach et al. 2013*). Zdá se, že kobalt může přecházet i do červených krvinek. Membránový transportní systém pro příjem kobaltu je sdílen s vápníkem, ale absorpce je v podstatě ireverzibilní, protože kobalt je v cytosolu vázán na hemoglobin a není vylučován vápenatou pumpou zpět. Jeho

eliminace je z krevního řečiště zpomalena pravděpodobně dlouhou životností červených krvinek, která je přibližně 120 dní, což má za následek pomalejší eliminaci kovu z plné krve ve srovnání se sérem (*Simonsen et al. 2012, Finley et al. 2013*). Absorpce kobaltu do červených krvinek v kombinaci s vazbou na sérový albumin, který má průměrný poločas asi 20 dnů, může přispět k pomalejšímu, než očekávanému poklesu koncentrace kobaltu v plné krvi (*Tvermoes et al. 2013*). Po perorálním podání je neabsorbovaný kobalt primárně vylučován stolicí, zatímco kobalt absorbovaný je vylučován hlavně močí a v menší míře také stolicí.

Vstřebávání organického kobaltu se liší od anorganického. Vitamin B₁₂ potřebuje ke vstřebání vnitřní faktor, který vzniká v gastrointestinálním traktu a díky němuž může dojít k následné absorpci. Poté je metabolizován v buňkách na deoxyadenosylkobalamin nebo methylkobalamin, uložen v játrech a následně eliminován močí nebo stolicí (*Paustenbach et al. 2013*).



Obr. 3 - Biokinetický systémový model pro anorganický kobalt: Model zobrazuje recyklaci kobaltu mezi krví a čtyřmi systémovými tkáněmi: játry, ledvinami, kostrou a dalšími tkáněmi. Využívá koeficienty přenosu tkání k zohlednění vylučování a sekrece kobaltu z různých částí těla za předpokladu kinetiky 1.řádu. *Převzato z Legget (2008)*.

3.2 INTOXIKACE KOBALTEM

K intoxikaci kobaltem dochází při jeho nadměrné expozici. Vyskytuje se hlavně v průmyslovém prostředí, kde se kobalt používá na barvení skla, keramiky, šperků a je obsažen v nátěrových barvivech. Jeho slitiny se využívají na výrobu leteckých motorů, magnetů, umělých kloubů a zubních implantátů. Pracovníci, zabývající se těžbou, tavením, svařováním, rafinací kovů a broušením diamantů, mohou podléhat vyšším úrovním expozice (*Permenter et al. 2013, Leyssens et al. 2017*).

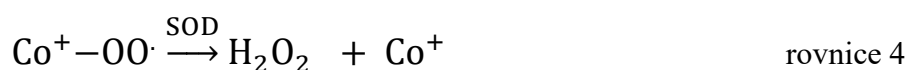
Anorganické formy kobaltu přítomné v iontové formě jsou pro lidské tělo toxické. Čím déle se v těle ukládají, tím více změn v buňkách způsobují (*Czarnek et al. 2015*). Předpokládá se, že k toxicitě kobaltem dochází rozdílnými mechanismy, které závisí na interakci volných kobaltnatých iontů s různými cíli, včetně iontových kanálů. Mezi tyto mechanismy na molekulární úrovni patří: tvorba reaktivních forem kyslíku s peroxidací lipidů; alterace homeostázy vápníku a železa; přerušení mitochondriální funkce; přerušení příjmu jódu štítnou žlázou; interakci se signálním systémem spouštějícím erythropoézu; indukci genotoxických účinků a možné přerušení opravných procesů DNA. Zapojení popsanych mechanismů závisí na koncentraci kobaltu v krvi nebo v tkáních (*Paustenbach et al. 2013, Leyssens et al. 2017*).

Systémové toxické účinky mohou nastat, pokud se ionty kobaltu ve vysoké koncentraci dostanou do krve, lymfatického oběhu a následně se rozšíří do různých orgánů. *In vitro* experimenty prokázaly, že primární toxickou formou pro systémovou toxicitu je ionizovaný kobalt Co^{2+} . Konkrétně se jedná o volné Co^{2+} ionty, které jsou biologicky dostupnější k vazbě na buněčné receptory, iontové kanály a biomolekuly než Co^{2+} ionty vázané na krevní bílkoviny. Některé chorobné stavy (např. selhání ledvin, nedostatek železa, sepse, podvýživa, alkoholismus) nebo příjem léků mohou snížit vazbu kobaltu na albumin a tím zvýšit množství volných Co^{2+} , což v konečném důsledku vede k toxickým projevům i při nižších dávkách (*Leyssens et al. 2017*).

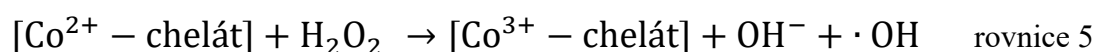
Narušení homeostázy kovových iontů může vést k oxidačnímu stresu. Jedná se o stav, kdy zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) přemůže antioxidační ochranu těla a následně způsobí poškození DNA, peroxidaci lipidů, modifikaci proteinů a další účinky, které mohou být příčinou četných onemocnění. Mechanismy vzniku ROS zahrnují Fentonovu reakci s tvorbou hydroxylového radikálu [rovnice 1] a tvorbu superoxidového radikálu (Obr. 4). Principem je fakt, že kobalt podléhá redoxním reakcím (*Valko et al. 2005, Jomova a Valko 2011, Paustenbach et al. 2013*).



Detailnější experimenty ukázaly, že částice kobaltu v suspenzi s peroxidem vodíku prostřednictvím Fentonovy reakce nereagují [rovnice 2]. V přítomnosti kyslíku vzniká radikálový meziprodukt $Co^+ - OO\cdot$ [rovnice 3]. Tento meziprodukt se v přítomnosti enzymu superoxidodismutázy (SOD) rozkládá na Co^+ a H_2O_2 [rovnice 4]. Dále probíhá již zmíněná Fentonova reakce [rovnice 1].

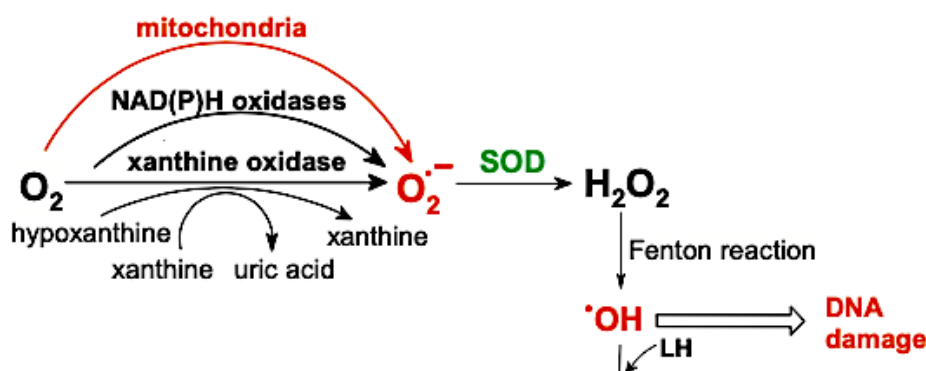


S ohledem na chemické vlastnosti jsou však kobaltnaté ionty špatně reaktivní. Milimolární koncentrace Co^{2+} a peroxidu vodíku použité k *in vitro* studiu těchto reakcí nebudou pravděpodobně pozorovány v *in vivo* podmínkách, s výjimkou snad pouze lysosomů. *In vitro* studie uvádějí, že samostatný Co^{2+} negeneruje účinně hydroxylové radikály z peroxidu, ale jinak tomu je u kobaltu vázaného na určité organické ligandy. Tyto biologické chelátory, jako je glutathion, mění oxidační potenciál Co^{2+} a mohou zvýšit tvorbu hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku [rovnice 5]. Přechod glutathionu a dalších chelátorů z antioksidančního na prooxidanční působení, který je zprostředkován ionty kobaltu (a také jinými kovy), může vysvětlit následné poškození buněk (*Hanna et al. 1992, Leonard et al. 1998, Shi et al. 1993, Paustenbach et al. 2013, Valko et al. 2005*).



Rozpustné a nerozpustné sloučeniny kobaltu mohou být vystaveny reakcím typu Fenton v lysosomálních kompartmentech makrofágů, v důsledku obranných mechanismů těla, za účelem eliminace cizích částic. Makrofágové buňky mohou pohlcovat nerozpustné částice kobaltu a využívat peroxid vodíku a další lysosomální složky k pokusu o rozpuštění cizích částic. Za určitých podmínek mohou tyto reakce typu Fenton vést k produkci ROS a peroxidaci

lipidů, které mohou makrofágy funkčně poškodit a/nebo způsobit jejich lýzu. Jak je vidět v některých makrofágových *in vitro* testech, ROS by dále mohly vést k oxidaci proteinů, což by potenciálně vedlo k jejich poškození a denaturaci (Caicedo et al. 2010, Petit et al. 2005). Toxikologický význam těchto reakcí je však nejasný kvůli vysokým koncentracím Co^{2+} a peroxidu vodíku, požadovaným pro tyto reakce (Paustenbach et al. 2003).



Obr. 4 – Schéma popisující tvorbu superoxidového radikálu a Fentonovu reakci s tvorbou hydroxylového radikálu: Schéma ukazuje, že superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$) vzniká několika patofyziologickými reakcemi, ale poměrně rychle je odbouráván enzymem superoxidodismutázou (SOD) za vzniku peroxidu vodíku. Vzniklý peroxid vodíku je Fentonovou reakcí, která je katalyzována kovy (Co^{2+} , Fe^{2+} aj.), přeměněn na hydroxylový radikál, který je pro lidské tělo toxický a jak je na schématu patrné, může poškodit DNA. Upraveno dle Jomova a Valko (2011).

Systémová toxicita kobaltem se projevuje jako klinický syndrom s proměnlivým projevem endokrinních, kardiovaskulárních a neurologických příznaků. Podle biokinetického modelu je koncentrace kobaltu v krvi okolo 300 $\mu\text{g/l}$ obvykle spojena s reverzibilními endokrinními a hematologickými nežádoucími účinky. Při vyšších koncentracích se mohou vyskytnout již závažnější kardiologické či neurologické nežádoucí účinky. Nicméně široká škála hladin kobaltu u různých symptomatických pacientů naznačuje, že klinický obraz mohou ovlivnit i další faktory. Proto nebyla stanovena „prahová“ koncentrace kobaltu, nad kterou je známo, že se projevují toxické účinky a měla by být přijata terapeutická opatření (Leyssens et al. 2017).

Otrava kobaltem může zasáhnout různé orgánové systémy. K podstatnému příjmu kobaltu dýchacím systémem dochází zejména u lidí, kteří jsou zaměstnáni v průmyslu těžkých

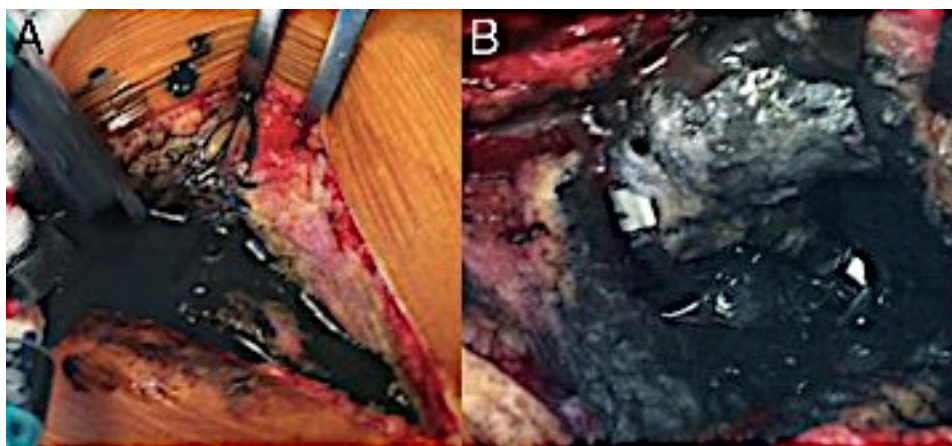
kovů. Částice kobaltu a jiných kovů pronikají do horních a dolních dýchacích cest a jsou transportovány v závislosti na jejich velikosti. Velké částice jsou spolknuty a dostávají se do jícnu, ale ty menší procházejí endotelovými buňkami plic, což může způsobit pneumokoniózu, astma z povolání a fibrózu plic. Riziko rakoviny plic je spojeno hlavně s kombinací kobaltu a karbidu wolframu (Smith et al. 2014, Czarnek et al. 2015, Leyssens et al. 2017). Jedním z nejčastějších onemocnění z povolání je alergická kontaktní dermatitida, kterou způsobuje hlavně kobalt, nikl a chrom (Czarnek et al. 2015).

Neurotoxicita, související s kobaltem, může způsobit jak periferní, tak centrální poškození. Ta pravděpodobně vycházejí ze schopnosti kobaltu překonat hematoencefalickou bariéru a ukládat se v mozku. Mezi příznaky otravy může patřit porucha sluchu, zraku, rovnováhy, kognitivních funkcí, sensorický i motorický deficit a polyneuropatie. Po ukončení expozice kobaltem se většina neurologických příznaků začne zlepšovat nebo úplně vymizí. Mezi další příznaky otravy kobaltem patří vznik strumy, porucha metabolismu hormonů štítné žlázy, polycytémie, erytrocytóza a atrofie varlat (Smith et al. 2014, Czarnek et al. 2015, Leyssens et al. 2017).

Jak již bylo zmíněno, toxický potenciál kobaltu na kardiovaskulární systém byl poprvé objeven v 60. letech v pivním průmyslu. Soli kobaltu – chlorid a síran kobaltnatý se využívaly jako stabilizátory pивní pěny. U některých silných konzumentů byla diagnostikována kardiomyopatie, charakterizována zvětšením srdce, selháním levé komory, perikardiálním výpotkem i rozsáhlými intracelulárními změnami. Toto onemocnění je zpočátku reverzibilní, ale zato rychle progresivní a může skončit až smrtí (Smith et al. 2014, Czarnek et al. 2015, Leyssens et al. 2017, Okomoto a Eltis 2011, Jomova a Valko 2011, Paustenbach et al. 2013).

Nedávno byly popsány případy fatální toxicity kobaltu z ortopedických implantátů (Obr. 5), zejména z kyčelních protéz, s významnou morbiditou a mortalitou. Většina hlášených případů byla spojena s opotřebením protéz typu kov na kov a zlomením keramických součástí, které vedly k uvolnění těžkého kovu a k systémové toxicitě (Fox et al. 2016, Pelclova et al. 2012, Campbell a Estey 2013). Kyčelní protézy typu kov na kov se skládají převážně z kobaltu (64 %) a chrómu (28 %), ale mohou obsahovat i malé množství jiných kovů (0,2 – 7 %). Ionty kobaltu a chrómu mohou být uvolňovány důsledkem dvou procesů – třením mezi kloubními plochami za vzniku četných opotřebovaných nanočástic nebo koroze kovových povrchů a opotřebovaných částic. Aktuálně dostupné údaje naznačují, že koncentraci kobaltu v krvi lze použít jako screeningový nástroj pro monitorování systémové odpovědi na kobalt u pacientů s implantáty kyčelního kloubu. Pacienti, kteří vykazují příznaky potenciálně související s polycytémií, hypotyreózou nebo srdeční dysfunkcí, by měli být klinicky vyšetřeni počínaje

koncentracemi kobaltu v krvi nebo séru nad 100 µg/l. Tato koncentrace je odvozena z analýz, zohledňujících nejnižší dávku navozující nežádoucí reakce a nejvyšší dávkou v souboru tyto reakce nenavozující. To by mělo adekvátně zohlednit interindividuální variabilitu, protože data byla shromážděna u relativně různorodého souboru exponovaných pacientů a dobrovolníků (Paustenbach et al. 2013, Leyssens et al. 2017).



Obr. 5 – Infiltrace periartikulární tkáně kovovými částicemi: A – periartikulární tkáň inklinována kovovými částicemi; B – velká infiltrace periartikulární tkáně kovovými částicemi v okolí kovové hlavice kyčelního kloubu. Převzato z Pelayo-de Tomás et al. (2017).

3.3 CHELATÁTORY KOVŮ A LÉČBA INTOXIKACE KOBALTEM

Chelatační terapie je preferovanou léčbou ke snížení toxických účinků kovů. Pojem chelatace pochází z řeckého „chelé“, znamenající klepeto. Termín chelát byl poprvé použit v roce 1920 sirem Gilbertem T. Morganem a H. D. K. Drewem (Kim et al. 2019, Flora a Pachauri 2010).

Princip chelatace je založen na jednoduché koordinační chemii a tvorbě koordinačně kovalentních vazeb. Chelatační činidla jsou organické nebo anorganické sloučeniny, schopné vázat se na toxické kovové ionty za vzniku složitých kruhových struktur zvané „cheláty“. Tyto cheláty se následně snadno vylučují z těla. Ve své struktuře obsahují specifické ligandy, které při tvorbě chelátů zaujímají roli donorů elektronového páru. Typickými ligandy jsou atomy dusíku, kyslíku a síry ve formě různých funkčních skupin. Každý kov má s ligandem jinou reaktivitu, tudíž je pro každý kov zapotřebí specifické chelatační činidlo. Vysoká dávka chelataujícího činidla může náhle v systémové cirkulaci zvýšit hladinu toxického kovu a způsobit přechodné zhoršení stavu pacientů. Během léčby je důležité poskytovat příslušnou

dávku léčiva v pravidelných intervalech podle koncentrace kovu, aby při delší terapii nedocházelo ke snížení koncentrace esenciálních kovů. V průběhu chelatační terapie je u některých pacientů hlášeno zhoršení zdravotního stavu. Mezi běžné nežádoucí účinky patří horečka, nevolnost, bolest hlavy, vysoký či nízký arteriální krevní tlak, gastrointestinální potíže a bolest svalů. Mezi závažné nežádoucí účinky patří srdeční selhání, dýchací potíže, respirační selhání, nízký arteriální krevní tlak, trvalé poškození ledvin, křeče nebo záchvaty a nízký obsah vápníku v krvi (*Kim et al. 2019, Smith 2013, Sears 2013, Flora a Pachauri 2010, Aaseth et al. 2015*).

Ideální chelátor by měl tvořit chemicky inertní a netoxické komplexy s atomy či ionty kovů. Kromě toho by měla vhodná chelatační činidla 1) vylučovat z těla daný kov bez jakékoli další interakce s životně důležitými kovy, 2) mít schopnost vstoupit do cytosolu buněk za účelem odstranění intracelulárních toxických kovů, 3) zachovat si své chelatační vlastnosti při pH tělních tekutin. Rozpustnost ve vodě usnadňuje transport v krvi a vylučování ledvinami. V případě neurotoxicity je preferováno činidlo lipofilní s nízkou molekulovou hmotností, z důvodu lepšího přestupu přes hematoencefalickou bariéru. Lipofilní chelátor může být také vylučován ve větším množství žlučí (*Kim et al. 2019, Smith 2013, Sears 2013, Flora a Pachauri 2010*).

Již doposud nebyl stanoven standardní režim pro odstranění toxického kobaltu ven z těla (*Pelclova et al. 2012*). Existuje pouze pár kazuistik, kde je využita chelatační terapie při intoxikaci kobaltem. V jednom z případů byla otrava kobaltem léčena ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA). Terapie byla kombinována s revizí a náhradou kyčelní endoprotézy. Došlo ke krátkodobému snížení hladin kobaltu v plazmě a zvýšenému vylučování močí, avšak přibližně po třech dnech došlo k opětovnému navýšení plazmatických hladin kobaltu (*Pazzaglia et al. 2011*). Ve studii od *Waters et al. (2001)* byla chelatační terapie pomocí EDTA zkoumána u různých těžkých kovů. Významně zvýšené ztráty močí, jak tomu bylo např. u olova, kadmia a zinku, v této studii u kobaltu prokázány nebyly. Veškerý kobalt, vylučovaný z těla po chelatační terapii EDTA, lze vysvětlit přidáním vitamínu B₁₂ do chelatačního roztoku (*Waters et al. 2001*). V kazuistice, kterou uvádí *Pelclova et al. (2012)* byl využit k chelatační terapii 2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonát (DMPS). Došlo ke zvýšenému vylučování kobaltu močí (Tab. 1). Jeden měsíc po zahájení léčby DMPS poklesl sérový kobalt na přibližně 26 % původní hladiny. Léčba byla prováděna v kombinaci s revizí a náhradou endoprotézy kyčle. Během chirurgického zákroku byla ale opětovně zaznamenána metalóza. 21 měsíců po zahájení terapie byly hladiny kobaltu v moči stále podstatně zvýšeny ve srovnání s referenčními hodnotami (Tab. 1). V průběhu léčby došlo ke zlepšení některých klinických

příznaků, chelatační terapie vedla ke zjevnému prospěchu, ale průběh nebyl zcela podle očekávání. U pacienta došlo navzdory chelatační terapie k přetrvávající ztrátě sluchu. Zkušeností s intoxikací kobaltem je relativně málo a optimální dávkování a standardní přístup není zatím zcela znám (Pelclova et al. 2012). Terapie intoxikace kobaltem je nejednotná. Informace o pacientech, podstatné ke klinickému rozhodování, jsou také nedostačující. Indikace pro chelatační terapii taktéž stanoveny nebyly a vyžadují další studium (Devlin et. al 2013).

Table 1. Urine concentrations ($\mu\text{g/L}$) before, during, and after the treatment with 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate (DMPS).

Date of urine collection (day.month.year)	16.2.2010	23.2.2010	26.2.2010	28.2.2010	23.4.2010	3.6.2010	1.12.2010	22.11.2011	Reference values of the laboratory ($\mu\text{g/L}$)
DMPS	Pre-treatment ($\mu\text{g/L}$)	Treatment ($\mu\text{g/L}$)			Post-treatment ($\mu\text{g/L}$)				
Cobalt	138.6	194	305	184	76.7	31.1	19.3	25.7	0.1–0.6

Tab. 1 – Tabulka poukazuje na zvýšenou koncentraci kobaltu v moči po zahájení chelatační terapie. Před začátkem léčby byla koncentrace kobaltu v moči 138,6 $\mu\text{g/l}$, po zahájení léčby došlo k zvýšenému vylučování kobaltu močí, koncentrace kobaltu v moči vzrostla až na 305 $\mu\text{g/l}$. Po 21 měsících, tj. 22.11.2011 (viz tabulka) by měla být ideální koncentrace kobaltu v moči dle referenčních hodnot. Nadále zvýšená koncentrace kobaltu v moči značí stálý výskyt kobaltu v séru. *Upraveno dle Pelclova et al. (2012).*

Jako jedna z dalších možností namísto chelatační terapie může být použita léčebná výměnná plazmaferéza, při které dochází k oddělování krevní plazmy od krevních buněk. Jelikož je kobalt vázán na albumin, je pravděpodobné, že plazmaferéza může snížit hladinu kobaltu a pomoci tak v lékařské terapii jako doplňková léčba. Avšak studie prokázala, že pokles hladin kobaltu byl pouze dočasný a plazmatická koncentrace kobaltu u pacienta se během osmi hodin vrátila ke koncentraci před léčbou. Tento rebound fenomén je pravděpodobně způsoben rychlostí, s jakou se navozuje rovnováha kobaltu mezi extravaskulární tkání a intravaskulárním prostorem. Z toho vyplývá, že bez důkladného chirurgického odstranění korodujících kovových zbytků implantátů, je ošetření terapeutickou výměnou plazmy marné. Jako doplňková léčba se používá hlavně u pacientů, jejichž hladiny kobaltu zůstávají vysoké po explantaci protézy a zejména u pacientů se selháváním ledvin, u nichž je chelatační terapie kontraindikována (Grant et al. 2016).

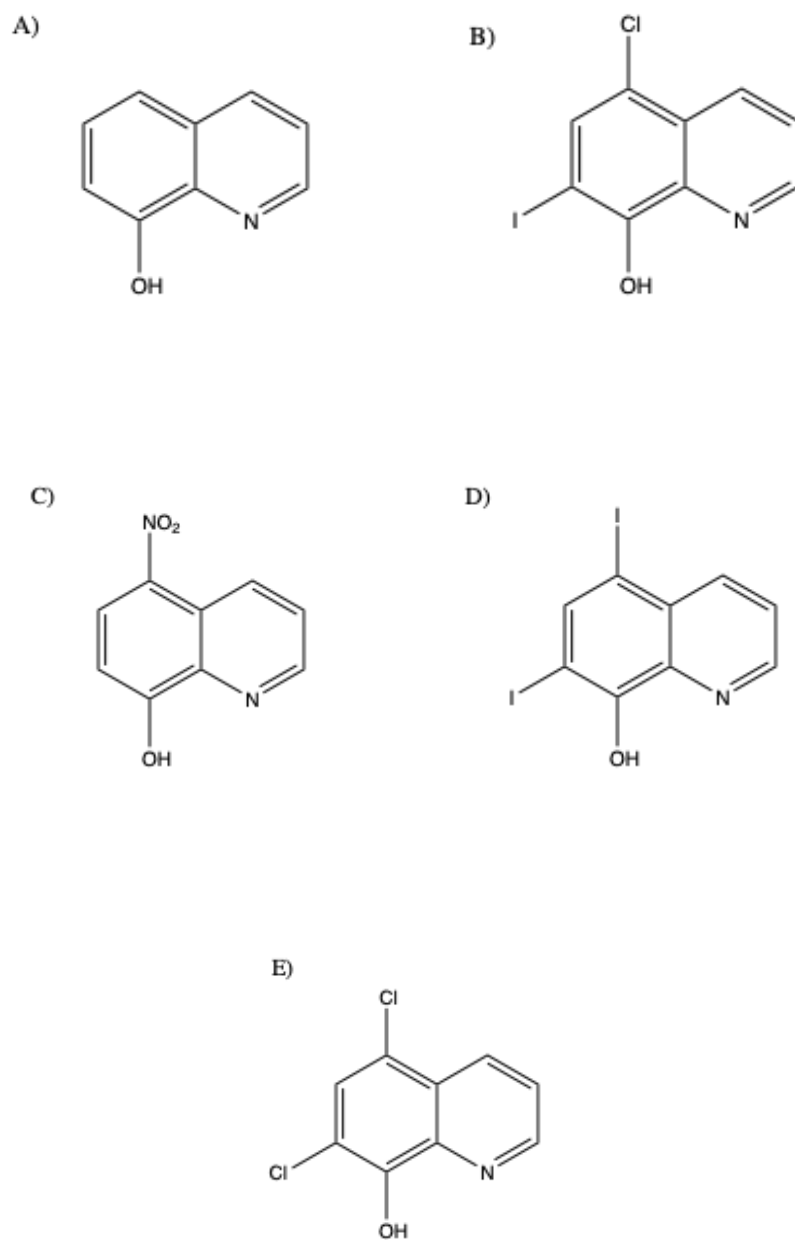
3.3.1 CHELATUJÍCÍ VLASTNOSTI 8-HYDROXYCHINOLINŮ

8-hydroxychinolin a jeho deriváty (Obr. 6) jsou malé planární molekuly s lipofilním účinkem a neselektivní chelatační schopností. Tyto heterocyklické sloučeniny váží ionty kovů prostřednictvím donorových atomů kyslíku a dusíku. Substituované halogeny mění vlastnosti 8-hydroxychinolinů, zvyšují lipofilitu molekuly a jsou tedy vhodné pro přechod hematoencefalickou bariérou do mozku. Podle experimentálních studií se vyznačují rozmanitou biologickou aktivitou, jako je neuroprotektce, protirakovinná, antibakteriální, antioxidantní, antidiabetická, protizánětlivá a protiplísňová aktivita. Dosud bylo zkoumáno několik chelatačních činidel z hlediska jejich potenciálu k léčbě neurodegenerace. Bylo zjištěno, že řada 8-hydroxychinolinových derivátů vykazovala největší potenciál pro léčbu neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a roztroušená skleróza. Zejména klichinol (5-chloro-7-iodochinolin-8-ol) dosáhl pilotní klinické studie II. fáze. Bylo zjištěno, že účinně prochází hematoencefalickou bariérou a rozpouští amyloidní plaky v mozku. I přesto je jeho použití v klinické praxi limitováno z důvodu neurotoxicity. Mechanismus toxicity není přesně znám, současná hlavní hypotéza udává, že klichinol snižuje biologickou dostupnost vitamínu B₁₂. Tento nežádoucí jev lze však zmírnit dostatečnou suplementací vitamínu B₁₂ a podáváním co nejmenší terapeuticky účinné dávky chelatačního činidla. Alzheimerova choroba souvisí hlavně s dysregulací iontů mědi, železa, zinku a hliníku. 8-hydroxychinoliny byly testovány právě primárně na zmíněných kovech (*Prachayasittikul et al. 2013, Oliveri a Vecchio 2016, Budimir 2011, Říha et al. 2013*).

Dalším derivátem ze skupiny 8-hydroxychinolinů je nitroxolin (8-hydroxy-5-nitrochinolin). Používá se jako širokospektrální antibakteriální látka k léčbě a profylaxi běžně se vyskytujících infekcí močových cest. Způsob antibakteriálního a antifungálního působení pravděpodobně souvisí s chelatační schopností nitroxolinu a jeho vazby na dvojmočné kationty. Nitroxolin váže Mg²⁺ ionty přítomné ve vnější bakteriální membráně, bakteriální povrch se tak stává hydrofobním a dochází ke snížení přilnavosti bakterií k povrchu močových cest. Nitroxolin vykazuje především bakteriostatický účinek, který je zvýšen v kyselém pH moči. V poslední době si získal pozornost zejména díky své protinádorové aktivitě. Protinádorový účinek se projevuje zejména prostřednictvím zvyšující se hladiny reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) v buňkách. Nitroskupina je zdrojem dusíkatých radikálů, které iniciují redoxní reakce. Důsledkem zmíněných dějů dochází ke změně intracelulární signalizace, což vede k antiangiogenezi a inhibici růstu nádorových buněk. Tyto účinky jsou navíc zesíleny Cu²⁺ ionty. Na rozdíl od klichinolu je jeho protinádorová aktivita silnější, a naopak působí méně

neurotoxicky, než zmíněný kliočinol (*Prachayasittikul et al. 2013, Oliveri a Vecchio 2016, Wijma et al. 2018*).

Díky antiprotozoární aktivitě se další z derivátů – jodočinol (5,7-dijodočinolin-8-ol) využíval jako perorální léčivo k eliminaci cyst *Entamoeba histolytica*. Působí jako chelátor železnatých iontů, které jsou nezbytné pro metabolismus améb, ale přesný mechanismus účinku není znám. V nedávné *in vitro* studii od *Abutaleb a Seleem (2020)* byl jodočinol testován na velké skupině různých kmenů *Clostridia difficile* jako slibný antiklostridiální lék. Bylo zjištěno, že vykazuje baktericidní aktivitu při velmi nízkých, klinicky dosažitelných koncentracích, a to dokonce rychleji, než používaná antibiotika vankomycin a metronidazol. Na rozdíl od zmíněných antibiotik neovlivňuje střevní mikroflóru. Jodočinol se tak jeví jako nový potenciální antiklostridiální lék, avšak je potřeba dalších *in vivo* studií k ověření výsledků studií *in vitro* (*Abutaleb a Seleem 2020*). V další recentní studii od *Yuan et al. (2020)* bylo zjištěno, že jodočinol vykazuje anti-SARS-CoV-2 aktivitu při nízkých mikromolárních koncentracích. Jelikož se špatně vstřebává do oběhového systému, preferuje se tak inhalační podání, avšak perorální užití má také své opodstatnění. Na modelu křečka infikovaného SARS-CoV-2 bylo upozorováno, že střeva zvířat vykazovala těžký zánět s detekovatelnou virovou RNA a dokonce infekčními virovými částicemi. Tato zjištění ukázala, že potenciálním zdrojem infekce u COVID-19 mohou být také výkaly. Místní a systémové účinky by měly být hodnoceny v dalších detailnějších studiích, ideálně ve vhodných *ex vivo* lidských orgánových kulturách, zvířecích modelech a klinických studiích (*Yuan et al. 2020*).



Obr. 6 – Strukturní vzorce 8-hydroxychinolinu a jeho derivátů: a) 8-hydroxychinolin, b) kliočinol, c) nitroxolin, d) jodočinol, e) chloroxin. *Vzorce byly kresleny v programu ChemDraw 19.1.*

4. CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla snaha o nalezení účinných chelátorů kobaltu. Jako modelové sloučeniny byly vybrány deriváty 8-hydroxychinolinu, protože se jedná o známé chelátory.

Vedlejšími cíli práce bylo:

- a) Zjistit, které strukturní předpoklady zvyšují účinnost chelatace u dané skupiny 8-hydroxychinolinů.
- b) Ověřit na biologickém modelu, zda se chelatace kobaltu projeví na lýze erytrocytů v přítomnosti kobaltu.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MATERIÁL

5.1.1 CHEMIKÁLIE

- chlorid kobaltnatý (CoCl_2)
- spektrofotometrický indikátor kobaltu:
 - disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové (Na_2NFDSA)
- testované látky:
 - 8-hydroxychinolin
 - kliočinol
 - jodočinol (Toronto Research Chemicals, Kanada)
 - chloroxin
 - nitroxolin
- chemikálie pro přípravu pufrů a další látky:
 - octan sodný
 - kyselina octová
 - kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová (HEPES) a její sodná sůl (NaHEPES)
 - glukosa
 - Triton X
 - disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA)
 - dithiotreitol
 - nikotinamidadeninukleotid (NAD^+)
 - tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)
 - heparin 5000 IU/ml byl zakoupen jako originální registrovaný preparát od Zentivy (ČR)
 - fyziologický roztok byl zakoupen jako originální registrovaný preparát od B.Braun (Německo)

Pokud není uvedeno jinak, tak všechny výše zmíněné látky byly zakoupeny od Sigma-Aldrich v Německu.

- rozpouštědla:
 - dimethylsulfoxid (DMSO) – Lach-Ner (ČR)
 - superčistá voda byla připravena pomocí přístroje Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

5.1.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- spektrofotometr Helios gama (Spectronic Unicam, Spojené Království)
- spektrofotometr pro mikrotitrační destičku Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Vermont, USA)
- analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- vortex mixér IKA® Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- třepačka pro mikrotitrační destičky IKA® MS 3 digital (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- automatické jednonábové pipety (Brand, Německo): 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl
- vícekanálová pipeta (Biohit, Německo): 30-300 µl
- semi-mikro polystyrenové UV kyvety (BrandTech Scientific Inc, Spojené Království)
- mikrotitrační destičky – 96 jamek (Brand, Německo)
- mikrozkušavky – 1,5 ml, 2,0 ml (Eppendorf, Německo)
- špičky k pipetám o objemu 200 µl, 1000 µl a 5 ml (Eppendorf, Německo)
- zkumavky centrifugační – 15 ml a 50 ml (Brand, Německo)
- centrifuga VWR Compact Star CS4 (VWR International Ltd, Spojené Království)
- centrifuga MIKRO 22R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Německo)
- spektrofotometr TECAN Infinite M200PRO (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko)
- inkubátor Hood TH 15 (Edmund Bühler GmbH, Německo)

5.1.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Pro některé pokusy byla využita potkaní krev (samci kmene Wistar: Han, VELAZ, s.r.o., ČR), získaná jako vedlejší produkt z experimentů, kdy se využívá potkaní aorta na testování vasodilatačních účinků (schválený projekt MŠMT-4937_2019-9).

5.2 METODICKÝ POSTUP

5.2.1 PUFRY

- Pufry o pH 4,5 a 5,5 byly vodnými roztoky octanu sodného a kyseliny octové. Konkrétně tyto acetátové pufry obsahovaly vždy 15 mM octanu sodného a 27,3 mM kyseliny octové (pH 4,5), respektive 2,7 mM kyseliny octové (pH 5,5).
- Pufry o pH 6,8 a 7,5 byly vodnými roztoky HEPES a její sodné soli. Konkrétně tyto pufry obsahovaly vždy 15 mM NaHEPES a 71,7 mM HEPES (pH 6,8), respektive 14,3 mM HEPES (pH 7,5).
- Fosfátový pufr obsahoval 8,5 % 200 mM roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného KH_2PO_4 a 91,5 % 200 mM roztoku hydrogenfosforečnanu draselného K_2HPO_4 . Jeho výsledné pH bylo 7,8.
- Reakční pufr byl vodným roztokem 40 mM laktátu, 6 mM NAD^+ a 0,1M TRIS. Výsledné pH pufru bylo 8,9.
- Lyzační pufr byl vodným roztokem 200 mM fosfátového pufru, 10 % Tritonu X, 0,1M Na_2EDTA a 1 M dithiotreitolu.

5.2.2 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHELÁTORŮ KOBALTU

Před experimentem:

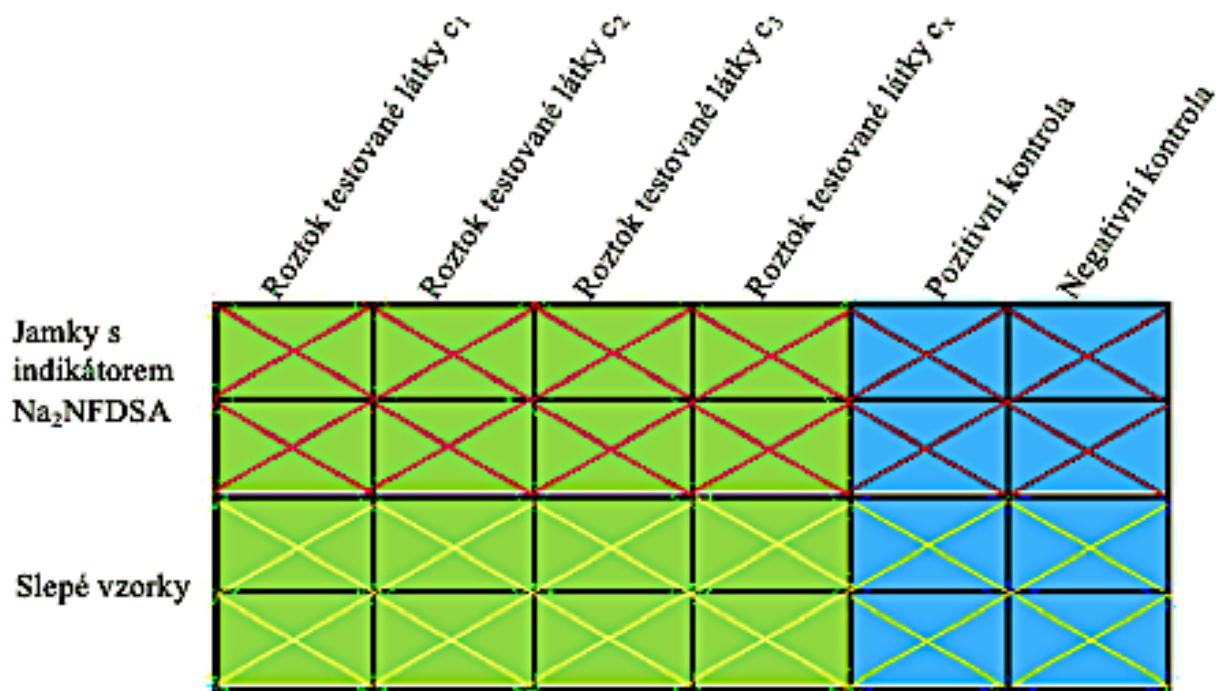
Bylo potřeba připravit zásobní roztoky

- Základní roztok chloridu kobaltnatého (CoCl_2) o koncentraci 5 mM. Roztok byl připraven rozpuštěním navážky CoCl_2 (M_w 129,84 g/mol) v potřebném objemu superčisté vody.
- Indikátor disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové (Na_2NFDSA). Navážka Na_2NFDSA (M_w 377,25 g/mol) byla rozpuštěna v superčisté vodě, aby výsledná koncentrace byla 5 mM.
- Tyto roztoky byly dále v experimentu naředěny na požadované koncentrace.

Provedení experimentu:

Do všech jamek mikrotitrační destičky jsem postupně napipetovala (Obr.7):

- 150 μl příslušného pufru (pH 4,5; 5,5; 6,8 nebo 7,5).
- 50 μl testované látky v požadovaných odlišných koncentracích (c_1 - c_x) a do jamek kontrolních (poslední dva sloupce) 50 μl rozpouštědla DMSO, jakožto rozpouštědla chelátorů.
- 50 μl 300 μM vodného roztoku kobaltnatých iontů vyjma poslední jamky (negativní kontrola), do které jsem napipetovala 50 μl superčisté vody.
- Destička byla následně po dobu dvou minut vložena do třepačky a nechala se intenzivně protřepat, přičemž došlo k případné interakci mezi ionty kobaltu a testovanou látkou (chelátorem) a možnému vzniku komplexu.
- Volné kobaltnaté ionty, které se na chelátor nenašly, se následně prokázaly reakcí s indikátorem Na_2NFDSA – 50 μl jeho 300 μM roztoku v superčisté vodě. Indikátor jsem přidala do prvních dvou řad mikrotitrační destičky, do druhých dvou řad – série slepých vzorků, byla přidána superčistá voda (pipetovala se jako první před přidáním indikátoru).
- Následně jsem destičku vložila do spektrofotometru a měřila absorbanci.
- Byla provedena dvě měření u dvou vlnových délek 490 nm a 540 nm, a to v čase 0 a 5 minut.
- Celý postup jsem zopakovala se všemi zmíněnými pufrů.



Obr. 7 – Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace kobaltnatých iontů: Ve všech jamkách je 150 μl příslušného pufru a 50 μl roztoku Co^{2+} iontů, kromě posledního sloupce, kde je namísto Co^{2+} iontů superčistá voda. V **testovaných jamkách** je 50 μl testované látky v odlišných koncentracích (c_1 - c_x) a v **kontrolních jamkách** 50 μl rozpouštědla (DMSO). V prvních dvou řadách je 50 μl indikátoru, roztoku Na_2NFDSA (x), v dalších dvou řadách – slepých vzorcích je 50 μl rozpouštědla, superčisté vody (x).

5.2.3 LÝZA ČERVENÝCH KRVINEK

Před experimentem:

- Bylo potřeba připravit základní roztok chloridu kobaltnatého (CoCl_2) o koncentraci 5 mM. V tomto případě byl rozpouštědlem fyziologický roztok.
- Nachystat si přehřátý 1 mM roztok glukosy ve fyziologickém roztoku a samotný fyziologický roztok na 37°C .
- Připravit lyzační pufr (viz výše).

Provedení experimentu:

- Potkaní krev byla ihned po odběru centrifugována při 5400 otáčkách (2770 g).
- Krevní plazma byla odstraněna a ponechané zbývající červené krvinky jsem smíchala s dvojnásobným množstvím fyziologického roztoku, přehřátého na 37°C . Zkumavku jsem vložila opět do centrifugy (VWR CS4) nastavenou na 5400 ot. / min (2770 g) a nechala ji centrifugovat po dobu 10 minut.
- Po odstranění supernatantu jsem předešlý krok zopakovala.
- Následně jsem naposledy odstranila vzniklý supernatant a opatrně přemístila očištěné červené krvinky do 50 ml zkumavky.
- Přidala jsem 20 μl heparinu (5000 UI / 1 ml) na 1 ml suspenze červených krvinek, aby se zabránilo jejich srážení.
- Červené krvinky jsem smísila s 9ti násobným přebytkem 1 mM roztoku glukosy ve fyziologickém roztoku, přehřátém na 37°C .
- 0,940 ml suspenze červených krvinek jsem přenesla do mikrozkušavek.
- Do všech připravených mikrozkušavek jsem dále napipetovala:
 - 1) 10 μl testovaných látek v požadovaných odlišných koncentracích a do kontrolních vzorků 10 μl rozpouštědla DMSO. Každý vzorek byl připraven dublicitně.
 - 2) 50 μl 5 mM fyziologického roztoku kobaltnatých iontů, vyjma kontrolních vzorků – byly připraveny 3 pozitivní slepé zkoušky (DMSO + Co^{2+} ionty) a 2 negativní slepé zkoušky (DMSO + fyziologický roztok).
- Sérii vzorků jsem následně nechala po dobu 4 hodin v inkubátoru při 100 ot. / min.
- Po uplynutí inkubace jsem vzorky přenesla do centrifugy (MIKRO 22R) nastavené na 5400 ot. / min (1950 g) po dobu 10 minut.

- Z každého vzorku jsem do předem připravených mikrozkušavek odebrala 250 μl supernatantu. Tyto vzorky byly zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Z původních vzorků jsem odstranila zbylý supernatant a doplnila je lyzačním pufrem.
- Vzorky jsem spolu s lyzačním pufrem zvortexovala a nechala dalších 20 minut stát při pokojové teplotě.
- Dále jsem vzorky přenesla opět do zmíněné centrifugy (MIKRO 22R), ale tentokrát nastavené na 10 000 ot. / min (6700 g) po dobu 10 minut.
- Po proběhlé centrifugaci jsem odebrala opět 250 μl každého vzorku.
- Všechny vzorky byly zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dále zpracovány nejpozději do 3 dnů.

Měření laktátdehydrogenázové (LDH) aktivity:

- Při stanovení LDH aktivity se využívá reakce laktátu s NAD^+ podle rovnice 6:
 $\text{laktát} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{pyruvát} + \text{NADH} + \text{H}^+$ [rovnice 6]
- Vzniklý přírůstek $\text{NADH} + \text{H}^+$ je stanoven spektrofotometrickým měřením.
- V den měření jsem si připravila reakční pufr a vyjmula vzorky z mrazicího boxu k dosažení pokojové teploty.
- Měření absorbance probíhalo na přístroji TECAN Infinite M200PRO za pokojové teploty, při vlnové délce 340 nm. Při této vlnové délce absorbuje vznikající NADH.
- Všechny vzorky jsem těsně před měřením zředila fyziologickým roztokem. Vzorky před lýzou byly zředěny v poměru 1:1 (vzorek:fyziologický roztok) a vzorky po lýze v poměru 1:5 (vzorek:fyziologický roztok).
- Na 96 jamkovou mikrotitrační destičku jsem duplicitně napipetovala:
 - 1) 50 μl zvortexovaného zředěného vzorku
 - 2) 300 μl reakčního pufru
- Ihned po napipetování reakčního pufru proběhlo měření, při kterém jsem měřila změny v absorbanci při výše zmíněné vlnové délce 340 nm.

5.3 MATEMATICKÉ A STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

5.3.1 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHELÁTORŮ KOBALTU

Množství nezchelatovaného kobaltu bylo vypočítáno z rozdílu absorbance mezi testovaným (s indikátorem) a slepým vzorkem (bez indikátoru), dělených rozdílem absorbance kontrolního vzorku (známé množství kobaltu bez testované látky) a jeho slepého vzorku (tj. kobaltu bez indikátoru, od něho byly ještě odečteny rozdíly mezi absorbancí negativních vzorků s a bez indikátoru).

Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka vypočítané podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$. Statistické porovnání absorbance bylo provedeno použitím testu ANOVA následovaného Bonferroni post-hoc testem.

Rozdíly v chelataci u jednotlivých derivátů 8-hydroxychinolinu byly sledovány pomocí 95% konfidenčních intervalů, které byly připraveny společně s dalšími grafy pomocí programu GraphPad Prism verze 6.0 pro Windows (GraphPad Software, USA).

5.3.2 LÝZA ČERVENÝCH KRVINEK

Celkové procento lýzy erytrocytů bylo určeno ze směrnice získaných měření aktivity LDH podle vzorce: $\frac{2x k_{BL}}{2x k_{BL} + 6x k_{PL}}$, kde BL je vzorek bez lýzy (ředěn 1:1) a PL je vzorek po lýze (ředěn 1:5).

Následně byla porovnána míra lýzy vzorků obsahujících testované látky s příslušnými pozitivními nebo negativními slepými vzorky (tj. buď s Co^{2+} nebo s fyziologickým roztokem místo roztoku Co^{2+}) podle vzorce: $1 - \left(\frac{\% \text{ lýzy vzorek}}{\% \text{ lýzy slepý vzorek}} \right)$. Tím bylo určeno, zda má či nemá testovaná látka vliv na lýzu erytrocytů.

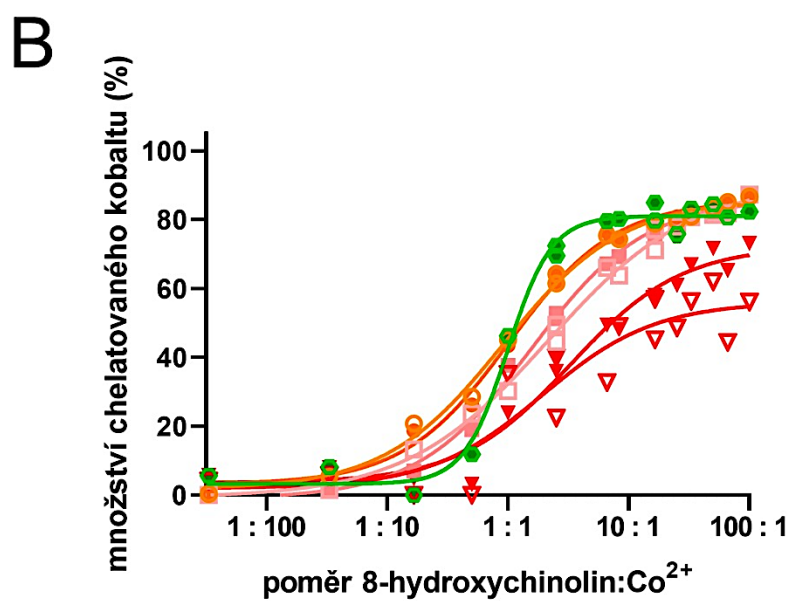
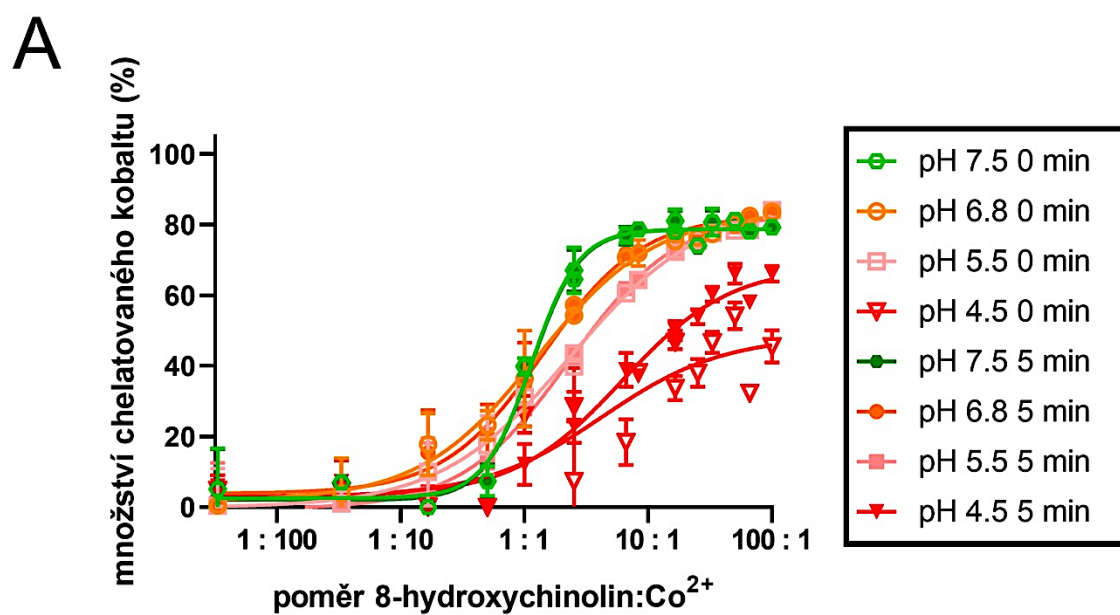
Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka vypočítané podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$. Statistická významnost výsledků byla stanovena pomocí studentova T-testu porovnáním celkové lýzy jednotlivých vzorků s příslušnými slepými vzorky. Grafické a statistické zpracování bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism verze 6.0 pro Windows (GraphPad Software, USA).

6. VÝSLEDKY

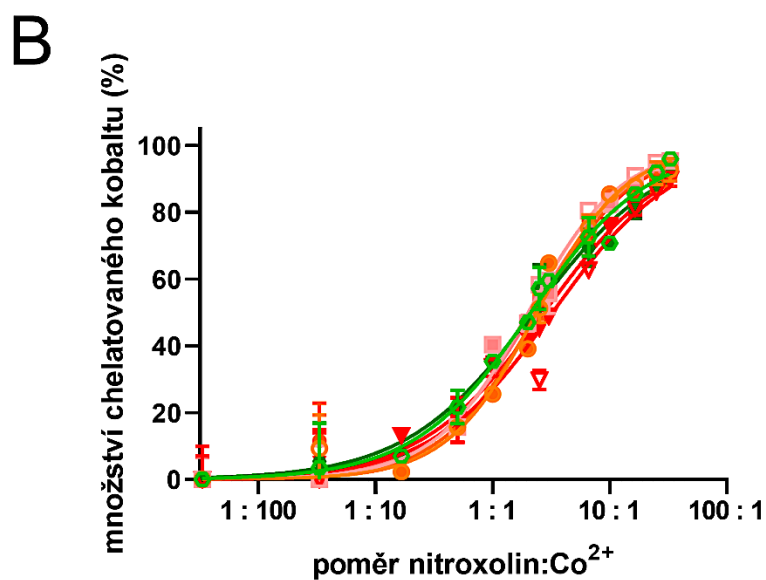
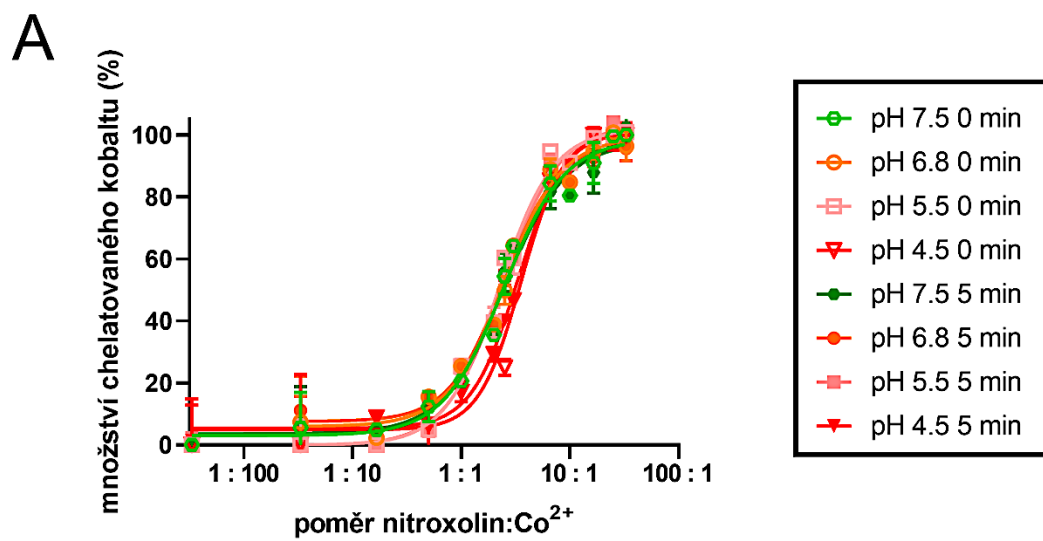
6.1 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHELÁTORŮ KOBALTU

Podle návodu, uvedeného v kapitole 5.2.2, byla zkoumána chelatační schopnost pěti testovaných látek (Obr. 8-12) – 8-hydroxychinolinu, nitroxolinu, chloroxinu, kliočinolu a jodočinolu. Chelatace byla stanovena měřením volných, tj. nezchelatovaných iontů kobaltu při dvou vybraných vlnových délkách (490 a 540 nm), ve čtyřech různých pH prostředích (pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5), v čase 0 a 5 minut. U všech testovaných chelátorů byla v poměru 1:1 (chelátor:kobalt) zjištěna určitá chelatace při všech pH (Obr. 8-12). Jedinou výjimkou byl jodočinol, který při tomto poměru prakticky, s výjimkou pH 7,5, nechelatoval. Chloroxin a kliočinol vykazovaly cca 33-50% chelataci při poměrech 1:1 za všech pH, z čehož se dá usoudit, že vzniklý komplex má stechiometrii 3:1 nebo 2:1 (chelátor:kobalt). Nitroxolin vykazoval 100% chelataci iontů kobaltu až při poměru vyšším než 10:1, zatímco 8-hydroxychinolin i při vyšších pH chelatoval maximálně 80 % kobaltnatých iontů, a to i při nejvyšším testovaném poměru 100:1 (chelátor:kobalt). Jodočinol při pH 4,5 nevykazoval žádnou chelataci, při pH 7,5 v poměru 1:1 chelatoval z cca 20 %. Při pH 5,5; 6,8 a 7,5 a poměru 3:1 vykazoval chelataci 50-60 %. Je pravděpodobné, že by bylo dosaženo 100% chelatace, ale z důvodu špatné rozpustnosti nebyly experimenty při těchto pH ve vyšších koncentracích provedeny. Byly vyzkoušeny jen u pH 4,5, aby bylo zjištěno, zda je látka vůbec schopna chelatovat kobalt při tomto nízkém pH. Z výsledků lze vyčíst, že se jedná o látky s různou schopností chelatovat kobalt.

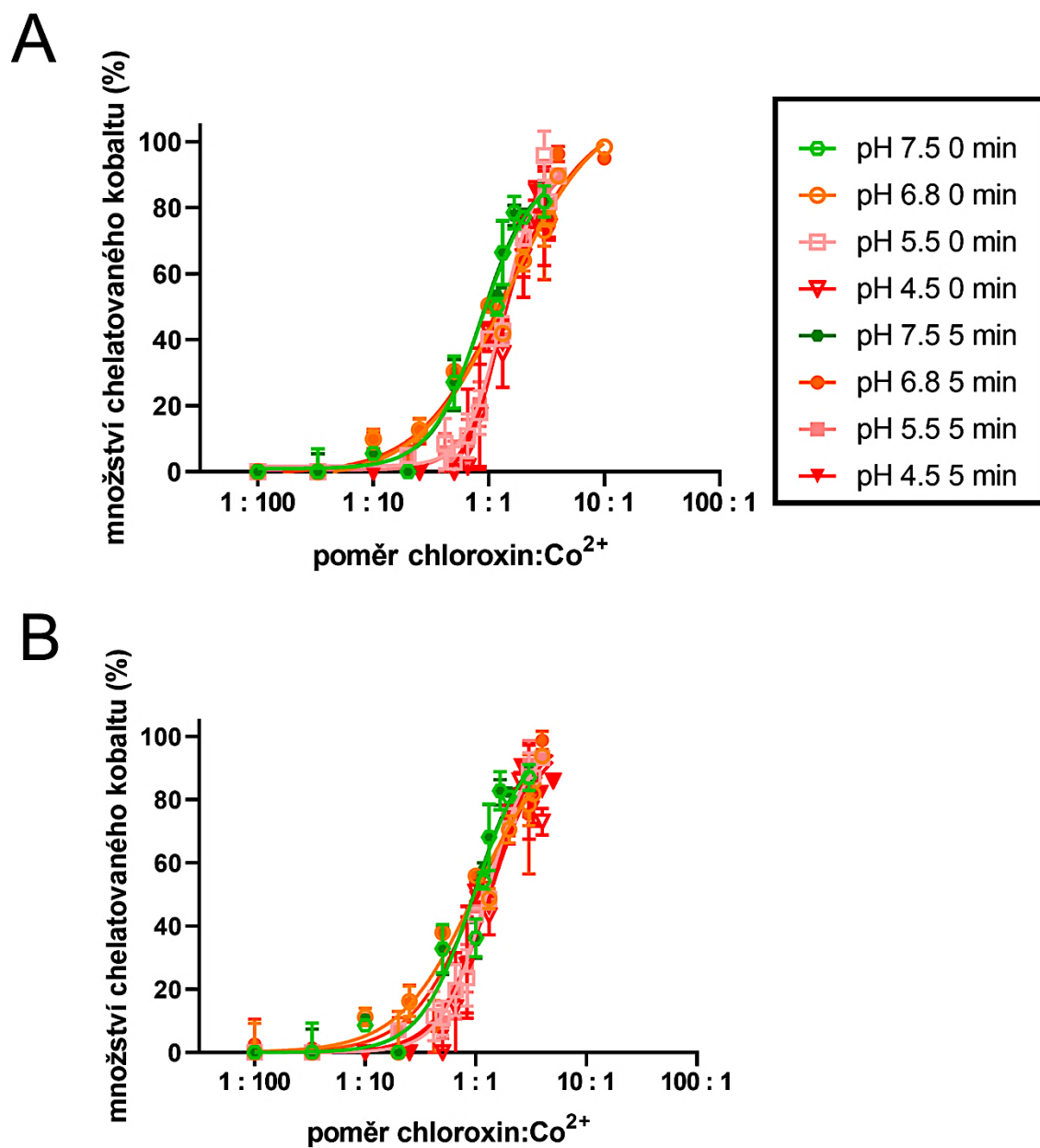
V dalším kroku byla jejich chelatační účinnost porovnána pomocí 95% konfidenčních intervalů u všech pH (Obr. 13-16). Z grafu lze potvrdit, že nejvyšší schopnost chelatace měl kliočinol a chloroxin. Při všech testovaných pH obě zmíněné látky chelatovaly v poměru 1:1 největší procento Co^{2+} iontů. Zatímco proměnlivé pH prostředí nemá na chelatační aktivitu u chloroxinu, kliočinolu a nitroxolinu vliv, tak u 8-hydroxychinolinu a jodočinolu chelatační účinek se snižujícím se pH klesá. Zjednodušeně lze říci, že chelatační účinnost těchto látek klesá v pořadí chloroxin = kliočinol > nitroxolin > 8-hydroxychinolin > jodočinol.



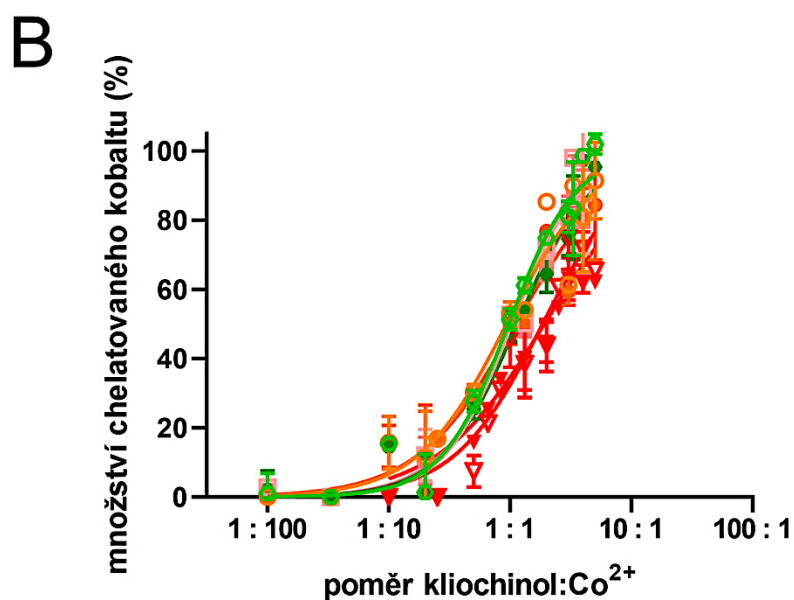
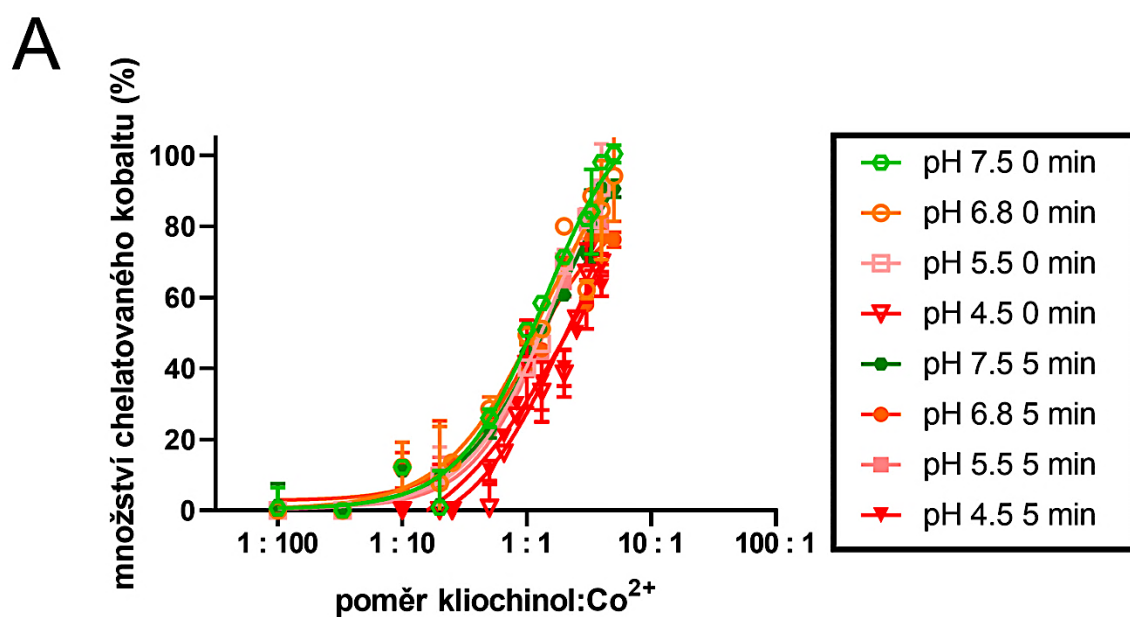
Obr. 8 – Účinnost chelatace kobaltu 8-hydroxychinolinem: Míra chelatace byla stanovena při dvou vlnových délkách A: při 490 nm; B: při 540 nm.



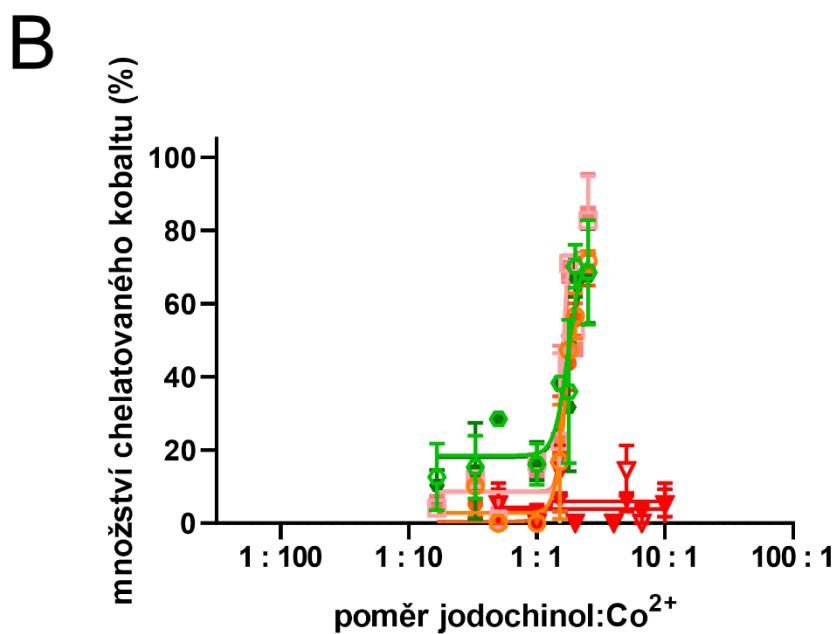
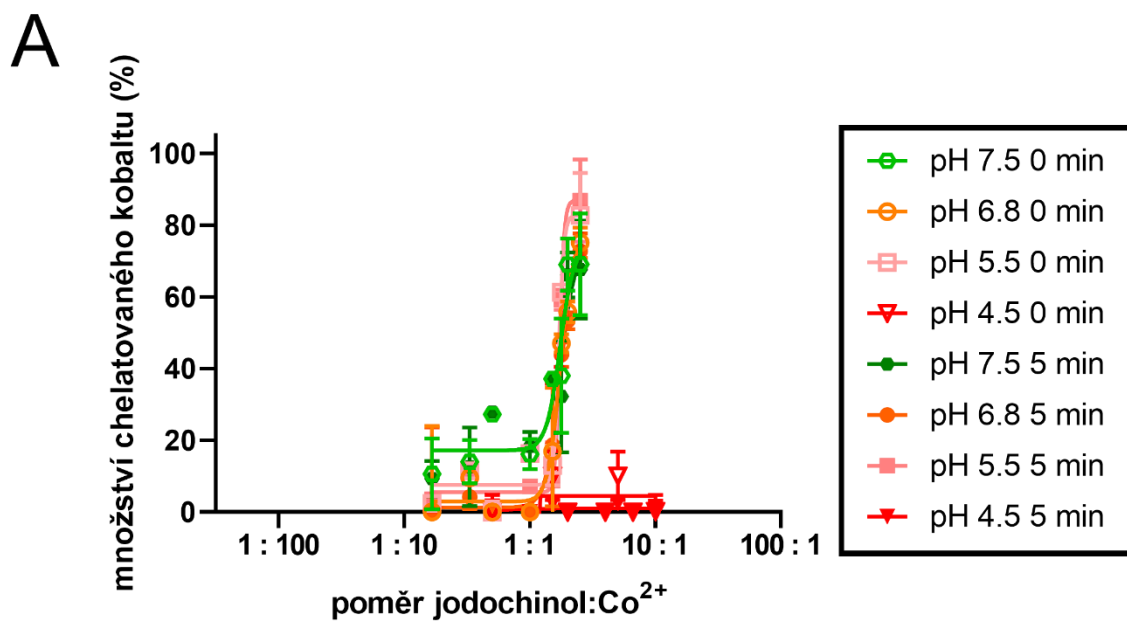
Obr. 9 – Účinnost chelatace kobaltu nitroxolinem: Míra chelatace byla stanovena při dvou vlnových délkách A: při 490 nm; B: při 540 nm.



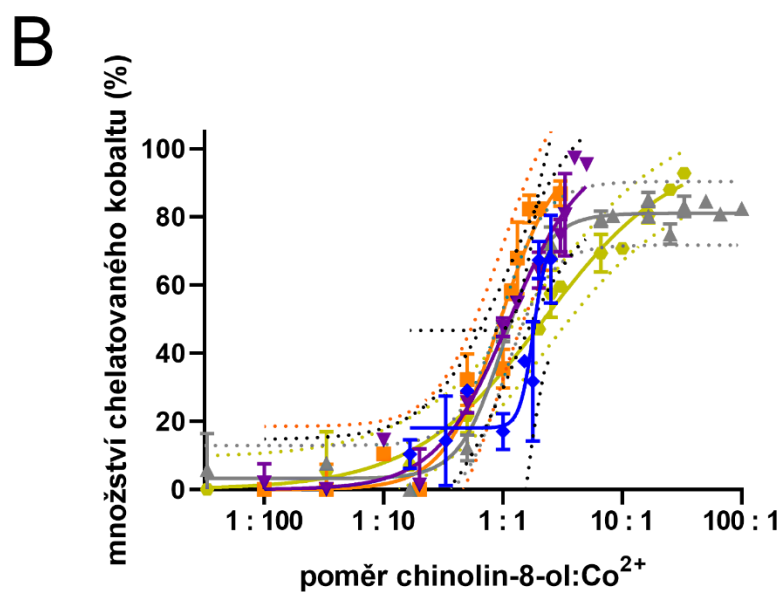
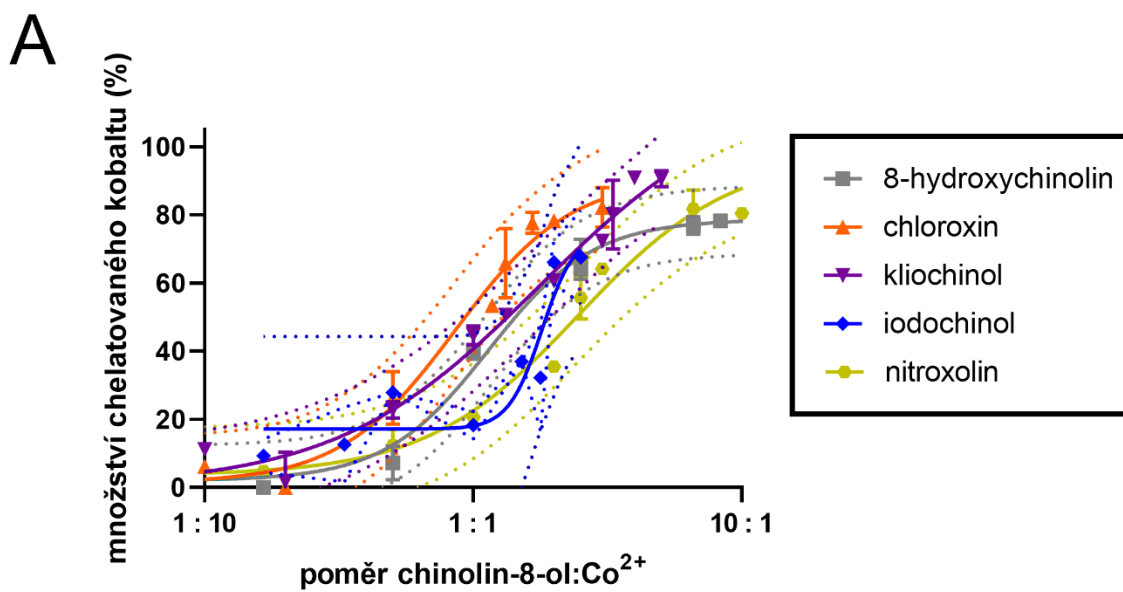
Obr. 10 – Účinnost chelatace kobaltu chloroxinem: Míra chelatace byla stanovena při dvou vlnových délkách A: při 490 nm; B: při 540 nm.



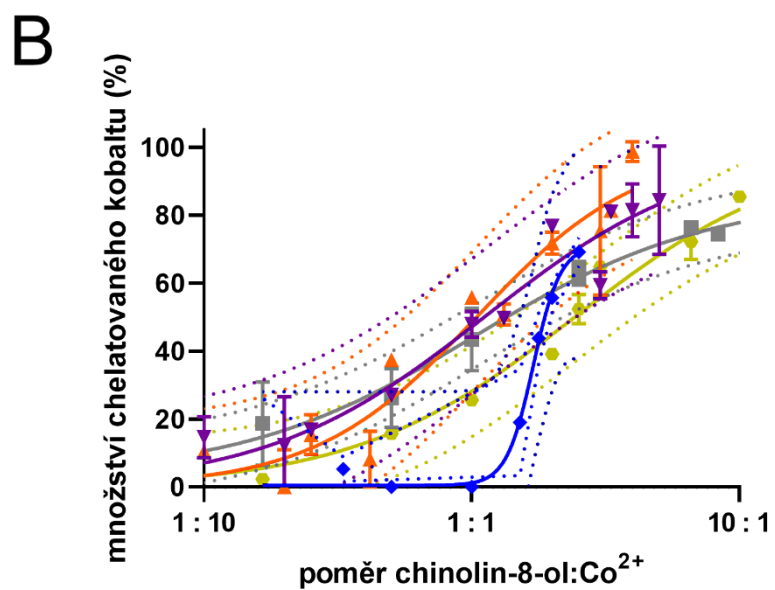
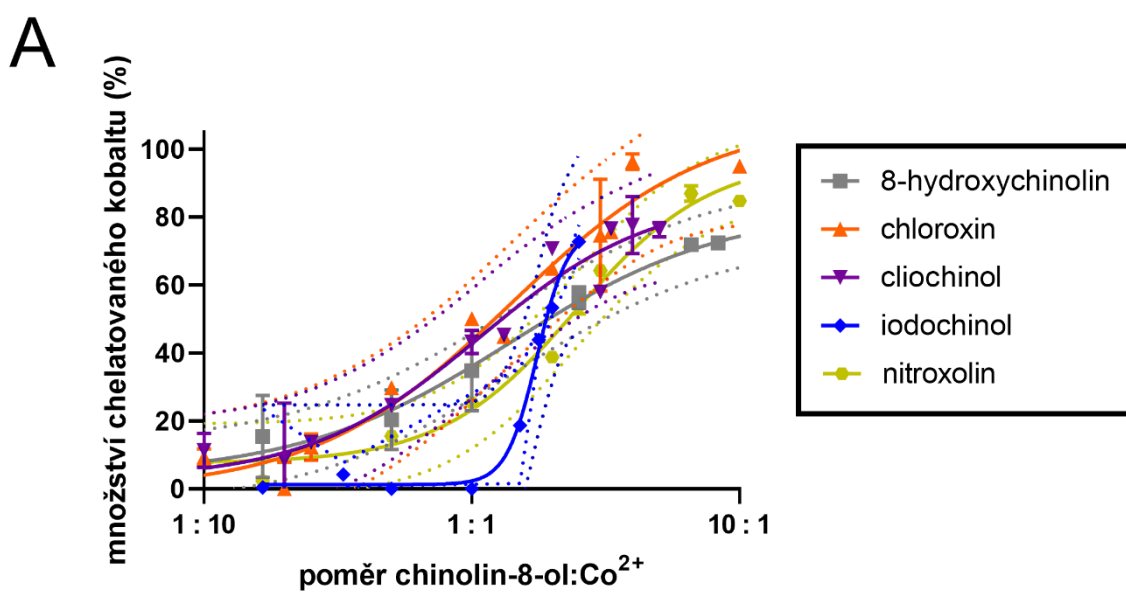
Obr. 11 – Účinnost chelatace kobaltu kliočinolem: Míra chelatace byla stanovena při dvou vlnových délkách A: při 490 nm; B: při 540 nm.



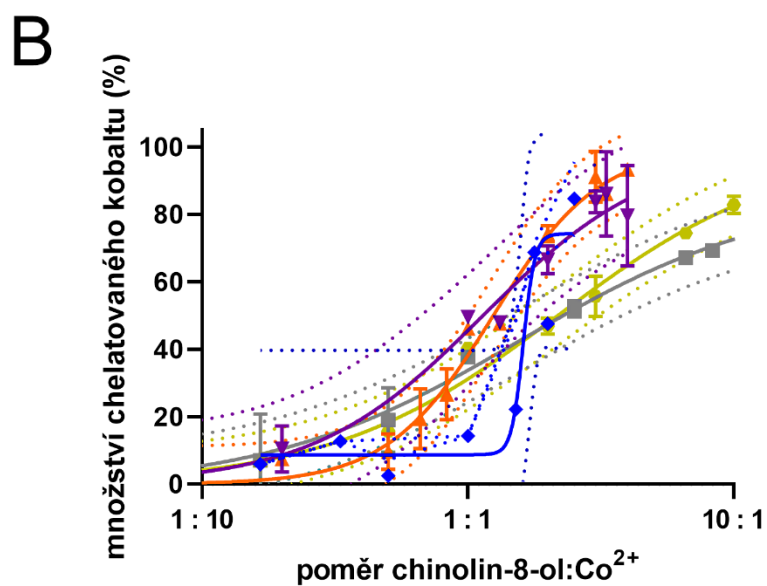
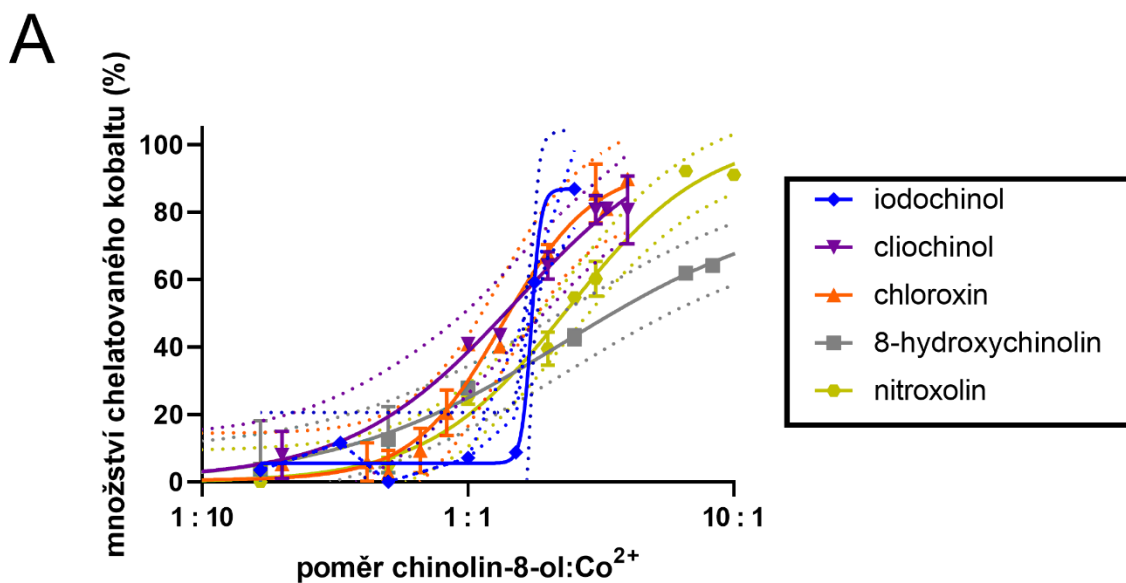
Obr. 12 – Účinnost chelatace kobaltu jodochinolem: Míra chelatace byla stanovena při dvou vlnových délkách A: při 490 nm; B: při 540 nm.



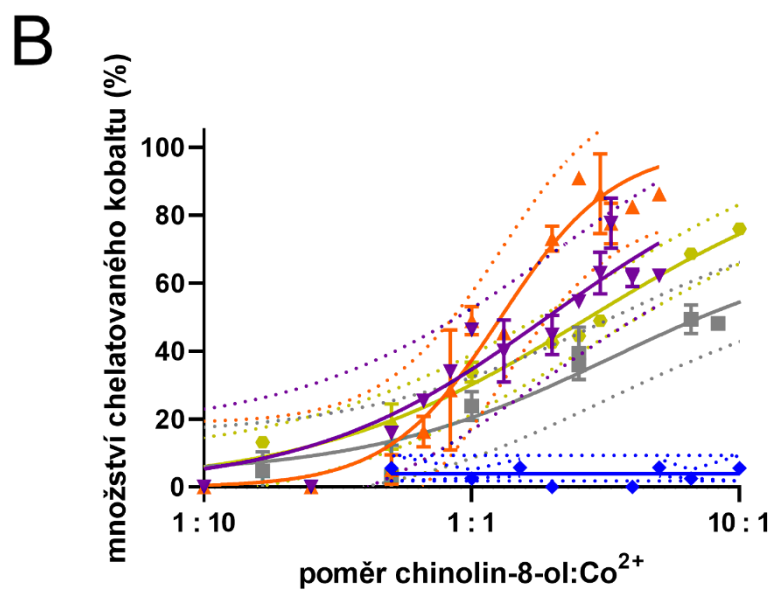
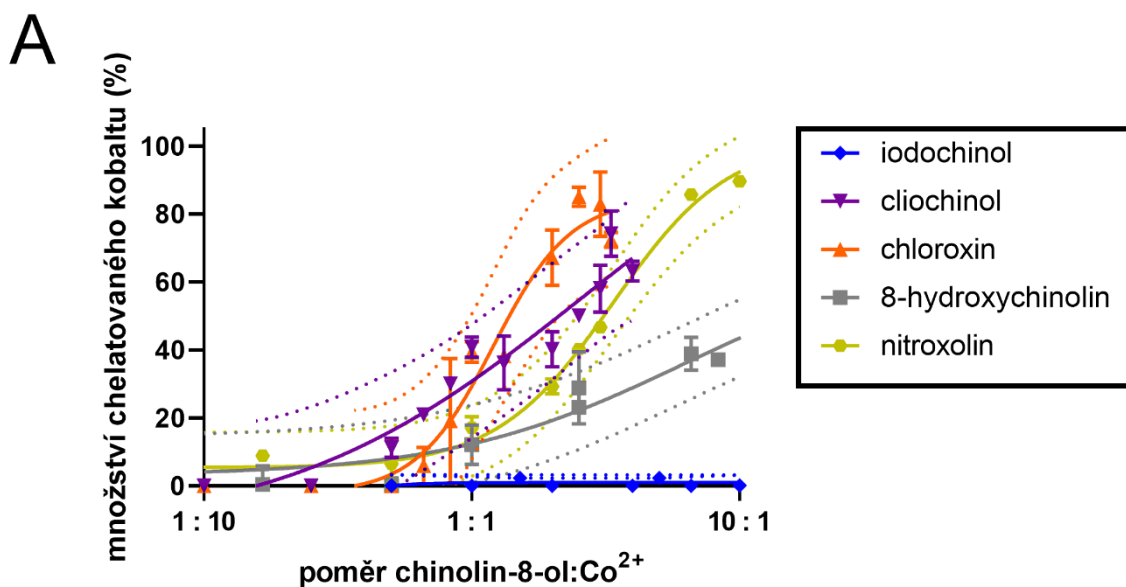
Obr. 13 – Porovnání chelatační aktivity 8-hydroxychinolinu a jeho derivátů pro ionty Co²⁺ pomocí 95% konfidenčních intervalů při pH 7,5 a při vlnových délkách A: 490 nm; B: 540 nm.



Obr. 14 – Porovnání chelatační aktivity 8-hydroxychinolinu a jeho derivátů pro ionty Co²⁺ pomocí 95% konfidenčních intervalů při pH 6,8 a při vlnových délkách A: 490 nm; B: 540 nm.



Obr. 15 – Porovnání chelatační aktivity 8-hydroxychinolinu a jeho derivátů pro ionty Co²⁺ pomocí 95% konfidenčních intervalů při pH 5,5 a při vlnových délkách A: 490 nm; B: 540 nm.

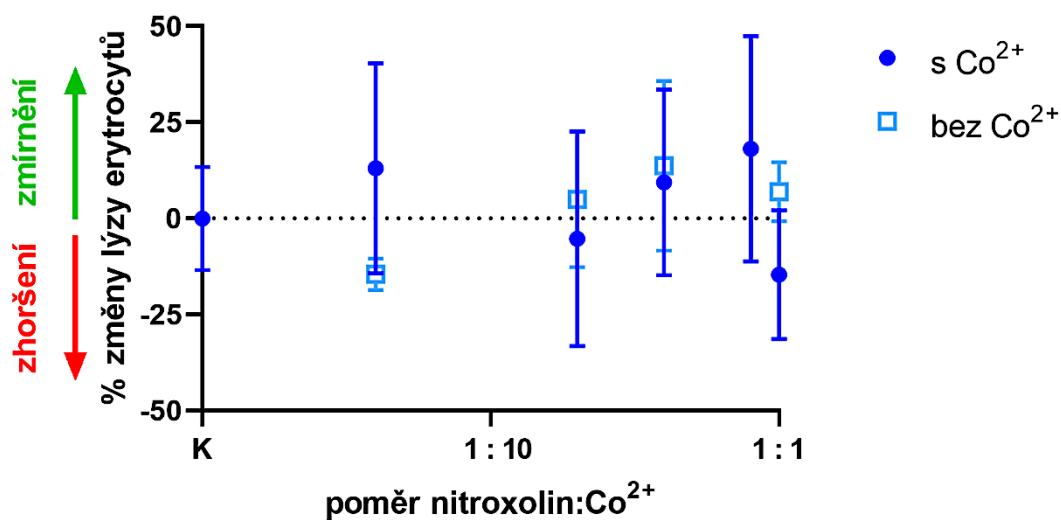


Obr. 16 – Porovnání chelatační aktivity 8-hydroxychinolinu a jeho derivátů pro ionty Co²⁺ pomocí 95% konfidenčních intervalů při pH 4,5 a při vlnových délkách A: 490 nm; B: 540 nm.

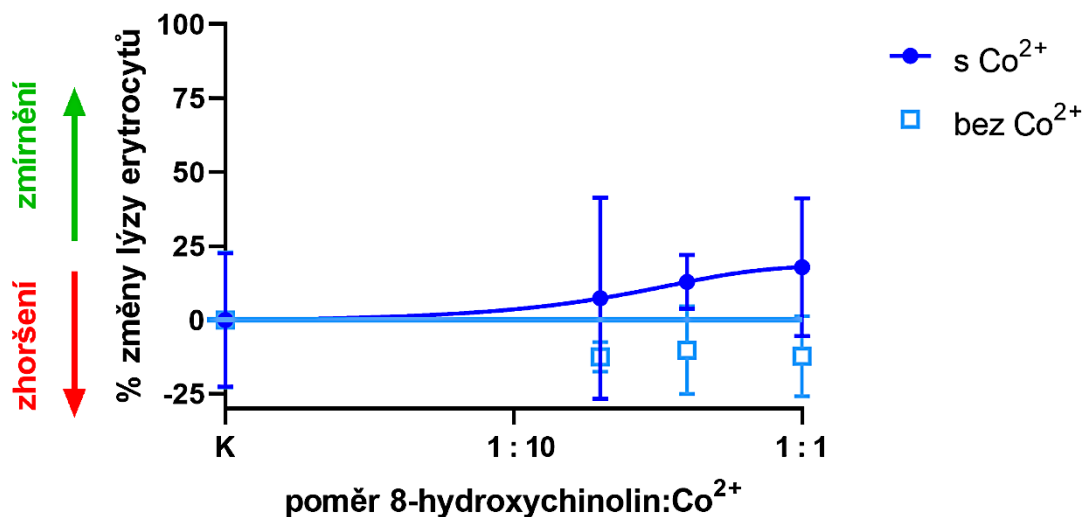
6.2 LÝZA ČERVENÝCH KRVINEK

Podle návodu, uvedeného v kapitole 5.2.3, byla zkoumána lýza červených krvinek a vliv přidávaných látek – nitroxolinu, 8-hydroxychinolinu, chloroxinu, kliočinolu a jodochinolu na lýzu erytrocytů, a to buď při současném přidání Co^{2+} ve finální koncentraci $250 \mu\text{M}$ nebo bez Co^{2+} , pouze se zmíněnými látkami (Obr. 17-21). Průměrná lýza krvinek byla cca 10 % a nelišila se mezi Co^{2+} ($10,1 \pm 5,8 \%$) a bez Co^{2+} ($10,7 \pm 5,9 \%$). Z čehož vyplývá, že samotný kobalt lýzu nezpůsobuje.

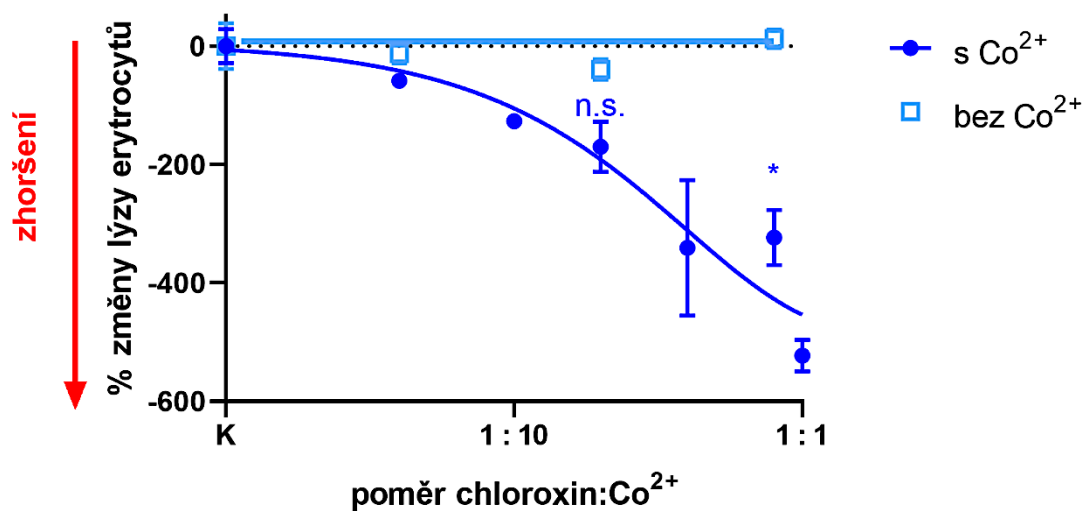
Nitroxolin (Obr. 17) ani 8-hydroxychinolin (Obr. 18) neměly na lýzu erytrocytů v přítomnosti kobaltu nebo bez něj žádný vliv. Zajímavé zjištění bylo, že přestože samotný chloroxin (Obr. 19) na červené krvinky nemá taktéž žádný vliv, v přítomnosti Co^{2+} iontů dochází k prudkému zhoršení lýzy erytrocytů. V přítomnosti kobaltu se tak chloroxin stává toxickým a způsobuje lýzu. Kliočinol také mírně lýzu erytrocytů zvyšuje. Jeho účinek se ale jeví nezávislý na kobaltu, respektive alespoň v nižší poměrech chelátor:kobalt (Obr. 20). Alternativně může kobalt jeho toxicitu snižovat. Jodochinol lýzu erytrocytů snížil, ale tento účinek nebyl na kobaltu závislý (Obr. 21).



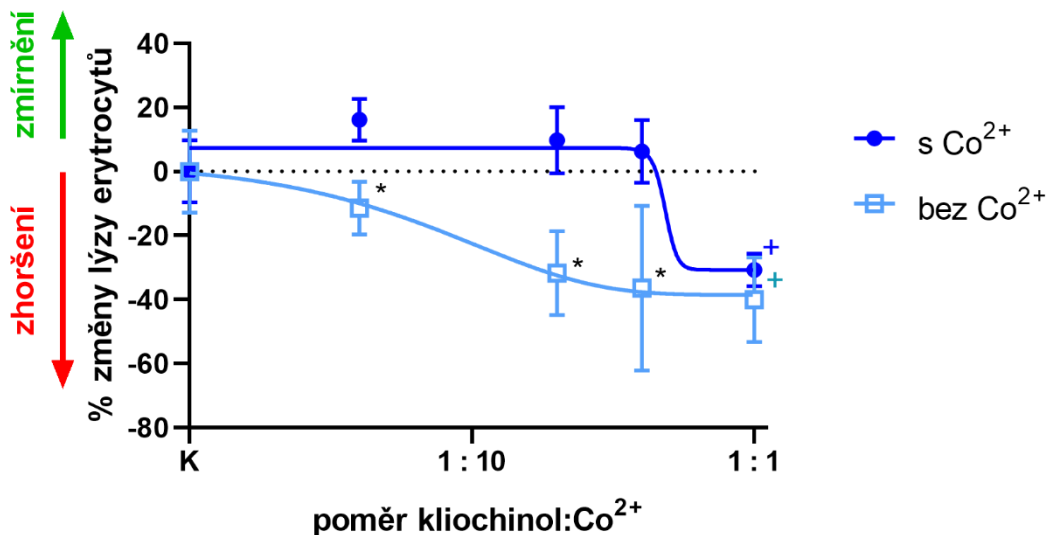
Obr. 17 – Vliv nitroxolinu na lýzu erytrocytů. Na grafu je znázorněna změna lýzy erytrocytů samotným nitroxolinem a změna lýzy při současném přidání Co^{2+} iontů a nitroxolinu. Rozdíly mezi vzorky s kobaltem a bez něj nebyly ze statistického hlediska významné.



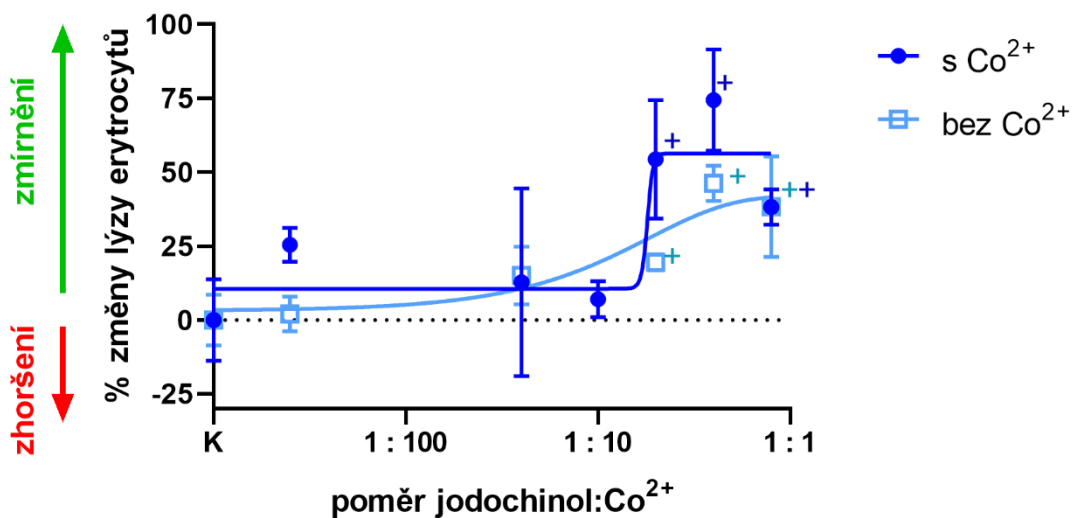
Obr. 18 – Vliv 8-hydroxychinolinu na lýzu erytrocytů. Na grafu je znázorněna změna lýzy erytrocytů samotným 8-hydroxychinolinem a změna lýzy při současném přidání Co^{2+} iontů a 8-hydroxychinolinu. Rozdíly mezi vzorky s kobaltem a bez něj nebyly ze statistického hlediska významné.



Obr. 19 – Vliv chloroxinu na lýzu erytrocytů. Na grafu je znázorněna změna lýzy erytrocytů samotným chloroxinem a změna lýzy při současném přidání Co^{2+} iontů a chloroxinu. V důsledku velkého rozptylu biologických hodnot nebylo možné vytvořit konfidenční intervaly. Proto byly porovnány jen odpovídající hodnoty, z čehož je zřetelné, že chloroxin lýzu erytrocytů zhoršuje. n.s. – nesignifikantní, * odpovídá $p < 0,05$.



Obr. 20 – Vliv clioquinolu na lýzu erytrocytů. Na grafu je znázorněna změna lýzy erytrocytů samotným clioquinolem a změna lýzy při současném přidání Co^{2+} iontů a clioquinolu. Mezi vzorky s kobaltem a bez něj byla nalezena významnost (* odpovídá $p < 0.05$ mezi vzorky s kobaltem a bez něj, + odpovídá $p < 0.05$ vs. pozitivní kontrola bez clioquinolu).



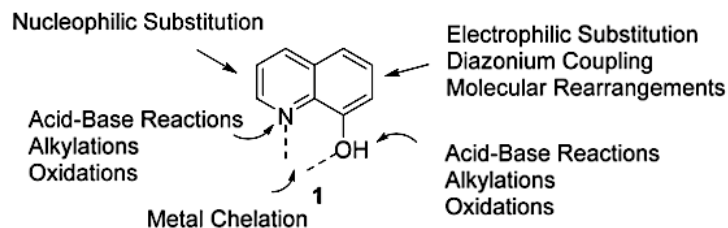
Obr. 21 – Vliv jodoquinolu na lýzu erytrocytů. Na grafu je znázorněna změna lýzy erytrocytů samotným jodoquinolem a změna lýzy při současném přidání Co^{2+} iontů a jodoquinolu. Rozdíly mezi vzorky s kobaltem a bez něj nebyly ze statistického hlediska významné. Ve vyšších poměrech, ale bez vztahu k přidavku kobaltu, jodoquinol lýzu erytrocytů snižoval (+ odpovídá $p < 0.05$ vs. pozitivní kontrola bez jodoquinolu).

7. DISKUZE

Cílem této práce byla snaha o nalezení účinných chelátorů kobaltu. Jako modelové sloučeniny byly použity 8-hydroxychinolin a jeho deriváty – nitroxolin, jodochinol, kliočinol a chloroxin, protože se jedná o známé neselektivní chelátory kovů (*Říha et al. 2013, Prachayasittikul et al. 2013, Pierre et al. 2003*). V *in vitro* podmínkách všechny zmíněné sloučeniny měly určitou chelatační aktivitu, vliv chelatace byl dále sledován *ex vivo* na potkaních erythrocytech. Jak je shrnuto v recentní studii od *Saadeh et al. (2020)*, tato skupina látek přitahuje v poslední době pozornost chemiků a dalších odborníků ve zdravotnictví, a to zejména díky svým jedinečným biologickým, fyzikálním a chemickým vlastnostem.

Sloučeniny obsahující 8-hydroxychinolinové jádro vykazují širokou škálu biologických aktivit, včetně antimikrobiálních, protirakovinných a antifungálních účinků. Na první pohled nelogické využití jedné látky jako antimikrobiálního a protinádorového léčiva se dá vysvětlit odlišnou dávkou. Zatímco antimikrobiální chemoterapie se většinou podává perorálně v nižších dávkách a pouze po dobu do vymizení příznaků, cytostatická léčba se podává intermitentně, ve vysokých dávkách a často intravenózně (*Prachayasittikul et al. 2013, Shen et al. 1999, Ding et al. 2005, Mechl a Vorlíček 2001, Oliveri a Vecchio 2016, Pierre et al. 2003*).

8-hydroxychinolin je bicyklická sloučenina, skládající se z pyridinového kruhu kondenzovaného k fenolu, ve kterém je hydroxylová skupina připojena v poloze 8 (Obr. 22). Pyridinový kruh si tak udržuje vlastnosti elektronově deficitní entity se zásaditým dusíkem. Vlivem přítomnosti fenolické skupiny vykazuje 8-hydroxychinolin i typické fenolické vlastnosti, díky nimž je citlivý na četné chemické reakce a strukturální modifikace, jako je např. elektrofilní aromatická substituce, diazoniová vazba a molekulární přesmyky. Vzhledem k těsné blízkosti hydroxylové skupiny k heterocyklickému dusíku se 8-hydroxychinoliny vyznačují jako dobrá chelatační činidla, která tvoří kovalentní komplexy s širokou škálou kovových iontů (*Saadeh et al. 2020, Prachayasittikul et al. 2013, Pierre et al. 2003*).



Obr. 22 – Schématické znázornění chemických reakcí 8-hydroxychinolinů.

Převzato ze Saadeh et al. (2020).

Z naměřených hodnot a grafů vyplývá, že nejlepších a takřka identických výsledků v *in vitro* chelatačních experimentech dosáhly chloroxin s kliocholem. Atomy chlóru a jódu v poloze 5 a 7 jsou společně s cyklickým dusíkem a hydroxylem v poloze 8 donory elektronů a zvyšují tak vazebnost sloučeniny vůči elektrofilům, kterými mohou být různé kovy, v našem případě kobaltnaté ionty. Vliv pH prostředí nemělo na tyto dva deriváty žádný vliv, což se nedá říct o 8-hydroxychinolinu. Při vyšších hodnotách pH byla jeho chelatační aktivita vyšší, to je pravděpodobně způsobeno snadnějším odštěpením kationtu vodíku z hydroxylové skupiny právě ve vyšším pH prostředí. Vzniklý aniont je tak mnohem aktivnějším nukleofilem, než byl samotný neutrální 8-hydroxychinolin. Chelatační aktivita proto klesá v kyselém prostředí, jak bylo také měřením prokázáno (*Prachayasittikul et al. 2013*). Ve studii od *Říha et al. (2013)* byla testována chelatační účinnost jak známými a klinicky používanými chelátory mědi (např. D-penicilaminem), tak skupinou derivátů 8-hydroxychinolinu. Konkrétně se jednalo o kliochole, chloroxin a samotný 8-hydroxychinolin. Rovněž jako u kobaltu, lze z výsledků této studie považovat chloroxin s kliocholem za silné chelátory mědi, které s ní tvoří velmi stabilní komplexy při všech testovaných pH prostředích. Chelatační aktivita byla také na pH nezávislá. V poměru 1:1 bylo chelatováno cca 50 % mědi a v poměru 2:1 (chelátor:měď) bylo chelatováno již 100 % mědi. Zatímco 8-hydroxychinolin byl podstatně slabší chelátor a jeho chelatační aktivita klesala se snižujícím se pH. Z toho vyplývá, že výsledky chelatační účinnosti 8-hydroxychinolinových derivátů u mědi jsou velmi podobné našim výsledkům s kobaltem.

Díky provedení *ex vivo* experimentů a vlivu zmíněných látek na lýzu erytrocytů s přidaným kobaltem nebo bez něj bylo zjištěno, že určité deriváty dokonce v přítomnosti kobaltu lýzu zhoršovaly a stávaly se tak toxickými. Tento poměrně překvapivý účinek způsoboval chloroxin. Sám o sobě ani on, ani kobalt nebyl toxický, ale jejich směs výrazně potencovala lýzu erytrocytů. Tohle zjištění se jeví jako poměrně zásadní, protože naznačuje, že komplexy kobaltu s některými chelátory mohou být toxické. Lze tak konstatovat, že je potřeba prověřit *in vitro* výsledky na *ex vivo* experimentech, či v *in vivo* podmínkách. Ve studii od *Jiang*

at al. (2011) byla zkoumána protinádorová aktivita právě na skupině látek odvozených od 8-hydroxychinolinu. Již dříve bylo v mnoha experimentech prokázáno, že jeden z derivátů – kliočinol má protinádorovou aktivitu jak *in vitro*, tak *in vivo* (*Ding et al. 2005, Daniel et al. 2005, Du et al. 2007, Mao et al. 2009*). Jeho použití je však v klinické praxi limitováno z důvodu neurotoxických účinků. Studie od *Jiang et al. (2011)* porovnávala cytotoxicitu kliočinolu se šesti dalšími 8-hydroxychinolinovými analogy za použití buněčných linií lidských rakovinných buněk. Z testovaných analogů dosáhl nejlepších protirakovinných účinků nitroxolin, zatímco nejméně toxický byl jodochinol. K testovaným derivátům byly vždy přidány dva kovy – měď a zinek. Aktivita nitroxolinu i všech ostatních derivátů byla zvýšena mědí, avšak v přítomnosti zinku byla zvýšena aktivita pouze kliočinolu a jodochinol. Dalším benefitem bylo, že nitroxolin zvýšil tvorbu reaktivních forem kyslíku a dusíku a tento účinek byl významně zvýšen přidáním mědi. Taktéž u kliočinolu došlo za přítomnosti mědi k mírnému zvýšení hladin reaktivních forem kyslíku, ale tento efekt byl ve srovnání s nitroxolinem nepatrný. Zatímco jodochinol sám, ani v přítomnosti mědi, tvorbu ROS nezvyšoval. V další části experimentu se ukázalo, že na rozdíl od kliočinolu není nitroxolin ionoforem zinečnatých iontů. Závěrem experimentu lze říct, že nitroxolin je účinnější než halogenované 8-hydroxychinoliny a vzhledem k tomu, že nepůsobí jako zinečnatý ionofor, je tak méně neurotoxický. Z této studie tak plyne, že některé, i když ne všechny, komplexy 8-hydroxychinolinových derivátů s mědí mohou být toxické a tím mít protinádorové účinky. Vliv různých kovů na podobné sloučeniny může být však odlišný.

Díky svým rozmanitým biologickým účinkům je molekula 8-hydroxychinolinu různě obměňována za účelem připravení nových, lepších a účinnějších derivátů, jak např. demonstruje studie od *Oliveri et al. (2012)*. V této studii byla popsána syntéza nového derivátu kliočinolu – kliočinol glukokonjugátu a 8-hydroxychinolinu - 8-hydroxychinolin glukokonjugátu, s úmyslem porovnání tohoto systému s kliočinolem a 8-hydroxychinolinem. Důvodem pro syntézu glukokonjugátů je hromadění glukózy a nadměrná exprese transportérů glukózy v nádorových buňkách. Přítomnost molekuly glukózy by mohla navíc eliminovat nežádoucí chelataci systémových iontů kovu a zvýšit selektivitu molekuly na konkrétní místo působení. Experiment byl proveden na různých buněčných liniích za přítomnosti iontů zinku a mědi. Bylo prokázáno, že glukokonjugáty jsou *in vitro* štěpeny β -glukosidázou a po uvolnění aktivního aglykonu vykazují antiproliferativní aktivitu proti různým liniím nádorových buněk v přítomnosti iontů mědi, ne však v přítomnosti zinku. Na základě těchto i našich výsledků je tedy patrné, že vliv různých kovů je na podobné deriváty odlišný, proto je potřeba vždy otestovat látky v biologickém prostředí. Dobrým příkladem je právě nitroxolin, jehož komplex

s kobaltem se nejeví jako cytotoxický, na rozdíl od jeho komplexu s mědí nebo komplexu chloroxinu s kobaltem.

Obecně lze shrnout, že tyto sloučeniny mohou mít terapeutický potenciál, ale je evidentně nutné jejich vlastnosti dobře otestovat, případně připravit deriváty, které by měly vhodnější vlastnosti.

8. ZÁVĚR

Závěrem mé diplomové práce lze říci, že pomocí jednoduché spektrofotometrické metody byla ověřena chelatační schopnost 8-hydroxychinolinu a jeho derivátů – nitroxolinu, jodochinolu, kliočinolu a chloroxinu při různých pato/fyziologických pH. Bylo potvrzeno, že určitou chelatační aktivitu vůči kobaltnatým iontům vykazují všechny zmíněné sloučeniny. Mezi nejlepší chelátory patřily chloroxin a kliočinol. 8-hydroxychinolin a nitroxolin měly o něco slabší účinek. Jodochinol se dá pokládat za nejslabší chelátor z výše zmíněných. Při poměru 1:1 (chelátor:kobalt) jako jediný nevykazoval žádnou chelataci, s výjimkou pH 7,5. Proměnlivé pH prostředí nemělo vliv na chloroxin, kliočinol a nitroxolin, zatímco u 8-hydroxychinolinu a jodochinolu klesala se snižujícím se pH chelatační aktivita. Lze tedy shrnout, že se jedná se o látky s různou schopností chelatovat kobalt.

Dále bylo na biologickém modelu ověřeno, zda se chelatace kobaltu projeví na lýze červených krvinek v přítomnosti kobaltu. Bylo zjištěno, že samotný kobalt ani v relativně vysoké koncentraci nepotencuje spontánní lýzu červených krvinek. Na druhé straně přídavek chloroxinu ke kobaltu lýzu erytrocytů výrazně zvýšil. Samotný chelátor chloroxin byl naopak ve vztahu k červeným krvinkám bez přítomnosti kobaltu netoxický. Tyto experimenty tedy ukazují na nutnost otestovat i účinky chelátorů ve více biologických podmínkách, protože čistě *in vitro* experimenty u kobaltu mohou přinést optimistické výsledky, které ale nemusí odrážet situaci v biologickém prostředí.

9. LITERATURA

Aaseth J, Skaug MA, Cao Y, Andersen O. Chelation in metal intoxication--Principles and paradigms. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;31:260-6.

Abutaleb NS, Seleem MN. Repurposing the Antiamoebic Drug Diiodohydroxyquinoline for Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 21;64(6):e02115-19.

Barceloux DG. Cobalt. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999;37(2):201-6.

Black MM. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr Bull.* 2008;29(2 Suppl):S126-31.

Budimir A. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharm.* 2011;61(1):1-14.

Caicedo MS, Pennekamp PH, McAllister K, Jacobs JJ, Hallab NJ. Soluble ions more than particulate cobalt-alloy implant debris induce monocyte costimulatory molecule expression and release of proinflammatory cytokines critical to metal-induced lymphocyte reactivity. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(4):1312-21.

Campbell JR, Estey MP. Metal release from hip prostheses: cobalt and chromium toxicity and the role of the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(1):213-20.

Christensen JM, Poulsen OM, Thomsen M. A short-term cross-over study on oral administration of soluble and insoluble cobalt compounds: sex differences in biological levels. *Int Arch Occup Environ Health.* 1993;65(4):233-40.

Czarnek K, Terpiłowska S, Siwicki AK. Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):236-42.

Daniel KG, Chen D, Orlu S, Cui QC, Miller FR, Dou QP. Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):897-908.

Devlin JJ, Pomerleau AC, Brent J, Morgan BW, Deitchman S, Schwartz M. Clinical features, testing, and management of patients with suspected prosthetic hip-associated cobalt toxicity: a systematic review of cases. *J Med Toxicol.* 2013;9(4):405-15.

Ding WQ, Liu B, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res.* 2005; 65(8):3389-95.

Du T, Filiz G, Caragounis A, Crouch PJ, White AR. Clioquinol promotes cancer cell toxicity through tumor necrosis factor alpha release from macrophages. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324(1):360-7.

Finley BL, Unice KM, Kerger BD, Otani JM, Paustenbach DJ, Galbraith DA, Tvermoes BE. 31-day study of cobalt(II) chloride ingestion in humans: pharmacokinetics and clinical effects. *J Toxicol Environ Health A.* 2013;76(21):1210-24.

Flora SJ, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(7):2745-88.

Fox KA, Phillips TM, Yanta JH, Abesamis MG. Fatal cobalt toxicity after total hip arthroplasty revision for fractured ceramic components. *Clin Toxicol (Phila).* 2016;54(9):874-877.

Grant ML, Karp JK, Palladino M, Le N, Hall N, Herman JH. Does therapeutic plasma exchange have a role in the treatment of prosthetic hip-associated cobalt toxicity? A case report and literature review. *Transfusion.* 2016;56(9):2368-73.

Hanna PM, Kadiiska MB, Mason RP. Oxygen-derived free radical and active oxygen complex formation from cobalt(II) chelates in vitro. *Chem Res Toxicol.* 1992;5(1):109-15.

Jiang H, Taggart JE, Zhang X, Benbrook DM, Lind SE, Ding WQ. Nitroxoline (8-hydroxy-5-nitroquinoline) is more a potent anti-cancer agent than clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-quinoline). *Cancer Let.* 2011; 321(1):11-7.

Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011;283(2-3):65-87.

Kim JJ, Kim YS, Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;54:226-231.

Leggett RW. The biokinetics of inorganic cobalt in the human body. *Sci Total Environ.* 2008;389(2-3):259-69.

Leonard S, Gannett PM, Rojanasakul Y, Schwegler-Berry D, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Cobalt-mediated generation of reactive oxygen species and its possible mechanism. *J Inorg Biochem.* 1998;70(3-4):239-44.

Leysens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. Cobalt toxicity in humans- A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology.* 2017;387:43-56.

Mao X, Li X, Sprangers R, Wang X, Venugopal A, Wood T, Zhang Y, Kuntz DA, Coe E, Trudel S, Rose D, Batey RA, Kay LE, Schimmer AD. Clioquinol inhibits the proteasome and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Leukemia.* 2009; 23(3):585-90.

Mechl Z, Vorlíček J. What do the antitumoral and antibacterial chemotherapies have in common? *Klin Onkol.* 2001; 14(6):207-209.

Meltzer HM, Brantsaeter AL, Borch-Johnsen B, Ellingsen DG, Alexander J, Thomassen Y, Stigum H, Ydersbond TA. Low iron stores are related to higher blood concentrations of manganese, cobalt and cadmium in non-smoking, Norwegian women in the HUNT 2 study. *Environ Res.* 2010;110(5):497-504.

Okamoto S, Eltis LD. The biological occurrence and trafficking of cobalt. *Metallomics.* 2011;3(10):963-70.

Oliveri V, Vecchio G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *Eur J Med Chem.* 2016;120:252-74.

Oliveri V, Giuffrida ML, Vecchio G, Aiello C, Viale M. Gluconjugates of 8-hydroxyquinolines as potential anti-cancer prodrugs. *Dalton Trans.* 2012;41(15):4530-5.

Paustenbach DJ, Tvermoe BE, Unice KM, Finley BL, Kerger BD. A review of the health hazards posed by cobalt. *Crit Rev Toxicol.* 2013;43(4):316-62.

Paustenbach DJ, Galbraith DA, Finley BL. Interpreting cobalt blood concentrations in hip implant patients. *Clin Toxicol (Phila).* 2014;52(2):98-112.

Pazzaglia UE, Apostoli P, Congiu T, Catalani S, Marchese M, Zarattini G. Cobalt, chromium and molybdenum ions kinetics in the human body: data gained from a total hip replacement with massive third body wear of the head and neuropathy by cobalt intoxication. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011;131(9):1299-308.

Pelayo-de Tomás JM, Novoa-Parra C, Gómez-Barbero P. Cobalt toxicity after revision total hip replacement due to fracture of a ceramic head. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2017;61(3):203-207.

Pelclova D, Sklensky M, Janicek P, Lach K. Severe cobalt intoxication following hip replacement revision: clinical features and outcome. *Clin Toxicol (Phila).* 2012;50(4):262-5.

Permenter MG, Dennis WE, Sutto TE, Jackson DA, Lewis JA, Stallings JD. Exposure to cobalt causes transcriptomic and proteomic changes in two rat liver derived cell lines. *PLoS One.* 2013;8(12):e83751.

Petit A, Mwale F, Tkaczyk C, Antoniou J, Zukor DJ, Huk OL. Induction of protein oxidation by cobalt and chromium ions in human U937 macrophages. *Biomaterials.* 2005;26(21):4416-22.

Pierre JL, Baret P, Serratrice G. Hydroxyquinolines as iron chelators. *Curr Med Chem.* 2003;10(12):1077-84.

Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:1157-78.

Říha M, Karličková J, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *J Inorg Biochem.* 2013;123:80-7.

Saadeh HA, Sweidan KA, Mubarak MS. Recent Advances in the Synthesis and biological Activity of 8-Hydroxyquinolines. *Molecules.* 2020;25(18):4321.

Sears ME. Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification--a review. *ScientificWorld Journal.* 2013;2013:219840.

Shen AY, Chen CP, Roffler S. A chelating agent possessing cytotoxicity and antimicrobial activity: 7-morpholinomethyl-8-hydroxyquinoline. *Life Sci.* 1999;64(9):813-25.

Shi X, Dalal NS, Kasprzak KS. Generation of free radicals from model lipid hydroperoxides and H₂O₂ by Co(II) in the presence of cysteinyl and histidyl chelators. *Chem Res Toxicol.* 1993;6(3):277-83.

Simonsen LO, Harbak H, Bennekou P. Cobalt metabolism and toxicology--a brief update. *Sci Total Environ.* 2012;432:210-5.

Smith SW. The role of chelation in the treatment of other metal poisonings. *J Med Toxicol.* 2013;9(4):355-69.

Smith LJ, Holmes AL, Kandpal SK, Mason MD, Zheng T, Wise JP Sr. The cytotoxicity and genotoxicity of soluble and particulate cobalt in human lung fibroblast cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;278(3):259-65.

Tvermoes BE, Finley BL, Unice KM, Otani JM, Paustenbach DJ, Galbraith DA. Cobalt whole blood concentrations in healthy adult male volunteers following two-weeks of ingesting a cobalt supplement. *Food Chem Toxicol.* 2013;53:432-9.

Unice KM, Monnot AD, Gaffney SH, Tvermoes BE, Thuett KA, Paustenbach DJ, Finley BL. Inorganic cobalt supplementation: prediction of cobalt levels in whole blood and urine using a biokinetic model. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(7):2456-61.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208.

Waters RS, Bryden NA, Patterson KY, Veillon C, Anderson RA. EDTA chelation effects on urinary losses of cadmium, calcium, chromium, cobalt, copper, lead, magnesium, and zinc. *Biol Trace Elem Res.* 2001;83(3):207-21.

Wijma RA, Huttner A, Koch BCP, Mouton JW, Muller AE. Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J Antimicrob Chemother.* 2018 ;73(11):2916-2926.

Wright JV. Bio-identical steroid hormone replacement: selected observations from 23 years of clinical and laboratory practice. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1057:506-24.

Yuan S, Chan JFW, Chik KKH, Chan CCY, Tsang JOL, Liang R, Cao J, Tang K, Chen LL, Wen K, Cai JP, Ye ZW, Lu G, Chu H, Jin DY, Yuen KY. Discovery of the FDA-approved drugs bexarotene, cetilistat, diiodohydroxyquinoline, and abiraterone as potential COVID-19 treatments with a robust two-tier screening system. *Pharmacol Res.* 2020;159:104960.