

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmakologie a toxikologie

**POROVNÁNÍ ŽELEZO CHELATAČNÍCH VLASTNOSTÍ
SYNTETICKÝCH CHELÁTORŮ ŽELEZA**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2011

Pavla Zárubová

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

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za všechny poskytnuté rady a připomínky a za pomoc při psaní této diplomové práce. Zároveň děkuji i Ing. Kateřině Macákové za pomoc při měření a v neposlední řadě oběma děkuji za velmi vstřícný přístup.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract in English	8
Teoretická část.....	10
1 Úvod.....	11
2 Železo	12
2.1 Fyziologický význam železa	12
2.2 Patologie železa	15
2.2.1 Přetížení organismu železem	15
2.2.2 Sideropenie	17
2.2.3 Akutní intoxikace železem	17
2.3 Toxické vlastnosti železa	18
3 Chelátory železa	21
3.1 Vlastnosti chelátorů železa	21
3.2 Chelatační léčba.....	23
3.2.1 Chelatační léčba u pacientů s dlouhodobou transfuzní terapií	23
3.2.2 Terapie thalasemie	25
3.2.3 Terapie při akutní intoxikaci železem.....	25
3.3 Charakteristiky jednotlivých chelátorů železa	26
3.3.1 Deferoxamin (DFO)	26
3.3.2 Deferipron (L1)	27
3.3.3 Deferasirox (ICL670)	28

3.3.4	Dexrazoxan (DEX).....	29
3.3.5	PIH (111)	29
3.3.6	SIH.....	30
3.3.7	Hydroxychinolinoly.....	31
3.3.8	EDTA	32
3.3.9	Rutin	33
3.4	Možnosti klinického využití chelátorů v budoucnu	34
	Experimentální část.....	36
4	Cíl práce.....	37
5	Materiál a metoda.....	38
5.1	Chemikálie.....	38
5.2	Přístroj	38
5.3	Ferrozinová metoda.....	38
5.4	Vztah mezi absorbancí a koncentrací železnatých iontů	40
5.5	Postup	40
5.5.1	Příprava zásobních roztoků	40
5.5.2	Příprava testovaných roztoků	41
5.6	Postup měření kalibrační křivky (Tab. 1)	41
5.7	Vlastní stanovení chelatace (Tab.2)	42
5.7.1	Chelatace Fe ²⁺ v DMSO	42
5.7.2	Chelatace Fe ³⁺ v DMSO	42
5.8	Redukce Fe ³⁺	43

5.9	Výpočet.....	43
5.9.1	Chelatace železa	43
5.9.2	Redukce železa	46
5.10	Statistická analýza.....	46
6	Výsledky.....	47
6.1	Chelatace	47
6.2	Redukce	55
7	Diskuze	57
8	Závěr.....	59
9	Seznam zkratek	60
10	Seznam použité literatury	61

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Pavla Zárubová

Školitel: PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Název práce: Porovnání železo chelatačních vlastností syntetických chelátorů železa

Železo je nezbytný prvek pro život buněk. Nebezpečným pro organismus může být jeho nedostatek, ale i nadbytek. Organismy proto homeostázu železa pečlivě regulují na buněčné i celotělové úrovni. Nedostatek železa může vzniknout v důsledku zvýšených krevních ztrát/zvýšených nárocích (menarche, těhotenství, laktace), při nedostatku železa v potravě a/nebo při poruchách jeho vstřebávání. Nadbytek železa může vzniknout při akutní intoxikaci, nebezpečné zejména u dětí, a také chronické intoxikaci při poruchách metabolismu železa, zejména ale podáváním častých krevních transfuzí při terapii hematologických onemocnění.

Chelátory železa jsou rozsáhlou skupinou látek s velmi variabilní chemickou strukturou. Jsou využívány terapeuticky v různých indikacích po řadu let a další indikace jsou v současné době předmětem výzkumu. Tradičně jsou využívány pro chelatační léčbu u akutní intoxikace a při chronickém přetížení železem, pozornost je jim v současné době věnována v chemoterapii nádorů či neurodegenerativních onemocnění. V terapii hrají důležitou roli mj. jejich farmakokinetické vlastnosti a lipofilita. Dříve bylo možno pacienty léčit pouze parenterálně deferoxaminem, v současnosti je možné také perorální podání (deferipron, deferasirox).

Cílem této práce bylo porovnávání chelatační účinnosti u různých chelátorů: kromě zmíněných registrovaných chelátorů byl v diplomové práci zkoumán také flavonoid rutin, skupina 8-hydroxychinolinů (parentní látka a jeho analoga chloroxin a 5-chlor-7-jod-8-hydroxychinolin), skupina aroylhydrazonů /PIH (pyridoxal isonicotinoyl hydrazon) a SIH (salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazon)/ a také neselektivní chelátor EDTA.

Chelatační účinnost byla změřena spektrofotometricky za pomoci ferrozinu, který je selektivním indikátorem železnatých iontů, se kterými tvoří fialově zbarvený komplex s absorpčním maximem při 562 nm. Proto byly železnaté ionty měřeny přímo přidáním ferrozinu, pro změření celkového železa byl přidán hydroxylaminový vodný roztok, aby zredukoval železité ionty na železnaté, které byly následně změřeny přidáním ferrozinu. Účinky jednotlivých chelátorů byly porovnány s deferoxaminem pomocí 95 % konfidenčních intervalů.

V případě chelatace železnatých iontů byl za nepufrovaných podmínek použitých v experimentu nejúčinnějším chelátorem klasický chelátor EDTA. Také deferasirox a deferipron byly účinnější než deferoxamin. Skupina 8-hydroxychinolinů vykazovala srovnatelnou účinnost s deferoxaminem, naopak chelátory SIH, PIH a flavonoid rutin byly méně účinné.

V případě chelatace celkového železa měly srovnatelnou účinnost s deferoxaminem klinicky užívané chelátory (deferasirox, deferipron), experimentálně zkoušené PIH, SIH a EDTA. Menší účinnost měla skupina 8-hydroxychinolinů, z nichž nejslabší byl 8-hydroxychinolin. Flavonoid rutin byl v těchto podmínkách nejslabším chelátorem, současně byl také jediným ze zkoumaných chelátorů, který redukoval významně železité ionty na železnaté.

Abstract in English

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of pharmacology and toxicology

Candidate: Pavla Zárubová

Tutor: Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Name of thesis: Comparison of iron-chelating properties of synthetic iron chelators

Iron is an essential element for living cells. Both lack of iron (sideropenia) and iron overload can be dangerous for the organism. Thus, iron homeostasis is maintained on the cellular and whole body levels. Sideropenia may occur as a consequence of increased blood loss/ increased iron need (menarche, gravidity, lactation), lack of iron in food or in derangements of gastrointestinal tract. Iron excess can be caused by acute intoxication, dangerous mainly in children, and also in chronic poisoning, caused by hereditary disorders or especially by frequent blood transfusions during the treatment of some haematological diseases.

Iron chelators are a wide group of chemical substances with very variable structure. They have been used therapeutically in different indications for many years and other indications are being researched recently. Traditionally, they are used for chelation therapy in acute intoxication and in chronic iron overload, nowadays they are in the center of research attention in association with cancer and neurodegenerative diseases. Their pharmacokinetic characteristics and lipophilicity play among others important role in the therapy. In the past, patients could be treated only parenterally by deferoxamine, in the present oral chelators (deferiprone, deferasirox) are available, too.

The aim of this study was the comparison of chelation efficiency of different chelators: registered chelators mentioned above, flavonoid rutin, a group of 8-hydroxyquinolines (parent compound and its analogues chloroxin and 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline), a group of aroylhydrazones /PIH (pyridoxal isonicotinoyl hydrazone) and SIH (salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazone)/, and unselective chelator EDTA.

Spectrofotometric method used for the measurement of chelation efficiency by use of ferrozine, which is a selective indicator for ferrous ions. It forms a magenta coloured complex with these ions with the absorption maximum at 562 nm. Therefore, ferrous ions were measured directly by addition of ferrozine, for the assessment of total iron, hydroxylamine aqueous solution was added in order to reduce ferric ions into ferrous which were afterwards measured by addition of ferrozine. Efficiency of each chelator was compared with deferoxamine using 95% confidence intervals.

The most efficient ferrous chelator in tested non-buffered conditions was EDTA. Also deferasirox and deferiprone were more efficient than deferoxamine. A group of 8-hydroxyquinolines showed comparable efficiency with deferoxamine, conversely chelators SIH, PIH and flavonoid rutin were less efficient.

In the case of total iron assessment, clinically used chelators (deferasirox, deferiprone), experimentally tested PIH, SIH and as well EDTA had comparable efficiency with deferoxamine. Less efficient was the group of 8-hydroxyquinolines, the least efficient of them was 8-hydroxyquinoline. Flavonoid rutin was in these conditions the least efficient chelator, moreover, it was the only one from tested chelators, which reduced ferric ions into ferrous.

Teoretická část

1 Úvod

Železo je esenciálním prvkem, účastnícím se životně nezbytných procesů. Jeho hladiny však musí být pečlivě regulovány, neboť je nedostatek a zejména jeho přebytek mohou být pro organismus nebezpečné. Regulace hladin železa se děje prostřednictvím střevní absorpce. Jeho toxicita je dána především jeho redoxní aktivitou, neboť mohou vznikat reaktivní volné radikály (ROS, z angl. Reactive Oxygen Species). V živých organismech je železo vázáno v proteinech (ferritin, transferin, hemosiderin, hemoglobin, myoglobin).

Poruchy metabolismu železa můžeme rozdělit na poruchy z nedostatku železa a poruchy z přetížení železem. Tato práce je orientována na poruchy z přetížení železem (akutní intoxikace a chronické intoxikace, která nastává u pacientů s dlouhodobou transfuzní léčbou, jako např. při léčbě anémie, thalasemie, myelodysplastického syndromu.)

Chelátory železa jsou molekuly různé struktury, které snižují hladiny železa a brání akumulaci železa ve tkáních. Můžeme je dělit dle různých kritérií, jako je např. selektivita a afinita k Fe^{3+} , vaznost, lipofilita, metabolismus a exkrece, způsob podání atd.

Chelatační léčba je důležitá v terapii u pacientů s chronickou transfuzní léčbou zejména u pacientů s thalasemií i např. v terapii akutní intoxikace železem. Uplatnění by chelatační léčba mohla v budoucnu najít i v jiných indikacích, zejména terapie nádorů a neurodegenerativních onemocnění.

2 Železo

2.1 Fyziologický význam železa

Železo je biogenní prvek vyskytují se ve všech živých buňkách od jednobuněčných organismů až po savce. Atom železa je schopen velmi snadno vázat i uvolňovat elektron, čehož živé buňky využívají v celé řadě vitálních biochemických reakcí. Vedle své nejznámější funkce transportéru kyslíku v podobě hemoglobinu, je železo nutné i pro syntézu nukleových kyselin (DNA i RNA), syntézu řady proteinů, účastní se řízení buněčné proliferace a diferenciaci a také apoptózy. Je součástí mnoha enzymů (cytochromy, katalázy, peroxidázy, oxidázy, ribonukleázy, NO syntázy). (1)

Pozornost řady vědeckých týmů je upřena také na úlohu železa v procesech stárnutí tkání, neurodegenerace, maligního bujení, aterosklerózy a role železa v imunitním systému. (1) Jeho nedostatek zastavuje buněčný růst a může vést až k buněčné smrti. (2)

Vlastnost atomu železa snadno vázat a uvolňovat elektron může však mít i negativní dopady na živé buňky, kdy volné železo může katalyzovat tvorbu toxických radikálů (zvláště hydroxylového radikálu $\text{OH}\cdot$). (1) Proto je životně důležité, aby homeostáza železa byla citlivě regulována.

Železo se vyskytuje v organismu ze všech biogenních kovů v nejvyšším množství, což je 35 mg/kg u žen a 45 mg/kg u mužů. (1) Největší množství železa je uloženo v cirkulujících erytrocytech (1,8g), parenchymatických buňkách jater (1g), retikuloendoteliálních makrofázích (0,6g), kostní dřeni (0,3g) a svalech (0,3 g). (2).

Je zajímavé, že savci nemají pro železo žádný aktivní exkretční mechanismus. (2). Z celkového pohledu je nejdůležitější regulace vstřebávání železa enterocyty, největší podíl na exkreci železa má exfoliace epitelů trávicího traktu, u žen i ztráty menstruačním krvácením. Malé množství železa se z organismu ztrácí odlučováním buněk jiných sliznic, jako kožního epitelu, kožních adnex a močí. (1)

Železo je v krevním proudu vázáno na bílkoviny, zejména transportní protein transferin. Molekula transferinu váže dva atomy trojmocného železa Fe^{3+} a má vysokou afinitu ke specializovaným receptorům na hematopoetických buňkách. Byly popsány dva typy transferinových receptorů (TfR) - TfR1 a TfR2. (1)

Feritin je hlavní zásobní formou železa v organismu. Je tvořen dvěma typy podjednotek, označovaných jako L (Light, Liver) a H (Heavy-, Heart) feritin. Další formou existence zásobního železa v buňce je jeho vazba na hemosiderin, jedná se o makromolekulární komplex feritinu s lipidovými strukturami. Vyskytuje se především v Kupferových buňkách. (1)

Organizmy jemně regulují homeostázu jak na buněčné, tak i na vyšších úrovních. Buněčnou a systémovou regulaci železa nelze od sebe navzájem oddělit, protože tvoří integrovaný celek vzájemně se ovlivňujících pochodů. (1)

Regulace metabolismu železa na buněčné úrovni je řízena několika geny na transkripční, posttranskripční a posttranslační úrovni. Hlavní roli hrají transferinový receptor (TfR) a feritin, jejichž exprese je kontrolována na úrovni translace regulačními proteiny (iron regulatory proteins- IRPs), které se vážou na specifické sekvence v mRNA (iron regulatory elements-IREs). Dle umístění IRE v molekule mRNA je po vazbě IRP její translace buď zablokována, nebo potencionována. Nadbytek železa v buňce tak způsobí zvýšenou expresi genů pro feritin a útlum exprese genu pro TfR, při nedostatku železa, tj. při buněčné sideropenii je tomu naopak. (1)

Na celotělové úrovni jsou klíčovými procesy regulace železa absorpce železa v enterocytech a retence nebo uvolňování železa z buněk monocyto-makrofágového systému. Makrofágy kostní dřeně, jater a sleziny představují hlavní regulátory recyklace erytrocytárního železa. Železo získávají fagocytózou erytrocytů. Export železa z monocyto-makrofágového systému je nutný k recyklaci železa. Pro eflux železa z buněk retikuloendoteliárního systému (RES) je mimo jiné nutná neporušená funkce ferroportinu. (1)

Homeostáza železa je udržována tedy díky regulaci absorpce v duodenu, kdy je při vyšších ztrátách i vyšší absorpce (3)

V potravě jsou zdrojem železa hlavně živočišné bílkoviny, zde se nachází v podobě vázané na hem a jako nehemové železo. Nehemové železo se vyskytuje zejména ve formě trojmocného Fe^{3+} , které musí být zredukováno na Fe^{2+} , aby mohlo být transportováno přes střevní epitel. (2) Děje se tak na apikální membráně duodenálních enterocytů prostřednictvím reduktázového duodenálního cytochromu B (DcytB). Hlavními faktory usnadňujícími vstřebávání železitých iontů je kyselina askorbová a pravděpodobně i redukující aminokyseliny uvolňující se z masa. Vstřebávání hemového železa je pro organismus nejsnadnější, řízení tohoto procesu však zůstává z velké části neobjasněno. (1)

Vstřebávání dvojmocného atomu železa je zprostředkované transportním proteinem DMT1 (divalent metal transporter 1). Exprese DMT1 je regulována vlivem celotělových zásob železa, jeho koncentrací v dietě nebo posttranslačně. (1, 3)

Basolaterální membrána enterocytů představuje velmi pravděpodobně klíčovou strukturu regulace influxu železa do organismu. Železo, které není přes bazolaterální membránu přeneseno, je vyloučeno exfoliací enterocytů. Zralé enterocyty zde exprimují proteiny ferroportin a hefeitin, které slouží k transportu

železa do krve. (1) Ferroportin je tedy basolateriálním exportérem železa a pravděpodobně také redukuje ionty železité na železnaté. (2) Dvoumocné železo po přenosu přes tuto cytoplazmatickou membránu okamžitě oxidováno na trojmocné hefestinem, což je enzymatický protein vykazující podobnost s plasmatickým proteinem ceruloplasminem. (3) Železité ionty jsou pak schopny vazby na transferin. (1)

Takto navázané železo putuje k cílovým buňkám a pomocí specifických vazeb se napojí na jejich membránový transferinový receptor 1 (TfR1). Celý komplex je pak pomocí endocytózy absorbován do buňky. Z endosomu je v důsledku okyselení činností ATP-dependentní protonové pumpy uvolněno železo. TfR1 je také uvolněn a navrácí se zpátky na povrch buňky k dalšímu použití. Železité ionty jsou pak znovu redukovány na železnaté, protože jenom železnaté ionty mohou být transportovány pomocí DMT-1 přes endocytární membránu do cytoplasmy (2). Celý proces nazýváme buněčná endocytóza transferinového železa. (1)

2.2 Patologie železa

Poruchy metabolismu železa můžeme rozdělit na onemocnění zapříčiněná nedostatkem tohoto prvku, a na stavy související s přetížením organismu železem a na poruchy utilizace železa. Tyto poruchy mohou být vrozené nebo získané.

2.2.1 Přetížení organismu železem

Přetížení organismu železem vzniká nejčastěji u pacientů s chronickou transfuzní léčbou, u některých hemolytických stavů, při neefektivní erythropoeze, u těžkých hepatopatií a u vrozených stavů se zvýšeným vstřebáváním železa,

označované jako hereditární hemochromatóza typu I až V. Pacienti, kteří jsou doživotně léčeni pomocí krevních transfuzí, jsou intoxikováni železem, a to pak musí být odstraňováno chelátory železa. (5)

Hereditární hemochromatóza je většinou autozomálně recesivním onemocněním, při němž jsou tito jedinci ohroženi nadměrným ukládáním Fe do parenchymatozních orgánů. Manifestuje se většinou širokým spektrem nespecifických symptomů, tzv. „bronzový diabetes“. Jedná se o primární přetížení organismu železem v důsledku poruchy regulace metabolismu železa. Klinická manifestace hemochromatózy je: hepatopatie (fibróza, cirhóza, karcinom), slabost, malátnost, úbytek váhy, dále hypotyreóza, hyperpigmentace, hypogonadismus, kardiomyopatie (dysrytmie, srdeční selhávání), diabetes mellitus, insuficience nadledvin, bolest břicha, artropatie. (5) Příčinou tzv. klasické hemochromatózy bývá mutace na genu pro HFE protein, který je spojen s TfR1 a reguluje i expresi hepcidinu. Tato porucha se většinou projevuje až po čtyřicátém roce života a příznakem bývá v souladu s výše uvedeným chronická únava, bolest kloubů, pigmentace kůže, impotence, cirhóza a zvětšení jater, diabetes mellitus nebo arytmie. Naproti tomu juvenilní hemochromatóza se manifestuje již po 10. roce života, protože absorpce železa ve střevě je větší a akumulace rychlejší. Může být způsobena mutací genu pro hemojuvelin nebo pro hepcidin (negativní regulátor transportu železa přes membrány erytrocytů a buněk monocyto-makrofágového systému). Projevuje se kromě klasických příznaků i kardiomyopatií nebo endokrinními poruchami a její průběh je vážnější. (38) Hereditární hemochromatóza může být způsobena také mutacemi jiných genů: genu HaMP kodující hepcidin (typ 2b), genu pro TfR2 (typ 3), mutace genu pro ferroportin 1 (typ 4 – autozomálně dominantní), mutace genu FTH1 kodující H-řetězec feritinu (typ 5). (5)

V současné době je zkoumán zejména možný vliv poruch metabolismu železa na rozvoj kardiovaskulárních chorob, diabetes mellitus, zhoubného bujení i poruch imunity, možnost ovlivnění vyšší nervové činnosti atp. Kancerogenní vliv přetížení organismu železem je jednoznačně prokázán u hepatocelulárního karcinomu. Vzhledem k vlivu Fe na proliferaci a diferenciaci buněk však studie kancerogenního efektu přetížení organismu dále pokračují. (5)

2.2.2 Sideropenie

O sideropenických stavech hovoříme tehdy, existuje-li v organismu absolutní či relativní nedostatek železa. Tento stav se vyvíjí při negativní bilanci železa při zvýšené utilizaci železa (růst, puberta, gravidita, laktace), zvýšené ztráty železa (hypermenorea, metrorrhagie, výraznější hematurie, dárci krve), u poruch vstřebávání železa (antacidita, stavy po resekci žaludku, malabsorpční syndromy atd.), nedostatek Fe v potravě (vegetariáni, podvýživa). (5)

2.2.3 Akutní intoxikace železem

Akutní otravy bývají časté u dětí, které náhodně (záměnou za bonbóny) požíly léčiva obsahující Fe^{2+} soli. Intoxikace mnohdy končí fatálně, zejména u dětských pacientů mezi prvním a druhým rokem. Toxicita závisí na obsahu elementárního Fe v jednotlivých sloučeninách. Např. 300 mg tableta železnatého glukonátu obsahuje pouze 35 mg elementárního železa, zatímco 200 mg tableta železantého sulfátu obsahuje 60 mg železa (21) Smrtelnou intoxikaci u dítěte způsobí již např. 0,5 g Fe (což odpovídá asi 2,5 g FeSO_4). Akutní otrava se manifestuje nejprve zvracením (za zhruba 1–6 hodin po požití).

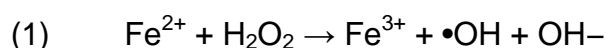
Intoxikace železem má velký dopad na GIT a oběhový systém. (7) Játra bývají velmi zasažena, neboť jsou prvním orgánem, který se setká s toxickým železem, a také mají velkou vazebnou kapacitu pro volné železo. Může se rozvinout jaterní selhání s hypoglykemií a koagulopatií, což bývá fatální. (6)

Při vážných intoxikacích, kdy je indikován deferoxamin intravenózně, spolu s podpůrnou léčbou, přičemž je pozornost věnována udržení objemu krve, dále korekci acidózy a poruch koagulace, a náhradě krevních komponentů. Hemodialýza a výměna krve by měly být rezervovány pro těžké případy, kdy selže klasická léčba. Ke snížení morbidity a mortality je nezbytná včasná diagnóza a začátek léčby akutní intoxikace železem u dětí. (7)

2.3 Toxické vlastnosti železa

Jak již bylo řečeno, vzhledem k toxicitě železa musí být jeho homeostáza pečlivě řízena. Schopnost železnatých iontů odevzdávat elektrony a železitých iontů elektrony přijímat, je nezbytnou reakcí při mnoha biochemických pochodech, a řadí tak železo k esenciálním prvkům.

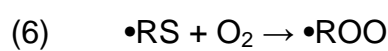
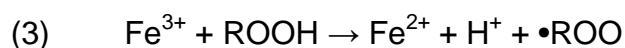
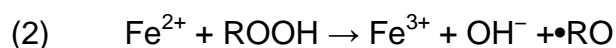
Avšak tato vlastnost může být nebezpečnou, neboť železo může za aerobních podmínek katalyzovat vznik volných radikálů. Železnaté ionty jsou totiž katalyzátory Fentonovy reakce, při které vzniká reaktivní hydroxylový radikál (8). (viz rovnice č. 1)



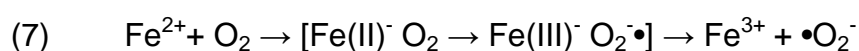
ROS jsou vedlejšími produkty dýchacího řetězce, nebo mohou vznikat v jiných buněčných kompartmentech jako jsou peroxisomy, endoplazmatické retikulum či cytoplazma. Dalším zdrojem může být NADPH-oxidázový komplex, což je důležitá součást antimikrobiální obrany organismu. Vytváří totiž velké množství superoxidu při

„oxidativním vzplanutí“, který se pak spontánně přeměňuje na peroxid vodíku. Produkty této reakce pak umožňují vzniknout dalším oxidantům jako je dusičnan (ONOO⁻) nebo chloristan (OCl⁻), kteří pak ještě zvyšují cytotoxicitu. (8)

Redoxní aktivita železa může tvořit i reaktivní organické látky jako peroxylové (•ROO), alkoxylové (•RO), thiylové (•RS) nebo thiylo-peroxylové (•RSOO) radikály (viz rovnice č. 2-6)



Konečně, volné radikály mohou vznikat přímou reakcí Fe²⁺ s kyslíkem. (viz rovnice č. 7)



Tyto volné radikály jsou vysoce reaktivní a mohou zapříčinit oxidaci proteinů, peroxidaci lipidových membrán a modifikaci nukleových kyselin. Podobně, dusíkové radikály mohou poškozovat proteiny nitrací. Při překročení antioxidační kapacity organismu vzniká oxidační (a nitrační) stres, s nímž se setkáváme u mnoha patologických stavů, jako jsou chronická zánětlivá onemocnění, ischemická choroba srdeční nebo neurodegenerativní onemocnění. Nadbytek železa s jeho redoxní aktivitou zhoršuje oxidační stres a vede k akcelerované degeneraci tkání. To je zřejmé jak u primárních, tak sekundárních onemocnění přetížení železem. (8)

Toxicita volných radikálů je způsobena také jejich schopností zasahovat do metabolismu železa. Mohou vyvolat vstup železa do buněk, mobilizovat železo z bílkovin, pravděpodobně nejjednodušeji z klastru FeS. Na druhou stranu, ukázalo se, že vznikající NO chrání buňky inhibicí zvyšujícího se příjmu do buněk a odstraňováním železa z buněk.

Peroxynitrit také ovlivňuje buněčný metabolismus železa. Zdá se, že to má menší dopad než u ostatních reaktivních radikálů. Na jednu stranu, NO chrání buňky před superoxidovým radikálem tím, že s ním reaguje, na druhou stranu musí být zdůrazněno, že reakční produkt – peroxynitrit - může být rozložen na vysoce reaktivní hydroxylový radikál. (8)

3 Chelátory železa

3.1 Vlastnosti chelátorů železa

Železo má koordinační číslo 6, takže se na jeho centrální atom může navázat až 6 jednovazných ligandů, které pak vytvoří osmistěnný chelát. (10). Po vytvoření komplexu je umožněn jeho efektivní transport a exkrece, přičemž nedochází k redistribuci železa. Chelátory železa tak snižují hladiny železa ve tkáních, brání akumulaci železa v orgánech a neutralizují toxický „pool železa“. (11)

Ligandy pak mohou být rozděleny podle počtu donorových atomů, kterými vytváří koordinační vazbu s centrálním atomem kovu, na dvojjazné, trojjazné a šestivazné. Šestivazné chelátory mají větší molekulovou hmotnost ve srovnání s dvoj- a trojjaznými. (11)

Přestup přes biologické membrány difuzí, a tak i absorpce z GIT a buněčná penetrace, závisí nejen na velikosti molekuly, ale také na lipofilitě a náboji. (11) Aby mohl být chelátor užit perorálně, musí se dostatečně absorbovat z GIT (rozdělovací koeficient $>0,2$). Avšak velmi lipofilní molekuly (rozdělovací koeficient >1) mohou penetrovat biologickými bariérami jako je hematoencefalická bariéra či placenta, což zapříčiní jejich toxicitu. (12) Tak např. DFO, jako mnohé šestivazné chelátory, není absorbován z GIT. Proto je v současné době věnována pozornost zejména dvoj- a trojjazným chelátorům, které se mohou užit perorálně. (11)

Důležitou charakteristikou chelátoru je jeho afinita a selektivita k železitým iontům. Tím se snižuje schopnost chelátoru vyvázat důležité dvojjazné ionty, jako např. měďnaté a zinečnaté. (11) Mnoho trojjazných iontů, jako např. aluminium(3+) a galium(3+) nejsou esenciální pro buňky, a proto jsou v biologických podmínkách

mnohem výhodnější chelátory železitých iontů. Vyvinout netoxické chelátory železnatých iontů je proto velmi obtížné, ne-li nemožné (12). Afinity chelátoru k železu a stabilita komplexu ligand-kov, je vyjádřena jako hodnota pFe^{3+} , což je záporný dekadický logaritmus koncentrace volných Fe^{3+} (měřeno v roztoku ligandu $10 \mu M$ a $Fe^{3+} 1 \mu M$ při pH 7,4). Čím je tato hodnota vyšší, tím je vyšší hodnota komplexu ligand-kov. (11)

Chelátor by měl odstranit pouze přebytečné železo. Nejen že mohou mít přímý toxický efekt, ale také mohou ovlivňovat homeostázu železa (absorpce, distribuce, utilizace), mohou interferovat se železo dependentními enzymy a odstraňovat důležité ionty kovů (zinek, vápník apod.) (11). Chelátory, které váží ionty železnaté i železité, jsou schopny „redoxního cyklování“. Tato nežádoucí vlastnost může vést k produkci hydroxylových radikálů. (12) Je nepravděpodobné, že by chelátory s vysokou selektivitou k železnatým nebo železitým iontům způsobovaly redoxní cyklování. Komplexy s dusíkovými ligandy mají vyšší redoxní potenciál, a koordinační železo může být při biologických podmínkách enzymaticky redukováno. Tyto komplexy mohou „redoxně cyklovat“ při aerobních podmínkách za tvorby kyslíkových radikálů. (13)

Je důležité, aby molekula chelátoru nebyla v těle metabolizována na metabolit bez schopnosti vázat železo. Musela by se pak zvýšit dávka chelátoru, čímž by se také zvýšilo riziko toxicity. Chelátor musí být přítomen v extracelulární tekutině v určité koncentraci ($10-25 \mu M$) a musí mít dostatečně dlouhý eliminační poločas. U sloučenin s kratším poločasem je menší pravděpodobnost, že budou účinné. (12)

3.2 Chelatační léčba

Chelatační léčba je užívána v terapii akutní a chronické intoxikace železem, v současné době je zkoumáno jejich využití i v dalších indikacích.

Vývoj chelátorů železa vedl od prvotních sideroforů a aromatických heterocyklických ligandů ke vzniku nové generace účinných chelátorů. V terapii se užívají jak přirozeně se vyskytující chelátory, tak i syntetické chelátory. Bylo navrženo a syntetizováno široké pole syntetických chelátorů, s cílem syntézy ideálního chelátoru. (13)

Efektivní chelatační léčba může působit jako prevence orgánové toxicity při přetížení železem, nebo ji může zvrátit. Při podání orálních chelátorů se v klinických studiích objevilo méně srdečních komplikací než při parenterálním podání chelátorů. Podstatná část důkazů totiž vypovídá o tom, že deferipron lépe odstraňuje železo ze srdce než deferoxamin, a snižuje kardiotoxicitu. V multicentrické retrospektivní studii se 359 pacienty s thalasemií major, kde 359 objektů bylo léčeno deferoxaminem a 157 deferipronem, se u 52 pacientů léčených deferoxaminem se vyskytly srdeční komplikace, zatímco u pacientů léčených deferipronem se žádné srdeční komplikace nevyskytly. (14)

3.2.1 Chelatační léčba u pacientů s dlouhodobou transfuzní terapií

Chelatační léčba je nezbytnou součástí terapie hematologických pacientů s chronickou transfuzní léčbou, kteří jsou přetížení železem nebo již vykazují jeho známky. V našich podmínkách jsou dlouhodobě transfundováni nejčastěji pacienti s myelodysplastickým syndromem (MDS). Mnohem vzácnější jsou anemie ze

skupiny vrozených anemií, jako jsou vrozené aplastické anemie, dyserythropoetické anemie, thalasemie a poruchy enzymů.

Každá transfuzní jednotka představuje přísun asi 200-250 mg Fe, což při denním vylučování asi 1-2 mg železa a nutnosti opakovaných přívodů krve vede nevyhnutelně k hromadění Fe v organismu. Na kumulaci Fe se podílí i zvýšená resorpce v důsledku refrakterní anemie a nadměrné uvolňování železa z buněk při neefektivní erythropoéze. U nemocných s MDS, u nichž je mocnění srdce velmi častou komorbiditou, je poškození myokardu velmi časté a je tak nejčastější neleukemickou příčinou smrti.

Obecně platí pro všechny pacienty, kteří jsou dlouhodobě léčeni transfuzemi, že poškození myokardu je hlavní příčinou smrti. Důležité však je, že při správné chelatační léčbě lze kardiální poškození dokonce zvrátit. U dětských pacientů s thalasemií je velmi negativní vliv přetížení Fe na myokard. Poškození myokardu se může projevit již ve věku kolem 10 let, a kolem 16 let již může docházet ke známkám srdečního selhání. Naopak správná chelatace, jak již bylo řečeno, může dokonce příznivě ovlivnit poškození, které již vzniklo.

Chelatační terapie je zatím jedinou prevencí akumulace Fe v organismu. Chelátory redukují množství tkáňového Fe, zabraňují jeho hromadění a neutralizují toxické plazmatické Fe. Po vazbě na chelátor je Fe posléze eliminováno z organismu močí a/nebo stolicí.

Chelatační terapie u nemocných závislých na transfuzích se stává jejich chronickou trvalou medikací, a je proto nutné, aby byla dobře snášena, měla jednoduchou aplikaci, co nejmenší množství komplikací a minimální toxicitu. Pacienti s MDS jsou léčeni chelátory: deferoxamin (Desferal[®]), deferasirox (Exjade[®] firmy Novartis). (15)

3.2.2 Terapie thalasemie

Ke snížení ukládání železa u pacientů s thalasemií major se užívá chelatační léčba, dále ve správnou dobu užitá splenektomie, a také specifická terapie komplikací. (16)

U dětí s homozygotní formou β -thalasemie se většinou objevují některé nebo všechny komplikace anemie a nedostatečné erythropoézy. Prevencí těchto komplikací jsou pravidelné transfuze. Pokud je brzy a pravidelně podávána transfuze, nemusí dojít ke zvětšení sleziny. U mnohých pacientů v adolescentním věku léčba nevyžadovala splenektomii. Bez chelatační terapie může dojít k progresivní orgánové dysfunkci, způsobené akumulací železa. Nejčastější a také nejzávažnější bývá poškození myokardu. I malé množství volného železa může vyvolat tvorbu kyslíkových reaktivních radikálů, které mají za následek poškození myokardu. Riziko srdečního selhání je ještě zvýšeno při současné plicní hypertenzi a zánětu myokardu. (16)

Prvním perorálním lékem, používaným v různých zemích především u vrozených anemií a zvláště thalasemia major, byl deferipron (Ferriprox[®] firmy Apotex). (15)

3.2.3 Terapie při akutní intoxikaci železem

Pro dávku menší než 30 mg/kg, pacientům nemusí být podána aktivní léčba. Vyvoláme zvracení, u vážnějších případů je nutná hydratace. Při chelatační léčbě je u akutní intoxikace železem podán deferoxamin. (17)

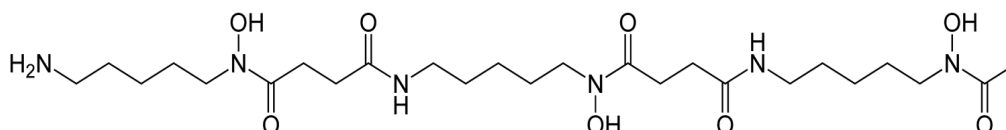
3.3 Charakteristiky jednotlivých chelátorů železa

3.3.1 Deferoxamin (DFO)

Deferoxamin (Obr. 1) je chelátorem se specifickou afinitou k železitým iontům, méně pevně váže hliník. Je přirozeně vyskytujícím se chelátorem produkovaným *Streptomyces pilosus*. Užívá se k léčbě akutní intoxikace železem (viz výše) i při chronickém přetížení železem. (18)

Tento šestivazný siderofor váže železo v poměru 1:1. Avšak jeho vysoce hydrofilní povaha limituje jeho účinnost, nevstřebává se tedy z GIT a nelze jej podávat perorálně. Vzhledem k jeho rychlému metabolismu je jeho eliminační poločas pouze 12 min. (19, 20) Neaktivní komplexy jsou vylučovány stolicí nebo močí. (15)

Tento standardní chelátor byl registrován již v roce 1970. Jde o účinný chelátor Fe, ale jeho aplikace je komplikovaná a pro nemocné zatěžující. Podává se subkutánně či intravenózně, vzhledem ke krátkému poločasu jsou nutné dlouhodobé infuze. Časté jsou lokální reakce při podkožní aplikaci. To pro nemocné se současnou trombocytopenií a neutropenií může znamenat nebezpečí rozvoje velkých hematomů a abscesů v místě vpichu. (15) Deferoxamin může ve vyšších dávkách způsobovat zpomalení růstu, ototoxicitu, poruchy zraku, ale i deformace kostí. (21)



Obr. 1: Deferoxamin

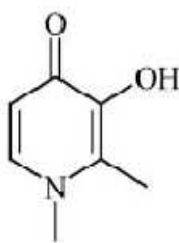
3.3.2 Deferipron (L1)

Významným pokrokem bylo uvedení perorálních chelátorů železa. Deferipron (Obr. 2) byl prvním perorálním lékem, používaným v různých zemích především u vrozených anemií a zvláště u thalasemia major (Ferriprox[®] firmy Apotex). (15)

Patří mezi dvojjazné chelátory, které se železem tvoří komplexy v poměru 3:1. (19)

Deferipron neboli L1 byl poprvé registrován v Indii v roce 1995 a následně v Evropě v roce 1999. (11) Jeho snášenlivost je relativně dobrá, jeho výhodou je perorální aplikace a ověřený účinek na odstranění Fe z myokardu. Jeho eliminační poločas je 2-3 hod, komplexy se železem jsou vylučovány močí. (15)

Problémem tohoto přípravku u nemocných s MDS bylo, že špatně snášeli užívání velkého množství pilulek (v denní dávce 9-12). Zvyšující se dávky provázely nárůst nežádoucích účinků, obzvláště u nemocných s MDS rozvoj neutropenie až obtížně řešitelné agranulocytózy. (15) Dalšími nežádoucími účinky jsou zejména gastrointestinálního charakteru (nauzea, zvracení, GIT dyskomfort), bolest kloubů, otoky, deficiencie zinku. (11) Ke snížení těchto nežádoucích účinků je zkoumána možnost užití kombinované terapie s deferoxaminem. (13)



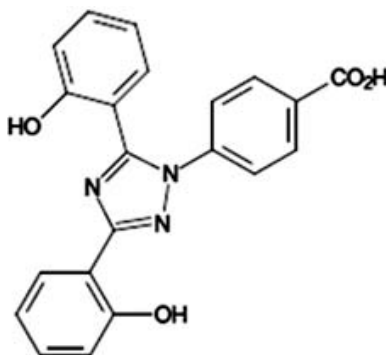
Obr. 2: Deferipron

3.3.3 Deferasirox (ICL670)

V roce 2008 byl firmou Novartis pod názvem Exjade[®] na trh uveden nový lék deferasirox (Obr. 3). Jde o perorální chelátor s prodlouženým plazmatickým poločasem, umožňujícím účinnou chelataci po dobu 24 hodin a aplikaci jedenkrát denně. Má vysokou afinitu k železu, velmi dobře proniká intracelulárně, Fe je po návázání vylučováno především do stolice. Je užíván k léčbě thalasemie major a chronického přetížení železem u jiných typů anemií od 2 let. (15)

Jedná se o trojvazný chelátor navržený počítačovým modelováním. Důležitá je jeho schopnost selektivně vázat železnaté ionty, přičemž nedochází ke ztrátám Cu^{2+} nebo Zn^{2+} . (13)

Účinná dávky vedoucí ke snížení celkového Fe v organismu je kolem 20-30 mg/kg/den. Jde o lék, který je dobře snášen, většinou pouze s mírnými gastrointestinálními obtížemi. Opatrnosti je třeba pouze pro možný rozvoj reverzibilních známek poruch renálních funkcí, a proto se doporučují v prvním měsíci týdenní kontroly hodnot kreatininu. U nás již byla zahájena terapie tímto léčivem, které se zatím jeví jako velice účinné s velmi nízkým výskytem nežádoucích účinků. (15)

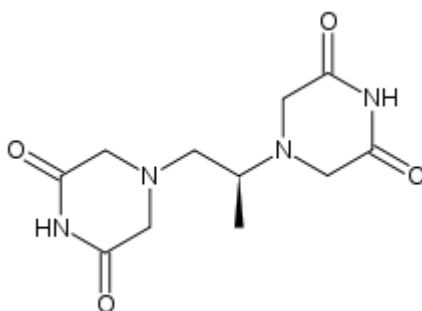


Obr. 3: Deferasirox

3.3.4 Dexrazoxan (DEX)

Účinná forma dexrazoxanu (Obr. 4) chelatuje železité ionty v poměru 1:3. Nejčastěji se užívá k prevenci a léčbě kardiotoxických účinků při dlouhodobé léčbě antracykliny (např. doxorubicin). Na molekulární úrovni vzniká chelát Fe(III)-(DOX)₃. Ten se však může redukovat na Fe(II)-(DOX)₃ za vzniku reaktivních kyslíkových radikálů, které způsobují peroxidaci kardiolipidové mitochondriální membrány a vedou až k ireverzibilní destrukci kardiomyocytů. (22)

Dexrazoxan selektivně blokuje chronickou kardiotoxicitu doxorubicinu. Má totiž větší afinitu k Fe³⁺ než doxorubicin a tak rychle nahrazuje Fe³⁺ v komplexu Fe(III)-(DOX)₃. (22)



Obr. 4: Dexrazoxan

3.3.5 PIH (111)

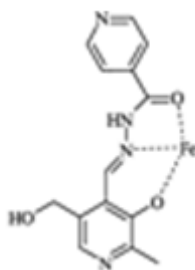
Pyridoxal isonicotinoyl hadrazon (Obr. 5) je perorálně účinný, trojvazný chelátor. Váže železo v poměru 2:1. (13)

PIH tvoří celou skupinu aromatických hydrazinů, produkovaných chemickou syntézou a identifikovaných jako účinné chelátory v roce 1979. (13)

Byla syntetizována celá řada jeho analogů. (13) Některé z nich, jako např. pyridoxal-benzoyl hydraziny byly až o 280 % účinnější než PIH. (11)

Má vysokou afinitu k Fe^{3+} , která je srovnatelná s deferoxaminem. Bylo zjištěno, že váže také Fe^{2+} , ale s mnohem menší afinitou. PIH velmi snadno prochází plazmatickou i mitochondriální membránou a chelatuje železo. (13)

Komplexy PIH se železem podporují syntézu hemoglobinu a buněčnou proliferaci, což svědčí o jeho nízké antiproliferativní účinnosti. Ačkoliv studie prokázaly netoxičnost komplexů PIH-železo v koncentraci pod mezí rozpustnosti, současné studie pojednávají o možnosti vzniku oxidačního stresu. (13) PIH byl netoxický ve studiích akutní a subakutní toxicity u myši a krysy, ale při klinických studiích terapie thalasemie byl nevyhovující. (10)



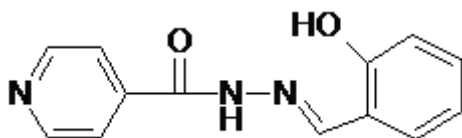
Obr. 5: PIH

3.3.6 SIH

Salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazon (SIH - Obr. 6) je nový, velmi účinný chelátor ze stejné skupiny aroylhydrazonů jako PIH. Patří mezi trojvazné chelátory, které vytváří selektivně s železitými ionty komplexy v poměru 2:1. Je zajímavé, že strukturální obměna vzhledem k chelátoru PIH, kdy byla zaměněna pyridoxalová skupina za salicylaldehydovou, vedla ke zvýšené afinitě k Fe^{3+} oproti PIH. SIH a jeho analoga prokázaly v testech in vivo nízkou toxicitu a jsou tak potenciálními léky v terapii přetížení železem. Při podávání králíkům v dávce 50 mg/kg jednou za týden

po dobu deseti týdnů zde nebyly žádné viditelné nežádoucí účinky. Avšak před uvedením do praxe musí být ještě provedeny klinické studie k prokázání účinnosti. (13)

Dále byly prokázány antiproliferativní účinky SIH a jeho analogů. (13)



Obr. 6: SIH

3.3.7 Hydroxychinolinoly

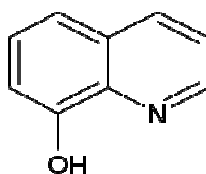
8-hydroxychinolin (8-OHQ - Obr. 7) tvoří stabilní pětičlenné chelátové kruhy, s různými kovy s nízkou selektivitou. S trojmocnými kovovými ionty tvoří lipofilní komplexy $M(8HQ)_3$, tyto ionty můžou s 8-OHQ tvořit mono-, bis- nebo tris komplexy v závislosti na pH a poměru kov:chelátor. (23)

Se železnatými ionty dává červený komplex, který je snadno oxidován. V neoxidovaném stavu zůstává pouze v přítomnosti silného redukčního činidla. V současné době ze zájem o 8-OHQ přesunul zejména do oblasti nukleární medicíny a terapie malárie. (23)

Komplex železo-8-OHQ má dostatečnou lipofilitu, která mu umožňuje vstup epitelem a distribuci buňkami. Bylo prokázáno, že železo navázáno na 8-OHQ způsobuje oxidativní poškození buněk (peroxidace lipidů). Dále byl prokázán cytotoxický a DNA- inhibiční efekt na buněčných liniích a dále antiproliferativní účinek a změny ve fenotypu indukované 8-hydroxychinolinem v nádorových buňkách. (23)

Na základě struktury přírodních chelátorů byl připraven syntetický chelátor, který má schopnost chelatovat Fe^{2+} i Fe^{3+} . Jedná se o velmi nadějný, ve vodě rozpustný chelátor o-TRENSOX. Jedná se o šestivazný ligand, který váže železo v poměru 1:1. Jeho afinita k Fe^{3+} je srovnatelná s DFO. (31) Bylo zjištěno, že komplex Fe(III)-o-TRENSOX se ani v přítomnosti kyseliny askorbové neredukuje, a nezpůsobuje tak oxidační poškození v přítomnosti peroxidu vodíku. Je pravděpodobné, že ligand tvoří bariéru pro přenos elektronu na peroxid vodíku. Bylo zjištěno, že o-TRENSOX snižuje syntézu DNA v závislosti na dávce a čase s větší účinností než DFO. (23)

O-TRENSOX a od něj odvozené ligandy tvoří velmi nadějnou skupiny chelátorů, se zatím neobjasněnými, ale zajímavými biologickými vlastnostmi. (23)



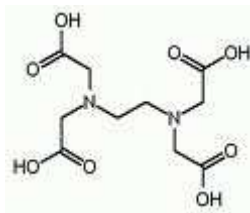
Obr. 7: 8-OHQ

3.3.8 EDTA

EDTA neboli kyselina etylendiamintetraoctová (Obr. 8), váže při intravenózním podání vápenaté a jiné dvoumocné ionty. Vzniklé komplexy jsou vylučovány močí. Je většinou podávána s antioxidačními vitamíny a jinými sloučeninami. Původně byla užívána při terapii otravy olovem už před rokem 1950. (24)

Má však mnoho nežádoucích účinků, nejzávažnější je poškození ledvin, dále jsou to hypoglykémie, kongestivní srdeční selhání a zhoršení jaterních funkcí. (25) V současné době je zkoumána zejména v souvislosti s možností terapie

aterosklerotických kardiovaskulárních chorob. Zavedení chelatační léčby pomocí EDTA jako součásti standardní léčby by vyžadoval méně invazivní přístupy, aby se léčba stala bezpečnější a ekonomicky efektivnější. (25)



Obr. 8: EDTA

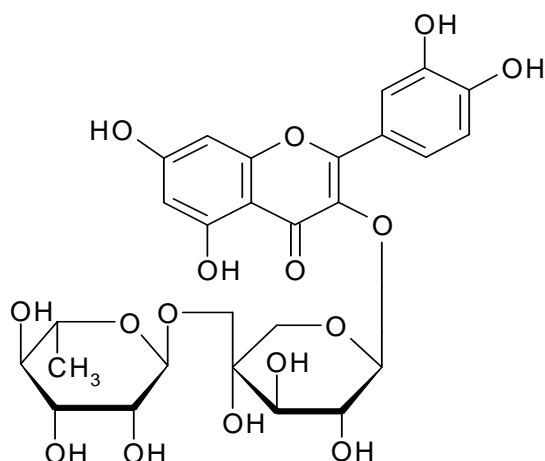
3.3.9 Rutin

Rutin (Obr. 9) neboli kvercetin-O-rhamnoglukosid patří mezi bioflavonoidní glykosidy. Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny, nacházející se v ovoci a zelenině. (32) Rostlinné fenolické sloučeniny jsou účinnými chelátory kovových iontů. (26)

V současné době se flavonoidy těší obrovskému zájmu jako možná terapeutika proti řadě onemocnění, které se většinou týkají oxidačního poškození. (27) Většina flavonoidů jsou účinnými scavengery volných radikálů. Kvercetin, hlavní zástupce flavonolové podtřídy flavonoidů je silným antioxidantem. Při posuzování jeho účinku na zdraví je problémem jeho absorpce, neboť v potravě se nachází ve vazbě na aglykon převážně β -glykosidickou vazbou a je proto těžko vstřebatelný. (28) Při porovnání chelatační účinnosti tří flavonoidů, zástupců různých podskupin flavonoidů (favanon, flavonol, flavon), pořadí by bylo následující: catechin > quercetin > diosmetin (chelátory byly porovnány podle mobilizace Fe^{55} z buněčných kultur

hepatocytů). Kvercetin také prokázal největší protiradikálovou účinnost proti radikálu hydroxidovému, peroxidovému a superoxidovému aniontu.

Některé studie uvádí možnost souvislosti antioxidačních vlastností flavonoidů s jejich chelatačními schopnostmi. Některé flavonoidy mají schopnost redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} . (29)



Obr. 9: Rutin

3.4 Možnosti klinického využití chelátorů v budoucnu

Chelatační léčba byla původně vyvíjena pro terapii onemocnění z přetížení železem. (30) V současné době je pozornost věnována uplatnění chelátorů železa v terapii nádorů, neurodegenerativních onemocnění, zánětů a onemocnění, kde oxidativní stres hraje důležitou roli. (31)

Na chelátory užívané jako chemoterapeutika jsou kladeny jiné požadavky než na chelátory užívané při přetížení železem. Vhodné jsou totiž komplexy železo-chelátor, které jsou redoxně aktivní. (30) Mohou být (a často jsou) podávány intravenózně v časovém horizontu týdnů až měsíců spíše než roků. Často jsou podávány v kombinacích. Musíme brát v potaz vzájemné ovlivňování léků v kombinacích, a proto velká část výzkumu musí být věnována výběru vhodné

kombinace. (31) Využití v terapii nádorů by tak mohly najít chelátory ze skupiny thiosemikarbazonu (např. Triapine[®]), nebo např. tachypyridin. (33)

Využití chelátorů železa by mohlo být i v terapii neurodegenerativních onemocnění. Podle jedné z uznávaných teorií totiž oxidativní stres způsobuje smrt dopaminergních neuronů, což v důsledku způsobí progresi Parkinsonovy choroby. (35)

Největší potenciál pro léčbu neurodegenerativních onemocnění mají dvouvazné chelátory jako jsou hydroxychinoliny a hydroxypyridiony. (34)

Experimentální část

4 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo porovnání chelatační účinnosti klinicky používaných i experimentálně testovaných chelátorů železa a rutinu v rozpouštědle DMSO. Naším cílem bylo také porovnání rozdílů v chelataci železnatých a celkových iontů železa jednotlivými chelátory. Druhým cílem bylo zjistit, zda tyto chelátory mohou redukovat trojmocné železo na dvojmocné a mít tak pravděpodobně prooxidační vliv.

5 Materiál a metoda

5.1 Chemikálie

Síran železnatý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), chlorid železitý ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ferrozín /sodná sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové kyseliny/, dimethylsulfoxid (DMSO), hydroxylamin chlorid (HA), rutin, deferoxamin, deferipron, EDTA (etylendiamintetraoctová), 5-chlor-7-jod-8-hydroxychinolin (cliochinol, 5-Cl-7-I-8-OHQ), chloroxin, 8-hydroxychinolin (8-OHQ) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Německo).

Deferoxamin byl získán od Novartis (Švýcarsko). Chelátory PIH (pyridoxal isonicotinoyl hydrazin), SIH (salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazin) byly syntetizovány na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Deferasirox byl izolován na stejné katedře z tablet Exjade[®] (Novartis).

5.2 Příklad

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

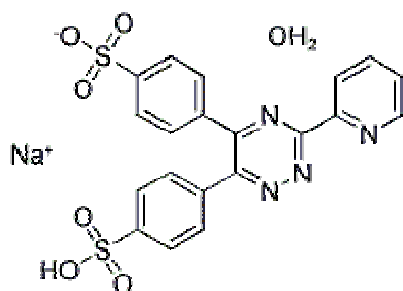
5.3 Ferrozínová metoda

Ferrozínová metoda byla použita pro hodnocení koncentrace železa. Ferrozín (Obr. 10) je specifickým činidlem, který tvoří se železnatými ionty fialově zbarvený komplex s absorpčním maximem při 562 nm. Chemicky se jedná o disodnou sůl

kyseliny 1,2,4-triazin- 3-(2-pyridyl)-5,6-bis)4-fenylsulfonové. Osahuje tedy feroinovou skupinu: $-N=C-C=N-$, která reaguje také s ionty měďnatými nebo kobaltnatými za vzniku barevných komplexů. Tento jev byl poprvé pozorován právě u iontů železnatých, se kterými dává mnohem intenzivněji zbarvené komplexy než s jinými ionty. (37)

Tyto komplexy jsou velmi rozpustné ve vodě a mohou být použity pro kvantitativní stanovení železa ve vodě/hydrofilním prostředí.

Železnaté ionty byly měřeny přímo přidáním ferrozinu (50 μ l, 5 mM ve vodě), pro změření celkového železa byl přidán hydroxylaminový (HA) vodný roztok (50 μ l, 5 mmol ve vodě), aby zredukoval železité ionty na železnaté, které byly následně změřeny přidáním ferrozinu. Všechna měření byla provedena v 96 jamkových mikrodestičkách. Každý vzorek byl změřen alespoň ve dvou jamkách s přidáním ferrozinu a také ve dvou jamkách bez přídavku ferrozinu (blank). Absorbance byla měřena okamžitě po přidání ferrozinu, kdy se předpokládá minimální kompetice ferrozinu s chelátorem o vázané železnaté ionty, a po pěti minutách. (37) Ferrozin totiž musí být považován také za chelátor železa, což znamená určitý stupeň kompetice o železnaté ionty s testovanými látkami a vytváří se proto chemická rovnováha mezi chelatací železa testovanou látkou a ferrozinem. Ferrozin nechelatuje pouze volné železo, ale může jej kompetitivně vyvázat z již vzniklého, méně stabilního chelátu. Proto bylo provedeno měření i po 5 minutách, tato metodologie nám tedy umožnila zjistit pevnost vzniklého komplexu. (37)



Obr. 10: Ferrozin

5.4 Vztah mezi absorbancí a koncentrací železnatých iontů

Koncentrace železnatých iontů je přímo úměrná absorbanci, přičemž platí Lambert-Beerův zákon vyjádřený vztahem: $A = \varepsilon \cdot c \cdot b$

ε ... molární absorpční koeficient

c ... koncentrace (mol/l)

b ... síla měřené vrstvy (cm)

5.5 Postup

5.5.1 Příprava zásobních roztoků

Před vlastním měřením byly připraveny zásobní roztoky:

- ferrozin 5 mM v destilované vodě ($M_w = 492,5$ g/mol),
- zásobní roztok Fe^{3+} / $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5mM v destilované vodě ($M_w = 207,3$ g/mol) /,
- zásobní roztok Fe^{2+} / $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mM v destilované vodě ($M_w = 278,02$ g/mol) /,
- HA 10mM v destilované vodě ($M_w = 69,49$ g/mol).

5.5.2 Příprava testovaných roztoků

Ze zásobního roztoku železnatých iontů byl připraven testovací roztok železa o koncentraci 250 μM . Naředily se roztoky chelátorů železa - obvykle 10-1-0,1-0,01mM v DMSO. Následovalo vlastní měření chelatace v mikroděstičkách.

5.6 Postup měření kalibrační křivky (Tab. 1)

Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μl destilované vody. Byla přidána žádaná koncentrace železnatých iontů v objemu 50 μl (pro $c = 0$ bylo přidáno 50 μl destilované vody). Dále bylo přidáno 50 μl ferrozinového roztoku do poloviny jamek (x), do druhé poloviny 50 μl destilované vody (x). Byla změřena absorbance při 562 nm.

Tab. 1: Postup měření kalibrační křivky

	kontrola - přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 0 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 75 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 150 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 250 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 500 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 750 \mu\text{M}$
ferrozin						
slepé vzorky						

5.7 Vlastní stanovení chelatace (Tab.2)

5.7.1 Chelatace Fe^{2+} v DMSO

Bylo napipetováno 100 μl roztoku chelátoru o různé koncentraci do testovacích jamek a stejné množství rozpouštědla do kontrolních jamek. Do všech jamek bylo přidáno 50 μl roztoku železa ($c = 250 \mu\text{M}$). Směs se 2 min míchala na automatické míchačce. Dále bylo přidáno 50 μl roztoku ferrozinu do testovacích jamek a 50 μl vody do slepých vzorků (blank) a byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm okamžitě a po 5 minutách. Kontrolní vzorek tedy obsahoval železnaté ionty, rozpouštědlo a ferrozín.

Tab. 2: Měření chelatace v mikrodestičkách

Koncentrace chelátoru	10 mM	1 mM	0,1 mM	0 mM (kontrola)
Ferrozín (F)	F	F	F	F
(testované vzorky)	F	F	F	F
Voda (V)	V	V	V	V
(slepé vzorky)	V	V	V	V

5.7.2 Chelatace Fe^{3+} v DMSO

Bylo napipetováno 100 μl roztoku chelátoru do testovacích jamek a stejné množství rozpouštědla do kontrolních jamek. Čerstvě připravený roztok železitých

iontů o koncentraci 250 μM byl napipetován do všech jamek. Směs se míchala 2 min. Dále bylo přidáno 50 μl HA do všech jamek nechalo se 1 min míchat. Přidalo se 50 μl roztoku ferrozinu do testovacích jamek a 50 μl vody do slepých vzorků (blank). Následovalo měření absorbance jako v případě železnatých iontů.

5.8 Redukce Fe^{3+}

Bylo napipetováno 100 μl roztoku chelátoru do testovacích jamek a 100 μl HA do kontrolních jamek. Dále se přidal čerstvě připravený roztok železitých iontů (opět 250 μM) do všech jamek a 2 min se směs míchala. Přidalo se 50 μl roztoku ferrozinu do testovacích jamek a 50 μl vody do slepých vzorků (blank). Další postup měření viz výše.

5.9 Výpočet

Množství zbylého železa bylo vypočteno z rozdílu absorbance mezi vzorkem testované látky s ferrozinem a vzorkem bez ferrozinu (slepý vzorek „blank“) vydělený rozdílem kontrolního vzorku (se známým množstvím železa bez testované látky) a jeho kontrolního slepého vzorku.

5.9.1 Chelatace železa

Nejdříve byl stanoven poměr (viz rovnice 8) molární koncentrace chelátoru k molární koncentraci železa. (Tab. 3)

$$(8) \quad \text{ratio} = c(\text{chelátoru}) / c(\text{Fe})$$

U každého tohoto poměru byla vypočítána procenta chelatovaného železa. Nejdříve se vypočetl rozdíl absorbancí - od absorbancí testovaného vzorku s ferrozinem (A_1, A_2) se odečetl průměr absorbancí bez ferrozinu téže koncentrace chelátoru ($A'_1 + A'_2$): (rovnice 9 a 10):

$$(9) \quad \Delta A_1 = A_1 - \frac{1}{2}(A'_1 + A'_2)$$

$$(10) \quad \Delta A_2 = A_2 - \frac{1}{2}(A'_1 + A'_2)$$

Stejným způsobem se vypočítal rozdíl absorbancí známé koncentrace železnatých iontů bez testované látky (kontrola, ΔK_1 a ΔK_2 , rovnice 11 a 12).

$$(11) \quad \Delta K_1 = K_1 - \frac{1}{2}(K'_1 + K'_2)$$

$$(12) \quad \Delta K_2 = K_2 - \frac{1}{2}(K'_1 + K'_2)$$

Průměr zmíněných absorbancí (ΔK_1 a ΔK_2), tj. $\frac{1}{2}(\Delta K_1 + \Delta K_2)$ je přímo úměrný známé koncentraci železa (tj. v našem případě finální koncentraci železa 50 μM). Procenta chelatovaného železa $X_1\%$ a $X_2\%$ (rovnice 13 a 14) se vypočetlo ve vztahu k této známé koncentraci železnatých iontů, ke kterým nebyl přidán chelátor (tj. 100% železa ve vzorku = 0% chelatovaného železa).

$$(13) \quad X_1\% = 1 - \frac{\Delta A_1}{\frac{1}{2}(\Delta K_1 + \Delta K_2)}$$

$$(14) \quad X_2\% = 1 - \frac{\Delta A_2}{\frac{1}{2}(\Delta K_1 + \Delta K_2)}$$

Procenta nechelatovaného železa se poté zprůměrovala (rovnice 15).

$$(15) \quad X\% = \frac{1}{2}(X_1\% + X_2\%)$$

Stabilita komplexu chelátor-železo (Y%) se vyjádřila jako procento změny 5 minut vs. 0 minut (rovnice 16).

$$(16) \quad Y\% = \frac{X\% \text{ 5 min}}{X\% \text{ 0 min}}$$

Tab. 3: Výpočet chelatace železa

Nepipetovaná koncentrace roztoku chelátoru (mM)					0 (kontrola)
Ratio					
LOG(ratio)					
Absorbance (vzorky s ferrozinem)	A_1	A_1	A_1	A_1	K_1
	A_2	A_2	A_2	A_2	K_2
Absorbance (vzorky bez ferrozinu)	A'_1	A'_1	A'_1	A'_1	K'_1
	A'_2	A'_2	A'_2	A'_2	K'_2
ΔA	ΔA_1	ΔA_1	ΔA_1	ΔA_1	ΔK_1
	ΔA_2	ΔA_2	ΔA_2	ΔA_2	ΔK_2
% chelatovaného železa	$X_1\%$	$X_1\%$	$X_1\%$	$X_1\%$	
	$X_2\%$	$X_2\%$	$X_2\%$	$X_2\%$	
Stabilita komplexu chelátor-železo	$Y_1\%$	$Y_1\%$	$Y_1\%$	$Y_1\%$	
	$Y_2\%$	$Y_2\%$	$Y_2\%$	$Y_2\%$	

5.9.2 Redukce železa

Při výpočtech redukce železa ($R\%$) platí výše uvedené s jedním rozdílem. Nestanovovalo se totiž procento chelatovaného železa, ale procento redukovaného železa, tj. železa, které se nacházelo volně v roztoku (rovnice 17).

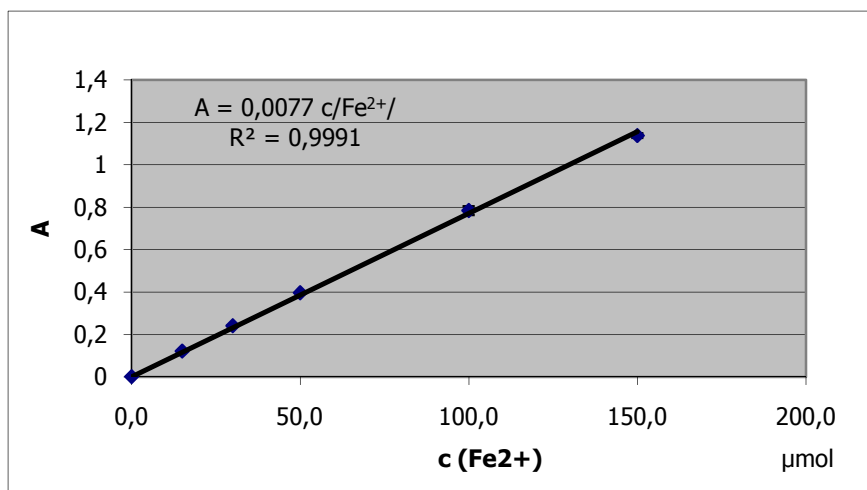
$$(17) \quad R\% = \frac{\frac{1}{2}(\Delta A_1 + \Delta A_2)}{\frac{1}{2}(\Delta K_1 + \Delta K_2)}$$

5.10 Statistická analýza

Chelátory byly porovnány nejdříve pomocí koncentrace nutné k chelataci 50 % železa (EC_{50}). Statisticky významné rozdíly byly poté stanoveny porovnáním 95 % konfidenčních intervalů.

6 Výsledky

Nejdříve byla stanovena kalibrační křivka pro železnaté ionty (Obr. 11)



Obr. 11: Kalibrační křivka železnatých iontů. Byla nalezena lineární závislost mezi koncentrací železnatých iontů $c(\text{Fe}^{2+})$ a absorpční hodnotou při 562 nm (A).

6.1 Chelatace

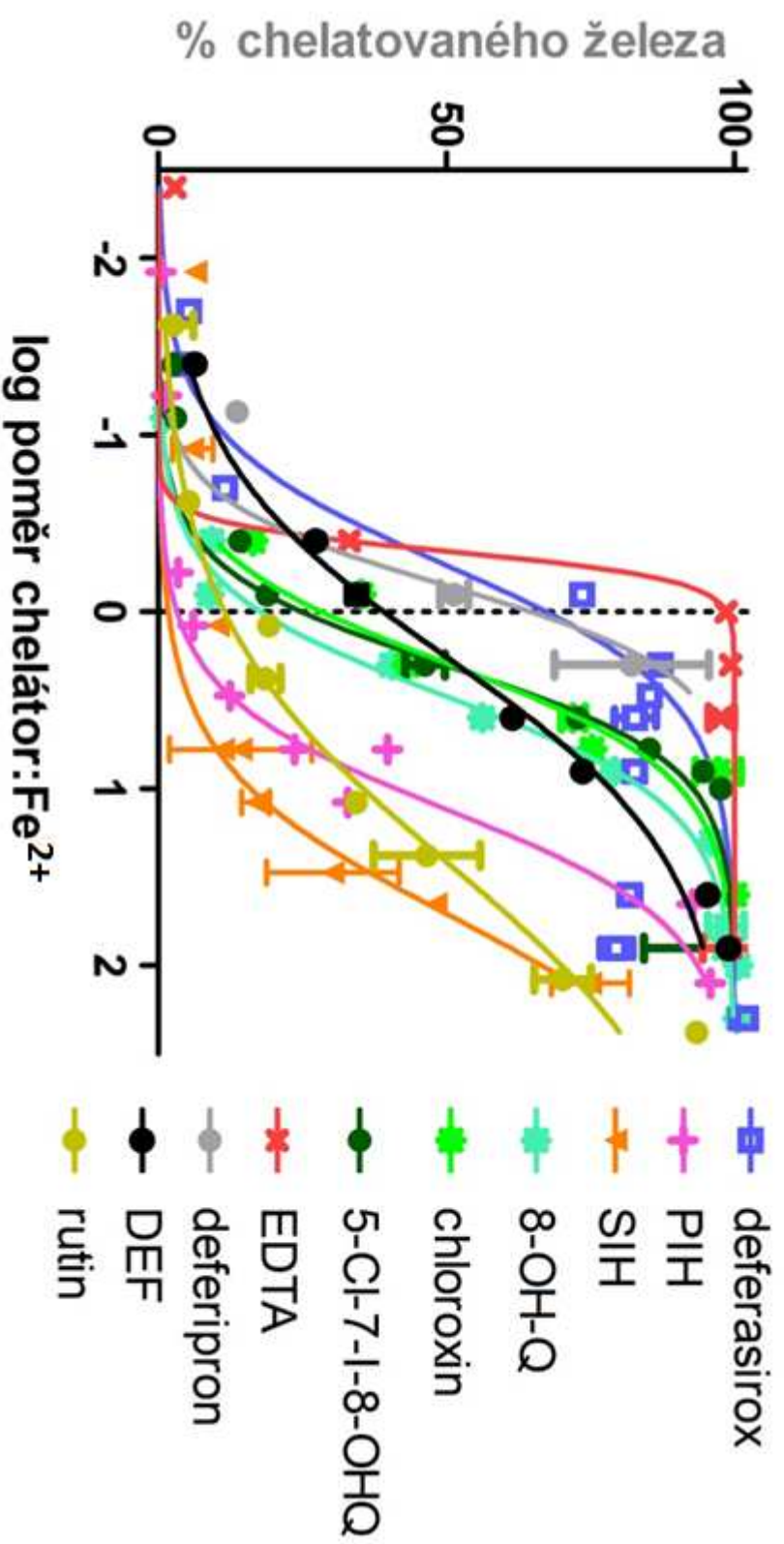
Poté byly stanoveny chelatační křivky všech testovaných chelátorů pro železnaté ionty (Obr. 12) a pro celkové železo (Obr. 13). Přehledné zobrazení EC_{50} těchto chelátorů je v Obr. 14 a Obr. 15. Porovnáním EC_{50} je zřetelné, že nejméně účinnými chelátory železnatých iontů jsou rutin, SIH a PIH, v případě chelatace celkového železa jsou nejméně účinné rutin a 8-OHQ.

Standardně klinicky používaný chelátor deferoxamin byl lepší chelátor železitých iontů než železnatých (EC_{50} pro celkové železo je 0,44 vs. EC_{50} pro železnaté ionty je 1,81). Chelátory deferasirox a EDTA byly naopak jen nepatrně účinnější v chelataci celkového železa (železitých+železnatých) iontů ve srovnání

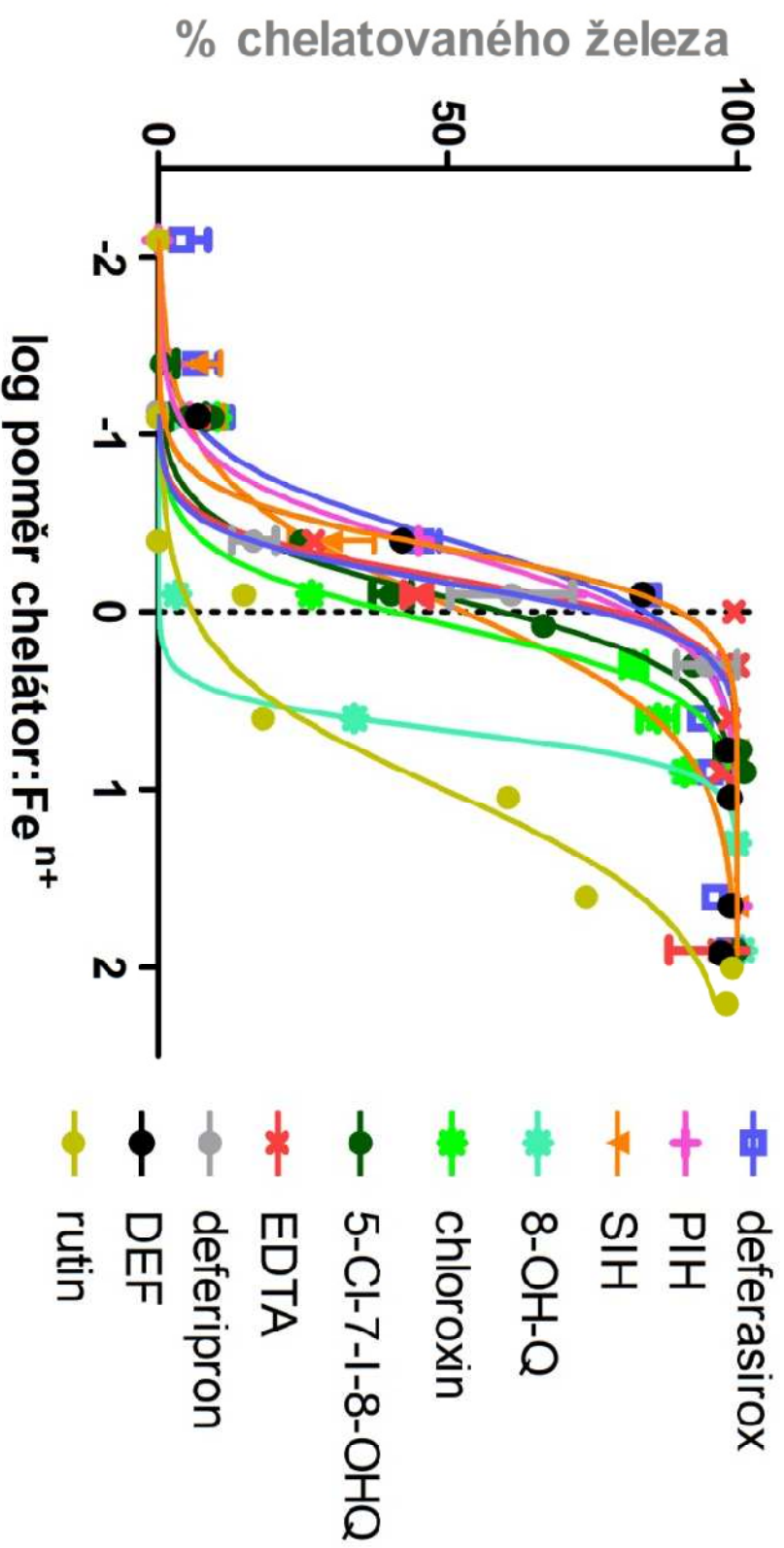
s chelatací iontů železnatých (pro deferasirox platí: EC_{50} pro $Fe^{2/3+}$: $0,39 \pm 0,03$ vs. EC_{50} Fe^{2+} $0,55 \pm 0,13$).

Chelátory ze skupiny aroylhydrazonů byly mnohem účinnější v chelataci celkového železa, což lze velmi zřetelně demonstrovat u chelátoru SIH: EC_{50} 0,92 pro celkové železo vs. EC_{50} 51,17 pro železnaté ionty. Podobně i PIH daleko lépe chelatoval ionty železité. Ze skupiny 8-hydroxyquinolinů, pouze 5-Cl-7-I-8-OHQ lépe chelatoval ionty železité (EC_{50} pro Fe^{2+} 2,01 vs. EC_{50} $Fe^{2/3+}$ 0,84), u 8-OHQ a chloroxinu byla chelatační účinnost na železnaté ionty a celkové železo srovnatelná.. Deferipron měl stejnou chelatační účinnost na celkové železo i železnaté ionty (EC_{50} pro Fe^{2+} : 0,71 vs. EC_{50} $Fe^{2/3+}$ 0,69). Rutin byl jednoznačně účinnější chelátor železitých iontů než železnatých (EC_{50} pro $Fe^{2/3+}$ je 10,24 vs. EC_{50} Fe^{2+} 25,99).

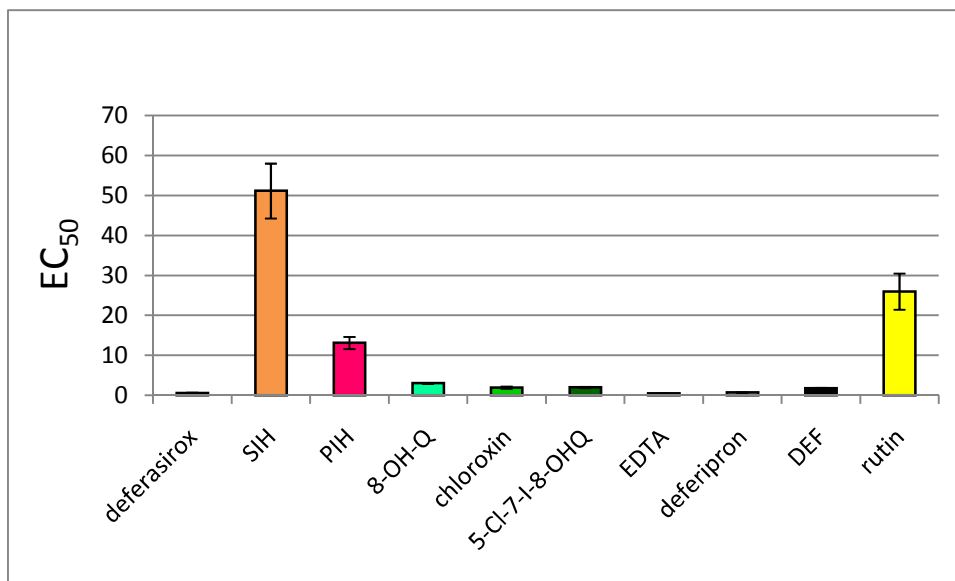
Všechny chelátory s výjimkou rutinu byly schopny udržet železo v kompetici s ferrozinem, tj. nebyla pozorována změna v chelataci v čase 0 a po 5 minutách, neobjevila se tedy kompetice s ferrozinem. U rutinu poklesla chelatace železnatých iontů po 5 minutách na $63,2 \pm 11,4$ % a celkového železa na $75,6 \pm 8,8$ %.



Obr. 12: Chelatační křivky testovaných chelátorů pro Fe²⁺

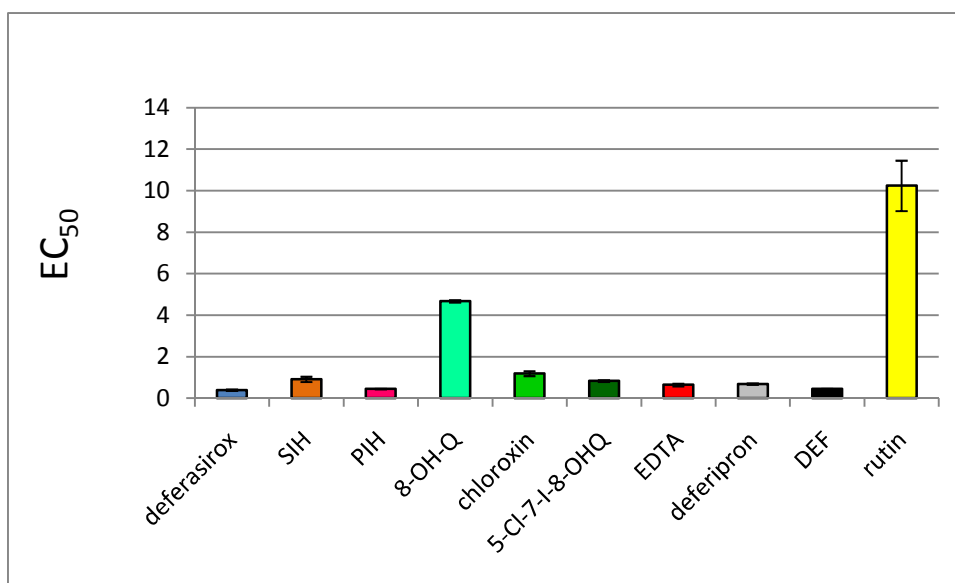


Obr. 13: Chelatační křivky testovaných chelátorů pro celkové železo



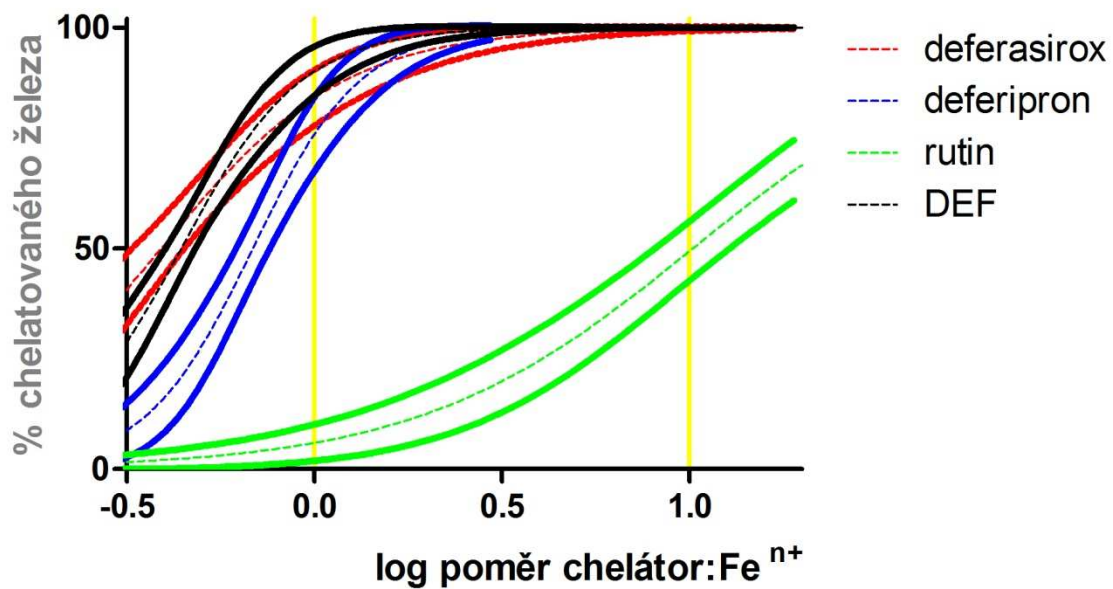
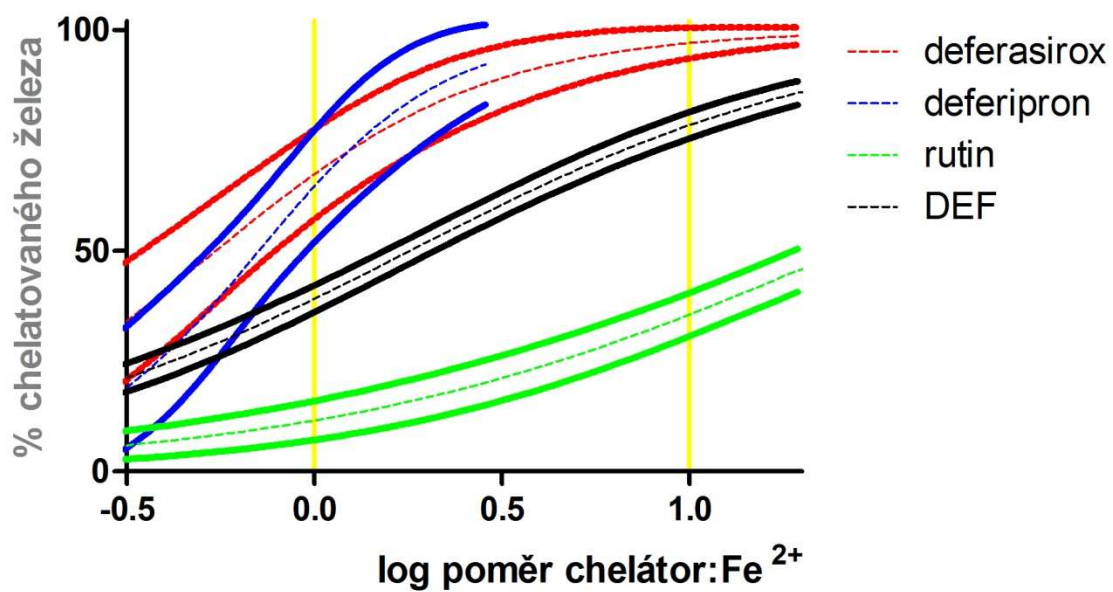
Obr. 14: Porovnání účinnosti chelátorů podle EC₅₀ při chelataci železnatých iontů.

EC₅₀ vyjadřuje poměr chelátor/železo nutný k chelataci 50 % iontů železa.

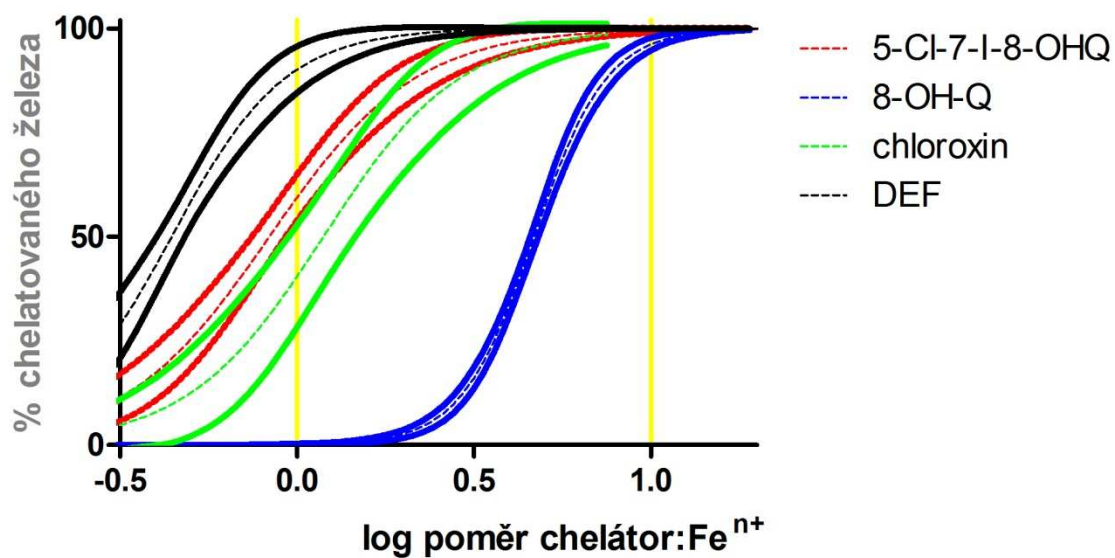
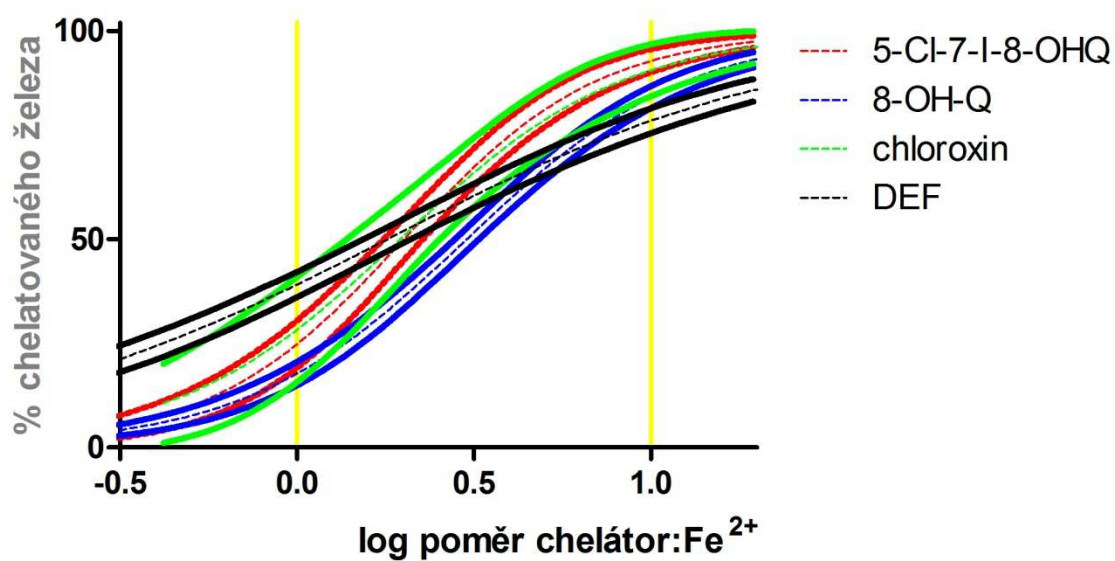


Obr. 15: Porovnání účinnosti chelátace celkového železa podle EC₅₀.

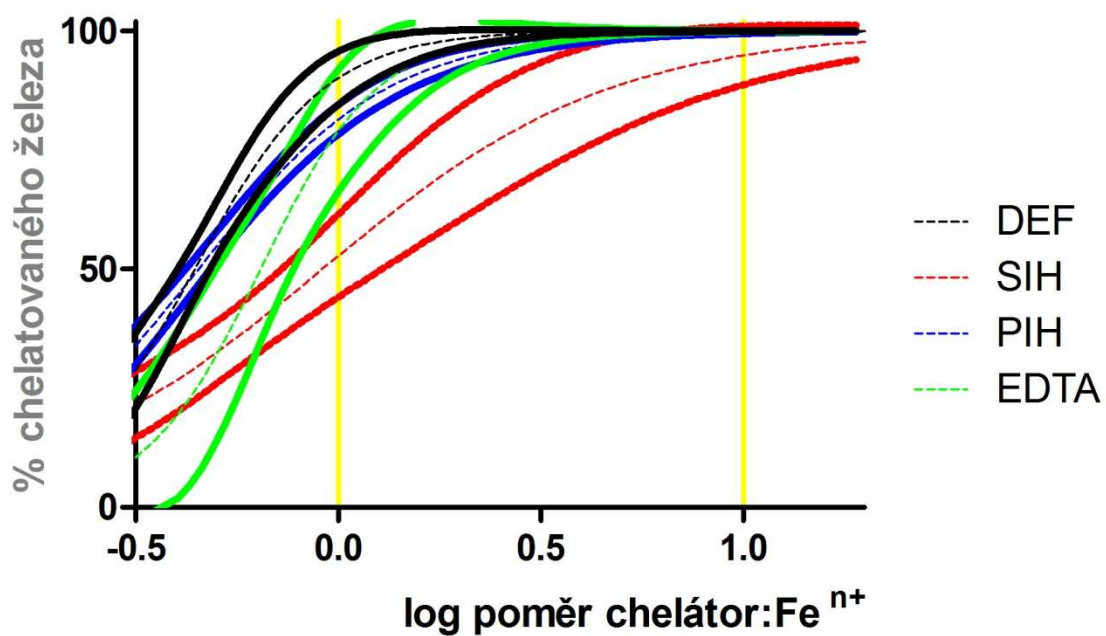
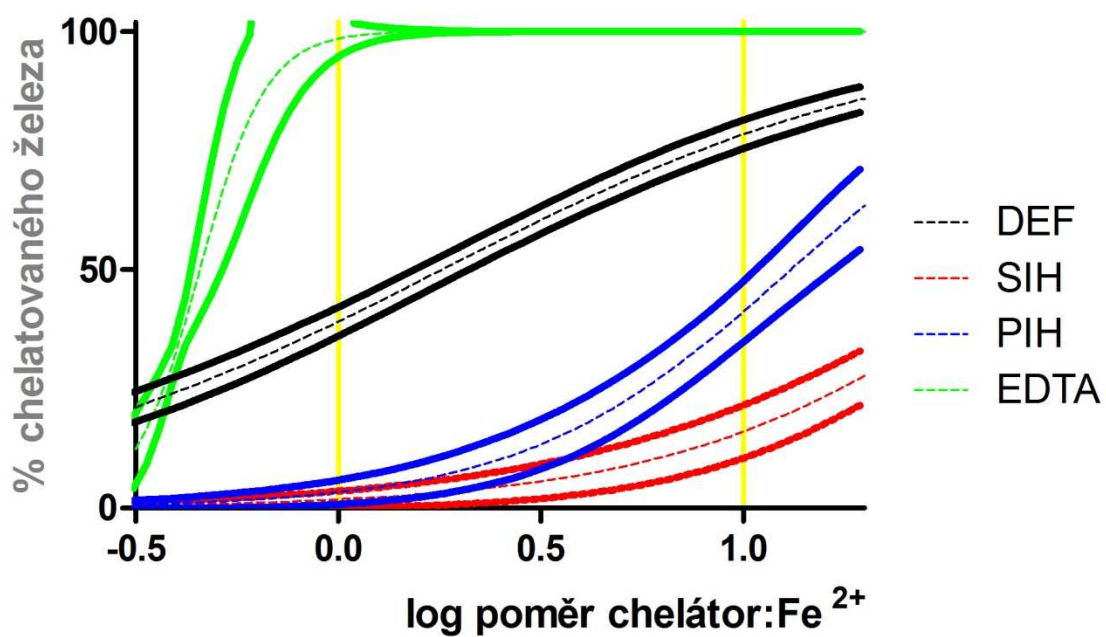
Pro přesnější porovnání aktivity všech chelátorů se standardním chelátorem železa deferoxaminem byly použity 95% konfidenční intervaly (Obr. 16, Obr. 17, Obr. 18).



Obr. 16: Konfidenční intervaly chelátorů ze skupiny registrovaných chelátorů, nahoře chelatace železnatých iontů, dole chelatace celkového železa



Obr. 17: Konfidenční intervaly chelátorů ze skupiny 8-hydroxychinolinů nahoře
chelatace železnatých iontů, dole chelatace celkového železa



Obr. 18: Konfidenční intervaly ze skupiny experimentálně zkoušených chelátorů
 nahoře chelatace železnatých iontů, dole chelatace celkového železa

Z porovnání jednoznačně vyplývá, že EDTA byla více účinným chelátorem železnatých iontů než deferoxamin, ale její účinnost při chelataci celkového železa už byla stejná v porovnání se deferoxaminem.

Při porovnání ve skupině registrovaných chelátorů s deferoxaminem se ukázala vyšší účinnost obou p.o. chelátorů při stanovení chelatace železnatých iontů, ale opět stejná účinnost všech tří látek při chelataci celkového železa.

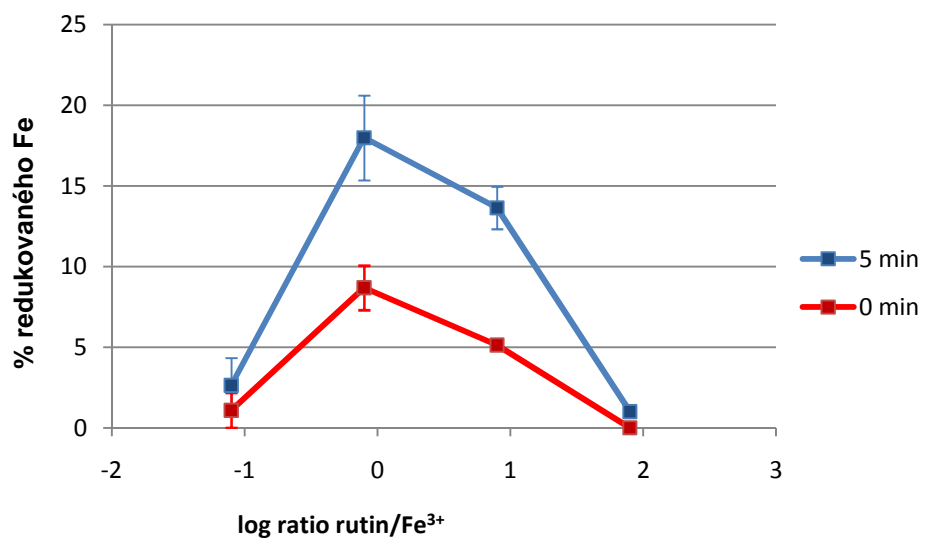
Při porovnávání statistické významnosti látek ze skupiny 8-hydroxychinolinů s deferoxaminem se ukázalo, že jejich účinnost v chelataci Fe^{2+} nebyla statisticky rozdílná ani mezi jednotlivými látkami ani s deferoxaminem. Naopak v chelataci Fe^{3+} jsou účinky deferoxaminu rozdílné se všemi 8-hydroxychinolinoly. Chloroxin a 5-Cl-7-I-8-O-HQ jsou vzájemně podobné v účinku a oba jsou jednoznačně účinnější než základní látka skupiny 8-OHQ.

Ve skupině experimentálně zkoušených látek, je nejúčinnějším chelátorem železnatých iontů EDTA, nejméně účinným je z této skupiny, stejně jako ze všech zkoumaných chelátorů, SIH. Situace je jiná při chelataci celkového Fe, zde jsou chelátory z této skupiny srovnatelně účinné mezi sebou i při porovnání s deferoxaminem, nejsou zde statistické rozdíly.

Rutin byl v obou případech jednoznačně slabší chelátor než deferoxamin.

6.2 Redukce

Byla zkoumána redukční schopnost jednotlivých chelátorů. Jediným ze zkoumaných chelátorů, který vykazoval významnější redukční schopnost, byl rutin (Obr. 19).



Obr. 19: Redukční schopnost rutinu

7 Diskuze

Existuje celá řada postupů ke stanovení hladin železa, které mají své výhody i limitace. Metoda užívající ferrozín má dostatečnou přesnost a specifčnost a může být užita pro rychlou analýzu chelatace železa. (36)

Chelataci železitých iontů však lze stanovit pouze nepřímo, změřením chelatace celkového železa. Ke stanovení celkového železa se použije roztok hydroxylaminu, který je redukčním činidlem a zredukuje tak trojmocné ionty železa na dvojmocné, které lze následně změřit ferrozínovou metodou. (36)

Ferrozín tvoří komplexy se železnatými ionty v poměru 3:1. Tento fialový komplex $\text{Fe}(\text{ferrozín})_3^{2+}$ se kompletně tvoří ve vodném prostředí při pH mezi 4 a 9. Největší výhodou užití ferrozínu je jeho citlivost a nízká cena. Jeho interference s jinými ionty jsou minimální. (37)

Chelátory železa jsou molekuly obsahující atomy kyslíku, dusíku nebo síry, které tvoří koordinační vazby se železem. Mohou být vyvinuty s vyšší afinitou pro Fe^{2+} nebo Fe^{3+} . Chelátory Fe^{3+} se vyvíjejí jednodušeji než chelátory s vysokou specifčností pro Fe^{2+} , částečně proto, že s trojmocnými ionty vznikají pevnější komplexy, důležité ale je, že trojmocné železo je jediným esenciálním trojmocným iontem v lidském organismu. (35)

Deferoxamin, jako standardní chelátor Fe^{3+} , se v našem měření opravdu projevil jako účinný chelátor Fe^{3+} . Tvoří komplexy v poměru 1:1 a skutečně v chelataci Fe^{3+} , kdy $x = \log 1 = 0$, bylo téměř všechno železo v daných podmínkách vyvázáno, v chelataci Fe^{2+} to bylo jen cca 40%. Má vyšší afinitu k Fe^{3+} než Tf, nevyvazuje však Fe z Tf přímo v plazmě ale inhibuje příjem Fe do buněk z Tf. (35)

Avšak modernější chelátory (např. deferipron) jsou v klinickém použití výhodnější i z hlediska distribuce a lipofility, neboť deferoxamin je limitován svou hydrofilitou.

Klinicky používané chelátory byly účinnější v této studii než deferoxamin, a to zejména při chelataci železnatých iontů, je ale možné že tyto rozdíly nejsou klinicky významné. Studie Olivieri and Brittenham uvádí, že při dlouhodobé léčbě deferipronem možná není zajištěna dostatečná kontrola nad železem v organismu při léčbě thalasemia major (16). Deferipron, který se v našich podmínkách ukázal být účinnějším chelátorem Fe^{3+} je v pH 7,4 mnohem účinnějším chelátorem těchto iontů. (33)

Experimentální chelátory SIH a PIH selektivně váží Fe^{3+} , což se při našem měření potvrdilo (EC_{50} pro SIH činí 0,92 a pro PIH 0,45). Neprokázano se ale, že by SIH měl vyšší afinitu k Fe^{3+} iontům (13), naopak PIH byl účinnější v chelataci Fe^{3+} i Fe^{2+} . Důvodem může být nepufrované prostředí.

EDTA velmi účinně chelatuje v prostředí DMSO ionty Fe^{2+} , avšak např. v jiné studii se ukázala být lepším chelátorem Fe^{3+} při měření v pH 7,4 (33). Tento rozdíl ve výsledku je pravděpodobně dán rozdílným prostředím.

Rutin, flavonoid s antioxidačními účinky jako jediný prokázal redukční schopnosti, a naměřené výsledky se tak shodují s literaturou. (32) Redukce železitých iontů na železnaté představuje potenciální riziko pro živé organismy, neboť železnaté ionty jsou katalyzátory Fentonovy reakce. (36)

8 Závěr

Bylo zjištěno, že při chelataci železnatých iontů byl za nepufrovaných podmínek použitých v experimentu nejúčinnějším chelátorem EDTA. Také klinicky používané chelátory deferasirox a deferipron byly účinnější než deferoxamin. Skupina 8-hydroxychinolinů vykazovala srovnatelnou účinnost s deferoxaminem, naopak chelátory SIH, PIH a flavonoid rutin byly méně účinné.

V případě chelatace celkového železa, která může při porovnání s chelatací železnatých iontů nepřímo ukázat na chelataci železitých iontů, měly srovnatelnou účinnost s deferoxaminem klinicky užívané chelátory (deferasirox, deferipron), experimentálně zkoušené PIH, SIH a EDTA. Menší účinnost měla skupina 8-hydroxychinolinů, z nichž nejslabší byl 8-OHQ. Flavonoid rutin byl v chelataci železitých iontů za nepufrovaných podmínek nejslabším chelátorem. Současně byl rutin i jedinou z testovaných látek, jejíž komplex s železem nebyl stabilní, a také jedinou látkou, která redukovala významně železité ionty na železnaté.

9 Seznam zkratek

ATP	adenosin trifosfát
DcytB	duodenální cytochrom B
DEX	dexrazoxan
DFO	deferoxamin
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT-1	dvoumocný transportér kovů 1
HA	hydroxylamin chlorid
HaMP	gen kódující hepcidin
HFE	gen kódující expresi HFE proteinu
IREs	iron response elements
IRPs	iron regulatory proteins
L1	deferipron
MDS	myelodysplastický syndrom
PIH	pyridoxal isonicotinoyl hydrazon
RES	retikuloendoteliární systém
ROS	reaktivní formy kyslíku
SIH	salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazon
Tf	transferin
TfR1 ,TfR2	transferinový receptor 1 a 2
8-OHQ	8-hydroxychinolin
5-Cl-7-I-8-OHQ	5-chlor-7-jod-8-hydroxychinolin

10 Seznam použité literatury

- (1) Novotný J. Poruchy metabolismu železa I. Vnitřní lék. 2005;51(6):681-688
- (2) Mladěnka P, Hrdina R, Hübl M and Šimůnek T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. Acta Med. 2005;48(3):127-35
- (3) Muñoz M, Villar I, García-Erce J. A. An update on iron fysiology. World J gastroenterol. 2009;15(37):4617-26
- (4) Siah Ch. W, Ombiga J, Adams LA, Trinder D and Olynyk JK. Normal Iron Metabolism and the Pathophysiology of Iron Overload Disorders. Clin Biochem Rev. 2006;27(1):5-16
- (5) Novotný J. Poruchy metabolismu železa II. Vnitřní lék. 2005;51(9):995-1004
- (6) McRea S, Bates N. Acute iron overdose: Clinical features and management. Emerg Nurse. 1999;7(5):18-23
- (7) Banner W Jr, Tong TJ. Iron Poisoning. Pediatr Clin North Am. 1986;33(2):393-409
- (8) Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. Toxicol and Appl Pharmacol. 2005;202(2):199-211
- (9) Mladěnka P, Šimůnek T, Hübl M, Hrdina R. The Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Cellular Iron Metabolism. Free Rad Res. 2006;40(3):263-272
- (10) Tam TF, Leung-Toung R, Li W, Wang Y, Karimian K, Spino M. Iron Chelator Research: Past, Present, and Future. Curr Med Chem. 2003;10(12):983-95
- (11) Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ and Vichinsky E. Thalassemia. Hematol. 2004;2004:14-34

- (12) Hider RC. Design of therapeutic chelating agents *Biochem Soc Trans.* 2002;30(4):751-4
- (13) Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):547-583
- (14) Kwiatkowski JL. Oral iron chelators. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010;24(1):229-48
- (15) Jonášová A. Doporučení pro chelatační léčbu u chronicky transfundovaných hematologických nemocných se známkami přetížení železem. *Farmakoterapie.* 2008; 5: 529-537
- (16) Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-Chelating Therapy and the Treatment of Thalassemia. *Blood.* 197;89(3):739-61
- (17) McCrea S, Bates N. Acute iron overdose: Clinical features and management *Emerg Nurse.* 1999;7(5):18-23
- (18) Aronson JK. Deferoxamine. Department of Clinical Pharmacology, Oxford, UK. 2006;1058
- (19) Neufeld EJ. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. *Blood* 2006;107:3436-3441.
- (20) Brittenham GM. Development of iron-chelating agents for clinical use. *Blood.* 1992;80(3):569-574
- (21) Porter JB. A risk-benefit assessment of iron-chelation therapy. *Drug Saf.* 1997;17(6):407-421
- (22) Langer SW, Sehested M, Jensen PB. Treatment of anthracycline extravasation with dexrazoxane. *Clin Cancer Res.* 2000;6(9):3680-6

- (23) Pierre JL, Baret P. and Serratrice G. Hydroxyquinolines as iron chelators. *Curr Med Chem.* 2003;10(12):1077-84
- (24) Chapell LT, Janson M. EDTA chelation therapy in the treatment of vascular disease. *Cardiovasc Nurse.* 1996;10(3):78-86
- (25) Lamas GA, Hussein SJ. EDTA chelation therapy needs evidence-based medicine. *Complement therap in clin pract.* 2006;12(3):213-15
- (26) Karama M, Agric J. Limitations of the Tetramethylmurexide Assay for Investigating the Fe(II) Chelation Activity of Phenolic Compounds. *Food Chem.* 2009;57(14):6425-6431
- (27) Van Acker SA, De Groot MJ, Tromp MN, Donne-Op den Kelfer G, Van der Vijg WJ, Bast A. A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem Res Toxicol.* 1996;9:1305-1312
- (28) Hollman PC, Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH, Katan MB. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Rad Biol & Medic.* 1999;21(5):703-707
- (29) Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocultures. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(1):13-19
- (30) Kalinowski DS, Richardson DR. Future of toxicology - iron chelators and differing modes of action and toxicity: the changing face of iron chelation therapy. *Chem Res Toxicol.* 2007;20(5):715-20
- (31) Buss JL, Greene BT, Turner J, Torti FM, Torti SV. Iron chelators in cancer chemotherapy. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(15):1623-1635

- (32) Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, Barcellona ML, Vanella A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol and Toxicol.* 2000;16:96-98
- (33) Buss JL, Torti FM and Torti SV. The Role of Iron Chelation in Cancer Therapy. *Curr Med Chem.* 2003;10:1021-1034
- (34) Hider RC, Ma Y, Molina-Holgado F, Gaeta A and Roy S. Iron chelation as a potential therapy for neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(6):1304-7
- (35) Perez CA, Tong Y, Guo M. Iron Chelators as Potential Therapeutic Agents for Parkinson's Disease. *Curr Bioact Compd.* 2008;4(3):150-15
- (36) Mladěnka P, Macáková K, Zatloukalová L, Řeháková Z, Singh BK, Prasad AK, Parmar VS, Jahodář L, Hrdina L, Saso L. In vitro interactions of coumarins with iron. *Biochimie.* 2010;92:1108-1114
- (37) Stookey L. Ferrozine. A new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem.* 1970;42(7):779-781
- (38) Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marks J. Hereditary Hemochromatosis: Genetic Complexity and New Diagnostic Approaches. *Clin Chem.* 2006; 52(6):950-68