

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie



Chelatace železnatých a železitých iontů flavonoidy
(Chelation of ferrous and ferric ions by flavonoids)

Diplomová práce

Vypracovala: Stonawská Michaela

Školitel: Ing. Macáková Kateřina

Akademický rok 2010/2011

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

Děkuji Ing. Kateřině Macákové, školitelce mé diplomové práce, za poskytnuté materiály, rady a pomoc při řešení a zpracování diplomové práce. Děkuji také PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za pomoc během měření, a také oběma za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Tato diplomová práce vznikla v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2011 SVV/2011/263002 a za finanční podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (grant č. 537073).

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíl práce	9
3. Teoretická část	10
3.1 Železo v lidském organismu.....	10
3.1.1 Fyziologická funkce železa v organismu	10
3.1.2 Nedostatek železa	12
3.1.3 Nadbytek železa.....	13
3.2 Chelatace železa.....	16
3.3 Flavonoidy.....	29
4. Experimentální část	36
4.1 Materiál.....	36
4.1.1 Použité chemikálie.....	36
4.1.2 Testované látky.....	36
4.1.3 Přístroj	38
4.2 Metody.....	38
4.2.1 Příprava zásobních roztoků	38
4.2.3 Zkouška pro železnaté ionty	38
4.2.4 Zkouška pro železité ionty	39
4.2.5 Kalibrace železnatých iontů.....	39
4.2.6 Chelatace železnatých iontů.....	39
4.2.7 Chelatace Fe ^{2+/3+} iontů.....	40
4.2.8 Statistická analýza	41
5. Výsledky	42
5.1 Kalibrační křivka železnatých iontů.....	42
5.2 Chelatační účinnost vybraných flavonoidů.....	43
6. Diskuse	49
7. Závěr	52
8. Seznam zkratk:	53
9. Seznam použité literatury:	54
10. Abstrakt	57
11. Abstract	58

1. Úvod

Železo je pro lidský organismus velmi důležitý prvek. Je součástí hemoglobinu – účastní se buněčného dýchání, redoxních reakcí a je využíváno k syntéze krevního a svalového barviva (9, 17, 18). Dospělý člověk má v těle 3,5 - 4 gramy železa. Poruchy metabolismu železa se projevují jeho nedostatkem nebo nadbytkem (9, 17, 27).

Příčinami nedostatku železa bývá silné krvácení, malabsorpce, genetické defekty a potrava chudá na železo. Následkem je sideropenická anémie, při ní může dojít k zastavení buněčného růstu (4, 23).

Příčinami nadbytku železa jsou dědičné hemochromatózy nebo krevní transfuze, kterými se léčí thalassemie (4, 9, 30). Lidský organismus přirozeně vylučuje železo pouze odlupováním buněk střeva. Tento mechanismus vylučování není při nadbytku železa dostačující, proto se železo začne hromadit v buňkách (17, 27). Nahromaděné železo zprostředkovává tvorbu kyslíkatých radikálů, které způsobují peroxidaci lipidů buněčné membrány. Podílí se na vyšší tvorbě kolagenu a poškození DNA, chromozomů a mitochondrií. V játrech a slinivce břišní dochází k fibróze, následkem toho je snížení produkce inzulinu a ukládání melaninu a hemosiderinu do kůže, což se projevuje jako „bronzový diabetes“. Srdce je postižené kardiomyopatií a může dojít k arytmiím a srdečnímu selhání (9, 19, 23). Nadbytek železa se léčil venepunkcí - každý týden 500ml krve po dva roky (23). Novější způsob léčby je pomocí chelátorů železa, což jsou látky, vytvářející se železem komplex, který je následně vylučován. Nejpoužívanějším chelátorem je deferoxamin (DFO), který má ale celou řadu nevýhod - perorálně podaný je neúčinný a má rychlou renální clearance (plazmatický poločas je 5-10 min). Pro dosažení dostatečného vylučování železa je třeba podávat DFO subkutánně nebo intravenózně 8-12 hod denně, 5-7 dní v týdnu. Tato terapie je pro pacienty nákladná a časově náročná, pacienti mají proto vysokou non-compliance. Intenzivní terapie DFO může mladým pacientům, kteří mají malou zásobu železa v těle, ublížit. Jako nežádoucí účinek se u nich projevuje neurotoxicita a poruchy tvorby chrupavky (4, 16, 19, 29).

Z těchto důvodů hledáme nové železochelatační struktury, které se budou moci podávat i perorálně. Je známo, že některé flavonoidy mají schopnost chelatovat železo. Proto je tato diplomová práce zaměřena na stanovení železochelatační aktivity vybraných flavonoidů – kvercetin, rutin, epikatechin, hesperetin, hesperidin a apigenin. Pro srovnání byl použit standardní chelátor deferoxamin (5, 21).

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je

- 1) změřit železochelatační aktivitu vybraných flavonoidů (apigenin, kvercetin, rutin, hesperetin, hesperidin, epikatechin) a srovnat ji se standardem (deferoxamin)
- 2) odvodit vztahy mezi strukturou flavonoidů a jejich železochelatační aktivitou.

3. Teoretická část

3.1 Železo v lidském organismu

3.1.1 Fyziologická funkce železa v organismu

Železo (Fe) je biogenní prvek, který se účastní buněčného dýchání a je důležitý pro reverzibilní vazbu kyslíku na hemoglobin (Hb). Je využíváno k syntéze krevního a svalového barviva (27), jako kofaktor enzymů se podílí na tvorbě ATP a syntéze DNA (9, 17, 18). Plní svoji úlohu v redoxních reakcích – je schopno se oxidovat a redukovat (17, 30).

Dospělý člověk má v těle 3,5 - 4 gramy železa. 65-70% Fe je v Hb cirkulujících erytrocytů. Na 1 g hemoglobinu připadá přibližně 3,4 mg železa. 4% železa jsou v myoglobinu, 1% Fe je v cytochromech, cytochromoxidáze, peroxidáze, kataláze, 0,1% je transportní Fe, 15-30% je zásobní Fe.

Železo rozdělujeme na funkční (hemové), transportní a zásobní. Funkční železo existuje ve formě dvojmocného kationtu (9, 17, 27). Hemoglobin se skládá z protoporfyrinu, Fe^{2+} a globinu. Zabudováním Fe^{2+} do protoporfyrinu vzniká hem (23). Transportní Fe je vázáno na protein transferin (beta1-globulin). Transferin má 2 vazebná místa pro Fe^{3+} (9, 17, 27). Vyskytuje se v plazmě, lymfě a mozkomíšním moku (30). Zásobní Fe je uloženo v makrofázích jater, sleziny, kostní dřeně, ve střevní sliznici, erytrocytech a plazmě. Muži mají v reprodukčním věku větší zásoby Fe než ženy. Zásobní Fe^{3+} je vázáno na feritin. Tato sférická bílkovina je rozpustná ve vodě. Skládá se z proteinové slupky a jádra, ve kterém je Fe^{3+} a fosfáty. Po odbourání proteinové slupky vzniká degradační produkt hemosiderin, ze kterého se Fe špatně uvolňuje (17, 27). Hemosiderin je uložen v játrech a ledvinných tubulech (13). Feritin není jen zásobní forma Fe. Chrání buňku proti toxickému účinku volných iontů Fe, protože volné ionty Fe mohou denaturovat proteiny. Vyskytuje se i v plasmě (séru), kde pochází z buněk monocyto-makrofágového systému. Sérový feritin ukazuje stav zásob Fe v těle.

Fe se dostává do zásobní buňky různými způsoby - z transferinu, odbouráváním Hb v makrofágu, střevní resorpcí nebo v podobě komplexu Hb-haptoglobin nebo hem-hemopexin (pouze hepatocyty).

Fe je přijímáno rostlinnou potravou ve formě anorganických solí a živočišnou potravou ve formě feritinu a hemu (27). Hlavní zdroje Fe jsou játra, maso a luštěniny

(13). Vyšší resorpci Fe mají děti, těhotné a kojící ženy. Z denního příjmu Fe (10-20 mg) se resorbuje 5-10% (27).

Fe je absorbováno v tenkém střevě (17). Absorpci Fe můžeme rozdělit na vychytávání Fe enterocytem, intraenterocytární transport a extraenterocytární transport.

Hemové Fe^{2+} se naváže na receptor – transportní systém enterocyty (HCP1), pronikne do enterocyty a rozloží se na Fe, oxid uhelnatý a biliverdin. Nehemové Fe^{3+} se musí nejdříve redukovat na Fe^{2+} . Tento proces probíhá v žaludku, kde je kyselé pH a v duodenu pomocí enzymu ferrireduktázy. Je to důležité pro zvýšení rozpustnosti a vstřebávání železa. Redukované Fe^{2+} se potom naváže na receptor-transportní systém (DMT1 = divalent metal transporter) na enterocyty a pronikne do enterocyty (30). DMT1 má funkci transmembránového přenašeče a intracelulárního přepravce dvojjazných kovů (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} a Pb^{2+}) (17).

Při nadbytku Fe ve střevě se uplatňuje paracelulární transport mucin – integrin – mobilferin (30).

Fe^{2+} je v enterocyty oxidováno na Fe^{3+} . Trojmocné Fe se naváže na apoferritin za vzniku feritinu, přesune se k bazolaterální membráně a uvolní se do plasmy. V plasmě se Fe^{3+} naváže na apotransferin za vzniku transferinu (15). Železo v plasmě má trojí původ - přijaté potravou, odštěpené z Hb rozpadlých erytrocytů a ze zásob v těle. Nejvíce Fe pochází z rozpadlých erytrocytů (27). V plasmě je komplex Fe-transferin unášen krevním oběhem a naváže se na receptory prekurzorů erytrocytů (30) (bazofilní normoblasty a dřevňové retikulocyty) (27) v játrech, slezině a kostní dřeni. Následuje endocytóza, uvolnění Fe a exocytóza apotransferinu. Fe vstoupí do mitochondrie, kde se naváže na protoporfyrin a odstartuje tvorbu hemu. V ostatních buňkách je Fe nezbytné pro funkci ribonukleotidové reduktázy, hydroxylázy, cytochromů, katalázy, peroxidázy a NO syntetázy. Pokud tělo potřebuje zvýšit zásoby Fe, tak se Fe naváže na apoferritin a uloží se do tkáně (30). V případě potřeby se Fe z tkání uvolní prostřednictvím buněk RES (retikuloendoteliálního systému) do cirkulace. Vedlejším účelem tvorby zásob Fe je detoxikace Fe (13).

Lidské tělo nemá fyziologický mechanismus pro odstranění železa z těla, homeostáza Fe je tedy závislá ve velké míře na regulaci absorpce (16, 17). Regulace absorpce Fe existuje na dvou úrovních – zásobní regulátor a erythropoetický regulátor. Zásobní regulátor reaguje na systémové zásoby železa. Jakmile je v těle dostatek Fe, hepcidin se naváže na ferroportin a tím zablokuje vtok Fe do buňky. Hecpidin je peptid tvořený jaterními buňkami. Inhibuje střevní absorpci, uvolňování Fe z makrofágů a

placentární přenos Fe, navíc má široké antibakteriální účinky. Expresi mRNA hepcidinu zvýší vzestup hladiny Fe v těle, infekce a zánět. Jednoduše řečeno – hepcidin je negativní regulátor metabolismu železa v těle.

Erytropoetický regulátor reguluje absorpci Fe v závislosti na erytropoéze (30).

Rychlost absorpce také řídí poměr apoferritinu k feritinu v mukózních buňkách. Absorpce Fe je zrychlena, pokud je poměr feritinu nízký. Pokud jsou zásoby feritinu zcela saturované, zastaví se absorpce Fe – tomuto jevu se říká mukózní blokáda (15).

Živočišné bílkoviny zvyšují absorpci hemového Fe. Negativně ovlivňují absorpci Ca^{2+} ionty. Absorpci nehemového Fe zvyšuje kyselina askorbová, fruktosa a histidin. Negativně ji ovlivní hemicelulóza, celulóza, pektin a fyláty (30).

Železo se vylučuje z těla odlučováním slizničních buněk střeva, u žen navíc menstruací. Průměrné denní ztráty Fe jsou u mužů 0,5 – 1 mg, u žen 1-2 mg. Resorpce 5-10% Fe přijatého potravou u zdravého člověka stačí tyto ztráty nahradit (17, 27).

Poruchy metabolismu Fe jsou jednou z nejčastějších klinických abnormalit. Projevují se nedostatkem nebo nadbytkem Fe (30).

3.1.2 Nedostatek železa

Příčiny nedostatku Fe jsou:

- Narušení resorpce Fe důsledkem malabsorpce nebo achlorhydrie, která je většinou způsobena atrofickou gastritidou nebo gastrektomií (23).
- Potrava chudá na Fe – v zemích 3. světa (4, 23).
- Vyšší spotřeba Fe během růstu, těhotenství a kojení.
- Defekt apotransferinu (23).
- Narušení recyklace Fe u chronických infekcí a při zánětu – zánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6, TNF-alfa) zvyšují hladinu hepcidinu, který zablokuje uvolňování Fe z makrofágů (30).
- Ztráta krve – jejími příčinami jsou hlavně úrazy, krvácením z GITu a menstruace (23).
- Nežádoucí účinky léčiv – penicilamin, levodopa, antacida, chinolony, tetracykliny.

První biochemickou známkou deficitu Fe je zvýšení volného a zinkového protoporfyrinu v erythrocytech. Tuto abnormalitu stanoví rozbor krevního obrazu.

Nedostatečná nabídka Fe pro erythropoézu způsobí zvýšení hladiny transferinových receptorů v plazmě, snížení vazebné kapacity transferinu a snížení hladiny Hb v retikulocytech (30). Na úrovni buněk se nedostatek Fe projevuje zastavením růstu a buněčnou smrtí (17).

Následkem nedostatku Fe vzniká mikrocytární hypochromní anémie (sideropenická anémie; anémie z nedostatku Fe) – v krvi jsou malé erythrocyty s nízkým obsahem Hb (23). Výskyt anémie v Evropě a Severní Americe je 1% u dospělých mužů a 14% u dospělých žen, v Africe 27% u mužů a 48% u žen a v Jižní Asii 40% u mužů a 57% u žen. Anémie z nedostatku Fe je zodpovědná za více než polovinu z těchto případů (4). Tato anémie se projevuje pocitem slabosti, únavou, nevykonností, námahovou dušností a bolestmi hlavy. Pacienti jsou bledí, trpí koilonychií (mají tenké konkávní nehty na prstech) a stomatitidou. Těmto klinickým příznakům se říká „anemický syndrom“ (15).

Léčba nedostatku Fe spočívá v substituci železem. Zahajuje se při laboratorním nálezu, kdy je feritin < 12 mikrogramů/ml a TSAT < 20%. Tyto parametry je nezbytné monitorovat každé 3 měsíce. Při dosažení hladiny feritinu > 50 mikrogramů/ml se užívá nalačno ve formě kapslí, tablet a sirupů. Jsou to většinou soli Fe²⁺ – fumarát/sukcinát/sulfát nebo polysacharidové komplexy (30). V ČR se používá síran železnatý v enterosolventních tabletách. Nežádoucí účinky perorálního podání Fe jsou časté zvracení, nausea, průjem, zácpa. Pozor na podání vysokých dávek, kdy hrozí nekróza mukózní membrány a perforace střevní stěny (15). Parenterálně se Fe podává pouze v případech, kdy není možné podat Fe per os (30). V ČR máme k dispozici komplexy Fe³⁺ s dextranem/sacharátem/isomaltátem (15). Parenterální podání Fe má jako kontraindikace graviditu, onemocnění jater a ledvin. Je třeba dát pozor na alergiky – může se vyskytnout anafylaktický šok. Před substitucí je nutno vyloučit probíhající zánět (prevence cytokiny zprostředkovaného defektu recyklace Fe na úrovni RES), může také dojít ke zhoršení infekce (30).

3.1.3 Nadbytek železa

Primárními příčinami nadbytku Fe jsou hereditární hemochromatózy (4, 30). Jsou způsobeny mutacemi genů pro HFE (klasická hemochromatóza), hepcidin, hemojuvelin (juvenilní hemochromatóza), transferinový receptor 2, ferroportin 1 a neznámý gen

způsobující tzv. Bantu siderózu. Pacienti s hereditární hemochromatózou vstřebávají z potravy stejné procento Fe jako zdravá populace, ale nedochází u nich ke snížení absorpce při nadbytku zásobního Fe v těle (30). Hereditární hemochromatózy jsou časté v severní Evropě a Severní Americe (16).

Sekundární příčiny nadbytku Fe jsou způsobeny poruchou zužitkování Fe. Patří mezi ně jaterní cirhóza, hemodialýza, parenterální suplementace železem, thalassemie, sideroblastická anemie, aplastická anemie (zde dochází ke zvýšené absorpci Fe) a transfuzní sideróza (při degradaci podaných erytrocytů se Fe akumuluje v makrofázích a následně se ukládá v parenchymatických orgánech) (9, 30).

Toxické projevy nadbytku železa závisí na hladině Fe v těle, na rychlosti ukládání Fe do buněk, na době trvání expozice Fe a na dalších faktorech, jako je abúzus alkoholu a virová hepatitida. Další z faktorů, který může ovlivnit míru toxicity Fe je místo ukládání Fe. Množství kyseliny askorbové v těle určuje, zda se bude nadbytečné Fe ukládat do makrofágů nebo parenchymatických buněk. V buňkách parenchymu způsobuje Fe vyšší toxicitu než v makrofázích. Kyselina askorbová pomáhá vyplavit Fe z parenchymálních buněk a tím zvýšit chelatační účinek DFO (19).

Nadbytečné Fe se ukládá v játrech, pankreatu, srdci, hypofýze a příštítých tělískách (30). V séru je v laboratorním nálezu vidět zvýšené množství Fe, feritinu a transferinu. Následkem je toxické poškození buněk – Fe zprostředkuje tvorbu kyslíkatých radikálů, které způsobí peroxidaci lipidů buněčné membrány. Železo se také podílí na vyšší tvorbě kolagenu a poškození DNA, chromozomů a mitochondrií. V játrech dochází k fibróze, tento proces může končit cirhózou nebo hepatocelulárním karcinomem. V pankreatu se rovněž tvoří fibróza, následkem toho je snížení produkce inzulinu a ukládání melaninu a hemosiderinu do kůže („bronzový diabetes“). Srdce je postižené kardiomyopatií a může dojít k arytmiím a srdečnímu selhání (9, 19, 23). Klouby jsou postižené onemocněním „pseudodna“ (23). Nadbytek železa způsobuje také hypogonadismus a nedostatek růstového hormonu. Poruchy růstu se objevují většinou až v pubertě společně s poruchou pohlavního vývoje jedince (19).

Nadbytek Fe způsobený krevními transfuzemi je častý při thalassemii (4, 16). Thalassemie je hereditární onemocnění. Vyskytuje se nejvíce v tropických a subtropických oblastech světa, neboť tyto geny ochraňují tamní obyvatelstvo před nákazou malárie. Thalassemii můžeme rozdělit na minor/major a α/β – thalassemii (16). Thalassemia minor je heterozygotní forma, která má málo symptomů. Thalassemia major je homozygotní forma, která má smrtelný průběh (23). Každoročně se na celém

světě vyskytne více než 50.000 případů thalassemie major, zejména ve Středomoří a na Dálném Východě. Pacienti dostávají transfuze v měsíčních intervalech. Bez chelatační terapie se těmto pacientům hromadí v těle více než 2,5g železa ročně (16). α -thalassemie se vyskytuje vzácně, protože způsobuje většinou úmrtí plodu. Při β -thalassemii je omezena produkce β -řetězce globinu. Následkem toho vzniká nedostatek HbA a zabudování Fe do Hb je potom nedostačující. Fe se začne hromadit v erythrocytech – tento stav se nazývá sideroachrécie (23). Jedna z možností léčby je transplantace kostní dřeně, která je bohužel nákladná a má omezenou dostupnost. Proto je nejčastější léčbou β -thalassemie zvýšení hladiny hemoglobinu v krvi transfuzí. Pravidelné krevní transfuze však vedou ke zvýšení hladiny železa. Každá jednotka krve (400 ml) obsahuje přibližně 250 mg železa. Pokud člověk obdrží krevní transfuzi více než dvakrát ročně, začne přebytné železo hromadit. Z tohoto důvodu hledáme perorálně aktivní chelátory železa, které by umožnily pravidelné transfuze bez obav z přetížení Fe (16, 19).

Nadbytek Fe měříme pomocí přímých a nepřímých metod. Nepřímo zjišťujeme nadbytek Fe pomocí hladiny feritinu. Přebytné Fe v buňkách poškozuje buněčné membrány. Z poškozených buněk pak uniká feritin, který můžeme změřit v séru nebo plazmě. Prahová hodnota koncentrace feritinu v séru je 2500 mg/l. Pacienti s vyšší koncentrací feritinu mají zvýšené riziko srdečních chorob a časně smrti. Dalšími způsoby nepřímé detekce hladiny Fe jsou CT (computer tomography) a NMR (nukleární magnetická rezonance). NMR je jediná metoda pro měření hladiny Fe v srdci. Mezi přímé metody měření hladiny volného Fe v těle patří rozbor jaterní biopsie. Je to kvantitativní a vysoce citlivá metoda (19).

Nadbytek Fe se léčil venepunkcí (od 50. let 20. stol.) = „pouštění žilou“ - každý týden 500ml krve po dva roky. Novější léčba je pomocí chelátorů Fe, například deferoxaminem (23). Zahájení léčby je doporučeno po 1. roce pravidelných transfuzí, kdy byla zjištěna zvýšená jaterní koncentrace železa. Pokud není jaterní koncentrace železa pravidelně vyhodnocována, počítá se u každého pacienta jednou za půl roku index toxicity. Index toxicity je definován jako průměrná denní dávka deferoxaminu (mg/kg) dělená koncentrací feritinu v séru (mg/l). Jeho hodnota by neměla přesáhnout 0.025. Doporučená denní dávka deferoxaminu nesmí překročit 50 mg/kg/den. U malých dětí by měla být dávka podkožního deferoxaminu nejvýše 25 - 35

mg na kilogram tělesné hmotnosti/24 hodin (19). U neléčených pacientů, kteří mají nadbytek Fe, nastává smrt obvykle ve druhé dekádě života (16).

3.2 Chelatace železa

Železo je jednou z příčin vzniku volných radikálů in vivo. Hraje tak klíčovou roli v oxidačním stresu, poškození DNA a buněčné smrti (4, 8, 18, 21). Proto se stalo cílem mnoha antioxidační terapií.

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), jako je hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), peroxid vodíku (H_2O_2), superoxid ($\text{O}_2 \cdot^-$), oxid dusnatý ($\text{NO}\cdot$) a peroxyinitrit (ONOO^-), jsou hlavním zdrojem oxidačního stresu v buňkách a poškozují proteiny, lipidy a DNA (8, 18, 21). ROS způsobují především poškození membrán mitochondrií, lysozomů a sarkoplazmatického retikula (19). Oxidativní poškození DNA je spojováno s rozvojem rakoviny, stárnutí, neurodegenerativních změn (Alzheimerova a Parkinsonova choroba) a kardiovaskulárních onemocnění (infarkt a mrtvice) (4, 8, 21, 22).

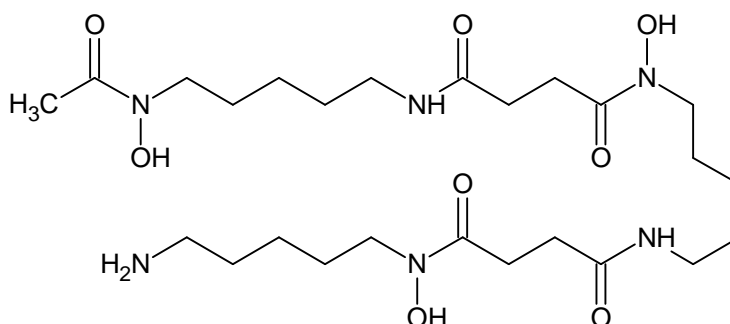
Při tvorbě hydroxylového radikálu rozeznáváme dvě hlavní důležité reakce – Fentonovu a Haber-Weissovu. Aerobní buňky produkují superoxid: $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2 \cdot^-$. Superoxid pomocí SOD (superoxiddismutáza) reaguje s H^+ a vzniká kyslík a peroxid vodíku $\text{O}_2 \cdot^- + \text{O}_2 \cdot^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Pokud je v přítomnosti superoxidu Fe^{3+} , je zredukováno na Fe^{2+} : $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2 \cdot^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$. Následuje Fentonova reakce, kde peroxid vodíku reaguje s Fe^{2+} : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$. Při Haber-Weissově reakci reaguje peroxid vodíku se superoxidem a vzniká hydroxylový radikál: $\text{O}_2 \cdot^- + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{železo}} \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ (18).

Pokud je v důsledku oxidačního stresu v blízkosti DNA přítomen H_2O_2 , redoxně aktivní ionty kovu (Fe^{2+} nebo Cu^{2+}), lokalizované blízko DNA nebo vázané na DNA, reagují s H_2O_2 za vzniku vysoce reaktivních hydroxylových radikálů. To vede k rozštěpení části DNA nebo otevření struktury jednotlivých nukleotidů. Poškození DNA může vyústit v genetické mutace, rakovinu nebo buněčnou smrt. Jaderná DNA je balena s proteiny histony v chromatinu. Několik studií ukázalo, že i zde dochází k oxidativnímu poškození. Na histonech jsou totiž navázány redoxně aktivní kovové ionty, které toto oxidační poškození způsobují. Mitochondriální DNA je mimořádně ohrožena oxidativním poškozením kvůli její blízkosti s respiračními procesy, které

produkují $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , a další ROS. Poškození mitochondriální DNA má tedy větší podíl na buněčné smrti než poškození jaderné DNA.

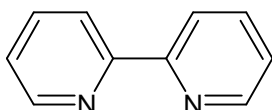
Železem zprostředkované poškození DNA pochází v první řadě z volného železa, které není vázáno na bílkoviny (18, 19, 21). Oxidační stres mimo jiné způsobuje další uvolňování železa z bílkovin, což vede ke zvýšení koncentrace volného železa (21). Za normálních podmínek je na sérový transferin vázáno 20-35% Fe. Při nadbytku Fe se transferin nasytí. Značná část železa uvolněná RES se potom nemůže vázat na nasycený transferin a zůstává v podobě volného Fe. Volné Fe vstupuje do buněk nezávisle na transferinovém receptoru a způsobuje tvorbu hydroxylových radikálů, čímž vede k poškození a smrti buňky (16, 18, 19). Vazbou Fe přispívá transferin k obraně proti infekci tím, že připravuje mikroorganismy o Fe. Lidé s nasyceným transferinem jsou proto náchylnější k infekcím. Z těchto důvodů je dobré odstranit všechno volné Fe - zejména u pacientů s potlačeným imunitním systémem.

Nadbytek Fe v těle je řešen chelatační terapií (16). Cheláty jsou cyklické sloučeniny, které vznikají koordinací volných elektronových párů na centrální atom (7). V těle se naváží na volné Fe a společně s Fe se vyloučí močí z těla. Exkrece komplexu Fe-chelátor močí může být snížena zánětem, infekcí, erytropoézou, jaterním onemocněním a nedostatkem kyseliny askorbové (19). V současnosti nejvíce užívaný chelátor je deferoxamin. DFO (obr. 1) je v hematologii nejrozšířenější chelátor železa za posledních 30 let. Jeho nevýhodou je, že při perorálním podání je neaktivní. Proto hledáme selektivní chelátory Fe, které se budou moci podávat perorálně, nebudou toxické a budou kineticky stabilní.

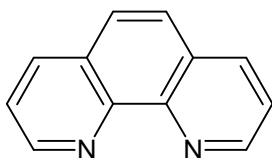


Obrázek 1. Deferoxamin.

Chelatační činidla tvoří komplexy buď s Fe^{2+} (železnaté) nebo Fe^{3+} (železité). Ligandy, které váží Fe^{2+} obsahují většinou dusík- jsou jimi např. 2,20-bipyridyl (obr. 2) a 1,10-fenantrolin (obr. 3). Tyto sloučeniny však mají afinitu k jiným bivalentním kovům, jako je Cu^{2+} a Zn^{2+} . Proto jsou chelátory Fe^{2+} považovány za toxické. Chelátory, které váží trojmocné kationty, nejsou považovány za toxické, protože tyto trojmocné kationty (Al^{3+} a Ga^{3+}) může buňka bez problému postrádat (16).



Obrázek 2. 2,20-bipyridyl.



Obrázek 3. 1,10-fenantrolin.

Ligandy mohou být strukturálně klasifikovány podle počtu donorových atomů. Pokud ligand obsahuje dva atomy, je dvojjazný, pokud tři, je trojjazný, atd. Koordinačně nejvýhodnější komplex má 6 donorových atomů a je ve tvaru oktaedru (osmistěn). Dále má pro stabilitu komplexu velký význam počet a velikost chelátotvorných kruhů. Nejpříznivější velikost má chelatační kruh, který se skládá z 5 nebo 6 atomů. Počet chelátotvorných kruhů lze zvýšit zvýšením počtu donorových atomů připojených k jednomu chelátoru. Například kovový iont s koordinačním číslem šest může tvořit tři kruhy s dvojjazným ligandem nebo pět kruhů se šestijazným ligandem. Pro maximalizaci termodynamické stability Fe^{3+} komplexu je nutné začlenit všech šest donorových atomů do jediné molekulární struktury a tím vytvořit šestijazný ligand. Toto zvýšení stability je do značné míry spojeno se změnou entropie, která nastane při přechodu z volného ligandu a rozpuštěného volného kovu na komplex ligand-kov.

Parametr, který je používán pro srovnání chelátorů, je hodnota pM nebo konstanta pFe^{3+} (pro pFe^{3+}). Hodnota pFe^{3+} je definována jako záporný logaritmus koncentrace volného Fe^{3+} v roztoku. pFe^{3+} hodnoty jsou obvykle vypočteny pro celkový [ligand] = 10^{-5} M a celkové [železo] = 10^{-6} M při pH 7,4. Srovnání ligandů podle hodnot pFe^{3+} je výhodné, protože na rozdíl od konstant stability log K nebo log β_3 tato hodnota bere v úvahu protonizační účinky ligandu a denticitu (množství atomů v jednom ligandu, které se váže na centrální atom v koordinačním komplexu). Srovnání pFe^{3+} hodnot šestivazných a dvojvazných ligandů ukazuje, že šestivazné ligandy jsou daleko lepšími chelátory Fe, než dvojvazné ligandy.

Aby mělo chelatační činidlo efektivní farmakologický účinek, musí být schopno dostat se v dostatečné koncentraci do cílových míst. Pro perorálně podávané chelátory je důležité, aby se v dostatečném množství absorbovaly z gastrointestinálního traktu. Faktory, které ovlivňují propustnost sloučeniny lipidovou membránou, jsou lipofilita, ionizace a molekulová hmotnost. Chelátory podávané per os by měly být rozpustné v tucích ($\log P$ voda/oktanol > -0.7). Pokud má chelátor vysokou rozpustnost v tucích, může pronikat přes HEB (hematoencefalickou bariéru) a placentární bariéru, čímž se zvyšuje toxicita. Propustnost membránami může být také ovlivněna iontovým stavem sloučeniny. Nenabitě molekuly pronikají buněčnou membránou rychleji, než nabitě. Z tohoto důvodu nejsou aminokarboxyláty vhodné pro perorální podání.

Další faktor, který ovlivňuje rychlost absorpce, je molekulová hmotnost. Způsoby absorpce ve střevech jsou transcelulární a paracelulární transport. Při transcelulární absorpci proniká chelátor difúzí do enterocytů - využívá tak přibližně 95% povrchu tenkého střeva. Paracelulární absorpce využívá pouze malou část plochy tenkého střeva. Při paracelulárním transportu je důležité, aby byly procházející sloučeniny malých rozměrů. Tak zvaná „cut off“ hodnota pro paracelulární transport je Mh 400. To znamená, že sloučeniny, které mají Mh vyšší než 400, neprojdou paracelulárním transportem skrz membránu. Nejlépe však pronikají paracelulárním transportem sloučeniny s Mh < 200 . Pro transcelulární transport nejsou zatím "cut off" hodnoty přesně známy. Podle propustnosti polyethylenglykolu (PEG) bylo však zjištěno, že se schopnost penetrace membránami rychle snižuje s molekulovou hmotností > 500 . Aby bylo dosaženo $> 70\%$ absorpce, musí mít chelátor molekulovou hmotnost < 500 . Tyto limity molekulárních hmotností poskytují značné omezení při volbě chelátorů pro klinické použití. Podle těchto hodnot můžeme vyloučit šestivazné ligandy. Patří mezi ně siderofory (například DFO), které mají Mh v rozmezí 500 až 900. Na rozdíl od

těchto sloučenin existují malé molekuly (např. EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová), které bez problému projdou membránou, ale jsou příliš malé na to, aby plně chelatovaly železo. Nejvýhodnější jsou pro vstřebávání dvojjazné a trojjazné ligandy, protože mají menší molekulovou hmotnost.

Rozhodující roli při určování účinnosti a toxicity chelátoru mají také jeho metabolické vlastnosti. Chelátory jsou více odolné proti metabolismu, pokud jejich struktura obsahuje málo esterů, amidů a hydroxamátů. Pokud chelátor obsahuje katecholovou skupinu, je to nevýhodné, protože mnoho enzymů tuto strukturu metabolizuje - např. katechol-O-methyl transferáza a tyrosináza. Pro dosažení maximální chelatace musí být chelátor přítomen v extracelulární tekutině v dostatečné koncentraci (10-25 mM) a po dostatečně dlouhou dobu, aby zachytil Fe z extracelulárních a intracelulárních prostor. Proto jsou sloučeniny s krátkým plazmatickým poločasem méně účinné. DFO má velmi krátký plazmatický poločas, proto je podáván infuzní pumpou.

Toxicita chelátorů Fe má různé příčiny – inhibice metaloenzymů, nedostatek selektivity pro Fe, přeměna Fe^{3+} na Fe^{2+} a naopak, kinetická labilita komplexu.

Ideální chelátor železa by měl být vysoce selektivní pro Fe^{3+} – to je důležité pro minimalizaci chelatace ostatních biologicky aktivních kovových iontů. Existuje ale mnoho ligandů, které mají vysokou afinitu k Fe^{3+} a zároveň k ostatním kovům. Například železo a zinek váží chelátory, které mají ve své struktuře karboxylát a dusík. Dvojjazné katecholy, hydroxamáty a hydroxypyridinony, které mají ve své struktuře kyslík, mají relativně vysokou selektivitu pro Fe^{3+} .

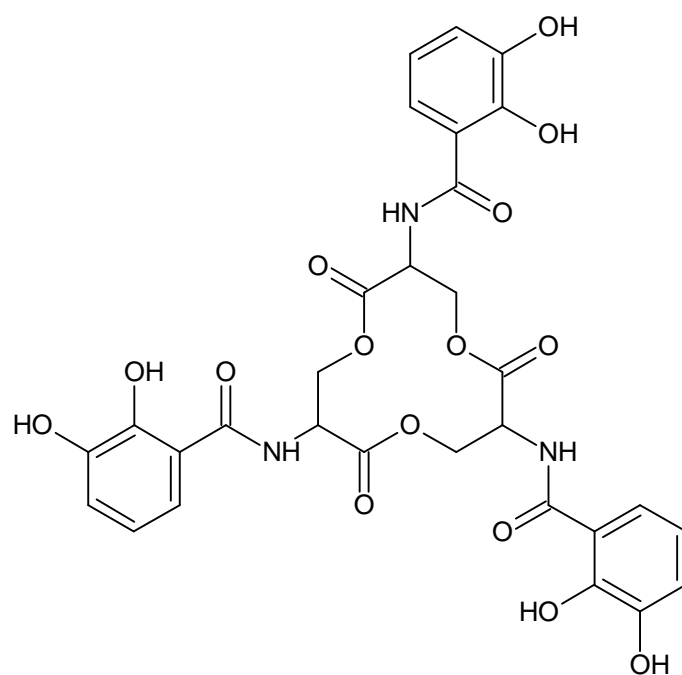
Aby se zabránilo produkci volných radikálů, mělo by být železo vázáno takovým způsobem, aby k němu neměl přímý přístup kyslík ani peroxid vodíku. Většina šestivazných ligandů (např. DFO) jsou kineticky stabilní - snižují produkci hydroxylových radikálů na minimum tím, že zcela chrání železo. Bohužel, ne všechny šestivazné ligandy mají dostatečné rozměry na to, aby zcela maskovaly železo - výsledný komplex pak může zvýšit tvorbu volných radikálů. Tento jev se nejvíce vyskytuje v neutrálním nebo zásaditém pH, kdy je rozpustnost volného Fe^{3+} značně omezená. Klasickým vzorem tohoto typu chování je EDTA, která má sedm koordinací místo obsazené molekulou vody. Tato molekula vody je kineticky labilní a je schopna se vyměňovat s kyslíkem, peroxidem vodíku a jinými ligandy, které se dostanou k Fe.

Chelátory, které váží Fe^{2+} i Fe^{3+} jsou schopné redoxně měnit oxidační stav vázaného Fe. Tato vlastnost je nežádoucí, protože může vést k tvorbě hydroxylových radikálů. Výrazně vyšší selektivita sideroforů pro Fe^{3+} než pro Fe^{2+} činí redoxní přeměnu Fe za biologických podmínek nepravděpodobnou. Chelátory s dusíkatými ligandy mají vyšší redoxní potenciál. Fe vázané na tyto chelátory může být za biologických podmínek enzymaticky redukováno a následně může dojít k tvorbě kyslíkových radikálů.

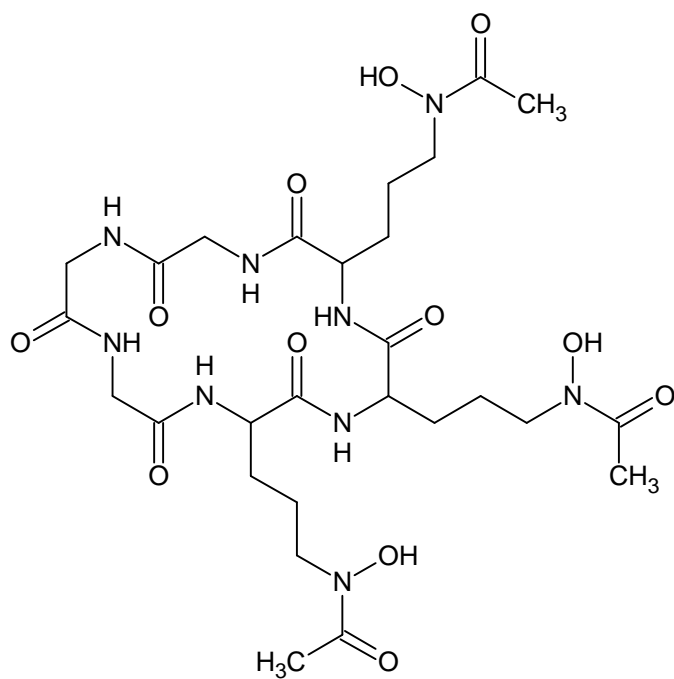
Chelátory Fe přímo neinhibují enzymy obsahující hem, protože nejsou schopné vázat komplex Fe-porfyrin. Existuje však mnoho nehemových enzymů, které obsahují Fe, jako je lipoxygenáza, aromatická hydroxyláza a ribonukleotidreduktáza. Tyto enzymy jsou citlivé na chelátorem indukovanou inhibici. Úpravou fyzikálně-chemických vlastností chelátorů Fe snížíme inhibiční vliv na mnoho metaloenzymů.

Dvojvázné a trojvázné ligandy mají oproti šestivázným ligandům výhodu, protože jsou perorálně dostupné, zároveň jsou ale více toxické. Jejich vedlejším účinkem je pronikání HEB. Propustnost HEB je pro většinu šestivázných sloučenin nízká, protože tyto sloučeniny mají vyšší molekulové hmotnosti. U molekul s nízkou molekulární hmotností ($\text{MW} < 300$) je penetrace HEB velmi závislá na lipofilitě. Molekuly s $\log P$ voda/oktanol < -1.3 pronikají skrz HEB špatně (16).

Přírodní chelátory Fe se nazývají siderofory. Produkují je mikroorganismy, které je používají pro zajištění příjmu železa z prostředí. Mají vysokou afinitu k Fe^{3+} . Jsou většinou šestivázné a jako ligandy využívají katechol a hydroxamát. Mezi tyto sloučeniny patří enterobactin (obr. 4), deferrichrom (obr. 5) a DFO (obr. 1) (4, 16).



Obrázek 4. Enterobactin.



Obrázek 5. Deferrichrom.

Šestivazné chelátory

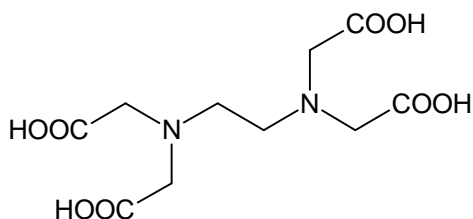
Šestivazné ligandy jsou vysoce selektivní pro Fe. Afinita k Fe není závislá na koncentraci. Jsou kineticky inertní – přeměna Fe^{3+} na Fe^{2+} je u nich nepravděpodobná. Tvoří plně koordinované 1:1 komplexy, netvoří polymerní komplexy. Propustnost přes HEB je nízká.

Mezi šestivazné chelátory patří DFO, aminokarboxyláty, katecholy a hydroxypyridinony.

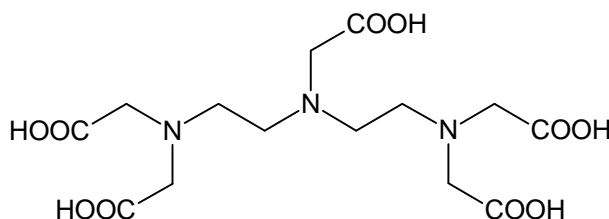
Přírozně se vyskytující siderofory poskytují vynikající modely pro výzkum terapeuticky užitečných chelátorů železa (16). Jedním z nich je DFO (1). Produkuje ho bakterie *Streptomyces pilosus* a slouží pro podporu růstu. Je to v současnosti jediný léčebný prostředek na chronické přetížení organismu železem (4, 16, 19). DFO je derivát tris-hydroxamové kyseliny a chelatuje železo v molárním poměru 1:1. Má velmi vysokou afinitu pro Fe^{3+} a mnohem nižší afinitu k ostatním iontům kovů, jako je zinek, vápník a hořčík. Přestože DFO je velká a velmi hydrofilní molekula, vstupuje do jater facilitovanou difúzí. Interaguje s hepatocelulárním i extracelulárním železem a vylučuje se močí i žlučí. DFO- Fe^{3+} komplex je kineticky inertní a má nízkou lipofilitu, z tohoto důvodu nevstupuje do buněk. DFO není ideální léčebný prostředek, protože perorálně podaný je neúčinný a má rychlou renální clearance (plazmatický poločas je 5-10 min) (16, 19, 29). Pro dosažení dostatečného vylučování železa je třeba podávat DFO subkutánně nebo intravenózně 8-12 hod denně, 5-7 dní v týdnu. Tato terapie je pro pacienty nákladná a časově náročná, pacienti mají proto vysokou non-compliance (16). Pro lepší compliance se hledají jiné způsoby podávání DFO. Jedna varianta je podání podkožní bolusové injekce místo infuze. Bolusová injekce by se podávala dvakrát denně. Další variantou by mohlo být podávání HES-DFO (hydroxyethylškrob-deferoxaminu). Jedná se o DFO, chemicky navázaný na polymer hydroxyethylškrobu. Tato struktura vytváří vysokomolekulární chelátor se stejnou afinitou k Fe, ale s 10 - 30 krát delším plazmatickým poločasem, než standardní DFO (19). Ačkoli se DFO jeví jako bezpečné léčivo, intenzivní terapie může mladým pacientům, kteří mají malou zásobu železa v těle, ublížit (16). Nežádoucími účinky DFO jsou neurotoxicita, poruchy tvorby chrupavky, poruchy visu a sluchu, změny ve funkci ledvin a plic. Podávání DFO malým dětem je spojeno s dysplazií chrupavek, dlouhých kostí a páteře, což se projevuje malým vzrůstem. Z těchto důvodů je třeba dávat malým dětem DFO v nižších dávkách, než u dospělých (19). Ve snaze zlepšit perorální biologickou dostupnost DFO byl proveden výzkum na hledání vhodných proléčiv. Pro zlepšení vstřebávání v GIT je

třeba esterifikovat labilní hydroxamatovou skupinu - vstřebávání se bohužel zlepšilo velmi málo (16).

Aminokarboxyláty mají vynikající Fe^{3+} -chelatační vlastnosti. Patří mezi ně ethylendiamintetraoctová (EDTA) (obr.6) a diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA) (obr.7). DTPA byl použit u pacientů, u kterých se objevily vedlejší toxické účinky při léčbě DFO. Kvůli jeho náboji při neutrálním pH neprochází membránami a je vylučován močí během 24 hodin od podání. Není perorálně účinný, protože se nevstřebává z GIT a vzhledem k jeho nízké selektivitě pro Fe^{3+} vede k nedostatku zinku. S cílem zvýšit selektivitu aminokarboxylátů pro Fe^{3+} bylo objeveno několik analogů, které obsahují karboxylovou a fenolovou skupinu. Užitečná sloučenina je N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)-ethylendiamin-N,N'-dioctová kyselina (HBED), která je účinnější než DFO. Váže silně Fe^{3+} s celkovou konstantou stability ($\log K_1$) od 40 a pFe^{3+} od 31. Tato hodnota ukazuje, že je to silný chelátor železa *in vivo*. Bohužel, HBED není dostatečně perorálně absorbována z důvodu iontového charakteru molekuly. Proto byla zkoumána proléčiva této molekuly. Byla prokázána perorální účinnost několika diesterů HBED. U jednoduchých alkylesterů byla rychlost hydrolyzy pomalá a účinnost nedostačující. U některých sloučenin byly zjištěny neurotoxické účinky, protože tyto sloučeniny procházely HEB. Za optimální sloučeninu je považován diisopropylester HBED, který má relativně malou molekulovou hmotnost ($\text{MW} < 500$) (4, 16).



Obrázek 6. Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA).



Obrázek 7. Kyselina diethylentriaminpentaoctová (DTPA).

Katecholy mají vysokou afinitu pro Fe^{3+} . Tato extrémně silná interakce s trojmocnými kationty kovů vyplývá z vysoké elektronové hustoty obou atomů kyslíku. Tvorba komplexů katecholů s kovy je citlivá na pH. Při pH 7,0 nese ligand i atom Fe náboj - při tomto pH komplexy neprojdou membránou pomocí prosté difúze a jsou uvězněny v buňce. Pro dvojjazné katecholy jsou komplexy 2:1 dominantní formou v rozmezí pH 5.5-7.5. V takových komplexech není atom železa zcela chráněn před rozpouštědlem a je schopen reagovat s peroxidem vodíku nebo kyslíkem, což může mít za následek tvorbu hydroxylových radikálů. Dalším problémem je náchylnost katecholů k oxidaci. Do této skupiny patří enterobactin (obr.4). Negativním znakem těchto molekul je vysoká molekulová hmotnost - jejich perorální biologická dostupnost je špatná. Proto byla připravena syntetická analoga, která mají vysokou afinitu pro Fe^{3+} jako enterobactin, navíc jsou stabilnější. Bohužel, mnoho z těchto šestivazných katecholů se váže k enterobactinovému receptoru, který mají na sobě patogenní mikroorganismy.

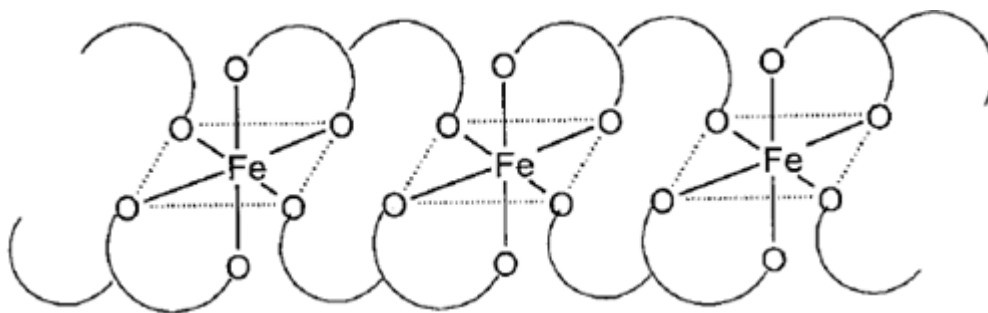
Hydroxypyridinony (HPOs) tvoří pětičlenné chelatační kruhy, ve kterých je kov koordinovaný dvěma sousedními atomy kyslíku. Při pH 7,0 se chovají jako monoprotické kyseliny a tvoří neutrální tris- Fe^{3+} -komplexy. Jejich výhodou je, že nejsou rozpoznány receptory pro siderofory na patogenních mikroorganismech. Šestivazné HPOs jsou méně toxické než jejich dvojjazná analoga, protože mají menší biodistribuci, ale vzhledem k jejich vyšší molekulové hmotnosti mají nízkou perorální dostupnost, což je nežádoucí.

Trojvazné chelátory

Trojvazné ligandy mají nízkou selektivitu pro Fe. Afinita k Fe je závislá na koncentraci. Jsou kineticky labilní – je u nich možná přeměna Fe^{3+} na Fe^{2+} a naopak. Tvoří částečně koordinované 1:1 komplexy. Tvoří polymerní komplexy v buňkách. Propustnost přes HEB je závislá na lipofilitě.

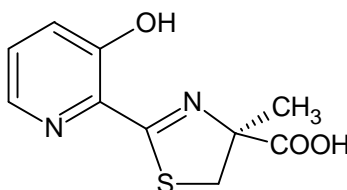
Mezi trojvazné chelátory řadíme desferriothiociny, triazoly a analoga pyridoxal isonicotinoyl hydrazon (PIH).

Potenciální problém spojený s trojvaznými ligandy je to, že na rozdíl od dvojjazných a většiny šestivazných sloučenin, mohou tvořit polymery (obr. 8). Takové struktury se obtížně vylučují ledvinami a snadno zůstávají v buňkách. Všechny trojvazné ligandy s vysokou afinitou pro Fe^{3+} mají jako ligand atom dusíku (16).



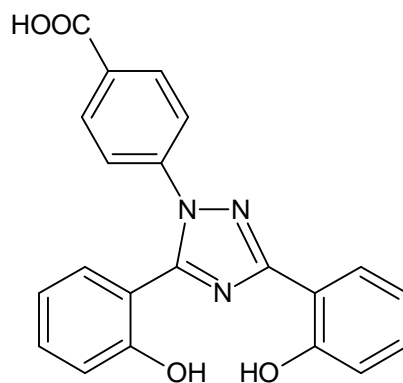
Obrázek 8. Polymerizace trojvazných komplexů železa (16).

Desferriothiocin (DFT) (obr.9) je siderofor izolovaný z mikroorganismu *Streptomyces antibioticus*. Tvoří při neutrálním pH komplex s Fe^{3+} v poměru 2:1. Skupiny vážící Fe jsou fenolátový kyslík, karboxylátový kyslík a dusík. DFT má vysokou afinitu k železitým iontům, avšak na základě přítomnosti dusíku a karboxylátů váže také pevně zinek. DFT má nežádoucí účinky - snižuje tělesnou hmotnost a je neurotoxický. Byla připravena řada syntetických analogů DFT, ale žádný analog neměl lepší vlastnosti než klinicky používaný DFO (4, 16).



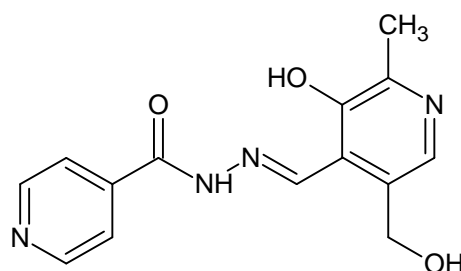
Obrázek 9. Desferriothiocin.

Triazoly (obr.10) chelatují Fe^{3+} dvěma fenolátovými kyslíky a jedním triazolovým dusíkem. Tvoří komplexy 2:1. Díky vysoké lipofilitě snadno pronikají membránami a mají dobrou perorální absorpci. Vysoká lipofilita má však i nežádoucí projevy- triazoly se hromadí v tkáních. Jejich extrémně vysoká hodnota log P zajišťuje, že se váží na plazmatické bílkoviny a tím je do určité míry omezena jejich distribuce v těle. Jsou vylučovány z jater žlučí, jen velmi malé procento z nich je vylučováno močí. Využívají jako ligand dusík - mají proto vysokou afinitu pro zinek. Vyskytují se jako trojvazné nebo čtyřvazné. Čtyřvazná struktura snadno tvoří polymerní komplexy a komplexy se zinkem.



Obrázek 10. Triazoly.

PIH (obr.11) a jeho analoga jsou perorálně účinná. U této skupiny chelátorů jsou preferovány hodnoty logP voda/oktanol blízké 1. Při neutrálním pH jsou jejich molekuly nenabitě, a proto snadno procházejí do buňky. PIH byl vybrán pro studium chelatace, protože obě složky kondenzované molekuly - isoniazid a pyridoxal, byly bezpečně používány při léčbě tuberkulózy. Dva atomy dusíku v koordinační sféře komplexu obdařují PIH analoga vysokou schopností vázat Fe^{2+} .



Obrázek 11. Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH).

Dvojvazné chelátory

Dvojvazné ligandy jsou vysoce selektivní pro Fe. Afinita k Fe je závislá na koncentraci. Jsou kineticky labilní – je u nich možná přeměna Fe^{3+} na Fe^{2+} a naopak. Tvoří částečně koordinované 2:1 komplexy, netvoří polymerní komplexy. Propustnost přes HEB je závislá na lipofilitě.

Mezi dvojvazné chelátory patří dialkylhydroxypyridinony, hydroxypyridinonová prolečiva a hydroxypyridinony s vysokým pFe^{3+} (16).

1,2-dimethyl-derivát (deferipron, L1, CP20) je perorálně aktivní chelátor železa, který je v současné době k dispozici pro klinické použití. Bohužel, dávka potřebná k

udržení dostatečné chelatace Fe je poměrně vysoká - cca 75–100 mg/kg za den. Byly také pozorovány časté nežádoucí účinky. Jedním z hlavních důvodů omezené účinnosti deferipronu je, že prochází v játrech rozsáhlým metabolismem. Hydroxylová skupina v poloze 3, která je rozhodující pro vazbu železa, je hlavním cílem pro glukuronidaci. Studie obsahu deferipronu v moči u potkanů a člověka ukázaly, že > 85% aplikované dávky je vyloučeno močí jako nechelatované 3-O-glukuronid konjugáty (4, 16). Proto byla zkoumána 1,2-diethyl analoga CP94 - tyto chelátory jsou účinnější než deferipron.

Na základě nízké molekulové hmotnosti a příznivého rozložení koeficientů jsou hydroxypyridinony perorálně aktivní, ale jejich nevýhodou je, že pronikají do HEB a placentární bariéry. Proto byla vyvinuta hydrofobní hydroxypyridinonová proléčiva, která jsou absorbována z gastrointestinálního traktu a v játrech se metabolizují na hydrofilní účinné látky, které mají omezenou schopnost procházet přes HEB a placentární bariéru. Tyto metabolity vyčistí jaterní buňku od Fe a potom se dostanou do krevního oběhu. Mezi tato proléčiva patří estery 1- hydroxyalkyl HPOs.

Nežádoucí vlastností dvojvazných HPOs je kinetická labilita jejich Fe^{3+} komplexů. Ideální komplex je 3:1. Částečně disociovaný komplex železa činí Fe^{3+} přístupný reakcím s kyslíkem a peroxidem vodíku, a tím náchylný k tvorbě hydroxylových radikálů. Chelátory s vysokou pFe^{3+} hodnotou vychytávají železo účinněji při nízkých koncentracích než chelátory s nízkou pFe^{3+} hodnotou. V zájmu zvýšení účinnosti a minimalizace toxicity byly zkoumány nové hydroxypyridinony se zvýšenou pFe^{3+} hodnotou. Byla syntetizována řada dvojvazných hydroxypyridinonů, které mají aromatický substituent v poloze 2. Aromatická skupina stabilizuje výsledný komplex železa a tím zvyšuje pFe^{3+} hodnotu (16).

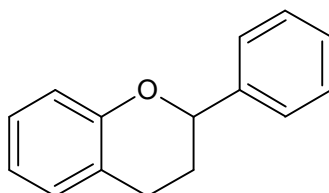
3.3 Flavonoidy

Flavonoidy (=flavonoidové glykosidy; vitamin P) jsou skupina asi 4000 polyfenolických struktur, vyskytujících se v cévnatých rostlinách (2, 3, 5, 6, 9, 26, 28, 29). Jsou to pigmenty, které způsobují různá zbarvení květů a listů – od červené po žlutou, způsobují také trpkou a hořkou chuť některých plodů. Jsou důležité pro růst a vývoj rostlin. Flavonoidy se vyskytovaly v rostlinách už před 2 biliony let. Mají mnoho příznivých účinků pro lidský organismus. Proto existuje řada studií, ve kterých se tyto účinky dokazují a měří. V této práci sledujeme hlavně železo – chelatační vlastnosti flavonoidů (5).

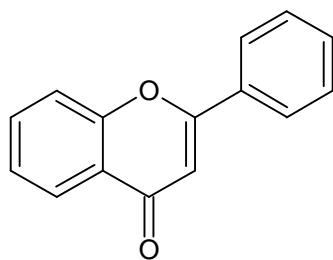
Chemická struktura

Flavonoidy (obr. 12) jsou glykosidicky vázané deriváty fenylochromanu. Jejich základním skeletem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany), 4 (neoflavany). V terapii se nejvíce využívají flavany, méně isoflavany. Neoflavany se nepoužívají. Účinné jsou glykosidy i aglykony (5, 26).

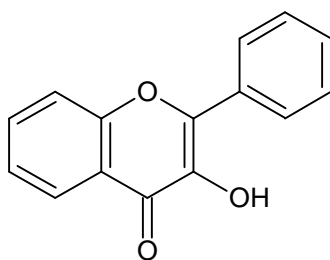
Flavany se dělí podle stupně oxidace na flavony (obr. 13, apigenin), flavonoly (obr. 14, galangin, kemferol, kvercetin, myrecetin, rutin), flavanony (obr. 15, naringenin, eriodyktiol, hesperetin) a flavanoly (obr. 16, epikatechin) (3, 26, 28). Základní struktury flavonoidů podléhají glykosylaci, hydroxylaci, hydrogenaci, malonylaci, methylaci a sulfataci. Proto se jednotlivé flavonoidy mohou od sebe ve své struktuře hodně lišit. Flavonoidy podléhají glykosylaci na C3, někdy na C7. Nejběžnější sacharidový zbytek je D-glukóza, v menším zastoupení bývá galaktóza, arabinóza, glukorhamnóza, lignin, L-rhamnóza a xylóza (3).



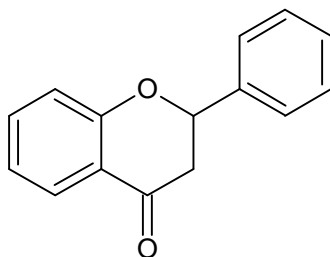
Obrázek 12. Základní struktura flavonoidů.



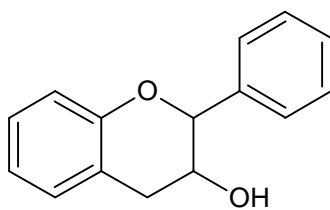
Obrázek 13. Flavony.



Obrázek 14. Flavonoly.



Obrázek 15. Flavanony.



Obrázek 16. Flavanol.

Syntéza flavonoidů

Prvním krokem syntézy flavonoidů je vytvoření fenylalaninu z fenylpyruvátu (fenylpyruvát vznikl z kyseliny šikimové) (28). Fenylalanin zreaguje na kyselinu trans-skořicovou, která podlehne hydrolýze a vznikne kyselina p-kumarová (C-9). Kyselina p-kumarová (C-9) kondenzuje se třemi malonyl-CoA (C-2) vznikne chalkon (C-15). Následným uzavřením kruhu a hydratací vzniknou 3-hydroxyflavonoidy (katechiny) a 3,4-diolflavonoidy (flavonoly) (3, 5).

Zdroje flavonoidů

Zdroje flavonoidů jsou zelený čaj a černý čaj, káva, ovoce, ovocná šťáva, zelenina, olivový olej, červené a bílé víno a čokoláda (1, 3, 5, 9, 21, 22, 28). Zelený čaj je zvláště bohatý na katechiny, které představují až 30% suché hmotnosti listu. Během pouhých 2 h po konzumaci jednoho šálku zeleného nebo černého čaje se našly katechiny v lidské plazmě v koncentraci 0,3-1 LM (21).

Metabolismus flavonoidů

Flavonoidní glykosidy v tenkém střevě podléhají hydrolýze enzymem glukosidázou, který produkuje střevní mikroflóra. Potom se vstřebávají pasivní difúzí ve formě aglykonů. Po vstřebání se vážou na albumin a jsou transportovány do jater. V játrech podléhají určité typy flavonoidů hydroxylaci, methylaci a redukci. Nakonec jsou flavonoidy v játrech konjugovány s kyselinou glukuronovou nebo síranem. Podle charakteru molekuly se flavonoidy vylučují močí nebo žlučí (3, 5, 28).

Antioxidační versus prooxidační účinek flavonoidů

Flavonoidy mají antioxidační účinky. K antioxidační aktivitě polyfenolů přispívá schopnost tvořit pevnou vazbu se železem a lipofilita, díky které prochází polyfenoly přes buněčné membrány (1, 2, 6, 9, 21, 22, 28). Čím mají flavonoidy více hydroxylových skupin a čím jsou méně glykosylovány, tím roste jejich antioxidační aktivita. Nejsilnější antioxidační účinky mají epikatechin a epikatechin-gallát (28).

Polyfenoly však mohou působit i prooxidačně. Prooxidační aktivita vyplývá ze schopnosti polyfenolů redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} , díky kterému se pak mohou vytvořit OH-radikály. Podmínky pro prooxidační činnost polyfenolů jsou ale omezené a často nejsou biologicky relevantní. Proto lidé, kteří konzumují potraviny, ve kterých jsou polyfenoly, nemusejí mít obavy. Polyfenoly a jejich komplexy s Fe^{2+} se chovají podobně jako

enzym superoxiddismutáza. Reagují se superoxidem ($O_2^{\cdot-}$) za tvorby H_2O_2 a semichinonového radikálu. Tyto reakce přispívají k oxidačnímu stresu (11, 21). Prooxidačních vlastností komplexů Fe-polyfenol se využívá v chemoterapii nádorů. Polyfenoly v nádorových buňkách inhibují aktivitu ribonukleotidreduktázy, Fe obsahujícího enzymu, který katalyzuje jeden z hlavních kroků syntézy DNA (11).

Terapeutické využití flavonoidů

Flavonoidy normalizují permeabilitu kapilár a odstraňují jejich lámavost, rozšiřují cévy (1, 5, 22, 26, 28) (zvyšují endoteliální syntézu oxidu dusnatého) (5, 21) a snižují krevní tlak. Tím zabraňují vzniku kardiovaskulárních onemocnění (5). Působí antiedematózně, antihemoragicky, diureticky (1, 22, 26, 28), protizánětlivě, antibakteriálně a antivirotický (1, 5, 21, 22, 28). Váží mnoho různých bílkovin – např. kasein a inhibují telomerázu, hyaluronidázu, α -amylázu, pepsin, trypsin a lipázu (21). S vápenatými kationty tvoří komplexní soli a tím brání srážení krve, zadržují v těle Ca^{2+} a potencují účinek vitamínu C. Používají se při prevenci osteoporózy. Mají choleretické, cholagogní, spasmolytické (1, 5, 26) a hepatoprotektivní účinky. Zabraňují uvolňování histaminu z bazofilů a žírných buněk – působí protialergicky. Některé flavonoidy snižují výskyt žaludečních vředů (působí proti *Helicobacter pylori*), inhibují střevní motilitu a sekreci – zabraňují průjmům (5). Dobře působí v prevenci neurodegenerativních chorob a rakoviny (indukují apoptózu rakovinné buňky) (5, 21). Snižují hladinu volného železa v plazmě tím, že tvoří cheláty se Fe ve střevech, Fe se pak nevstřebává.

Katechiny zeleného čaje jsou schopny překročit vysoce selektivní hematoencefalickou bariéru (HEB) a chránit tak mozek před železem. Používají se pro prevenci a léčbu Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. Železo se hromadí v degenerovaných neuronech v substantia nigra, způsobuje peroxidaci lipidů a indukuje agregaci a ukládání škodlivého β -amyloidu a α -synukleinu (21). Při léčbě těchto chorob by se mohly používat i syntetické hydroxypyridinony, které prochází HEB (16).

Nejčastější účinky a flavonoidy, které je způsobují:

Protizánětlivé - apigenin, chrysin, myricetin, kvercitrin, kvercetin, nepetin, hibrifolin, gossypin, luteolin.

Protirakovinové – baikalein, rutin, tangeretin, woogonin, tricetin, epigallokatechin, nobiletin, kvercetin, katechin.

Proti průjmu – apigenin, kempferol, naringenin, kvercetin, kvercitrin, myricetin, morin.

Antiulcerózní – kempferol, kvercetin, rutin, solon.

Antihepatotoxické – silymarin, hispidulin, gossypin, kolaviron, kvercetin.

Spasmolytické – apigenin, kempferol, kvercetin, chrysin, katechin.

Ochrana cév – citrin, kvercetin, rutosid (5).

Flavonoidy jako konzervanty

Železem zprostředkované oxidační poškození není omezeno pouze na organismy. Vzhledem k přítomnosti železa v životním prostředí, železem generované • OH jsou zodpovědné za kažení jídla a hnilobu dřeva. Proto se polyfenoly mohou také využívat jako konzervační přísady do potravin, kosmetiky, léčiv a proti hnití dřeva. Existují však protichůdné zprávy o tom, zda polyfenoly jsou vhodné pro použití jako konzervační přísady. V některých případech polyfenoly zpomalují zkázu potravin, jindy ji zase urychlují. Například hnědnutí pohmožděného nebo krájeného ovoce způsobují komplexy Fe-polyfenoly. Využití polyfenolických sloučenin jako konzervantů vypadá slibně, ale nejdříve je důležité vybrat specifické polyfenoly s antioxidačními vlastnostmi, protože některé za určitých podmínek skutečně urychlují hnilobné procesy. Jako konzervační prostředek byl schválen FDA (Food And Drug Administration) n-propylgallát (21).

Použití některých flavonoidů

Flavonoidy se používají nejvíce ve formě drog a extraktů, některé jsou i izolované (rutin, hesperidin).

Baikalein řadíme mezi flavony. Matečnou rostlinou je čínská bylina *Scutellaria baicalensis*. Používá se při léčbě bakteriálních infekcí, rakoviny a působí antioxidačně. Baikalein má výborné chelatační účinky - tvoří komplexy s Fe^{3+} i Fe^{2+} (20).

Naringin je naringenin 7-rhamnoglukosid. Řadíme ho mezi flavanony. Matečnými rostlinami jsou citrusy (*Citrus paradisi*, *C. sinensis*, *C. unshiu*, *C. nobilis*, *C. tachibana*, *C. junos*), pelyněk (*Artemisia selengensis*, *A. stolonifera*) a další rostliny (*Cudrania cochinchinensis* var. *geronatogea*, *Thymus herba barona*, *Poncirus trifoliata*, *Mabea fistulifera*, *Swartzia polyphylla*). Naringin je velmi dobrý antioxidant (10).

Rutin je 3 – rhamnoglukosid – 5 – 7 – 3' – 4' – tetrahydroxyflavonolu. Je obsažen v *Ruta graveolens*, *Sophora Japonica*, *Fagopyrum tartaricum*, *Fagopyrum vulgare*,

Pericarpium aurantii, *Herba violae tricoloris*. Používá se k léčbě hemoragií, hypertenze, alergií a jako adjuvans při infekčních onemocněních.

Hesperidin je hesperetin – 7 – 0 – rutinoid. Vykytuje se v oplodí nezralých citrusových plodů (8%). Společně s vitamínem C se používá k léčbě lámavosti kapilár, hemoragií, hypertenze. Je asi 10krát méně účinný než rutin.

Kvercitrin je kvercetin – 3 – 0 – rhamnosid. Je obsažen ve *Folium uvae-ursi* a *Herba callunae* (26).

Drogy obsahující flavonoidy

Betulae folium = březový list – ze stromu *Betula pendula* / *pubescent* (Betulaceae). Obsahuje až 3% flavonoidů, 0,1% silic a 5% katechinových tříslovin. Používá se jako diuretikum. Je součástí čajových směsí - *Species urologicae*, *Species diureticae*, *Species antirheumaticae*, Reduktan. Suchou destilací se z jeho kůry se vyrábí dehet – *Pix betulae*, který se používá v kožním lékařství.

Crataegi folium / *flos*– list nebo květ hlohu – z rostliny *Crataegus laevigata* / *monogyna* / *pentagyna* / *nigra* / *azarolus* (Malaceae). Používá se na nemoci krevního oběhu a srdce, kdy ještě není potřeba nasadit léčbu kardiotonickými glykosidy. Hloh se přidává do antisklerotických čajových směsí, extrakty se přidávají do sedativních a spasmolytických přípravků.

Ononidis radix – kořen jehlice – matečnou rostlinou je polokeř *Ononis spinosa* / *arvensis* (Fabaceae). Droga kromě flavonoidů obsahuje triterpeny a silice. Používá se jako diuretikum. Je součástí čajových směsí – *Species diureticae*, *Species urologicae*, *Species cholagogae*.

Sambuci flos– květ bezu – matečnou rostlinou je *Sambucus nigra* (Sambucaceae). Droga obsahuje flavonoly, aminy a silice. Používá se jako diuretikum a vzhledové a chuťové korigens.

Tiliae flos– lipový květ – ze stromu *Tilia cordata* / *platyphyllos* (Tiliaceae). Droga obsahuje 1% flavonoidů, 2% tříslovin, sliz, leukoanthokyanidiny, kyselinu kávovou, chlorogenovou, p – kumarovou a silice. Používá se k léčbě dráždivého kašle (slizy), má potopudný účinek při nachlazení a infekcích. Působí spasmolyticky a laxativně.

Robiniae flos (*Acaciae flos*) – květ akátu – z matečné rostliny *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae). Droga obsahuje flavonoidy, silice, kyselinu anthranilovou, farnesol, nerol a linalol. Používá se jako aromatikum, stomachikum a izoluje se z ní nerol, který se používá na parfemaci kosmetických přípravků a jako odpuzovač hmyzu.

Calendulae flos– květ měsíčku – z byliny *Calendula officinalis* (Asteraceae). Droga obsahuje silice, flavonoidy, kalendulosidy (působí hemolyticky), triterpenové alkoholy, karotenová barviva, fenolové kyseliny, hořčiny a polyacetyleny. Používá se jako antiflogistikum.

Spiraeae flos – Flos ulmariae – tužebníkový květ – z byliny *Filipendula Ulmaria* (Rosaceae). Obsahovými látkami v droze jsou flavonoidy, silice, methylester kyseliny salicylové a třísloviny. Používá se jako antirevmatikum, diaforetikum, diuretikum a antipyretikum. Přidává se do čajových směsí - Species antipyreticae, Species antirheumaticae.

Lamii albi flos – květ hluchavky – z matečné rostliny *Lamium album* (Lamiaceae). Kromě flavonoidů obsahuje droga třísloviny, triterpenické saponiny a silice. Používá se jako expektorans, mucilaginozum, adstringens při poruchách trávení a při menopauze.

Cardui mariae fructus– plod ostropestřce – *Silybum marianum* (Asteraceae). Obsahové látky jsou flavony, olej, steroly a sliz. Používá se jako hepatoprotektivum.

Violae tricoloris herba – nať violky trojbarevné a rolní - z byliny *Viola triolor/arvensis* (Violaceae). Obsahovými látkami jsou sliz, třísloviny, flavonoidy, anthokyanidiny, karotenoidy, fenolové kyseliny, a saponiny. Používá se v kožním lékařství a přidává se do antitussik.

Ribis nigri folium– List rybízu černého – z keře *Ribes nigrum* (Grossulariaceae). Droga obsahuje flavonoidy, třísloviny a vitamin C. Přidává se do diuretických a diaforetických čajových směsí (26).

4. Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Použité chemikálie

Použité chemikálie byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Německo).

Síran železnatý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Chlorid železitý ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Ferozin (sodná sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové kyseliny).

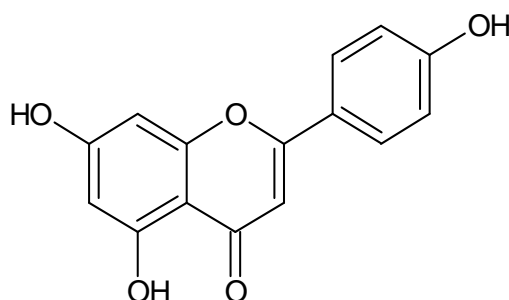
Dimethylsulfoxid (DMSO).

Hydroxylamin chlorid (HA).

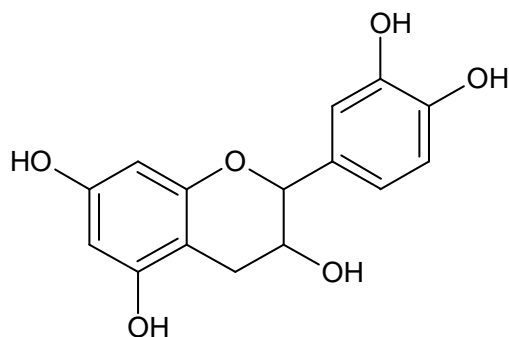
4.1.2 Testované látky

Jako srovnávací standard byl použit deferoxamin (obr. 1., Novartis Švýcarsko).

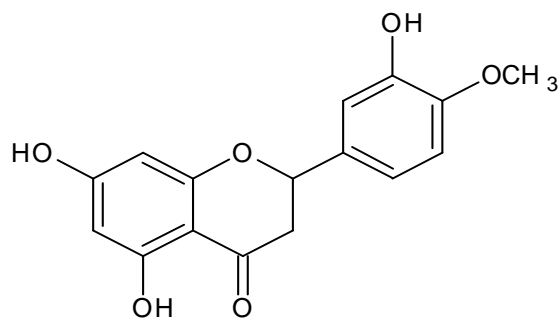
Všechny testované flavonoidy byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Německo).



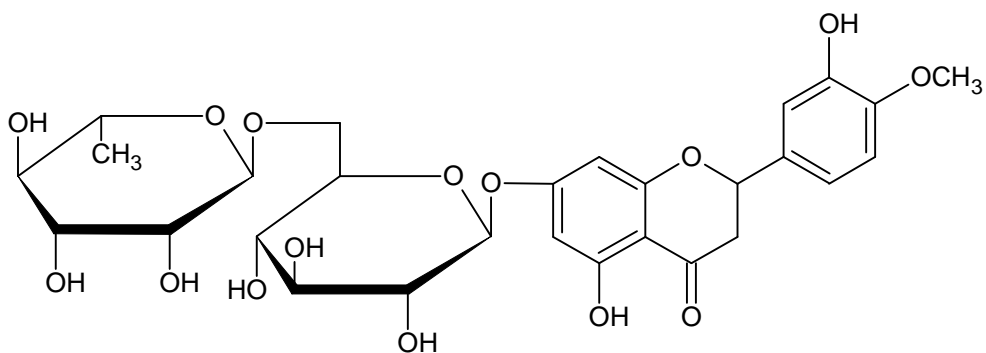
Obrázek 17. Apigenin.



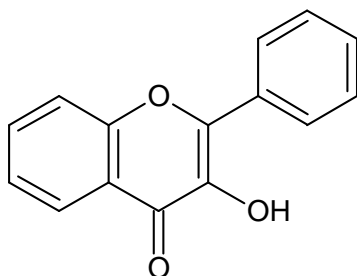
Obrázek 18. Epikatechin.



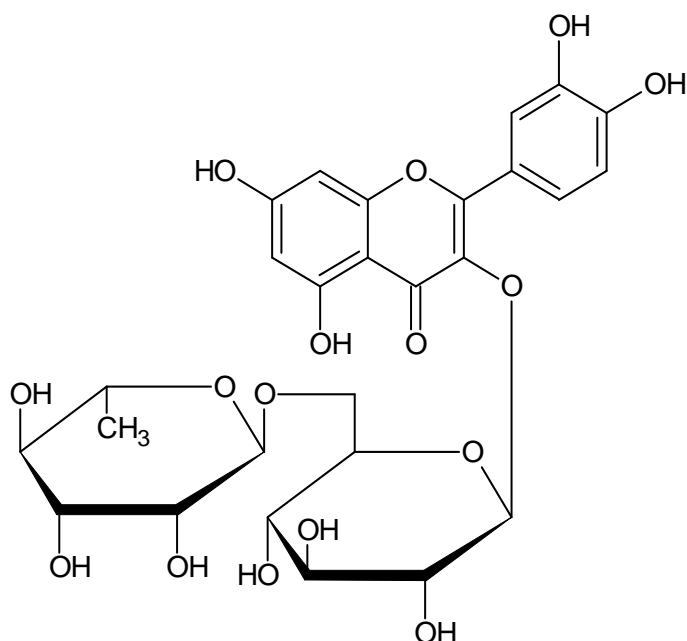
Obrázek 19. Hesperetin.



Obrázek 20. Hesperidin.



Obrázek 21. Kvercetin.



Obrázek 22. Rutin.

4.1.3 Příklad

Pro měření byl použit spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Anthos reader 2010 (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Rakousko).

4.2 Metody

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

- 1) ferozin (disodná sůl kyseliny 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové) - 5mM v destilované vodě (Mw= 492,5 g/mol)
- 2) FeCl₃.6H₂O - 5mM v destilované vodě (Mw= 207,3 g/mol) – zásobní roztok Fe³⁺
- 3) FeSO₄.7H₂O - 5mM v destilované vodě (Mw= 278,02 g/mol) – zásobní roztok Fe²⁺
- 4) HA 10mM v destilované vodě (Mw = 69,49 g/mol)

4.2.3 Zkouška pro železnaté ionty

Podle Standardního operačního postupu byla provedena zkouška pro Fe²⁺ ionty.

Do části mikrotitrační destičky (2*4 jamky) bylo napipetováno 100 μl DMSO, 50 μl roztoku Fe^{2+} (250 μM) a 50 μl roztoku ferozinu (5 mM). Absorbance byla změřena ihned při vlnové délce 562nm na readeru Anthos reader 2010. Je-li hodnota naměřené absorbance v rozmezí 0,47 – 0,52, má roztok železnatých iontů správnou koncentraci a může být použit k měření.

4.2.4 Zkouška pro železité ionty

Podle Standardního operačního postupu byla provedena zkouška pro Fe^{3+} ionty.

Do části mikrotitrační destičky (2*4 jamky) bylo napipetováno 100 μl DMSO, 50 μl roztoku Fe^{3+} (250 μM), 50 μl roztoku hydroxylaminu (10 μM) a 50 μl roztoku ferozinu (5 mM). Absorbance byla změřena ihned při vlnové délce 562nm na readeru Anthos reader 2010. Je-li hodnota naměřené absorbance v rozmezí 0,45 – 0,52, má roztok železnatých iontů správnou koncentraci a může být použit k měření.

4.2.5 Kalibrace železnatých iontů

Ze zásobního roztoku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5mM) byly připraveny koncentrace 150 μM , 100 μM , 50 μM , 30 μM , 15 μM a 0 μM . Tyto roztoky byly napipetovány na 96-jamkovou mikrotitrační destičku v množství 50 μl , následně k nim bylo přidáno 150 μl destilované vody a 50 μl ferozinu (5mM). Po 5 minutách byla na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm změřena absorbance. Z naměřených výsledků (tabulka 3) byla zhotovena kalibrační křivka (graf 1). Kalibrační křivka zobrazuje závislost absorbance (A) na finální koncentraci železnatých iontů [$\text{c}(\text{Fe}^{2+})$].

4.2.6 Chelatace železnatých iontů

- 1) Ze zásobního roztoku Fe^{2+} o koncentraci 5mM byl připraven roztok o koncentraci 0,25 mM. Schéma viz obr. 23.
- 2) Byly připraveny roztoky chelátorů železa v DMSO (flavonoidy) nebo destilované vodě (DFO) o koncentracích 10mM, 1mM, 0,1mM a 0,01mM.
- 3) Do testovacích i kontrolních jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μl roztoků chelátoru o koncentracích 10 mM, 1mM, 0,1 mM a 0 mM.
- 4) Do všech jamek bylo přidáno 50 μl roztoku Fe^{2+} .
- 5) Destička byla umístěna na 2 minuty do třepačky.

- 6) Do ½ jamek bylo přidáno 50 µl roztoku ferozinu a do druhé poloviny jamek 50 µl destilované vody.
- 7) Absorbance byla ihned naměřena při vlnové délce 562nm na readeru Anthos reader 2010.
- 8) Po 5 minutách byla absorbance naměřena znova při stejné vlnové délce.

Koncentrace testovaného roztoku /mM/	10	1	0,1	0,01	0
Absorbance směsi s ferozinem	X	X	X	X	X
Absorbance směsi s vodou (bez ferozinu) - slepý vzorek	X	X	X	X	X

testované řádky
 koncentrace chelátoru = 0, místo chelátoru bylo použito příslušné rozpouštědlo
X jamky s roztokem ferozinu
X jamky s vodou

Obrázek 23. Schéma chelatace železnatých kationtů.

4.2.7 Chelatace Fe^{2+/3+} iontů

- 1) Nejprve byly připraveny roztoky chelátorů železa v DMSO (flavonoidy) nebo destilované vodě (DFO) o koncentracích 10mM, 1mM, 0,1mM a 0,01mM. Schéma viz obr. 23.
- 2) Do testovacích i kontrolních jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 µl roztoků chelátoru o koncentracích 10 mM, 1mM, 0,1 mM a 0 mM.
- 3) Ze zásobního roztoku Fe³⁺ o koncentraci 5mM byl připraven roztok o koncentraci 0,25 mM a ihned bylo napipetováno 50 µl tohoto roztoku do všech jamek.
- 4) Destička byla umístěna na 2 minuty do třepačky.
- 5) Do všech jamek bylo napipetováno 50 µl roztoku hydroxylaminu.
- 6) Destička byla umístěna na 1 minutu do třepačky.
- 7) Do ½ jamek bylo přidáno 50 µl roztoku ferozinu a do druhé poloviny jamek 50 µl destilované vody.
- 8) Absorbance byla ihned naměřena při vlnové délce 562nm na readeru Anthos reader 2010.
- 9) Po 5 minutách byla absorbance naměřena znova při stejné vlnové délce.

4.2.8 Statistická analýza

Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm standardní odchylka. Při srovnání účinnosti jednotlivých chelátorů byl využit test ANOVA s Bonferroniho post-testem za pomoci programu GraphPad Prism verze 4.00 pro Windows, GraphPad Software (San Diego California USA).

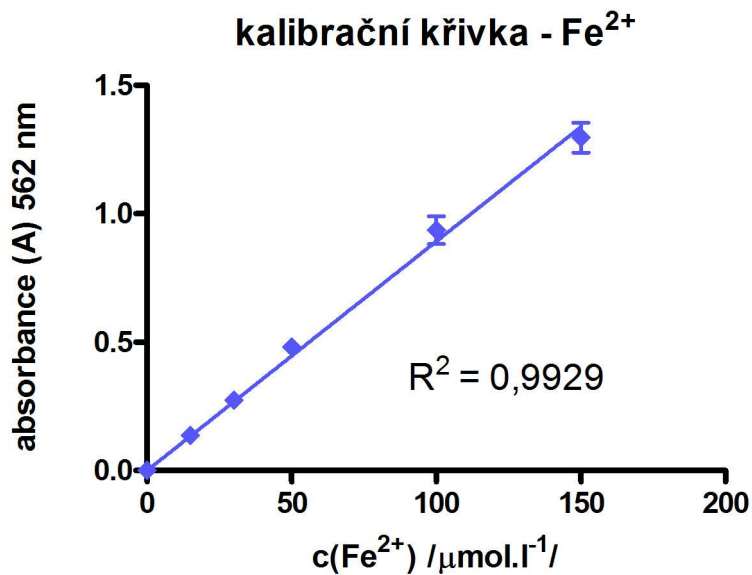
5. Výsledky

5.1 Kalibrační křivka železnatých iontů

Z naměřených hodnot (tab. 1) a následně sestrojeného grafu (obr. 24) je zřejmé, že závislost absorbance na koncentraci železa je v daném rozsahu koncentrací lineární.

$c(\text{Fe}^{2+})/\mu\text{mol.l}^{-1}$	Absorbance (A) 562 nm			
0	0	0	0	0
15	0,14	0,13	0,14	0,14
30	0,28	0,27	0,27	0,28
50	0,48	0,48	0,48	0,48
100	0,94	0,88	1,01	0,92
150	1,3	1,22	1,36	1,31

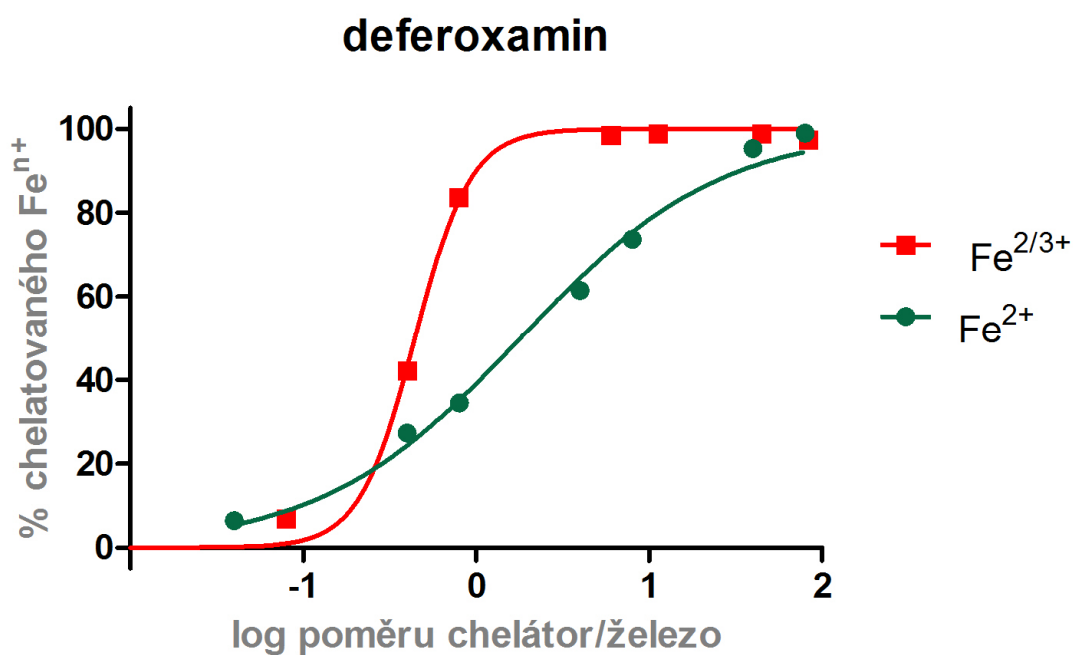
Tabulka 1. Závislost absorbance na koncentraci železnatých iontů.



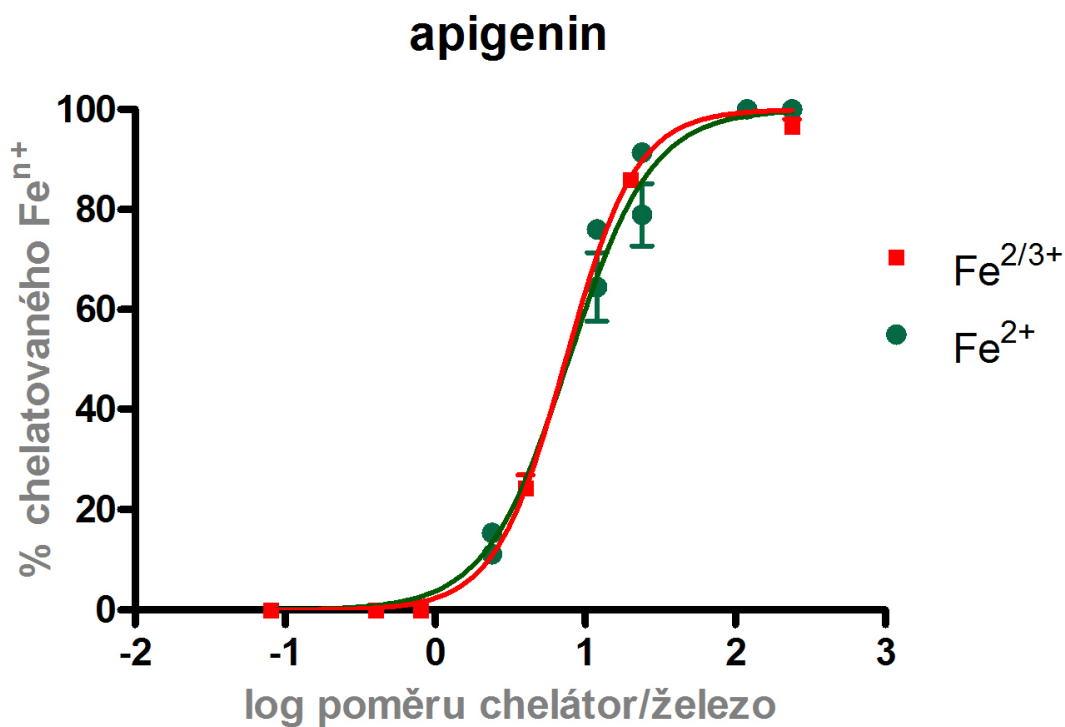
Obrázek 24. Kalibrační křivka železnatých iontů.

5.2 Chelatační účinnost vybraných flavonoidů

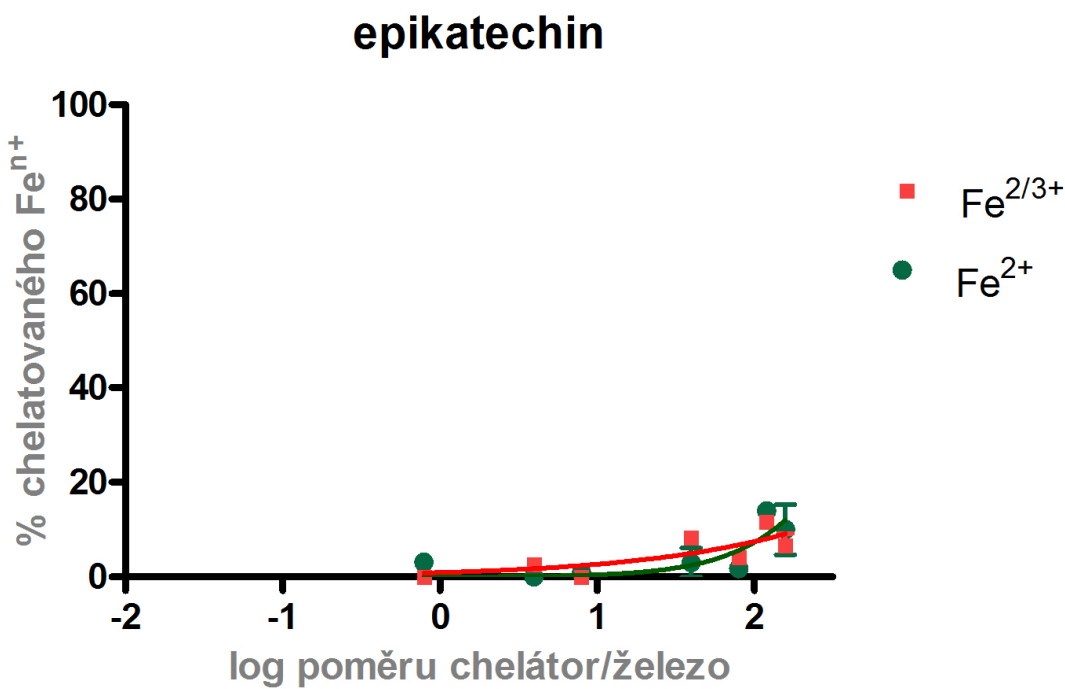
Z naměřených hodnot byly sestrojeny grafy chelatační účinnosti DEF (obr. 25) a jednotlivých flavonoidů (obr. 26-32). Dále byla porovnána chelatační aktivita jednotlivých látek při poměrech koncentrací chelátor:železo 1:1 a 10:1 (log poměru 0 a 1) (obr. 33, 34).



Obrázek 25. Chelatační účinnost deferoxaminu.

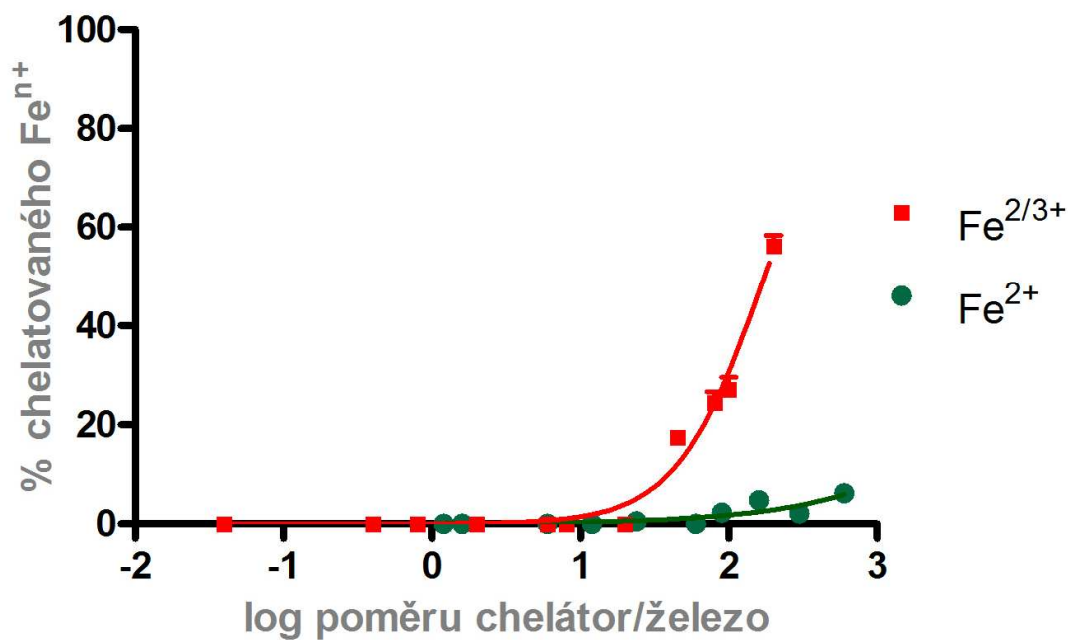


Obrázek 26. Chelatační účinnost apigeninu.



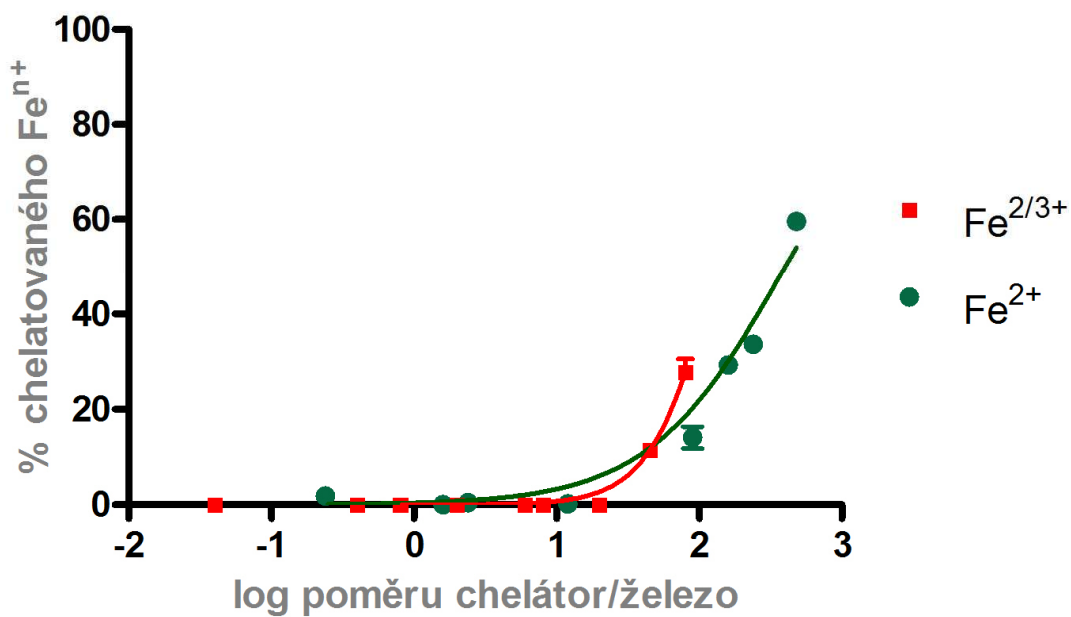
Obrázek 27. Chelatační účinnost epikatechinu.

hesperetin



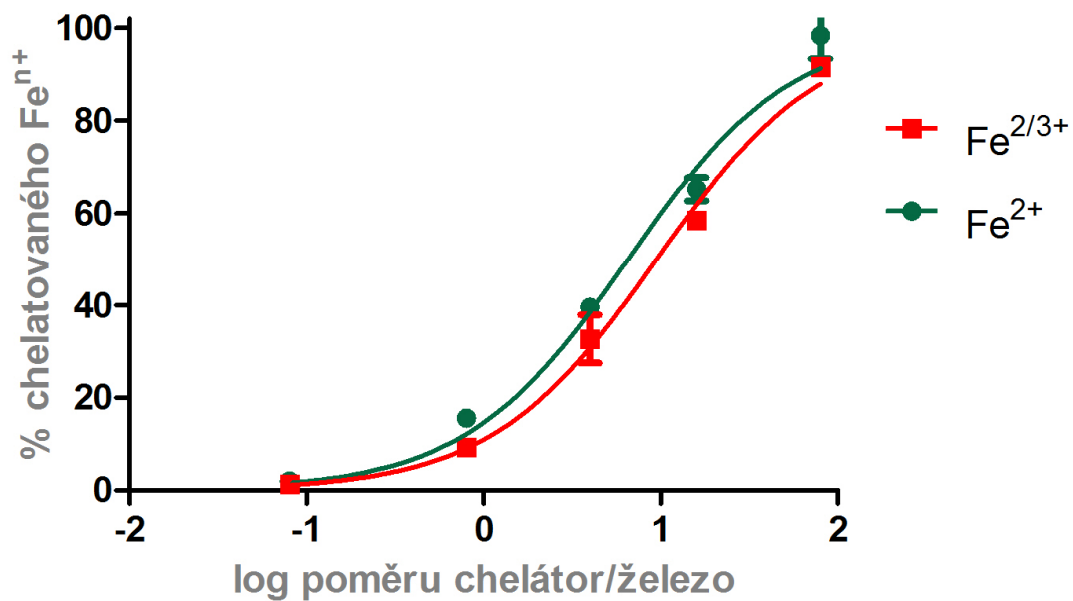
Obrázek 28. Chelatační účinnost hesperetinu.

hesperidin



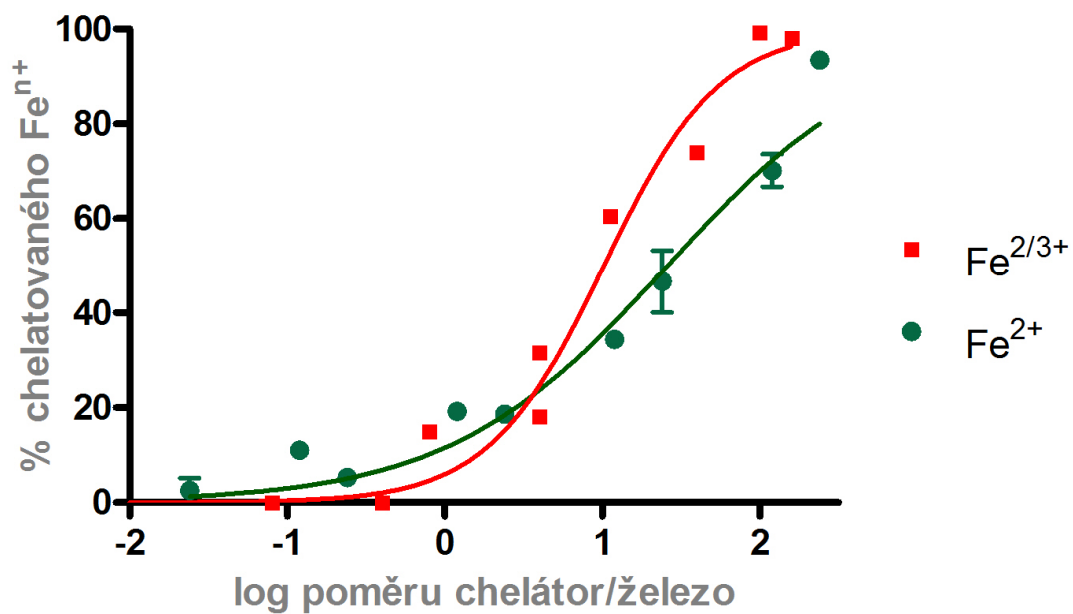
Obrázek 29. Chelatační účinnost hesperidinu.

kvercetin



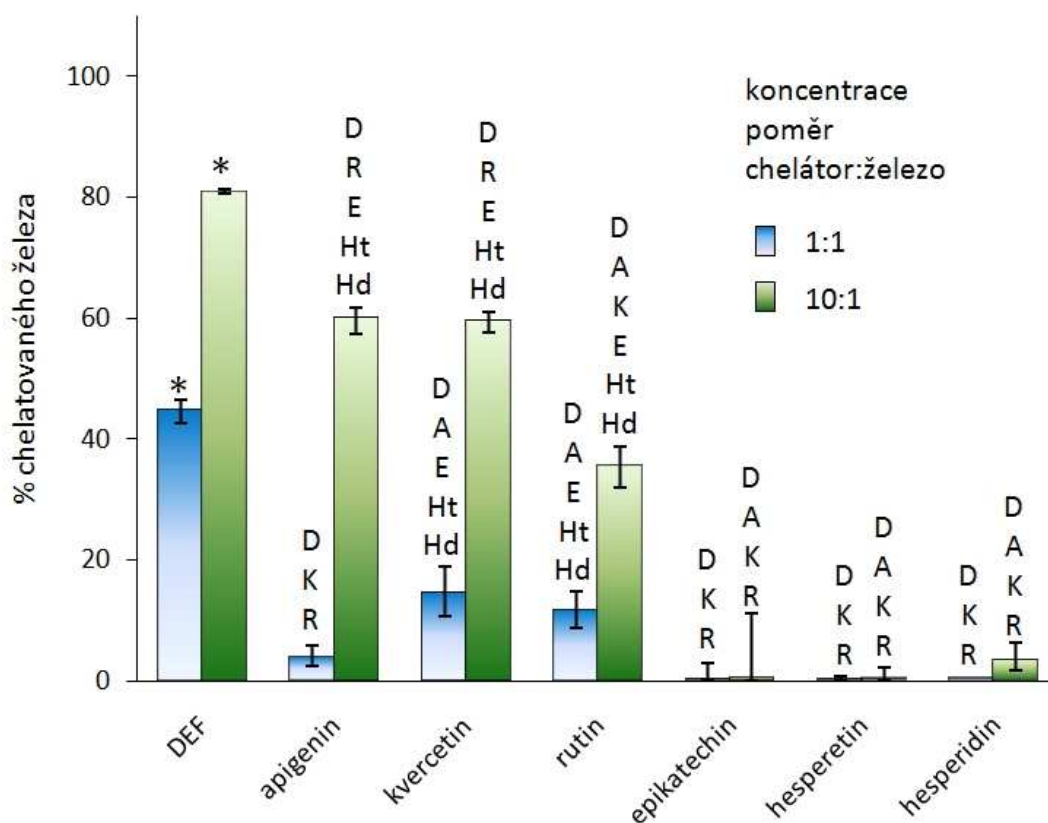
Obrázek 30. Chelatační účinnost kvercetinu.

rutin



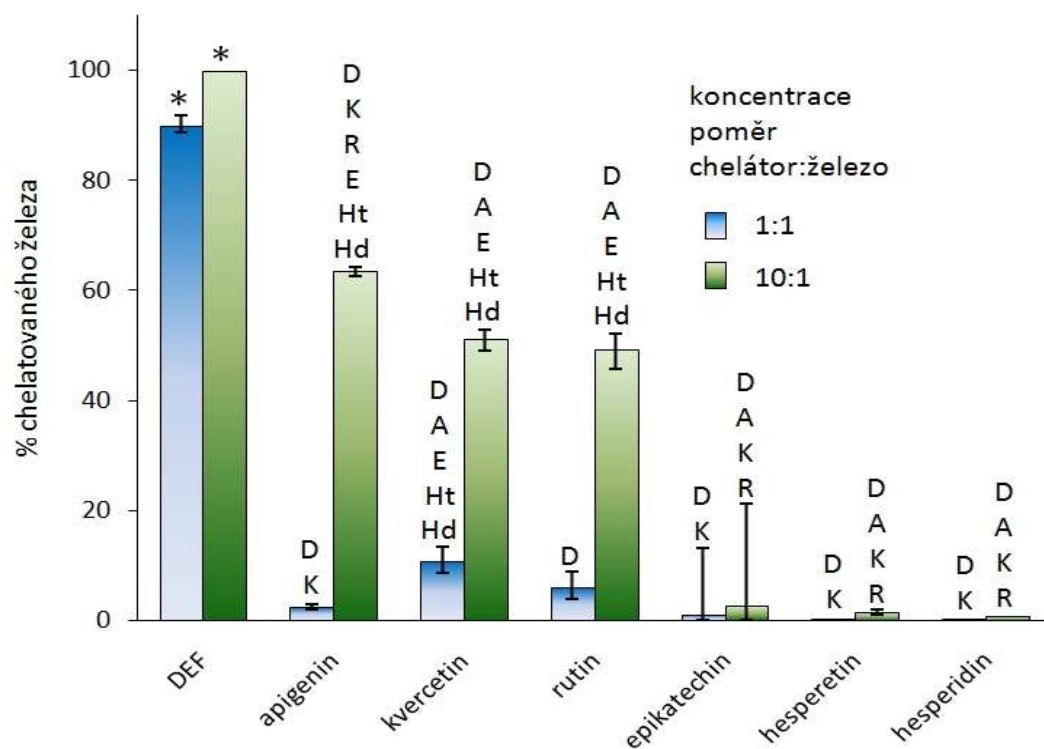
Obrázek 31. Chelatační účinnost rutinu.

Chelatace Fe²⁺



Obrázek 32. Procentuální srovnání účinnosti flavonoidů při chelataci železnatých kationtů. Statistická významnost $p < 0,001$, Symboly *: vs all flavonoids, A: vs apigenin, K: vs kvercetin, R: vs rutin, E: vs epikatechin, Ht: vs hesperetin, Hd: vs hesperidin.

Chelatace Fe^{2/3+}



Obrázek 33. Procentuální srovnání účinnosti flavonoidů při chelataci celkového železa. Statistická významnost $p < 0,001$, Symboly *: vs all flavonoids, A: vs apigenin, K: vs kvercetin, R: vs rutin, E: vs epikatechin, Ht: vs hesperetin, Hd: vs hesperidin.

6. Diskuse

Flavonoidy – rostlinné polyfenoly - mají velmi široké použití v medicíně a farmacii. Mají mnoho farmakologických účinků. V přírodě je mnoho rostlin, které obsahují různé flavonoidy – jejich výběr je velmi pestrý. Tyto skutečnosti umožňují velké možnosti studia jejich farmakologické aktivity. Jedním z účinků je chelatace železa neboli tvorba komplexů se železem. Cílem této diplomové práce bylo stanovit železochelatační aktivitu několika flavonoidů. Jako srovnávací standard jsme zvolili klinicky používaný deferoxamin. Vzhledem k nežádoucím účinkům, které jsou časté při podávání DFO, se výzkum chelátorů železa zaměřuje na látky, které tyto nežádoucí účinky nevykazují.

Pro odvození vztahu mezi strukturou a aktivitou flavonoidů byly testovány strukturálně odlišné flavonoidy (flavony, flavonoly, flavanony a flavanoly). Pro stanovení chelatační účinnosti flavonoidů a DFO byl použit spektrofotometr a chemický indikátor ferozin, který tvoří s Fe^{2+} komplex s vysokým extinkčním koeficientem při 562nm (24). Při této vlnové délce bylo měřeno množství Fe^{2+} iontů, které nebyly navázány do komplexu s chelátorem. Lineární závislost absorbance na koncentraci Fe^{2+} iontů (obr. 24) byla ověřena s vysokou hodnotou spolehlivosti ($R^2 = 0,9929$). Ferozin je činidlo, které je schopné vytvářet barevný komplex pouze s železnatými ionty, a proto musely být železité ionty před vlastním měřením zredukovány pomocí redukčního činidla hydroxylaminu.

Po srovnání účinnosti chelatace zkoušených flavonoidů s deferoxaminem jsme zjistili, že klinicky používaný DFO je z těchto chelátorů nejúčinnější.

Při poměru chelátor:Fe 1:1 (dále jen „poměr 1:1“) chelatoval Fe^{2+} nejvíce (40%) DFO, potom kvercetin (15%), rutin (13%) a nejméně apigenin (5%). Epikatechin, hesperetin a hesperidin vykazovaly zanedbatelnou aktivitu.

Při poměru chelátor:Fe 10:1 (dále jen „poměr 10:1“) chelatoval Fe^{2+} opět nejvíce DFO (81%), potom apigenin (60%), kvercetin (59%), rutin (38%) a hesperidin (5%). Epikatechin a hesperetin vykazovaly zanedbatelnou aktivitu.

Při chelataci $\text{Fe}^{2+/3+}$ při poměru 1:1 vykazoval největší aktivitu DFO (89%), potom kvercetin (10%), rutin (6%), apigenin (2%) a epikatechin (1%). Hesperidin a hesperetin vykazovaly zanedbatelnou aktivitu.

Při poměru 10:1 vykazoval největší aktivitu DFO (100%), potom apigenin (63%), kvercetin (50%), rutin (48%), epikatechin (3%), hesperetin (2%) a hesperidin (1%).

Zjistili jsme, že kromě DFO je při poměru 1:1 neúčinnější kvercetin, po něm rutin a na třetím místě apigenin. Při poměru 10:1 se toto pořadí liší – neúčinnější je apigenin, po něm kvercetin a nakonec rutin.

Při poměru 1:1, kdy je stejné množství chelátoru a Fe, vykazují chelátory nižší účinnost (např. DFO chelatuje jen 40% Fe^{2+}). Pokud přidáme desetinásobné množství chelátoru (poměr 10:1), účinnost chelatace se zvýší (např. DFO chelatuje 81% Fe^{2+}). Z těchto poznatků můžeme říci, že je účinnost chelatace kvalitativně i kvantitativně ovlivněna koncentrací flavonoidu. Vzhledem k tomu, že při poměru 1:1 je procento chelatovaného Fe nižší, bude lepší, když se budou flavonoidy klinicky podávat ve vyšších koncentracích, než je poměr 1:1. Při poměru 10:1 neúčinnější flavonoid apigenin chelatoval přibližně 60% Fe. Z tohoto důvodu je třeba změřit chelataci při vyšších koncentracích flavonoidů než je poměr 10:1 a nalézt koncentraci, při které budou rostlinné chelátory nejvíce účinné a nebudou mít více nežádoucích účinků než klinicky podávaný deferoxamin. Zároveň bude třeba nalézt při určené koncentraci neúčinnější chelátor, protože aktivita chelátorů se mění se změnou koncentrace.

Při poměru 1:1 při chelataci Fe^{2+} i $\text{Fe}^{2+/3+}$ vykazoval hesperidin a hesperetin zanedbatelnou aktivitu.

Podle mnoha studií různých autorů mají flavonoidy několik součástí své struktury, důležitých pro chelataci Fe^{2+} . Největší chelatační aktivitu mají flavonoidy, které mají v kruhu C mezi C2 a C3 dvojnou vazbu, na C4 mají navázanou ketoskupinu a na C3 nebo C5 (kruhu A) mají hydroxylovou skupinu. Pokud mají navíc na kruhu B hydroxylové skupiny v polohách 3' a 4' (tzv. katecholová struktura), jejich účinnost je tím navíc zvýšena (například – kvercetin) (1, 12, 14, 25). Tyto informace souhlasí se našimi výsledky.

Pokud neobsahují flavonoidy na kruhu C dvojnou vazbu mezi C2 a C3, ketoskupinu na C4 a hydroxyskupinu na C3 nebo C5, můžou vykazovat chelatační aktivitu, pokud budou mít ve své struktuře blízko sebe dvě hydroxylové skupiny (1, 12, 14, 25). Jako příklad zde uvedu epikatechin, který má při chelataci Fe^{2+} zanedbatelnou aktivitu, ale při chelataci celkového železa ($\text{Fe}^{2+/3+}$) chelatuje při poměru 1:1 přibližně 1% Fe a při poměru 10:1 přibližně 3% Fe. Epikatechin má chelatační účinky díky katecholové struktuře na kruhu B (3', 4'-dihydroxy). Pokud by se na kruh B přidala na

C5' další hydroxyskupina, vznikla by gallová struktura (3', 4', 5'- trihydroxy), která má mnohem nižší chelatační účinky než katecholová struktura (12).

Některé flavonoidy, které vykazují železochelatační aktivitu, mají na kruhu A na C7 a C8 hydroxyskupiny. Flavonoidy s velkým množstvím hydroxylových skupin (př. taniny) mají významnou chelatační aktivitu (12).

Z měření chelatace jsme zjistili, že rutin, kvercetin a apigenin vykazovaly významnou chelatační aktivitu. Hesperidin, hesperetin a epikatechin vykazovaly zanedbatelnou chelatační aktivitu – téměř nulovou. Tyto dvě skupiny látek se mezi sebou liší tím, že flavonoidy, které mají určité chelatační účinky, obsahují ve své struktuře mezi C2-C3 dvojnou vazbu, zatímco flavonoidy s téměř nulovou aktivitou mají mezi C2-C3 vazbu jednoduchou.

Při porovnávání struktur apigeninu, kvercetinu a rutinu jsme přišli na to, že apigenin má při poměru 10:1 z těchto tří flavonoidů největší aktivitu, protože nemá v poloze 3 kruhu C hydroxyskupinu. Kvercetin a jeho glykosid rutin mají v poloze 3 a 5 hydroxyskupiny – jedna z těchto hydroxyskupin částečně stericly brání vazbě Fe na flavonoid. Z tohoto důvodu je pro chelataci lepší, když struktura obsahuje v poloze 4 oxoskupinu a hydroxyskupinu buď jen v poloze 3 nebo 5.

Kvercetin má při poměru 10:1 lepší chelatační účinky než rutin, protože v poloze 3 kruhu C má navázanou hydroxyskupinu, která zabírá v prostoru menší místo, než glykosidicky navázaná rhamnóza a glukóza u rutinu. Čím větší struktura je na C3 navázána, tím více stericly zabraňuje vazbě Fe na oxoskupinu (C4) a hydroxyskupinu (C5), tím menší je železochelatační aktivita flavonoidu.

Výsledky této diplomové práce souhlasí s výsledky dříve publikovanými. Zjistili jsme, že je účinnost chelatace kvalitativně i kvantitativně ovlivněna koncentrací flavonoidu. Porovnali jsme vztahy struktury a účinku a svým výzkumem přispěli k potvrzení dříve stanovených poznatků.

7. Závěr

V této diplomové práci jsme popsali změřenou železochelatační aktivitu vybraných flavonoidů (apigenin, kvercetin, rutin, hesperetin, hesperidin, epikatechin) a srovnali ji se standardem (deferoxamin). Zjistili jsme, že koncentrace flavonoidu ovlivňuje kvalitativně i kvantitativně chelataci železa. Při poměru chelátor:železo 1:1 byl nejúčinnější deferoxamin, potom kvercetin, rutin a apigenin. Při poměru 10:1 byl opět nejúčinnější deferoxamin, potom apigenin, kvercetin a rutin.

Vztahy struktury a účinku jsme porovnali s dříve publikovanými poznatky a přispěli k potvrzení jejich pravdivosti. Flavonoidy, které dobře chelatují železo, mají ve své struktuře v kruhu A mezi C2 a C3 dvojnou vazbu, na C4 mají ketoskupinu a na C3 nebo C5 hydroxylovou skupinu. Nižší chelatační aktivitu vykazuje katecholová struktura na kruhu B nebo hydroxyskupiny na C7 a C8 na kruhu A.

8. Seznam zkratek:

CT – computer tomography – počítačová tomografie

DFO – deferoxamin

DFT – desferriothiocin

DMT1 - divalent metal transporter – transportér dvojmocných kovů

DTPA – diethylentriaminpentaoctová kyselina

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

FDA – Food And Drug Administration

Fe – železo

GIT – gastrointestinální trakt

Hb – hemoglobin

HBED - N, N'- bis(2-hydroxybenzyl)-ethylendiamin-N, N'- dioctová kyselina

HCP1 – receptor–transportní systém enterocytu

HEB – hematoencefalická bariéra

HES-DFO (hydroxyethylškrob-deferoxaminu)

HFE – klasická hemochromatóza

HPOs - hydroxypyridinony

Mh - molekulová hmotnost

mRNA – mitochondriální ribonukleová kyselina

NMR – nukleární magnetická rezonance

PEG - polyethylenglykol

PIH – pyridoxal isonicotinoyl hydrazin

RES – retikuloendoteliární systém

RNS – reaktivní formy dusíku

ROS – reaktivní formy kyslíku

TSAT – saturace transferinu

9. Seznam použité literatury:

1. van Acker, S.A., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., Bast, A., van der Wijgh, W.J.F. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 1998, 56: 935-943.
2. van Acker, S.A., van den Berg, D.J., Tromp, M.N., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J., Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(3):331-42.
3. Aherne, S.A., O'Brien, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002;18(1):75-81.
4. Aouad, F., Florence, A., Zhang, Y., Collins, F., Henry, C., Ward, R.J., Crichton, R.R. Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorg Chim Acta*, 2002, 339:470–480.
5. di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 1999 ;65 (4):337-353.
6. Cheng, I.F., Breen, K. On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals*. 2000;13(1):77-83.
7. Červinka, O., Dědek, V., Ferles, M. *Organická chemie*. 1. Vydání. Praha: SNTL, 1970. 1070 s., s. 373.
8. Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS letters*, 1997, 416: 123-129.
9. Fraga, C.G., Oteiza, P.I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 2002;180(1):23-32.
10. Jagetia, A., Jagetia, G.C., Jha, S. Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *J Appl Toxicol*. 2007;27(2):122-32.
11. Kalinowski, D.S. and Richardson, D.R. 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.

12. Khokkar, S., Apenten, R.K.O. Iron binding characteristics of phenolic compounds:some tentative structure-activity relations.Food Chemistry. 2003, 81, 133-140.
13. Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J. Biochemie pro studující medicíny. 2. Díl. 1. Vydání. Praha: Karolinum, 2006. 562 s. ISBN 80-246-0850-2. Železo – významný prvek těla, s. 391 – 392.
14. Leopoldini, M., Russo, N., Chiodo, S., Toscano, M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. Journal of agricultural and food chemistry. 2006, 54, 6343-6351.
15. Lincová, D., Farghali, H. Základní a aplikovaná farmakologie. 2. Vydání. Praha: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0. Anémie z nedostatku železa, s.281-282.
16. Liu, Z.D. and Hider, R.C. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. Med Res Rev 2002;22(1): 26-64
17. Mladěnka, P., Hrdina, R., Hübl, M., Šimůnek, T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. Acta Medica (Hradec Králové). 2005;48(3-4):127-35.
18. Mladěnka, P., Hrdina, R., Hübl, M., Šimůnek, T. The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. Free Radic Res. 2006;40(3):263-72.
19. Olivieri, N.F., Brittenham, G.M. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. Blood 1997; 89: 739-761.
20. Perez, C.A., Wei, Y., Guo, M. Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. J Inorg Biochem. 2009;103(3):326-32.
21. Perron, N.R., Brumaghim, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell Biochem Biophys. 2009;53(2):75-100
22. Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., Vanella, A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors.Cell Biol Toxicol. 2000;16(2):91-8.
23. Silbernagl, S., Lang, F. Atlas patofyziologie člověka. 1. Vydání. Praha: Grada Publishing, 2001. 390 s. ISBN 80-7169-968-3. Anémie způsobené poruchami syntézy hemoglobinu, s. 36. Hemochromatózy, s. 252.
24. Stookey, L.L. Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. Anal. Chem. 1970, 42, 779–781.

25. Sugihara, N., Arakawa, T., Ohnishi, M., Furuno, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid. *Free radical biology and medicine*. 1999, 27, 1313-1323.
26. Tomko, J., Kresánek, J., Hubík, J., Suchý, V., Felklová, M., Sikyta, B., Libický, A. *Farmakognózia*. 2. Vydání. Martin: Osveta, 1999. 423 s. ISBN 80-8063-014-3. Flavonoidové glykosidy, s. 181-192.
27. Trojan, S., Langmeier, M. *Lékařská fyziologie*. 4. Vydání. Praha: Grada publishing, 2003. 771 s. ISBN 80-247-0512-5. Metabolismus železa, s. 132-135.
28. Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberán, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr*. 2004;59(3):113-22.
29. Zhang, Y., Li, H., Zhao, Y., Gao, Z. Dietary supplementation of baicalin and quercetin attenuates iron overload induced mouse liver injury. *Eur J Pharmacol*. 2006;535(1-3):263-9.
30. Žourek, M., Lacigová, S., Krčma, M., Mudra, J., Jankovec, Z., Rušavý, Z. Přehled metabolismu železa s ohledem na klinickou praxi. *DMEV = Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa*. 2007, 2, s. 100-105.

10. Abstrakt

Stonawská, M. Chelatace železnatých a železitých iontů flavonoidy. **Diplomová práce 2010/2011, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 58 s.**

Železo je pro lidský organismus velmi důležitý prvek. Účastní se buněčného dýchání, redoxních reakcí a využívá se k syntéze krevního a svalového barviva. Poruchy metabolismu železa se projevují jeho nedostatkem nebo nadbytkem. Lidský organismus má při nadbytku železa nedostačující mechanismus vylučování železa - hromadí se v buňkách a zprostředkovává tvorbu kyslíkatých radikálů, které způsobují peroxidaci lipidů buněčných membrán.

Nadbytek železa se léčí pomocí chelátorů Fe, což jsou látky, vytvářející se železem komplex, který je následně vylučován. Nejpoužívanějším chelátorem je deferoxamin, který má ale celou řadu nevýhod. Proto hledáme nové železochelatační struktury, které se budou moci podávat i perorálně.

Flavonoidy jsou rostlinné polyfenoly. Z chemického hlediska to jsou glykosidicky vázané deriváty fenylochromanu. Mají antioxidační účinky – reagují s volnými radikály a chelatují některé ionty kovů.

V této studii jsme se zaměřili na výzkum chelatační aktivity flavonoidů kvercetin, rutin, epikatechin, hesperetin, hesperidin a apigenin. Pro srovnání jsme použili standardní chelátor deferoxamin. Chelatační účinnost jsme měřili pomocí spektrofotometru. Jako indikátor železnatých iontů jsme použili ferozin a pro stanovení celkové chelatace jsme jako redukční činidlo použili hydroxylamin.

Porovnali jsme účinnost jednotlivých flavonoidů při dvou různých koncentracích. Při poměru chelátor:železo 1:1 byl nejúčinnější deferoxamin, potom kvercetin, rutin a apigenin. Při poměru 10:1 byl opět nejúčinnější deferoxamin, potom apigenin, kvercetin a rutin. Z toho vyplývá, že koncentrace flavonoidu ovlivňuje kvalitativně i kvantitativně chelataci železa.

Ze vztahů struktury a účinku jsme odvodili, že flavonoidy, které dobře chelatují železo, mají ve své struktuře mezi C2 a C3 dvojnou vazbu, na C4 mají ketoskupinu a na C3 nebo C5 hydroxylovou skupinu. Nižší chelatační aktivitu vykazuje katecholová struktura na kruhu B nebo hydroxyskupiny na C7 a C8. Tyto vztahy struktury a účinku jsme porovnali s dříve publikovanými poznatky a přispěli k potvrzení jejich pravdivosti.

11. Abstract

Stonawská, M. Chelation of ferrous and ferric ions by flavonoids. **Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 58 pp.**

The iron is a very important element for human organism. It participates in a cellular respiration, redox reactions and it is used for the synthesis of blood and muscle pigments. Disorders of iron metabolism are manifested by deficiency or surplus. The iron overloaded human body has insufficient mechanism for iron excretion – the iron is accumulated in the cells and mediates the creation of oxygen radicals, that cause lipid peroxidation of cell membranes.

The iron surplus is treated with iron chelators, which are substances forming a complex with iron, which is excreted. The most commonly used chelator is deferoxamine, but it has many disadvantages. For these reasons, we are looking for new iron-chelating structures, which will be able to be administered orally.

Flavonoids are plant polyphenols. From the chemical point of view they are glycosidically linked derivatives of phenylchroman. They have antioxidant effects – they interact with free radicals and chelate some metal ions.

In this study, we focused on research of chelating activity of flavonoids quercetin, rutin, epicatechin, hesperetin, hesperidin and apigenin. For comparison, we used the standard chelator deferoxamine. Chelation efficiency was measured using a spectrophotometer. As an indicator of iron ions, we used ferozin and as a reducing agent for determination of overall chelation, we used hydroxylamine.

We compared the efficacy of flavonoids in two different concentrations. In the ratio of chelator: iron 1:1, deferoxamine was the most effective, followed by quercetin, rutin and apigenin. In the ratio 10:1, deferoxamine was again the most effective, followed by apigenin, quercetin and rutin. It results from these findings that the concentrations of flavonoid affects quality and quantity of iron chelation.

We derived from the structure-activity relationships, that flavonoids, which chelated iron well, have double bond between C2 and C3, in the C4 have oxo group and in the C3 or C5 have hydroxy group in their structure. Lower chelating activity has catechol structure in the ring B or hydroxy groups in the C7 and C8. The structure-activity relationships were compared with previously published findings and contribute to confirm their veracity.