

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

**SROVNÁNÍ ŽELEZO CHELATAČNÍCH ÚČINKŮ KLINICKY POUŽÍVANÝCH
PERORÁLNÍCH CHELÁTORŮ A 8-HYDROXYCHINOLINŮ**

Rigorózní práce

Konzultant rigorózní práce: PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Mgr. 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. Tuto práci jsem nepoužil/a k získání jiného nebo stejného titulu.

Pavla Zárubová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za všechny odborné rady a za pomoc při měření a zpracování této práce. Tento výzkum byl uskutečněn za finanční pomoci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu č. 263 003.

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíl práce.....	11
3	Fyziologický význam železa.....	13
3.1	Regulace absorpce železa – hepcidin.....	14
3.2	Fyziologie hematopoézy.....	14
3.3	Hemoglobin (Hb).....	15
4	Patologické stavy spojené s dysbalancí železa.....	17
5	Anémie.....	19
5.1	Anémie způsobené poruchou tvorby erytrocytů v důsledku nedostatku železa.....	20
5.2	Anémie způsobené poruchou tvorby erytrocytů v důsledku nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové.....	21
5.3	Anémie způsobené zvýšenou ztrátou nebo destrukcí erytrocytů.....	22
5.4	Anémie způsobené poruchami syntézy hemoglobinu v důsledku genetických abnormalit.....	23
5.4.1	Srpkovitá anémie.....	24
5.4.2	Talasemie.....	25
6	Léčba anemií.....	30
6.1	Železo.....	30
6.2	Kobalamin a kyselina listová.....	32
6.3	Krevní transfuze.....	33

6.4	Další léčebné prostředky	35
6.5	Chelátory železa.....	37
6.5.1	Deferoxamin (DFO).....	37
6.5.2	Deferasirox (ICL670).....	38
6.5.3	Deferipron (L1).....	39
6.6	Možnosti klinického využití chelátorů v budoucnu	39
6.6.1	Využití chelátorů v chemoterapii nádorů	40
6.6.2	Využití chelátorů v terapii spojených se zvýšeným oxidačním stresem	42
7	Materiál a metoda.....	46
7.1	Chemikálie.....	46
7.2	Přístroj	47
7.3	Ferrozinová metoda.....	47
7.4	Postup	48
7.4.1	Příprava zásobních roztoků	48
7.4.2	Příprava testovaných roztoků	48
7.4.3	Měření chelatace železnatých iontů v závislosti na pH (Tab. 3)	48
7.4.4	Měření chelatace celkového železa v závislosti na pH (Tab. 4).....	50
7.5	Výpočet	50
7.6	Statistická analýza.....	53
8	Výsledky	54
9	Diskuze.....	61
10	Závěr	65

11	Seznam zkratek.....	66
12	Seznam použité literatury.....	68

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Pavla Zárubová

Konzultant: PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Název práce: Srovnání železo chelatačních účinků klinicky používaných perorálních chelátorů a 8-hydroxychinolinů

Železo je esenciálním prvkem účastnícím se na celé řadě životně důležitých procesů. Avšak nadbytečné železo může být pro organismus toxické v důsledku katalýzy tvorby volných radikálů. Nejčastější příčinou přetížení organismu železem (tzv. „iron overload“) je dlouhodobé podávání transfuzí u různých typů anémií. Každá transfuze představuje přívod 200-250 mg železa do organismu, což při vylučování 1-2 mg denně vede ke hromadění železa v organismu. Důsledkem je vznik komplikací, jako jsou např. srdeční poškození a fibróza jater. Riziko vzniku těchto vážných komplikací lze snížit podáváním chelátorů železa.

K chelatační terapii u chronického přesycení organismu železem se tradičně používá deferoxamin, k jeho nevýhodám ale patří nutnost časté parenterální aplikace. V současné době jej lze nahradit modernějšími perorálně podávanými chelátory (deferasirox, deferipron). Nabízí se ale také celá řada potenciálních nových indikací (záněty, nádory, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění). Ve všech těchto stavech hraje oxidační stres důležitou roli. Je nutné připomenout, že

účinnost chelatační terapie se může lišit v závislosti na pH, a pokles pH je dobře zdokumentován u některých výše uvedených stavů.

Cílem této práce bylo srovnání chelatační účinnosti registrovaných perorálně podávaných chelátorů (defripron, deferasirox) a látek ze skupiny 8-hydroxychinolinolů (8-OH-Q, chloroxin, kliočinol) v závislosti na patofyziologicky významných pH. Chelatační účinnost byla změřena spektrofotometricky ferrozínovou metodou. Statistická analýza byla provedena porovnáním 95% konfidenčních intervalů.

Bylo zjištěno, že při zvyšování pH se zvyšovala aktivita testovaných chelátorů. Některé chelátory - kliočinol, chloroxin, defripron- ale stejně účinně chelatovaly železnaté ionty při pH 5.5-7.5, i když jejich chelatační potenciál byl jednoznačně nižší při pH 4.5. Nejúčinněji chelatoval Fe^{2+} deferasirox při pH 7.5. Při pH 4.5 byly všechny chelátory relativně málo účinné. U všech testovaných chelátorů byly křivky chelatace železnatých iontů při pH 7.5 a celkového železa při pH 4.5 prakticky identické ukazující na vysokou afinitu těchto chelátorů k železitým iontům.

Všechny chelátory tvořily se železem stabilní komplexy a nedocházelo k redukci železitých iontů na redoxně aktivní ionty železnaté.

Závěrem lze tedy konstatovat, že při neutrálním pH nebudou pravděpodobně přítomny velké rozdíly mezi testovanými účinnými chelátory, ale při terapii onemocnění spojených s acidózou je vhodné přihlídnout k odlišným chelatačním účinkům těchto látek.

Abstract in English

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of pharmacology and toxicology

Candidate: Pavla Zárubová

Consultant: Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Name of thesis: Comparison of iron-chelating effects of clinically used peroral iron chelators and 8-hydroxyquinolines

Iron is an essential element, which takes part in many vital processes. However, excessive iron can be toxic for the organism by catalyzing production of free radicals. Long-term administration of blood transfusions in the therapy of various anaemias is the most common cause of iron overload. Each transfusion represents an intake of 200-250 mg iron in the organism, which due to low daily elimination (only 1-2 mg) leads to iron overload. As a result, complications like cardiovascular impairment or liver fibrosis can emerge. The risk of these severe complications can be reduced by administration of iron chelators.

Deferoxamine has been traditionally used for the chelation therapy of chronic iron overload, but to his disadvantages belong frequent parenteral applications. In these days we can also use modern orally active chelators (deferipron, deferoxamin). Furthermore, there is a wide range of potentially new indications (inflammation, tumor, cardiovascular and neurodegenerative diseases). In all these conditions oxidative stress plays an important role. It is necessary to remind that the efficiency

of chelation therapy can differ in dependence on pH, and pH reduction is well documented in some of pathological conditions mentioned above.

The aim of this study was the comparison of chelation efficiency of registered orally active chelators (deferipron, deferasirox) and a group of 8-hydroxyquinolines (8-OH-Q, chloroxin, cliochinol) in pathophysiologically important pHs. Chelation efficiency was measured by spectrophotometric method using ferrozine. Statistical analysis was performed by comparison of 95% confidence intervals.

It was found out, that the activity of tested chelators rised with increasing pH. Although some of the chelators – cliochinol, cloroxin, deferipron - chelated ferrous ions with equal efficiency at pH 5.5-7.5, their chelation potencial was lower at pH 4.5. The most efficient ferrous chelator at pH 7.5 was deferasirox. At pH 4.5 all chelators were relatively less efficient. Chelation curves at pH 7.5 for ferrous ions were almost identical to chelation curves for chelation of total iron at pH 4.5, which suggests high affinity of chelators to ferric ions.

All chelators formed stable complexes with iron and ferric ions were not reduced to redox-active ferrous ions.

In conclusion, at neutral pH there are probably not big differences among tested efficient chelators, but in conditions connected with acidosis it is worth having a respect to different chelation activity of these substances.

1 Úvod

Homeostáza železa musí být vzhledem k toxicitě železa pečlivě regulována na intracelulární i celotělové úrovni. Při fyziologických či patologických ztrátách železa vznikají sideropenické stavy, naopak při nadbytku železa dochází k přetížení organismu železem, k čemuž v našich podmínkách nejčastěji dochází při pravidelném podávání transfuzí. K odstranění nadbytečného železa z organismu se používají chelátory železa. Prvním chelátorem byl deferoxamin, dnes je možné také perorální podání deferipronu či deferasiroxu. Předmětem výzkumu jsou další indikace, zejména stavy se zvýšeným oxidačním stresem nebo nádorová onemocnění.

Anémie jsou širokým spektrem chorob. Při poruchách tvorby či struktury hemoglobinu vznikají hemoglobinopatie, jako je např. srpkovitá anémie či talasemie.

Při mnohých patologických stavech dochází ke změnám pH, jako je např. ischemie myokardu, zánětlivá a nádorová onemocnění. Se změnou pH se dochází ke změnám v chelatační schopnosti chelátorů, přičemž při klesajícím pH klesá schopnost chelatovat železnaté ionty.

2 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo porovnání registrovaných perorálně podávaných chelátorů a chelátorů ze skupiny 8-hydroxychinolinů, jejich chelatační účinnosti a schopnosti redukovat železo při patofyziologicky významných pH.

Teoretická část

3 Fyziologický význam železa

Železo je nezbytný prvek pro život buněk. Je biogenním prvkem, který se vyskytuje prakticky ve všech živých organismech. Najdeme jej v jednobuněčných organismech (kvasinky, bakterie), v buňkách rostlin a v těle bezobratlých i obratlovců. Atom železa může podle oxidačního stavu vázat nebo uvolňovat elektron, a účastní se tak řady životně důležitých biochemických reakcí. Zajišťuje transport kyslíku ve formě hemoglobinu, syntézu nukleových kyselin i proteinů, řízení buněčné proliferace a diferenciaci a také apoptózy. Je součástí mnoha enzymů (cytochromy, katalázy, peroxidázy, oxidázy, ribonukleázy, NO syntetázy) (1).

Nebezpečným pro organismus může být jeho nedostatek, ale i nadbytek. Homeostáza železa proto musí být pečlivě regulována. Železo je v organismu uloženo v cirkulujících erytrocytech (1,8g), parenchymatických buňkách jater (1g), retikuloendoteliálních makrofázích (0,6 g), kostní dřeni (0,3 g) a svalech (0,3g) (2).

Metabolismus železa představuje uzavřený systém, v němž je většina železa reutilizována a malé ztráty jsou doplňovány ze zevních zdrojů. Železo je vylučováno z těla především deskvamací buněk, zejména v gastrointestinálním traktu (u žen k tomu přistupují ještě ztráty železa menstruační krví). Železo se vyskytuje v organismu ve dvou oxidačních stavech: ve ferro (Fe^{2+}) a ferri (Fe^{3+}) formě. Dvojmocná ferro forma je charakteristická pro hemové funkční železo, zatímco zásobní a transportní proteiny (transferin, feritin, hemosiderin) váží železo ve formě trojmocné (3). Podobně hemoglobin s navázaným Fe^{3+} , tzv. methemoglobin, je nefunkční formou hemoglobinu, kdy železo navíc kovalentně váže hydroxylovou skupinu a pro kyslík žádná valence nezůstává (3).

Pro pochopení následujícího textu je nutné zdůraznit některé aspekty osudu a významu železa v organismu.

3.1 Regulace absorpce železa – hepcidin

Homeostáza železa na intracelulární i celotělové úrovni je důležitým obranným mechanismem proti vzniku oxidačního stresu a je řízena na posttranskripční úrovni regulačním mechanismem IRP/IRE (z angl. Iron Regulatory Proteins a Iron Response Elements) a hepcidinem. Hepcidin je peptidový hormon, objevený v roce 2001, který hraje důležitou roli v absorpci železa z potravy a uvolnění železa z monocyto-makrofágového systému. Inhibuje uvolnění železa z enterocytů a makrofágů urychlením degradace feroportinu, transportéru železa (31). Tvorba hepcidinu v hepatocytech je při zánětlivých stavech stimulována IL 6 (32). Mutace v genu pro hepcidin, stejně tak i mutace genů účastnících se regulace hepcidinu, vede k toxické akumulaci železa v organismu, k čemuž dochází při nedostatku hepcidinu, nebo také k závažným anémiím z nedostatku železa při zvýšené tvorbě hepcidinu (33, 34). Hepcidin se užívá také k určení diagnózy anémií, kdy je jeho produkce snížena. Naopak, jeho produkce je zvýšena při zánětlivých stavech a přetížení železem (11).

3.2 Fyziologie hematopoézy

Krvetvorba (hematopoéza) probíhá v dospělosti hlavně v kostní dřeni lebky, sternu, žebrech, obratlech, lopatkách kostí kyčelních a v proximálních koncích dlouhých kostí. Jednotlivé krevní elementy vznikají z multipotentní kmenové buňky, která má schopnost sebeobnovy a diferenciací. Lymfocyty, erytrocyty a trombocyty

vznikají za normálních okolností v kostní dřeni. Thymus dostává progenitorové T-lymfocyty z kostní dřene a umožňuje jejich vyžívání ve zralé lymfocyty. Krvetvorba je komplexní soubor dějů, který je výsledkem působení řady humorálních faktorů a buněčných interakcí, na nichž se podílejí vlastní krvetvorné buňky, fibroblasty, tukové buňky a endotelie, nacházející se v kostní dřeni. Humorální faktory, cytokiny, mají povahu stimulatorů, inhibitorů, případně ovlivňují účinky jiných cytokinů. Jejich účinek je podmíněn vazbou na membránové receptory, umožňující přenos signálu do buňky (3, 6).

3.3 Hemoglobin (Hb)

Hemoglobin, krevní barvivo v erythrocytech, se skládá ze čtyř podjednotek. U zdravých dospělých jedinců obsahuje dvě podjednotky α a dvě β ($\alpha_2\beta_2$). Podjednotky α a β se liší počtem aminokyselin (α 141, β 146) i jistými rozdíly v sekvenci. Na každé podjednotce je hydrofobní kapsa, zadržující hem. Tento tetramer se označuje jako hemoglobin A (HbA), vyskytuje se v krvi dospělého člověka v 97 %. Dalšími fyziologickými hemoglobiny jsou hemoglobin A2 (HbA2), s molekulární strukturou $\alpha_2\delta_2$ a nízkým obsahem v krvi (1-3 %) (3, 35). Ve fetálním období hlavní podíl hemoglobinu představuje fetální hemoglobin HbF se strukturou tetrameru $\alpha_2\gamma_2$, který má vyšší afinitu ke kyslíku. Mezi patologické hemoglobiny patří např. hemoglobin S (HbS), hemoglobin M (HbM), hemoglobin H (HbH), hemoglobin E (HbE). Hemoglobin S je podkladem srpkovité anémie, kdy je v β řetězci v poloze 6 valin místo glutamátu. Erythrocyty s HbS pro svůj tvar a neohebnost špatně prochází kapilárami, vyvolávají bolest, snadno hemolyzují. V HbM je proximální histidin nahrazen tyrosinem, produktem je methemoglobin. HbH je složen ze čtyř β řetězců a

vyskytuje se u pacientů s α -talasemií. U HbE dochází k mutaci v β řetězci, což má za následek vznik mírné formy hemolytické anémie a splenomegalie (36).

4 Patologické stavy spojené s dysbalancí železa

Patologické stavy spojené s dysbalancí železa můžeme rozdělit na onemocnění zapříčiněná absolutním či relativním nedostatkem tohoto prvku, na stavy související s přetížením organismu železem a na poruchy utilizace železa. Tyto poruchy mohou být vrozené nebo získané, často se však jedná o kombinaci obou příčin (1).

Je-li v organismu absolutní či relativní nedostatek železa, mluvíme o sideropenických stavech. Sideropenie se vyvíjí při negativní bilanci železa, kdy příjem železa v potravě a/nebo poruchy jeho vstřebávání nestačí k hrazení fyziologických nebo patologických ztrát. K fyziologickým příčinám patří zvýšená utilizace Fe v pubertě, těhotenství, laktaci. Mezi patologické příčiny sideropenie patří zvýšené ztráty Fe (hypermenorhea, metroragie, vředy v trávicím traktu, hematurie, dárce krve), poruchy vstřebávání železa (anacidita, stavy po resekci žaludku, malabsorbční syndrom), nedostatek Fe v potravě (přísní vegetariáni, podvýživa). Karence železa se snadněji vyvine u žen v reprodukčním věku, neboť menses nebo gravidita vyžadují vyšší příjem železa potravou. Laboratorně nacházíme u pacientů s karencí železa celé spektrum nálezů od latentní sideropenie po manifestní sideropenickou anémii (4).

Léčebným postupem u sideropenie je jednak snaha o odstranění její příčiny a zároveň zvýšený přívod železa, nejčastěji v podobě perorálních tablet. Jedině v případě výrazné poruchy vstřebávání nebo intolerance této léčby jsme nuceni sáhnout k parenterální aplikaci železa v podobě intramuskulárních či intravenozních injekcí. Celková dávka železa musí být přesně vypočítána, abychom eliminovali

možnost vzniku nežádoucích vedlejších účinků plynoucích zejména z rizika přesycení organismu železem.

Naopak přetížení organismu železem vzniká při pozitivní bilanci tohoto prvku zapříčiněné zvýšeným vstřebáváním nebo přívodem železa, dále při zvýšeném katabolismu hemoglobinu (hemolýza, neefektivní erythropoéza) a při poruchách transportu železa z buněk. Při hemolytických anémiích, zvláště při vrozených hemoglobinopatiích, je prokázáno i zvýšené vstřebávání železa v duodenu.

V klinické praxi jsou častými příčinami přesycení organismu železem mnohočetné transfuze u různých typů anémií, a dále v menší míře i hereditární hemochromatóza (4, 5).

Klíčovým momentem v patofyziologii toxicity nadbytku železa je jeho zvýšený výdej do cirkulace. Při překročení saturace transferinu železem stoupá v plazmě množství tzv. netransferinového železa. Jedná se v podstatě z velké části o tzv. labilní plazmatické železo, je které je oxidačně aktivní a může iniciovat v důsledku Fentonovy reakce peroxidací lipidů vedoucí k zániku buněk (5).

5 Anémie

Poruchy hematopoézy tvoří velmi široké spektrum chorob. Tyto poruchy mohou být vrozené nebo získané. Můžeme je rozdělit na poruchy myelopoézy (myeloaplázie, myelodysplázie a myeloproliferativní onemocnění), poruchy lymfopoézy (imunodeficity, autoimunitní a lymfoproliferativní onemocnění) (7). Důraz je v této práci kladen na poruchy hematopoézy z hlediska patofyziologie železa, tedy zejména anémie. Anémii lze definovat jako chorobný stav charakterizovaný snížením koncentrace hemoglobinu pod fyziologickou mez pro daný věk a pohlaví (41).

Aplastická anémie je charakterizovaná celkovým útlumem krvetvorby, provázená pancytopenií. Onemocnění je poměrně vzácné s incidencí 5-10 případů na jeden milion obyvatel za rok. Získaná aplastická anémie (tzv. Fanconiho anémie) je mnohem častější než vrozená. Získaná aplastická anémie má různé příčiny jako infekční choroby, ozáření, působení léků (cytostatika, chloramfenikol, streptomycin, chlorpromazin atd.) (7). Imunitní podklad aplastické anémie u většiny pacientů poskytuje důvod k užití imunosupresivní terapie, hematologická odpověď je u 75 % pacientů. Transplantace hematopoetické kmenové buňky u získané aplastické anémie, ať už u od sourozence s identickým HLA (z angl. Human Leukocyte Antigen) nebo od nepříbuzného dárce, je spojena s vysokou pravděpodobností dlouhodobého vyléčení (9).

U dětí se může aplastická anémie projevit v jakémkoli věku. Na rozdíl od dospělých se většinou nejedná o aplastickou anémii získanou nebo idiopatickou, ale jako důsledek více genetických faktorů. Dříve byla smrtelnou hematologickou poruchou, dnes se díky několika terapeutickým možnostem a podpůrné léčbě prognóza velmi zlepšila. Léčbou první volby je pacientů s HLA-identickým

sourozencem je obecně opět transplantace hematopoetické kmenové buňky, s procentem vyléčených kolem 90 %. U dětských pacientů, kteří nemají HLA-identického sourozence je léčbou volby imunosupresivní terapie (9).

Myelodysplastický syndrom (MDS) je definován jako klonální porucha krvetvorby. Mutace kmenové krvetvorné buňky vede ke vzniku patologického klonu s růstovou výhodou, jenž může postupem doby zcela nahradit normální krvetvorbu. V časně fázi onemocnění bývá většinou přítomen různý stupeň cytopenie v periferní krvi při současném nálezu buněčně bohaté kostní dřeně s morfologickými známkami dysplazie. Tento obraz vzniká v důsledku vystupňování procesu apoptózy. Pro pokročilou fázi MDS je naopak charakteristický progresivní nárůst nezralých buněk s velmi nízkým stupněm apoptózy, vedoucí k obrazu nadbytku blastů v kostní dřeni a v periferní krvi. Tato fáze onemocnění je spojena s vysokou pravděpodobností přechodu choroby do akutní leukémie (AL) (37).

5.1 Anémie způsobené poruchou tvorby erytrocytů v důsledku nedostatku železa

Anémie z nedostatku železa (sideropenická anémie) vzniká při manifestním nedostatku železa, a to nejprve normocytární (asi 20 % sideropenických anémií), při poklesu hemoglobinu cca pod 110 g/l dochází i ke zmenšování objemu krvinky a anémie bývá mikrocytární s anizocytózou (nestejná velikost erytrocytů). Příčina anémie tkví především v nedostatečné tvorbě erytrocytů, neboť nedostatek Fe limituje proliferaci červené řady v kostní dřeni, i když k ní mohou vést i nadměrné ztráty krve a železa (41). Nedostatek železa, např. při nedostatečném přívodu potravou, nádoru, peptickém vředu, hemoroidech, metrorhagii, graviditě nebo pubertě, je nejčastější příčinou anémií celosvětově (11). Prevalence tohoto typu

anémie je 2 % u dospělých mužů, 9-12 % u bílých žen nehispanšského původu, téměř 20 % u žen černé rasy a mexického původu (12).

Může mít za následek nižší pracovní výkonnost u dospělých a zpomalený mentální vývoj u dětí a adolescentů. U žen, které v adolescenci trpěly tímto typem anémie, se v dospělosti může projevit únavou (12). Únava, podrážděnost, závratě, palpitace, dušnost, bolesti hlavy patří k nespecifickým příznakům anémie. Ke specifickým příznakům patří kromě zpomalení růstu a vývoje také snížená svalová výkonnost, postižení epiteliálních tkání projevující se např. třepením a lámáním nehtů nebo pálením jazyka, poruchy imunity (41).

Nejnovější způsob diagnózy je na základě snížené produkce hepcidinu (11). U pacientů je také mezi prvními indikováno diagnostické vyšetření GIT, které může odhalit zatím asymptomatický nádor (13).

5.2 Anémie způsobené poruchou tvorby erytrocytů v důsledku nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové

V důsledku nedostatku vitamínu B12 (kobalamin) nebo kyseliny listové vzniká megaloblastová anémie. Tyto poruchy mají za následek omezení syntézy DNA a tím zpomalení buněčného cyklu během erythropoezy (10). Dochází tak k prodloužení metabolismu buněk a jejich setrvání v S-fázi mitózy. Tvoří se krátké Okazakiho fragmenty DNA, což se projeví poruchou zrání jádra. Tvorba RNA a bílkovin porušena není, proto cytoplazma vyzáváá běžnou rychlostí, vzniká tedy plazmojaderná asynchronie se zpožděním vyzáváání jádra za cytoplazmou. Megaloblastová přestavba se týká všech vývojových linií, proto v periferním krevním obrazu bývá i trombocytopenie a leukopenie s neutropenií (41).

Kromě zpomalení proliferace přispívá k anémii také předčasný zánik megaloblastů v kostní dřeni stejně jako zkrácená doba života megalocytů uvolněných do krve (předčasná hemolýza). Syntézu DNA a tím erythropoezu negativně ovlivňují následující poruchy příjmu nebo metabolismu folátu, např. příliš málo folátu v potravě, zvýšená potřeba (těhotenství), malabsorpce (např. při onemocnění tenkého střeva) nebo při inhibici syntézy aktivní formy folátu methotrexátem popř. dalšími léčivými (aminopterin, pyrimetamin), nedostatek kobalaminu, inhibice thymidilátsyntetázy cytostatiky (10).

Perniciozní anémie, která je podtypem megaloblastické anemie, je způsobena nedostatkem intrinsic faktoru (IF faktor, nutný pro vazbu a resorpci kobalaminu) např. na autoimunitním podkladě. Důsledkem je nedostatek kobalaminu v organismu. Běžná forma, která vzniká v dospělosti, je poměrně častým onemocněním s výskytem narůstajícím s věkem (41). Vzhledem k velké zásobě kobalaminu v játrech se manifestují příznaky jeho nedostatku teprve až po zhruba 5 letech blokování jeho přívodu (10).

5.3 Anémie způsobené zvýšenou ztrátou nebo destrukcí erytrocytů

Anémie tohoto typu vzniká, jestliže ani vystupňovaná aktivita kostní dřenež nestačí nahradit zvýšené ztráty erytrocytů a dochází tak k nerovnováze mezi zvýšenou tvorbou a zánikem erytrocytů. Příčina zkráceného přežívání erytrocytu může být přímo v samotné krvi (korpuskulární hemolytické stavy), nebo je způsoben vlivy okolního prostředí (extrakorpuskulární hemolytické stavy). V klinickém obrazu je dominujícím nálezem ikterus, dále bývá dle typu onemocnění různě vyjádřená splenomegalie, může odcházet k uvolnění hemoglobinu, který

odstraňuje NO, což je podkladem poruchy funkce hladkého svalstva (bolesti břicha, hypertenze u probíhající masivní hemolýzy) (41).

Příčiny hemolytických anémií z abnormalit erytrocytů jsou: odchylky struktury erytrocytů (např. hereditární sferocytóza, eliptocytóza), enzymatické defekty erytrocytů (defekty pyruvátkinázy, hexokinázy, glukozo-6-fosfátdehydrogenázy), poruchy syntézy hemoglobinu (viz další kapitola, např. talasemie, srpkovitá anémie). K získaným poruchám patří defekty erytrocytární membrány. Hemolytické anémie extrakorpuskulární vznikají např. z tvorby protilátek (např. po transfuzích, nebo tvorba autoprotilátek při lupus erytematodes), z mechanické traumatizace erytrocytů (např. při náhradách srdečních chlopní), anémie při infekcích (např. malárie), anémie z přímého chemického poškození (např. otrava olovem, mědí), nadměrná destrukce (hypersplenismus) (7).

Do skupiny anémií ze zvýšené ztráty erytrocytů lze zařadit (ačkoliv častěji je uváděna samostatně) akutní posthemoragickou anémii, která je způsobena nadměrnou rychlou ztrátou erytrocytů. Příčinou náhlé ztráty krve mohou být zevní poranění nebo velké operační zákroky. K diagnosticky závažným příčinám patří masivní krvácení do trávicího ústrojí či do tělních dutin (41).

5.4 Anémie způsobené poruchami syntézy hemoglobinu v důsledku genetických abnormalit

Hemoglobinopatie jsou vrozené poruchy struktury či syntézy vlastního hemoglobinu. Jsou nejrozšířenějšími monogenními dědičnými nemocemi na světě. Postihují asi 7 % světové populace (24).

Do této skupiny anémií patří již výše zmíněná srpkovitá anémie a talasemie. Další poruchy syntézy hemoglobinu jsou uvedeny v kapitole 3.3 Hemoglobin.

5.4.1 Srpkovitá anémie

V případě srpkovité anémie vzniká již výše zmíněný HbS. Příčinou je homozygotní genový defekt. HbS se ve své deoxygenované formě agreguje, a tím způsobuje srpkovitý tvar erytrocytů. Tyto srpkovité buňky nejsou deformovatelné a způsobují ucpávání malých cév. Nejvíce jsou postiženy kapiláry s dlouhou dobou pasáže (slezina, vasa recta ve dřeni ledvin). Zajímavostí je, že heterozygotní nositelé jsou chráněni proti nebezpečným formám malárie (10).

K léčbě srpkovité anémie se užívá hydroxykarbamid (hydroxymočovina), řadíme jej sice k cytostatikům, ale současně tato látka zvyšují syntézu HbF, což je její pravděpodobný mechanismus účinku. Lze ji podávat dlouhodobě perorálně s nízkým rizikem toxicity. Již tradičně jsou k léčbě užívány transfuze. Transfuze jsou spojeny s přetížením organismu železem, avšak železo se oproti talasemii ukládá nejvíce v játrech, pouze malá část v srdci, a tak případy úmrtí na poškození srdce železem jsou velmi málo časté. Zatímco u talasemie jsou časté endokrinní poruchy způsobené toxickým působením železa, u srpkovité anémie se tyto poruchy vyskytují zřídka. Stejně tak diabetes, hypogonadismus, hypothyroidismus a retardace růstu se u pacientů se srpkovitou anémií objevují zřídka. Endokrinními poruchami trpí 56 % pacientů s talasemií, zatímco v případě srpkovité anémie pouze 13 %. Důvod rozdílného ukládání železa u těchto dvou onemocnění zatím nebyl plně objasněn. Jedním z důvodů může být, že podávání transfuzí u srpkovité anémie je méně časté než u talasemie. Srpkovitá anémie je chronickým zánětlivým onemocněním s vyššími hladinami cytokinů. Tento zánětlivý stav může být ochranným faktorem, neboť při něm dochází k up-regulaci syntézy hepcidinu. Tím se snižuje absorpce železa z GIT

a zvyšuje se jeho zadržení v retikuloendoteliárních buňkách střev, což má za následek menší poškození tkání železem (15).

U srpkovité anémie je dále pozorováno zvýšené vylučování železa. Normální exkrece železa je 2 mg/kg/den, u srpkovité anémie dochází k vylučování až 11 mg/kg/den. Dále je patrná antioxidační ochrana tkání, neboť hladiny γ -tokoferolu jsou vyšší u srpkovité anémie než talasemie (15).

U pacientů, kterým jsou dlouhodobě podávány transfuze, je důležitá chelatační léčba. Další možností léčby je transplantace hemopoetické kmenové buňky a genová terapie (16).

5.4.2 Talasemie

Talasemie jsou skupinou vrozených hematologických onemocnění, způsobených poruchou syntézy jednoho nebo více hemoglobinových řetězců. α -talasemie je způsobená malou nebo chybějící syntézou α -globinových řetězců, β -talasemie malou nebo chybějící syntézou β -globinových řetězců. Nerovnováha v globinových řetězcích způsobí hemolýzu a poruchu erythropoezy (18). Katabolismem hemoglobinu tak dochází k přesycení organismu železem.

Vysoká frekvence onemocnění je v oblasti Středoziemního moře (z řečtiny thalassa – moře), na Středním Východě, v jihovýchodní Asii (41).

5.4.2.1 β -talasemie

β -talasemie jsou dědičné poruchy krvetvorby, charakterizované anomáliemi v syntéze β -řetězce, což má za následek vznik různých fenotypů, od těžkých anémií až po klinicky asymptomatické jedince. Incidence tohoto onemocnění je 1:10 000

v Evropské Unii (19). β -talasemie jsou způsobené bodovými mutacemi, nebo méně často, delecí v genu pro β globin na 11. chromozomu, vedoucí k redukované nebo chybějící syntéze β -řetězců Hb (19). Transmise je autozomálně recesivní, avšak dominantní mutace byly také zaznamenány (20). Omezení produkce β -řetězce vede k nedostatku HbA, což může být částečně kompenzováno tvorbou HbA2 a HbF. Ačkoliv je osmotická rezistence erytrocytů dokonce zvýšena, jsou mechanicky zranitelnější (rychlejší odbourávání ve slezině, častá hemolýza) (10).

Byly popsány tři hlavní formy: *thalassaemia major*, *thalassaemia intermedia* a *thalassaemia minor* (19). U pacientů, kteří jsou homozygoti β -talasemie, se může vyvinout buď *thalassaemia major* nebo *thalassaemia intermedia* (19).

Thalassaemia major se projevuje v prvních dvou letech života těžkou anémií, vyžadující pravidelné transfuze červených krvinek. Pacienti trpí závažnou hypochromií mikrocytární anémií. U neléčeného onemocnění (např. v rozvojových zemích) se objevuje růstová retardace, žloutenka, bledost, hepatosplenomegalie, vředy na dolních končetinách, vznikají typické změny na skeletu. Kvůli vystupňované erythropoeze totiž dochází k rozšiřování dřevňové dutiny a ztenčování kompaktní kosti (19, 41). Změny kostí zahrnují deformity dlouhých kostí v dolních končetinách a změny na lebce a obličejové části hlavy (zvětšení lebky, vystouplé lící kosti, zmenšení kořene nosu, tendence k mongoloidnímu tvaru očí, hypertrofie horní čelisti, tzv. facies thalassaemica) (19). Pacienti mívají doprovázející endokrinní poruchy jako hypogonadismus (35-55 % pacientů), hypothyreoidismus (9-11 %), hypoparathyreoidismus (4 %) a diabetes (6-10 %). Je nutné ale zmínit, že není jasné, do jaké míry se na těchto poruchách podílí transfuzní léčba. U 33 % pacientů se také setkáváme s fibrózou jater a srdečními poruchami, což jsou ale typické komplikace způsobené přetížením organismu železem při dlouhodobém podávání transfuzí (19).

Thalassaemia intermedia se může projevovat širokou škálou klinických příznaků. U některých pacientů se projevuje středně těžkou anémií a nevyžaduje pravidelné transfuze. Hlavními klinickými příznaky u těchto pacientů jsou hypertrofie kostní dřeně a mimodřeňová erythropoeza s jejími komplikacemi (osteoporóza; masy erythropoetické tkáně, které primárně napadají slezinu, játra, lymfatické uzliny, hrudník a páteř a způsobují kostní deformity a typické změny ve vzhledu obličeje), žlučové kameny, zvýšená predispozice ke vzniku trombózy, bolestivé bércové vředy. Mimodřeňová erythropoeza může způsobit paraplegii kompresí míchy. Na rozdíl od pacientů s *thalassaemia major* mají pacienti s *thalassaemia intermedia* zvýšenou predispozici k trombózám, jako je hluboká žilní trombóza, trombóza veny portae, mozková mrtvice a plicní embolizace. U některých jedinců s *thalassaemia intermedia* je zapotřebí splenektomie, suplementace kyselinou listovou, léčba mimodřeňového erythropoetického ložiska a vředů, prevence a terapie tromboembolických příhod. U závažných případů se onemocnění projevuje mezi 2 a 6 lety, a ačkoliv jsou pacienti schopní přežít bez pravidelných krevních transfuzí, růstově a vývojově jsou retardováni. Na druhé straně jsou i pacienti, kteří jsou asymptomatictí až do dospělosti, pouze s mírnou anémií (19).

Thalassaemia minor je klinicky asymptomatická, ale v některých případech se může objevit mírná anémie. Pokud oba rodiče trpí touto formou onemocnění, je 25% pravděpodobnost, že jejich dítě bude mít homozygotní formu talasemie (19).

Jak již bylo uvedeno výše, při přesycené organismu železem dochází postupně k saturaci transferinu a nevázané železo tak zapříčiňuje významnou toxicitu. Vznikají tak komplikace z přetížení organismu železem. Častou příčinou smrti pacientů nad 15 let věku je poškození jater. Poškození jater způsobené přetížením organismu železem může být potencováno virem hepatitidy C (24).

V rozvojových zemích je prevalence pacientů, kteří jsou léčeni transfuzemi a současně nakaženi virem hepatitidy C 20-64 %. Často se jedná o dětské pacienty. Chronická aktivní hepatitida může vést k cirhóze, fibróze a hepatocelulárnímu karcinomu, pokud není léčena (21). Srdeční onemocnění způsobené myokardiální siderózou patří k nejvíce život ohrožujícím komplikacím přetížení železem u β -talasemie. Srdeční komplikace jsou příčinou smrti u 71 % pacientů s *β -thalassaemia major* (19).

Léčba *thalassaemia major* zaznamenala v posledních desetiletích výrazné zlepšení a zahrnuje podání transfuzí v kombinaci s chelatační terapií. V současnosti je jedinou definitivní léčbou transplantace kostní dřeně (24). První transplantace kostní dřeně při léčbě talasemie byla uskutečněna v roce 1982. Přežití 33 pediatrických pacientů, u kterých byla v současné době provedena transplantace kostní dřeně, bylo 93 % a procento rejekce štěpu pokleslo z 30 % na 8 % (21).

Další možnosti léčby jsou předmětem výzkumu. Jedná se o indukci HbF farmakologickými sloučeninami a genovou terapii kmenovými buňkami (19). I když je genová terapie oblastí aktivně zkoumanou v klinických studiích, je zatím mnoho překážek, které znemožňují využití genové terapie v léčbě talasemie. První fáze klinického testování byla již provedena ve Francii, klinická data však ještě nejsou k dispozici (21).

5.4.2.2 α -talasemie

α -talasemie jsou následkem redukováného nebo chybějícího α -řetězce. Produkce α -globinového řetězce je řízena dvěma geny na 16. chromozomu. Vznik redukováného α -řetězce je většinou způsoben delecí jednoho nebo více těchto genů. Delece jednoho genu zapříčiňuje vznik asymptomatického nosiče, delece dvou genů

způsobují vznik onemocnění *α -thalassaemia minor*. Delecií tří genů vzniká HbH, který má čtyři β -řetězce. *α -thalassaemia intermedia* nebo hemoglobinopatie HbH způsobují vznik mikrocytární anémie, hemolýzu, splenomegalie. *α -thalassaemia major* s tzv. hemoglobinem Hb Barts vede k odumření plodu ve fetálním období (18). Vyšetření na HbH je většinou na základě komplikací jako je cholelithiáza, exacerbace anémie po prodělané infekci nebo splenomegalie. 29-50 % pacientům s HbH jsou intermitentně podávány transfuze (24). V České republice a na Slovensku se objevuje toto onemocnění velmi zřídka (35).

6 Léčba anémií

6.1 Železo

Perorální suplementace železem je nejvhodnější léčbou u většiny pacientů s anémií z nedostatku železa. Tato léčba je jednoduchá, bezpečná, účinná (14). Jedná se o farmakologicky i ekonomicky účinný způsob doplnění zásob železa v organismu (11). Doporučený denní příjem železa je v Tab. 1 (14). Čtyři běžné léky jsou uvedeny v Tab. 2 (11). V minulosti byl užíván zejména síran železnatý, vzhledem k jeho dobré absorpci v GIT a nízkým nežádoucím účinkům (pálení žáhy, bolesti břicha, nauzea průjem, zácpa). Pokud je železo podávané ve formě komplexu nebo v chelatované formě, jsou gastrointestinální potíže minimální (11). Gastrointestinální absorpce elementárního železa je zvýšena v kyselém prostředí žaludku. To může být dosaženo také současným příjmem kyseliny askorbové, která redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+} . Ačkoli se železo lépe absorbuje nalačno, není vždy možné pacienty nutit k aplikaci nalačno, protože se současně zvyšuje možnost podráždění žaludku. Potrava bohatá na taniny (např. čaj) nebo fytáty (např. otruby, cereálie) nebo léky, které zvyšují pH žaludku (antacida, blokátory protonové pumpy, H_2 antihistaminika) snižují absorpci železa. U pacientů, kteří mají potíže se vstřebáním železa kvůli špatné disoluci obalu, se doporučují kapalné lékové formy. Laxativa, léčiva změkčující stolici, a adekvátní příjem tekutin zmírňují zácpu, pokud se vyskytne při suplementaci železem (12).

Tab. 1: Doporučený denní příjem železa potravou (14)

Skupina		Doporučný příjem mg/kg
Děti	7-12 měsíců	11
Děti	1-3 roky	9
Děti	4-8 let	10
Děti	9-13 let	8
Chlapci	14-18 let	11
Dívky	14-18 let	15
Muži		8
Ženy	18-50 let	18
Ženy	nad 50 let	8
Těhotenství		27
Laktace	14-18 let	10
Laktace	nad 18 let	8

Nejllepšími zdroji železa jsou: maso (zejména játra), ryby, vejce dále cereálie, mouka, ořechy, luštěniny.

Tab. 2: Běžné perorálně podávané přípravky (11)

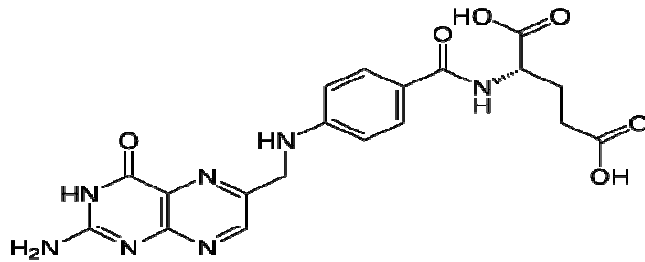
Sůl železa	Železo (%)	Obvyklá dávka (mg)
Síran železnatý	20	325 třikrát denně
Síran železnatý dehydrovaný	30	200 třikrát denně
Glukonát železnatý	12	325 třikrát denně
Fumarát železnatý	33	325 dvakrát denně

Parenterální podání železa je nezbytné u pacientů, kteří netolerují nebo neodpovídají na perorální suplementaci železem. U chronického ledvinného selhání je indikováno železo ve vazbě na sacharózu (Venofer®) (11). Glukonát sodno-železnatý (Ferrlecit®) je bezpečnějším léčivem podávaným parenterálně. Riziko anafylaxe je u něj sníženo na minimum. Je podáván intravenózně v osmi dávkách za týden ve 125miligramových dávkách, celková dávka je 1000 mg (12).

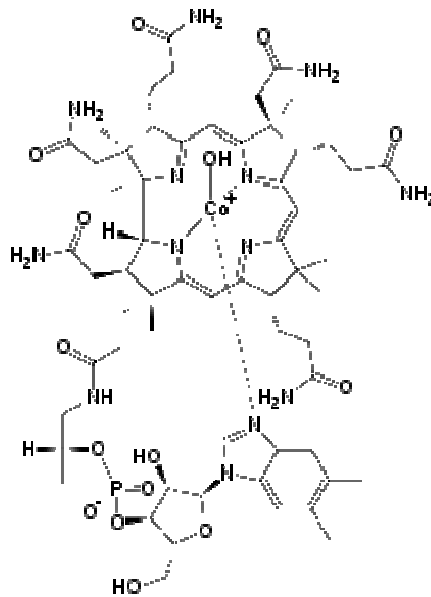
6.2 Kobalamin a kyselina listová

Kyselina listová (Obr. 1) je nezbytná při syntéze DNA, kdy se účastní přenosu jednonukleotidových zbytků při syntéze purinových bází a thyminu. Vyskytuje se hojně v syrové zelenině i ovoci, přesto je nedostatek kyseliny listové dost častý (příjem méně než 50 µg/den). Jejím zdrojem je zvláště listová zelenina, kvasnice, maso, vnitřnosti. Denní spotřeba kyseliny listové se zvyšuje při dělení buněk (růst, těhotenství, hojení rozsáhlých ran) (41). Denní spotřeba se uvádí pro děti 0,07 mg, děti nad osm let 0,15 mg, ženy 0,2 mg, muži 0,24 mg, těhotné ženy 0,4 mg (54).

Také kobalamin (vitamin B12) (Obr. 2) musí člověk přijímat potravou, jeho denní spotřeba je velmi malá (1.6 až 4 µg/den) (41). Nedostatek kobalaminu se léčí podáním 1000 µg/víkend po dobu jednoho měsíce a dále jednou za měsíc (v dávce 300 µg), a to intramuskulárně nebo subkutánně (17, 41). Substituční léčba je dlouhodobá, resp. doživotní (41). V případě nedostatku kyseliny listové jsou její hladiny na rozdíl od kobalaminu citlivé na příjem folátu potravou a dobře reagují na krátkodobou léčbu (17). Dávka kyseliny listové 5-10 mg denně je dostačující k úpravě hematologických změn, v profylaktickém podání v těhotenství se potřebná dávka pohybuje okolo 0,2-0,4 mg denně (41).



Obr. 1: Kyselina listová



Obr. 2: Kobalamin

6.3 Krevní transfuze

Opakované dlouhodobé krevní převody jsou v našich podmínkách nejčastěji nutné u dospělých pacientů se selháním krvevotvorby u nemocných s MDS, méně u nemocných s myelofibrózou, paroxysmální noční hemoglobinurií, chronickou aplastickou anémií. Vzácněji jsou pak krevní transfuze podávány u vrozených anémií, jako je např. sideroblastická anémie, vrozené aplastické anémie, talasemie, srpkovitá anémie a jiné poruchy hemoglobinu, nebo korpuskulární hemolytická anémie. Každá transfuzní jednotka představuje přísun asi 200-250 mg Fe, což při

denním vylučování 1-2 mg Fe a nutnosti opakovaných převodů krve vede nevyhnutelně k hromadění Fe v organismu (40).

Poslední tři desetiletí se odehrály velké změny v terapii *thalassaemia major*. Pravidelné transfuze eliminují komplikace anémie a kompenzační zvětšení kostní dřeně, umožňují normální vývoj dětí a prodlužují délku života (24). Cílem transfuzní terapie je tedy léčba anémie, potlačení erythropoezy a inhibice gastrointestinální absorpce železa, která se objevuje u pacientů neléčených transfuzemi, jako důsledek zvýšené ale neefektivní erythropoezy. Rozhodnutí o zahájení transfuzí u pacienta s potvrzenou diagnózou talasemie by mělo být založeno na přítomnosti těžké anémie (Hb méně 7g/dl po dobu více než dvou týdnů, kromě starších jedinců, kdy pacient trpí např. infekcí). U pacientů, kteří mají více než 7g/dl musí být zváženy i jiné faktory (typické změny v obličeji, malý vzrůst, zvětšení objem kostní dřeně, splenomegalie). Začít s pravidelnou léčbou transfuzemi by se mělo nejpozději do dvou až tří let věku, z důvodu možného vzniku protilátek k červeným krvinkám a k obtížnému nalezení vhodného dárce krve. Frekvence transfuzí je obvykle každé dva nebo tři týdny. Kratší intervaly by možná lépe vyhovovaly fyziologickým nárokům krve, ale snižovaly by kvalitu života (19).

Při správné léčbě *thalassaemia major* se děti dožijí dospělého věku (24). Avšak, terapie pomocí transfuzí má za následek hromadění železa v organismu, které musí být odstraňováno. S vývojem chelátorů železa se za posledních 20 let změnila i prognóza u pacientů s *thalassaemia major*. Použití chelátorů železa snižuje nežádoucí účinky z přetížení organismu železem, výrazně zlepšuje kvalitu života nemocných a prodlužuje délku života (24). Přežití jedinců, kteří pravidelně dostávali transfuze, a byli léčeni vhodnou chelatační léčbou se zvýšilo až nad 40 let věku (19). Pokud se transfuze podají včas a pravidelně, nedojde ke zvětšení sleziny, a nemusí

tak být provedena splenektomie (24). Pokud je zahájen pravidelný transfuzní program, který udržuje Hb v koncentraci od 9,5 do 10,5 g/dl, růst a vývoj se zdá být normální do 10 až 12 let věku (19).

Transfuze červených krvinek jsou již tradiční léčbou srpkovité anémie, respektive v léčbě akutních i chronických komplikací srpkovité anémie. Transfuze upravují anémii, snižují procento HbS, potlačují syntézu HbS a snižují hemolýzu (16). Klinická praxe prokázala účinnost tohoto přístupu, snížila se tak incidence akutních srdečních příhod, bolestivých stavů, mrtvice a nutnosti hospitalizace. Cílem léčby je snížit HbS pod 30 % z celkového hemoglobinu. Zatímco v léčbě *thalassaemia major* jsou transfuze nezbytně nutné, v léčbě srpkovité anémie byly dříve jen pro pacienty, kteří prodělali mrtvici. V současné době, kdy je lépe pochopen význam transfuzní terapie v prevenci morbiditu, se často podávají transfuze dlouhodobě pacientům až do dospělosti (15).

Transfuze červených krvinek je u anémií z nedostatku železa nevhodná, pokud není nezbytný zvýšený přívod kyslíku (např. angina pectoris, srdeční selhání) nebo je onemocnění komplikováno závažným krvácením (14).

6.4 Další léčebné prostředky

Další možností léčby je podání erythropoetinu. Erythropoetin (EPO) je glykoprotein o molekulární hmotnosti 30 400 D, produkováný z velké části ledvinami, jenž prostřednictvím vazby se specifickým receptorem na povrchu cílových buněk ovlivňuje produkci erytrocytů, zejména cestou stimulace proliferace a inhibice apoptózy pozdních prekurzorů erythropoezy (tzv. CFU-E buněk). Je indikován např. u pacientů s myelodysplastickým syndromem, kdy podporuje jak diferenciaci prekurzorů náležejících k patologickému klonu směrem ke zralým erytrocytům, tak

proliferaci reziduální populace normálních prekurzorů červené řady. U časných forem MDS se dále předpokládá tlumivý efekt EPO na zvýšený stupeň apoptózy progenitorových buněk. Rekombinantní lidský erythropoetin (rHuEPO) je používán ke korekci anémie u nemocných s MDS od počátku 90. let minulého století. Příznivý efekt podávání rHuEPO byl prokázán pouze u 15-20 % nemocných s méně pokročilými formami MDS. Řada studií se proto pokouší vzhledem k nákladnosti léčby přesněji charakterizovat nemocné, u nichž lze předpokládat efektivní léčbu rHuEPO, ať už v monoterapii nebo v kombinaci s jinými růstovými faktory (38).

Jeho hlavní nevýhodou je nutnost častých aplikací, vzácně se objevuje i velmi vzácná komplikace - čistá aplázie červené krevní řady (45). U pacientů léčených látkami stimulující erythropoezu by měl být pečlivě měřen krevní tlak; také kolísání hodnot Hb a čas nezbytný k dosažení cílových hladin Hb jsou rizikovými faktory zvyšujícími náklady na léčbu, morbiditu a mortalitu (46). Druhou generaci erythropoezu stimulujících látek představuje darbepoetin s pozměněnou chemickou strukturou i výhodnější farmakokinetikou. Nyní se do klinické praxe zavádí představitel třetí generace kontinuální aktivátor erythropoetinu CERA (z angl. Continuous Erythropoetin Receptor Activator) s delším biologickým poločasem. Ve čtvrté generaci se již objevují léky aplikovatelné perorálně, které začínají novou éru v léčbě anémie (45, 46).

Mezi další alternativy léčby patří imunosupresivní terapie u onemocnění, kde se předpokládá spoluúčast imunitních mechanismů, což je např. u autoimunitní hemolytické anémie, aplastické anémie, perniciozní anémie nebo MDS. Další možností léčby je transplantace kostní dřeně či genová terapie např. u aplastické anémie a u některých vrozených poruch erythropoezy, zejména *thalassaemia major* (47).

6.5 Chelátory železa

Při dlouhodobém podávání transfuzí se u pacientů s talasemií nebo srpkovitou anemií do organismu dostává velké množství železa, které je poté spojeno s výše popsanými komplikacemi.

V současné době se mění náhled na indikaci a cíle chelatační léčby. Namísto odstraňování již přítomného nadbytečného železa je kladen důraz na včasné zahájení chelatace a prevenci hromadění železa ve tkáních a minimalizaci účinku potenciálně toxického volného železa. U anemických onemocnění se známkami přetížení železem je základem léčby podávání chelátorů. Chelatační terapie je tedy indikována při podávání transfuzí i k léčbě anemického onemocnění jako takového (např. talasemie). Velký důraz je u těchto onemocnění kladen na prevenci rozvoje závažného stupně rozvoje přetížení železem (25).

Chelatační terapie může být monitorována několika metodami. Bylo zjištěno, že nejvíce odpovídá skutečným zásobám v organismu koncentrace sérového feritinu, i když hladiny železa jsou ovlivněny patologickými stavy (zánět, infekce, onemocnění jater nebo zhoubné bujení). Avšak opakované měření sérového feritinu zůstává nejjednodušší a nejspolehlivější metodou měření přetížení železem a účinnosti chelatační terapie (19).

K léčbě srpkovité anémie a talasemie jsou užívány zejména tyto tři chelátory: deferoxamin (DFO), deferipron (L1) a deferasirox (ICL670).

6.5.1 Deferoxamin (DFO)

Tento parenterálně podávaný chelátor železa, známý již od 60. let 20. století, byl prvním použitým chelátorem přetížení železem (24). Měl velký dopad na

prognózu nemocných. Obvyklá dávka je 20-40 mg/kg u dětí a 30-50 mg/kg u dospělých (19). Jeho nevýhodou je subkutánní podání, a tedy i nižší compliance. Je však považována za léčbu bezpečnou a účinnou (24).

Dvě současné studie prováděné po dobu 10 let prokázaly, že dlouhodobá efektivní léčba deferoxaminem (Desferal®) souvisí s délkou života u pacientů s thalassaemia major (24). Prokázaný je pozitivní vliv chelatační terapie na srdce, játra a také na endokrinní funkce (22). V různých studiích se vliv léčby deferoxaminem liší, nedostatečná účinnost deferoxaminu v prevenci nesprávného vývoje v pubertě se přisuzuje nedostatečně dlouhé době léčby nebo intenzitě léčby. Je také prokázáno, že léčba deferoxaminem dokonce dokáže zvrátit poškození jater a ledvin (24).

Toxicita deferoxaminu se zvětšuje se zmenšující se sérovou koncentrací feritinu. Nežádoucí účinky léčby deferoxaminem zahrnují oční a ušní poškození, neurotoxicitu, plicní poškození, změny v renálních funkcích. Tyto nežádoucí účinky způsobené deferoxaminem mohou být eliminovány při pravidelném a přímém stanovení hladin železa v organismu a měřením koncentrace železa v játrech (24).

Možností je také kombinovaná léčba deferoxaminem a deferipronem, k dosažení takové exkrece železa, které bychom nedosáhli užitím jednoho chelátoru, přičemž nedojde ke zvýšení toxicity (19).

6.5.2 Deferasirox (ICL670)

Deferasirox (Exjade®) byl prvním perorálně podávaným registrovaným chelátorem k léčbě srpkovité anémie (15,16). Je podáván ve formě tablet jednou denně. Klinické studie prokazují, že je účinný u dospělých i u dětí. Doporučenou počáteční dávkou je 20 mg/kg/den, může být upraveno na 10-30 mg/kg/den.

Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou mírné a přechodné gastrointestinální potíže a kožní vyrážka (19).

U nemocných s MDS a těžkým stupněm přetížení železem vedlo ve studiích dlouhodobé podávání deferasiroxu k signifikantnímu poklesu hladiny feritinu v séru, k redukci orgánových zásob železa a k normalizaci hodnot labilního plazmatického železa. Včasná a řádná chelatační léčba může u těchto pacientů ovlivnit i délku přežití a možná i incidenci transformace do leukémie (24).

6.5.3 Deferipron (L1)

Stále většího významu nabývá perorálně podávaný deferipron (L1, Ferriprox®) (15). Deferipron je podáván třikrát denně (16). Byl vyvinut na základě rozsáhlého zkoumání látek, využitelných pro chelatační léčbu (24). Obvyklá dávka deferipronu je 75 mg/kg/den ve třech denních dávkách, maximální dávek je 100 mg/kg/den (23).

Nejzávažnějším nežádoucím účinkem je agranulocytóza objevující se u 1 % pacientů. Méně závažnými, ale častějšími nežádoucími účinky jsou gastrointestinální potíže, bolest kloubů, nedostatek zinku a kolísání jaterních enzymů (19).

6.6 Možnosti klinického využití chelátorů v budoucnu

Chelatační léčba byla původně vyvíjena pro terapii onemocnění z přetížení železem (26). V současné době je pozornost věnována uplatnění chelátorů železa v terapii nádorů, neurodegenerativních onemocnění, zánětů a onemocnění, kde oxidační stres hraje důležitou roli, např. akutní infarkt myokardu (27). V ischemizované srdeční tkáni může dojít ke vzniku maligních fibrilací. Velkou roli

hraje při tomto patologickém stavu pH. S nízkým pH se setkáváme dále např. u zánětu (pH pod 5.4) nebo u zhoubného bujení (pH pod 5.7) (39).

Chelatační terapie tedy bude pravděpodobně hrát velkou roli v terapii onemocnění, která nejsou charakterizovaná přetížením organismu železem, a to jako léčba pomocná, alternativní nebo léčba volby (53).

6.6.1 Využití chelátorů v chemoterapii nádorů

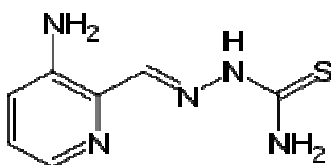
Zatímco komplexy ligand-železo, které jsou redoxně neaktivní, se užívají k chelatační léčbě při přetížení železem, redoxně aktivní komplexy jsou vhodné jako antiproliferativní činidla při chemoterapii rakoviny. Tyto redoxně aktivní komplexy chelátor-železo jsou totiž schopny tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS z angl. Reactive Oxygen Species). Na druhé straně, chelátory železa také vyčerpávají železo z nekontrolovaně se dělících rakovinných buněk a dále mohou inhibovat RNA-reduktázu (RR), což je železo-obsahující enzym uplatňující se při syntéze většiny deoxynukleotidů. Navíc, nedostatek železa způsobí narušení syntézy molekul, uplatňujících se při buněčném cyklu, čímž je ovlivněn růst a vývoj buněk. Tyto účinky ve svém důsledku vedou k inhibici proliferace rakovinných buněk (26).

Chelátory ze skupiny thiosemikarbazonu byly zkoumány po 30 let jako inhibitory RNA-reduktázy. V nedávné době 3-aminopyridin-2-carboxaldehyd thiosemikarbazon (3-AP, Triapine®) (Obr. 3) ukázal velké antiproliferativní schopnosti v klinických studiích in vivo i in vitro. Další nadějnou látkou se ukázal být analog PIH (pyridoxal isonicotinoyl hydrazon), kterým je 2-hydroxy-1-naftylaldehyd isonikotinoyl hydrazon. Jeho velká chelatační účinnost souvisí se schopností inhibovat RNA-reduktázu.

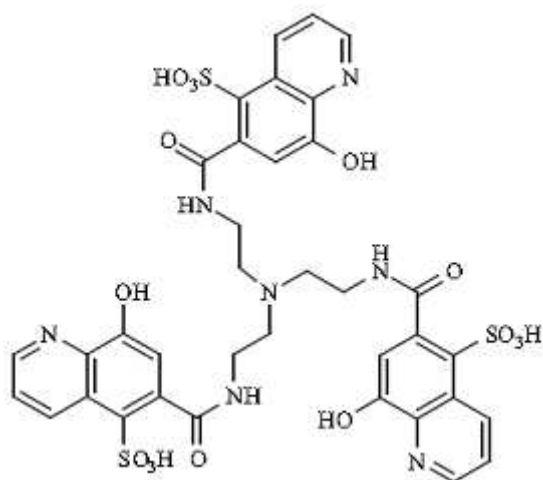
Tachipyridin (N-acetyl.p-amonofenol) je také nadějnou látkou. Obsahuje šest dusíkových donorů a chelatuje železo v poměru 1:1 s vyšší afinitou pro Fe^{2+} . Je toxický pro nádorové buňky z tkání různého původu (prsa, močový měchýř, plíce) s IC_{50} v řádech mikromolů (28).

Ze skupiny 8-hydroxychinolinů, 8-OH-Q tvoří neutrální komplexy, které dobře procházejí epitely. Způsobují oxidativní poškození tkání a zlomy v řetězci DNA. Byly popsány cytotoxické a DNA inhibiční účinky těchto komplexů na lidské leukemické buňky a hepatocyty krys. Byly také pozorovány antiproliferativní účinky a změny ve fenotypu buněk melanomu (49). Další antiproliferativní látkou z této skupiny je o-Trensox (Obr. 4), který by mohl být použit v prevenci hepatocelulárního karcinomu (28).

Zatímco chelátory užívané při přetížení železem musí splňovat podmínky nízké ceny, dostupnosti po perorálním podání, netoxičnosti při chronickém podávání, na chelátory užívané jako chemoterapeutika jsou kladeny jiné požadavky: 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 (27).



Obr. 3: 3-aminopyridin-2-karboxaldehyd thiosemikarbazon



Obr.: 4 o-trenox

6.6.2 Využití chelátorů v terapii spojených se zvýšeným oxidačním stresem

ROS mohou poškodit celou řadu nezbytných fyziologických dějů oxidací thiolových skupin a nitrací tyrosinu. Snížené hladiny redukovaného glutathionu byly zjištěny u pacientů s Parkinsonovou chorobou. Redukovaný glutathion je jedním z hlavních antioxidačních mechanismů v buňce a také regulátorem redoxních reakcí. Jeho nedostatek je znakem oxidačního stresu neuronů. V současné době je uznávána teorie, kdy oxidační stres způsobuje poškození dopaminergních neuronů, což v důsledku způsobí progresi Parkinsonovy choroby (30).

Je mnoho důkazů o tom, že homeostáza kovů a neurodegenerativní onemocnění jako Parkinsonova choroba a Alzheimerova demence spolu souvisí. Chelátory, které pronikají hematoencefalickou bariérou, jsou potenciálními léčivy v terapii těchto chorob (30).

Schopnost pronikat přes hematoencefalickou bariéru je u léčby neurodegenerativních onemocnění velmi důležitá. Velikost chelátorů tak pravděpodobně musí být menší než 300 Da (kromě šestivazných ligandů). Chelátor

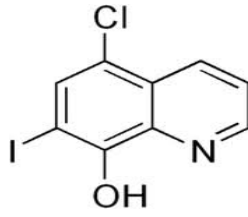
vhodný pro léčbu Alzheimerovy demence by měl mít velikost molekuly 200-400 Da, měl by pevněji vázat Fe^{3+} než Fe^{2+} , neměl by „redoxně cyklovat“ a ovlivňovat funkci metaloenzymů (29).

Studie in vitro a v některých případech také in vivo, že tyto chelátory mohou zřetelně snížit úmrtí neuronů v důsledku oxidačního stresu. Ve studii, která používala krysí model Parkinsonovy choroby a 6-hydroxydopamin, bylo zjištěno, že deferoxamin dokáže uchránit až 60 % dopaminergních neuronů od úmrtí. V jiné studii (Youdin et al.) bylo zjištěno, že neuroprotektivní účinek byl závislý na dávce deferoxaminu. Avšak hydrofilní charakter deferoxaminu neumožňuje překročení hematoencefalické bariéry, pokud byl podán perorálně (30).

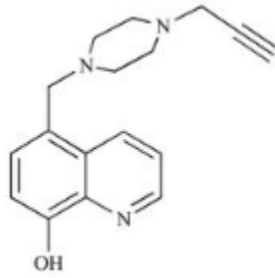
Kliochinol (5-Cl-7-I-8-OHQ) (Obr. 5) je malý lipofilní chelátor železa. Ve všech studiích in vivo (Andersen et al.) se ukázalo, že dokáže snížit koncentraci železa v substantia nigra myši o 30 %. Jako mnoho chelátorů, cliochinol není selektivní, což může mít za následek nežádoucí účinky. Byl u něj prokázán úbytek S-adenosylmethioninu, což je marker nedostatku B12. Na rozdíl od deferoxaminu prostupuje kliochinol hematoencefalickou bariérou (30).

Vzhledem k neurotoxicitě halogenovaných hydroxychinolinů byla vyvinuta nová generace hydroxychinolinů, jako např. HLA 20 (Obr. 6). Jedná se o nechlorovaný analog 8-hydroxychinolinů. Ukázalo se, že HLA 20 by mohl být silným chelátorem Fe^{3+} a scavengerem radikálů. Navíc bylo zjištěno, že je slabým inhibítozem enzymu MAO B (30).

Největší potenciál pro léčbu neurodegenerativních onemocnění mají dvouvazné chelátory jako jsou hydroxychinoliny a hydroxypyridiony. Chelatační terapie by měla být uznána za cennou strategii v léčbě neurodegenerativních poruch (29).



Obr.5: 5-Cl-7-I-8-OHQ (kliočinol)



Obr. 6: HLA 20

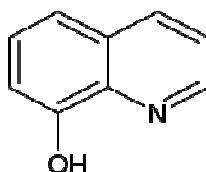
Experimentální část

7 Materiál a metoda

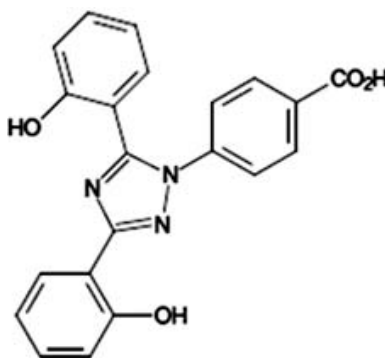
7.1 Chemikálie

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), acetát sodný, kyselina octová, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), sodná sůl HEPES, deferipron, 5-chlor-7-jod-8-hydroxychinolin (kliočinol, 5-Cl-7-I-8-OHQ), chloroxin, 8-hydroxychinolin (8-OHQ, Obr. 7) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Německo).

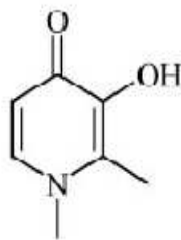
Deferasirox (Obr. 8) byl izolován na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové z tablet Exjade® (Novartis, Švýcarsko). Deferipron (Obr. 9) byl získán darem od firmy Apotex (Kanada).



Obr. 7: Strukturální vzorec 8-OHQ



Obr. 8: Strukturální vzorec deferasiroxu



Obr. 9: Strukturální vzorec deferipronu

7.2 Příklad

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

7.3 Ferrozinová metoda

Pro stanovení koncentrace železa byla použita ferrozinová metoda. Ferrozin je specifickým činidlem, který tvoří se železnatými ionty fialově zbarvený komplex s absorpčním maximem při 562 nm. Se železnatými ionty dává mnohem intenzivněji zbarvené ionty než s jinými ionty (např. měďnatými, kobaltnatými). Tyto komplexy jsou velmi rozpustné ve vodě a mohou být použity pro kvantitativní stanovení železa ve vodě/hydrofilním prostředí.

Ferrozin nechelatuje pouze volné železo, ale může ho vyvázat z již vzniklého, méně stabilního chelátu. Proto bylo provedeno měření ihned po přidání ferrozinu a po 5 minutách (44).

7.4 Postup

7.4.1 Příprava zásobních roztoků

Před vlastním měřením byly připraveny zásobní roztoky: ferrozín 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+} / $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 5 mM v destilované vodě ($M_w = 278,02$ g/mol) /, HA 10 mM v destilované vodě ($M_w = 69,49$ g/mol).

Pufry byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího poměru kyseliny octové a její sodné soli (pH 4.5 a 5.5) a HEPES a její sodné soli (pH 6.8 a 7.5). Použitá koncentrace solí byla 15 mM.

7.4.2 Příprava testovaných roztoků

Ze zásobního roztoku železnatých iontů byl připraven testovací roztok železa o koncentraci 250 μM . Roztoky testovaných chelátorů se naředily obvykle nejdříve na koncentrace 10-1-0,1-0,01mM v DMSO. Následovalo vlastní měření chelatace v 96-ti jamkových mikrodětičkách.

7.4.3 Měření chelatace železnatých iontů v závislosti na pH (Tab. 3)

7.4.3.1 Postup pro pH 4.5, 5.5, a 6.8

Do všech jamek se napipetovalo 150 μl příslušného pufru. Do testovacích jamek se přidalo 50 μl roztoku chelátoru (různé koncentrace) nebo stejné množství

rozpuštědla do kontrolních jamek. Poté se do každé jamky se napipetovalo 50 μ l roztoku železa (250 μ M). Směs se míchala 2 min. Přidalo se 50 μ l roztoku ferrozinu (5mM) do testovacích jamek a 50 μ l vody do slepých vzorků (blank). Byla okamžitě změřena absorbance při 562 nm. Po 5 minutách se měření absorbance opakovalo.

7.4.3.2 Postup pro pH 7.5

Do všech jamek se napipetovala 150 μ l příslušného pufru. Do testovacích jamek se přidalo 50 μ l roztoku chelátoru (různé koncentrace) nebo stejné množství rozpouštědla do kontrolních jamek. Do všech jamek se přidal 10mM roztok HA v objemu 50 μ l. Při tomto pH oxidace železnatých iontů vzrůstá s časem a proto byl přidán hydroxylamin jako redukční činidlo. Do každé jamky se napipetovalo 50 μ l roztoku železa. Směs se míchala 2 min. Poté se přidalo 50 μ l roztoku ferrozinu do testovacích jamek a 50 μ l vody do slepých vzorků (blank). Absorbance byla změřena okamžitě a po 5 minutách.

Tab. 3: Postup pro měření chelatace železnatých iontů v závislosti na pH

	roztok chelátoru c = 10 mM	roztok chelátoru c = 1 mM	roztok chelátoru c = 0,1 mM	kontrola c = 0 mM		obsah jamek pro pH 4.5, 5.5, 6.8	
ferrozin					150 μ l	pufru	
					50 μ l	roztoku chelátoru	
voda					50 μ l	Fe ²⁺ 0,25mM	
					50 μ l	ferrozinu 5 mM/vody	
					+		
				pH 7.5	50 μ l	hydroxylaminu 10 mM	

7.4.4 Měření chelatace celkového železa v závislosti na pH (Tab. 4)

7.4.4.1 Postup pro pH 4.5

Do všech jamek se napipetovalo 150 μl příslušného pufru. Dále bylo přidáno 50 μl roztoku chelátoru (různé koncentrace) do testovacích jamek nebo stejné množství rozpouštědla do kontrolních jamek. Čerstvě připravený roztok železitých iontů (250 μM , 50 μl) 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). Byla okamžitě změřena absorbance při 562 nm. Po 5 minutách se měření absorbance opakovalo.

Tab. 4: Postup pro měření celkového železa v závislosti na pH

	roztok chelátoru c = 10 mM	roztok chelátoru c = 1 mM	roztok chelátoru c = 0,1 mM	kontrola c = 0		
ferrozin						pH 4.5
					150 μl	pufru
voda					50 μl	roztoku chelátoru
					50 μl	Fe^{3+} 0,25mM(Fe^{2+})
					50 μl	hydroxylaminu 10 mM
					50 μl	ferrozinu 5 mM/vody

7.5 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 (44).

Nejdříve byl stanoven koncentrační poměr (p , viz rovnice 1) molární koncentrace chelátoru k molární koncentraci železa (Tab. 5).

$$(1) \quad p = c(\text{chelátoru}) / c(\text{Fe})$$

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 2 a 3):

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

$$(3) \quad \Delta A_2 = A_2 - \frac{1}{2}(A'_1 + A'_2)$$

Stejným způsobem se vypočítal rozdíl absorbancí známé koncentrace železnatých iontů bez testované látky (kontrola, ΔK_1 a ΔK_2 , rovnice 4 a 5).

$$(4) \quad \Delta K_1 = K_1 - \frac{1}{2}(K'_1 + K'_2)$$

$$(5) \quad \Delta K_2 = K_2 - \frac{1}{2}(K'_1 + K'_2)$$

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 6 a 7) se vypočetlo ve vztahu k této známé koncentraci železnatých iontů, ke kterým nebyl přidán chelátor (tj. 100 % železa ve vzorku = 0 % chelatovaného železa).

$$(6) \quad X_1\% = 1 - \frac{\Delta A_1}{\frac{1}{2}(\Delta K_1 + \Delta K_2)}$$

$$(7) \quad X_2\% = 1 - \frac{\Delta A_2}{\frac{1}{2}(\Delta K_1 + \Delta K_2)}$$

Procenta nechelatovaného železa se poté zprůměrovala (rovnice 8).

$$(8) \quad X\% = \frac{1}{2}(X_1\% + X_2\%)$$

Stabilita komplexu chelátor-železo (Y%) se vyjádřila jako procento změny 5 minut vs. 0 minut (rovnice 9).

$$(9) \quad Y\% = \frac{X\% \text{ 5 min}}{X\% \text{ 0 min}}$$

Tab. 5: Výpočet chelatace železa (44)

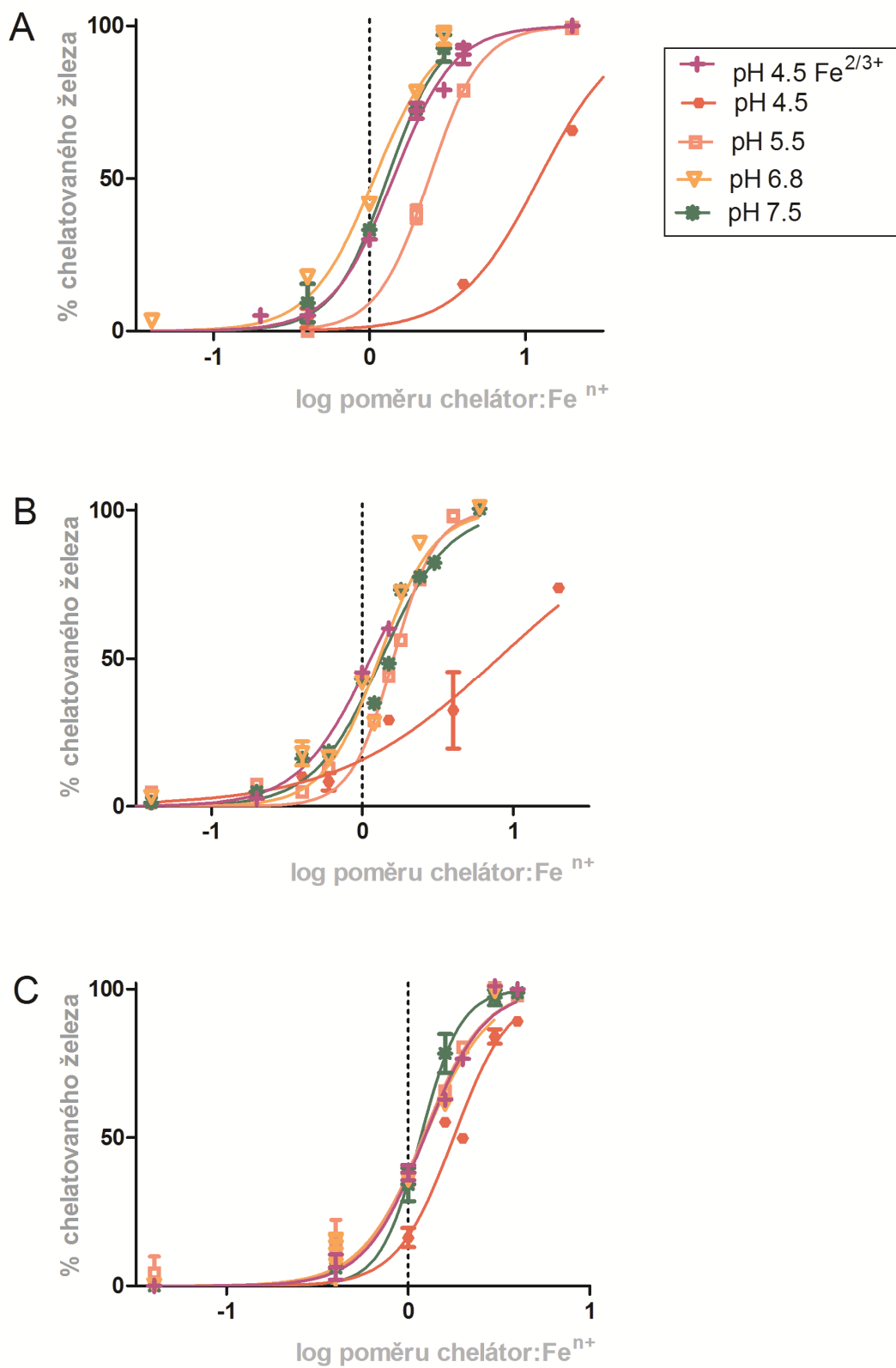
Nepipetovaná koncentrace roztoku chelátoru (mM)					0 (kontrola)
Koncentrační poměr chelátor/železo (p)					
log(p)					
Absorbance (vzorky s ferrozinem)	A_1	A_1	A_1	A_1	K_1
	A_2	A_2	A_2	A_2	K_2
Absorbance (vzorky bez ferrozinu)	A'_1	A'_1	A'_1	A'_1	K'_1
	A'_2	A'_2	A'_2	A'_2	K'_2
ΔA	ΔA_1	ΔA_1	ΔA_1	ΔA_1	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	$Y_1\%$	$Y_1\%$	$Y_1\%$	$Y_1\%$	
	$Y_2\%$	$Y_2\%$	$Y_2\%$	$Y_2\%$	

7.6 Statistická analýza

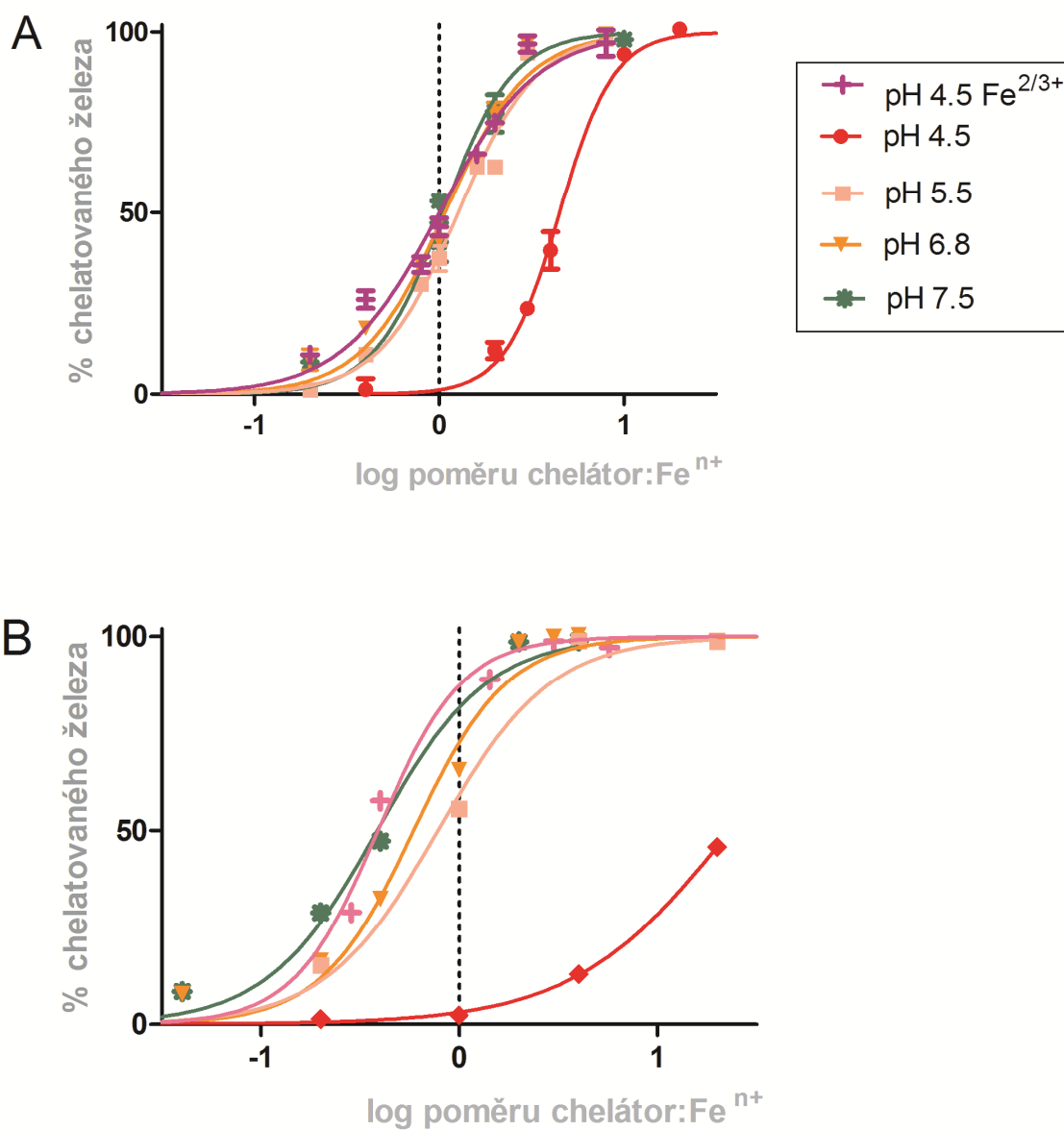
Statisticky významné rozdíly byly stanoveny porovnáním 95% konfidenčních intervalů při $x = \log 1 = 0$ a $x = \log 10 = 1$ za pomoci softwaru GraphPad Prism verze 4.00 pro Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA). K výpočtům byl použit Microsoft Office Excel 2007.

8 Výsledky

Byly stanoveny chelatační křivky testovaných chelátorů v závislosti na pH podle výše popsaných postupů. Obr. 10 shrnuje chelataci železnatých ionů chelátory ze skupiny 8-hydroxychinolinů a Obr. 11 chelataci registrovanými chelátory.



Obr. 10: Chelatace iontů železa chelátorů ze skupiny 8-hydroxychinolinu. A: 8-OH-Q, B: 5-Cl-7-I-8-OH-Q, C: chloroxin.



Obr. 11: Chelatace iontů železa registrovaných chelátorů. A: Deferipron, B: Deferasirox

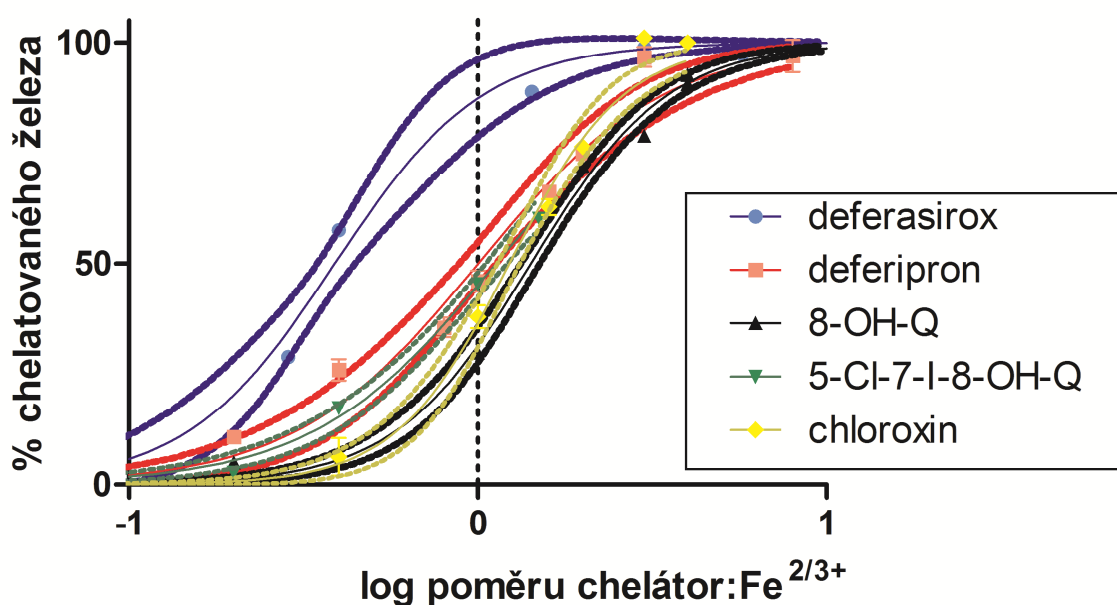
Obecně u testovaných chelátorů účinnost chelatace železnatých iontů klesala se snižujícím se pH. Některé chelátory - kliočinol, chloroxin, deferipron- ale stejně účinně chelatovaly železnaté ionty při pH 5.5 – 7.5 i když jejich chelatační potenciál byl jednoznačně nižší při pH 4.5. U základní látky 8-hydroxychinolinů, 8-OH-Q, byly pozorovány nejvýraznější rozdíly v chelataci železnatých iontů. Oproti neutrálnímu a slabě kyselému chelatace poklesla při pH 5.5 a další pokles, tentokrát zhruba o jeden řád byl pozorován při pH 4.5. U všech testovaných chelátorů byly křivky chelatace železnatých iontů při pH 7.5 a celkového železa při pH 4.5 prakticky identické ukazující na vysokou afinitu těchto chelátorů k železitým iontům.

V rámci statistické analýzy byly porovnány chelatační účinky daných chelátorů pomocí konfidenčních intervalů. Nejúčinnějším chelátorem celkového železa (tj. železitých i železnatých iontů) při pH 4.5 by deferasirox (Obr. 12). Rozdíly v účinku mezi ostatními chelátory byly prakticky nevýznamné. Naopak, při porovnání chelatace pouze železnatých iontů při stejném pH, byla situace zcela odlišná (Obr. 13). Při poměru 1:1 byly účinnými chelátory pouze chloroxin a 5-Cl-7-I-8-OH-Q. Chloroxin byl při tomto pH jednoznačně nejúčinnější chelátor. Při poměru 10:1 ($x = \log 10 = 1$) vykazovaly všechny chelátory určitý potenciál chelatovat železnaté ionty, byly zde ale přítomny významné rozdíly v chelatační účinnosti, přičemž nejúčinnějším chelátorem při tomto pH byl po chloroxinu deferipron. Kliočinol a 8-OH-Q byly srovnatelně účinné, nejméně účinným chelátorem byl paradoxně deferasirox.

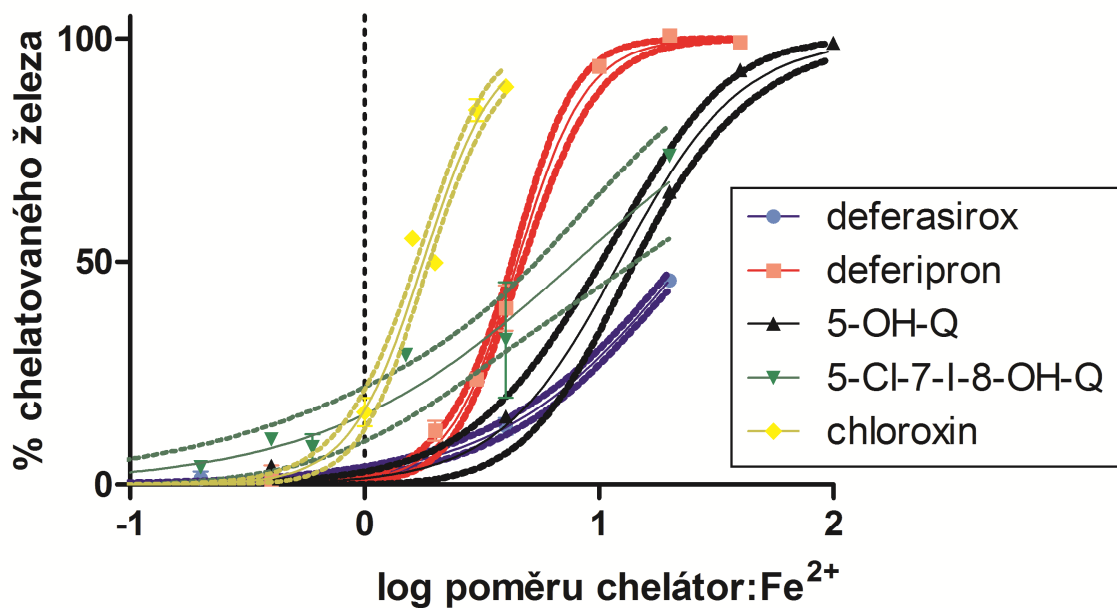
Při vyšších pH (5.5-7.5) byl opět nejúčinnějším chelátorem deferasirox. Při pH 6.8 (Obr. 14) a 7.5 (Obr. 15) nebyly signifikantní rozdíly mezi ostatními testovanými chelátory. Při pH 5.5 (Obr. 16) byl jednoznačně nejslabším chelátorem 8-OH-Q, deferipron a kliočinol byly vzájemně podobné v účinnosti.

Rozdíly mezi 8-hydroxychinoliny jsou v chelataci železnatých iontů při pH 4.5 a 5.5. Při pH 4.5 neúčinněji chelatoval chloroxin. Při pH 5.5 byl 8-OH-Q nejslabším chelátorem. Naopak při pH 6.8 a 7.5 chelatovaly látky ze skupiny 8-hydroxychinolinů se srovnatelnou účinností.

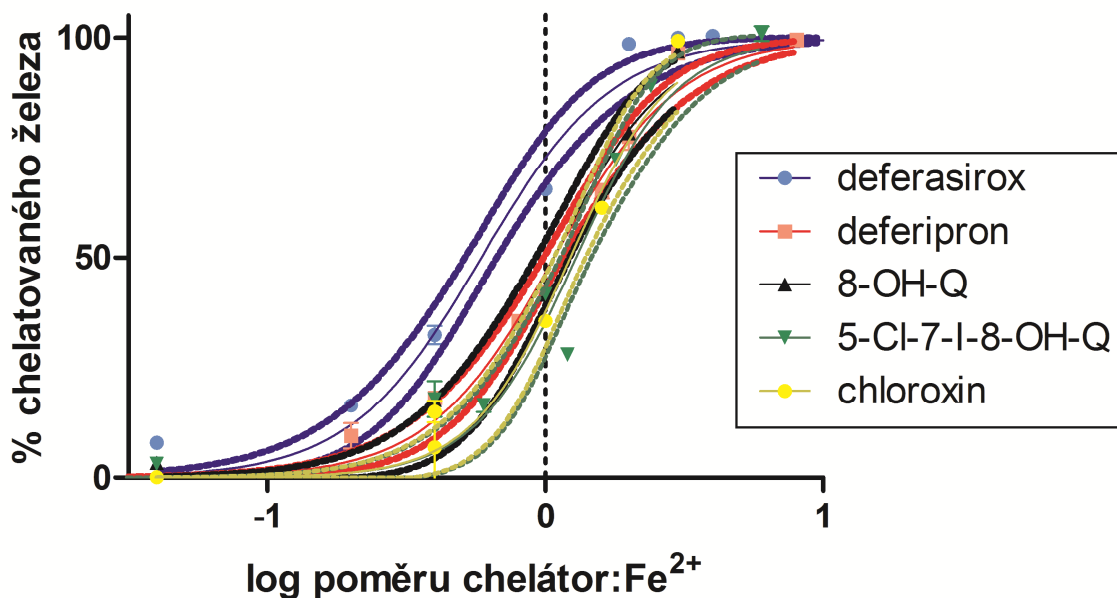
Žádný z testovaných chelátorů významněji neztrácel svou chelatační aktivitu, tj. % chelatovaného železa bylo stejné jak při okamžitém měření, tak při měření po 5 minutách. Podobně žádný z testovaných chelátorů při žádném z testovaných pH neredukoval významně železitě ionty na železnaté.



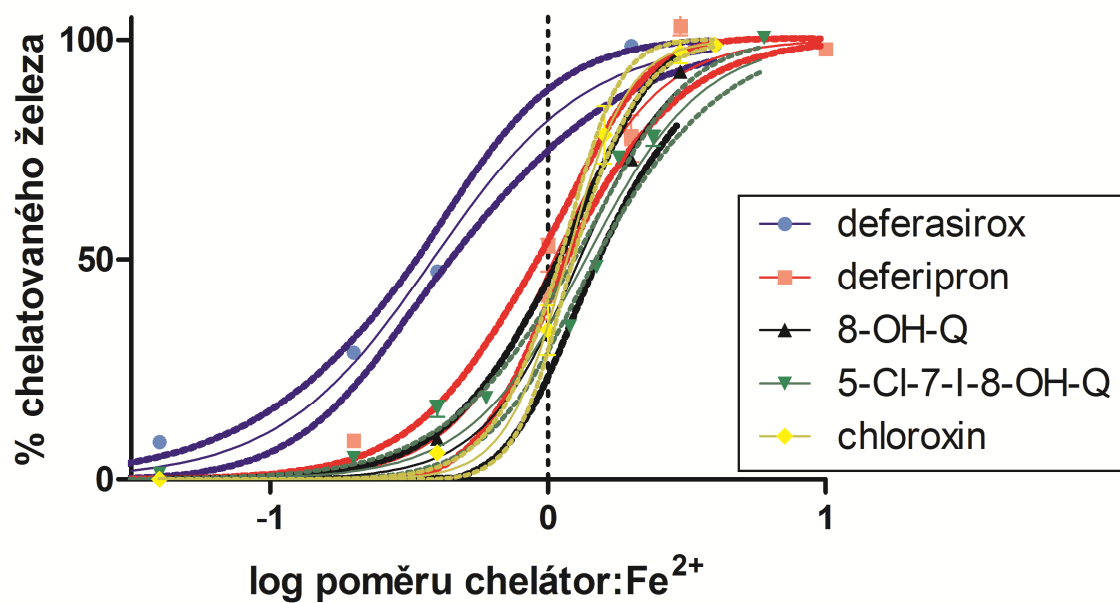
Obr. 12: Konfidenční intervaly zkoušených chelátorů při pH 4.5, chelatace celkového železa



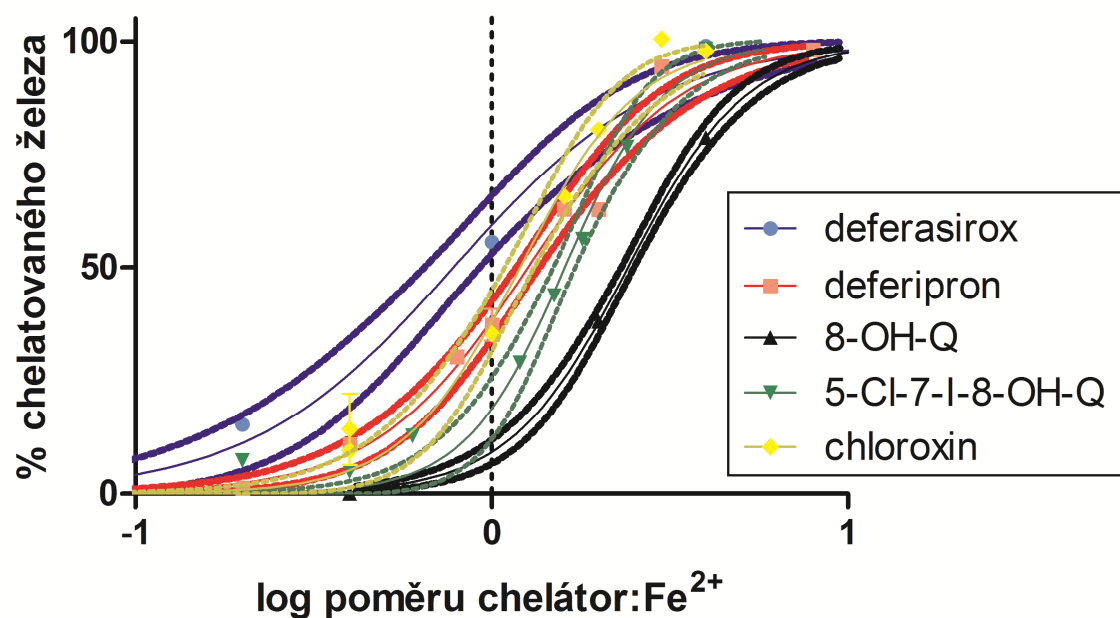
Obr. 13: Konfidenční intervaly zkoušených chelátorů při pH 4.5, chelatace železnatých iontů



Obr. 14: Konfidenční intervaly zkoušených chelátorů při pH 6.8, chelatace železnatých iontů



Obr. 15: Konfidenční intervaly zkoušených chelátorů při pH 7.5, chelatace železnatých iontů



Obr. 16: Konfidenční intervaly zkoušených chelátorů při pH 5.5, chelatace železnatých iontů

9 Diskuze

Schopnost chelátorů vázat železo závisí nejen na jeho struktuře, ale také může být ovlivněna pH prostředí. S nižším pH se můžeme setkat u řady patologických stavů, jako je akutní ischemie myokardu, zánět, zhoubný nádor (43).

Všechny testované chelátory vykazovaly v našem experimentu nejnižší chelatační schopnosti při pH 4.5. Nejvyšší chelatace železnatých iontů nastala při pH 6.8 a 7.5. Obecně lze říci, že jak u klinicky používaných chelátorů deferipronu a deferaziroxu, tak u skupiny chelátorů se základní strukturou 8-hydroxychinolinu, s klesajícím pH klesá schopnost chelatace. Děje se tak pravděpodobně díky tomu, že v zásaditějším prostředí jsou hydroxylové skupiny snadněji deprotonovány a lépe pak tvoří komplexy se železem (43).

V naší studii byla závislost účinku na struktuře zkoumána jen mezi 8-hydroxychinoliny, kde byly nalezeny významné rozdíly v chelataci železnatých iontů při pH 4.5 a 5.5. Substituce v poloze 5 chlorem v poloze 7 jodem zvýšila chelatační účinnost v pH 5.5 a pouze mírně se zvýšila chelatace železnatých iontů v pH 4.5. Avšak substituce dvou elektronegativních atomů chloru v poloze 5 a 7 vedla ke zvýšení chelatační účinnosti železnatých iontů v pH 4.5 téměř o jeden řád ve srovnání se základní látkou této skupiny. Je tedy pravděpodobné, že tato substituce usnadňuje odštěpení vodíku z hydroxylové skupiny a zvyšuje tak chelatační potenciál základní sloučeniny.

Chelatace celkového železa byla v této práci měřena při pH 4.5. Touto metodou lze nepřímo změřit chelataci železitých iontů. 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 (44). Proto jde o chelataci celkového železa, neboť je teoreticky možné, že i zredukované železo (železnaté ionty) může být chelatováno. Vzhledem k tomu, že ale chelatace železnatých iontů při tomto pH byla také zmeřena, lze nepřímo usuzovat, že tyto látky chelatují železité ionty při tomto pH velmi dobře narozdíl od železnatých. Tato metodika ale nemůže být využita ve vyšších pH pravděpodobně z důvodu, že se rozpustnost železitých iontů snižuje od kyselého do neutrálního pH (42).

V naší práci vykazovaly chelátory vysokou afinitu pro Fe^{3+} . Obecně platí, že s trojmocnými ionty tvoří chelátory pevnější komplexy než s dvojmocnými. Trojmocné ionty železa jsou jedinými esenciálními trojmocnými ionty v lidském organismu, a zkoušené chelátory by tedy měly mít z tohoto hlediska nízkou toxicitu. Zatímco iont Fe^{3+} je malý a málo polarizovatelný, Fe^{2+} je větší a více polarizovatelný. Fe^{3+} se tak váže s atomy, jako je např. kyslík, Fe^{2+} preferuje atomy dusíku nebo síry (28). Ukazuje se, že tyto teoretické předpoklady nemusí vždy platit, zejména za aerobních podmínek, kdy dochází k relativně snadné oxidaci železnatých iontů na železité. To je pravděpodobně důvod, proč všechny testované chelátory byly podobně účinnými chelátory železitých iontů a železnatých v neutrálním prostředí. Na druhé straně nízké pH tyto předpoklady nepotvrdilo, deferasirox, který selektivně váže železnaté ionty dvěma atomy dusíku a kyslíkem byl méně účinný než deferipron, který váže atom železa dvěma atomy kyslíku (57). Je možné, že studie mohla být částečně ovlivněna rozpouštědlem, kterým byl dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO je amfifilní organická sloučenina s vysokou dielektrickou konstantou (55). Molekula obsahuje polární oblast a dvě apolární methylové skupiny, což jí činí rozpustnou jak v organickém rozpouštědle, tak ve vodném prostředí. Vzhledem k těmto fyzikálně-chemickým vlastnostem je DMSO velmi účinným rozpouštědlem pro organické látky

(56). Ale není příliš pravděpodobné, vzhledem k nadbytku pufru, že by tato látka mohla výrazně ovlivnit výsledky.

Protože v lidském organismu musí chelátor efektivně kompetovat s ligandy, které běžně váží železo v organismu, jsou afinita chelátoru k železu a stechiometrický poměr velmi důležitými pro klinické využití chelátoru (28).

Deferipron patří mezi dvojjazné chelátory, které tvoří se železem komplexy v poměru 3:1 (48) a skutečně při poměru 1:1 ($x = \log 1 = 0$) bylo chelatováno cca 33 % železa (kromě chelatace Fe^{2+} při pH 4.5) (Obr.11 A). Jeho výhodou je, že je bez náboje a tak snadno prochází membránami (51).

8- hydroxychinoliny také tvoří komplexy se železem v poměru 3:1 (49), což odpovídá grafům (Obr. 10 A, B, C), kdy je opět chelatováno cca 33 % železa při poměru 1:1, kromě pH 4.5 a u 8-OH-Q také pH 5.5.

Naopak, deferasirox je trojjazným chelátorem, který chelatuje železo v poměru 2:1(50). To v našem experimentu odpovídá u pH 5.5 (Obr. 11 B), kdy je při poměru 1:1 chelatováno cca 50 % železa. Avšak při pH 7.5, stejně jako při chelataci celkového železa při pH 4.5, chelatoval v poměru 1:1, tzn. při $x = \log 1 = 0$ chelatoval téměř 100 % železa. Důvod není znám.

Při srovnání dvojjazných a trojjazných chelátorů s šestivaznými (např. Deferoxamin, DFO), dvojj- a trojjazné chelátory mají výhodu v možnosti perorálního podání, avšak jejich zvýšená schopnost procházet membránami je činí potenciálně více toxickými, neboť prochází hematoencefalickou bariérou (HEB). Schopnost pronikat HEB závisí na jejich rozdělovacím koeficientu a molekulové hmotnosti. Šestivazné chelátory nepronikají HEB kvůli jejich vysoké molekulové hmotnosti (52).

Vzhledem k tomu, že komplexy železa s testovanými chelátory byly stabilní a nebyla pozorována žádná redukce železitých iontů, bylo potvrzeno, že klinicky

používané chelátory i testované chelátory ze skupiny 8-hydroxychinolinů jsou bezpečné z hlediska vyvazování volného železa. Ukazuje se ale, že při patologiích spojených se silnou redukcí pH (např. ischemie) by 8-hydroxychinoliny (zejm. chloroxin) mohly být výhodnější.

10 Závěr

Bylo zjištěno, že při stoupajícím pH se zvyšuje chelatační aktivita registrovaných perorálně podávaných chelátorů i chelátorů ze skupiny 8-hydroxychinolinů. Nejúčinnější z našich testovaných chelátorů byl při pH 7.5 deferasirox. Naopak ostatní chelátory byly prakticky stejně účinné. Výjimku představuje pH 4.5, kdy všechny chelátory byly relativně málo účinné, nejúčinnější byl chloroxin, naopak nejslabším chelátorem byl deferasirox.

Rozdíly mezi 8-hydroxychinoliny se vyskytly při pH 4.5 a 5.5, avšak v chelataci železnatých iontů při ostatních pH, stejně tak i v chelataci celkového železa, byla jejich chelatační účinnost srovnatelná.

Je také nutno dodat, že všechny chelátory tvoří velmi stabilní komplexy železo-chelátor a nehrozí ani redukce železitých iontů na redoxně aktivní železnaté ionty.

Závěrem je tedy patrné, že při patologiích spojených se silnou redukcí pH (např. ischemie) by mělo být při volbě chelátoru přihlédnuto k jeho možné změně účinnosti oproti neutrálnímu prostředí.

11 Seznam zkratek

	3-aminopyridin-2-karboxaldehyd
3-AP	thiosemikarbazon
	kontinuální aktivátor erythropoetinového
CERA	receptoru
CFU-E	pozdní prekurzory erythropoezy
DEX	dexrazoxan
DFO	deferoxamin
DMSO	dimethylsulfoxid
EPO	erythropoetin
HA	hydroxylamin chlorid
Hb	hemoglobin
HbA	hemoglobin A
HbA2	hemoglobin A2
HbE	hemoglobin E
HbF	hemoglobin F
HbH	hemoglobin H
HbM	hemoglobin M
HbS	hemoglobin S
ICL670	deferasirox
IF faktor	intrinsic faktor
IL 6	interleukin 6
IRE	iron response element

IRP	iron regulatory protein
L1	deferipron
MAO B	monoaminoxidáza B
MDS	myelodysplastický syndrom
PIH	pyridoxal isonicotinoyl hydrazon
rHuEPO	rekombinantní lidský erytropoetin
ROS	reaktivní formy kyslíku
RR	RNA-reduktáza
8-OHQ	8-hydroxychinolin
5-Cl-7-I-8-OHQ	5-chlor-7-jod-8-hydroxychinolin, kliočinol

12 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. Trojan S. Lékařská fyziologie. Praha: Nakladatelství Grada publishing. 2003; 364-365
4. Novotný J. Poruchy metabolismu železa II. Vnitřní lék. 2005;51(9):995-1004
5. Čermák J. Přetížení železem- novinky v patogenezi a léčbě. Vnitř lék. 2009;1: 559-563
6. Souček M, Špinar J, Svačina P a kolektiv. Vnitřní lékařství pro stomatology. Praha: Grada Publishing. 2005; 305
7. Povýšil C. a kolektiv. Speciální patologie. Praha. 2006; 45-50
8. Young NS, Bacigalupo A, Marsh CW. Aplastic Anemia: Pathophysiology and Treatment. Biol Blood Marrow Transplant. 2010, 16: 119-125
9. Kurre P, Jonson LF, Deeg HJ. Diagnosis and Treatment of Children with Aplastic Anaemia. Pediatr Blood Cancer. 2005; 45: 770-780
10. Silbernagl S, Lang F. Atlas patofyziologie člověka. Praha: Nakladatelství Grada Publishing. 2001; 28-41
11. Clark, Susan F. Iron Deficiency Anaemia: Diagnosis and Management. Curr Opin in Gastroent. 2009; 25(2): 122-128
12. Shersten K. a kolektiv. Iron Deficiency Anaemia. Am Fam Phys. 2007; 75(5): 671-678
13. Raida L. Anémie chronických chorob. Vnitřní lék. 2005; 8: 878-888

14. Pasricha S. et al. Diagnosis and Management of Iron Deficiency Anaemia: a Clinical Update. *The Medic Journal of Austr.* 2010; 193(9): 523-532
15. Inatti A, Khoriat E, Mussalam KM. Iron in Sickle-Cell Disease: What have we learned over the years? *Pediatr Blood Cancer.* 2011; 56: 182-190
16. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle cell disease. *Pediatr Haem.* 2010; 376: 2018-31
17. Aslinia F, Mazza J, and Yale SH. Megaloblastic anaemia and other causes of macrocytosis. *Clin Med Res.* 2006; 4(3): 236-241
18. Herbert L, Muncie Jr, James S. Campbell. Alpha and Beta Thalassemia. *Am Fam Physic.* 2009; 80: 339-345
19. Cao A, Galanello L. Beta-thalassemia. *Genet Med.* 2010; 12(2): 61-76
20. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010; 5:11
21. Cunningham MJ. Update on Thalassemia: Clinical Care and Complications. *Pediatr Clin N Am.* 2008; 55: 447-460
22. Tichelli A, Rovo A. Clinical management of thalassemia in adults. *Diagnostische Hametologie. Ther Umsch.* 2010; 67(5): 237-43
23. Neufeld EJ. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. *Blood.* 2006; 107(9): 3436- 3441
24. Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-Chelating Therapy and the Treatment of Thalassemia. 1997; 89: 739-761
25. Čermák J. Přetížení železem- novinky v patogenezi a léčbě. *Vnitř lék.* 2009;1: 559-563

26. 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
27. Buss JL, Greene BT, Turner J, Torti F. M, Torti S. V. Iron chelators in cancer chemotherapy. *Curr Top Med Chem.* 2004; 4(15):1623-1635
28. Buss JL, Torti FM and Torti SV. The Role of Iron Chelation in Cancer Therapy. *Curr Med Chem.* 2003; 10:1021-1034
29. 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
30. Perez CA, Tong Y, Guo M. Iron Chelators as Potential Therapeutic Agents for Parkinson's Disease. *Curr Bioact Compd.* 2008; 4(3):150-15
31. Hariqae H. Recent progress in iron metabolism and iron-related anaemia. *Rinsho Byori* 2010. 58(12):1211-8
32. Šimek M. Nové poznatky o metabolismu železa. *Vnitř Lék.* 2005; 51(3): 345-353
33. Lipinski P, Starzynski RR, Stys A, Stracilo M. Iron homeostasis, a defence mechanism in oxidative stress. *Postepy Biochem* 2010; 56(3): 305-16
34. Cau M, Melis MA, Conqiu R, Galanello R. Iron deficiency anaemia secondary to mutations in genes controlling hepcidin. *Expert Rev Hematol.* 2010; 3(2): 205-16
35. Divoký V. et al. Některé vzácnější formy hereditárních anémií vyskytující se v dospělé populaci v ČR a SR- β -thalasemie a nestabilní hemoglobinové varianty. *Vnitř Lék.* 2005; 51(8): 887-890

36. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev.* 2003; 17(1): 43-53
37. Čermák J. Myelodysplastický syndrom v novém tisíciletí. Jak klasifikovat a jak léčit nemocné? *Vnitř Lék.* 2005; (51)1: 20-25
38. J.Čermák. Erythropoetin v léčbě nemocných s myelodysplastickým syndromem. *Vnitř Lék.* 2005; 51(10): 1102-1106
39. Steen KH, Steen AE, Reeh PW. A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitisation of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci.* 1995; 15(5): 3982-9
40. Jonášová A. Doporučení pro chelatační léčbu u chronicky transfundovaných hematologických nemocných se známkami přetížení železem. *Farmakoterap.* 2008; 5: 529-537
41. Dítě P et al. *Vnitřní lékařství.* Praha: Nakladatelství Galen; 2007: 165-187
42. 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
43. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.* 2009; 53(2):75-100
44. Zárubová P. Porovnání železo chelatačních vlastností syntetických chelátorů železa. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. 2011
45. Stibor B, Schwameis F. Erythropoetin a jiné léky stimulující erythropoézu na pozadí bezkrevní medicíny- nová éra v léčbě anémie? *Anest.intensiv.Med.* 2009; 20: 84-87

46. Štaud F. Molekulární farmakologie látek stimulujících erytropoézu. *Remedia*. 2007; 5: 32-38
47. Čermák J. K diferenciální diagnostice a léčbě anémií. *Remedia*. 2003; 4: 24-26
48. Neufeld EJ. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. *Blood* 2006;10(7):3436-3441
49. Pierre JL, Baret P. and Serratrice G. Hydroxyquinolines as iron chelators. *Curr Med Chem*. 2003; 10(12):1077-84
50. 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
51. Choudry VP, Naithani R. Current Status of iron overload and Chelation with Deferasirox. *Indian J Pediatr*. 2007; 74(8): 769-764
52. Liu ZD, Hider RC. Design of Clinically Usefull Iron(III)-Selective Chelators. *Inc Med Res Rev*. 2002; 22(1): 26-64
53. Koutoumgiorgos GJ, Kolnagoou A, Penq CT, Shah SV, Aessopos A. Safety issues on iron chelation therapy in patients with normal range iron stores including thalassaemia, neurodegenerative, renal, and infectious diseases. *Expert opin Drug Saf*. 2010; 9(2): 201-6
54. Varela-Moreiras, Murphy MM, Scott J. Cobalamin, folic acid and homocysteine. *Nutr. Rev*. 2009; 67(1): 69-72
55. Vondráček et al. Dimethylsulfoxide potentiates dech-mediated apoptosis in the human myeloid leukemia U 937 cell line through enhancement mitochondrial membráně depolarization. 2006, 30(1): 81-89

56. Santos NC et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65: 1035-1041
57. 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