

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakologie a Toxikologie

Kandidát **Mgr. Libuše Zatloukalová**

Školitel **Prof. MUDr. Radomír Hrdina, CSc.**

Název disertační práce **Vliv polyfenolických látek s železo chelatační aktivitou u modelu akutního infarktu myokardu a oxidačního stresu navozeného katecholaminu**

Úvod a cíl studie: Ischemická choroba srdeční (IČS) a speciálně její nejméně závažnější forma akutní infarkt myokardu (AIM) představuje významný zdravotní problém v rozvinutých zemích s relativně vysokou mortalitou. V rámci multifaktoriální patogeneze AIM zaujímají významné místo reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) tvořené za katalytického působení volného železa, vystupňovaná aktivita sympatického nervového systému a uvolňování katecholaminů. Proto je jako vhodný model AIM používán syntetický katecholamin isoprenalin (ISO), který navozuje morfologické a funkční změny podobné těm, které provázejí AIM u lidí.

AIM je považován za typickou formu ischemicko-reperfuzního (I-R) poškození myokardu. Významnou roli v něm hrají RONS, které se v nadměrné míře uvolní během prvních minut reperfuze. Volné železo celý proces tvorby RONS velmi významně stupňuje.

Využití chelátorů železa by mělo mít protektivní vliv na I-R a AIM, jak vyplývá ze zmíněné patogeneze. Chelátory železa představují rozsáhlou skupinu léčiv s velmi variabilní strukturou. Klinicky jsou využívány v případech akutního předávkování železem a chronického přesycení železem spojeného především s častým podáváním krevních transfuzí zejména u pacientů s talasemií. Tyto látky jsou ovšem experimentálně zkoumány v řadě jiných indikací.

Cíl této studie byl tudíž zaměřen na látky s potenciálem chelatovat železo, které přispívá k rozvoji oxidačního stresu myokardu. Prostřednictvím in vitro metody jsme porovnali železo-chelatační účinky testovaných polyfenolických látek při pato/fyziologických pH podmínkách, jejich vztah ke struktuře a srovnali jsme jejich účinky se standardním chelátorem deferoxaminem. Druhou část disertační práce jsme věnovali in vivo analýze účinků látek s železo-chelatačním potenciálem na katecholaminovém modelu AIM navozeném vysokými dávkami ISO.

Metodika: V in vitro studiích byla analyzována chelatační aktivita a stabilita vytvořených komplexů u 26 flavonoidů z různých skupin a řady přirozeně se vyskytujících a chemicky syntetizovaných 4-metylkumarinů, a to za různých pato/fyziologických pH podmínek (4,5/5,5/6,8/7,5), ve srovnání s klinicky užívaným chelátorem železa deferoxaminem. Chelatace železnatých iontů a celkového železa byla zkoumána pomocí jednoduché spektrofotometrické zkoušky. Chelátory železa byly smíchány s železnatými nebo železitými ionty v různých koncentračních poměrech. Koncentrace nevázaného železa byla poté určena specifickým indikátorem železnatých iontů ferrozinem při vlnové délce 562 nm. Absorbance byla měřena ihned po přidání ferrozinu a po 5 minutách. Stanovení železitých iontů probíhá nepřímo, pomocí jejich redukce hydroxylaminem na železnaté, které jsou následně stanoveny ferrozinem. Tímto nepřímým způsobem je stanovena i chelatace celkového železa.

V in vivo experimentech byli použiti samci potkanů kmene Han:Wistar o průměrné hmotnosti 360 g. Potkani byli premedikováni i.v. flavonoidem rutinem (46 mg.kg<sup>-1</sup> a 11,5 mg.kg<sup>-1</sup>) nebo standardním chelátorem železa dexrazoxanem (20,4 mg.kg<sup>-1</sup>) (DEX) samotným nebo v kombinaci s ISO (100 mg.kg<sup>-1</sup>) podaným s.c. Za 24 hodin po aplikaci léčiv byla zvířata anestetizována za pomoci uretanu (1,2 g.kg<sup>-1</sup> i.p.). Hemodynamické parametry srdeční funkce byly změřeny prostřednictvím termodiluční metody za použití přístroje Cardiosys (Experimetria Ltd., Maďarsko). V případě DEX se provádělo ještě kontinuální 2-hodinové

měření hemodynamických parametrů srdeční funkce a EKG parametrů pomocí přístroje PowerLab (AdInstruments, Austrálie). Krevní vzorek byl odebrán pro stanovení biochemických markerů. Po eutanazii potkanů i.v. podáním KCl (1 mM) bylo srdce vyjmuto pro zvážení srdečních komor, analýzu vybraných iontů a histopatologické vyšetření.

Výsledky: In vitro studie poukázala, že nejúčinnější železo-chelatační místo flavonoidů představuje 6,7-dihydroxy struktura, jako v případě baikaleinu, který prokázal stejnou aktivitu ve všech testovaných pH jako deferoxamin. Významnou železo-chelatační aktivitu mají také flavonoidy s 3-hydroxy-4-keto uspořádáním spolu s 2,3-dvojnou vaznou a katecholickým B kruhem, např. myricetin a quercetin, ale nemají významnou roli v kyselém prostředí, podobnou aktivitu jako baikalein a deferoxamin měli pouze za neutrálních podmínek. 5-hydroxy-4-keto uspořádání bylo méně aktivní a samotné keto, hydroxy, metoxyskupiny nebo ortho-metoxy-hydroxyskupiny nebyly spojeny s chelatací železa.

Mezi testovanými kumariny byly nejúčinnějšími chelátory železa orto-dihydroxyderiváty. 7,8-dihydroxy-4-metylkumariny dosáhly za neutrálního pH účinnosti deferoxaminu, ovšem nevázaly železo dostatečně pevně za kyselých podmínek, navíc redukovaly železité ionty, čímž by mohly vést k zesílení Fentonovy reakce a tím i oxidačního stresu. Ostatní kumariny významně železo nechelatovaly, s výjimkou orto-diacetoxymumarinů.

V in vivo studii bylo podání ISO ve srovnání s kontrolou spojeno s 30% mortalitou, poklesem tlaku krve, snížením srdečního výdeje, zvýšením periferní cévní rezistence a srdeční frekvence, uvolněním srdečního troponinu T (cTnT) do cirkulace, vzestupem vlhké hmotnosti komor, přesycením myokardu vápníkem a histopatologickými abnormalitami. V případě EKG ISO vedl k rychlému zvýšení ST segmentu a snížení amplitudy T vlny a R vlny.

Rutin snížil vzestup periferní cévní rezistence po podání ISO, ale obecně spíše zhoršoval katecholaminové poškození myokardu. Vyšší dávka zvýšila mortalitu, potencovala uvolnění cTnT a zvýšila přesycení myokardu vápníkem.

DEX snížil úmrtnost potkanů především pravděpodobně díky útlumu dysrytmií a inhibici přebytku vápníku. Ačkoliv měl DEX tendenci snižovat střední tlak krve, neměl žádný významný vliv na ostatní hemodynamické a EKG parametry.

Závěr: Schopnost jednotlivých látek chelatovat železo závisí na jejich chemické struktuře a prostředí. Užití některých železo-chelatačních flavonoidů či 4-metylkumarinů může být totiž nevhodné především v kyselém prostředí (jako je tomu u akutního infarktu myokardu) v důsledku redukce železitých iontů a následné účasti železnatých iontů ve Fentonově reakci a zvýšené produkci volných radikálů kyslíku a dusíku.

V případě in vivo účinků rutin nebyl schopen snížit katecholaminovou kardiotoxicitu pravděpodobně díky jeho hydrofilnímu charakteru a pro-oxidačním vlastnostem. Naopak toto myokardiální poškození ve vyšších dávkách spíše zhoršoval. DEX prokázal některé kardioprotektivní účinky u modelu AIM, ty byly ale pravděpodobně většinou způsobené antidysrytmickým působením díky chelataci železa a inhibici přesycení myokardu vápníkem.