



**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakologie a toxikologie**

**Vliv polyfenolických látek s železo  
chelatační aktivitou u modelu akutního  
infarktu myokardu a oxidačního stresu  
navozeného katecholaminy**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Mgr. Libuše Zatloukalová**

**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 použité literatury a v práci řádně citovány“.

Mgr. Libuše Zatloukalová

### **Poděkování:**

Ráda bych poděkovala Prof. MUDr. Radomíru Hrdinovi, CSc., který mi poskytl příležitost a čest s ním pracovat a který byl vždy připraven mi pomoci s každým i tím nejnepatrnějším vědeckým problémem.

Dále jsem vděčná mým kolegům PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. a Mgr. Tomáši Filipskému za spolupráci na experimentech.

Také bych chtěla poděkovat Anežce Kunové a Renatě Exnarové za jejich vynikající laboratorní zručnost v rámci našich experimentů a Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za histologické vyšetření.

Tato práce vznikla za podpory grantu SVV- 263- 003, projektu FRVŠ 1115/2010 a rozvojového projektu č.75/FaF/2b.

Mgr. Libuše Zatloukalová

# OBSAH

<b>I.</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
<b>II.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>7</b>
1.	<b>Kardiovaskulární choroby .....</b>	<b>7</b>
1.1.	Ischemická choroba srdeční a akutní infarkt myokardu .....	9
2.	<b>Katecholaminy a jejich vztah k AIM .....</b>	<b>11</b>
2.1.	Isoprenalin (isoproterenol).....	12
3.	<b>Látky s potenciálem chelátovat železo .....</b>	<b>14</b>
3.1.	Klinicky používané chelátory železa .....	15
3.1.1.	Deferoxamin.....	15
3.1.2.	Dexrazoxan .....	17
3.1.3.	Ostatní klinicky používané chelátory železa.....	19
3.1.3.1.	Deferipron .....	20
3.1.3.2.	Deferasirox .....	21
3.2.	Polyfenolické látky .....	22
3.2.1.	Flavonoidy .....	23
3.2.1.1.	Rutin .....	27
3.2.2.	Kumariny .....	28
<b>III.</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>30</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>31</b>
1.	<b>Chemikálie.....</b>	<b>31</b>
2.	<b>Přístrojové vybavení.....</b>	<b>34</b>
3.	<b>Metodika experimentů v <i>in vitro</i> podmínkách - stanovení chelatace železa.....</b>	<b>35</b>
4.	<b>Metodika experimentů v <i>in vivo</i> podmínkách .....</b>	<b>37</b>
<b>V.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>45</b>
1.	<b>Stanovení chelatace železa v <i>in vitro</i> podmínkách .....</b>	<b>45</b>
1.1.	Chelatace flavonoidy .....	47

1.2. Chelatace kumariny .....	55
<b>2. Účinky látek s železo chelatačním potenciálem <i>in vivo</i> na modelu akutního infarktu myokardu .....</b>	<b>59</b>
2.1. Rutin .....	59
2.2. Dexrazoxan .....	64
<b>VI. DISKUZE.....</b>	<b>71</b>
<b>VII. ZÁVĚR.....</b>	<b>81</b>
<b>VIII. ABSTRAKT.....</b>	<b>82</b>
<b>IX. ABSTRACT.....</b>	<b>86</b>
<b>X. SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>90</b>
<b>XI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>91</b>
<b>XII. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....</b>	<b>113</b>

# I. ÚVOD

Oxidační stres je důsledkem zvýšené produkce volných kyslíkových (i jiných) radikálů a hraje důležitou roli v patogenezi řady onemocnění, mj. kardiovaskulárního systému, včetně jedné z jeho nejzávažnějších forem- akutního infarktu myokardu. Tvorba volných radikálů je potencována přítomností volného nebo slabě vázaného železa a vystupňovaným uvolňováním katecholaminů. Proto je jako vhodný standardizovaný model akutního infarktu myokardu používán syntetický katecholamin isoprenalin.

Téma disertace se zaměřuje na látky s potenciálem chelatovat transitní kovy, především železo, které svou katalytickou rolí přispívá k rozvoji oxidačního stresu myokardu. Účinná chelatace železa, jak vyplývá ze zmíněné patogeneze, by tak mohla přispět k prevenci rozvoje poškození myokardu.

## II. TEORETICKÁ ČÁST

### 1. Kardiovaskulární choroby

Kardiovaskulární onemocnění, především ischemická choroba srdeční (ICHS), představují vážný zdravotní problém v rozvinutých i rozvojových zemích, s mortalitou přibližně 20%, ačkoliv se v poslední době projevil spíše trend ústupu těchto onemocnění (Coady *et al.*, 2001; Goldberg *et al.*, 2006). ICHS je multifaktoriální onemocnění, kde mezi hlavní rizikové faktory patří především arteriální hypertenze, diabetes mellitus, aterogenní dyslipidémie, centrální obezita, hyperkoagulační stavy, prozánětlivé stavy a v neposlední řadě také životní styl (kouření, stres, nízká fyzická aktivita) a genetická predispozice (Touyz a Schiffrin, 2004; Grundy, 2008; Berenson *et al.*, 1998; Marenberg *et al.*, 1994).

Rozvoj ICHS je na jedné straně úzce spjat se sníženými hladinami antioxidantních systémů v myokardu a na druhé straně s oxidačním stresem (Loeper *et al.*, 1991).

Oxidační stres je důsledkem zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku (tzv. RONS, z ang. reactive oxygen and nitrogen species) a hraje důležitou roli v patogenezi mnoha nemocí včetně aterosklerózy, ICHS, městnavého srdečního selhání, kardiomyopatií či arytmií. Nicméně oxidační stres se účastní i velkého množství jiných onemocnění u člověka jako je zánět, zhoubná nádorová onemocnění, stárnutí a neurodegenerativní onemocnění (Parkinsonova a Alzheimerova choroba) (Russo *et al.*, 2000; Halliwell, 1994; Gassen a Youdim, 1997).

Oxidační stres představuje nerovnováhu mezi endogenními antioxidanty a RONS (Halliwell a Gutteridge, 1999; Russo *et al.*, 2000). Během myokardiálního oxidačního stresu je zvýšena tvorba RONS, především superoxidového, peroxidového a hydroxylového radikálu, a obranné mechanismy kardiomyocytů jsou změněny. Zdroji RONS v srdečních myocytech mohou být mitochondriální elektronový transportní řetězec, syntáza NO (NOS), NADPH

oxidáza, xantinoxidáza, lipoxygenázy/cyklooxygenáza-2 nebo autooxidace různých sloučenin, především endogenních katecholaminů (adrenalinu, noradrenalinu). RONS mohou být ale tvořeny i neenzymaticky za katalytického působení iontů železa nebo mědi. Prokázalo se totiž, že železo a měď se zvýšeně uvolňují během ischemie a byly také nalezeny ve vysokých hladinách při reperfuzi. RONS poté reagují s biomolekulami, jako jsou lipidy buněčné membrány, proteiny, karbohydráty, nukleové kyseliny a glutation, což nakonec vede k tvorbě organických radikálů, peroxidaci lipidů, inaktivaci enzymů, oxidaci glutationu a k destrukci buněk (Baud a Ardaillou, 1986; Zwemer *et al.*, 2000; Misra, 2009; Chevion *et al.*, 1993).

Nejvíce škodlivé účinky na buňky má především hydroxylový radikál ( $\text{OH}^\bullet$ ). Ačkoliv organické peroxylové radikály mají relativně nízkou oxidační schopnost ve srovnání s hydroxylovým radikálem, jsou schopny zhoršovat poškození tkání v biologických systémech. Kromě toho jsou peroxylové radikály tvořeny *in vivo* v membránách a lipoproteinech jako meziprodukty peroxidace lipidů, která je spojena s ischemicko/reperfuzním poškozením. To spouští akutní zánětlivou odpověď, u které polymorfonukleární neutrofily infiltrují myokardium a mohou mít škodlivé účinky produkcí dalších RONS a proteolytických enzymů (Ray *et al.*, 1999; Jordan *et al.*, 1999; Kaminski *et al.*, 2002).

Kardiomyopatie jsou heterogenní skupinou nemocí myokardia spojených s mechanickou a/nebo elektrickou dysfunkcí, která se obvykle projevuje nepřiměřenou hypertrofií a/nebo dilatací komor (restriktivní kardiomyopatie je u nás vzácná). Stresová kardiomyopatie, také známá jako Takotsubova kardiomyopatie, dočasná apikální výduť nebo syndrom zlomeného srdce, je charakterizovaná akutní, ale reverzibilní levokomorovou systolickou dysfunkcí za nepřítomnosti aterosklerózy koronárních tepen a má symptomy podobné AIM (Nef *et al.*, 2010; Hansen, 2007;). Mohou se vyskytovat fatální komplikace jako kardiogenní šok, maligní arytmie nebo ruptura levé komory (Akashi *et al.*, 2004; Bonello



*et al.*, 2008;). Může zde být zahrnuto mnoho patologických mechanismů, v neposlední řadě také nadbytek katecholaminů a zvýšení aktivity sympatiku, proto může být stresová kardiomyopatie urychlena nadměrnou stimulací myokardu endogenními nebo exogenními katecholaminy. V akutní fázi stresem indukované kardiomyopatie hraje roli také přítomnost RONS stimulovaná katecholaminy nebo ischemií (Akashi *et al.*, 2003). Ty vedou k dysfunkci a cytotoxicitě kardiomyocytů.

### **1.1. Ischemická choroba srdeční a akutní infarkt myokardu**

Ischemická choroba srdeční (ICHS) v důsledku aterosklerózy koronárních tepen (jiné příčiny ICHS jsou relativně vzácné, např. stenóza aortálních chlopní, závažná anémie, hypertyreóza, spasmy koronárních cév, aj.) představuje významný zdravotní problém na celém světě. Bylo prokázáno, že velký vliv může mít právě i kardiotoxické působení katecholaminů, což může významně přispět k rozmanitým projevům ICHS včetně nejzávažnějších koronárních syndromů (nestabilní angina pectoris, AIM). Klinická manifestace zmíněných syndromů představuje další stresovou situaci, čímž se uzavírá bludný kruh (Kassim *et al.*, 2008; Rump a Klaus, 1994; Kloner, 2006; Dhalla *et al.*, 2010).

Akutní infarkt myokardu (AIM) patří mezi nejzávažnější formy ICHS, je důsledkem endoteliální dysfunkce se zvýšenou agregací destiček a prokoagulačním stavem vedoucí k trombóze. AIM je provázen nekrózou myokardu, ke které došlo na základě nerovnováhy mezi dodávkou krve srdci (v případě AIM v důsledku uzávěru koronární tepny či její větve je dodávka krve a tím i kyslíku příslušné partii myokardu zastavena úplně) a potřebám srdce v důsledku uzávěru koronární tepny či její větve. Dochází také ke zvýšené peroxidaci lipidů a dočasné inhibici antioxidačních protektivních enzymů, jako je superoxiddismutáza (SOD) (Loeper *et al.*, 1991).

AIM je považován za typickou formu ischemicko-reperfučního (I-R) poškození. Při obnovení prokrvení - reperfuze - se kyslík dostává do předtím ischemické tkáně a navozuje další poškození. Reperfuze akutně ischemického myokardu je spojena s různými význačnými patofyziologickými poruchami, jako jsou arytmie, přechodná mechanická dysfunkce („stunning“) a buněčná smrt. Celý proces od sebe ovšem nelze lehce oddělit, a proto se hovoří o I-R poškození. Významnou roli v něm hrají RONS, které se v nadměrné míře uvolní během prvních minut reperfuze. Je také dostatečně dobře popsáno uvolnění volného železa, které celý proces tvorby RONS velmi významně stupňuje (Bolli, 1991; Misra *et al.*, 2009). Chelatace železa se zdá být proto potenciálně protektivní vůči I-R poškození myokardu.

Železo je základní prvek účastnící se mnoha životně důležitých procesů (transport kyslíku, produkce ATP a syntéza DNA) (Richardson a Ponka, 1997). Nejdůležitější vlastností železa, pro kterou je nezbytnou součástí mnoha enzymů, je jeho schopnost darovat a obdržet elektron, tzn. snadno přecházet mezi železnatou ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a železitou ( $\text{Fe}^{3+}$ ) formou, je tedy snadno oxidováno a redukováno. Na druhou stranu tato užitečná vlastnost může být za určitých podmínek škodlivá kvůli účasti volného železa na tvorbě silných oxidačních sloučenin jako je hydroxylový radikál. Z uvedeného plyne, že železo hraje významnou roli také v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění (Halliwell a Gutteridge, 1999; Mladěnka *et al.*, 2005; Murphy a Oudit, 2010). Železo hraje také roli v iniciaci a propagaci peroxidace lipidů (oxidační reakce polynenasycených lipidů odstraněním atomů vodíku z nenasycených mastných kyselin v lipidové dvojvrstvě membrán organel), ať už prostřednictvím hydroxylových radikálů nebo přímo katalyzováním peroxidace lipidů (Halliwell a Gutteridge, 1999; Chau, 2000, Minotti a Aust, 1987).

Existují narůstající epidemiologické důkazy týkající se role železa v patogenezi aterosklerózy a ICHS. Mechanismus, kterým může železo stimulovat aterogenezi, je nejasný. Předpokládá se, že katalytická role železa v peroxidaci lipidů může být důležitým faktorem ve

tvorbě aterosklerotických lézí. Železem katalyzované volné radikály způsobují oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), které se vyskytují v endoteliálních buňkách, v buňkách hladkého svalstva, lymfocytech a makrofázích. Oxidované LDL poté indukují změny v endoteliálních buňkách se ztrátou integrity, což usnadňuje pozdější akumulaci cirkulujících monocytů a LDL a tak podporují progresi aterosklerotické léze (Halliwell a Chirico, 1993; Steinbrecher *et al.*, 1990; de Valk a Marx, 1999; Balla *et al.*, 1991). Ateroskleróza koronárních cév může poté vést k ischemii myokardu a infarktu myokardu. Z uvedených skutečností plyne, že by chelatace železa mohla zmírnit některé následky RONS. Na druhé straně ale, pokud je afinita chelátoru železa s redukujícími schopnostmi nízká, hrozí riziko redukce železitých iontů na železnaté, což je nežádoucí a vede k zesílení produkce RONS.

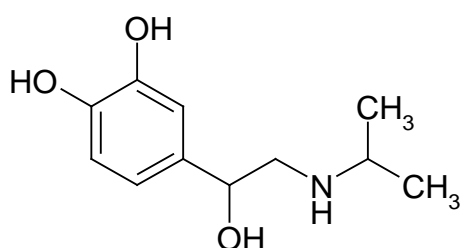
Srdeční selhání nebo arytmie jsou častými komplikacemi AIM, kde hraje opět svou roli oxidační stres (Zweier a Talukder, 2006). U pacientů se srdečním selháním byla zjištěna zvýšená produkce RONS, která může přispívat k rozvoji hypertrofie srdce. A podobně, RONS mohou hrát svou roli i ve vzniku arytmií (De Biase *et al.*, 2003; Bernier *et al.*, 1986; Manning *et al.*, 1984).

## **2. Katecholaminy a jejich vztah k AIM**

Patogeneze ICHS zahrnuje více faktorů, jedním z nich je právě vystupňovaná aktivita sympatického nervového systému a další neurohumorální změny. Životní styl je často doprovázen stresem, který je spojen se zvýšenou stimulací sympatiku, uvolněním endogenních katecholaminů jak systémových, zejména adrenalinu ze dřeně nadledvin, tak lokálních, především noradrenalinu z postgangliových zakončení noradrenergických vláken přímo v myokardu. Endogenní katecholaminy jsou základními složkami sympatického nervového systému, který je zodpovědný, kromě jiného, za udržování kardiovaskulární homeostázy. Nicméně, za určitých podmínek mohou být kardiotoxické a mohou přispívat

k dalšímu srdečnímu poškození, jako je chronické srdeční selhání, stresová kardiomyopatie, arytmie a mohou být bezprostředním spouštěcím faktorem rozvoje AIM (Dhalla *et al.*, 2010; Kloner, 2006). Proto jako vhodný standardizovaný model AIM a stresové kardiomyopatie ke studiu prospěšných účinků mnoha látek a srdeční funkce slouží syntetický katecholamin isoprenalin (ISO).

## 2.1. Isoprenalin (isoproterenol)



**Obr. 1:** Chemická struktura syntetického katecholaminu isoprenalinu.

Syntetický katecholamin isoprenalin (ISO) (Obr. 1) má neselektivní  $\beta$ -agonistické vlastnosti a byl dříve ve farmakoterapii používán krátkodobě v případech atrioventrikulární blokády vzhledem k jeho pozitivně dromotropním účinkům. Ovšem jeho podání v dostatečné dávce u laboratorních zvířat vyvolává patologický stav v mnoha aspektech podobný AIM u lidí, což je patrné z biochemických (např. uvolnění srdečního troponinu T), histologických nálezů (nekróza srdeční tkáně) i ze změn u elektrokardiogramu (EKG) (např. elevace ST-segmentu) (Rona, 1985; Chagoya de Sánchez *et al.*, 1997; Diaz-Munoz *et al.*, 2006; Pinelli<sup>a,b</sup> *et al.*, 2004). Využití ISO jako modelu AIM u malých laboratorních zvířat má mnoho výhod: je relativně levný, pro navození infarktu není nutné provádět obtížné chirurgické zákroky a rozsah nekrózy myokardu souvisí s podanou dávkou, na rozdíl např. od modelu ligatury srdeční artérie (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>a</sup>; Hasenfuss, 1998; Rona *et al.*, 1959).

Přestože existuje nemalá řada studií, která tento model zkoumala, není přesně známo, jakým mechanismem dochází k poškození myokardu. Jedním z důležitých mechanismů vysvětlujících ISO indukované srdeční poškození je především nadměrná stimulace  $\beta$ -adrenergických receptorů, která vede v první řadě k výrazné stimulaci myokardu s pozitivně inotropními, chronotropními a dromotropními účinky (zprostředkované  $\beta_1$ -receptory) a snížení periferní cévní rezistence (způsobené aktivací  $\beta_2$ -receptorů). Dalším významným mechanismem je pravděpodobně i přeměna ISO na katecholaminové cytotoxické oxidační produkty (aminochromony, konkrétně isoprenochrom) autooxidací, přispívající ke zvýšenému oxidačnímu stresu (Rajadurai a Prince, 2007; Remiao *et al.*, 2002; Rona, 1985; Remiao *et al.*, 2000; Rump a Klaus, 1994). Kromě toho je tvorba volných radikálů potencována za katalytické přítomnosti volného nebo slabě vázaného železa, které se zvýšeně uvolňuje z tkání během a po ischemii (I-R poškození).

ISO způsobuje závažný stres myokardu a vede k morfologickým a funkčním změnám, které ústí v nekrózu srdečního svalu s progresivním procesem remodelace srdečních komor s difúzním poškozením myokardu. Už i relativně malé dávky ISO ( $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (Blasig *et al.*, 1985) způsobují relativní ischemii myokardu, která je spojená s výrazným vzestupem volného železa a mědi, které jsou následně uvolněny do cirkulace a napomáhají rozvoji oxidačního stresu (Winsor *et al.*, 1975; Berenshtein *et al.*, 2002; Wexler, 1978; Gauthman *et al.*, 2006). Katecholaminy jsou navíc schopny tvořit redoxně-aktivní komplexy železa, které se mohou podílet na poškození srdeční tkáně pozorované u ISO-indukované kardiotoxicity a u AIM. Dále dochází ke stimulaci peroxidace lipidů, což může být důvod ireverzibilního poškození membrán myokardu.

Patogeneze ISO poškození je tedy multifaktoriální. Její součástí je i pokles dodávky krve myokardu kvůli periferní vasodilataci spojené s poklesem tlaku krve a tím i koronární perfuze, následované tvorbou mikrotrombů s patrnou obstrukcí mnoha malých cév. Svoji

prokazatelnou roli hraje i přesycení kardiomyocytů vápníkem (tzv. „calcium overload“), mitochondriální dysfunkce, porucha intermediárního metabolismu v srdeční tkáni, aj. (Bindoli *et al.*, 1992; Rona, 1985; Pinelli<sup>b</sup> *et al.*, 2004; Blasig *et al.*, 1985; Diaz-Munoz *et al.*, 2006).

### **3. Látky s potenciálem chelatovat železo**

Chelátory železa představují rozsáhlou skupinu léčiv s velmi variabilní strukturou. Klinicky jsou zatím využívány jako léčiva preventivně působící vůči kardiotoxicitě při léčbě antracykliny, v méně běžných případech při akutním předávkování železem a u chronického přesycení železem, které kromě opět ojedinělých geneticky podmíněných případů bývá většinou spojeno s podáváním častých krevních transfúzí, zejména u pacientů s talasemií (Hershko *et al.* 2002; Olivieri a Brittenham, 1997; Tam *et al.*, 2003; Hrdina *et al.*, 2000).

Chelátory železa jsou experimentálně zkoumány i v řadě dalších patologických stavů. Kromě výše uvedených indikací se objevuje role chelátorů železa v celé řadě nemocí charakterizovaných oxidačním stresem, zahrnující kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní onemocnění a zhoubná nádorová onemocnění. I když železo není považováno u těchto nemocí za hlavní příčinu, hraje v progresi těchto nemocí důležitou roli. Proto by chelátory železa mohly mít terapeutický prospěch u mnoha těchto stavů (Tam *et al.*, 2003; Kalinowski a Richardson, 2005; Hatcher *et al.*, 2009).

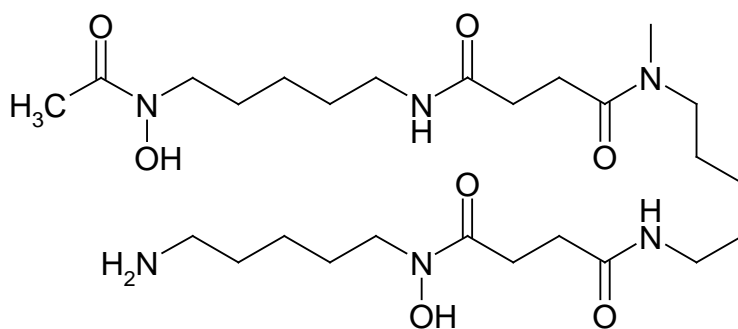
U některých látek s železo-chelatačními vlastnostmi se v nedávné době prokázal také protektivní účinek u zmíněného catecholaminového modelu srdečního poškození. Ale účinky antioxidantů s železo-chelatační aktivitou jsou často rozporuplné (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>c</sup>; Karthick a Stanely Mainzen Prince, 2006).

### 3.1. Klinicky používané chelátory železa

Železo-chelatační terapie má svůj původ v léčbě syndromů chronického přesycení organismu železem, kdy je železo za určitých patologických podmínek uvolněno ze zásob a stoupají hladiny volného železa, vedoucí ke stavům oxidačního stresu. Pokud se v těchto případech pacienti neléčí, dochází ke kumulaci železa v játrech, srdci, slinivce břišní a kloubech, což vede k dysfunkci těchto orgánů a brzkému úmrtí pacientů (Barton, 2007; Porter, 2001; Fraga a Oteiza, 2002).

Chelatační léčba zahrnuje léčiva, která selektivně vážou nadbytek železa a zvyšují jeho vylučování. V současné době jsou pro klinické využití dostupné tři chelátory. Po desítky let byl jako standard k tomuto účelu využíván deferoxamin. V nedávné době byl v této oblasti zaznamenán významný pokrok, kdy byly objeveny nové chelátory se zlepšenými farmakologickými vlastnostmi ve srovnání s deferoxaminem. Nejvýznamnější jsou deferasirox (Exjade®) a deferipron (Ferriprox®), které jsou již klinicky dostupné (Hatcher *et al.*, 2009; Barton, 2007).

#### 3.1.1. Deferoxamin



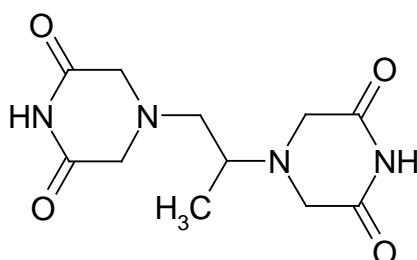
**Obr. 2:** Chemická struktura chelátoru železa deferoxaminu.

Deferoxamin (DFO) (Obr. 2) je tzv. siderofor (sloučenina vázající a přenášející železo v buňkách mnoha druhů bakterií) produkovaný bakterií *Streptomyces pilous* (De Domenico *et al.*, 2009, Günter *et al.*, 1993), identifikován jako první účinný a biologicky aktivní chelátor železa. DFO byl schválen v roce 1960 jako první klinicky používaný chelátor železa v případech přetížení organismu železem, kdy významně zlepšil naděje na přežití a kvalitu života u pacientů s těmito nemocemi (Kalinowski a Richardson, 2005; Cianciulli, 2009; Borgna-Pignatti *et al.*, 1998, Cappellini a Pattoneri, 2009). Jeho vysoká afinita pro železité ionty, které jsou vázány dvěma atomy kyslíku s vysokou afinitou v poměru 1:1 s následnou tvorbou komplexu feroxaminu, umožňuje jeho využití jako standardu ke srovnání železo-chelatující aktivity potenciálních nových chelátorů železa. Naopak má mnohem nižší afinitu pro jiné ionty kovů jako zinku, vápníku a hořčíku. Navíc DFO chelatuje za aerobních podmínek s velkou afinitou také železnaté ionty, kdy umožňuje jejich autooxidaci na železité ionty (Liu a Hider, 2002; Harris a Aisen, 1973).

Schopnost DFO penetrovat přes buněčné membrány závisí na velikosti molekuly a lipofilitě. Pro jeho velkou molekulu (molekulární hmotnost 656 daltonů) a díky nízké lipofilitě je DFO špatně absorbován z gastrointestinálního traktu. Tudíž není aktivní po p.o. podání, podléhá rychlé renální eliminaci, má velmi krátký biologický poločas a musí být proto podáván parenterální infúzí, která je nezbytná pro optimální chelataci železa (Cianciulli, 2009; Gabutti a Piga, 1996; Barton, 2007). Nedostupnost z finančního hlediska, nezbytné časté parenterální podání, což může být pro spoustu pacientů nevhodné, ale i selhání léčby nebo komplikace léčby, jako jsou neurotoxicita, retardace růstu, onemocnění kostí či podráždění v místě vpichu, vedlo postupně k hledání alternativních chelátorů železa (Olivieri *et al.*, 1986; Gabutti a Piga, 1996). Po mnoho let bylo více jak 1000 molekul syntetických, mikrobiálních i rostlinných látek testováno *in vitro* i *in vivo*. Byla identifikována řada dnes již používaných sloučenin (viz níže) (Cohen *et al.*, 2004).



### 3.1.2. Dexrazoxan



**Obr. 3:** Chemická struktura chelátoru dexrazoxanu.

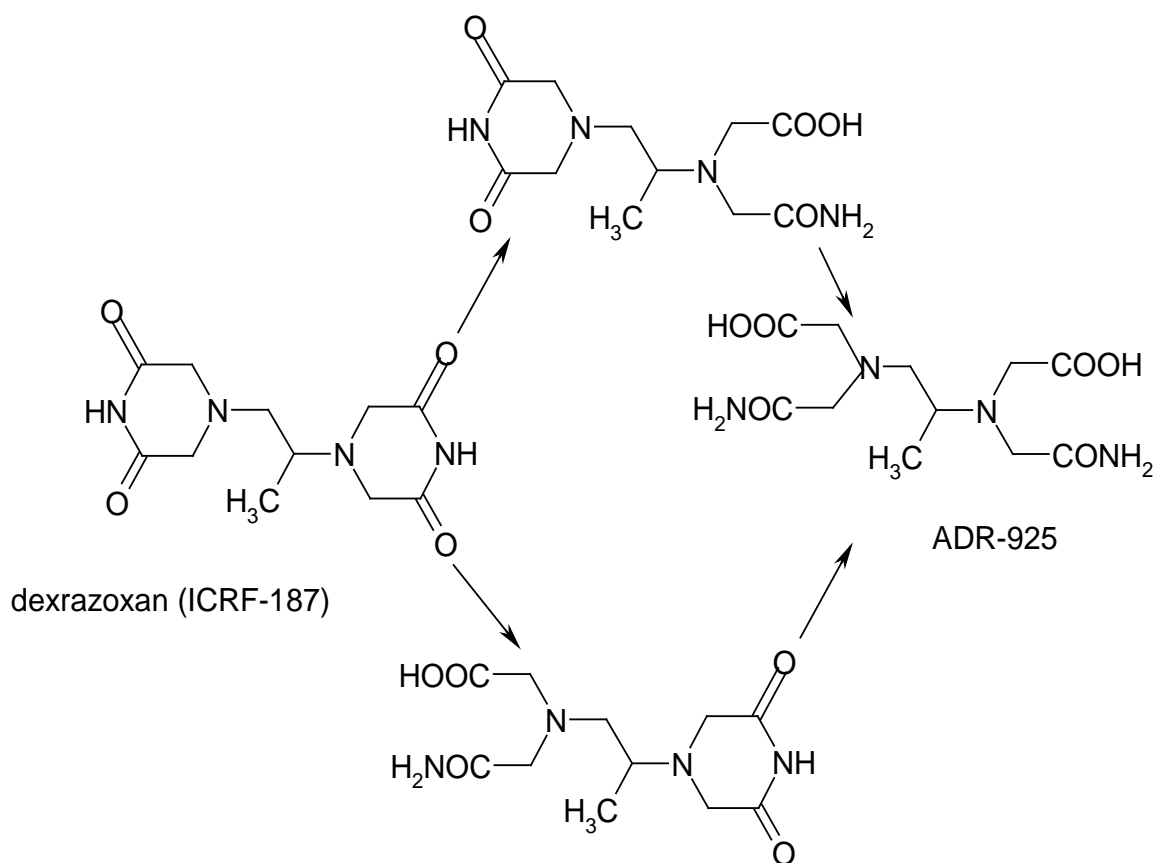
Dexrazoxan (DEX) (Obr. 3), cyklický derivát etylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), je velmi účinným a v současné době jediným používaným léčivem v prevenci antracyklinové kardiotoxicity.

Antracykliny, jmenovitě doxorubicin, jsou jedny z nejúčinnějších chemoterapeuticky působících látek používaných k léčbě širokého spektra pevných nádorů a hematologických malignit. Nicméně klinická prospěšnost antracyklinů je všeobecně významně limitována jejich na dávce závislými, kumulativními a potenciálně život ohrožujícími kardiotoxickými účinky (Links a Lewis, 1999; Pai a Nahata, 2000; Wiseman a Spencer, 1998). Hlavním mechanismem antracyklinového poškození kardiomyocytů je, v závislosti na železe, tvorba kyslíkových volných radikálů díky vytvořeným komplexům antracyklin-železo, které jsou schopné přenosu elektronů. RONS postupně indukují poškození mitochondrií v myokardu a peroxidaci lipidů v jejich membránách (Sugioka a Nakano, 1982; Hasinoff *et al.*, 2003).

DEX je dobře tolerované léčivo se snášenlivostí podobnou placebo u dospělých pacientů s rakovinou léčených antracykliny (Cvetkovic a Scott, 2005). DEX je proléčivo, které je *in vivo* v myokardiálních buňkách metabolizováno hydrolýzou na aktivní železo-chelatující produkty s otevřenými cykly, se strukturou podobnou EDTA a s podobným chelatujícím účinkem (Obr. 4). Bylo prokázáno, že DEX podléhá enzymatické hydrolýze také

v játrech, ledvinách, erythrocytech a leukocytech (Hasinoff a Aoyama, 1999<sup>a,b</sup>; Cvetkovic a Scott, 2005). Kromě toho může být přeměna urychlena přítomností železnatých a železitých iontů (Buss a Hasinoff, 1995). Obojí, DEX i jeho metabolity, prokázaly *in vitro* schopnost odstranit ionty železa z transferinu a feritinu (transportní a skladovací protein železa). Také vychytávají ionty železa, které myokard poškozují tím, že vytváří komplexy s antracykliny (Wiseman a Spencer, 1998; Hasinoff *et al.*, 1998). Tím se zabrání, aby komplexy Fe<sup>3+</sup>-antracykliny vstoupily do oxido-redukčního cyklu a vytvořily reaktivní kyslíkové radikály prostřednictvím Fentonovy a Haberovy-Weissovy reakce (Kaiserová *et al.*, 2007). Protože je kardiotoxicita a protinádorová účinnost antracyklinů zprostředkována rozdílným mechanismem, DEX neovlivňuje protinádorový účinek antracyklinů.

Předpokládá se, že poškození myokardu volnými radikály indukovanými antracykliny je podobné I-R poškození. U DEX bylo prokázáno, že chrání buňky vůči působení katecholaminů u I-R modelů AIM a chronických modelů katecholaminové kardiotoxicity (Ramu *et al.*, 2006; Hasinoff, 2002). DEX významně zlepšoval I-R poškození redukcí tvorby volných radikálů a tím vedl ke snížení karbonylace proteinů a umožnil obnovu hemodynamické rovnováhy (Ramu *et al.*, 2006).

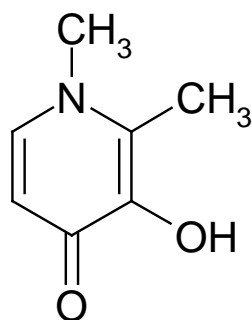


**Obr. 4:** Železo-chelataující produkty dexrazoxanu s otevřenými cykly.

### 3.1.3. Ostatní klinicky používané chelátory železa

Nedávné výsledky nasvědčují tomu, že nízkomolekulární perorální chelátor deferipron a novější deferasirox jsou obzvlášť účinné také v odstranění nebo v prevenci nadbytku železa v srdci (Anderson *et al.*, 2002; Pennell *et al.*, 2010; Musallam a Taher, 2011).

### 3.1.3.1. Deferipron

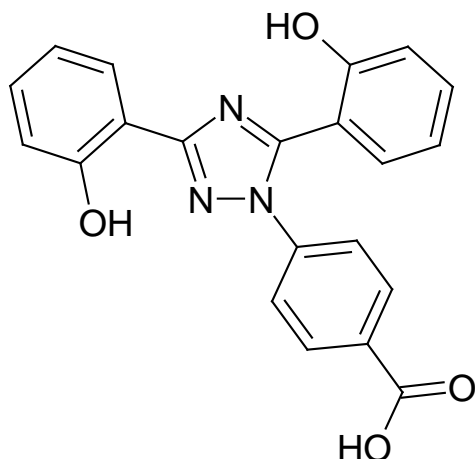


**Obr. 5:** Chemická struktura deferipronu.

Deferipron (DFP) (Obr. 5) je syntetický dvojjazvý chelátor železa, kde jsou tři molekuly potřebné k vazbě jednoho atomu železa. DFP váže také jiné kovy, jako zinek. Proto byl zaznamenán nedostatek zinku u menšího počtu pacientů s dlouhodobou terapií DFP (Balfour Barman a Foster, 1999). DFP byl zaveden v Evropě v roce 2000 jako léčivo druhé volby u pacientů s  $\beta$ -talasemií léčených krevními transfuzemi s vedlejšími účinky DFO nebo kde je DFO kontraindikován. Zajímavou výhodou DFP oproti DFO se zdá být schopnost snižovat toxické hladiny železa v srdci, což bývá obvykle zodpovědné za většinu morbidit a mortality u pacientů s  $\beta$ -talasemií, především ve spojení se selháním srdce. Tato výhoda je pravděpodobně umožněna kvůli malé molekule (139 daltonů) a jejímu lipofilnímu charakteru, kdy přechází přes buněčné membrány snadněji než DFO (Cianciulli, 2009; Anderson *et al.*, 2002; Pennell *et al.*, 2010; Barton, 2007; Borgna-Pignatti *et al.*, 2004). DFP odstraňuje také železo z nesrdečního parenchymu, makrofágů, transferinu, feritinu a hemosiderinu. Chelatované železo je poté vylučováno především močí podle dávky DFP. DFP se zdál být slibným orálně podávaným chelátorem, nicméně jeho užití je limitováno vážnými vedlejšími účinky, jako je neutropenie a agranulocytóza (Capellini a Pattoneri, 2009). I přes všechny

nežádoucí účinky je compliance u terapie DFP mnohem větší než u terapie DFO a může být u mnoha pacientů jeho účinnou alternativou (Beutler *et al.*, 2003).

### 3.1.3.2. Deferasirox



**Obr. 6:** Chemická struktura deferasiroxu.

Deferasirox (DFX) (Obr. 6), poprvé zaregistrován v roce 2005 (dle AISLP u nás reg. 2006), je nový, p.o. účinný široce používaný trojvazný chelátor k léčbě přesyčení organismu železem u transfuzí β<sup>0</sup>-talasemie, který poskytuje konstantní 24 hodinovou chelataci s dávkováním jednou denně. Navíc se jedná o bezpečné, dobře tolerované léčivo užívané u dospělých i dětí v krátkodobé i dlouhodobé terapii (Capellini a Pattoneri, 2009; Piga *et al.*, 2006; Barton, 2007, Wood *et al.*, 2010). Většina vedlejších účinků je mírná a/nebo dočasná, např. nevolnost, zvracení, abdominální bolest, zácpa nebo průjem a vyrážka (Cappellini *et al.*, 2006; Vichinsky *et al.*, 2007). DFX je srovnatelný svou účinností s DFO a jeví se jako tolerabilní a bezpečný pro dlouhodobou terapii. V Evropě byl zaveden jako léčivo první volby k léčbě transfuzního přesyčení železem u β<sup>0</sup>-talasemie u pacientů starších 6 let a jako léčivo druhé linie u ostatních stavů spojených s nadbytkem železa u dětí ve věku 2-5 let (Barton,

2007; Cappellini, 2005). DFX vstupuje do různých buněk, především do srdečních myocytů, a chelatuje snadno intracelulární železo. Více než 80% DFX, s nebo bez vázaného železa, je vylučováno stolicí (Barton, 2007).

DFX je chelátor s vysokou afinitou pro železité ionty, dvě jeho molekuly vážou jeden iont železa (Yang *et al.*, 2007). Má minimální afinitu pro jiné dvojmocné ionty kovů, jako je zinek nebo měď, tudíž se neprokázalo žádné klinicky významné snížení hladin zinku a mědi v plazmě u pacientů léčených DFX (Nisbet-Brown *et al.*, 2003; Piga *et al.*, 2006).

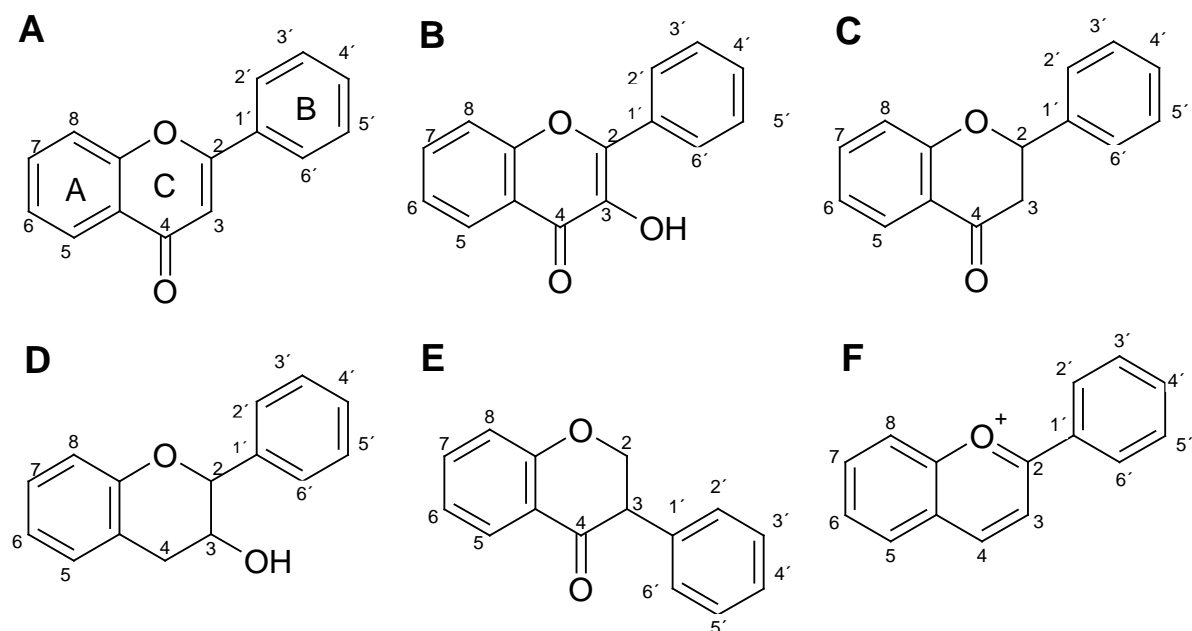
### **3.2. Polyfenolické látky**

Polyfenolické látky jsou rozsáhlou skupinou látek zejména přírodního původu, které jsou opakovaně předmětem výzkumu z důvodu celé řady potenciálních pozitivních vlastností včetně kardioprotektivních vlastností, kdy vyšší příjem polyfenolických látek bývá spojován se sníženou mortalitou u kardiovaskulárních onemocnění (Mennen *et al.*, 2004; Hertog *et al.*, 1993; Sesso *et al.*, 2003). Tyto protektivní účinky mohou být alespoň částečně zprostředkovány nejen schopností přímého vychytávání („zhášení“) volných radikálů, ale i železo-chelatačními vlastnostmi těchto látek, protože volné železo hraje významnou roli v patogenezi některých kardiovaskulárních onemocnění. Na druhé straně redukce trojmocného železa na dvojmocné zvyšuje přísun katalyticky aktivního železa, a proto látky schopné redukovat železo mohou vést k prooxidačním účinkům (Mira *et al.*, 2002; Laughton *et al.*, 1989). Kromě celé řady pozitivních studií existuje i nezanedbatelný počet studií ukazujících spíše na nežádoucí působení těchto látek (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>d</sup>; Mira *et al.*, 2002; Robaszkiewicz *et al.*, 2007).

### 3.2.1. Flavonoidy

Flavonoidy, deriváty benzopyranu s nízkou molekulovou hmotností, jsou přirozeně se vyskytující sekundární metabolity rostlin. Flavonoidy jsou velkou skupinou přírodních polyfenolických sloučenin, nejhojnější antioxidanty (přes 4000 různých flavonoidů) nalezené v běžné stravě. Hlavními zdroji flavonoidů jsou jablka, cibule, moruše, borůvky, čokoláda, červené ovoce, citrusové plody, ořechy a nápoje jako čaj, pivo a víno (Russo *et al.*, 2000; Mennen *et al.*, 2004; Hertog *et al.*, 1995).

Flavonoidy jsou podle chemické struktury rozděleny do několika tříd (Obr. 7): flavonoly, flavanoly, flavony, flavanony, isoflavony a 2,3-dihydro deriváty flavonů nazývané flavanony. Tyto podstupují řadu přeměn ovlivňující heterocyklický kruh C, což umožňuje vznik další rodiny členů flavonoidů zahrnující anthokyaniny a katechiny (Russo *et al.*, 2000; Mennen *et al.*, 2004).



**Obr. 7:** Základní rozdělení flavonoidů: **A:** flavony, **B:** flavonoly, **C:** flavanony, **D:** flavanoly, **E:** isoflavony, **F:** anthokyaniny.

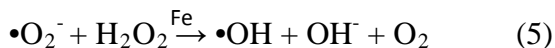
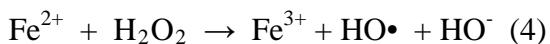
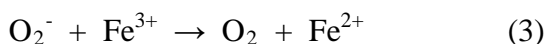
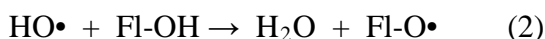
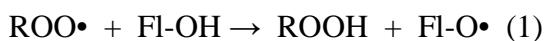
Flavonoidy byly během posledních desetiletí pod rozsáhlým výzkumem kvůli jejich potenciálním antioxidačním, protizánětlivým, antialergickým, antidiabetickým, kardioprotektivním, hepatoprotektivním, gastroprotektivním, antitrombotickým, imunostimulačním, antivirovým a protinádorovým účinkům, které jsou především přisuzované jejich kovy-chelatujícím a volné radikály-zhášejícím účinkům (Mira *et al.*, 2002; van Acker *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1998; Hanasaki *et al.*, 1994). Epidemiologické studie předpokládají, že flavonoidy mají pozitivní vliv na různá kardiovaskulární onemocnění (Hertog *et al.*, 1993; Geleijnse *et al.*, 2002; Knekt *et al.*, 2002; Sesso *et al.*, 2003; Rimm *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1997).

Farmakologické vlastnosti flavonoidů jsou připisány jednak inhibici enzymů, jako je cyklooxygenáza a xantinoxidáza, které jsou zapojené v produkci volných radikálů, ale i jejich přímým RONS-zhášejícím účinkům tvorbou méně reaktivních flavonoid-fenoxylových radikálů (Reakce 1,2), čímž mohou chránit tkáň před toxickými účinky volných kyslíkových radikálů, jako je superoxidový anion ( $O_2^-$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxylový radikál ( $OH^\bullet$ ) (You *et al.*, 1999; Cotelle *et al.*, 1996).

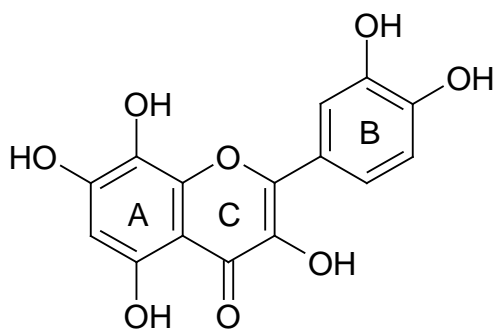
Další antioxidační mechanismus flavonoidů může plynout z jejich přímých interakcí s ionty kovů (především železem a mědí) vedoucí k vytvoření chelátů, které jsou jen velmi málo aktivní z hlediska tvorby RONS (Afanas'ev *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1998).

Na druhé straně bylo u flavonoidů také prokázáno, že mají i pro-oxidační účinky, které jsou spojeny s jejich schopností redukce železa a mědi. Tyto redukováné kovy mohou katalyzovat produkci hydroxylových radikálů mechanismem Fentonovy reakce (Reakce 3,4), která se někdy souhrnně i s redukcí  $Fe^{3+}$  iontů nazývá Haberova-Weissova reakce (Reakce 5) a lipidových radikálů mechanismem rozložení lipidových hydroperoxidů (Brown *et al.*, 1998; Moran *et al.*, 1997; Afanas'ev *et al.*, 1989; Tadolini *et al.*, 1997; Baker a Gebick, 1986, Halliwell, 1978).



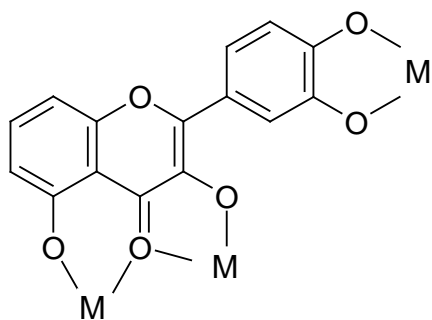


Chemická struktura flavonoidů hraje významnou roli v jejich aktivitě (Obr. 8). Antioxidační schopnost flavonoidů určuje několik faktorů, jako je počet a pozice fenolických vodíků, nasycení heterocyklického kruhu C nebo jakákoliv substituce fenolických vodíků cukrem nebo alkylovou skupinou. Obecně platí, že větší počet volných hydroxylových skupin koresponduje s lepším účinkem flavonoidů jako scavengerů. Přítomnost *ortho*-dihydroxyfenolické struktury B kruhu je považována za nejdůležitější pro zhášecí aktivitu oxidantů, ačkoliv přidané hydroxyskupiny v pozicích 5 a 6 (a 7) u kruhu A mohou nahradit zhášecí funkci hydroxyskupin kruhu B. 3',4'-dihydroxyfenolická struktura kruhu B vypadá jako ideální, protože její interakce s RONS může vyústit ve tvorbu poměrně stálého radikálu. Odstranění nebo derivatizace jedné či více hydroxylových skupin v *ortho* pozici kruhu B významně snižuje RONS-zhášecí aktivitu. 3-hydroxyskupina u kruhu C, ve spojení s přilehlou 2,3-dvojnou vazbou a 4-oxoskupinou, umocňují účinek zhašení radikálů (Rice-Evans *et al.*, 1996; Okawa *et al.*, 2001). Flavonoidy mající pouze volnou 5-hydroxy a/nebo 7-hydroxyskupinu nejsou aktivní, nebo jen velmi slabě. Nicméně 5-hydroxyskupina zlepšuje zhášecí aktivitu flavonoidů obsahujících *ortho*-dihydroxyskupinu na kruhu B (Rice-Evans *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2007). Obecně metylace a také glykosylace spíše redukuje aktivitu ve srovnání s odpovídajícími aglykony (Rice-Evans *et al.*, 1996).



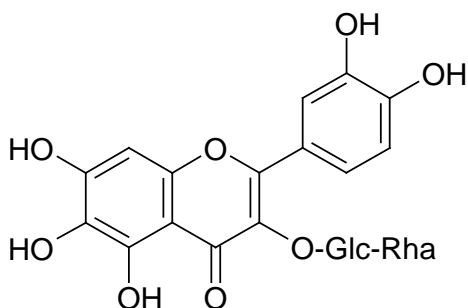
**Obr. 8:** Strukturální kritéria zvyšující antioxidační aktivitu flavonoidů. Detailní popis je uveden v textu.

Chemická struktura je důležitá také pro jejich železo-chelatační účinnost. Existují tři hlavní kov-chelatující domény flavonoidů (Obr. 9): mezi 5-hydroxy a 4-karboxylovou skupinou, mezi 3-hydroxy a 4-karboxylovou skupinou a mezi 3',4'-dihydroxyskupinami umístěnými na kruhu B. Poslední zmíněné chelatační místo vypadá vhodnější, ale není prospěšné za kyselých podmínek, na rozdíl od prvních dvou zmíněných. Důvodem je to, že disociace obou hydroxylových skupin u kruhu B je usnadněná za neutrálních podmínek, ale je limitována za podmínek kyselých. Naopak 5-hydroxy a 4-keto chelatační místo je preferováno za kyselých podmínek vzhledem k podporovanější disociaci 5-hydroxyskupiny, než je tomu u 3-hydroxyskupiny (Mira *et al.*, 2002; Schweigert *et al.*, 2001). Flavonoidy s volnou 6-hydroxy a 7-hydroxyskupinou mohou toto místo využít k chelataci a vypadá to, že je toto místo preferováno před 5-hydroxy a 4-ketoskupinou. Flavonoid chelatující železité ionty musí mít nejméně 2 hydroxyskupiny v *ortho* poloze na kruhu B nebo pravděpodobně 3-hydroxy-4-keto-5-hydroxy strukturu s přítomností 2,3-dvojně vazby. Pyrogallolová struktura kruhu B se zdá, že zvyšuje redukční potenciál flavonoidů i anthocyanidinů (Brown *et al.*, 1998; Mira *et al.*, 2002; Guo M *et al.*, 2007).



**Obr. 9:** Nejobvyklejší možná kov-chelatační místa flavonoidů. M- kov.

### 3.2.1.1. Rutin



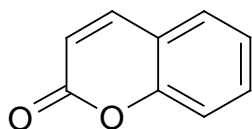
**Obr. 10:** Chemická struktura rutinu.

Rutin (quercetin-3-rhamnosyl glukosid) (Obr. 10), jeden z hlavních představitelů flavonoidů také známý jako vitamin P, je hojně přítomen např. v cibuli, jablkách, čaji a červeném víně a vykazuje rozmanité farmakologické účinky jako protidestičkový, antibakteriální, protinádorový, protizánětlivý a antihypertenzivní, také zlepšuje vlastnosti kapilár (Wadworth a Faulds, 1992; Hertog *et al.*, 1993; Janbaz *et al.*, 2002; Guo R *et al.*, 2007). Existují také studie o jeho na dávce závislých účincích inhibice peroxidace LDL (reakce s lipidovými peroxy-radikály), což je pravděpodobně hlavní důvod, proč rutin snižuje riziko rozvoje aterosklerózy (Gong *et al.*, 2010; Milde *et al.*, 2000; Afanas'ev *et al.*, 1989).

Inhibice tvorby volných radikálů je u rutinu spojena s jeho železo/měď- chelatací, antioxidačními RONS-zhášecími vlastnostmi a inhibicí peroxidace lipidů. V důsledku toho se zdá být potenciální užitečnou látkou v redukci katecholaminové kardiotoxicity. Perorální

předléčba rutinem u potkanů, kterým byl aplikován ISO, brání tvorbě lipidových peroxidů a hladin TBARS a poklesu koncentrace antioxidantů (Karthick a Stanely Mainzen Prince, 2006). Některé klinické a experimentální studie jasně prokázaly, že rutin je štěpen ve střevě a není absorbován jako původní (parentní) sloučenina (Manach *et al.*, 1995; Choudbury *et al.*, 1999; Erlund *et al.*, 2000). Proto není jasné, zda mohou být prospěšné účinky rutinu připsané přímo jemu, nebo jeho metabolitům.

### 3.2.2. Kumariny



**Obr. 11:** Chemická struktura kumarinu.

Kumariny, heterocyklické sloučeniny také známé jako benzopyrony (Obr. 11), jsou velmi rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů obsažených v pozoruhodném množství rostlin a esenciálních olejů a užívaných jako koření, ovšem jejich přítomnost byla objevena také u mikroorganismů a živočišných zdrojů (Borges *et al.*, 2005).

Kumariny jsou látky s různorodou chemickou strukturou, díky různým typům substituce, a spousta z nich je považována za zajímavé sloučeniny pro farmakologický výzkum kvůli jejich širokému spektru potenciálně pozitivních farmakologických účinků (Borges *et al.*, 2005; Campos-Toimil *et al.*, 2002), jako je antioxidační, antiagregační, antialergický, antivirový, protirakovinný, hypolipidemický, protizánětlivý a vazorelaxační (Kostova, 2006; Borges *et al.*, 2005). Tyto účinky mohou některé z nich předurčit k léčbě a/nebo k prevenci kardiovaskulárních onemocnění (Hoult a Paya, 1996; Baccard *et al.*, 2000; Kostova, 2006).

Kumariny jsou kategorizovány do několika skupin: a) jednoduché kumariny, b) furanokumariny, c) pyranokumariny, d) biskumariny a triskumariny, e) kumarinolignany (Kostova, 2006; Borges *et al.*, 2005). Hydroxykumariny jsou typickými fenolickými sloučeninami, ve kterých hydroxyskupina na aromatickém kruhu může vést k redukci jednoho elektronu u volného radikálu a tudíž účinkovat jako silný chelátor kovů a zhasěč volných radikálů. Jsou tedy účinnými antioxidanty (Kostova, 2006; Pedersen *et al.*, 2007). Proto naše studie (Mladěnka *et al.*, 2010) zkoumala účinky jednoduchých kumarinů, především derivátů 4-metylkumarinů, které jsou obvykle považovány za bezpečné látky s antioxidačními vlastnostmi (Fort *et al.*, 1998).

### III. CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo:

- porovnat *in vitro* železo-chelatační účinky testovaných polyfenolických látek při pato/fyziologických pH podmínkách, dále jejich vztah ke struktuře a srovnání jejich účinku se standardním chelátorem deferoxaminem,
- zanalyzovat *in vivo* účinky látek s železo-chelatačním potenciálem na modelu stresové kardiomyopatie navozeném vysokými dávkami ISO, v mnoha aspektech připomínající AIM u lidí.

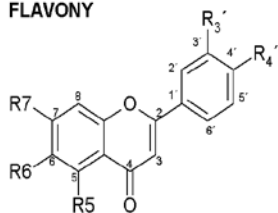
## IV. MATERIÁL A METODIKA

### 1. Chemikálie

*In vitro experimenty:* sodná sůl 3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4', 4''- disulfonické kyseliny (ferrozin), heptahydrát sulfátu železnatého, hexahydrát chloridu železitého, hydroxylamin, dimethyl sulfoxid (DMSO), acetát sodný, kyselina octová, 4-(2-hydroxyethyl)-piperazineethanesulfonová kyselina (HEPES), sodná sůl HEPES, flavonoidy (Sigma-Aldrich, Německo) (Obr. 12), 4-hydroxykumariny (Obr. 13) (syntetizovány na University of Delhi, Faculty of Science, Department of chemistry, Indie). Scopoletin, umbelliferon a scopolin (N<sub>2</sub>-N<sub>4</sub>) byly izolovány z *Evolvulus alsinoides* (Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze), deferoxamin (Novartis, Švýcarsko)

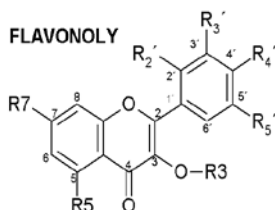
*In vivo experimenty:* fyziologický roztok (Braun, Německo), isoproterenol (Sigma-Aldrich, USA), rutin (Sigma-Aldrich, USA), dexrazoxan (Cardioxane®, Chiron, UK), uretan (Sigma-Aldrich, USA), chlorid draselný (Sigma-Aldrich, USA), 25% roztok NaCl s 500 IU heparinu (Heparin Léčiva, Zentiva A.S., Česká republika)

**FLAVONY**



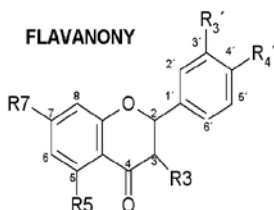
<i>flavon</i>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>
flavon	H	H	H	H	H
5-hydroxyflavon	OH	H	H	H	H
7-hydroxyflavon	H	H	OH	H	H
chrysin	OH	H	OH	H	H
apigenin	OH	H	OH	H	OH
luteolin	OH	H	OH	OH	OH
negletein	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H
baicalein	OH	OH	OH	H	H
mosloflavon	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
diosmin	OH	H	O-Glc-Rha	OH	OCH <sub>3</sub>

**FLAVONOLY**



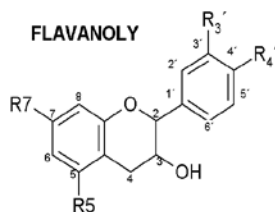
<i>flavonol</i>	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>2'</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5'</sub>
3-hydroxyflavon	H	H	H	H	H	H	H
kaempferol	H	OH	OH	H	H	OH	H
quercetin	H	OH	OH	H	OH	OH	H
morin	H	OH	OH	OH	H	OH	H
myricetin	H	OH	OH	H	OH	OH	OH
rutin	-Glc-Rha	OH	OH	H	OH	OH	H
troxerutin	-Glc-Rha	OH	O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -OH	H	O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -OH	O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -OH	H

**FLAVANONY**



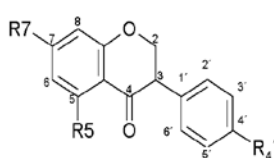
<i>flavanon</i>	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>
naringenin	H	OH	OH	H	OH
naringin	H	OH	O-Glc-Rha	H	OH
hesperetin	H	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
hesperidin	H	OH	O-Glc-Rha	OH	OCH <sub>3</sub>
taxifolin	OH (konf. S)	OH	OH	OH	OH

**FLAVANOLY**



<i>flavanol</i>	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	konformace
epikatechin	OH	OH	OH	OH	2R, 3R
katechin	OH	OH	OH	OH	2R, 3S

**ISOFLAVONOIDY**

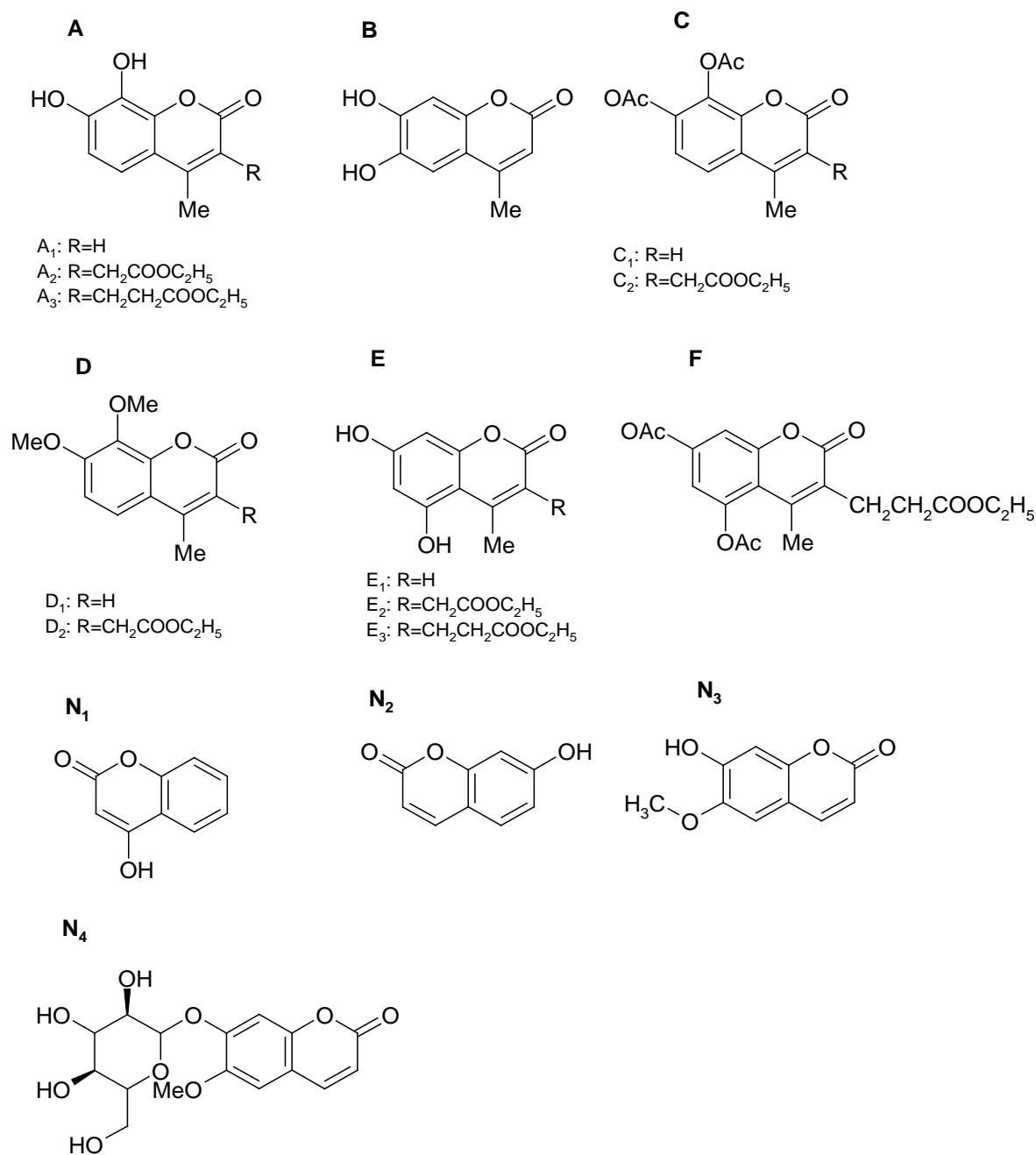


<i>isoflavonoid</i>	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>4'</sub>
daidzein	H	OH	OH
genistein	OH	OH	OH

**Obř. 12:** Chemická struktura vřech flavonoidů testovaných v této studii.

Glc: glukóza, Rha: rhamnóza (Mladěnka *et al.*, 2011).





**Obř. 13:** Chemická struktura testovaných kumarinů. Syntetizované 4-methylkumariny byly rozděleny do 6 skupin podle chemické struktury: 7,8-dihydroxy-4-methylkumariny (skupina A), 6,7- dihydroxy-4-methylkumarin (známý take jako 4-methylesculetin, skupina B, pouze jedna látka), 7,8-diacetoxy-4-methylkumariny (skupina C), 7,8-dimethoxy-4-methylkumariny (skupina D), 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny (skupina E), 5,7-diacetoxy-4-methylkumarin (skupina F, jediná látka). Přírodní kumariny (skupina N) jsou reprezentovány 4-hydroxykumarinem (N<sub>1</sub>), umbelliferonem (7-hydroxykumarin, N<sub>2</sub>), scopoletinem (N<sub>3</sub>) a jeho β-D-glykosidem scopolinem (N<sub>4</sub>) (Mladěnka *et al.*, 2010).

## 2. Přístrojové vybavení

### ***In vitro* experimenty:**

- spektrofotometr Anthos reader 2010 (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Rakousko)

### ***In vivo* 24- hodinové pokusy:**

- Cardiosys<sup>®</sup> (Experimentria Ltd, Maďarsko) se softwarem Cardiosys<sup>®</sup> V 1.1
- polyetylenový (PE) katétr (0.5/1.0 mm vyplněný heparinizovaným fyziologickým roztokem 50 IU.ml<sup>-1</sup>)
- termokatétr (o.d. 0.8 mm)
- polyetylenový (PE) katétr (0.5/1.0 mm vyplněný heparinizovaným fyziologickým roztokem 50 IU.ml<sup>-1</sup>) spojený se snímačem krevního tlaku BPR-01 (Experimentria Ltd, Maďarsko)

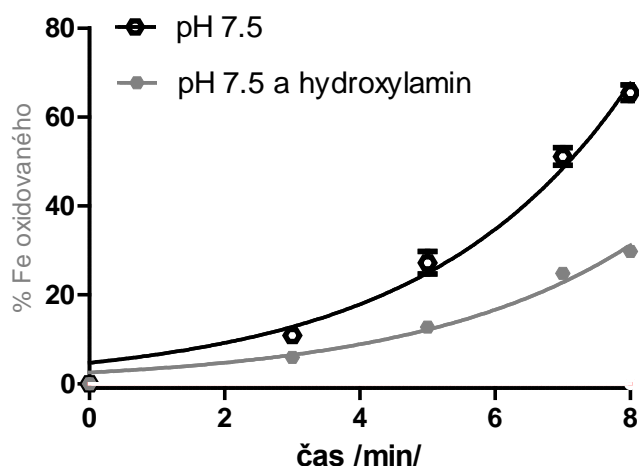
### ***In vivo* 2-hodinové pokusy:**

- tlakový snímač MLT0380/D (AdInstruments, Austrálie)
- polyetylenový (PE) katétr 0.5/1.0 mm
- Millar PV-katétr SPR-838 (2F, 4E, 9 mm; Millar Instruments, Inc., Houston, U.S.A.)
- EKG modul- subkutánní elektrody- standardní končetinový svod II (MLA1215, AdInstruments, Austrálie)
- přístroj PowerLab<sup>®</sup> vybaveným softwarem LabChart<sup>®</sup> verze 6 (AdInstruments, Austrálie)
- vyhřívaná destička pro udržení stálé teploty (TCAT-2LV Controller, Physitem Instruments Inc., U.S.A.)

### **3. Metodika experimentů v *in vitro* podmínkách - stanovení chelatace železa**

Ferrozín je specifické činidlo, které tvoří purpurově zbarvený komplex (absorpční maximum v 562 nm) s železnatými ionty (Stookey, 1970). Železnaté ionty jsou měřeny přímo přidáním ferrozínu (50  $\mu$ l, 5 mM ve vodě). Pro stanovení celkového železa je nejdříve přidán vodný roztok hydroxylaminu (50  $\mu$ l, 10 mM) k redukci železitých iontů na železnaté, jejichž koncentrace je poté změřena přidáním ferrozínu (Mladěnka et al., 2010). Různé koncentrace DMSO roztoků zkoušených látek (flavonoidů, kumarinů, dexrazoxanu) byly smíchány s železnatými nebo železitými ionty (výsledná koncentrace 50 $\mu$ M) v nepufrovaném prostředí a v acetátových (pH 4,5 and 5,5) a HEPES (pH 6,8 and 7,5) pufrech. U pH 7,5 stoupá s časem oxidace železnatých iontů a tudíž byl přidán jako reduktant hydroxylamin k prevenci této oxidace (Obr. 14).

Všechny experimenty byly provedeny na 96-jamkové destičce. Každý vzorek byl měřen minimálně dvakrát s přidáním ferrozínu a dvakrát také bez ferrozínu (tzv. „blank“ vzorek). Absorbance byla měřena okamžitě po přidání ferrozínu a o 5 minut později znovu pomocí spektrofotometru Anthos reader 2010. Koncentrace železnatých iontů byla kontrolována u každého pokusu. Pro srovnání železo-chelatační aktivity byl použit DFO jako standardní chelátor železa. Ferrozín je také chelátor železa, proto je po 5 minutách dosaženo určitého stupně chemické rovnováhy mezi chelatací železa testovaných látek a ferrozínu. Stabilita komplexů železa se zkoumanými látkami a DFO byla vypočtena jako % chelatace železa po 5 minutách dělená % chelatace železa v čase 0.



**Obr. 14:** Oxidace železnatých iontů při pH 7,5 a s přidáním hydroxylaminu. U ostatních použitých pH k oxidaci prakticky nedochází.

### Výpočty a statistická analýza

Množství zbývajících železa bylo vypočteno jako rozdíl absorbance testovaného vzorku (s ferrozinem) a jeho odpovídajícího blanku dělený rozdílem kontrolního vzorku a jeho blanku.

Normalizovaná na dávce závislá křivka byla zkonstruovaná užitím GraphPad Prism vision 4.00 pro Windows. Schopnost chelatace železa v poměru molárních koncentrací 10:1 (nebo 1:1 pro flavonoidy) (látka:železo) byla vypočtena z rovnice křivky:

$$y = 100 (1 + 10^{(\log EC_{50} - x) \cdot k})^{-1}$$

kde  $y$  = účinnost chelatace železa v %,  $x$  = dekadický logaritmus poměru koncentrace látka:železo,  $k$  = sklon křivky.

Data jsou vyjádřena jako průměry  $\pm$  SD, rozdíly mezi skupinami byly považovány jako významné při  $P \leq 0,05$ . Skupiny byly srovnány jednostranným ANOVA testem následovaným testem Bonferroniho.

## 4. Metodika experimentů v *in vivo* podmínkách

### Pokusná zvířata

Mladí samci potkana Wistar:Han z Biotest s.r.o. (Konárovice, Česká republika), vážící přibližně 360 g, byli použiti po dvou týdnech aklimatizace ve viváriu. Zvířata byla umístěna v klimatizované místnosti s volným přístupem ke standardní peletové dietě pro hlodavce a k vodě. Zvířata byla nalačno 12 hodin před pokusy.

Studie byla provedena pod dohledem Etické komise Univerzity Karlovy v Praze, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a podřizuje se “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” publikovaných v US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Fyziologický roztok nebo látka(y) byla(y) aplikována(y) 24 hodin před chirurgickými procedurami a měřeními.

### 24-hodinové pokusy- rutin:

Zvířata byla náhodně rozdělena do 6 skupin:

- *kontrolní skupina* (C, 7 zvířat) obdržela fyziologický roztok 1 ml.kg<sup>-1</sup> s.c.
- *ISO skupina* (10 zvířat) – obdržela 100 mg.kg<sup>-1</sup> ISO ve vodném roztoku s.c.
- *skupina rutin*– potkani obdrželi buď 11,5 mg.kg<sup>-1</sup> (Ru11, 7 zvířat) nebo 46 mg.kg<sup>-1</sup> rutinu i.v. (Ru46, 7 zvířat).
- *kombinační skupiny* – potkani obdrželi buď 11,5 mg.kg<sup>-1</sup> (Ru11+ISO, 10 zvířat) nebo 46 mg.kg<sup>-1</sup> rutinu i.v. (Ru46+ISO, 17 zvířat) 5 minut před aplikací ISO u výše zmíněných dávek.

## **24-hodinové pokusy- dexrazoxan:**

Zvířata byla náhodně rozdělena do 6 skupin:

- *kontrolní skupina I* (7 zvířat) – 2 ml.kg<sup>-1</sup> fyziologického roztoku s.c.
- *ISO skupina I* (10 zvířat) – ISO 100 mg.kg<sup>-1</sup> s.c.
- *DEX skupina I* (7 zvířat) – 20,4 mg.kg<sup>-1</sup> DEX i.v.
- *kombinační DEX- ISO skupina I* (8 zvířat) – potkani obdrželi DEX 5 minut před ISO ve stejné dávce jako výše.

## **2-hodinové pokusy- dexrazoxan:**

Zvířata byla náhodně rozdělena do těchto skupin:

- *kontrolní skupina IIa* (3 zvířata) – stejná jako kontrolní skupina I (viz výše)
- *kontrolní skupina IIb* (3 zvířata) – potkani obdrželi 1 ml fyziologického roztoku i.v.
- *DEX skupina II* (5 zvířat) - 20,4 mg.kg<sup>-1</sup> DEX i.v.
- *ISO skupina II* (9 zvířat) - ISO 100 mg.kg<sup>-1</sup> s.c.
- *DEX- ISO skupina II* (5 zvířat) - potkani obdrželi DEX 5 minut před ISO ve stejné dávce jako výše.

## **Postup měření**

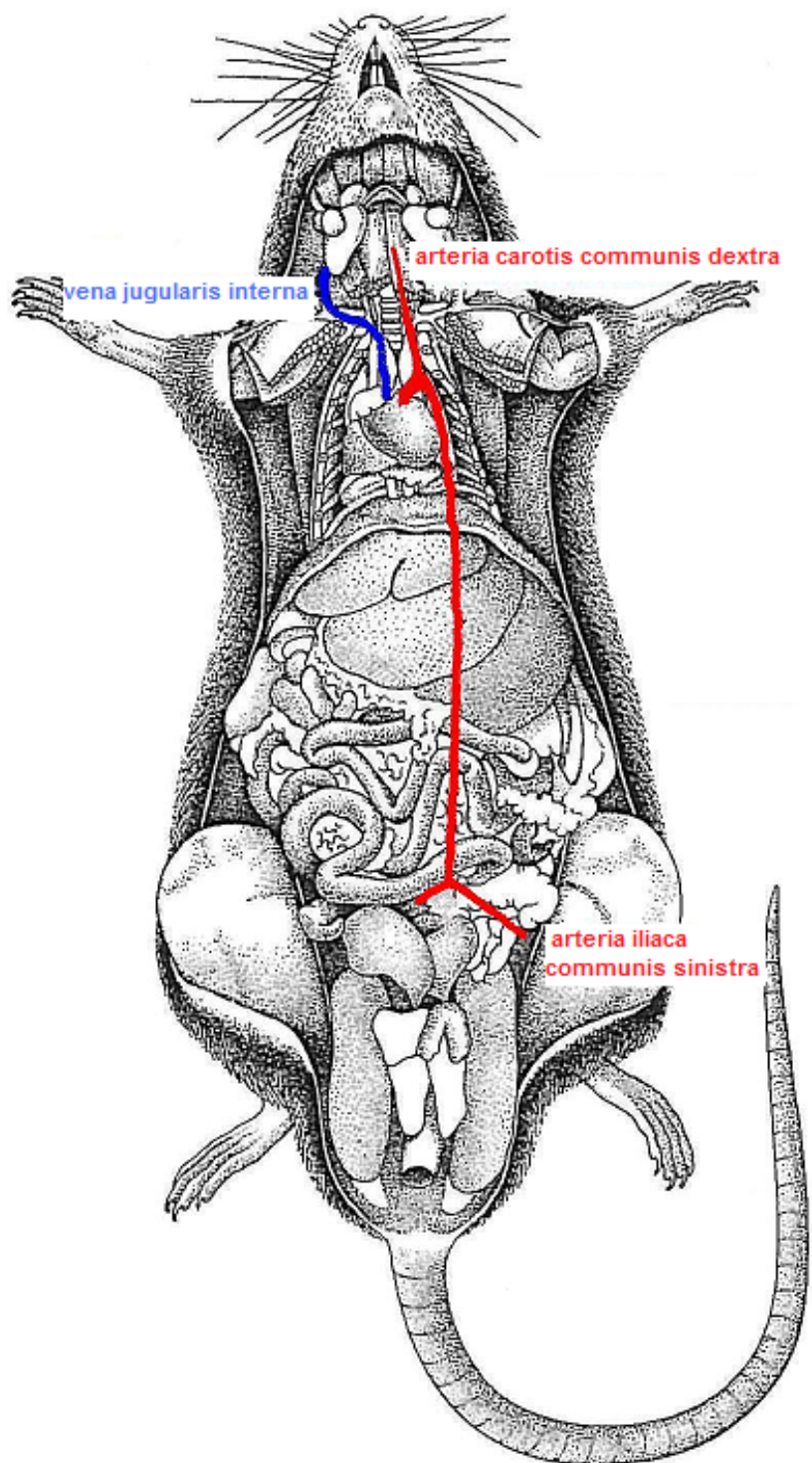
### **Měření srdečních funkcí po 24 hodinách:**

Potkani byli anestetizováni uretanem (1,2 g.kg<sup>-1</sup> i.p.). PE-katétr vyplněný heparinizovaným fyziologickým roztokem byl zaveden do pravé vena jugularis pro podání studeného fyziologického roztoku (přibližná teplota 10°C). Termokatétr (o.d. 0,8 mm) byl zaveden přes levou arteria carotis comm. do aortálního oblouku. Jiný PE-katétr vyplněný heparinizovaným fyziologickým roztokem byl zaveden do levé arteria iliaca, která byla

spojena se snímačem krevního tlaku BPR-01 přístroje pro měření hemodynamických změn Cardiosys<sup>®</sup> (Obr. 15). Pro měření srdečního minutového výdeje byla užita termodiluční transpulmonální metoda podle Stewarta-Hamiltona (Spiller a Webb-Peploe, 1985).

Měření hemodynamických parametrů bylo zrealizováno 15 minut po zavedení katétrů. Funkční změny (srdeční minutový výdej, tepový objem, krevní tlak, srdeční frekvence) byly zprůměrovány ze 4 měření provedených v 5 minutových intervalech. Výsledky byly vyjádřeny jako indexy (měřené parametry vztažené k hmotnosti potkana) s výjimkou tlaku krve, srdeční frekvence a tzv. „dvojproduktu“ (systolický tlak krve násobený srdeční frekvencí). Poslední parametr je běžně užíván jako nepřímý index srdeční spotřeby kyslíku. Celková periferní rezistence byla vypočtena jako podíl středního tlaku krve a srdečního minutového výdeje.

Krevní vzorek (přibližně 5 ml) byl odebrán po hemodynamickém měření z abdominální aorty do heparinizované testovací zkumavky (170 IU). Poté bylo zvíře usmrceno předávkováním i.v. roztokem chloridu draselného (1 mM), srdeční komory byly vyňaty, zváženy a zmrazeny při -20°C pro pozdější analýzu obsahu vybraných prvků.

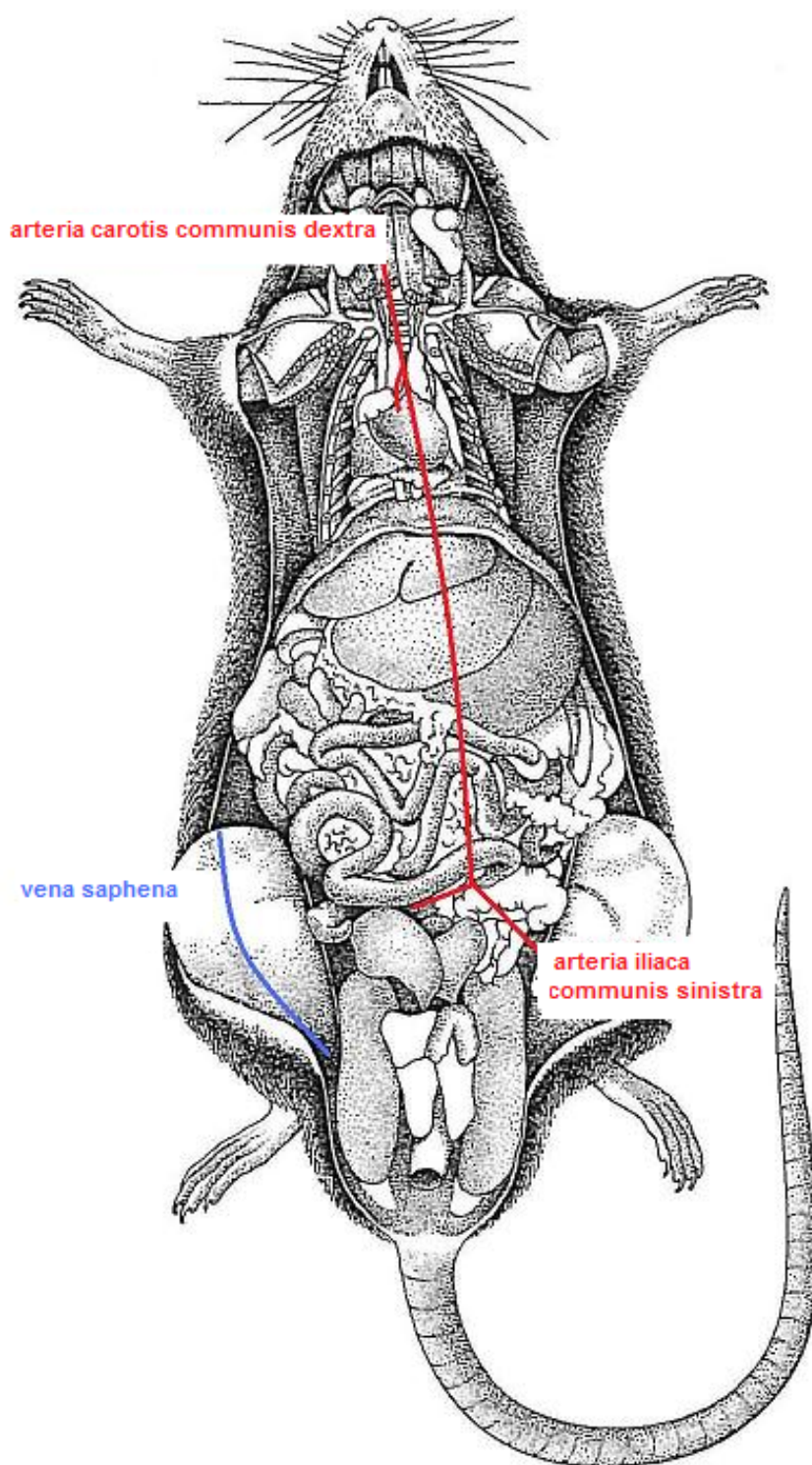


**Obr. 15:** Zobrazení zavedení katétrů u 24-hodinového pokusu: PE-katétr do pravé vena jugularis, termokatétr přes levou arteria carotis communis dextra do aortálního oblouku a další PE-katétr do arteria iliaca communis sinistra.



## **2-hodinové měření srdečních funkcí:**

Potkani vážící přibližně 370 g byli anestetizováni i.p. roztokem uretanu (stejná dávka jako výše) před aplikací látek. Tlakový snímač MLT0380/D spojený s PE-katétrem 0,5/1,0 mm (naplněný heparinizovaným roztokem 10 IU/ml), byl zaveden do levé arteria iliaca comm. Millar PV-katétr SPR-838 byl zaveden do levé srdeční komory přes pravou arteria carotis comm. (Obr. 16). Tlakový snímač i Millar PV-katétr spolu se subkutánními elektrodami pro snímání EKG (standardní končetinový svod II), byly spojeny s přístrojem PowerLab. Po 15 min stabilizace parametrů byla provedena kalibrace objemu, důležitá pro určení objemu krve v levé komoře, pomocí aplikace 20  $\mu$ l 25% heparinizovaného roztoku NaCl do vena saphena. Poté byl zvířatům podán fyziologický roztok nebo látka(y). Zvířata byla monitorována po dvě hodiny. Teplota zvířete byla udržována pomocí vyhřívané destičky během celého experimentu na  $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Pokus byl ukončen stejně jako tomu bylo u 24-hodinových pokusů (viz výše).



**Obr. 16:** Zobrazení zavedení katétrů u 2-hodinového pokusu: tlakový snímač spojený s PE-katétrem do arteria iliaca communis sinistra, Millar katétr do levé komory prostřednictvím arteria carotis communis dextra a kanylace vena saphena pro kalibraci přístroje a aplikaci léčiv.

## **Histologická analýza**

Po pitvě byly apikální části srdce dány do Bouinova roztoku a zpracovány pro světelnou mikroskopii. Tkáně byly zbaveny vody ve vzrůstajících koncentracích etanolu, impregnovány v parafinu a nařezány na 5-8  $\mu\text{m}$  silné řezy. Tkáňové řezy byly zbarvené hematoxylinem a eosinem. Fotodokumentace a digitalizace obrázků byly pořízeny světelným mikroskopem Olympus AX 70 s digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. Ottawa, Kanada) se softwarem analýzy obrázků NIS (Laboratory Imaging, Česká republika).

## **Biochemická analýza krve**

Biochemické měření bylo provedeno v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové (ÚKBD FN HK).

Srdeční troponin T (cTnT) a vitamin E byly měřeny v séru, malondialdehyd (MDA) v plazmě a celkový glutation (koncentrace redukováného a oxidovaného glutationu) v krvi. cTnT byl určen elektrochemoluminiscenční imunoanalýzou (Elecsys 2010, Roche Diagnostics), která používá dvě monoklonální protilátky specificky zaměřené proti cTnT. MDA byl změřen jako červený komplex s tiobarbiturovou kyselinou (TBARS) při 485, 532 a 560 nm užitím Beckman DU 640 spektrofotometru (Beckman, Palo Alto, USA). Kapilární elektroforéza byla využita pro separaci glutationu, který byl změřen UV detekcí (System P/ACE 5100, Beckman) při 200 nm. Po deproteinizaci byla provedena analýza vitaminu E fluorimetrickou detekcí v HPLC systému HP1050 (Hewlett Packard, Německo).

## **Prvky v myokardu**

Zmrazené vzorky srdeční tkáně byly vysušeny, zváženy a vyluhovány pomocí mikrovlánné digesce užitím kyseliny dusičné a peroxidu vodíku (Milestone MLS 1200 MEGA,

Itálie). Železo, měď a selen byly změřeny užitím grafitové atomové absorpční spektrofotometrie (Unicam, Solaar 959, U.K.), zinek byl stanoven užitím plamenné atomové absorpční spektrofotometrie (Unicam, Solaar 959, U.K.) a vápník byl měřen fotometricky užitím plamenné fotometrie (Eppendorf, Efox 5053, Německo). Výsledky byly vyjádřeny v  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  (železo, měď, zinek, vápník) nebo  $\text{nmol.g}^{-1}$  (selen) suché tkáně.

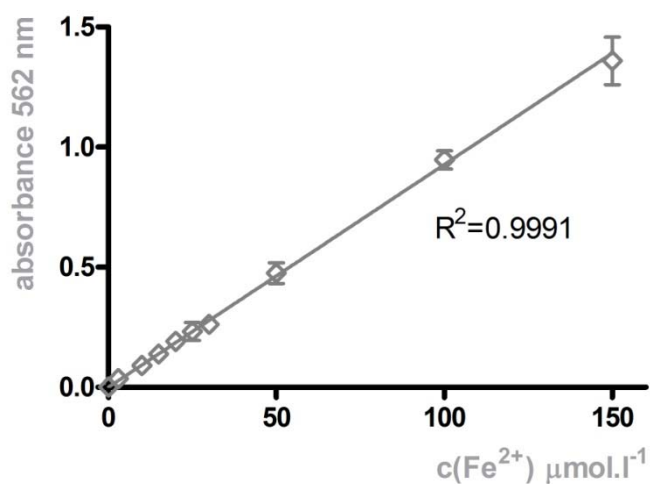
### **Analýza dat**

Data jsou vyjádřena jako průměry  $\pm$  SEM. Skupiny byly srovnány jednosměrným ANOVA testem následovaným Tukeyho srovnávacím testem. K analýze byl využit software GraphPad Prism verze 4.00 pro Windows (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, U.S.A). Rozdíly mezi skupinami byly považovány jako významné při  $P \leq 0,05$ , pokud není uvedeno jinak.

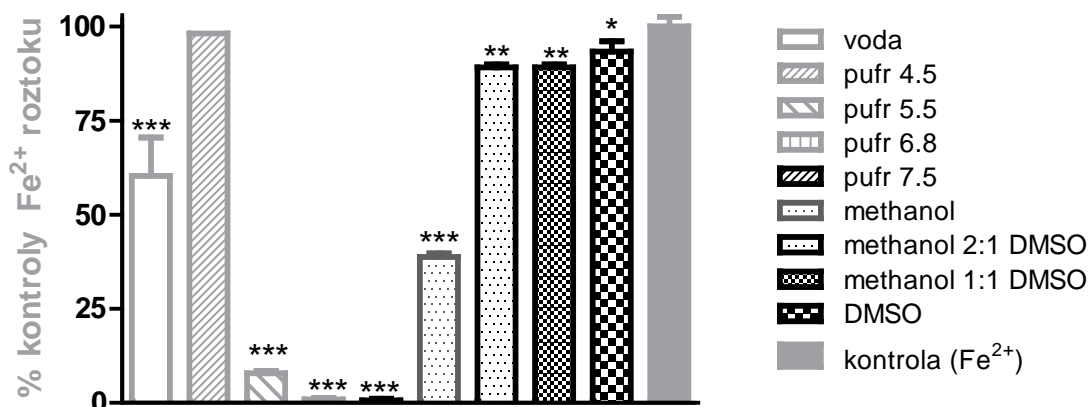
## V. VÝSLEDKY

### 1. Stanovení chelatace železa v *in vitro* podmínkách

Ferrozín je specifický indikátor železnatých iontů. Koncentrace železnatých iontů přímo odpovídá změřené absorbanci (Obr. 17). Ferrozín ale nereaguje s železitými ionty, ovšem existuje možná metoda redukce na železnaté ionty přidáním vhodného redukčního činidla, hydroxylaminu, kde ale prostředí hraje významnou roli. Z testovaných rozpouštědel/pufřů pouze DMSO ( $93 \pm 3\%$  redukovaných železitých iontů) a acetátový pufr o pH 4,5 ( $98 \pm 0\%$ ) tvořily přijatelné podmínky pro redukci železitých iontů. Voda, metanol nebo pufrы v rozsahu pH 5,5-7,5 byly spojeny s nízkou nebo většinou s žádnou redukcí železitých iontů (Obr. 18).



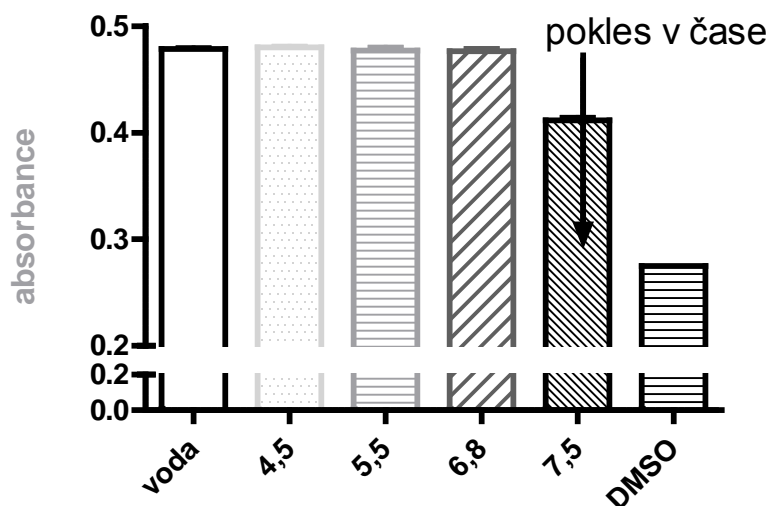
Obr. 17: Kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci železnatých iontů.



**Obr. 18: Vliv různých prostředí na redukci železitých iontů.** Redukce 50  $\mu\text{M}$  železitých iontů hydroxylaminem (finální koncentrace 2mM) byly srovnány v různých prostředích se stejnými koncentracemi kontrolního roztoku železnatých iontů. Statistická významnost vs. kontrola: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  (Mladěnka *et al.*, 2010).

V případě železnatých iontů byly jejich komplexy s ferrozinem během experimentu stále ve všech testovaných prostředích s výjimkou pufru o pH 7,5, kde stoupá oxidace železnatých iontů s časem. Pro tento účel byly chelatační pokusy v tomto pH prováděny s přidáním hydroxylaminu jako redukčního činidla, aby eliminoval oxidaci (Obr. 19).

Jak flavonoidy, tak i kumariny, byly nejúčinnějšími chelatačními činidly za podmínek blízkých fyziologickému pH, tzn. neutrálnímu nebo jemu velmi blízkému pH (6,8; 7,5), naopak tuto účinnost ztrácely v kyselém prostředí (4,5; 5,5).



Obr. 19: Oxidace železnatých iontů v prostředí o pH 7,5.

### 1.1. Chelatace flavonoidy

S výjimkou flavonu, 7-hydroxyflavonu a daidzeinu, všechny testované flavonoidy byly schopny v různých stupních chelatovat železo v různých pH prostředích (Obr. 20, 21).

Všechny flavonoidy tvořily stálé komplexy se železem v neutrálních nebo mírně kyselých podmínkách (pH 6,8 a 7,5). Některé flavony, flavonoly a také flavanony, především ty s přilehlými hydroxyskupinami na kruhu A nebo B, a/nebo volnou 3-hydroxyskupinu, byly schopny dosáhnout účinnosti chelatace železnatých iontů jako standardní chelátor železa DFO. Testované flavanony bez katecholického B kruhu byly zřetelně méně účinnou skupinou flavonoidů, pouze s mírnými chelatačními účinky při pH 7,5.

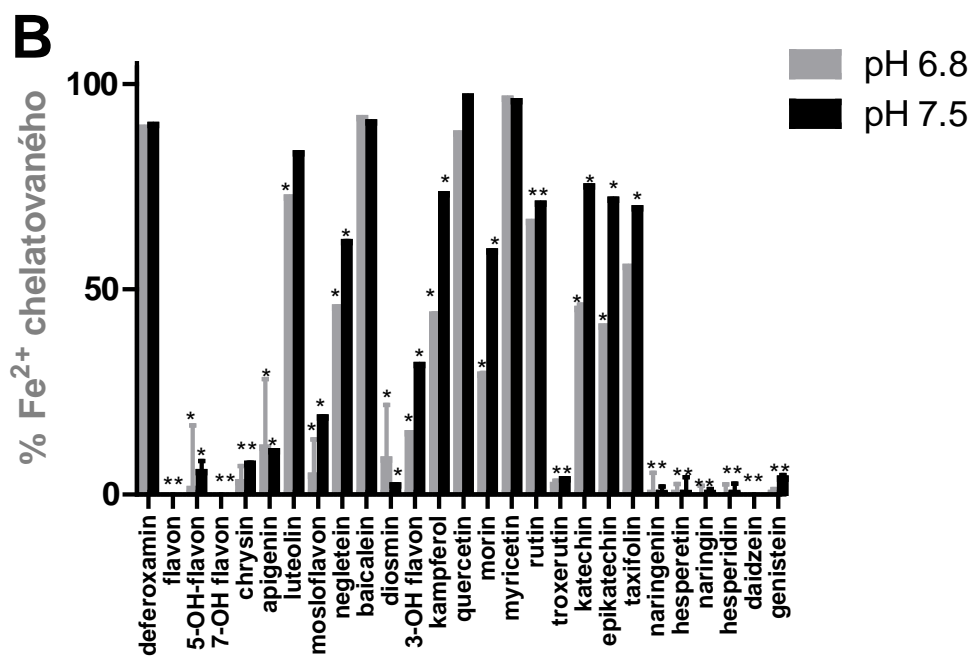
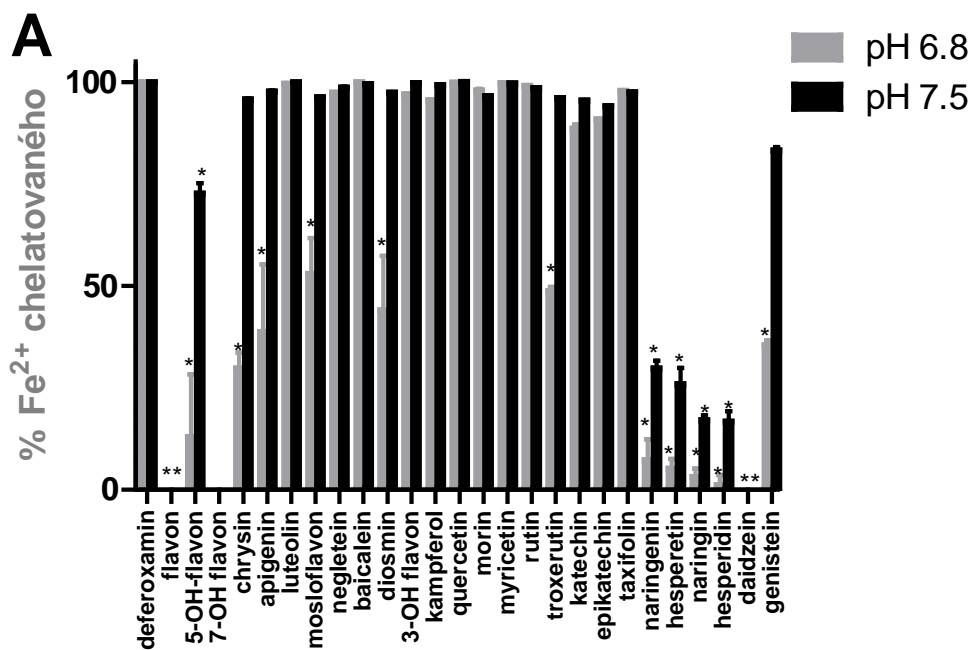
Za kyselejšího pH pouze několik flavonoidů prokázalo určitou chelataci železnatých iontů ve srovnání s DFO. Testované flavanony byly většinou bez jakéhokoliv účinku. Při pH 5,5 pouze baicalein s volnými 5,6,7-hydroxyskupinami a flavonoly s 3-hydroxy-4-keto-5-hydroxy rozložením a s nejméně dvěma volnými hydroxyskupinami na kruhu B v *ortho* poloze, dosáhly účinnosti DFO. Baicalein byl podobně aktivní jako DFO dokonce i v poměru

1:1, narušil od ostatních flavonolů, které dosáhly účinnosti DFO pouze v poměru 10:1. A tyto komplexy flavonoidů s železnatými ionty byly stále při pH 5,5.

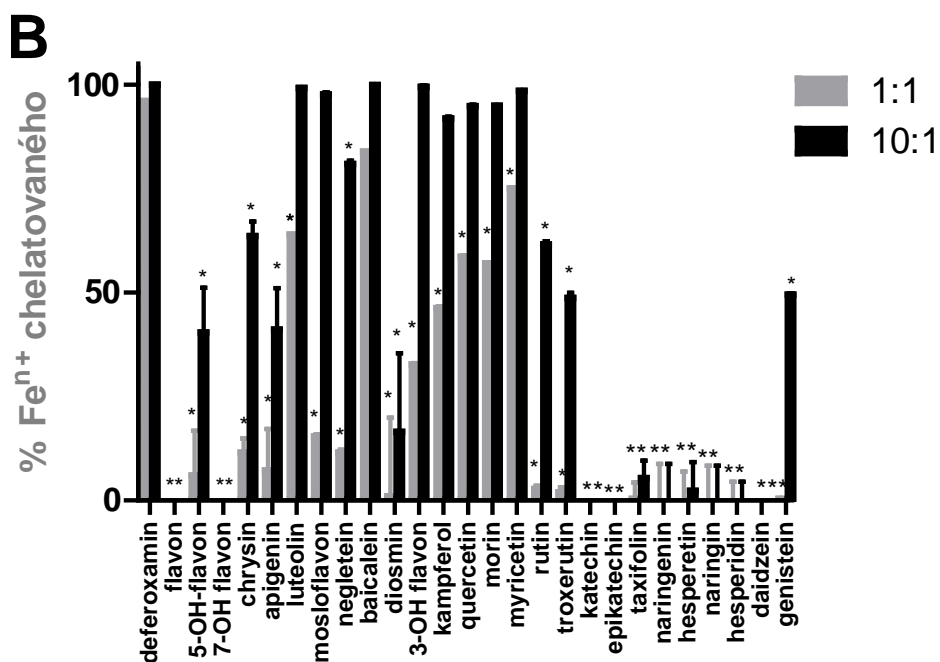
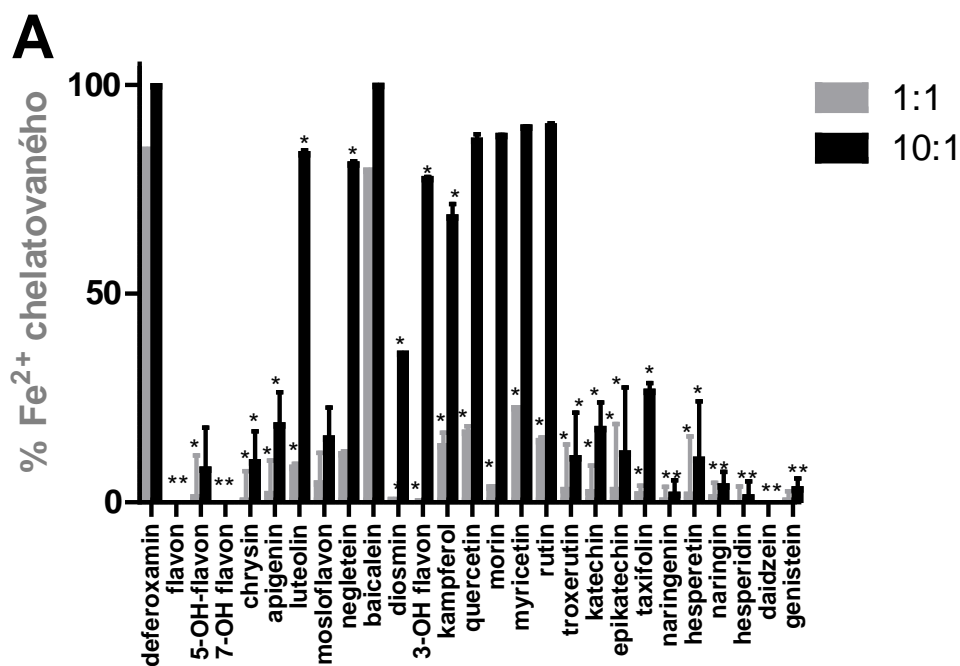
Při pH 4,5 flavonoidy téměř nechelatovaly žádné železnaté ionty v poměru 1:1, s výjimkou baicaleinu ( $18 \pm 2\%$ ). V poměru 10:1 baicalein chelatoval  $70 \pm 2\%$ , morin chelatoval  $35 \pm 2\%$ , zatímco jiné flavonoidy nechelatovaly železo více než 25%. Účinnost baicaleinu nebyla významně odlišná od standardního chelátoru železa DFO ( $75 \pm 1\%$ ). Obojí komplexy DFO i baicaleinu byly stabilní.

Chelatace celkového železa, tj. železitých i železnatých iontů, při pH 4,5 reprezentovala jasný rozdíl s chelatací pouze železnatých iontů. Opět baicalein a flavonoly alespoň s volnou 3-hydroxyskupinou a některé flavony dosáhly nebo měly téměř stejnou účinnost jako DFO. Zde, oproti jiným více neutrálním pH, katecholický B kruh bez 3-hydroxy-4-keto nebo 5-hydroxy-4-keto uspořádání a 2-3 dvojně vazby neměl žádný účinek na chelataci. Navíc některé flavonoidy, zvláště ty s 5-hydroxy-4-keto uspořádáním bez 3-hydroxyskupiny a/nebo katecholického B kruhu, netvořily stále komplexy železa.





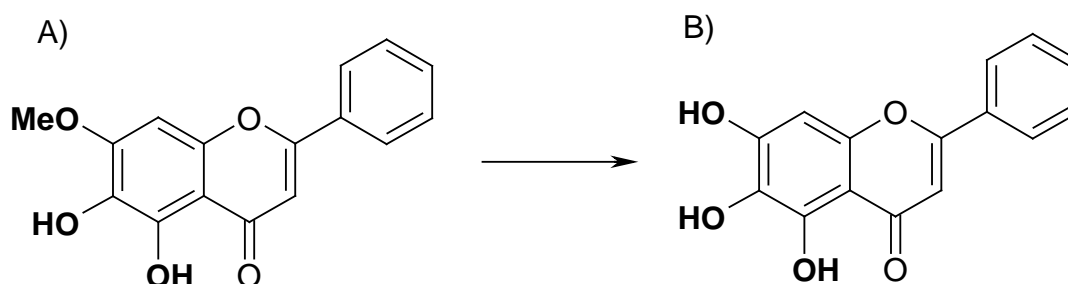
**Obr. 20:** Chelatace železa flavonoidy. Chelatace železnatých iontů při pH 6,8 and 7,5 (A: poměr molárních koncentrací 10:1, B: poměr 1:1 flavonoid:železo). Účinnost chelatace železa byla srovnána s DFO: \* P<0,05 (Mladěnka *et al.*, 2011).



**Obr. 21:** Chelatace železa flavonoidy. Chelatace železnatých iontů při pH 5,5 (**A**) a celková chelatace železa při pH 4,5 (**B**). Účinnost chelatace železa byla srovnána s DFO: \* P<0,05 (Mladěnka *et al.*, 2011).

Dále byl v naší studii srovnán železo-chelatační účinek úzce příbuzných flavonoidů pro charakterizaci přispění různých funkčních skupin:

- 1) Hydroxyskupina na kruhu A. Rostoucí počet volných hydroxyskupin na kruhu A zlepšoval chelatační schopnost: baicalein s volnými 5,6,7-hydroxyskupinami byl účinnější než negletein s volnými 5,6-hydroxyskupinami (Obr. 22). Negletein byl ale účinnější než 5-hydroxyflavon.

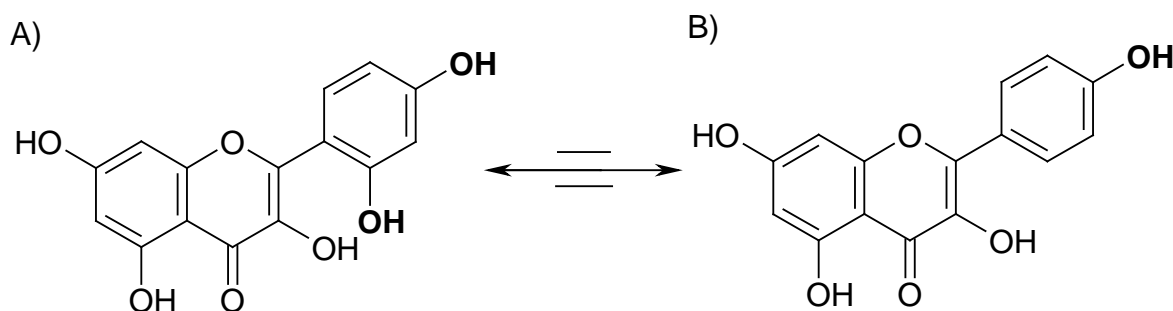


**Obr. 22:** Vliv 7-hydroxyskupiny na kruhu A a její metylace na chelatační účinnost u A) negleteinu a B) baicaleinu. Směr šipky poukazuje na účinnější sloučeninu.

Žádné rozdíly nebyly u všech pH nalezeny (Mladěnka *et al.*, 2011).

- 2) Hydroxyskupiny na kruhu B. Narozdíl od kruhu A, neprojevily se žádné rozdíly mezi katecholovým (dvě hydroxyskupiny v *ortho* pozici) a pyrogallovým (tři přilehlé hydroxyskupiny) uspořádání na kruhu B. Podobně jedna nebo dvě hydroxyskupiny v *meta* poloze nepředstavovaly žádnou výhodu ve srovnání s flavonoidy bez žádné hydroxyskupiny na kruhu B. Nebyly žádné rozdíly mezi flavonolem morinem (dvě hydroxyskupiny v *meta* pozici 2' a 4' na kruhu B) a kampferolem (pouze jedna hydroxyskupina v pozici 4' na kruhu B), s výjimkou chelatace železnatých iontů při pH 4,5 (Obr. 23). Navíc byly katechol a pyrogallol v porovnání s jednou nebo žádnou hydroxyskupinou na kruhu B spojeny s vyšší chelatací jen za neutrálních nebo mírně kyselých podmínek (pH 6,8 a 7,5). V kyslejších prostředí nebyly žádné rozdíly mezi

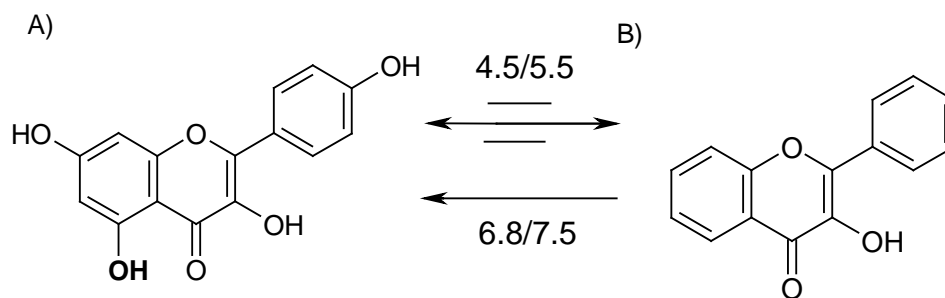
flavonoidy s jednou, dvěma a třemi hydroxyskupinami na kruhu B u testovaných koncentrací.



**Obr. 23:** Vliv počtu hydroxyskupin na kruhu B na chelatační účinnost u A) morinu a B) kampferolu. Oboustranná šipka poukazuje na žádné rozdíly mezi sloučeninami.

Žádné rozdíly nebyly u všech pH nalezeny (Mladěnka *et al.*, 2011).

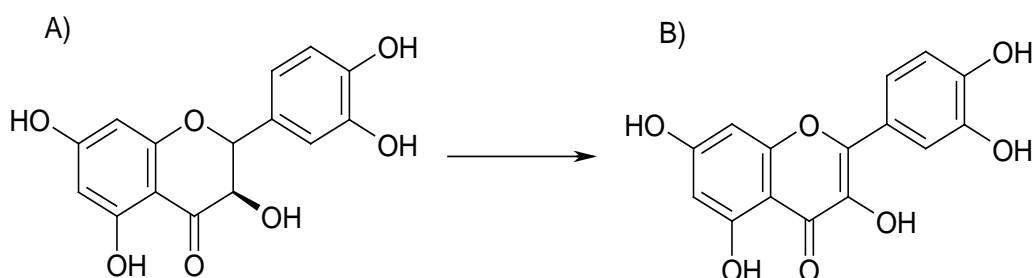
- 3) 3-hydroxyskupina. Volná 3-hydroxyskupina u flavonoidů s 4-ketoskupinou obvykle zvyšovala chelataci železa, ale přítomnost silného železo-chelatačního místa (catecholický kruh B) v neutrálních podmínkách může skrýt příspěvek této hydroxyskupiny. Navíc to vypadá, že 3-hydroxyskupina je spojena s vysokou afinitou k železitým iontům, tudíž chelatace těchto iontů byla značně zvýšena v kyselých podmínkách.
- 4) 5-hydroxyskupina. Volná 5-hydroxyskupina u flavonoidů s 4-ketoskupinou může posílit železo-chelatační účinek flavonoidů, zvláště v neutrálním nebo blízkém prostředí (pH 6,8-7,5). Toto zlepšení chelatační aktivity bylo obvykle nižší, než v případě volné 3-hydroxyskupiny, např. 3-hydroxyflavon vs. kampferol (Obr. 24).



**Obr. 24:** Vliv přítomnosti 5-hydroxyskupiny na chelatační účinnosti u A) kampferolu a B) 3-hydroxyflavonu. Směr šipky poukazuje na účinnější sloučeninu. Oboustranná šipka poukazuje na žádné rozdíly mezi sloučeninami.

Významnost byla nalezena u pH 6,8 a 7,5, ale ne u pH 5,5 pro chelataci železnatých iontů a pH 4,5 pro chelataci celkového železa (Mladěnka *et al.*, 2011).

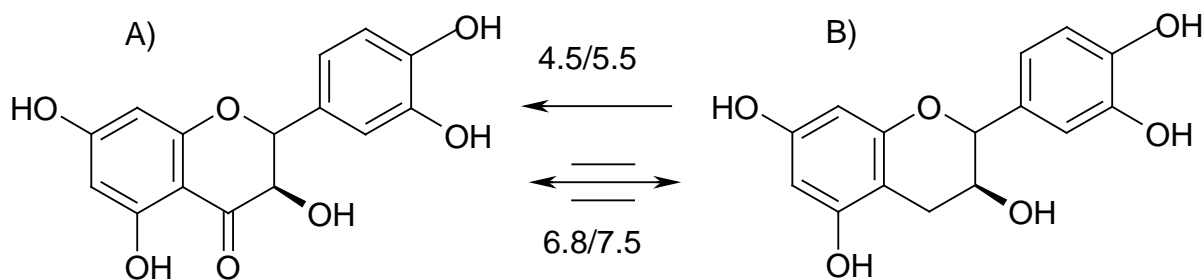
5) 2,3-dvojná vazba. Zdá se, že zvyšuje železo-chelatační účinek, jako můžeme vidět v případě srovnání quercetinu a taxifolinu (Obr. 25).



**Obr. 25:** Vliv přítomnosti 2,3-dvojně vazby na chelatační účinnost u A) taxifolinu a B) quercetinu. Směr šipky poukazuje na účinnější sloučeninu.

Žádné rozdíly nebyly nalezeny u všech pH (Mladěnka *et al.*, 2011).

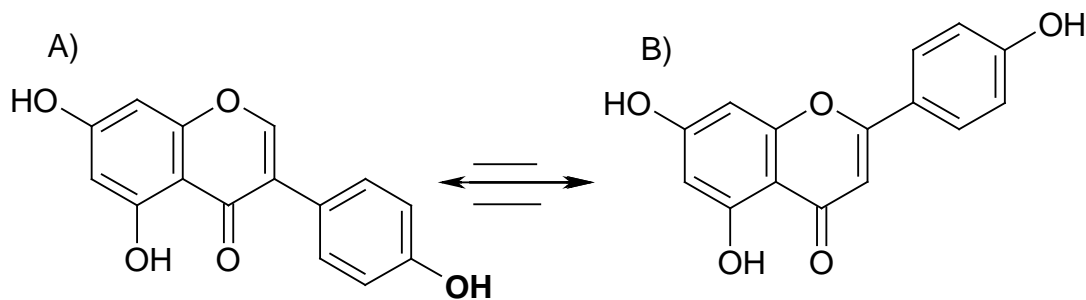
6) Ketoskupina v poloze 4. Ketoskupina sama má zřejmě nízký účinek na chelataci železa, ale je to důležitá součást chelatačních uskupení 3-hydroxy-4-keto nebo 5-hydroxy-4-keto, a proto její odstranění bylo spojeno s redukcí chelatace železa (ukázáno ve srovnání taxifolinu a katechinu v kyselém prostředí, kde katecholický B kruh nehrál důležitou roli) (Obr. 26).



**Obr. 26:** Vliv přítomnosti 4-ketoskupiny na chelatační účinnost u A) taxifolinu a B) katechinu. Směr šipky poukazuje na účinnější sloučeninu. Oboustranná šipka poukazuje na žádné rozdíly mezi sloučeninami.

Významnost byla nalezena pro chelataci železnatých iontů u pH 5,5 a pro chelataci celkového železa u pH 4,5, žádné rozdíly nebyly nalezeny u pH 6,8 a 7,5 pro chelataci železnatých iontů (Mladěnka *et al.*, 2011).

7) U pozice kruhu B se nezdá být patrná jakákoliv změna účinku na aktivitu, např. isoflavonoid genistein a flavon apigenin se stejnými funkčními skupinami měly stejnou účinnost (Obr. 27).



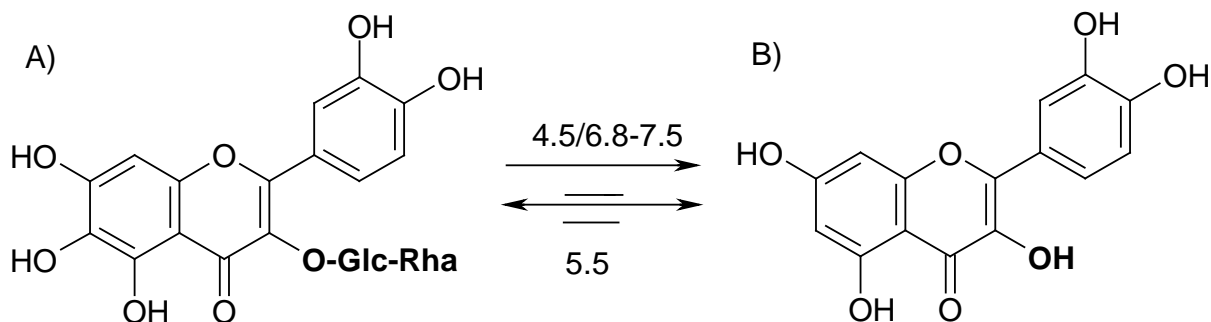
**Obr. 27:** Vliv pozice kruhu B na chelatační účinnost u A) genisteinu a B) apigeninu.

Oboustranná šipka poukazuje na žádné rozdíly mezi sloučeninami.

Žádné rozdíly nebyly nalezeny u všech pH (Mladěnka *et al.*, 2011).

8) Vedlejší skupiny. Stereoisometrie u flavanolů týkající se pozice 3-hydroxyskupiny byla bezvýznamná v případě chelatace železa. Cukerná komponenta sama nijak nepřispívá k chelataci, spíše pokud blokovala známé chelatační místo, tuto schopnost

snižovala (např. v případě rutinu oproti quercetinu u Obr. 28). U flavanonů se neprojevíly žádné rozdíly mezi aglykony hesperetinem a naringeninem a jejich odpovídajícími glykosidy hesperidinem a naringinem v testovaných koncentracích.



**Obr. 28:** Vliv 3-hydroxyskupiny na chelatační účinnost u A) rutinu and B) quercetinu.

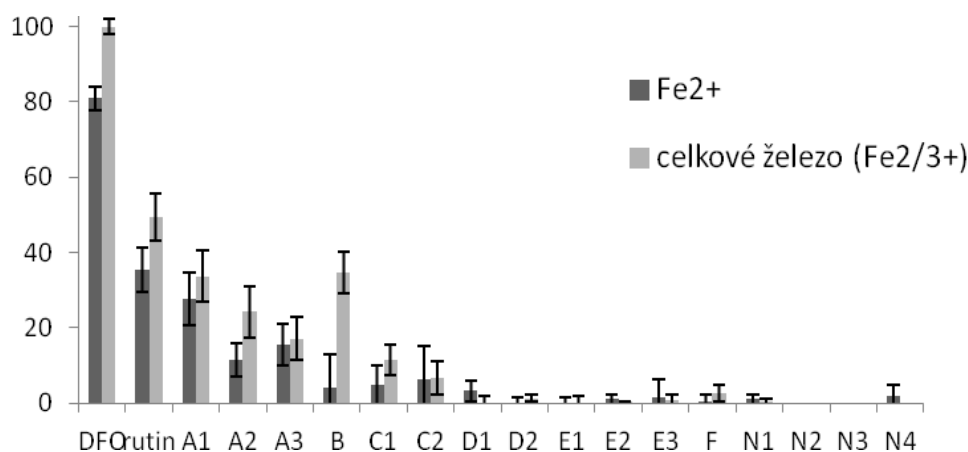
Směr šipky poukazuje na účinnější sloučeninu. Oboustranná šipka poukazuje na žádné rozdíly mezi sloučeninami. Glc: glukóza, Rha: rhamnóza.

Významnost byla nalezena u pH 4,5 pro chelataci celkového železa a u pH 6,8 a 7,5 pro chelataci železnatých iontů, ale žádný rozdíl nebyl objeven u pH pro chelataci železnatých iontů (Mladěnka *et al.*, 2011).

## 1.2. Chelatace kumariny

Na rozdíl od flavonoidů, nebylo o chelataci železa kumariny mnoho známo, proto byly nejdříve kumariny otestovány v nepufrovaném prostředí rozpouštědla DMSO (Obr. 29). Žádný z testovaných kumarinů nebyl účinnější než standardní chelátor železa DFO nebo flavonoidní glykosid rutin. 7,8-dihydroxykumariny (skupina A) byly neúčinnější testované kumariny v případě chelatace železnatých iontů i chelatace celkového železa. 6,7-dihydroxy-4-metylkumarin (B) byl podobně účinný chelátor celkového železa jako skupina A a významně účinnější oproti přírodním kumarinům (N1-N4) a všem kumarinům ze skupin D-F. *Ortho*-dihydroxy-4-metylkumariny (C) byly také účinné. Všechny kumariny s jednou

hydroxyskupinou, dvěma metoxylovými skupinami nebo hydroxy- či acetoxykupinou v *meta* pozici byly prakticky neaktivní.



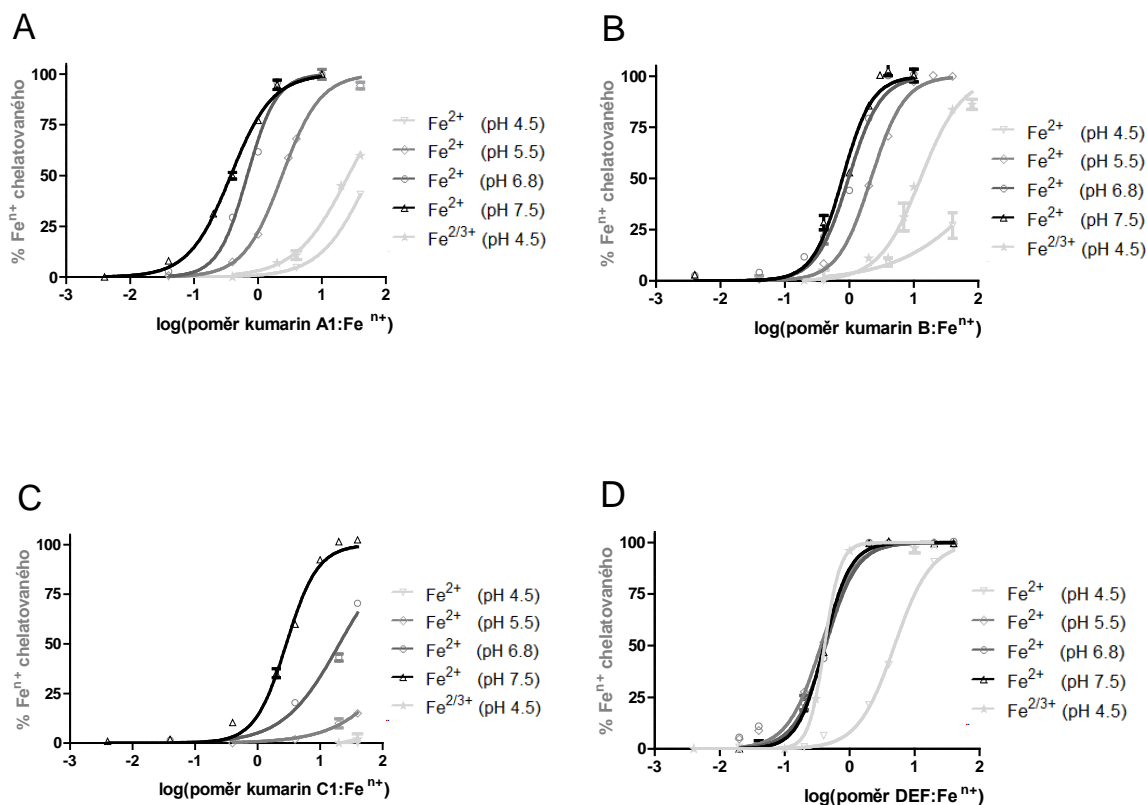
**Obr. 29:** Železo-chelatační účinky kumarinů v DMSO ve srovnání s DFO a rutinem 5 minut po přidání ferrozinu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní odchylka pro molární poměr látka:železo 10:1.

Vysvětlení zkratk v grafu: A: 7,8-dihydroxy-4-methylkumariny, B: 6,7- dihydroxy-4-methylkumarin, C: 7,8-diacetoxy-4-methylkumariny, D: 7,8-dimethoxy-4-methylkumariny, E: 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny, F: 5,7-diacetoxy-4-methylkumarin, N: přírodní kumariny. Blíže viz. Obr. 13 (Mladěnka *et al.*, 2010).

V následujícím pokusu byla testována chelatace železnatých iontů/celkového železa u kumarinů s aktivními skupinami (kumariny bez postranního řetězce v pozici 3) při různých pH (Obr. 30). DFO jako standard byl nejúčinnější látkou s výjimkou pH 7,5, kde 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin dosáhl stejné účinnosti. 6,8-dihydroxy-4-methylkumarin byl o něco méně účinný než 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin při pH 6,8 a 7,5, na druhé straně byl ale účinnějším chelátorem železitých iontů při pH 4,5. DFO si udržel železo-chelatační



aktivitu ve všech testovaných prostředích. Zajímavé je, že kumariny ztratil svou železo-chelatační aktivitu v kyselém prostředí, ale byly schopny absolutně si ji udržet za podmínek blízkých neutrálnímu pH.



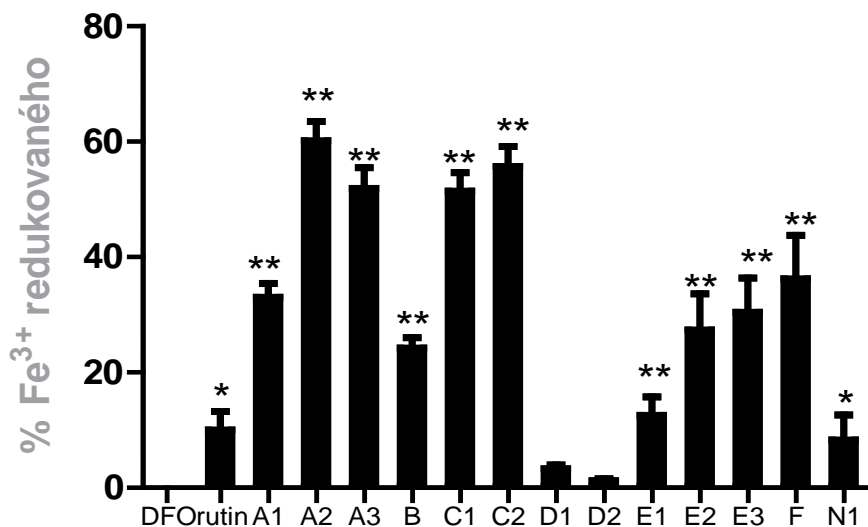
**Obr. 30:** Chelatace železnatých iontů/celkového železa zástupci účinných skupin.

**A:** 7,8-dihydroxy-4-metylkumarin (kumarin A1), **B:** 6,7-dihydroxy-4-metylkumarin (kumarin B), **C:** 7,8-dihydroxy-4-metylkumarin (kumarin C1) and **D:** DFO (Mladěnka *et al.*, 2010).

Poslední částí této studie bylo zjišťování, zda jsou kumariny schopny redukovat železité ionty. Nejdřív byla prověřena redukce železitých iontů za užití roztoku DMSO bez pufrů (Obr. 31). DFO nebyl spojován s žádnou redukcí železitých iontů v různých testovaných koncentracích. Naopak, všechny testované kumariny, s výjimkou 7,8-metoxy-4-metylkumarinů (skupina D), redukovaly železité ionty v různém rozsahu.

Redukce železitých iontů může představovat riziko kvůli možnosti vystupňování Fentonovy reakce, urychlením katalytické obnovy železnatých iontů. Proto byla provedena u účinných kumarinů detailnější analýza redukce železitých iontů v pufrch. Opět DFO neredukoval železité ionty při žádném testovaném pH. Všichni tři testovaní zástupci kumarinů redukovali významně železo při pH 4,5, v menším rozsahu potom při pH 5,5, žádné železité ionty nebyly redukovány při pH 6,8 a 7,5.

Je zajímavé, že se projevil významný rozdíl mezi dihydroxykumariny a diacetoxykumariny. Dihydroxykumariny způsobily redukci už v nízkých koncentracích s nejvyšší redukcí v molárním koncentračním poměru kumarin:železo mezi 1:1-10:1. Další zvýšení koncentrace chelátoru vedlo k poklesu redukce. Naopak 7,8-diacetoxykumariny způsobily na dávce závislé zvýšení množství redukováných železitých iontů (= železnatých iontů) v celém testovaném rozsahu (poměr molární koncentrace kumarin:železo 1:100-80:1). Navíc se projevil významný rozdíl mezi *ortho*-dihydroxy-4-metylkumariny v redukční účinnosti, kdy byl zhruba 3-krát vyšší účinek v případě 7,8-dihydroxyderivátů.



**Obr. 31:** Redukce železitých iontů v DMSO. Roztoky testovaných látek v DMSO byly smíchány s železitými ionty. Ferrozin byl podán ke změření množství železnatých iontů, které odpovídaly redukováným železitým iontům.

Vysvětlení zkratk v grafu: A: 7,8-dihydroxy-4-methylkumariny, B: 6,7- dihydroxy-4-methylkumarin, C: 7,8-diacetoxy-4-methylkumariny, D: 7,8-dimethoxy-4-methylkumariny, E: 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny, F: 5,7-diacetoxy-4-methylkumarin, N: přírodní kumariny. Blíže viz. Obr. 13 (Mladěnka *et al.*, 2010).

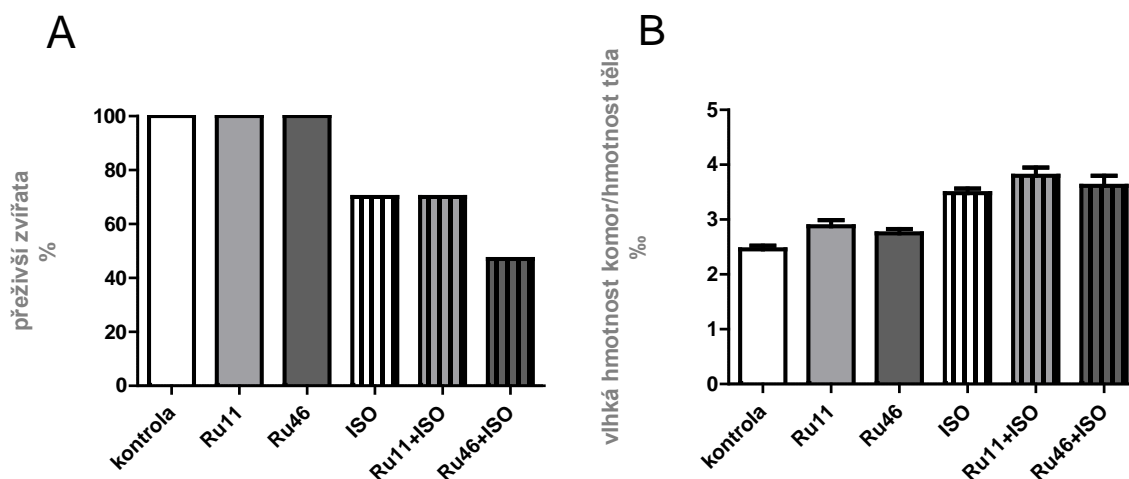
## 2. Účinky látek s železo chelatačním potenciálem *in vivo* na modelu akutního infarktu myokardu

### 2.1. Rutin

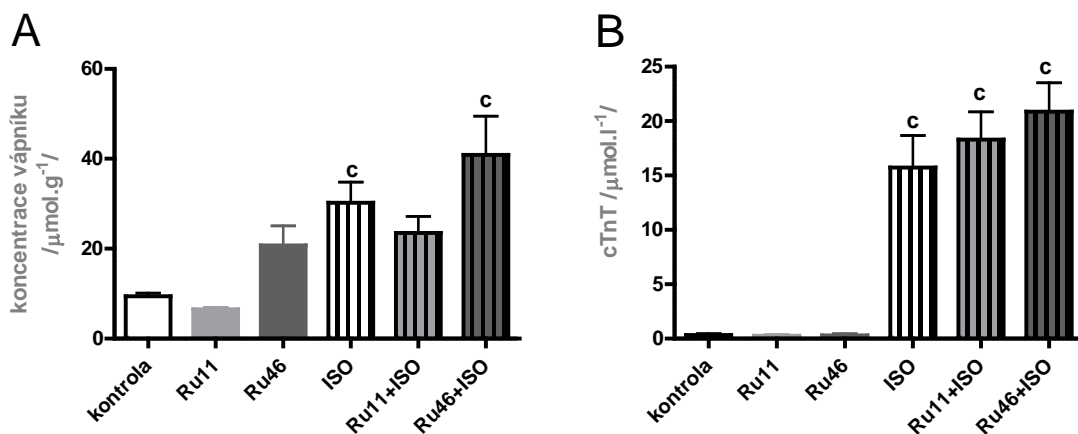
Aplikace ISO (100 mg.kg<sup>-1</sup> s.c.) způsobila během 24 hodin 30% úmrtnost zvířat (3 z 10 pokusných zvířat v této skupině). Stejně tak 3 zvířata z 10 zemřela, když byla premedikována 11,5 mg.kg<sup>-1</sup> rutinu i.v. před aplikací ISO. Nicméně dávka 46 mg.kg<sup>-1</sup> rutinu vedla ke zvýšené

úmrtnosti na 53% (9 ze 17, navíc další 2 zvířata zemřela během anestezie). Žádné ze zvířat z kontrolní skupiny nebo zvířata léčená pouze rutinem (v obou dávkách) nezahynula (Obr. 32).

ISO způsobil masivní poškození myokardu, což bylo potvrzeno histologickým nálezem (viz. dále), zvýšením vlhké hmotnosti komor (Obr. 32), vzestupem srdečního troponinu T (cTnT) v séru a koncentrace vápníku v myokardiálních buňkách. Rutin tyto parametry nezlepšil, naopak u vyšší dávky byla pozorována tendence k přetížení myokardu vápníkem, k uvolnění cTnT a ke zvýšení vlhké hmotnosti komor. U potkanů, kterým byl aplikován pouze fyziologický roztok nebo rutin samotný, došlo pouze k minimálnímu uvolnění cTnT, ale vyšší dávka rutinu sama o sobě zvýšila obsah vápníku v myokardu (Obr. 33).

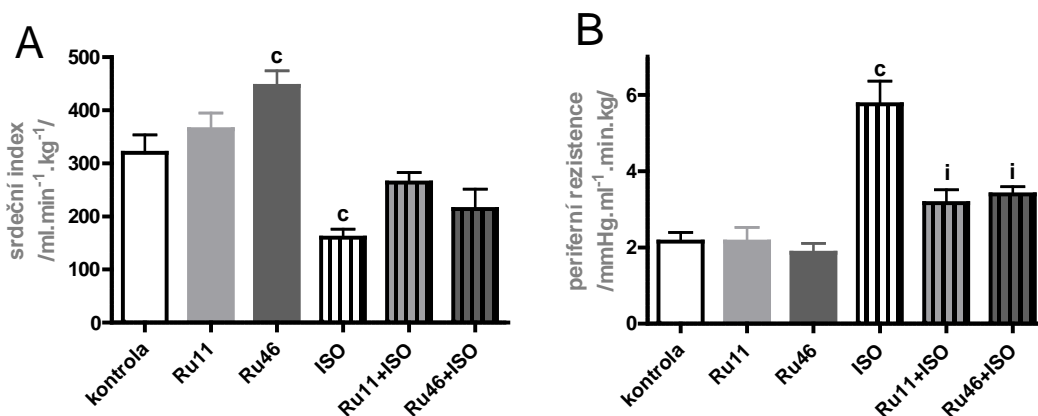


**Obr. 32:** Přežití zvířat (A) a vlhká hmotnost komor po aplikaci fyziologického roztoku (kontrola), ISO, rutinu v dávkách 11,5 a 46 mg.kg<sup>-1</sup> (Ru 11 a Ru 46) a kombinace rutinu (v obou dávkách) a ISO experimentálními potkanů. Statistická významnost při P<0,05: c vs. kontrolní skupina.



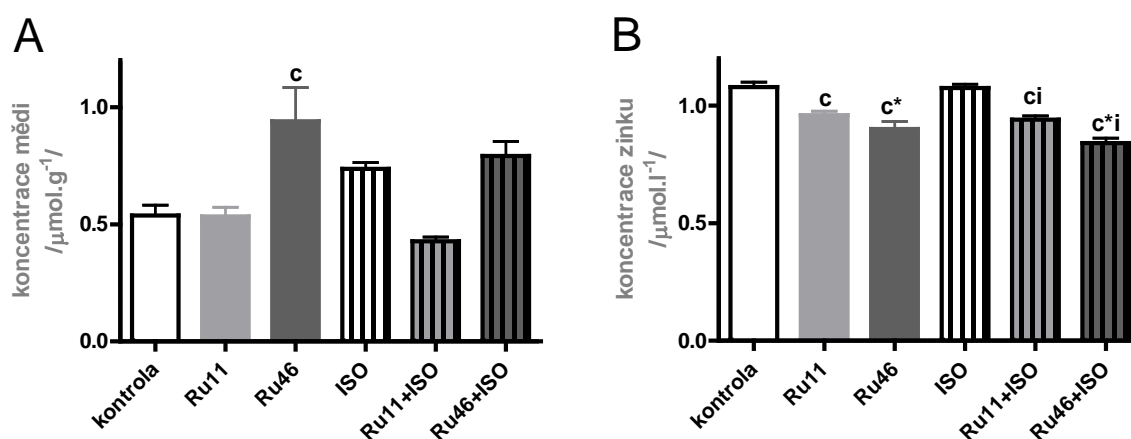
**Obr. 33:** Obsah vápníku v myokardu (A) a koncentrace srdečního troponinu T v séru (B) 24 hodin po aplikaci rutinu (Ru – 11,5 nebo 46  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), ISO (100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  s.c.) nebo jejich kombinací pokusným potkanům. Statistická významnost při  $P < 0,05$ : c vs. kontrolní skupina (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>d</sup>).

Rutin v závislosti na dávce zvyšoval srdeční index (Obr. 34A). Pokles srdečního indexu navozený ISO rutin nevrátil zpět. Naproti tomu ale v obou dávkách snížil ISO-navozené zvýšení periferní cévní rezistence (Obr. 34B). Mezi skupinami nebyly žádné významné rozdíly u hodnot tlaku krve.

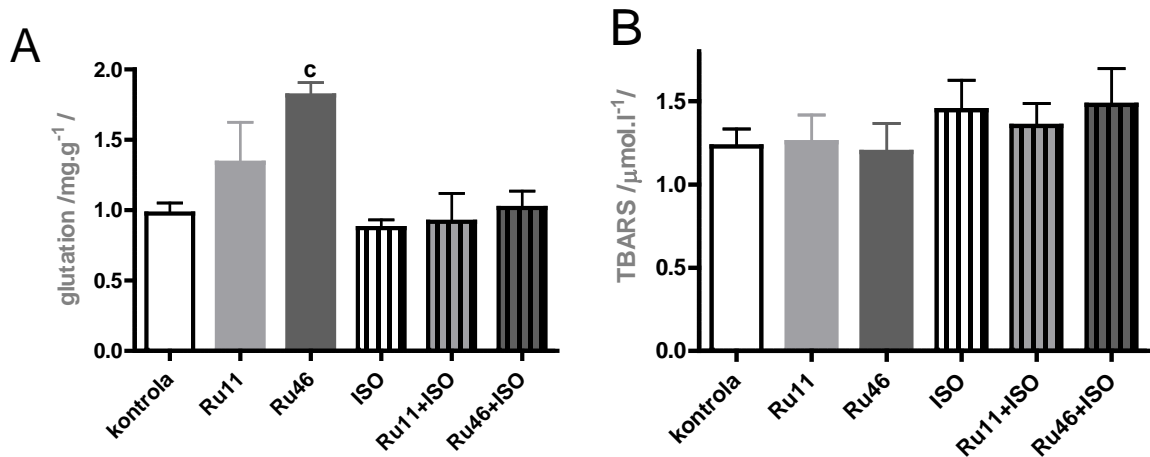


**Obr. 34:** Srdeční index (A) a periferní cévní rezistence (B) 24 hodin po aplikaci rutinu (Ru – 11,5 nebo 46  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i.v.), ISO (100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  s.c.) nebo jejich kombinací experimentálním potkanům. Statistická významnost při  $P < 0,05$ : c vs. kontrolní skupina, i vs. ISO skupina (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>d</sup>).

V případě koncentrací mědi a zinku v myokardu, podání ISO mělo jen malý nebo nepatrný vliv (Obr. 35). Zajímavé ale bylo, že vyšší dávka rutinu významně zvyšovala hladiny mědi v myokardu, zatímco obě dávky rutinu snižovaly obsah zinku v srdci nezávisle na podání ISO, ačkoliv v kombinaci s ISO byl pokles výraznější. Rozdíly mezi skupinami týkající se obsahu myokardiálního železa a selenu nebyly statisticky významné. Ohledně parametrů oxidačního stresu v krvi, rutin v závislosti na dávce zvyšoval hladiny celkového glutationu (Obr. 36A), nicméně podání ISO mělo jen malý účinek na tento parametr. ISO a kombinační skupiny oproti kontrole a rutinu samotnému velmi mírně zvyšovaly hladiny TBARS bez statistické významnosti (Obr. 36B). Hladiny vitamínu E v séru byly srovnatelné a bez významných rozdílů u všech skupin.



**Obr. 35:** Koncentrace mědi (A) a zinku (B) v myokardu 24 hodin po aplikaci rutinu (Ru – 11,5 nebo 46  $\text{mg.kg}^{-1}$  i.v.), ISO (100  $\text{mg.kg}^{-1}$  s.c.) nebo jejich kombinací experimentálním potkanům. Statistická významnost: **c** vs. kontrolní skupina  $P < 0,01$ , **c\*** vs. kontrola při  $P < 0,001$ , **i** vs. ISO skupina při  $P < 0,01$  (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>d</sup>).



**Obr. 36:** Hladiny celkového glutationu v krvi (A) a konjugované dieny v plasmě - TBARS (B) 24 hodin po aplikaci rutinu (Ru – 11,5 nebo 46 mg.kg<sup>-1</sup> i.v.), ISO (100 mg.kg<sup>-1</sup> s.c.) nebo jejich kombinací experimentálním potkanům. Statistická významnost: c vs. kontrolní skupina při P<0,01 (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>d</sup>).

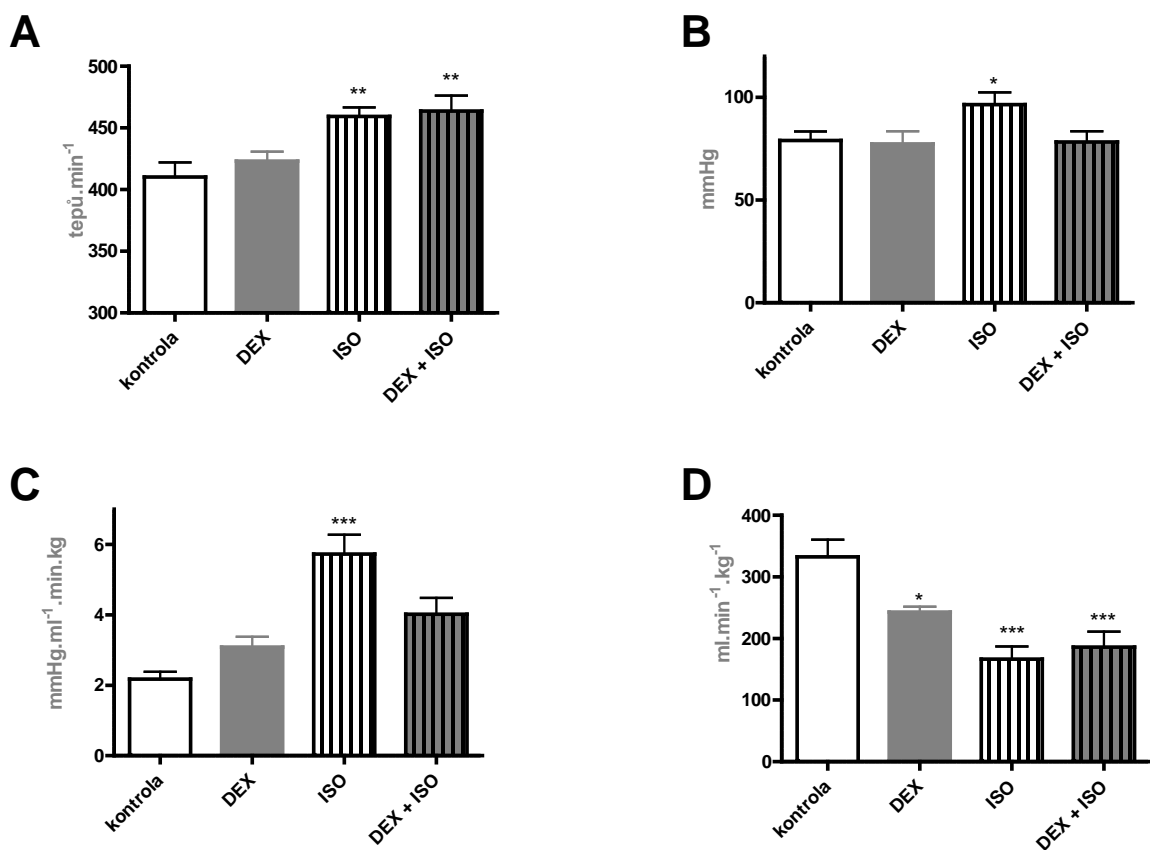
Bylo provedeno také histologické vyšetření, které bylo vyhodnoceno Doc. RNDr. Vladimírem Semeckým, CSc. z Katedry biologických a lékařských věd a které zjistilo u obou kontrolních skupin zvířat a u obou dávek rutinu normální strukturu myokardiální tkáně. Na druhé straně ISO podání způsobilo vážné difúzní a fokální poškození kardiomyocytů. Navíc byla také objevena významná zánětlivá infiltrace lokalizovaná především pod endokardiálním epitelem nebo v tenké fibrózní tkáni pod epikardiálním endotelem. Naopak, pouze ojedinělá infiltrace byla přítomna v oblasti centrálního myokardu. Histopatologické nálezy u ISO skupiny a v kombinačních skupinách ISO+rutin v obou dávkách byly obdobné. Detailnější rozpis viz. naše publikace (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>d</sup>).

## 2.2. Dexrazoxan

Podobně jako v předchozím případě vedlo podání  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  s.c. ISO potkanům ke 30% úmrtnosti (3 zvířata z 10) během 24 hodin. Premedikace potkanů  $20,4 \text{ mg.kg}^{-1}$  DEX i.v. redukovalo úmrtnost na 12,5 % (1 z 8 potkanů). Žádné ze zvířat nezemřelo jak u kontrolní skupiny, tak u skupiny DEX.

Stejně jako ve studii s rutinem, vedla aplikace ISO po 24 hodinách ke snížení srdečního minutového výdeje a ke zvýšení periferní cévní rezistence, diastolického tlaku krve a srdeční frekvence. Systolický tlak krve se po podání ISO neměnil, ve srovnání s kontrolami. DEX neovlivňoval hemodynamické parametry zdravých zvířat, s výjimkou významného snížení srdečního minutového výdeje. Podání DEX před ISO částečně snížil ISO zvýšenou periferní cévní rezistenci a diastolický tlak krve bez účinku na zvýšenou srdeční frekvenci a snížený srdeční minutový výdej (Obr. 37).





**Obr. 37:** Změny hemodynamických parametrů po podání ISO, DEX nebo jejich kombinance. Kontrolní zvířata obdržela pouze fyziologický roztok. **A:** srdeční frekvence, **B:** diastolický tlak krve **C:** periferní cévní rezistence, **D:** srdeční index.

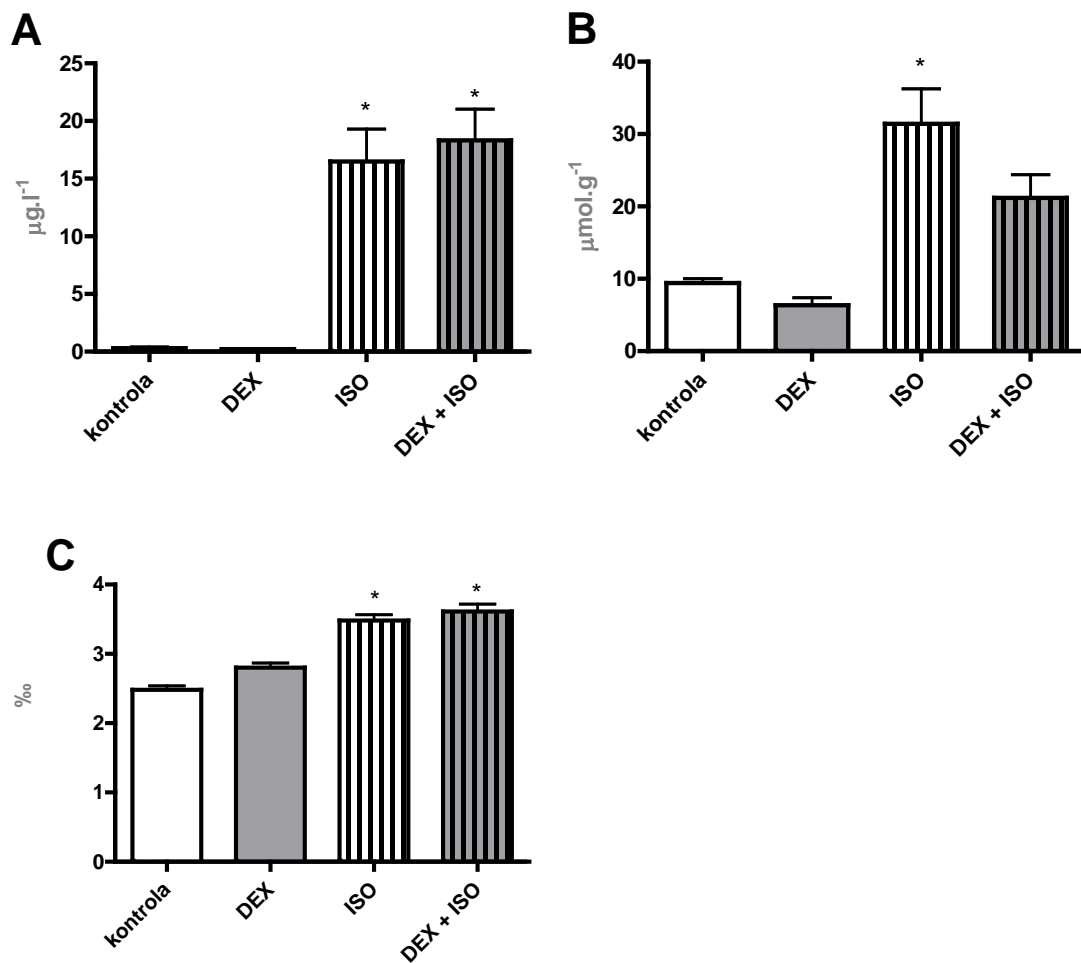
Statistická významnost: \*  $P < 0,05$  vs. kontrola, \*\*  $P < 0,01$  vs. kontrola, \*\*\*  $P < 0,001$  vs. kontrola.

Po aplikaci ISO se projevily některé změny v biochemických a morfologických parametrech, spojené se srdečním poškozením (změny v koncentraci cTnT, vápníku v kardiomyocytech, vlhké hmotnosti srdečních komor) (Obr. 38). DEX ovlivnil tyto změny jen v případě obsahu vápníku v srdci. Mezi skupinami se neprojevily žádné významné rozdíly u celkového glutationu v krvi, hladiny vitamínu E v plasmě a u koncentrací železa, zinku, selenu a mědi v srdeční tkáni.

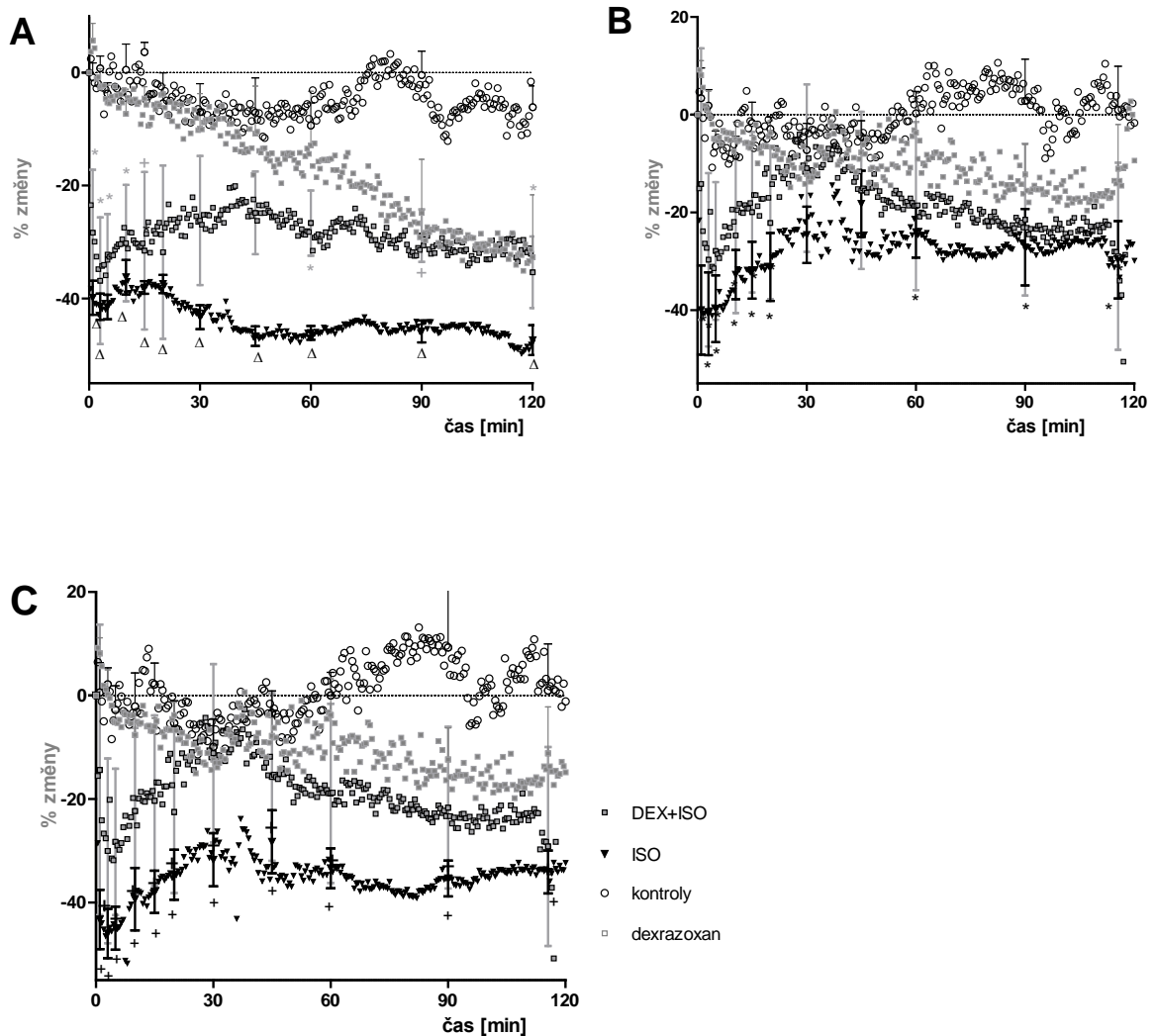
V dalším pokusu byly monitorovány akutní účinky ISO, DEX a jejich kombinace během 2 hodin po aplikaci zmíněných látek. Protože jsou kardiovaskulární parametry akutně ovlivňovány objemem podaných roztoků, obdržela další skupina zvířat i.v. fyziologický roztok v adekvátním objemu. Neprojevily se žádné změny mezi i.v. a s.c. podáním u kontrolních skupin v žádném z měřených parametrů. Pro lepší přehlednost byla data obou kontrolních skupin prezentována dohromady (jako kontroly).

Podobně jako u předešlých pokusů, ISO způsobil 33% úmrtnost (3 z 9 zvířat) během 100 min. Dvě zvířata zemřela na atrioventrikulární (AV) blokádu a jedno z důvodu ventrikulární fibrilace. DEX snížil úmrtnost (1 z 5 zvířat zemřelo na AV blokádu po 75 min), zatímco žádné ze zvířat nezemřelo po aplikaci fyziologického roztoku nebo DEX samotného.

Podání ISO s.c. způsobilo většinou okamžitě (obvykle během prvních 60 sekund) významné zvýšení srdeční frekvence a snížení tlaků krve. Tyto účinky byly doprovázeny snížením levokomorového tlakového gradientu (rozdíl mezi endsystolickým a enddiastolickým tlakem) a parametru ventrikulární relaxace  $dP/dt_{\min}$  (Obr. 39). Naopak parametr ventrikulární kontraktility,  $dP/dt_{\max}$ , byl spíše nevýznamně zvýšen. Změny u tepového objemu nebyly významné. Podání DEX významně neovlivnilo akutní hemodynamické změny vyvolané ISO, s výjimkou krevního tlaku, kde se účinek významně projevil od 35. minuty až do konce pokusu. DEX samotný měl na zdravá zvířata jen malý účinek.



Obr. 38: Základní biochemické a morfologické parametry spojené s kardiotoxicitou ISO a její ovlivnění DEX. A: srdeční troponin T v séru. B: obsah vápníku v srdci. C: index vlhké hmotnosti komor. Statistická významnost: \*  $P < 0,001$  vs. kontrola.

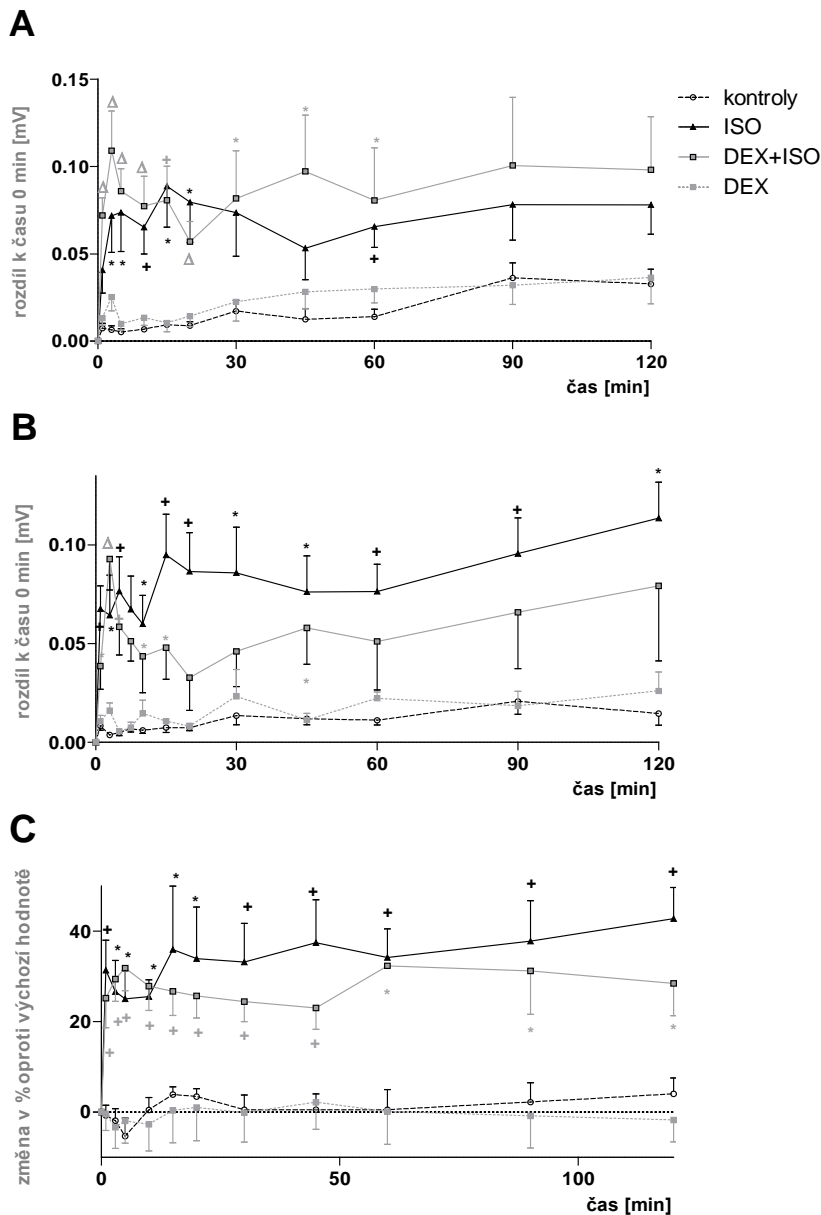


**Obr. 39:** Akutní hemodynamické změny po aplikaci isoprenalinu (ISO), fyziologického roztoku (kontroly), dexrazoxanu (DEX) nebo kombinace DEX+ISO. **A:** střední tlak krve. **B:** levokomorový tlakový gradient. **C:** parametr relaxace levé komory  $dp/dt_{min}$ . Výsledky jsou vyjádřeny jako procentuální rozdíl oproti výchozím hodnotám (před aplikací látek). Statistická významnost vs. kontrola: \*  $P < 0,05$ , +  $P < 0,01$ ,  $\Delta P < 0,001$ .

Pro lepší přehlednost jsou SEM a statistická významnost vs. kontrola ukázány pouze v čase 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 a 120 min. Kontroly a DEX se významně neodlišovaly v žádných hodnotách ani časových intervalech a jejich odchylky jsou zobrazené pouze v horním směru. Významné rozdíly mezi DEX a DEX+ISO na hladině významnosti  $P < 0,05$  byly nalezeny pouze v případě středního arteriálního tlaku krve od 30. min do konce pokusu (nezobrazeno v grafu).

V případě změn EKG parametrů (Obr. 40), ISO způsobil rychlé zvýšení/snížení u ST segmentu, amplitudy T vlny a intervalu PR. Neprojevily se žádné významné změny u trvání a velikosti amplitudy P vlny nebo trvání QRS komplexu. QT interval je u potkanů obtížné změřit (Beinfield a Lehr, 1968) a tudíž nebyl zahrnut v analýze EKG dat. DEX nebyl schopen snížit prodloužení intervalu PR a zvýšení ST segmentu. Z toho vyplývá, že neměl žádný vliv na AV blokádu a ischemii. Částečně ovšem snižoval změny T vlny.

U hemodynamických i EKG parametrů se neprojevily žádné významné rozdíly mezi skupinami s fyziologickým roztokem a skupinou DEX, ačkoliv podání DEX mělo tendenci k nevýznamnému snížení středního arteriálního tlaku krve po 1 hod.



**Obr. 40:** Abnormality u EKG po aplikaci isoprenalinu (ISO), fyziologického roztoku (kontroly), dexrazoxanu (DEX) nebo kombinace DEX+ISO. **A:** výška ST segmentu. **B:** amplituda T vlny. **C:** relativní PR interval (měřený jako PR dělený délkou cyklu).

Výsledky jsou vyjádřeny jako absolutní aritmetický rozdíl vs. výchozí hodnota v čase 0 (před aplikací látek) v případě ST segmentu a amplitudy T a procentuální rozdíl vs. výchozí hodnota v čase 0 v případě PR intervalu. Statistická významnost vs. kontrola: \*  $P < 0,05$ , +  $P < 0,001$ .

Neprokázaly se žádné významné rozdíly mezi kontrolami a DEX nebo DEX+ISO a ISO samotným u žádného z měřených EKG parametrů.

## VI. DISKUZE

Železo je nepostradatelný prvek zahrnutý do mnoha životně důležitých procesů (např. přenos kyslíku, syntéza DNA, tvorba ATP) a je nezbytnou součástí mnoha enzymů. Železo se za fyziologických podmínek prakticky nenachází ve volné, redoxně aktivní formě, ale za určitých patologických podmínek, jako je nízké pH v případě ischemie, může být z vazebných proteinů následně uvolněno do cirkulace a podílet se na produkci volných radikálů (Haberova-Weissova reakce) a následně na poškození makromolekul (např. poškození lipidů buněčných membrán, proteinů i DNA). Z uvedeného vyplývá, že chelátory železa by mohly být prospěšné v terapii AIM a následné reperfuze po terapeutických zákrocích (obnovení perfuze po podání fibrinolytik či po koronární angioplastice), kdy železo hraje významnou roli v patogenezi tzv. I-R poškození. V dnešní době jsou chelátory železa využívány jako léčiva u mnoha patologických stavů jako je akutní otrava železem, chronický nadbytek železa nebo prevence antracyklinové kardiotoxicity (Olivieri a Brittenham, 1997; Popelová *et al.*, 2009; Cvetkovic a Scott, 2005). Nicméně jejich prospěšný účinek může být rozsáhlejší a jsou zkoumány i jako léčiva v prevenci různých stavů spojených s I-R poškozením (vysvětleno na str. 10 a v Seznamu zkratk), které závisí na jejich schopnosti inhibovat Fentonovu reakci vazáním redoxně aktivního železa (Kalinowski a Richardson, 2005).

V našich *in vitro* pokusech jsme využili při stanovování hladin železa metodu s použitím ferrozinu. Tato metoda má relativně dostatečnou přesnost a specifitu a může být využita pro rychlou analýzu chelatace železa. Stupeň chelatace železitých iontů může být zhodnocen nepřímo měřením chelatace celkového železa při pH 4,5 nebo v prostředí DMSO bez pufru. Tato metodika nemůže být využita při vyšším pH, protože rozpustnost železitých iontů klesá od kyselého po neutrální pH (Cornell a Schwertmann, 2003). Validita metody užitá v naší studii byla potvrzena DFO, standardním chelátorem železa klinicky užívaným při patologických intoxikacích železem. Chelatuje železité ionty s vysokou afinitou v poměru 1:1.

V některých studiích bylo již prokázáno, že látky s železo-chelatačními účinky snižovaly poškození myokardu u katecholaminového modelu AIM (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>b</sup>). Z toho důvodu jsme předpokládali, že by flavonoidy a kumariny mohly být ještě účinnější, protože poskytují, kromě železo-chelatační aktivity, i jiné potenciálně užitečné farmakologické vlastnosti, např. přímé vychytávání radikálů, protisrážlivé a protizánětlivé účinky (Fylaktakidou *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2005; Menghini *et al.*, 2010). Užití některých flavonoidů či železo-chelatačních 4-metylkumarinů však může být nevhodné především v kyselém prostředí. Tato problematika může být podpořena i našimi daty zmíněnými dříve v případě rutinu, který má značnou železo-chelatační aktivitu a zhoršuje poškození myokardu u našeho modelu AIM, pravděpodobně, alespoň částečně, díky jeho schopnosti redukovat železité ionty (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>d</sup>).

V našich *in vitro* studiích jsme proto srovnávali chelatační účinky jednotlivých flavonoidů a kumarinů při různém pH a prokázali jsme, že některé flavonoidy i kumariny jsou podobně aktivní jako standardní chelátor DFO. V případě flavonoidů jsou to především zástupci s katecholickým kruhem B s 3-hydroxy-4-keto uspořádáním a 2,3-dvojnou vazbou. Nejúčinnější flavonoidy s železo-chelatační aktivitou mají 6,7-dihydroxy uspořádání kruhu A. Flavonoidy z první skupiny, zahrnující myricetin a quercetin, dosáhly aktivity DFO pouze za fyziologického nebo mu blízkého pH. Zástupce druhé jmenované skupiny, baikalein, prokázal stejnou účinnost jako DFO při všech testovaných pH. Skutečnost, že baikalein je účinnějším chelátorem železa než jiné obvyklé flavonoidy bylo nedávno prokázáno i jinými autory (Perez *et al.*, 2009). Podobně tomu bylo i u zkoumaných lipofilních 4-metylkumarinů, kdy 2 -OH skupiny v *ortho* pozici korespondovaly s nejvyšší železo-chelatační účinností a dosáhly účinků DFO při pH 6,8 a 7,5. U *ortho*-diacetoxi-4-metylkumarinů byla aktivita již nižší. Existují i další možná chelatační místa jako např. 5-hydroxy-4-keto uspořádání u flavonoidů, ale jeho významnost je již nižší než u výše zmíněných chelatačních míst. Komplex



flavonoid-železo tvořený tímto místem je méně stálý a železo může být za kyselých podmínek snadno uvolněno. Tato různorodost v železo-chelatačních schopnostech je vysvětlena pravděpodobně různou disociací protonů hydroxyskupin.

Mezi nevýznamná chelatační místa, kdy železo není stabilně vázané, patří u flavonoidů izolovaná ketoskupina, izolovaná hydroxyskupina, metoxyskupina nebo hydroxyskupina s přilehlou metoxyskupinou (Kuo *et al.*, 1998; Hider *et al.*, 2001). V případě kumarinů železo významně nevázaly zástupci s pouhými metoxyskupinami, se samotnou hydroxyskupinou nebo se dvěma hydroxy/acetoxyskupinami v *meta* pozici.

V případě srovnání účinnosti a počtu hydroxyskupin jsme zjistili, že flavonoidy s jednou či žádnou hydroxyskupinou nemají chelatační aktivitu, ale není žádný rozdíl mezi katecholickým a pyrogallolovým B kruhem, tzn. že 2 hydroxyskupiny jsou dostačující pro chelataci železa a přilehlá skupina navíc neposkytuje již žádnou výhodu. Opačné výsledky byly ovšem nalezeny u kruhu A u flavonů, kde zvyšující se počet hydroxyskupin zlepšil železo-chelatační potenciál. U kumarinů ze získaných dat vyplývá, že 7,8-dihydroxy-4-metylkumariny jsou sice aktivnějšími chelátory než 6,7-dihydroxy-4-metylkumariny, ovšem poslední zmíněné se zdají být silnějšími chelátory v kyselém prostředí (Raj *et al.*, 1998). V případě zhášecí aktivity volných radikálů je u flavonoidů nejvýznamnější 3',4'-*ortho*-dihydroxyfenolická struktura B kruhu. Přidané hydroxyskupiny v pozicích 5 a 6 (a 7) u kruhu A ale mohou nahradit zhášecí funkci hydroxyskupin kruhu B.

V našich publikovaných výsledcích (Mladěnka *et al.*, 2011) jsme také určovali stechiometrii flavonoidů, kdy jsme změřili chelataci v molárním poměru flavonoid:železo 1:1. V neutrálním pH chelatoval baikalein, quercetin a myricetin přibližně 100% železa, což naznačuje komplexy se stechiometrií 1:1 nebo vyšší, zatímco morin, negletein, katechin, epikatechin a taxifolin chelatovaly okolo 50 % železa, což znamená komplex 2:1 flavonoid:železo. 3-hydroxyflavon chelatoval okolo 30%, tedy lze předpokládat komplex 3:1.

V řípadě pH 4,5 byla určena stechiometrie chelatace železitých iontů. Baikalein prokázal poměr opět 1:1, quercetin, kampferol, myricetin, morin 2:1 a 3-hydroxyflavon 3:1. Tato studie neanalyzovala chelataci železitých iontů u vyššího pH kvůli obtížnostem spojeným s redukcí iontů.

Následně byla také zkoumána schopnost 4-metylkumarinů redukovat železité ionty. Dokonce i kumariny s pouze jednou volnou hydroxyskupinou prokázaly určitý stupeň redukce železitých iontů. Stejně kumariny s jednou volnou hydroxyskupinou se ukázaly být jen velmi málo aktivní RONS scavengery (Kaneko *et al.*, 2003). Navíc tato studie poukázala na to, že mohou být naopak škodlivé kvůli redukcí železitých iontů na železnaté, které se účastní Fentonovy reakce produkující OH<sup>•</sup> radikál.

ICHS a především její nejzávažnější forma- AIM - představují stále závažný zdravotnický problém a jsou vedoucí příčinou mortality a morbidit po celém světě bez ohledu na současný příznivý vývoj v jejich incidenci (Dahlof, 2010). Předpokládá se, že rozvoj ICHS je úzce spjat se stavem antioxidantů a oxidačním stresem a s ním spojenou tvorbou RONS (Halliwell, 1994). Proto existuje řada studií, zahrnující i naše, kde je snaha nalézt prevenci před poškozením myokardu AIM, resp. I-R poškozením. Z toho důvodu bylo vyvinuto několik *in vivo* zvířecích modelů AIM, např. námi užívaný katecholaminový, jmenovitě isoprenalinový model (Karthick a Stanely Mainzen Prince, 2006; Kassim *et al.*, 2006; Rajadurai a Prince, 2007; Punithavathi *et al.*, 2010; Chagoya de Sánchez *et al.*, 1997). Syntetický katecholamin ISO je často užíván v experimentální kardiologii k vyvolání patologického stavu v mnoha aspektech podobnému AIM u lidí. Jeho podání ve velkých dávkách vede k nedostatečnému zásobování myokardu kyslíkem následovanému ischemií myokardu s produkcí RONS, založené na uvolnění volného železa a mědi (Pinelli<sup>a</sup> *et al.*, 2004; Diaz-munoz *et al.*, 2006; Rona *et al.*, 1983). Tento model může být patofyziologicky

významný kvůli tomu, že endogenní katecholaminy jsou významně uvolňovány během AIM, což může přispívat k pozdějšímu zhoršení onemocnění (Lameris *et al.*, 2000).

Naše *in vivo* studie se zabývala účinky látek s železo-chelatační aktivitou, např. bioflavonoidu rutinu nebo DEX, chelátoru používaného v praxi při prevenci antracyklinové kardiotoxicity, na isoprenalinový model AIM.

Flavonoidy jsou skupinou látek, která je testována pro svůj pozitivní vliv na různá kardiovaskulární onemocnění díky svým antioxidačním účinkům, které zahrnují přímé vychytávání reaktivních forem kyslíku, chelataci kovů, inhibici některých radikály-tvořících enzymů (xantinoxidáza, NADPH oxidáza a lipoxygenáza), dále inhibici agregace destiček nebo vasodilatační vlastnosti. Tyto účinky nejsou přítomny u všech flavonoidů, ale jsou ovlivněny specifickými substitucemi základní chemické struktury (Mladěnka *et al.*, 2010; Rice-Evans *et al.*, 1996). Ačkoliv jsou flavonoidy obecně považovány za bezpečné sloučeniny, mnoho publikací však poukázalo na jejich prooxidační účinky (Galati a O'Brien, 2004; Chou *et al.*, 2007).

Teoreticky by flavonoidy měly být potenciálně protektivními látkami díky jejich železo/měď vázajícím vlastnostem a vychytávání RONS. Např. u rutinu bylo prokázáno jednak vychytávání RONS (především superoxidu a hypochloritu) (Russo *et al.*, 2000; Moridani *et al.*, 2003; Firuzi *et al.*, 2004), tak i vázání železa a mědi a snížení oxidačního poškození katalyzovaného volným železem (Afanas'ev *et al.*, 1989; Russo *et al.*, 2000; Mira *et al.*, 2002). Navíc se ukázalo, že rutin inhibuje xantinoxidázu, která je hlavním RONS produkujícím enzymem působícím v ischemické tkáni (Russo *et al.*, 2000; Berry a Hare, 2004). Nicméně, navzdory těmto prospěšným vlastnostem, v naší studii rutin spíše zhoršoval poškození myokardu způsobené ISO.

Existují nejméně tři hlavní faktory přispívající k nežádoucímu působení rutinu u ISO modelu AIM:

1. Hydrofilní charakter rutinu, který může představovat hlavní rozdíl od jeho lipofilního aglykonu - quercetinu, u kterého bylo prokázáno, že přechází přes lipofilní bariéry. Naopak rutin přechází jen v malém množství do buněk díky zmíněné hydrofilitě a vyplývající nepatrné rozpustnosti v membránách erytrocytů (Ferrali *et al.*, 1997). Lipofilita koreluje s protektivními antioxidantními účinky polyfenolů (Sestili *et al.*, 2002). Z toho důvodu mohou rozdíly v lipofilní/hydrofilní povaze vysvětlit selhání rutinu v *in vivo* protekci myokardu u modelového poškození ISO.

2. Přímý vliv na kardiovaskulární systém, kdy se projevíly pozitivně inotropní účinky a účinky vedoucí ke snížení tlaku krve (Lorenz *et al.*, 2008; Hotta *et al.*, 2006; Perez-Vizcaino *et al.*, 2009). V naší studii rutin v závislosti na dávce zvyšoval srdeční index pravděpodobně díky zvyšující se srdeční inotropii. V případě katecholaminového poškození myokardu může mít pozitivně inotropní účinek rutinu hlavní vliv, protože může vést k pozdějšímu zvyšování požadavku na dodání kyslíku myokardu a k významnějšímu poškození srdce. Stejně vazodilatace navozená rutinem může zhoršovat akutně patogenezi ISO poškození, protože ISO v dávce použité v této studii vede k výraznému poklesu tlaku krve a tím i poklesu koronární perfuze (viz Obr. 34).

3. Pravděpodobně existuje úzké dávkové rozmezí mezi antioxidantními a pro-oxidantními vlastnostmi flavonoidů (Moran *et al.*, 1997; Galati a O'Brien, 2004). Dávka  $46 \text{ mg.kg}^{-1}$  rutinu byla vybrána jako ekvimolární k bezpečné dávce referenčního chelátoru železa DFO ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) (Ambrosio *et al.*, 1987). Zmíněná dávka rutinu způsobila patrné histopatologické změny v myokardu a vyvolala některé změny v hladinách myokardiálních prvků, jako je zvýšení obsahu vápníku a mědi. Navíc, obě dávky rutinu (kromě dávky  $46 \text{ mg.kg}^{-1}$  byla testována i nižší dávka  $11,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  při i.v. podání) snížily v dávkové závislosti obsah zinku

v myokardu. Uvedené faktory mohou ovlivnit katecholaminovou kardiotoxicitu, protože měď a zinek jsou součástí antioxidantních enzymů a zvýšená hladina vápníku poukazuje na nefyziologické myokardiální změny. Navíc některé flavonoidy s katecholovým B kruhem mohou produkovat RONS a oxidovat glutation nebo s ním tvořit adiční sloučeniny (Galati a O'Brien, 2004).

Naše výsledky jsou tedy v přímém kontrastu s daty jiné výzkumné skupiny, která naopak ukázala pozitivní účinky perorálního podávání rutinu na katecholaminovou kardiotoxicitu (Karthick a Stanely Mainzen Prince, 2006; Stanely Mainzen Prince a Karthick, 2007). V naší studii rutin aplikovaný i.v. bezprostředně (5 minut) před ISO nepůsobil preventivně vůči katecholaminové kardiotoxicitě, spíše ji ve své vyšší dávce zvyšoval. Ovšem u perorálního podání rutinu u lidí nebo potkanů nedochází k jeho absorpci (Manach *et al.*, 1995; Choudhury *et al.*, 1999). Je štěpen na různé metabolity (např. quercetin, isorhamnetin, tamarixetin nebo různé fenolické kyseliny) intestinálními bakteriemi (Pashikanti *et al.*, 2010; Braune *et al.*, 2001) a není absorbován jako původní sloučenina. Je tudíž pravděpodobné, že protektivního vlivu p.o. podaného rutinu v těchto studiích nebylo zřejmě dosaženo rutinem samotným, ale spíše jeho aktivními metabolity. Naopak, rutin podaný i.v. (jako v naší studii) pravděpodobně nepodstupuje metabolizaci na quercetin (Choudhury *et al.*, 1999). Další *in vitro* a *in vivo* studie jsou třeba pro lepší porozumění účinků rutinu (a/nebo jeho metabolitů) v biologických systémech.

Dalším chelatačním činidlem zkoumaným v rámci našich *in vivo* studií je DEX. Jedná se o proléčivo, které je pomalu přeměněno na aktivní železo-chelatující metabolit(y), buď spontánně za neutrálních podmínek nebo rychleji enzymy (Hasinoff a Aoyama, 1999<sup>a,b</sup>). Navíc může být tato přeměna značně urychlena železem, především železnatými ionty (Buss a Hasinoff, 1995; Hasinoff a Aoyama, 1999<sup>a</sup>). Tato transformace byla námi potvrzena za neutrálního a jemu blízkého pH (Obr. 41). Dávka užitá v naší studii byla vybrána na základě

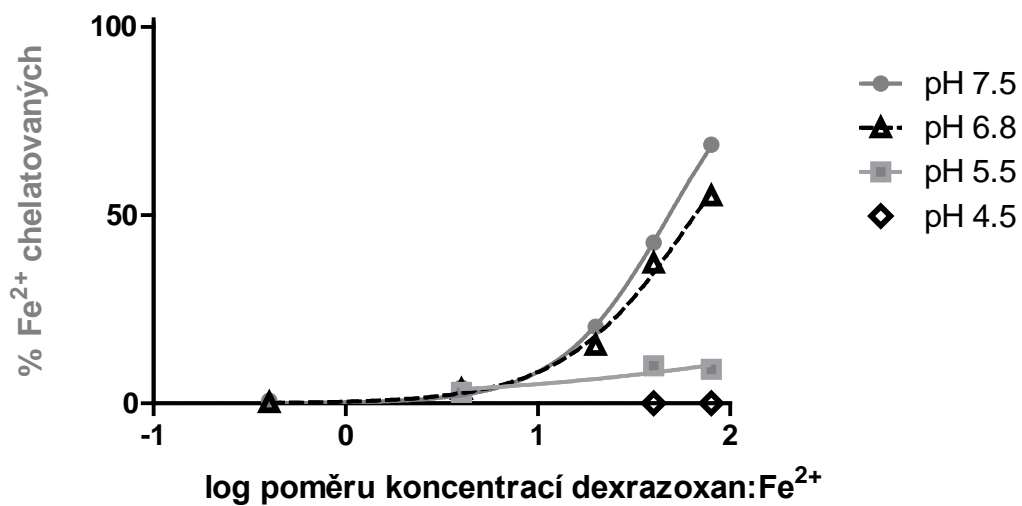
našich předešlých studií (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>b</sup>; Mladěnka *et al.*, 2009<sup>d</sup>). Je ekvimolární 50 mg.kg<sup>-1</sup> DFO, což je dávka v rozmezí obvyklých terapeutických dávek.

Pozitivní účinky DEX pravděpodobně odpovídají antidysrhythmické protekci myokardu. Dřívější studie prokázaly snížení rizika dysrytmií DEX po aplikaci antracyklinů, kde DEX předcházel prodloužení QT intervalu (Ducroq *et al.*, 2010; Galetta *et al.*, 2005). Smrtné dysrytmie, nejčastěji fibrilace komor, se projevovaly většinou 30 min (nebo později) po aplikaci ISO a byly pravděpodobně způsobeny spíše RONS než ISO. V naší studii se komorová fibrilace vyskytla u jednoho ISO zvířete (2 hodinový experiment). Naopak dvě zvířata zahynula po AV blokádě s následnou zástavou srdce. AV blokády se zdají být typickým jevem pozorovaným po aplikaci vysokých dávek katecholaminů na rozdíl od jiných modelů AIM (okluze koronární arterie), kde dominuje fibrilace komor (Barta *et al.*, 2008). Je ovšem možné, že výskyt AV blokády různého stupně byl zintenzivněn anestezií uretanem. V porovnání s ISO samotným, ve skupině DEX+ISO zemřelo pouze jedno zvíře na AV blokádu a žádné na fibrilaci komor. V této studii neměl DEX příliš vliv na AV blokádu, ale zdá se, že inhibuje fibrilaci komor. Může to být z toho důvodu, že časné AV blokády nemohou být inhibovány DEX kvůli jeho nízké transformaci na aktivní metabolity v kyselých podmínkách. Později již může DEX účinně chelátovat železo a působit preventivně proti fibrilaci komor. Dalším důležitým protektivním účinkem DEX je inhibice nadbytku vápníku, což je další významná příčina tachydysrytmií a pozdnějšího poškození myokardu. Navíc byl DEX v inhibici účinnější než jiná železo-chelatační činidla díky jeho neselektivní kov-chelataující aktivitě. Kromě železnatých a železitých iontů chelatoval DEX s docela podobnou afinitou i měď, vápník, mangan a zinek (Tetef *et al.*, 2001; Von Hoff, 1998). Na druhé straně tato neselektivní chelatace může být spojena s vedlejšími účinky DEX, především rizikem nadměrného vylučování zinku. Naopak ale mírná chelatace vápníku byla pravděpodobně

zodpovědná za nepatrné snížení levokomorového tlakového gradientu se současným snížením tlaku krve po 90 min a za významné snížení minutového srdečního výdeje po 24 hodinách.

Neschopnost DEX účinněji zabránit srdečnímu poškození způsobeného ISO byla pravděpodobně způsobena relativně nízkou dávkou nebo nedostatečnou přeměnou na železo-chelatující metabolity. DEX nedosahoval účinnosti např. nového chelátoru železa PCTH (2-pyridoxylkarboxaldehyd 2-thiophenkarboxyl hydrazon), u kterého jsme zkoumali chelatační účinky v dřívějších studiích (Mladěnka *et al.*, 2009<sup>b</sup>), kdy PCTH v dávce (20 mg.kg<sup>-1</sup> i.v.) ekvimolární k běžné dávce DFO vedl ke 100% přežití zvířat po aplikaci ISO, inhiboval tedy jak časně arytmie, tak pozdější poškození myokardu, což bylo provázeno především významnou redukcí hladin srdečního cTnT a vlhké hmotnosti komor zvýšené po podání ISO. DEX vlhkou hmotnost komor neovlivňoval.

Mírný účinek DEX zlepšovat katecholaminové poškození a naopak vysoká účinnost tohoto chelátoru, ve srovnání s jinými chelátory, v prevenci antracyklinové kardiotoxicity, může být spojena s odlišným chováním tohoto chelátoru v různém pH prostředí vlivem patofyziologických faktorů, jako je acidóza doprovázející AIM. Tudiž bylo důležité také testovat schopnost DEX vázat železo za různých pH (Obr. 41). Ačkoliv je DEX považován za proléčivo, může být přímo přeměněn volnými železnatými ionty na účinný chelátor železa. Ale to může být uskutečněno většinou pouze v neutrálním nebo velmi blízkém pH (v molárním koncentračním poměru 100:1 DEX: železo je přibližně 50% železa chelátováno). Kyselé podmínky při pH 5,5 tuto přeměnu značně snižovaly. U výše zmíněného poměru bylo chelátováno zhruba pouze 10% železa.



**Obr. 41:** *In vitro* chelatace železnatých iontů DEX při různém pH a různém molárním poměru koncentrace DEX:Fe<sup>2+</sup>.



## VII. ZÁVĚR

Jedním z cílů disertační práce bylo porovnat *in vitro* železo-chelatační účinky testovaných polyfenolických látek (flavonoidů a kumarinů) při pato/fyziologických pH podmínkách. Nejen že schopnost jednotlivých látek chelatovat železo byla závislá na jejich chemické struktuře, ale také na prostředí. Např. *ortho*-dihydroxy-4-metylkumariny a *ortho*-diacetoxy-4-metylkumariny mají významnou schopnost vázat železo za podmínek blízkých fyziologickému pH. Ovšem naopak může být jejich použití v kyselém prostředí (jako u AIM) nežádoucí v důsledku redukce železitých iontů a následné účasti železnatých iontů ve Fentonově reakci s produkcí vysoce reaktivního OH<sup>•</sup>. Podobně tomu bylo i v případě testovaných flavonoidů.

V případě *in vivo* účinků zkoumaných chelatačních látek můžeme shrnout, že rutin, i přes své předpoklady být účinnou kardioprotektivní látkou, nebyl schopen snížit katecholaminovou kardiotoxicitu u experimentálního modelu AIM navozeného vysokými dávkami ISO, pravděpodobně díky nízké schopnosti chelatovat železo v kyselém prostředí provázajícím ischemii a jeho hydrofilnímu charakteru ztěžujícím prostup do buněk přes biologické membrány. Naopak rutin spíše myokardiální poškození zhoršoval, a to především ve vyšších dávkách.

DEX měl některé kardioprotektivní účinky u modelu AIM, zejména snižoval částečně mortalitu, následky pozdějšího poškození myokardu, přebytek vápníku v kardiomyocytech, periferní hemodynamické poruchy a zřejmě také výskyt fibrilace komor, zatímco neměl účinky na AV blokády, jak prokázaly 2-hodinové pokusy. Tyto účinky byly pravděpodobně převážně založeny na chelataci železa a částečně na inhibici přebytku vápníku. Souhrnné kardioprotektivní účinky DEX jsou ovlivněny typem a vážností poškození myokardu, dávkou a dávkovacím schématem DEX užitého v experimentální studii.

## VIII. 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 katecholaminy**

**Klíčová slova:** Ischemická choroba srdeční, akutní infarkt myokardu, železo, chelátory železa, isoprenalin, polyfenolické látky, flavonoidy, kumariny, rutin, dexrazoxan

**Úvod a cíl studie:** Ischemická choroba srdeční (ICHS) a speciálně její nejvážnější 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 chelátovat 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 utvořených 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<sup>®</sup> (Experimetria Ltd. <sup>®</sup>, Maďarsko). V případě DEX se provádělo ještě kontinuální 2-hodinové měření hemodynamických parametrů srdeční funkce a EKG parametrů pomocí přístroje PowerLab<sup>®</sup> (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 *ortho*-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 *ortho*-diacetoxykumarinů.

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.

## IX. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Libuše Zatloukalová

Supervisor: Prof. MUDr. Radomír Hrdina, CSc.

Title of Doctoral Thesis: **Influence of polyphenolic substances with iron chelating activity in model of acute myocardial infarction and oxidation stress induced by catecholamines**

**Key words:** Ischaemic heart disease, acute myocardial infarction, iron, iron chelators, isoprenaline, polyphenolic substances, flavonoids, coumarins, rutin, dexrazoxane

**Background and aim:** Ischaemic heart disease (IHD) and particularly its most serious form - acute myocardial infarction (AMI) - represents significant health problem in the developed countries with relatively high mortality. Within multifactorial pathogenesis of AMI, reactive oxygen and nitrogen species (RONS) generated by free iron catalytic effect and increased activity of the sympathetic nervous system accompanied with a release of the catecholamines play a significant role. Large doses of the synthetic catecholamine isoprenaline has been used as a suitable experimental model of AMI.

AIM is considered as typical form of ischaemic-reperfusion (I-R) injury. RONS, which are excessively released during the first minutes of reperfusion, play a significant role in the pathogenesis of myocardial I-R injury. Free iron significantly increases the process of RONS generation.

Use of iron chelators could have protective influence in I-R injury and AMI, which is obvious from the mentioned pathogenesis. Iron chelators represent large group of drugs with very variable chemical structure. In clinical practice they are used in cases of acute iron

overdose and in chronic iron overload accompanying mainly frequent blood transfusions in patients with thalassaemia. These substances are experimentally studied also in another pathological conditions.

Aim of this study was therefore focused on substances with iron chelation potential. By *in vitro* method we compared iron-chelating activity of the tested polyphenolic substances in different patho/physiological pH conditions, their relation to the structure. Their chelating activity was compared with the standard chelating agent deferoxamine. The last part of the doctoral thesis deals with *in vivo* analysis of the effects of iron chelating substances in catecholamine model of AMI, induced by the administration of high dose of ISO.

**Methods:** In *in vitro* studies, 26 flavonoids from different subclasses and a series of naturally and synthetic 4-methylcoumarins were analysed for their iron chelating activity and stability of the formed complexes in four patho/physiologically relevant pH conditions (4.5/5.5/6.8/7.5) and compared with clinically used iron chelator deferoxamine. Ferrous ions and total iron chelating activity was assessed by a simple spectrophotometric assay. Iron chelators were mixed with ferrous or ferric ions in various ratios. Concentration of free iron was measured by specific indicator of ferrous ions ferrozine at 562 nm. Absorbance was measured immediately after addition of ferrozine and 5 minutes later. Concentrations of ferric ions is determined indirectly by means of ferric ions reduction by hydroxylamine to ferrous ions, which are subsequently determined by ferrozine. By this indirect method, the total iron chelation has been assessed too.

In *in vivo* experiments we used male Han:Wistar rats weighing approximately 360 g. Rats were pretreated i.v. with flavonoid rutin (46 mg.kg<sup>-1</sup> and 11,5 mg.kg<sup>-1</sup>) or with standard iron chelator dexrazoxane (20,4 mg.kg<sup>-1</sup>) (DEX) alone or in combination with ISO (100 mg.kg<sup>-1</sup> s.c.). 24 hours after drug(s) administration, animals were anaesthetized with urethane (1,2 g.kg<sup>-1</sup> i.p.). Haemodynamic parameters of cardiac function were assessed by

thermodilution method using Cardiosys<sup>®</sup> (Experimetria Ltd. <sup>®</sup>, Mađarsko). In the case of DEX, continual 2-hours measurements of haemodynamic and ECG parameters using apparatus PowerLab<sup>®</sup> (AdInstruments, Austrálie) were performed. Blood sample was withdrawn for biochemical measurement. Following euthanasia (1 mM KCl i.v.), the heart ventricles were removed for the measurement of their wet weight, concentration of the selected elements and for histopathological analysis.

**Results:** *In vitro* study demonstrated that the most effective iron binding site of flavonoids represents 6,7-dihydroxy structure, as in the case of baicalein, which had the similar activity in all tested pH as compared to deferoxamine. The 3-hydroxy-4-keto conformation together with 2,3-double bond and catecholic B ring, for example myricetin and quercetin, were also associated with a substantial iron chelation, but they have no significant role in the acidic conditions. They have similar activity like baicalein and deferoxamine only in the neutral conditions. The 5-hydroxy-4-keto site was less efficient and isolated keto, hydroxyl, methoxyl groups or an *ortho*-methoxy-hydroxyl groups were not associated with iron chelation.

Among the tested coumarins, *ortho*-dihydroxyderivatives were the most potent iron chelators. 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarins reached the efficacy of deferoxamine in neutral pH, but they did not bind iron firmly in acidic conditions. In addition, they reduced ferric ions to ferrous ones, which could lead to intensification of the Fenton chemistry. Other tested coumarins did not substantially chelate iron with exception of *ortho*-diacetoxycoumarins.

In *in vivo* study, ISO alone caused 30% mortality, a decrease in blood pressure, cardiac output, total peripheral resistance and an increase in heart rate, marked elevation of cardiac troponin T concentration, wet ventricle weight increase, myocardial calcium overload and histopathological abnormalities. Regarding ECG parameters, ISO caused rapid elevation in ST junction and a depression in T-wave and R-wave amplitudes.



Rutin decreased peripheral resistance elevation following ISO administration, but generally, rutin rather aggravated catecholamine myocardial injury. Higher dose of rutin increased mortality, intensified an increase in serum cTnT concentration and increased calcium overload in myocardium.

DEX decreased mortality likely due to an attenuation of dysrhythmias and inhibition of myocardial calcium overload. Although DEX tended to insignificantly decrease mean blood pressure, it had no significant influence on other haemodynamic and ECG parameters.

**Conclusion:** Ability of particular substances to chelate iron depends on their chemical structure and pH conditions. Using of some iron-chelating flavonoids or 4-methylcoumarins could be unsuitable mainly in acidic conditions (e.g., in acute myocardial infarction), as a consequence of ferric ions reduction and subsequent participation of ferrous ions in Fenton chemistry.

In the case of *in vivo* effects, rutin was not able to decrease catecholamine cardiotoxicity, probably due to its hydrophilic character and pro-oxidant properties. Contrarily, rutin in higher dose rather aggravated this myocardial injury. DEX demonstrated some cardioprotective effects in a model of AMI, which were probably caused, at least partly, by antidysrhythmic activity due to iron chelation and partial prevention of calcium overload of the myocardial tissue.

## **X. SEZNAM ZKRATEK**

AIM- akutní infarkt myokardu

ATP- adenosintrifosfát

cTnT- srdeční troponin T

DEX- dexrazoxan

DFO- deferoxamin

DFP- deferipron

DFX- deferasirox

DMSO- dimetyl sulfoxid

DNA- deoxyribonukleová kyselina

EDTA- kyselina ethylendiaminotetraoctová

EKG- elektrokardiogram

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

ICHS- ischemická choroba srdeční

I-R- ischemicko-reperfuzní

ISO- isoprenalin

LDL- lipoproteiny s nízkou hustotou

MDA- malondialdehyd

NADPH- nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NOS- syntáza NO

PCTH- 2-pyridoxylkarboxaldehyd 2-thiophenkarboxyl hydrazon

RONS- z ang. reactive oxygen and nitrogen species, reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku

SOD- superoxiddismutáza

TBARS- reaktivní sloučeniny kyseliny thiobarbiturové

## XI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:1763–1769.
2. Akashi YJ, Nakazawa K, Sakakibara M, Miyake F, Koike H, Sasaka K. The clinical features of takotsubo cardiomyopathy. *QJM* 2003; 96(8):563-73.
3. Akashi YJ, Tejima T, Sakurada H, Matsuda H, Sužuji K, Kawasaki K, Tsuchiya K, Hashimoto N, Musha H, Sakakibara M, Nakazawa K, Miyake F. Left ventricular rupture associated with Takotsubo cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2004; 79(6):821-4.
4. Ambrosio G, Zweier JL, Jacobus WE, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation* 1987; 76(4):906-15.
5. Anderson LJ, Wonke B, Prescott E, Holden S, Walker JM, Pennell DJ. Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia. *Lancet* 2002; 360 9332: 516–20.
6. Baccard N, Mechiche H, Nazeyrollas P, Manot L, Lamiable D, Devillier P, Millart H. Effects of 7-hydroxycoumarin (umbelliferone) on isolated perfused and ischemic-reperfused rat heart. *Arzneimittelforschung* 2000; 50:890-896.
7. Baker MS and Gebick JM. The effect of pH on yields of hydroxyl radicals produced from superoxide by potential biological iron chelators. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 581–588.

8. Balfour Barman JA, Foster RH. Deferiprone: a review of its clinical potential in iron overload in beta thalassemia major and other transfusion-dependent diseases. *Drugs* 1999; 58:553–578.
9. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(6):1700-11.
10. Barta J, Sanganalmath SK, Kumamoto H, Takeda N, Edes I, Dhalla NS. Antiplatelet agents sarpogrelate and cilostazol affect experimentally-induced ventricular arrhythmias and mortality. *Cardiovasc Toxicol* 2008; 8(3): 127-135.
11. Barton JC. Optimal management strategies for chronic iron overload. *Therapy in Practise* 2007; 67 (5):685-700.
12. Baud L, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol* 1986; 251:1765-76.
13. Beinfield WH, Lehr D. QRS-T variations in the rat electrocardiogram. *Am J Physiol* 1968; 214:197-204.
14. Berenshtein E, Vaisman B, Goldgerg-Langerman C, Kitrossky N, Konijn AM, Chevion M. Roles of ferritin and iron in ischemic preconditioning of the heart. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235:283-292.
15. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* 1998; 338(23):1650-6.
16. Bernier M, Hearse DJ, Manning AS. Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with „anti-free radical“ interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res* 1986; 58:331-340.

17. Berry CE, and Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physio* 2004; 555:589-606.
18. Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD. Iron deficiency and overload. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 40-61.
19. Bindoli A, Rigobello MP, Deebble DJ. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:391-405.
20. Blasig IE, Zipper J, Muschick P, Modersohn D, Löwe H. Absolute and relative myocardial ischemia by isoproterenol overdose. *Biomed Biochim Acta* 1985; 44:1641-1649.
21. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 2:249-68.
22. Bonello L, Com O, Ait-Moktar O, Théron A, Moro PJ, Salem A, Sbragia P, Paganelli F. Ventricular arrhythmias during Tako-tsubo syndrome. *Int J Cardiol* 2008; 128(2):e50-3.
23. Borges F, Roleira N, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr Med Chem* 2005; 12:887-916.
24. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Piga A, Di Gregorio F, Gamberini MR, Sabato V, Melevendi C, Cappellini MD, Verlato G. Survival and disease complications in thalassemia major. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850:227-31.
25. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, Romeo MA, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A, Cnaan A. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* 2004; 89(10):1187-93.

26. Braune A, Gütschow M, Engst W, Blaut M. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(12):5558-67.
27. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J* 1998; 330 (3):1173-8.
28. Buss JL, Hasinoff BB. Ferrous ion strongly promotes the ring opening of the hydrolysis intermediates of the antioxidant cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187). *Arch Biochem Biophys* 1995; 317(1):121-7.
29. Campos-Toimil M, Orallo F, Santana L, Uriarte E. Synthesis and vasorelaxant activity of new coumarin and furocoumarin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2002; 12(5): 783-6.
30. Cappellini MD, Cohen A, Piga A, Bejaoui M, Perrotta S, Agaoglu L, Aydinok Y, Kattamis A, Kilinc Y, Porter J, Capra M, Galanello R, Fattoum S, Drelichman G, Magnano C, Verissimo M, Athanassiou-Metaxa M, Giardina P, Kourakli-Symeonidis A, Janka-Schaub G, Coates T, Vermynen C, Olivieri N, Thuret I, Opitz H, Ressayre-Djaffer C, Marks P, Alberti D. A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. *Blood* 2006; 107(9):3455-62.
31. Cappellini MD, Pattoneri P. Oral iron chelators. *Annu Rev Med* 2009; 60:25-38.
32. Cappellini MD. Iron-chelating therapy with the new oral agent ICL670 (Exjade). *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18(2):289-98.
33. Cianciulli P. Iron Chelation Therapy in Thalassemia Syndromes. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2009; 1(1): e2009034.
34. Coady SA, Sorlie PD, Cooper LS, Folsom AR, Rosamond WD, Conwill DE. Validation of death certificate diagnosis for coronary heart disease:the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Clin Epidemiol* 2001; 54:40-50.

35. Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E. Thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 14-34
36. Cornell R and Schwertmann U. *The Iron Oxides*. Weinheim, Wiley-VCH 2003.
37. Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:35-43.
38. Cvetkovic RS, Scott LJ: Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* 2005; 65: 1005-24.
39. Dahlof B: Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am J Cardiol* 2010; 105: 3A-9A.
40. De Biase L, Pignatelli P, Lenti L, Tocci G, Piccioni F, Riondino S, Pulcinelli FM, Rubattu S, Volpe M, Violi F. Enhanced TNF alpha and oxidative stress in patients with heart failure: effect of TNF alpha on platelet O<sub>2</sub>-production. *Thromb Haemost* 2003; 317-325.
41. De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation. *Blood* 2009; 114(20):4546-51.
42. De Valk B, Marx JJ. Iron, Atherosclerosis, and Ischemic Heart Disease. *Arch Intern Med* 1999; 159:1542-1548.
43. Dhalla NS, Adameova A, Kaur M. Role of catecholamine oxidation in sudden cardiac death. *Fundam Clin Pharmacol* 2010; 24(5):539-46.
44. Diaz-Munoz M, Alvarez-Pérez MA, Yáñez L et al. Correlation between oxidative stress and alteration of intracellular calcium handling in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2006; 289:125-136.
45. Ducroq J, Moha ou Maati H, Guilbot S, Dilly S, Laemmel E, Pons-Himbert C, Faivre JF, Bois P, Stücker O, Le Grand M. Dexrazoxane protects the heart from acute

- doxorubicin-induced QT prolongation: a key role for I(Ks). *Br J Pharmacol* 2010; 159(1):93-101.
46. Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Mäenpää J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56(8):545-53.
47. 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 Lett* 1997; 416(2):123-9.
48. Firuzi O, Mladenka P, Petrucci R, Marrosu G, Saso L. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 801-807.
49. Fort DJ, Stover EL, Propst T, Hull MA, Bantle JA. Evaluation of the developmental toxicities of coumarin, 4-hydroxycoumarin, and 7-hydroxycoumarin using FETAX. *Drug Chem Toxicol* 1998; 21:15-26.
50. Fraga CG, Oteiza PI. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2002; 180(1):23-32.
51. Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr Pharm Des* 2004; 10(30):3813-33.
52. Gabutti V, Piga A. Results of long-term iron-chelating therapy. *Acta Haematol* 1996; 95(1):26-36.
53. Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(3):287-303.



54. Galetta F, Franzoni F, Cervetti G, Cecconi N, Carpi A, Petrini M, Santoro G. Effect of epirubicin-based chemotherapy and dexrazoxane supplementation on QT dispersion in non-Hodgkin lymphoma patients. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(10):541-4.
55. Gassen M, Youdim MB. The potential role of iron chelators in the treatment of Parkinson's disease and related neurological disorders. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80(4):159-66.
56. Gauthman KK, Saleem MTS, Thanislas PT, Prabhu VV, Krishnamoorthy KK, Devaraj NS, Somasundaram JS. Cardioprotective effect of the Hibiscus rosa sinensis flowers in an oxidative stress model of myocardial ischemic reperfusion injury in rat. *BMC Complement Altern Med* 2006; 6:32.
57. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 880-886.
58. Goldberg RJ, Glatfelter K, Burbank-Schmidt E, Lessard D, Gore JM. Trends in community mortality due to coronary heart disease. *Am Heart J* 2006; 151:501-507.
59. Gong G, Qin Y, Huang W, Zhou S, Yang X, Li D. Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. *European Journal of Pharmacology* 2010; 628:27-35.
60. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(4):629-36.
61. Günter K, Toupet C, Schupp T. Characterization of an iron-regulated promoter involved in desferrioxamine B synthesis in *Streptomyces pilosus*: repressor-binding site and homology to the diphtheria toxin gene promoter. *J Bacteriol* 1993; 175(11):3295-302.

62. Guo R, Wei P, Liu W. Combined antioxidant effect of rutin and vitamin C in Triton X-100 micelles. *J Pharm Biochem Anal* 2007; 43:1580.
63. Guo M, Perez C, Wei Y, Rapoza E, Su G, Bou-Abdallah F, Chasteen N D. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Trans* 2007; 4951–4961.
64. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*, third ed. Oxford University Press, New York 1999.
65. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57:715S-724S.
66. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease:curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344:721-4.
67. Halliwell, B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism of hydroxyl radical production in biochemici systems? *FEBS Lett* 1978; 92:321–326.
68. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1994; 16(6):845-50.
69. Hansen PR. Takotsubo cardiomyopathy: An under-recognized myocardial syndrome. *Eur J Intern Med* 2007; 18(8):561-5.
70. Harris DC, Aisen P. Facilitation of Fe(II) autoxidation by Fe(3) complexing agents. *Biochim Biophys Acta* 1973; 329(1):156-8.
71. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Ardiovasc Res* 1998; 39:60-76.
72. Hasinoff BB, Aoyama RG. Relative plasma levels of the cardioprotective drug dexrazoxane and its two active ring-opened metabolites in the rat. *Drug Metab Dispos* 1999; 27(2):265-8.

73. Hasinoff BB, Aoyama RG. Stereoselective metabolism of dexrazoxane (ICRF-187) and levrazoxane (ICRF-186). *Chirality* 1999; 11(4):286-90.
74. Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, Ferrans VJ. Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* 1998; 5(1):1-28.
75. Hasinoff BB, Schnabl KL, Marusak RA, Patel D, Huebner E. Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria. *Cardiovasc Toxicol* 2003; 3(2):89-99.
76. Hasinoff BB. Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against hypoxia-reoxygenation damage. *Cardiovasc Toxicol* 2002; 2:111-118.
77. Hatcher HC, Singh RN, Torti FM, Torti SV. Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use. *Future Med Chem* 2009; 1(9):1643-70.
78. Hershko C, Link G, Konijn AM, Huerta M, Rosenmann E, Reinus C. The iron-loaded gerbil model revisited: effects of deferoxamine and deferiprone treatment. *J Lab Clin Med* 2002; 139(1):50-8.
79. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease:the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342:1007-1011.
80. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticancerogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition and Cancer* 1993; 20:21-29.
81. Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:1489-94.

82. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995; 155:381-6.
83. Hider RC, Liu ZD, Khodr HH. Metal chelation of polyphenols. *Methods Enzymol* 2001; 335: 190-203.
84. Hotta Y, Huang L, Muto T, Yajima M, Miyazeki K, Ishikawa N, Fukuzawa Y, Wakida Y, Tushima H, Ando H, Nonogaki T. Positive inotropic effect of purified green tea catechin derivative in guinea pig hearts: the measurements of cellular Ca<sup>2+</sup> and nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 2006; 15;552(1-3):123-30.
85. Hoult JR, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins:natural products wit therapeutic potential. *Gen Pharmacol* 1996; 27:713-722.
86. Hrdina R, Gersl V, Klimtova I, Simunek T, Machackova J, Adamcova M. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2000; 43:75-82.
87. Chagoya de Sánchez V, Hernández-Muñoz R, López-Barrera F, Yañez L, Vidrio S, Suárez J, Cota-Garza MD, Aranda-Fraustro A, Cruz D. Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75(12):1300-11.
88. Chan SC, Chang YS, Wang JP, Chen SC, Kuo SC. Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. *Planta Med* 1998; 64:153-8.
89. Chang WT, Shao ZH, Yin JJ, Mehendale S, Wang CHZ, Qin Y, Li J, Chen WJ, Chien CT, Becker LB, Vanden Hoek TL, Yuan CS. Comparative effects of flavonoids on

- oxidant scavenging and ischemia-reperfusion injury in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2007; 566: 58-66.
90. Chau LY. Iron and atherosclerosis. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 2000; 24(4):151-5.
91. Chevion M, Jiang Y, Har-El R, Berenshtein E, Uretzky G, Kitrossky N. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: Possible predictive criteria for tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1993; 90:1102-1106.
92. Chou DS, Lee JJ, Hsiao G, Hsieh CY, Tsai YJ, Chen TF, Sheu JR. Baicalein induction of hydroxyl radical formation via 12-lipoxygenase in human platelets: an ESR study. *J Agric Food Chem* 2007; 55(3):649-55.
93. Choudhury R, Srail SK, Debnam E, Rice-Evans CA. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(3-4):278-86.
94. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 2002; 73:557-563.
95. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999; 43:860-878.
96. Kaiserová H, Šimůnek T, van der Vijgh WJ, Bast A, Kvasničková E. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772:1065-1074.
97. Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4):547-83.
98. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation- the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2002; 86: 41-59.

99. Kaneko T, Baba N, Matsuo M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 2003; 142(3):239-254.
100. Karthick M and Stanely Mainzen Prince P. Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58:701-707.
101. Kassim TA, Clarke DD, Mai VQ, Clyde PW, Mohamed Shakir KM. Catecholamine-induced cardiomyopathy. *Endocr Pract* 2008; 14(9):1137-49.
102. Kloner RA. Natural and unnatural triggers of myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 2006; 48:285-300.
103. Knekt P., Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:560-568.
104. Kostova I. Synthetic and natural coumarins as antioxidants. *Mini Rev Med Chem* 2006; 6(4):365-74.
105. Kuo SM, Leavitt PS, Lin CP. Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallothionein level in human intestinal cells. *Biol Trace Elem Res* 1998; 62(3):135-153.
106. Lameris TW, de Zeeuw S, Alberts G, Boomsma F, Duncker DJ, Verdouw PD, Veld AJ, van Den Meiracker AH. Time course and mechanism of myocardial catecholamine release during transient ischemia in vivo. *Circulation* 2000; 101(22):2645-50.
107. Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Houlst JR. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(17):2859-65.

108. Links M, Lewis C. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs* 1999; 57(3):293-308.
109. Liu ZD, Hider RC. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. *Med Res Rev* 2002; 22(1):26-64.
110. Loeper J, Goy J, Rozensztajn L, Bedu O, Moisson P. Lipid peroxidation and protective enzymes during myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1991; 196(2-3):119-25.
111. Lorenz M, Hellige N, Rieder P, Kinkel HT, Trimpert C, Staudt A, Felix SB, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Positive inotropic effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) involve activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers. *Eur J Heart Fail* 2008; 10(5):439-45.
112. Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigné C, Régéat F, Rémésy C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 1995; 125(7):1911-22.
113. Manning AS, Coltart DJ, Hearse DJ. Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ Res* 1984; 55(4):545-548.
114. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994; 330(15):1041-6.
115. Menghini L, Epifano F, Genovese S, Marcotullio MC, Sosa S, Tubaro A. Antiinflammatory activity of coumarins from *Ligusticum lucidum* Mill. subsp. *cuneifolium* (Guss.) Tamaro (Apiaceae). *Phytother Res* 2010; 24(11):1697-9.
116. Mennen LI, Sapinho D, Bree A, Arnault N, Bertrais S, Galan P, Hercberg S. Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy french women. *J Nutr* 2004; 134 (4): 923.

117. Milde J, Elstner EF, Grassmann J. Synergistic inhibition of lowdensity lipoprotein oxidation by rutin,  $\gamma$ -terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine* 2000; 11:105.
118. Minotti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1987; 262: 1098–1104.
119. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 2002; 36(11):1199-208.
120. Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 2009; 15(10):RA209-219.
121. Mladěnka P, Hrdina R, Bobrovová Z, Semecký V, Vávrová J, Holečková M, Palička V, Mazurová Y, Nachtigal P. Cardiac biomarkers in a model of acute catecholamine cardiotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 2009; 28 (10): 631-640<sup>a</sup>.
122. Mladěnka P, Hrdina R, Hubl M, Šimunek T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica* 2005; 48(3-4):127-135.
123. Mladěnka P, Kalinowski DS, Hašková P, Bobrovová Z, Hrdina R, Šimunek T, Nachtigal P, Semecký V, Vávrová J, Holečková M, Palička V, Mazurová Y, Jansson PJ, Richardson DR. The novel iron chelator 2-pyridylcarboxaldehyde -2-thiophenecarboxyl hydrazone, reduces catecholamine-mediated myocardial toxicity. *Chem Res Toxicol* 2009; 22(1):208-17<sup>b</sup>.
124. Mladěnka P, Macáková K, Filipský T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, Silvestri IP, Hrdina R, Saso L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem* 2011; 105(5):693-701.
125. Mladenka P, Macáková K, Zatloukalová L, Řeháková Z, Singh BK, Prasad AK, Parmar VS, Jahodář L, Hrdina R, Saso L. In vitro interactions of coumarins with iron. *Biochimie* 2010; 92(9):1108-14.



- 126.Mladěnka P, Semecký V, Bobrovová Z, Nachtigal P, Vávrová J, Holečková M, Palička V, Mazurová Y, Hrdina R. The effects of lactoferrin in a rat model of catecholamine cardiotoxicity. *Biometals* 2009; 22:353-361<sup>c</sup>.
- 127.Mladěnka P, Zatloukalová L, Šimůnek T, Bobrovová Z, Semecký V, Nachtigal P, Hašková P, Macková E, Vávrová J, Holečková M, Palička V, Hrdina R. Direct administration of rutin does not protect against catecholamine cardiotoxicity. *Toxicology* 2009; 255(1-2):25-32<sup>d</sup>.
- 128.Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 1997; 22:861–870.
- 129.Moridani MY, Pourahmad J, Bui H, Siraki A, O'Brien PJ. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(2):243-53.
- 130.Murphy CJ, Oudit GY. Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Card Fail* 2010; 16(11):888-900.
- 131.Musallam KM, Taher AE. Deferiprone or deferasirox for cardiac siderosis in beta-thalassemia major. *Haematologica* 2011; 96(2):5-6.
- 132.Nef HM, Möllmann H, Akashi YJ, Hamm CW. Mechanisms of stress (Takotsubo) cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7(4):187-93.
- 133.Nisbet-Brown E, Olivieri NF, Giardina PJ, Grady RW, Neufeld EJ, Séchaud R, Krebs-Brown AJ, Anderson JR, Alberti D, Sizer KC, Nathan DG. Effectiveness and safety of ICL670 in iron-loaded patients with thalassaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* 2003; 361(9369):1597-602.

- 134.Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol Pharm Bull* 2001; 24(10):1202-5.
- 135.Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997; 89(3):739-61.
- 136.Olivieri NF, Buncic JR, Chew E, Gallant T, Harrison RV, Keenan N, Logan W, Mitchell D, Ricci G, Skarf B. Visual and auditory neurotoxicity in patients receiving subcutaneous deferoxamine infusions. *N Engl J Med* 1986; 314:869-73.
- 137.Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 2000; 22(4):263-302.
- 138.Pashikanti S, de Alba DR, Boissonneault GA, Cervantes-Laurean D. Rutin metabolites: novel inhibitors of nonoxidative advanced glycation end products. *Free Radic Biol Med* 2010; 48(5):656-63.
- 139.Pedersen JZ, Oliveira C, Incerpi S, Kumar V, Fiore AM, Vito PD, Prasad AK, Malhotra SV, Virinder SP, Saso L. Antioxidant activity of 4-methylcoumarins. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59:1721-1728.
- 140.Pennell DJ, Porter JB, Cappellini MD, El-Beshlawy A, Chan LL, Aydinok Y, Elalfy MS, Sutcharitchan P, Li CK, Ibrahim H, Viprakasit V, Kattamis A, Smith G, Habr D, Domokos G, Roubert B, Taher A. Efficacy of deferasirox in reducing and preventing cardiac iron overload in beta-thalassemia. *Blood* 2010; 115(12):2364-71.
- 141.Perez CA, Wei Y, Guo M. Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. *J Inorg Biochem* 2009; 103(3):326-32.
- 142.Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep* 2009; 61(1):67-75.

143. Piga A, Galanello R, Forni GL, Cappellini MD, Origa R, Zappu A, Donato G, Bordone E, Lavagetto A, Zanaboni L, Sechaud R, Hewson N, Ford JM, Opitz H, Alberti D. Randomized phase II trial of deferasirox (Exjade, ICL670), a once-daily, orally-administered iron chelator, in comparison to deferoxamine in thalassemia patients with transfusional iron overload. *Haematologica* 2006; 91(7):873-80.
144. Pinelli A, Trivulzio S, Tomasoni L, Bertolini B, Brenna S, Bonacina E, Vignati S. Myocardial infarction non-invasively induced in rabbits by administering isoproterenol and vasopressin: protective effects exerted by verapamil. *Fundam Clin Pharmacol* 2004; 18(6):657-67<sup>a</sup>.
145. Pinelli A, Trivulzio S, Tomasoni L, Brenna S, Bonacina E, Accinni R. Isoproterenol-induced myocardial infarction in rabbits. Protection by propranolol or labetalol: a proposed non-invasive procedure. *Eur J Pharm Sci* 2004; 23:277-285<sup>b</sup>.
146. Popelová O, Štěrba M, Hašková P, Šimůnek T, Hroch M, Guncová I, Nachtigal P, Adamcová M, Geršl V, Mazurová Y. Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *Br J Cancer* 2009; 101:792-802.
147. Porter JB. Practical management of iron overload. *Br J Haematol* 2001; 115:239-52.
148. Punithavathi VR, Shanmugapriya K, Prince PS. Protective effects of rutin on mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiotoxic rats: an in vivo and in vitro study. *Cardiovasc Toxicol* 2010; 10(3):181-9.
149. Raj HG, Sharma RK, Garg BS, Parmar VS, Jain SC, Goel S, Tyagi YK, Singh A, Olsen CE, Wengel J. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part 3: A novel mechanism for the inhibition of biological membrane lipid peroxidation by dioxygenated 4-methylcoumarins mediated by the

- formation of a stable ADP-Fe-inhibitor mixed ligand complex. *Bioorg Med Chem* 1998; 6(11):2205-12.
- 150.Rajadurai M, Prince PS. Preventive effect of naringin on isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: an in vivo and in vitro study. *Toxicology* 2007; 232(3):216-25.
- 151.Ramu E, Korach A, Houminer E, Schneider A, Elami A, Schwalb H. Dexrazoxane Prevents Myocardial Ischemia/Reperfusion-Induced Oxidative Stress in the Rat Heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 343–348.
- 152.Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AAE, Bertelli A, Das DK. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:160-169.
- 153.Remiao F, Carmo H, Carvalho FD, Bastos ML. Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *J Enzyme Inhib* 2000; 15(1):47-61.
- 154.Remiao F, Carvalho M, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML. Cu<sup>2+</sup>-induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol* 2002; 15:861-869.
- 155.Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:933–956.
- 156.Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1331: 1-40.
- 157.Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1331: 1-40.
- 158.Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stamper MJ, Willet WC. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 1996; 125:384-9.

159. Robaszekiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int* 2007; 31(10):1245-50.
160. Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarction-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol* 1959; 67:443-455.
161. Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 291-306.
162. Rona G, Boutet M, Huttner I. Reperfusion injury. A possible link between catecholamine-induced and ischemic myocardial alterations. *Adv Myocardiol* 1983; 4:427-439.
163. Rump AF, Klaus W. Cardiotoxicity of adrenochrome in isolated rabbit hearts assessed by epicardial NADH fluorescence. *Arch Toxicol* 1994; 68(9):571-5.
164. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, Barcellona ML, Vanella A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol* 2000; 16:91-98.
165. Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(6):1400-8.
166. Sestili P, Diamantini G, Bedini A, Ceriomi L, Tommasini I, Tarzia G, Cantoni O. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. *Biochem J* 2002; 364:121-128.
167. Schweigert N, Zehnder AJ, Eggen RI. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ Microbiol* 2001; 3(2):81-91.
168. Spiller P, Webb-Peploe MM. Blood flow. *Eur Heart J* 1985; 6:11-8.

169. Stanely Mainzen Prince P, Karthick M. Preventive effect of rutin on lipids, lipoproteins, and ATPases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2007; 21:1-6.
170. Steinbrecher UP, Zhang HF, Loughheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1990; 9(2):155-68.
171. Stookey LL. Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem* 1970; 42(7):779-781.
172. Sugioka K, Nakano M. Mechanism of phospholipid peroxidation induced by ferric ion-ADP-adriamycin-co-ordination complex. *Biochim Biophys Acta* 1982; 713(2):333-43.
173. Tadolini B, Cabrini L, Menna C, Pinna GG, Hakim G. Iron (III) stimulation of lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1997; 27(6):563-76.
174. Tam TF, Leung-Toung R, Li W, Wang Y, Karimian K, Spino M. Iron chelator research: past, present, and future. *Curr Med Chem* 2003; 10(12):983-95.
175. Tetef ML, Synold TW, Chow W, Leong L, Margolin K, Morgan R, Raschko J, Shibata S, Somlo G, Yen Y, Groshen S, Johnson K, Lenz HJ, Gandara D, Doroshow JH. Phase I trial of 96-hour continuous infusion of dexrazoxane in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2001; 7(6):1569-76.
176. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; 122:339-352.
177. Van Acker SA, van Balen GP, van der Berg DJ, Bast A, van der Vijgh WJ. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 935-943.
178. Vichinsky E, Onyekwere O, Porter J, Swerdlow P, Eckman J, Lane P, Files B, Hassell K, Kelly P, Wilson F, Bernaudin F, Forni GL, Okpala I, Ressayre-Djaffer C, Alberti D,

- Holland J, Marks P, Fung E, Fischer R, Mueller BU, Coates T. Deferasirox in Sickle Cell Investigators. A randomised comparison of deferasirox versus deferoxamine for the treatment of transfusional iron overload in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2007; 136(3):501-8.
179. Von Hoff DD. Phase I trials of dexrazoxane and other potential applications for the agent. *Semin Oncol* 1998; 25:31-6.
180. Wadworth AN, Faulds D. Hydroxyethylrutosides. A review of its pharmacology, and therapeutic efficacy in venous insufficiency and related disorders. *Drugs* 1992; 44(6):1013-32.
181. Wexler BC. Myocardial infarction in young vs old male rats; pathophysiologic changes. *Am. Heart J* 1978; 96: 70–80.
182. Winsor T, Mills B, Winbury MM, Howe BB, Berger HJ. Intramyocardial diversion of coronary blood flow: effects of isoproterenol-induced subendocardial ischemia. *Microvasc Res* 1975; 9:261-278.
183. Wiseman LR, Spencer CM. Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Drugs* 1998; 56(3):385-403.
184. Wood JC, Kang BP, Thompson A, Giardina P, Harmatz P, Glynn T, Paley C, Coates TD. The effect of deferasirox on cardiac iron in thalassemia major: impact of total body iron stores. *Blood* 2010; 116 4: 537–43.
185. Yang LP, Keam SJ, Keating GM. Deferasirox: a review of its use in the management of transfusional chronic iron overload. *Drugs* 2007; 67(15):2211-30.
186. You KM, Jong HG, Kim HP. Inhibition of cyclooxygenase/lipoxygenase from human platelets by polyhydroxylated/methoxylated flavonoids isolated from medicinal plants. *Arch Pharm Res* 1999; 22:18-24.

187. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70:181-190.
188. Zwemer CF, Shoemaker JL Jr, Hazard SW 3rd, Davis RE, Bartoletti AG, Phillips CL. Hyperoxic reperfusion exacerbates postischemic renal dysfunction. *Surgery* 2000; 128(5):815-21.



## XII. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

### 1. Původní práce publikované v odborných časopisech

MLADĚNKA P, ZATLOUKALOVÁ L, ŠIMŮNEK T, BOBROVOVÁ Z, SEMECKÝ V, NACHTIGAL P, HAŠKOVÁ P, MACKOVÁ E, VÁVROVÁ J, HOLEČKOVÁ M, PALIČKA V, HRDINA R. **Direct administration of rutin doesn not protect against catecholamine cardiotoxicity.** Toxicology 2009; 255(1-2):25-32 (IF = 3,641)

MLADĚNKA P, MACÁKOVÁ K, ZATLOUKALOVÁ L, ŘEHÁKOVÁ Z, SINGH BK, PRASAD AK, PARMAR VS, JAHODÁŘ L, HRDINA R, SASO L. **In vitro interactions of coumarins with iron.** Biochimie 2010; 92(9):1108-14 (IF = 3,787)

MLADĚNKA P, MACÁKOVÁ K, FILIPSKÝ T, ZATLOUKALOVÁ L, JAHODÁŘ L, BOVICELLI P, SILVESTRI IP, HRDINA R, SASO L. **In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids.** 2011. 2011; 105(5):693-701 (IF = 3,317)

### 2. Přehledové články

MLADĚNKA P, ZATLOUKALOVÁ L, FILIPSKÝ T, HRDINA R. **Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity.** Free Radic Biol Med 2010; 49(6):963-75 (IF = 5,707)

### **3. Abstrakty z mezinárodních konferencí**

**28th Annual Meeting, European Section of the International Society for Heart Research - Atény (Řecko), květen 28-31, 2008**

MLADĚNKA P, SEMECKÝ V, BOBROVOVÁ Z, FILIPOVÁ V, ZATLOUKALOVÁ L, HRDINA R. The influence of iron chelators on myocardial metal content after catecholamine cardiotoxic insult. J Moll Cell Cardiol 2008; vol. 44:716-7.

**EPHAR 2008 Congress - Manchester (Velká Británie), červenec 12-17, 2008**

MLADĚNKA P, ZATLOUKALOVÁ L, MACÁKOVÁ K, ŘEHÁKOVÁ Z, KUMAR PRASAD A, PARMAR PS, SASO L, HRDINA R. In vitro iron chelation activity of selected polyphenolic compounds. Fundam Clin Pharmacol 2008; vol. 22 (suppl. 2), p. 58.

HRDINA R, MLADĚNKA P, ZATLOUKALOVÁ L, BOBROVOVÁ Z. Effects of iron chelators on acute isoprenaline cardiotoxicity. Fundam Clin Pharmacol 2008; vol. 22 (suppl. 2), p.104-5.

**7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF - Atény (Řecko), srpen 3-8, 2008**

MACÁKOVÁ M, MLADĚNKA P, ŘEHÁKOVÁ Z, ZATLOUKALOVÁ L, HRDINA R, OPLETAL L, KARLIČKOVÁ J. Ferrous and ferric chelation activity of selected natural flavonoids. Planta Med 2008; 74:946.

**Heart Failure Congress 2009, Palais Acropolis, Nice – Francie, 30.5. -2.6. 2009**

ZATLOUKALOVÁ L, MLADĚNKA P, MACÁKOVÁ K, SEMECKÝ V, NACHTIGAL P, HRDINA R. The cardiovascular effects of rutin on catecholamine model of

acute myocardial infarction. European Journal of Heart Failure Supplements 2009; 8:abstrakt 937

MLADĚNKA P, ZATLOUKALOVÁ L, SEMECKÝ V, NACHTIGAL P, HRDINA R. The cardiovascular effects of rutin on healthy rats. European Journal of Heart Failure Supplements 2009; 8:abstrakt 936

**International BioIron Society Meeting, Porto-Portugalsko, 7. -11. 6. 2009**

MLADĚNKA P, SEMECKÝ V, ZATLOUKALOVÁ L, BRIESTENSKÝ J, HRDINA R. Polyanhydroglucuronic acid derivative of lactoferrin does not improve its protective effects on catecholamine cardiotoxicity.

MACÁKOVÁ K, MLADĚNKA P, ZATLOUKALOVÁ L, VÁVROVÁ K, OPLETAL L, HRDINA R, JAHODÁŘ L. Iron chelation by synthetic chelators and flavonoids depends on pH.

**30th Annual Meeting, European Section of the International Society for Heart Research, Haifa-Izrael, 26. -29.6. 2011**

MLADĚNKA P, ZATLOUKALOVÁ L, FILIPSKÝ T, HRDINA R. Acute haemodynamic changes in the isoprenaline cardiotoxicity model.

#### **4. Abstrakty z českých a slovenských konferencí**

**58. Farmakologické Dny- Praha, 3. - 5. 9. 2008**

ZATLOUKALOVÁ L, MLADĚNKA P, BOBROVOVÁ Z, VÁVROVÁ J, HOLEČKOVÁ M, PALIČKA V, HRDINA R. Isoprenaline Cardiotoxic Insult is Aggravated by Rutin. Prague Med Rep 2008; 109 (suppl.):S131-2.

## **60. Farmakologické Dny- Hradec Králové, 15. -17.9. 2010**

FILIPSKÝ T, ZATLOUKALOVÁ L, MLADĚNKA P, HRDINA R. Acute haemodynamic changes following administration of synthetic catecholamine isoprenaline. Acta Medica (Hradec Králové) 2010; vol. 53, no.3, p.171.

MLADĚNKA P, ZATLOUKALOVÁ L, FILIPSKÝ T, HRDINA R. Influence of different drugs with iron chelating properties on catecholamine model of cardiotoxicity. Acta Medica (Hradec Králové) 2010; vol. 53, no.3, p.184-5.

## **5. Přednášky na konferencích**

### **Fakultní konference- Farmaceutická fakulta v Hradci Králové- 1. -2.2. 2011**

ZATLOUKALOVÁ L, FILIPSKÝ T, MLADĚNKA P, HRDINA R. Acute haemodynamic changes after synthetic catecholamine isoprenaline administration.

FILIPSKÝ T, MLADĚNKA P, MACÁKOVÁ K, ZATLOUKALOVÁ L, HRDINA R. Iron chelating properties of flavonoids measured by direct spectrophotometry.

### **8th Indo-Italian workshop on Chemistry and Biology of Antioxidants, Řím- Itálie, 29.11. -2.12. 2010**

MLADĚNKA P, ZATLOUKALOVÁ L, FILIPSKÝ T, HRDINA R. Effects of rutin on healthy animals and animals with induced acute myocardial infarction.

MACÁKOVÁ K, MLADĚNKA P, FILIPSKÝ T, ZATLOUKALOVÁ L, JAHODÁŘ L, BOVICELLI P, SILVESTRI IP, HRDINA R, SASO L. Iron chelating properties of flavonoids measured by ferrozine methodology.

FILIPSKÝ T, MLADĚNKA P, MACÁKOVÁ K, ZATLOUKALOVÁ L, HRDINA R. Iron chelating properties of flavonoids measured by direct spectrophotometry.