

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: **Mgr. Tomáš Filipický**

Školitel: **prof. MUDr. Radomír Hrdina, CSc.**

Konzultant: **PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.**

Název disertační práce: **Výzkum látek s potenciálem chelátovat železo a jejich případné využití v terapii akutního infarktu myokardu**

Železo je esenciálním elementem všech živých organismů. Za fyziologických podmínek je úroveň volného/nevázaného železa v organismu velmi nízká. V případě některých patologických stavů, je ovšem tato homeostáza železa narušena a může dojít k poškození orgánů v důsledku zvýšené tvorby reaktivních forem kyslíku.

Ischemická choroba srdeční je celosvětově nejčastější příčinou morbidity a mortality. Její nejzávažnější formou je akutní infarkt myokardu (AIM). Již během časné ischemie se do krevního řečiště uvolňují katalyticky aktivní elementy, především zmíněné železo, ale také měď. Po obnovení krevního průtoku (reperfuzi) se mohou účastnit produkce biologicky nejnebezpečnějšího oxidantu – hydroxylového radikálu tzv. železem/mědí katalyzovanou Fentonovou reakcí. Tudíž se zde nabízí potenciale aplikovatelný farmakoterapeutický přístup k léčbě tohoto onemocnění – terapie látkami chelatujícími železo/měď.

Cílem této disertační práce byl výzkum látek chelatujících železo a jejich vliv na isoprenalinový model AIM včetně charakterizace některých dříve nezkoumaných aspektů tohoto modelu.

V *in vitro* části studie byla k analýze účinků testovaných látek při (pato)fyziologicky relevantních pH použita: 1) spektrofotometrická ferrozinová metoda k detekci účinnosti chelatace železa a 2) HPLC analýza k zjištění anti/pro-oxidační aktivity s použitím kyseliny salicylové jako indikátoru tvorby hydroxylového radikálu. Kromě toho byl vyvinut nový, finančně nenáročný, ale přesný analytický přístup pro zjištění stechiometrie komplexu chelátor:železo za využití UV–Vis spektrofotometrie. *In vivo* část studie byla zaměřena na zhodnocení vlivu dexrazoxanu (20,4 mg/kg, i.v.) na isoprenalinový model AIM (100 mg/kg, s.c.) u Wistar:Han potkanů. Kromě toho byly také popsány časné patologické změny a vzájemné vztahy mezi biochemickými markery a funkčními parametry srdeční dys/funkce po aplikaci isoprenalinu. V těchto *in vivo* studiích byla použita termodiluční metoda nebo invazivní měření tlaku a objemu v levé srdeční komoře.

Pro chelatační účinky flavonoidů se jako nejvýhodnější pozice jevila 6,7-dihydroxylová skupina. Baikalein, obsahující tuto strukturu, měl srovnatelnou schopnost chelátovat železo jako referenční chelátor železa – deferoxamin. Nicméně jeho vliv na inhibici Fentonovy reakce byl menší. 3-hydroxy-4-keto substituce s dvojnou vazbou v poloze 2 a pyrokatecholový kruh B (např. kvercetin) byly rovněž spojeny s významnými chelatačními účinky. Na druhou stranu vliv těchto flavonoidů na Fentonovu reakci byl spíše minimální. V některých případech byl pozorován dokonce nežádoucí pro-oxidační účinek.

Ačkoli mezi dlouho známé podskupiny syntetických chelátorů železa patří 1-fenyl-3-methyl-4-acylpyrazol-5-ony, poznatky týkající se jejich biologické aktivity jsou spíše limitované. Některé sloučeniny prokázaly vyšší účinnost při pH 4,5 než v klinické praxi používaný deferoxamin. Za zmínku stojí prototypová sloučenina H₂QpyQ, tj. 2,6-bis[4(1-fenyl-3-methylpyrazol-5-on)karbonyl]pyridin, jejíž schopnost chelátovat železo rostla s klesajícím pH. Podle našich znalostí je to vůbec první sloučenina, která má takovéto vlastnosti. Kromě toho většina acylpyrazolonů patřila mezi velmi účinné inhibitory Fentonovy reakce, jež lze srovnávat s deferoxaminem.

Jednou z důležitých vlastností chelátorů je i stechiometrie vytvořeného komplexu ve vztahu k pH. Jelikož je u některých látek, např. flavonoidů, stechiometrie komplexů stále nejasná, byl k jejímu určení vyvinut nový analytický přístup za využití UV–Vis spektrofotometrie. Hlavní výhodou oproti standardní Jobově metodě se jeví jeho schopnost určit stechiometrii a případně i kinetiku tvorby komplexu i u slabých chelátorů železa.

Studie zaměřená na analýzu časných patologických změn po aplikaci kardiotoxické dávky isoprenalinu prokázala, že z patogenetického hlediska diastolická dysfunkce předchází systolické dysfunkci a že k její samotné indukci je stimulace pouze β_2 -adrenergních receptorů nedostatečná. Kromě toho sérové koncentrace srdečního troponinu (cTnT) významně korelovaly se závažností poškození myokardu u potkanů (např. s přetížením myokardu vápníkem – pozitivní korelace a tepovým objemem – negativní korelace). Na druhou stranu korelace cTnT s markery oxidačního stresu byly spíše nevýrazné (glutathion a vitamin C) nebo nulové (vitamin E a TBARS – reaktivní formy thiobarbiturové kyseliny, z angl. thiobarbituric acid reactive substances). Vztah mezi cTnT a dalšími parametry byl exponenciální s výjimkou koncentrace vápníku v srdeční tkáni, kde byl nalezen vztah, který popisuje mocninná funkce.

V 24hodinovém experimentu podání dexrazoxanu vedlo k částečnému poklesu mortality, snížení koncentrace vápníku v srdeční tkáni, ke zlepšení histopatologického nálezu a hemodynamických parametrů. Kontinuální 2hodinový experiment prokázal, že dexrazoxan není schopen ovlivnit isoprenalinem navozené atrioventrikulární bloky a jeho vliv na hemodynamické parametry byl zde spíše minimální. Navíc *in vitro* experimenty naznačily, že chelatační vlastnosti dexrazoxanu nehrají významnou roli v kardioprotektivním mechanismu.

Závěrem lze shrnout, že série *in vitro* experimentů může u chelátorů železa alespoň částečně predikovat pozitivní nebo i negativní vliv na isoprenalinový model AIM. Některé aspekty bude ale nutné ověřit v dalších zejména *in vivo* experimentech.