

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



RIGORÓZNÍ PRÁCE

**ZINEK-CHELATAČNÍ AKTIVITA VYBRANÝCH
NOVÝCH CHELÁTORŮ ZE SKUPINY
4-ACYLPYRAZOL-5-ONŮ**

Vedoucí rigorózní práce (konzultant): doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka,
PhD.

Ko-konzultant:

Mgr. Václav Tvrdý

Hradec Králové 2020

Mgr. Jana Nováková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a veškeré použité prameny byly v práci řádně citovány. Tuto práci jsem nepoužila k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové dne

.....

Mgr. Jana Nováková

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla srdečně poděkovat svému školiteli doc. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, PhD. za velmi vstřícnou odbornou pomoc a užitečné rady během vypracování této rigorózní práce.

Dále bych chtěla velmi poděkovat Mgr. Václavu Tvrděmu za neustálou pomoc v laboratoři i mimo ni.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Jana Nováková

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

Ko-konzultant: Mgr. Václav Tvrдый

Název rigorózní práce: Zinek-chelatační aktivita vybraných nových chelátorů ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů

Zinek zastává v lidském organismu širokou škálu klíčových fyziologických funkcí. V případě zvýšených koncentrací zinku v těle může docházet k řadě patologických projevů. V méně závažných případech se jedná o gastrointestinální nevolnosti, v horším případě může dojít až ke kardiovaskulárnímu selhání. Při potvrzení diagnózy – intoxikace zinkem, se využívá chelatační terapie, jejíž význam spočívá ve vytvoření komplexů s nadbytečným kovem a jejich exkreci. U látek ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů byly již dříve ukázány silné železochelatační vlastnosti. Cílem této rigorózní práce bylo otestovat, zda tyto látky nemohou také chelatovat zinek a stanovit, zda mohou strukturální obměny základní struktury zvýšit tento potenciál. Na základě získaných výsledků je možné konstatovat, že většina z testovaných 4-acylpyrazol-5-onů chelatovala zinečnaté ionty spíše zanedbatelně nebo až při velmi vysokém nadbytku chelátoru nad Zn^{2+} ionty. Nejúčinnějšími látkami byly H2QPyQ a H2Q4Q. Ty se ale chovaly velmi odlišně: u prvně jmenované látky se zvyšovala chelatační aktivita se zvyšujícím se pH a dosáhla 75 % chelatace Zn^{2+} iontů u pH 7,5; zatímco druhá jmenovaná byla schopna chelatovat cca 50 % Zn^{2+} iontů při pH 5,5-7,5 a nejvyšším poměru 100:1 ale 100 % při poměru 10:1 u pH 4,5. Přes tyto výsledky není pravděpodobné, že by tyto látky našly využití jako chelátory zinečnatých iontů, protože jejich účinnost byla za všech podmínek nižší než experimentálně používaný chelátor TPEN.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Jana Nováková, MSc.

Consultant: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, PharmD., Ph.D.

Co-consultant: Václav Tvrdý, MSc.

Title of thesis: Zinc-chelating activity of selected novel chelators from 4-acylpyrazol-5-one group

Zinc plays a key role in many physiological functions in the human body. In case of increased concentrations of zinc in the body, a number of pathological manifestations may occur. In less severe cases, gastrointestinal discomfort and nausea can occur while in a worse case, cardiovascular failure can develop. After the diagnosis of zinc intoxication is confirmed, the chelation therapy is used. Its principle is based on the formation of complexes with excessive metal and their excretion. Substances from the group 4-acylpyrazol-5-ones were previously shown to be strong iron chelators. The aim of this thesis was to test the ability of these substances to chelate zinc and determine the structure-activity relationship. Based on the obtained results, it can be concluded that most of the tested 4-acylpyrazol-5-ones were almost inactive or showed ability to chelate zinc ions only at very high excess over Zn^{2+} . The most effective substances were H2QPyQ and H2Q4Q. However, each of them behaved very differently: chelation activity of H2QPyQ increased with increasing pH and reached 75 % of Zn^{2+} ions chelation at pH 7.5; while H2Q4Q reached about 50 % of Zn^{2+} ions at pH 5.5-7.5 at the highest ratio of 100:1 but reached 100 % at the most acidic condition of pH 4.5 even in a lower ratio of 10:1. Despite these results, these substances are unlikely to be used as zinc ion chelators, as their effectiveness in all conditions was lower than the experimentally used chelator TPEN.

SEZNAM ZKRATEK

AD	atopická dermatitida
BAL	dimerkaprol, tzv. „britský anti-Lewisit“, z anglického „ British anti Lewisit “
DMSO	dimetylsulfoxid
DPA	D-penicilamin
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství, z anglického "Food and Agricultural Organization"
GI	gastrointestinální
MT	metallothionein
p. o.	perorální
TPEN	N,N,N,N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin
ZNF	zinkové prsty, z anglického " zinc fingers "
ZnT	transportéry zinku zprostředkovávající přesun zinku z cytosolu (eflux zinku vně buňky nebo influx dovnitř intracelulárních organel)
ZIP	transportéry zinku zodpovědné za transport zinku do cytoplasmy

OBSAH

	ÚVOD.....	9
1	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1	Fyziologický význam zinku.....	10
1.2	Farmakokinetika zinku.....	12
1.3	Zdroj zinku.....	14
1.4	Role zinku v organismu.....	14
1.4.1	Transportéry ZnT a ZIP.....	15
1.4.2	Zinc fingers (ZNF).....	15
1.4.3	Metallothionein (MT).....	16
1.5	Ukazatelé hladiny zinku v organismu.....	16
1.6	Patologie zinku.....	17
1.6.1	Nedostatek zinku v organismu.....	17
1.6.2	Nadbytek zinku v organismu.....	18
1.7	Chelatace a vlastnosti chelátorů.....	18
1.7.1	Dimerkarpol.....	19
1.7.2	Edetan disodný vápenatý (CaNa ₂ EDTA).....	20
1.7.3	N,N,N,N' - tetrakis (2-pyridylmethyl) –ethylendiamin (TPEN) ...	21
1.7.4	D-penicillamin.....	21
1.7.5	Acylpyrazolony.....	22
2	CÍL PRÁCE.....	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
3.1	Chemikálie a přístroje.....	25
3.1.1	Chemikálie.....	25
3.1.1.1	Zinek, rozpouštědla a indikátor.....	25
3.1.1.2	Testované chelátory.....	25
3.1.2	Přístroje.....	27
3.2	Metodika vztahující se k měření chelatace zinečných iontů.....	28
3.2.1	Příprava zásobních roztoků.....	28
3.2.2	Příprava pracovních roztoků.....	28
3.2.3	Měření kalibrační křivky zinečnatých iontů (Tab. 1).....	28
3.2.4	Měření chelatační aktivity zinečnatých (Tab. 2).....	29
3.2.5	Změření spekter 4-acylpyrazol-5-onů.....	30
3.3	Matematická a statistická analýza.....	31
3.3.1	Výpočet chelatace zinku.....	31
3.3.2	Statistická analýza.....	31
4	VÝSLEDKY.....	32
5	DISKUZE.....	55
	ZÁVĚR.....	56
	POUŽITÁ LITERATURA.....	58

ÚVOD

V periodické soustavě prvků zinek najdeme ve IIb skupině, společně se dvěma toxickými kovy - rtutí a kadmíem. Nicméně zinek je na rozdíl od ostatních kovů této skupiny řazen mezi netoxické kovy v lidském organismu (Fosmire 1990). V kontrastu k těmto dvěma kovům, u kterých role v lidském organismu není blíže známa, zinek je důležitým mikronutrientem nejen pro lidskou populaci, ale obecně pro všechny žijící organismy. Je významným komponentem více než 300 enzymů a celé řady proteinů, které jsou nepostradatelné pro lidské zdraví (Vallee et al. 1993).

Zinek zastává v lidském organismu širokou škálu významných funkcí, které jsou primárně závislé na jeho celkovém množství. V případě zvýšených koncentrací zinku v těle může docházet k řadě patologických stavů. V méně závažných případech se jedná o gastrointestinální nevolnosti, v horším případě může dojít až ke kardiovaskulárnímu selhání (Plum et al. 2010).

Přítomnost řady kovů je pro fyziologickou funkci organismu naprosto nezbytná. Proto logicky při jejich dyshomeostáze dochází ke zjevným patologickým projevům. V případě nadbytku kovů může docházet až k závažným toxickým stavům.

Při potvrzení diagnózy – intoxikace zinkem, se využívá chelatační terapie, jejíž význam spočívá ve vytvoření komplexu s nadbytečným kovem v organismu. (Andersen 1999)

Chelatační terapie je preferovanou léčebnou metodou pro odstranění toxických kovů z organismu. Chelatační činidla vykazují schopnost vázat toxické kovy z intra- nebo extracelulárních oblastí v organismu, vytvořit s ním komplex a vyloučit ho ven z těla (Flora et al. 2010).

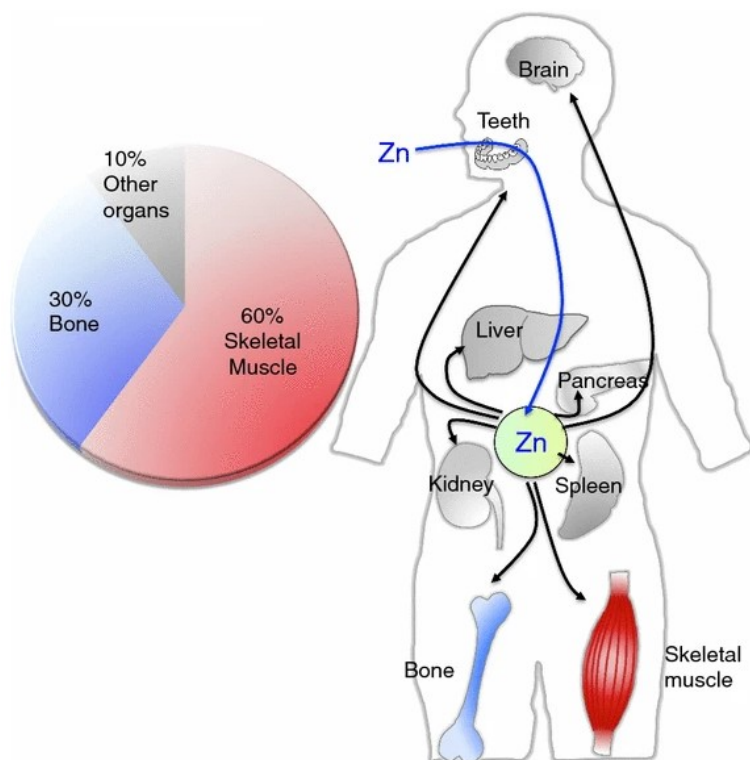
V současné době vykazují chelatační činidla řadu nežádoucích účinků. Nutno ovšem taktéž podotknout, že řada z nich nevykazuje dostatečnou selektivitu, a proto při jejich použití dochází i k množstevnímu poklesu fyziologických kovů v organismu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM ZINKU

Zinek je významným stopovým prvkem všech živých organismů. Je po železe druhým nejvíce zastoupeným mikronutrientem v lidském organismu. Význam zinku pro živé organismy byl poprvé popsán v roce 1869. V dalších letech byla jeho důležitost potvrzena u rostlin a živočichů (O'Dell et al. 1958, Kambe et al. 2015). Deficit zinku byl u lidí poprvé zaznamenán v roce 1961. Jednalo se o mladého Iráčana a Egyptěana, kteří měli obdobné symptomy - kožní onemocnění, mentální letargie a hepatosplenomegalie. Po následné zinkové suplementaci se jejich stav zlepšil (Prasad et al. 1961, Sandstead et al. 1967).

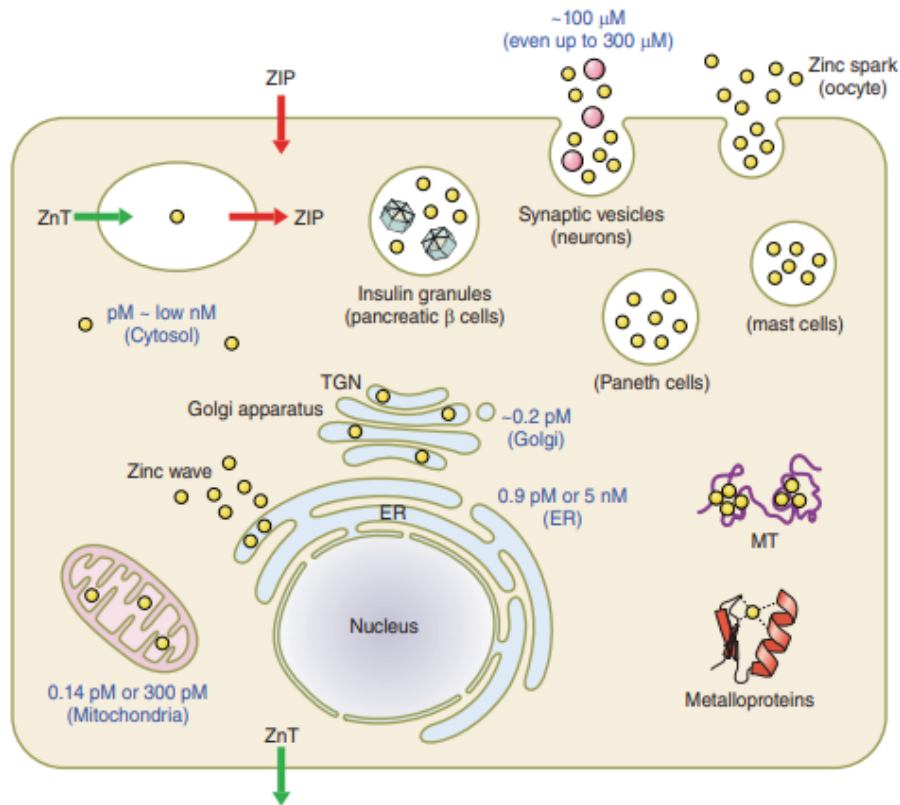
Celkové množství zinku v organismu představuje okolo 2 g, přičemž 95 % z tohoto množství je intracelulární. Vyskytuje se ve všech tkáních a tělních tekutinách, ale nejvíce je lokalizován v kosterním svalstvu (okolo 30 %) a kostech (okolo 60 %, viz Obr. 1). V játrech a kůži je obsaženo 5 % z celkového obsahu, zbytek se nachází v ostatních tkáních. (Jackson 1989, Miller et al. 1994)



Obr. 1.: Schéma procentuálního rozložení zinku v organismu. Převzato z: Hara et al. 2017

Co se týče nitrobuňčného rozložení zinku, v cytoplasmě je distribuováno 50 % zinečnatých iontů, v jádru se nachází 30-40 % a v membráně 10 % viz Obr. 2 (Haase et al. 2014). Celková koncentrace v buňce představuje desítky až stovky mikromolů. V cytosolu jsou zinečnaté ionty navázané v metaloproteinech a v metalothioneinu (MT), nebo jsou uskladněny v organelách a vezikulech. Jejich transport dovnitř a vně buňky i intracelulárně je zprostředkován ZnT a ZIP transportéry. Z toho důvodu nalezneme v buňce jen velmi malé množství volného zinku, řádově pikomoly až nanomoly (Canzoniero et al. 1997, Outten et al. 2001, Qin et al. 2011). Koncentrace v organelách představuje 0,14 pM v mitochondriích, 0,2 pM mitochondriální matrix, 0,9 pM–5 nM v endoplasmatickém retikulu a 0,2 pM v Golgiho aparátu (Besnard et al. 2002, Qin et al. 2011, McCranor et al. 2012, Chabosseau et al. 2014).

Homeostáza představuje stabilní koncentraci zinku uvnitř buněk a v plasmě a pohybuje se v rozmezí od 11–25 $\mu\text{M/L}$ (Livingstone 2015). Na buněčné i podbuněčné úrovni je regulována příjmem, distribucí, shromažďováním a výdejem zinku pomocí ZnT a ZIP transportérů (Colvin et al. 2010, Maret 2011).



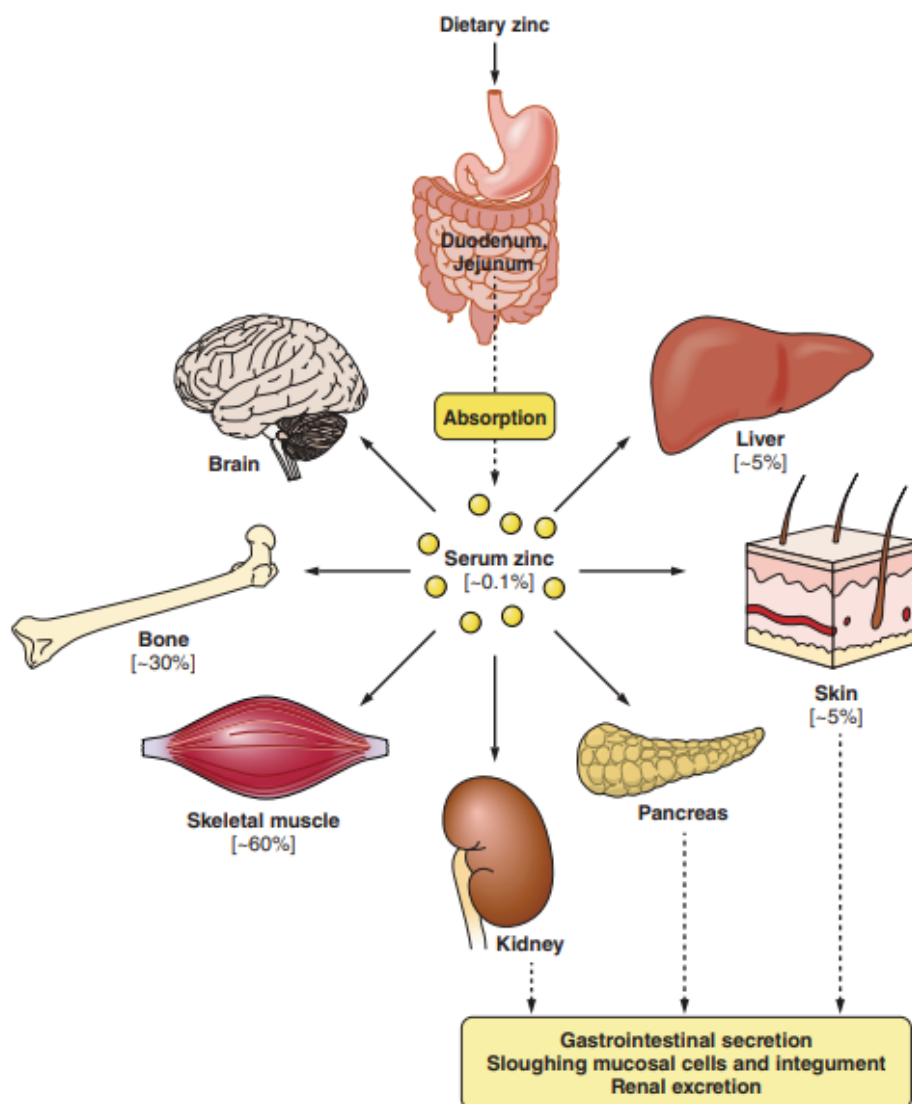
Obr. 2: Rozložení zinku uvnitř buňky. Převzato z Kambe et al. 2015

Koncentrace zinku uvnitř buňky kolísají v čase v závislosti na různých stimulech - zinková vlna (z anglického zinc wave) či zinkový výboj (přeloženo zinc spark) (Yamasaki et al. 2007, Kim et al. 2011) Tyto stimuly zastávají důležitou roli v buněčné signalizaci (Outten et al. 2001, Maret 2013).

1.2 FARMAKOKINETIKA ZINKU

Zinek je absorbován v duodenu a proximálním jejunu. Absorbovaný zinek je následně transportován vrátnicovým oběhem do jater nebo je intracelulárně navázán na MT v enterocytech. Zinek je také vylučován do žluči, a to v koncentraci okolo 4 μg/ml (61,2 μM). Určité množství je zpětně vstřebáno enterohepatální cirkulací. Výsledná GI ztráta zinku představuje 2-4 mg/den (Livingstone 2015)

Močovými cestami se denně vyloučí 0,5-0,8 mg zinku, zatímco okolo 500-600 μg denně je vyloučeno potem (Abu-Hamdan et al. 1981, Leonard et al. 2007). Další fyziologické ztráty jsou vlasy a kůže (Livingstone 2015). V kůži se totiž vyskytuje významné množství zinku (Obr. 3).



Obr. 3: Schéma distribuce zinku v organismu. Převzato z Kambe et al. 2015

V regulaci nitrobuňkové homeostázy zinku se uplatňují adaptivní mechanismy v závislosti na příjmu nebo výdeji zinku. Při sníženém příjmu zinku v potravě dochází ke zvýšené absorpci až na 100 %. Navíc je potlačena jeho exkrece stolicí. Dochází také ke snížení močové exkrece a je podpořena retence zinku uvnitř buněk. Stejně tak v případě, kdy je vyšší příjem zinku v potravě, začne se tvořit více thioneinu v játrech a enterocytech, který tvoří se zinkem cheláty (výše popsany MT) a je zvýšena také močová exkrece (Livingstone 2015).

1.3 ZDROJ ZINKU

Zinek je bohatě obsažen v mase, nejvíce ve vepřovém a hovězím. Z mořských korýšů mají nejvyšší obsah ústřice. Další bohaté zdroje představují oříšky a mléko (Willoughby et al. 2014) Naopak nízkou biodostupnost zinku nalezneme v rostlinné stravě. Je to z důvodu přítomnosti fytátů, které jsou jedním z faktorů významně snižujících absorpci zinku. Z výše uvedeného vyplývá, že s nedostatkem zinku se často setkáváme u vegetariánů (Turnlund et al. 1984, Foster et al. 2013). Dalšími faktory limitujícími absorpci zinku jsou přítomnost železa a vlákniny. Naopak kyselina citronová významně zvyšuje absorpci zinku (Cousins 1985, Kenny et al. 1989).

1.4 ROLE ZINKU V ORGANISMU

Zinek existuje jako dvojmocný kationt a za fyziologických podmínek není aktivní v redoxní formě. To vysvětluje, proč zastává tolik významných fyziologických rolí v organismu a je součástí mnoha biologických procesů aniž by byl toxický s výjimkou velmi vysokých hladin. Na rozdíl od mědi a železa je redoxně neutrální a v biologických reakcích vystupuje jako Lewisova kyselina. Na základě těchto poznatků lze vyvodit, že zinek v organismu zastává funkci strukturální, katalytickou a má důležitou roli v buněčné signalizaci (Kambe et al. 2015).

1. Katalytická

Existuje přibližně 300 metaloenzymů, např. DNA polymeráza, karboanhydráza, alkalická fosfatáza a alkohol-dehydrogenáza, kdy zinek je jejich nedílnou součástí a navíc se podílí na jejich regulaci (Vallee et al. 1993, O'Dell 2000). Zinek vystupuje jako kofaktor v 6 hlavních enzymových třídách – oxidoreduktásách transferásách, hydrolásách, lyásách, isomerásách a ligásách (Vallee et al. 1990, Vallee et al. 1993, Andreini et al. 2012).

2. Strukturální

Strukturně je obsažen v buněčných membránách, nukleových kyselinách, ribozomech a proteinech (Livingstone 2015).

3. Signální mediátor

Zinek vystupuje jako druhý posel při buněčné signalizaci, která je aktivovaná vstupem zinečnatých iontů do cytosolu z extracelulárních míst a z organel (Hirano et al. 2008, Fukada et al. 2011).

1.4.1 TRANSPORTÉRY ZNT A ZIP

Transportéry zinku (ZnT a ZIP) umožňují širokou škálu buněčných a fyziologických funkcí (Kambe et al. 2015). Tyto dvě rodiny zinečnatých transportérů jsou primárně zodpovědné za udržení homeostázy zinku uvnitř buněk (Mocchegiani et al. 2013). První transportní protein zinku, Zrc1, byl poprvé detekován v *Sacharomyces cerevisiae* v roce 1981 (Kamizono et al. 1989).

ZnT transportéry zajišťují přenos zinku do lumen intracelulárních kompartmentů nebo z cytosolu do extracelulárního prostoru (Kambe et al. 2015). Naopak ZIP transportéry umožňují přenos zinku z extracelulárního prostoru nebo z intracelulárních vezikul do cytosolu (Hara et al. 2017).

Existuje celkově 10 skupin ZnT (ZnT1-ZnT10). ZnT1 je jediným transportérem lokalizovaným pouze v plasmatické membráně (Palmiter et al. 1995, Kambe et al. 2015). Některé biochemické studie uvádějí, že ZnT transportéry fungují jako protichůdné přenašeče iontů Zn^{2+}/H^{+} (Kawachi et al. 2008, Shusterman et al. 2014).

ZIP transportéry jsou rozděleny do několika podskupin I, II, LIV-1 a gufA. ZIP I a gufA obsahují jednodušší členy. Podskupina ZIP II je složena ze 3 ZIP 1-3, zatímco LIV-1 je obsáhlejší (Gaither et al. 2001, Taylor et al. 2003). Podskupina LIV-1 je složena z transportérů ZIP 4-14, které zajišťují řadu významných biologických funkcí (Taylor et al. 2003).

1.4.2 ZINC FINGERS (ZNF)

Zinc fingers jsou široce využívanými metaloproteiny na základě jejich unikátních strukturních a funkčních aspektů. Tvoří největší skupinu zinečnatých proteinů, které zajišťují důležité fyziologické funkce u prokaryot i eukaryot (Eom et al. 2016).

ZNF jsou strukturální proteinové modely, které zajišťují interakce s velkou skupinou proteinů, lipidů a nukleových kyselin (Kambe et al. 2015).

Dva cysteinové a histidinové zbytky (Cys₂His₂) jsou navázány na zinek a vytvářejí ββα záhyb a tato sekundární struktura zajišťuje interakce s jeho vazebnými partnery – DNA, RNA, proteiny, lipidy a dalšími malými molekulami (Eom et al. 2016).

1.4.3 METALLOTHIONEIN (MT)

Z celkového množství zinku v cytosolu je 5-15 % navázáno v metallothioneinu (Bouron et al. 2014). MT jsou složeny z 61-68 aminokyselin a mají schopnost navázat až 7 atomů zinku a další dvojjvalné kovy s odlišnou afinitou (Krezel et al. 2008). MT zastávají poměrně významnou roli v zinkové homeostáze uvnitř buněk tím, že mají schopnost vytvářet komplexy až s 20 % volného zinku (Chimienti et al. 2003, Tapiero et al. 2003).

1.5 UKAZATELÉ HLADINY ZINKU V ORGANISMU

Prozatím neexistuje jednoduchá metoda pro stanovení celkových hladin zinku v organismu. Máme ale k dispozici několik možných ukazatelů:

1. Množství zinku v plasmě není příliš citlivý ukazatel jeho hladin v organismu. Existují totiž adaptivní mechanismy, které v závislosti na příjmu zinku v potravě ovlivňují jeho koncentraci (Lowe et al. 2009).
2. Běžná hodnota exkrece zinku močovými cestami je 0,5-0,8 mg za den. I zde se však uplatňují adaptační mechanismy, kdy při deficitu zinku poklesne jeho vylučování (Leonard et al. 2007, Livingstone 2015).
3. Dalším významným markerem je IGF-1 (inzulínu podobný růstový faktor 1). Bylo prokázáno studii, že tento růstový faktor byl u zinkového deficitu snížen. To vysvětluje, proč je nedostatek zinku spojován útlumem růstu (Cossack 1991).
4. Na základě faktu, že zinek je také obsažen ve vlasech, je hypoteticky možné uvažovat o této další cestě detekce. Ve studii u malých dětí s atopickou dermatitidou od Kim a spol. z roku 2014 byly porovnávány hladiny zinku u zdravých jedinců

a u pacientů s touto chorobou a dále byly sledovány změny koncentrací Zn ve vlasech po následné suplementaci. Bylo zjištěno, že u pacientů bylo ve vlasech naměřeno nižší množství zinku než u zdravé skupiny. Po následné 8mítýdenní suplementaci se u deficitních pacientů hladiny zinku srovnaly k fyziologickým hodnotám (Kim et al. 2014).

5. Existují i další ukazatelé, jako například hladina zinku ve slinách nebo stolici, nicméně neexistuje v současnosti dostatek dat pro jejich využití v praxi (Livingstone 2015).

1.6 PATOLOGIE ZINKU

Jak nedostatek, tak i nadbytek zinku v organismu je popsán, nicméně nedostatek je významně častější.

1.6.1 NEDOSTATEK ZINKU V ORGANISMU

Nejčastější příčinou deficitu zinku bývá uváděn nízký příjem v potravě, špatná absorpce nebo zvýšená exkrece (Livingstone 2015). Analýza dat provedená Organizací pro výživu a zemědělství (FAO) ukázala na prevalenci ve světě až 40 % (Maret et al. 2006). Nedostatek zinku se může projevit chronickými průjmy, kožními symptomy, anorexií, poklesem kognitivních funkcí nebo zhoršeným hojením ran (Willoughby et al. 2014).

V rozvojových zemích představuje nedostatek zinku 4 % celkové morbidity a mortality u malých dětí (Penny 2013).

Ve vyspělých zemích je častou příčinou nedostatku nízký příjem zinku v potravě, malabsorpce a vyšší exkreční ztráty nebo se může vyskytnout i při dlouhodobé parenterální výživě bez jeho suplementace (Leonard et al. 2007, Ghasemi et al. 2012, Penny 2013).

Nejvíce rizikovými skupinami jsou jednak malé děti ve věku do 37 týdnů. Je to v důsledku vyšších ztrát ve stolici a zvýšenou potřebou zinku pro růst a metabolismus (Leonard et al. 2007, Corbo et al. 2013). Dále se sem řadí děti, které se chronicky léčí se zažívacími obtížemi, např. Crohnovou nemocí nebo ulcerativní kolitidou (Willoughby et al. 2014). Také vegetariáni, jejichž hlavním zdrojem příjmu je rostlinná strava bohatá

na fytáty, které mají, jak již bylo uvedeno výše, za následek sníženou absorpci zinku (Turnlund et al. 1984).

1.6.2 NADBYTEK ZINKU V ORGANISMU

Jedná se o mnohem vzácnější stav. Ve srovnání s ostatními stopovými prvky vykazuje zinek poměrně nízkou toxicitu. Zpravidla při p. o. dávkách do 100 mg/den nezpůsobuje toxicitu, při vyšších už ale bývá pozorována. K předávkování může docházet např. na pracovištích, kde jsou zaměstnanci vystaveni inhalaci zinkového prachu, nebo při zvýšené orální suplementaci, případně u pacientů na hemodialýze s kovy kontaminovanou vodou v důsledku špatného uchování (Plum et al. 2010).

V závislosti na cestě podání může docházet i k místnímu podráždění: po požití $ZnCl_2$ dochází k podráždění zažívacího traktu, při inhalaci ZnO k podráždění dýchacích cest. V horších případech se mohou symptomy stupňovat a dochází až ke krvácení v zažívacím traktu nebo ke kardiovaskulárnímu selhání. V ojedinělých případech se toxicita může projevit zvracením, nauzeou, průjmami, mikrocytární anémií, poklesem hladin ceruloplasminu nebo dochází ke snížení hladiny HDL-cholesterolu (Plum et al. 2010).

Intoxikace zinkem je stav reverzibilní. Pro zvýšené vyloučení nadbytečného zinku v organismu je využívána právě chelatace. Mezi nejvíce využívané chelátory patří EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), dimerkaprol, D-penicilamin a N-acetylcystein (Plum et al. 2010).

1.7 CHELATACE A VLASTNOSTI CHELÁTORŮ

Chelatace je proces, při kterém dochází k vazbě kovu mono-, bi-, tri- nebo polyvazebným ligandem - chelátorem. Chelátor může být jak organickou, tak anorganickou látkou. Funkce ligandů mají nejčastěji atomy S, N nebo O (Andersen 1999).

Chelatace je významný nástroj pro regulaci množství některých kovů v těle. Komplexy kovů s ligandy, chelátory, se nazývají cheláty (Andersen 1999).

Chemicky ideální chelátor by měl zajistit rychlou eliminaci toxického nebo nadbytečného kovu, být dostatečně odolný vůči biotransformaci, měl by mít schopnost specificky se vázat do cílového místa na určitý cílový kov, tj. neovlivňovat další fyziologicky významné kovy, udržet si chelatační schopnost i při pH tělních tekutin a vytvářet méně toxické komplexy s kovem než je kov samotný (Flora et al. 2010).

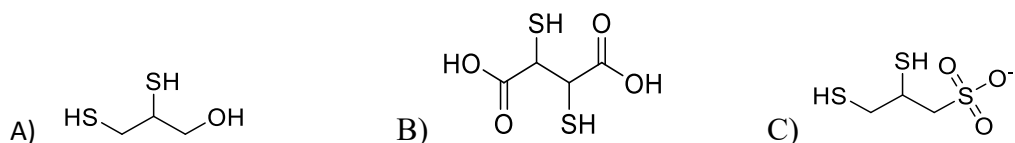
Chelatační činidla je možné dělit na intracelulární a extracelulární. V případě intracelulárních chelátorů by samotná látka měla být neutrální, mít dostatečně hydrofobní charakter, aby pasivní difuzí dobře pronikala přes plasmatickou membránu. Naopak extracelulární chelátory přes buněčné membrány dobře nepronikají. Je to z důvodu jejich negativního náboje (Radford et al. 2013).

Aby docházelo k efektivnímu navázání volného zinku, hodnota pKa donorů atomů musí být pod hranicí fyziologického pH pro efektivní vazbu Zn (Radford et al. 2013).

Jiným pohledem na interakce chelátorů je ten, že voda, která je donorem elektronů vystupuje jako Lewisova báze. Stejně tak mnoho sloučenin obsahujících kyslík. Naproti tomu pozitivně nabitě ionty kovů mohou být řazeny jako kyseliny, protože jsou akceptory elektronů. Při chelataci pak dochází k výměně vody za jinou Lewisovu bázi, která vytvoří se solvovaným kovem komplex (Lewis 1938). Pearson ve své studii Hard-Soft-Acid-Base teorie uvedl, že stabilita komplexu s kovem se odvíjí od síly/slabosti donorů elektronů a iontu kovu (Pearson 1963).

1.7.1 DIMERKAPROL

Jedním z nejstarších chelatačních činidel je 2,3-dimerkaprol. Byl vyvinutý během 2. světové války na Oxfordské univerzitě. Byl využíván Brity jako antidotum při otravách chemickou zbraní – arsen obsahující Lewisitem. Z toho důvodu převzal i zkrácený název BAL (**B**ritish **a**nti **L**ewisit). Jelikož má řadu závažných nežádoucích účinků a možnost pouze intramuskulární aplikace, je dnes jeho využití v praxi spíše vzácné. Postupně byly z 2,3-dimerkaprolu vyvinuty další látky (Obr. 4) s nižším výskytem nežádoucích účinků. Mezi ně patří např. DMSA (2,3-dimerkaptosukcinová kyselina) nebo DMPS (2,3-dimerkaptopropan 1-sulfonát) (Fournier et al. 1988, Guldager et al. 1996, Baum 1999).



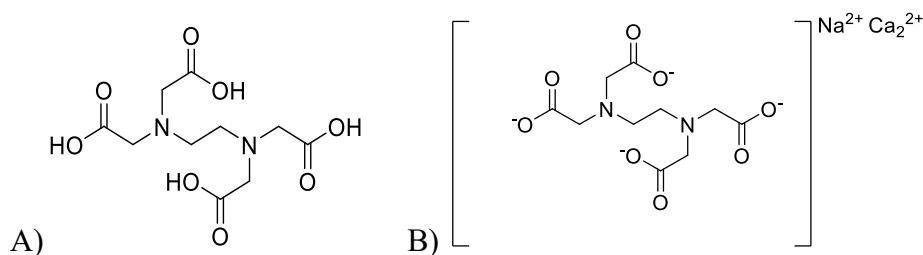
Obr 4: Chemická struktura BAL (A), DMSA (B), DMPS (C)

1.7.2 EDETAN DISODNÝ VÁPENATÝ (CaNa₂EDTA)

CaNa₂EDTA (Obr. 5) je běžně využívaným chelátačním činidlem. Jeho syntetickým derivátem je kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Obr. 5). Jedna z dalších teorií poukazuje na schopnost EDTA redukovat oxidační stres a zánětlivé stavy v buňkách krevního systému (Miller et al. 2004). CaNa₂EDTA nevykazuje dobrou absorpci po p. o. podání, z toho důvodu se aplikuje pouze intravenózně. Samotná aplikace je popisována jako velmi nepříjemná a bolestivá (Flora et al. 2010).

EDTA je polydentátní chelátor, jehož donory atomů jsou dusík a kyslík. Z toho důvodu má vysokou afinitu k dvoj- a trojvazným iontům s nízkou elektronegativitou. Příkladem je železo, zinek, hořčík nebo vápník (Aaseth et al. 2015). Léčba intoxikace kovy EDTA je ale zpochybňována. Např. Flora et al. doporučili, aby se upustilo od testování mobilizace olova v organismu u dětí, protože bylo zjištěno, že dochází k přesunu olova z ostatních tkání primárně do mozku (Flora et al. 1995).

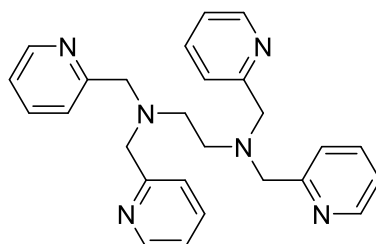
Navíc léčba pomocí CaNa₂EDTA může přinést velkou řadu nežádoucích účinků zahrnujících selhání ledvin, hypotenzi nebo arytmií (Knudtson et al. 2002).



Obr. 5: Chemické struktury EDTA (A) a CaNa₂EDTA (B)

1.7.3 N,N,N,N' - TETRAKIS (2-PYRIDYLMETHYL) – ETHYLENDIAMIN (TPEN)

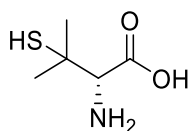
TPEN (Obr. 6) je nejvíce využívaným experimentálním intracelulárním chelátorem zinku. Snadno proniká buněčnými membránami a tvoří stabilní šestivazebný komplex se zinkem. Nicméně řada studií prokázala jeho toxické účinky v organismu (Radford et al. 2013).



Obr. 6: Chemická struktura TPEN

1.7.4 D-PENICILAMIN

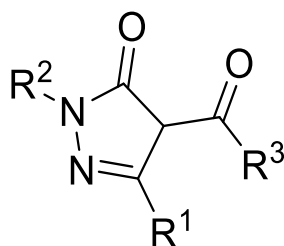
Za zmínku stojí také D-penicilamin (Obr. 7) využívaný v terapii Wilsonovy choroby pro svou schopnost chelatace mědi (Rousseaux et al. 1992). Jeho eliminační poločas činí řádově 1-7 hod. V souvislosti s délkou léčby dochází k nauze, zvracení a anorexii. Další toxické účinky zahrnují ztrátu nebo změny chuti, proteinurii, ztrátu vlasů nebo GI obtíže. Vysoké riziko představuje D-penicilamin pro osoby alergické na penicilin, u nichž by mohlo dojít až k anafylaktickému šoku (Grasedyck 1988).



Obr. 7: Chemická struktura D-penicillaminu

1.7.5 ACYLPYRAZOLONY

Acylpyrazolony jsou velmi zajímavou skupinou látek řadících se mezi β -diketony. Základ těch v práci testovaných tvoří pyrazolonový kruh s $R^{1,2,3}$ substituenty (Obr. 8). V zásadě všechny testované acylpyrazolony mají R^1 methylovou skupinu, R^2 fenylovou skupinu a R^3 je různě substituovaná acylová skupina.

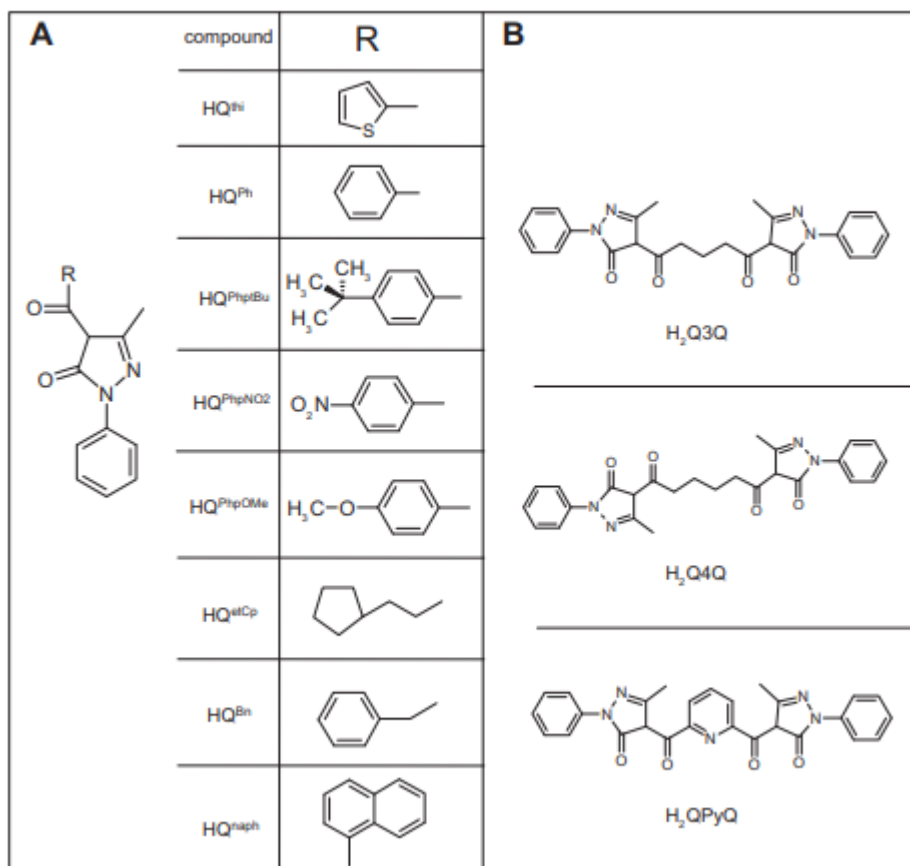


Obr. 8: Obecná struktura testovaných acylpyrazolonů.

R^1 – methyl, R^2 – fenyl, R^3 – různě substituovaná acylová skupina

Acylpyrazolony v této práci můžeme rozdělit na monoacylpyrazolony a biacylpyrazolony. Monoacylpyrazolony jsou tvořeny jedním pyrazolonovým kruhem s navázanou acylovou skupinou, která je u jednotlivých látek různě substituovaná viz Obr. 9 schéma A. Biacylpyrazolony jsou dimerní látky tvořené dvěma acylpyrazolonovými skupinami s odlišnými substituenty viz Obr. 9B.

Acylpyrazolony byly již otestovány ve studii od Filipského a spol. jako efektivní chelátory železa. Byla zjištěna rozličná chelatace různých látek s výrazným vlivem substituentů na acylové skupině a při jednotlivých pH (Filipský et al. 2012).



Obr. 9: Struktury testovaných acylpyrazolonů. **A)** monoacylpyrazolonů, **B)** bis(acyl)pyrazolonů. Převzato z Filipský et al. 2012

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo otestovat, zda látky ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů mohou chelatovat zinek a stanovit, zda mohou strukturální obměny základní struktury zvýšit tento potenciál.

Analýza se konkrétně zaměřuje na 11 látek ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů a posuzuje se u nich chelatační aktivita při různých pato(fyziologických) hodnotách pH.

Tohoto cíle bylo dosaženo využitím spektrofotometrie a metodou *in vitro* byla ověřena zinek-chelatační schopnost vybraných derivátů 4-acylpyrazol-5-onů.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

3.1.1 CHEMIKÁLIE

3.1.1.1 ZINEK, ROZPOUŠTĚDLA A INDIKÁTOR

Dithizon (1,5-difenylothiokarbazon)

DMSO (dimethylsulfoxid)

ZnCl₂ (chlorid zinečnatý)

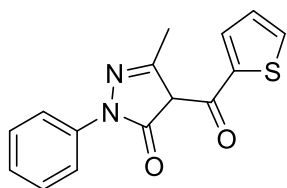
CH₃OH (methanol)

Ultračistá voda připravená v přístroji Mili-Q (Milipore, Francie).

3.1.1.2 TESTOVANÉ CHELÁTORY

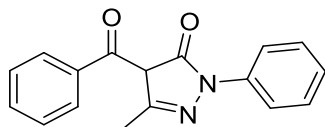
HQthi: 3-methyl-1-fenyl-4-(thiopen-2-karboxyl)-1H-pyrazol-5(4H)-on

M_w = 284,33



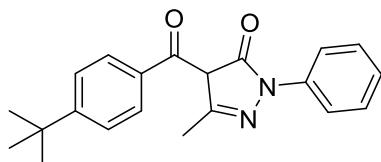
HQPh: 4-benzoyl-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5(4H)-on

M_w = 278,31



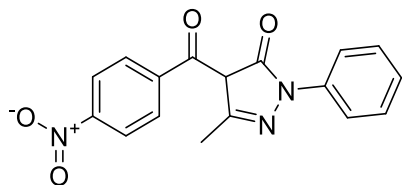
HQPhptBu: 4-(4-tert-butylbenzoyl)-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5(4H)-on

M_w = 334,42



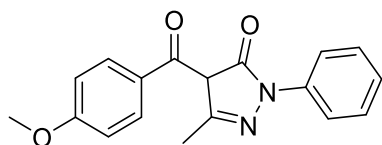
HQPhpNO₂: 3-methyl-4-(4-nitrobenzoyl)-1-fenyl-1H-pyrazol-5(4H)-on

M_w = 323,31



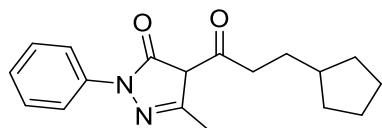
HQPhpOMe: 4-(4-methoxybenzoyl)-3-methyl-1-fenyl-1H-pyrazol-5(4H)-on

M_w = 308,34



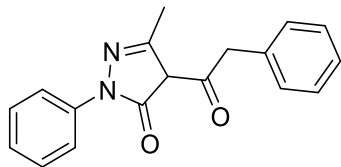
HQetCp: 4-(3-cyklopentylpropanoyl)-3-methyl-1-fenyl-1H-pyrazol-5(4H)-on

M_w = 298,39



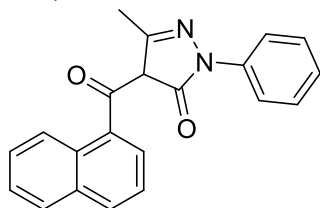
HQBn: 3-methyl-1-fenyl-4-(2-fenylacetyl)-1H-pyrazol-5(4H)-on

M_w = 292,34



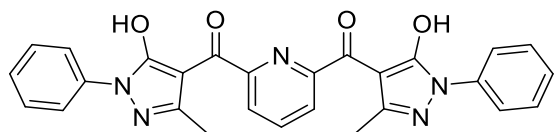
HQnaph: 4-(1-naftoyl)-3-methyl-1-fenyl-1H-pyrazol-5(4H)-on

M_w = 328,37

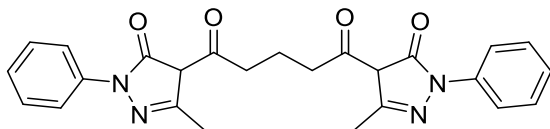


H2QPyQ: pyridin-2,6-diylbis(5-hydroxy-3-methyl-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl)methanon

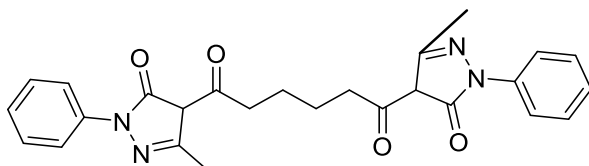
M_w = 479,50



H2Q3Q: 1,5-bis (3-methyl-5-oxo-1-fenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)pentan-1,5-dion
 $M_w = 444,49$



H2Q4Q: 1,6-bis (3-methyl-5-oxo-1-fenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)hexan-1,6-dion
 $M_w = 458,52$



Všechny tyto látky byly poskytnuty Prof. Claudiem Pettinari z University v Camerinu (Itálie).

Využívané acetátové pufrы pH 4,5 a 5,5 byly připraveny jako vodné roztoky octanu sodného a kyseliny octové (15 mM), tj. 15 mM octanu sodného a 27,3 nebo 2,7 mM kyseliny octové, respektive.

HEPES pufrы o pH 6,8 a 7,5 byly připraveny jako vodné roztoky HEPES 71,7 nebo 14,3 mM, respektive, a jeho sodné soli (15 mM),

3.1.2 PŘÍSTROJE

Jednokanálové pipety Eppendorf - Německo

Multikanálové pipety Eppendorf - Německo

Spektrofotometr Helios gama (Spectronic Unicam) - Spojené Království

Analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen) - Německo

Vortex mixér IKA Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG) - Německo

Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA® MS 3 digital (IKA®-Werke GmbH & Co. KG) - Německo

Hodnoty absorbance byly naměřeny pomocí spektrofotometru Helios gama (Spectronic Unicam). Grafické výsledky a výpočty byly zpracovány v programu Microsoft Excel, verze 2013. Spektrofotometrie byla měřena na čtečce mikrodestiček Hidex Sense (Finsko).

3.2 METODIKA VZTAHUJÍCÍ SE K MĚŘENÍ CHELATAČE ZINEČNATÝCH IONTŮ

3.2.1 PŘÍPRAVA ZÁSObNÍCH ROZTOKŮ

Prvním krokem každého dne měření byla příprava zásobního roztoku Zn^{2+} rozpuštěním navážky (5-15 mg) chloridu zinečnatého ($M_w = 136,31$) ve vodě na koncentraci 10 mM.

Obdobným způsobem byl připraven roztok dithizonu ($M_w = 256,33$) rozpuštěním navážky (5-15 mg) v DMSO na koncentraci 5 mM.

Jednotlivé 4-acylpyrazol-5-ony byly rozpuštěny v příslušném objemu DMSO na koncentraci 6 mM.

3.2.2 PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ

Příslušným naředěním zásobních roztoků na požadované koncentrace bylo možné přejít již k samotnému stanovení chelatační aktivity. Pro změření byl zásobní roztok Zn^{2+} naředěn ultračistou vodou na koncentraci 60 μ M. Zásobní roztok dithizonu byl zředěn DMSO na koncentraci 250 μ M.

3.2.3 MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY ZINEČNATÝCH IONTŮ (TAB. 1).

Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μ L pufrů o pH 4,5-7,5, 50 μ L DMSO a 50 μ L jednotlivých koncentrací zinečnatých iontů, které se připraví ředěním zásobního roztoku $ZnCl_2$ ve vodě na koncentrace od 90 μ M do 0 μ M. Poslední sloupec schématu představuje stejné množství ultračisté vody Mili-Q bez obsahu Zn^{2+} . Do poslední řady bylo přidáno 50 μ L DMSO a do 3 horních řad 50 μ L 250 μ M DMSO roztoku hematxylinu.

Měření absorbance probíhalo po 0 a 5 minutách při vlnových délkách 530 a 570 nm pro pH 4,5 a 540 a 590 nm pro pH 5,5-7,5 podle metodiky standardizované v předchozí studii (Catapano et al. 2018).

Tab. 1: Rozložení roztoků v mikrotitrační destičce při měření kalibrační křivky

	Koncentrace testované látky							
	$c(\text{Zn}^{2+}) = 90 \mu\text{M}$	$c(\text{Zn}^{2+}) = 60 \mu\text{M}$	$c(\text{Zn}^{2+}) = 40 \mu\text{M}$	$c(\text{Zn}^{2+}) = 20 \mu\text{M}$	$c(\text{Zn}^{2+}) = 6 \mu\text{M}$	$c(\text{Zn}^{2+}) = 3 \mu\text{M}$	$c(\text{Zn}^{2+}) = 1,2 \mu\text{M}$	$c(\text{Zn}^{2+}) = 0 \mu\text{M}$
dithizon								
blank								



různé koncentrace Zn^{2+} s dithizonem



slepé vzorky bez Zn^{2+} (voda) s dithizonem



různé koncentrace Zn^{2+} bez dithizonu



slepé vzorky bez Zn^{2+} (voda) a bez dithizonu

3.2.4 MĚŘENÍ CHELATAČNÍ AKTIVITY ZINEČNATÝCH IONTŮ (TAB. 2)

V první fázi se jednalo o screeningové měření, kdy byla testována koncentrační řada 6000, 600, 60 a 6 μM na chelatační aktivitu. Tyto koncentrace odpovídají poměrům 1000-1:1, chelátor: Zn.

Po potvrzení této aktivity při určitých koncentracích byla prováděna další chelatace při následných koncentracích.

V případě, že látka neprojevovala žádný náznak chelatace, další proměřování nebyla provedena.

1. Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150 μL pufru (pH = 4,5; 5,5; 6,8 nebo 7,5)
2. Následně bylo přidáno do každé jamky 50 μL pracovního roztoku Zn^{2+} o koncentraci 60 μM . Vynechán byl pouze poslední sloupec, kde bylo přidáno stejné množství ultračisté vody.
3. Následovala aplikace testované látky v rozdílných koncentracích o objemu 50 μL s výjimkou posledních dvou sloupců, kde byl nanesen stejný objem rozpouštědla, tj. DMSO.

4. V dalším kroku proběhlo míchání po dobu 2 min při 400 otáčkách za minutu.
5. Do spodní řady bylo přidáno 50 μl DMSO a do 3 horních řad nad DMSO roztok dithizonu o koncentraci 250 μM . Ihned po napipetování dithizonu byla proměřována absorbance a další měření bylo provedeno po 5 minutách. Měření probíhalo při pH 4,5 při vlnových délkách 530 a 570 nm. Při pH 5,5; 6,8 a 7,5 při vlnových délkách 540 a 590 nm.

Tab. 2: Rozložení roztoků v mikrotitrační destičce při měření chelatační aktivity zinečnatých iontů

		Koncentrace testované látky				
		c_x	c_y	c_z	$c = 0 \text{ mM}$	$c = 0 \text{ mM}$ bez Zn
Dithizon						
blank						

	testovaná látka se Zn a dithizonem		testovaná látka se Zn a bez dithizonu
	rozpouštědlo se Zn a dithizonem		rozpouštědlo se Zn a bez dithizonu
	rozpouštědlo s vodou a dithizonem		rozpouštědlo s vodou a bez dithizonu

3.2.5 ZMĚŘENÍ SPEKTER 4-ACYPIRAZOL-5-ONŮ

Spektra vybraných acylpyrazolonů byla proměřována pomocí spektrofotometru Helios gama (Spectronic Unicam, Spojené Království) v UV kyvetách a data byla zpracována v programu Visionlite. Pro měření byly stanoveny vlnové délky od 230 do 550 nm. Testované látky byly rozpuštěny v příslušném množství methanolu na

výslednou koncentraci 100 µM. Do kyvet bylo napipetováno stejné množství testované látky bez nebo se zinkem v molárním poměru 1:1. Byla porovnáována spektra látky a roztoků zinku i v dalších poměrech a to 1:500, 1:1000 a 1:0 (finální koncentrace zinku byla tedy 50 µM, 250 µM, 500 µM a 0 µM a finální koncentrace látek byla 50 µM, respektive).

3.3 MATEMATICKÁ A STATISTICKÁ ANALÝZA

3.3.1 VÝPOČET CHELATAČE ZINKU

Pro výpočet se používá níže uvedený vzorec. Výsledky se na závěr zprůměrují.

$$x (\%) = \left(1 - \frac{A_x - A_{\text{blank } x} - \emptyset A_{\text{dithizon}} - A_{\text{dithizon blank}}}{\emptyset A_0 - A_{\text{blank } 0} - \emptyset A_{\text{dithizon}} - A_{\text{dithizon blank}}} \right) * 100$$

A_x – Absorbance testované látky (testovaná látka + Zn + dithizon)

$A_{\text{blank } x}$ – Absorbance slepého vzorku testované látky (testovaná látka + Zn, bez dithizonu)

$\emptyset A_0$ – průměr absorbancí testované látky se zinkem a dithizonem, bez testované látky = pozitivní kontrola se 100 % Zn ve vzorku

$A_{\text{blank } 0}$ – absorbance slepého vzorku bez Zn a bez dithizonu

A_{dithizon} – absorbance dithizonu bez Zn = absorbance „pozadí“

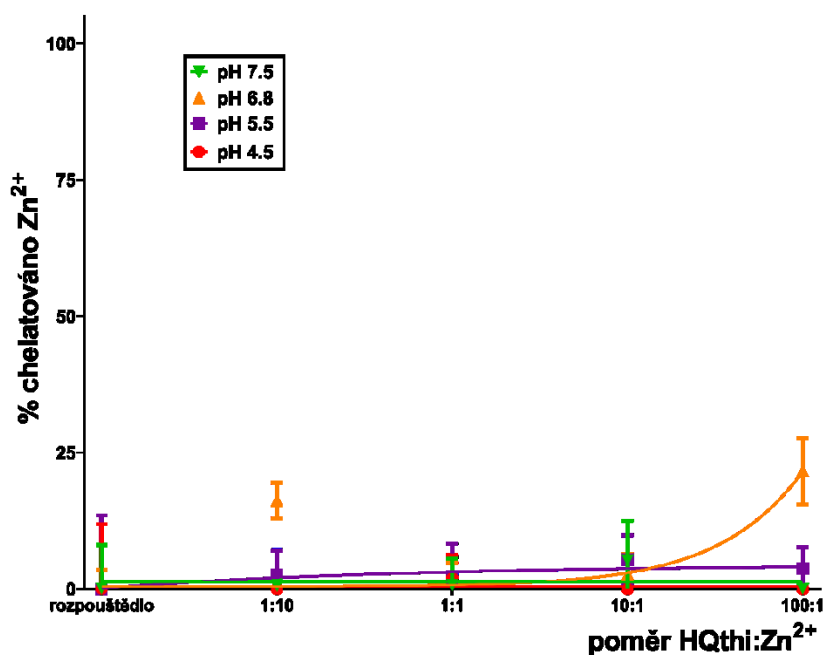
3.3.2 STATISTICKÁ ANALÝZA

Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka vypočítaná

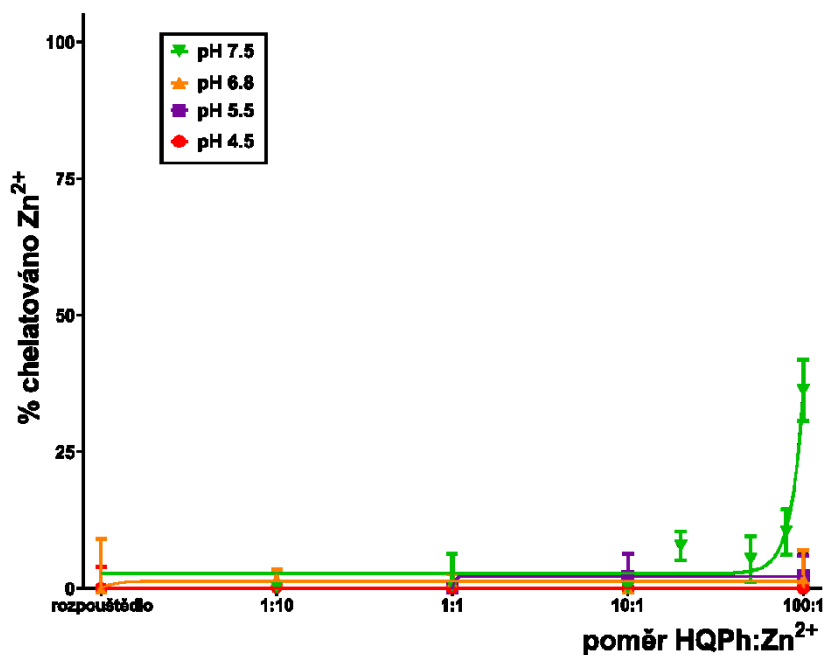
podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$. Rozdíly mezi chelatační schopností zinku byly porovnávány pomocí 95 % konfidenčních intervalů chelatačních křivek vytvořených v programu GraphPad Prism verze 8 pro Windows (GraphPad Software, USA).

4 VÝSLEDKY

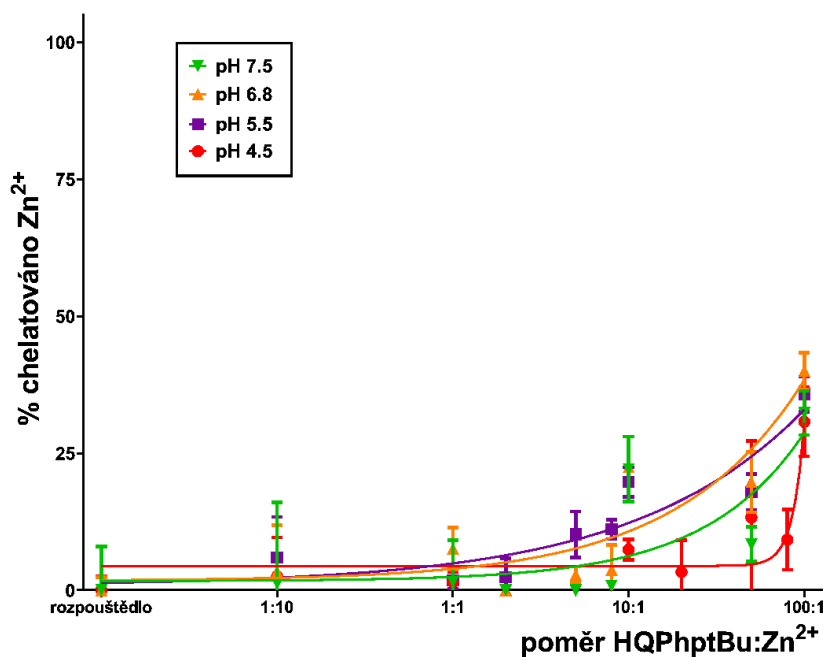
Bylo otestováno celkem 11 látek ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů při pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5. Závislosti procentuálního množství chelatovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci chelátorů v těchto čtyřech pH jsou znázorněny v grafech na Obr. 10-20. Většina z testovaných látek jevila schopnost chelatace Zn^{2+} iontů až při nejvyšších koncentracích, a to zejména v neutrálním nebo případně slabě kyselém pH (6,8). V zásadě většina z testovaných látek reagovala až při vyšších koncentracích řádově 10:1 a 100:1 (acylpyrazolon:kov) se Zn^{2+} . Při nižších koncentracích 1:10 a 1:1 nereagovala žádná z testovaných látek s výjimkou H2QPyQ, u kterého byla u některých pH nalezena chelatace i v poměru 1:1 (Obr. 18). V některých případech (HQPhpNO2 – Obr. 13 a HQBn – Obr.16) byla ale i při těchto podmínkách chelatace zinečnatých iontů zanedbatelná.



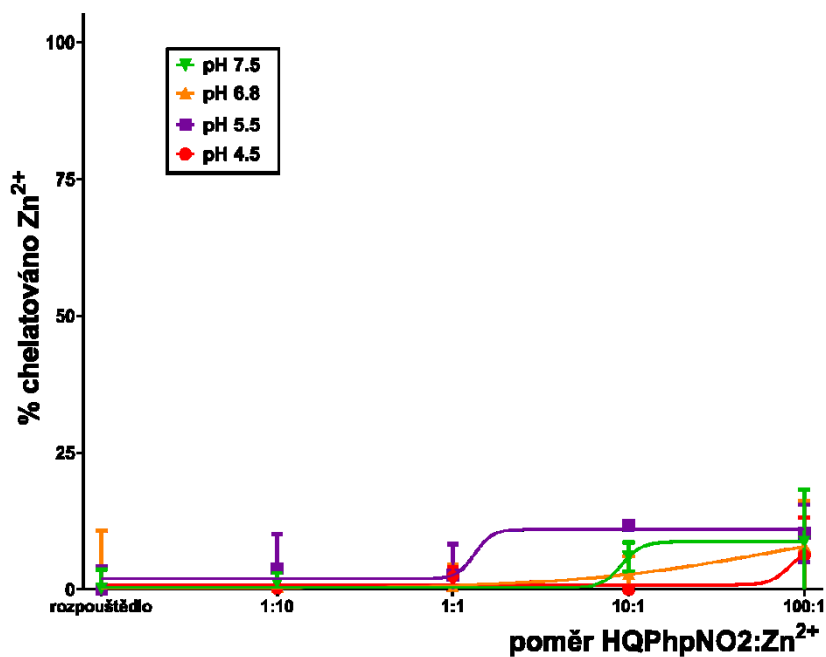
Obr. 10: Závislost procentuálního množství chelatovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci HQthi při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). S výjimkou nejvyššího poměru 100:1 u pH 6,8 nebyla zaznamenána žádná významná chelatace za žádných jiných podmínek.



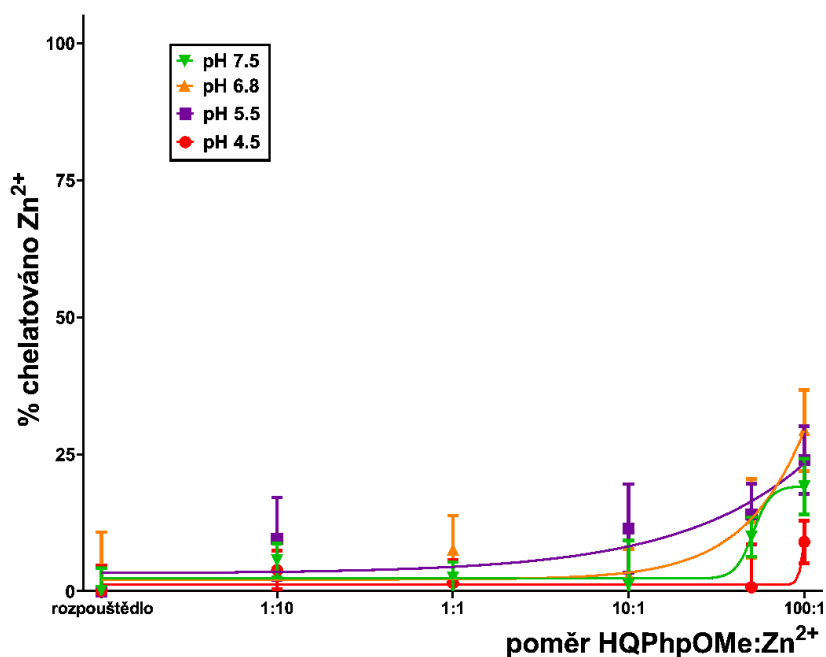
Obr. 11: Závislost procentuálního množství chelatovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci HQPh při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Významná chelatace byla zaznamenána jen u nejvyšších poměrů v pH 7,5.



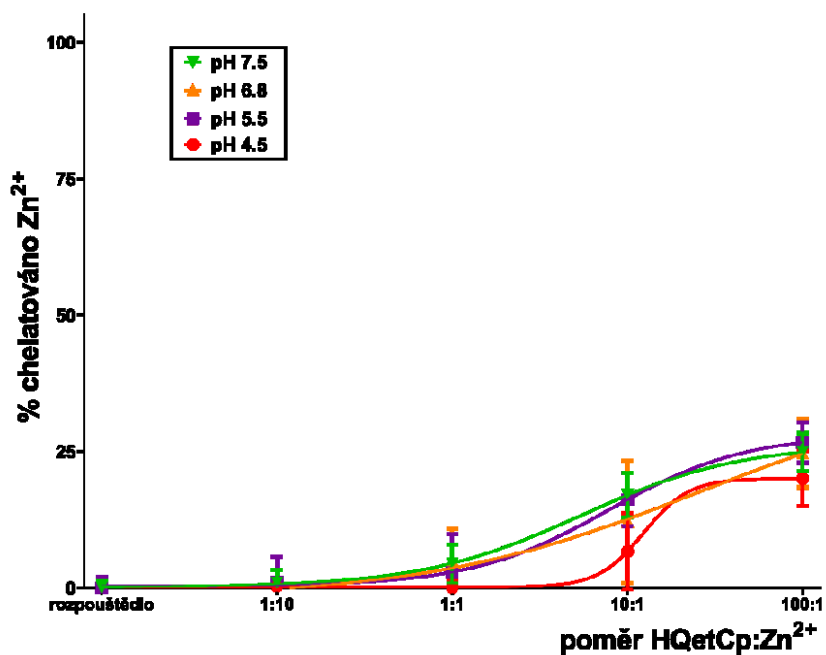
Obr. 12: Závislost procentuálního množství chelatovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci HQPhptBu při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). V tomto případě byla chelatace zaznamenána ve všech pH při nejvyšších poměrech.



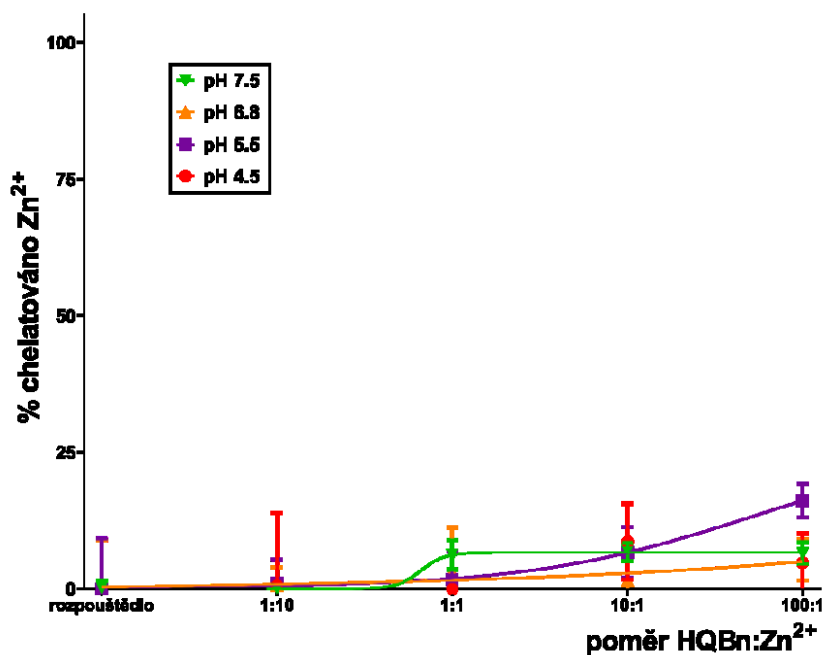
Obr. 13: Závislost procentuálního množství chelátovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci HQPhNO₂ při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Chelatace zinečnatých iontů byla minimální při všech testovaných pH.



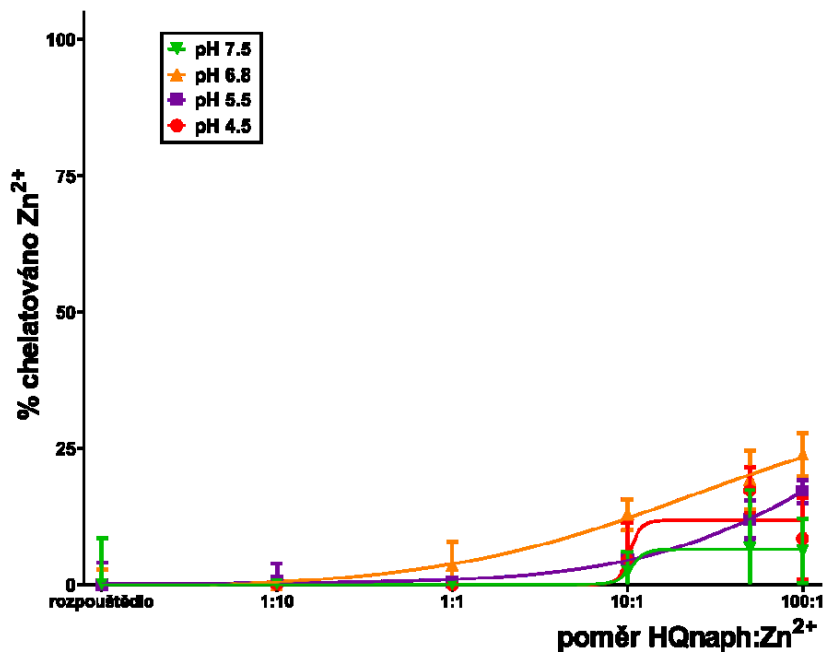
Obr. 14: Závislost procentuálního množství chelátovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci HQPhOMe při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Účinnost chelatace stoupala se vzrůstajícím poměrem víceméně bez výrazného vztahu k pH prostředí.



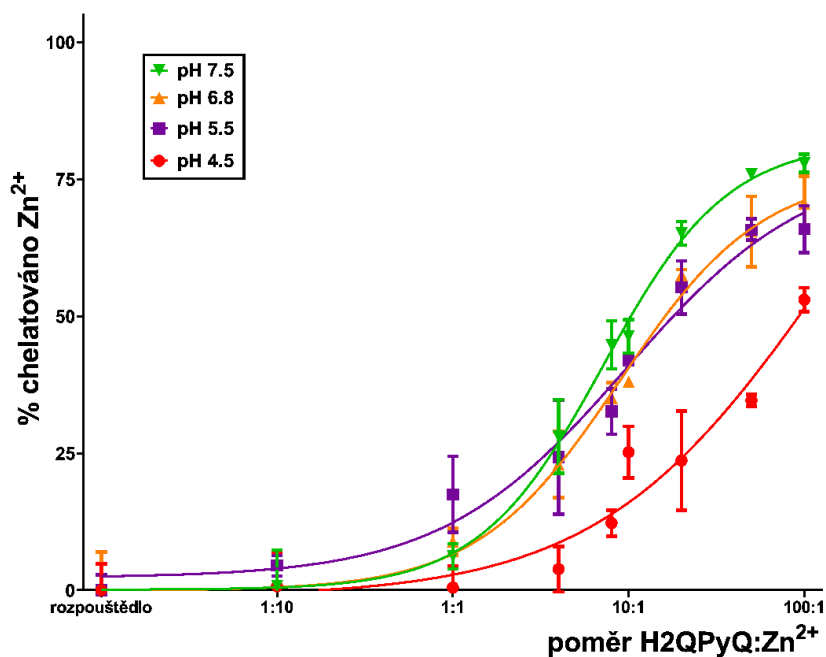
Obr. 15: Závislost procentuálního množství chelátovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci HQetCp při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Podobně jako v předchozím případě účinnost chelatace stoupala se vzrůstajícím poměrem bez vztahu k pH.



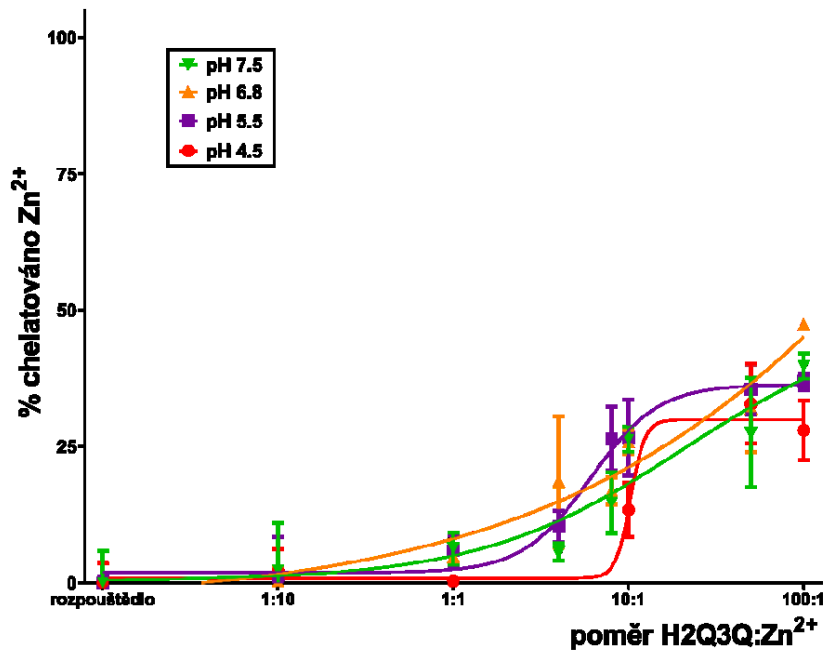
Obr. 16: Závislost procentuálního množství chelátovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci HQBn při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Chelatace zinečnatých iontů byla minimální při všech testovaných pH.



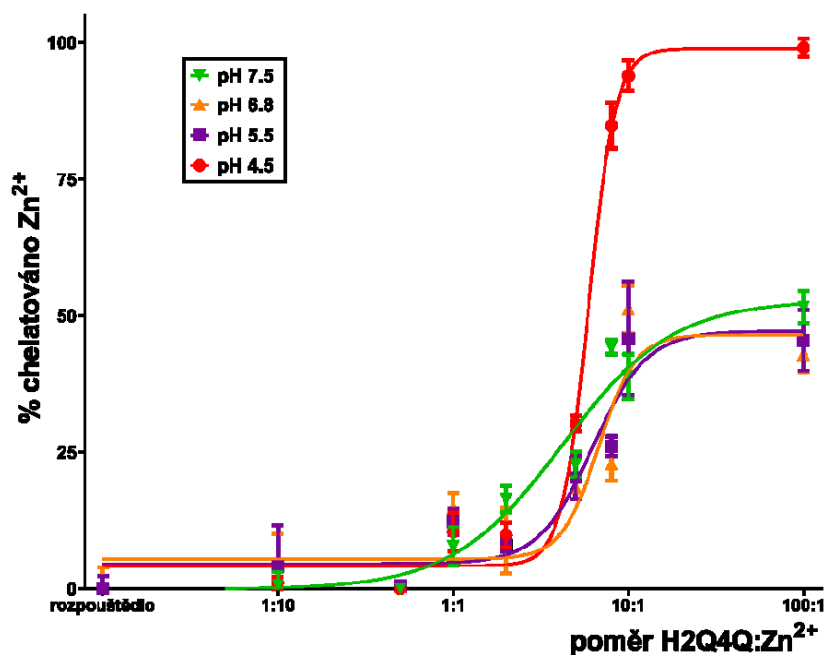
Obr. 17: Závislost procentuálního množství chelatovaného zinku Zn²⁺ na koncentraci HQnaph při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Určitá chelatace byla zaznamenána při nejvyšších poměrech bez jasného vztahu k pH.



Obr. 18: Závislost procentuálního množství chelatovaného zinku Zn²⁺ na koncentraci H2QPyQ při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). V tomto případě byla chelatace výrazná a měřitelná u vyšších pH již od poměru 1:1.



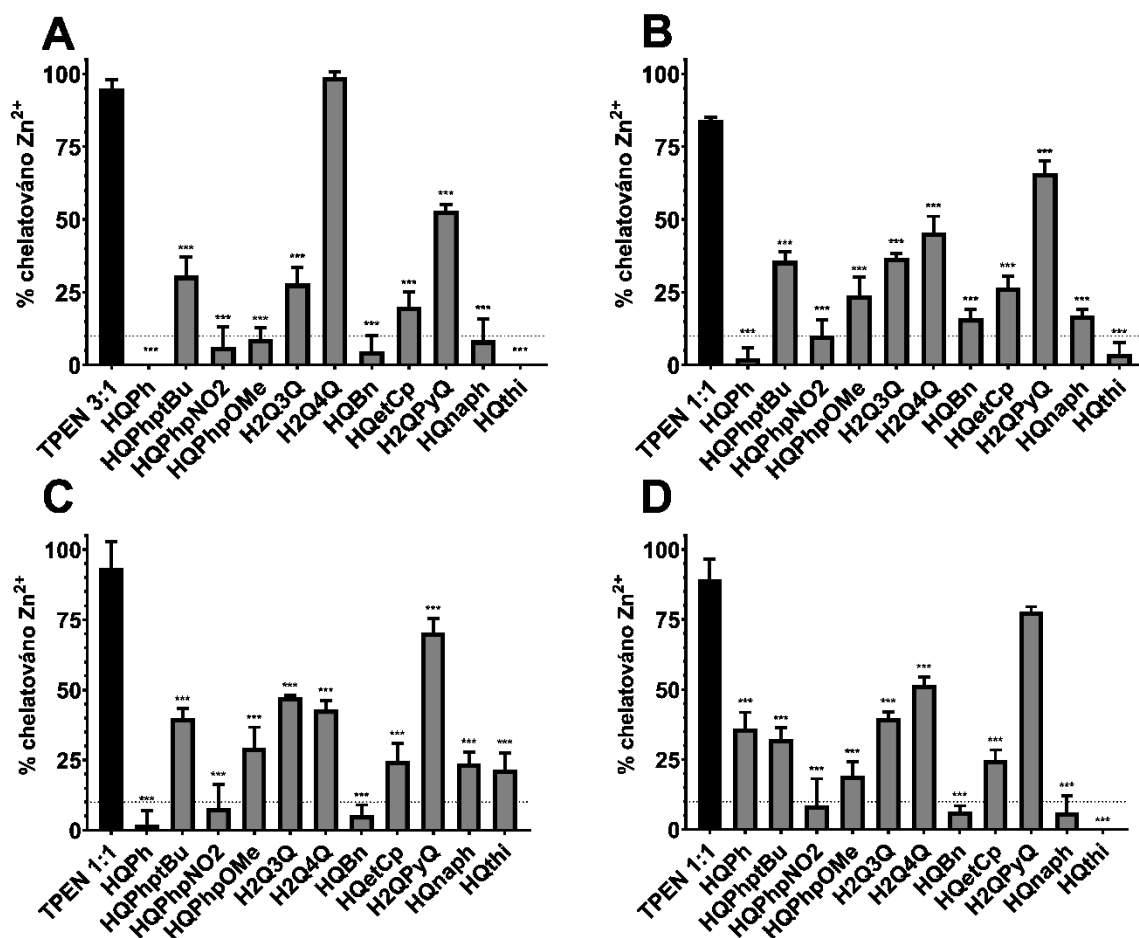
Obr. 19: Závislost procentuálního množství chelátovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci H2Q3Q při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Ve všech pH byla naměřena chelatace v závislosti na koncentraci.



Obr. 20: Závislost procentuálního množství chelátovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci H2Q4Q při čtyřech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Ve všech pH byla zaznamenána výrazná chelatace, která byla poněkud překvapivě nejvyšší u pH 4,5.

Z výše uvedených grafů vyplývá, že thienylový derivát HQthi tvořil komplex s Zn^{2+} až při koncentraci 100:1 v pH 6,8, a to pouze do 20 %, obdobně reagoval fenylový derivát HQPh, který chelatoval jen při pH 7,5 okolo 30 % (Obr. 10, 11). Další testované látky HQPhptBu a HQPhNO₂ se strukturálně liší v para poloze fenylového kruhu. Terc.butylový derivát reagoval v porovnání s nitroderivátem lépe (Obr. 12, 13). Nepatrnou schopnost chelatace, řádově do 25 %, vykazovaly další látky HQPhpOMe a HQetCp, které při porovnávání mezi sebou chelatovaly na stejné úrovni (Obr. 14, 15). Benzylový derivát (HQBn) chelatoval v zásadě velmi podobně jako naftylový derivát (HQnaph), kdy schopnost tvořit komplex byla velmi nízká, u HQnaph do 25 % a HQBn do 20 % (Obr. 16, 17). V porovnání s ostatními, H₂QPyQ chelatoval ze všech testovaných látek nejvíce, kdy jeho schopnost chelatovat rostla s rostoucím pH. Při pH 7,5 dosahovala hodnot okolo 75 % chelatovaného Zn^{2+} (Obr. 18). Látku H₂Q₃Q je možno řadit mezi středně silné chelátory: nejvyššího stupně chelatace dosáhla při pH 5,5 a 7,5 (až okolo 50 %). Zajímavým výsledkem je schopnost H₂Q₄Q chelatovat kompletně zinečnaté ionty při pH 4,5 v koncentraci 10:1 (Obr. 20).

Pro vzájemné porovnání mezi 4-acylpyrazol-5-ony byly pro větší přehlednost vytvořeny sloupcové grafy zobrazující účinnost chelatace při nejvyšším poměru 100:1, chelátor: zinečnaté ionty (Obr.21). Pro pozitivní kontrolu byl do grafů přidán TPEN, známý chelátor zinečnatých iontů. Hodnota pH 4,5 je pro chelataci nejméně výhodná, což je evidentní z Obr. 21A. Pouze H₂Q₄Q při pH 4,5 nejlépe chelatuje okolo 100 %. Za zmínku také stojí látka H₂QPyQ, která při tomto pH chelatuje zhruba okolo 50 % Zn^{2+} . H₂QPyQ v ostatních pH (Obr. 21B-D) dosahuje chelatace Zn^{2+} až 75 %. Detailní porovnání mezi všemi látkami je uvedeno v Tabulkách 3-6 a shrnuto ve schématech v Obr. 22-25.



Obr. 21: Porovnání účinnosti chelatace Zn²⁺ iontů mezi testovanými látkami. Ve všech případech bylo použito nadměrné množství chelátoru (100:1) s výjimkou TPEN ukázaného pro porovnání: **A)** pH 4,5 **B)** pH 5,5 **C)** pH 6,8 **D)** pH 7,5. * p<0.05 vs. TPEN, ** p<0.01 vs. TPEN, *** p<0.001 vs. TPEN

Tab. 3: Porovnání statistické významnosti 4-acylpyrazol-5-onů při pH 4,5

	TPEN 3:1	HQPh	HQPhptBu	HQPhpNO2	HQPhpOMe	H2Q3Q	H2Q4Q	HQBn	HQetCp	H2QPyQ	HQnaph	HQthi
TPEN 3:1	-	***	***	***	***	***	ns	***	***	***	***	***
HQPh	***	-	***	ns	ns	***	***	ns	**	***	ns	ns
HQPhptBu	***	***	-	***	***	ns	***	***	ns	***	***	***
HQPhpNO2	***	ns	***	-	ns	***	***	ns	ns	***	ns	ns
HQPhpOMe	***	ns	***	ns	-	**	***	ns	ns	***	ns	ns
H2Q3Q	***	***	ns	***	**	-	***	***	ns	***	***	***
H2Q4Q	ns	***	***	***	***	***	-	***	***	***	***	***
HQBn	***	ns	***	ns	ns	***	***	-	*	***	ns	ns
HQetCp	***	**	ns	ns	ns	ns	***	*	-	***	ns	***
H2QPyQ	***	***	***	***	***	***	***	***	***	-	***	***
HQnaph	***	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	***	-	ns
HQthi	***	ns	***	ns	ns	***	***	ns	***	***	ns	-

statistická významnost: *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, ns = není statisticky významné

Tab. 4: Porovnání statistické významnosti 4-acylpyrazol-5-onů při pH 5,5

	TPEN 1:1	HQPh	HQPhptBu	HQPhpNO2	HQPhpOMe	H2Q3Q	H2Q4Q	HQBn	HQetCp	H2QPyQ	HQnaph	HQthi
TPEN 1:1	-	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
HQPh	***	-	***	ns	***	***	***	*	***	***	**	ns
HQPhptBu	***	***	-	***	*	ns	ns	***	ns	***	***	***
HQPhpNO2	***	ns	***	-	**	***	***	ns	**	***	ns	ns
HQPhpOMe	***	***	*	**	-	*	***	ns	ns	***	ns	***
H2Q3Q	***	***	ns	***	*	-	ns	***	ns	***	***	***
H2Q4Q	***	***	ns	***	***	ns	-	***	***	***	***	***
HQBn	***	*	***	ns	ns	***	***	-	ns	***	ns	*
HQetCp	***	***	ns	**	ns	ns	***	ns	-	***	ns	***
H2QPyQ	***	***	***	***	***	***	***	***	***	-	***	***
HQnaph	***	**	***	ns	ns	***	***	ns	ns	***	-	**
HQthi	***	ns	***	ns	***	***	***	*	***	***	**	-

statistická významnost: *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, ns = není statisticky významné

Tab. 5: Porovnání statistické významnosti 4-acylpyrazol-5-onů při pH 6,8

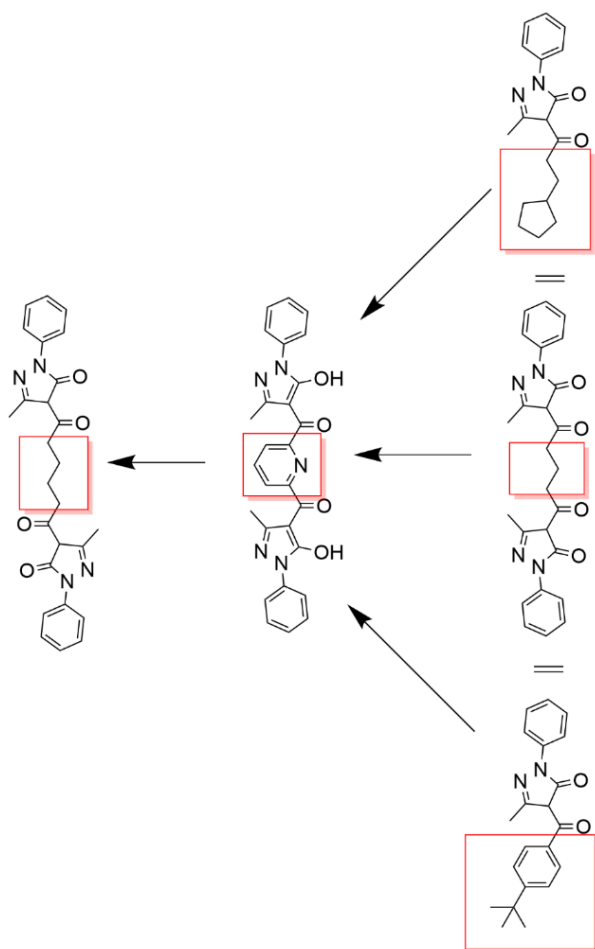
	TPEN 1:1	HQPh	HQPhptBu	HQPhpNO2	HQPhpOMe	H2Q3Q	H2Q4Q	HQBn	HQetCp	H2QPyQ	HQnaph	HQthi
TPEN 1:1		***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***
HQPh	***	-	***	ns	***	***	***	ns	***	***	**	**
HQPhptBu	***	***	-	***	ns	ns	ns	***	*	***	*	*
HQPhpNO2	***	ns	***	-	***	***	***	ns	*	***	*	ns
HQPhpOMe	***	***	ns	***	-	**	ns	***	ns	***	ns	ns
H2Q3Q	***	***	ns	***	**	-	ns	***	***	**	***	***
H2Q4Q	***	***	ns	***	ns	ns	-	***	**	***	*	**
HQBn	***	ns	***	ns	***	***	***	-	**	***	*	*
HQetCp	***	***	*	*	ns	***	**	**	-	***	ns	ns
H2QPyQ	**	***	***	***	***	**	***	***	***	-	***	***
HQnaph	***	**	*	*	ns	***	*	*	ns	***	-	ns
HQthi	***	**	*	ns	ns	***	**	*	ns	***	ns	-

statistická významnost: *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, ns = není statisticky významné

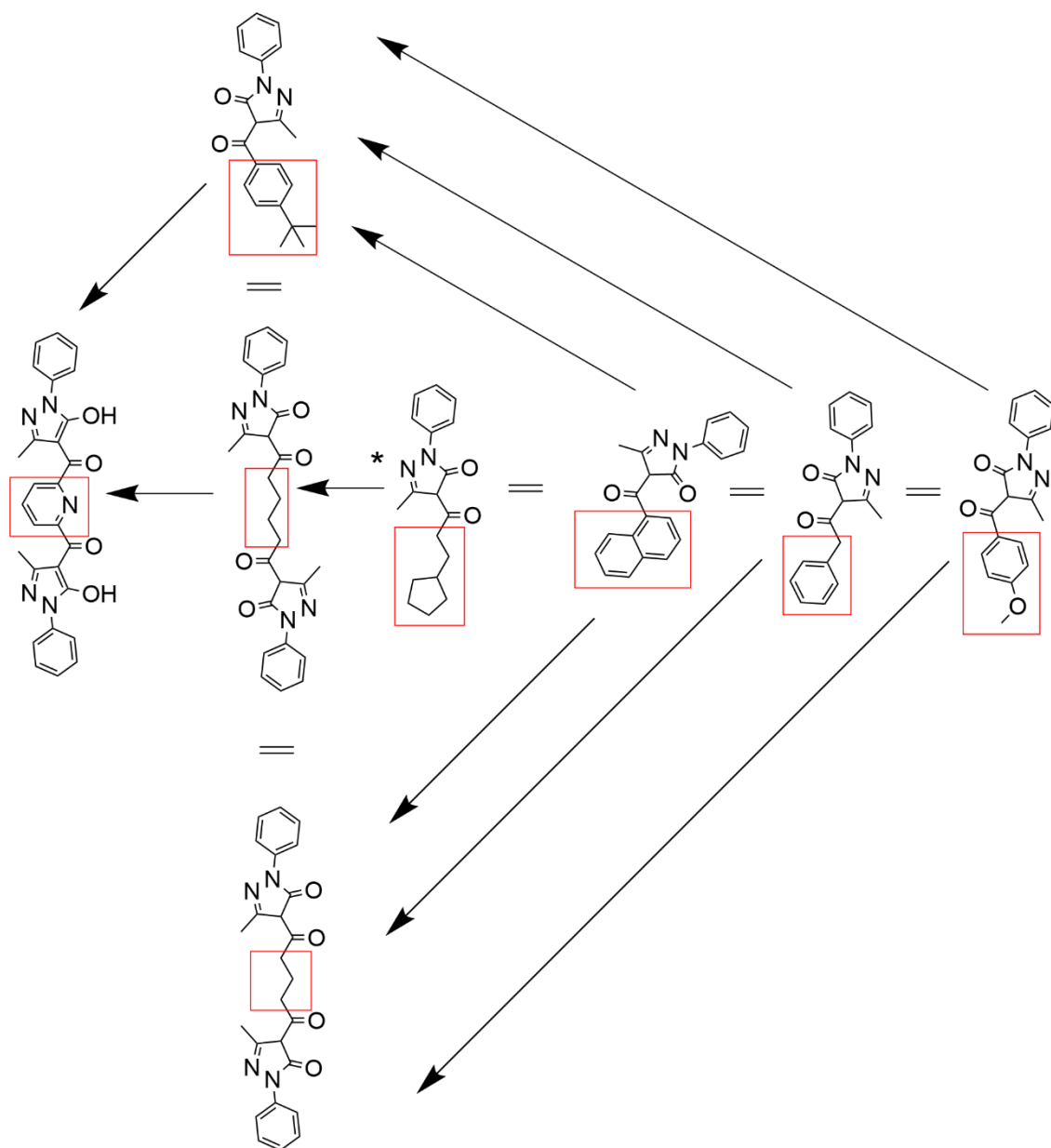
Tab. 6: Porovnání statistické významnosti 4-acylpyrazol-5-onů při pH 7,5

	TPEN 1:1	HQPh	HQPhptBu	HQPhpNO2	HQPhpOMe	H2Q3Q	H2Q4Q	HQBn	HQetCp	H2QPyQ	HQnaph	HQthi
TPEN 1:1	-	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	***	***
HQPh	***	-	ns	***	**	ns	*	***	ns	***	***	***
HQPhptBu	***	ns	-	***	ns	ns	**	***	ns	***	***	***
HQPhpNO2	***	***	***	-	ns	***	***	ns	*	***	ns	ns
HQPhpOMe	***	**	ns	ns	-	***	***	ns	ns	***	ns	**
H2Q3Q	***	ns	ns	***	***	-	ns	***	*	***	***	***
H2Q4Q	***	*	**	***	***	ns	-	***	***	***	***	***
HQBn	***	***	***	ns	ns	***	***	-	*	***	ns	ns
HQetCp	***	ns	ns	*	ns	*	***	*	-	***	**	***
H2QPyQ	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	-	***	***
HQnaph	***	***	***	ns	ns	***	***	ns	**	***	-	ns
HQthi	***	***	***	ns	**	***	***	ns	***	***	ns	-

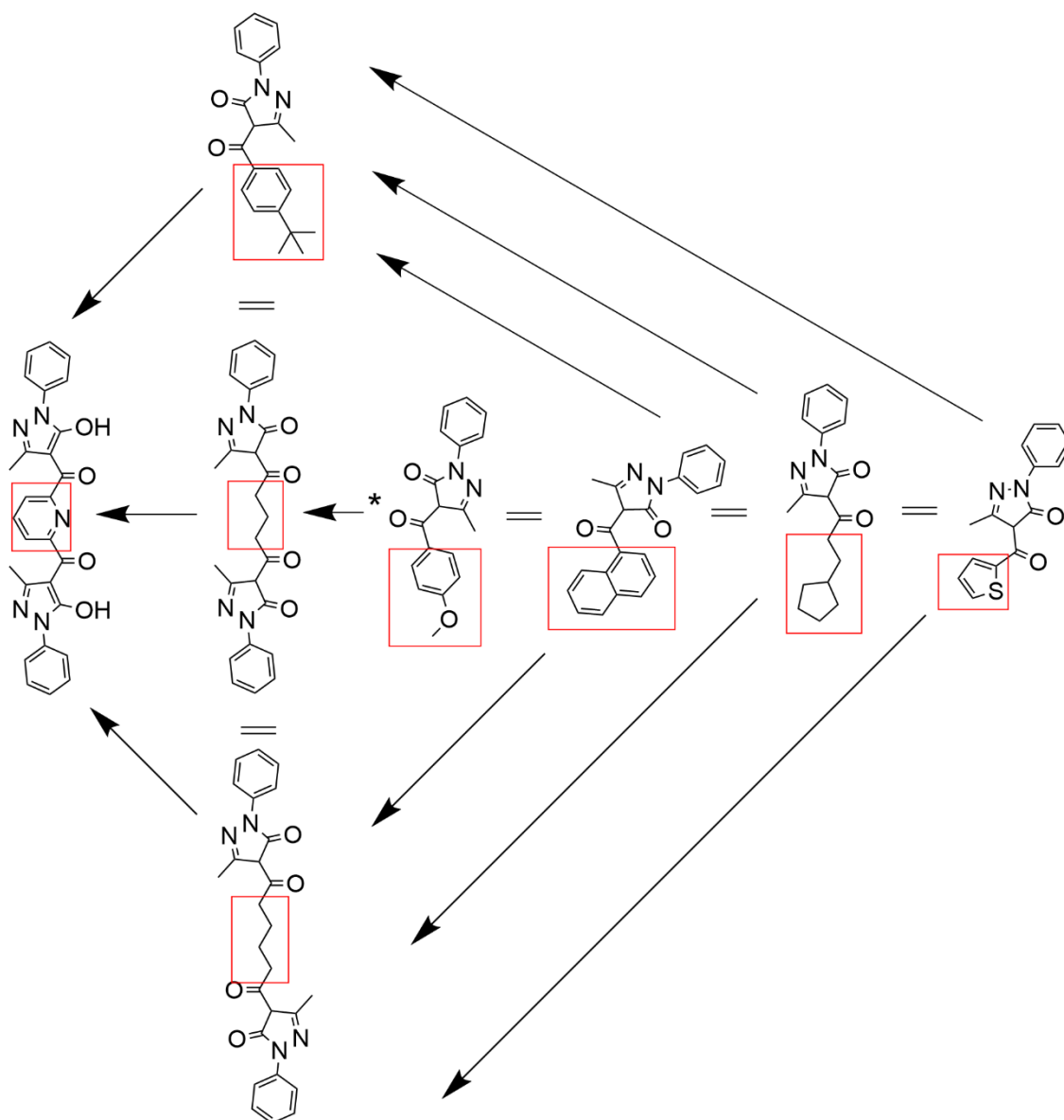
statistická významnost: *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, ns = není statisticky významné



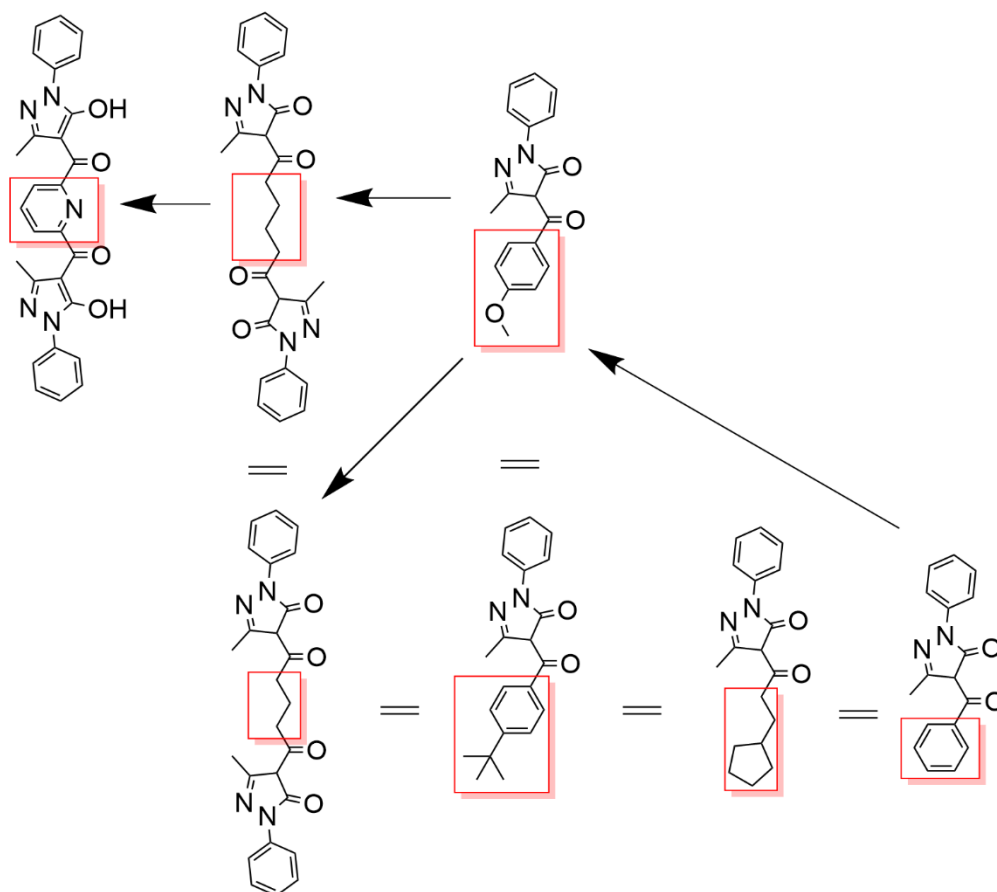
Obr. 22: Schéma zinek-chelatační účinnosti v pH 4,5 sestavené na základě statistické významnosti uvedené v Tab. 3. Porovnány byly jen látky, které chelatovaly alespoň 10% v nejvyšším chelatační poměru, 100:1, pyrazolon: zinek, respektive. Směr znázorněných šipek ukazuje na statisticky významně účinnější chelátor. Znak rovná se znamená, že mezi těmito dvěma látkami nebyl nalezen ze statistického hlediska významný rozdíl.



Obr. 23: Přehled zinek-chelatační účinnosti v pH 5,5 sestavený na základě statistické významnosti látek v Tab. 4. Směr znázorněných šipek znamená statistickou významnost vybraných chelátorů ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů, které chelatovaly Zn^{2+} nad 10 %. Znak rovná se znamená, že mezi těmito dvěma látkami nebyl nalezen ze statistického hlediska významný rozdíl. *výjimka – cyklopentylpropanolový derivát (HQetCp) je stejně statisticky významný jako terc.butylový derivát (HQPhptBu) a derivát se 3-C řetězcem (H2Q3Q), ale méně než derivát se 4-C řetězcem (H2Q4Q).



Obr. 24: Přehled zinek-chelatační účinnosti v pH 6,8 sestavený na základě statistické významnosti látek v Tab. 5. Směr znázorněných šipek znamená statistickou významnost vybraných chelátorů ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů, které chelatovaly Zn^{2+} nad 10 %. Znak rovná se představuje stejnou statistickou významnost uvedených chelátorů. *výjimka – methoxybenzylový derivát (HQPhpOMe) představuje stejnou statistickou významnost jako terc.butylový derivát (HQPhpBu) a derivát se 4-C řetězcem (H2Q4Q), ale menší než molekula propojená přes 3-C řetězec (H2Q3Q).



Obr. 25: Schéma zinek-chelatační účinnosti v pH 7,5 sestavené na základě statistické významnosti uvedené v Tab.3. Směr znázorněných šipek znamená statistickou významnost vybraných chelátorů ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů, které chelatovaly Zn^{2+} nad 10 %. Znak rovná se znamená, že mezi těmito dvěma látkami nebyl nalezen ze statistického hlediska významný rozdíl.

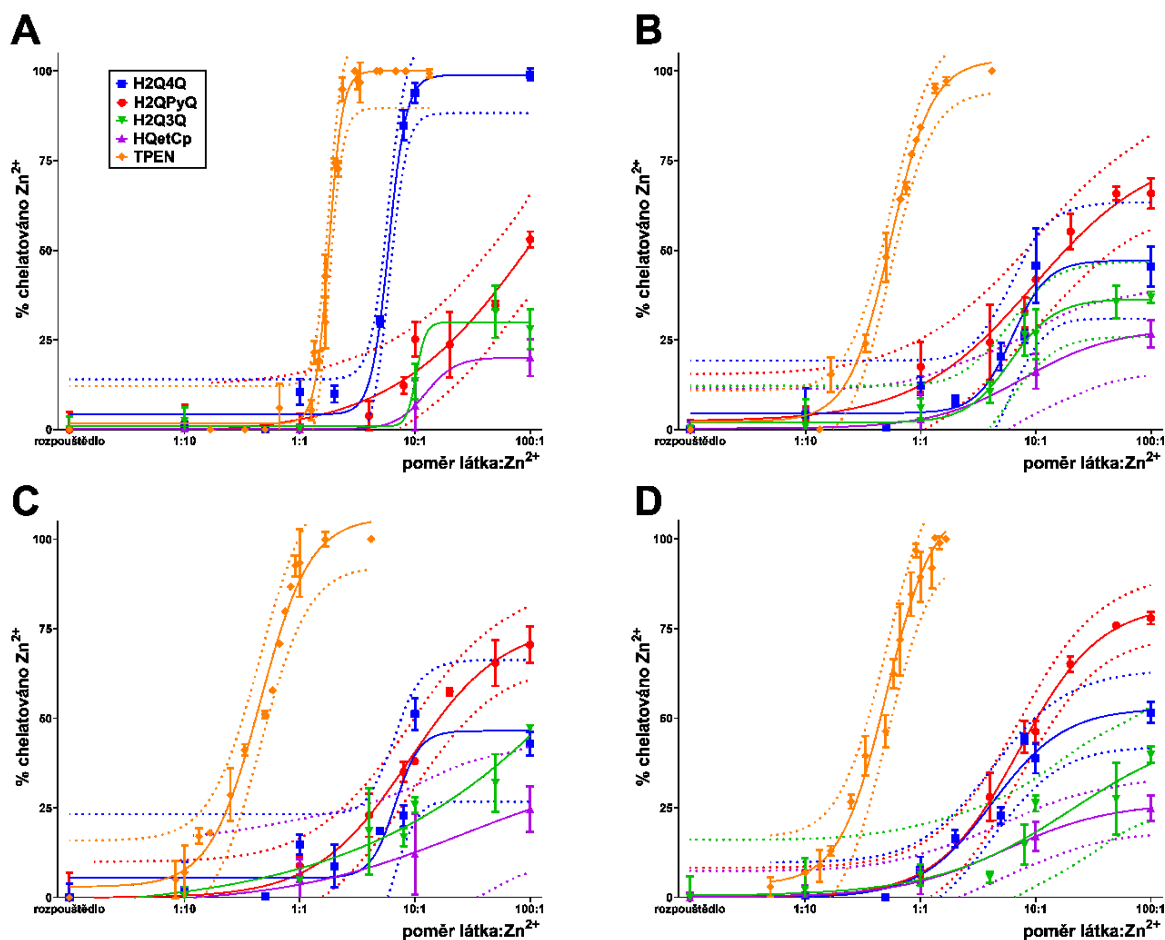
V silně kyselém pH chelatovalo nad 10 % pouze pět testovaných látek (Obr. 22). Nejméně efektivním chelátorem při pH 4,5 byl terc.butylový derivát (HQPhptBu), dvojitá molekula se 3-C můstkem (H2Q3Q) a cyklopentylpropanolový derivát (HQetCp). Statisticky významnějším chelátorem než předchozí jmenované látky byl H2QPyQ, jehož zdvojená molekula je propojena přes pyridin. Překvapivě nejlépe chelatoval H2Q4Q, další zdvojená molekula spojená přes 4-C řetězec (viz Obr. 22).

V dalším pH 5,5 již chelatovalo více testovaných látek. Nejmenší schopnost chelatace vykazoval benzylový (HQBn), naftylový (HQnaph), methoxybenzylový (HQPhpOMe) a cyklopentylpropanolový derivát (HQetCp). Statisticky významnějšími chelátory byly terc.butylový derivát (HQPhptBu), a zdvojené molekuly se 3 a 4

uhlíkatými můstky (H2Q3Q a H2Q4Q). Nicméně již zmíněný cyklopentylpropanolový derivát byl stejně statisticky významný jako terc.butylový derivát a zdvojená molekula propojená 4-C řetězcem. Nejlépe chelatoval při porovnání s ostatními látkami H2QPyQ (viz. Obr. 23).

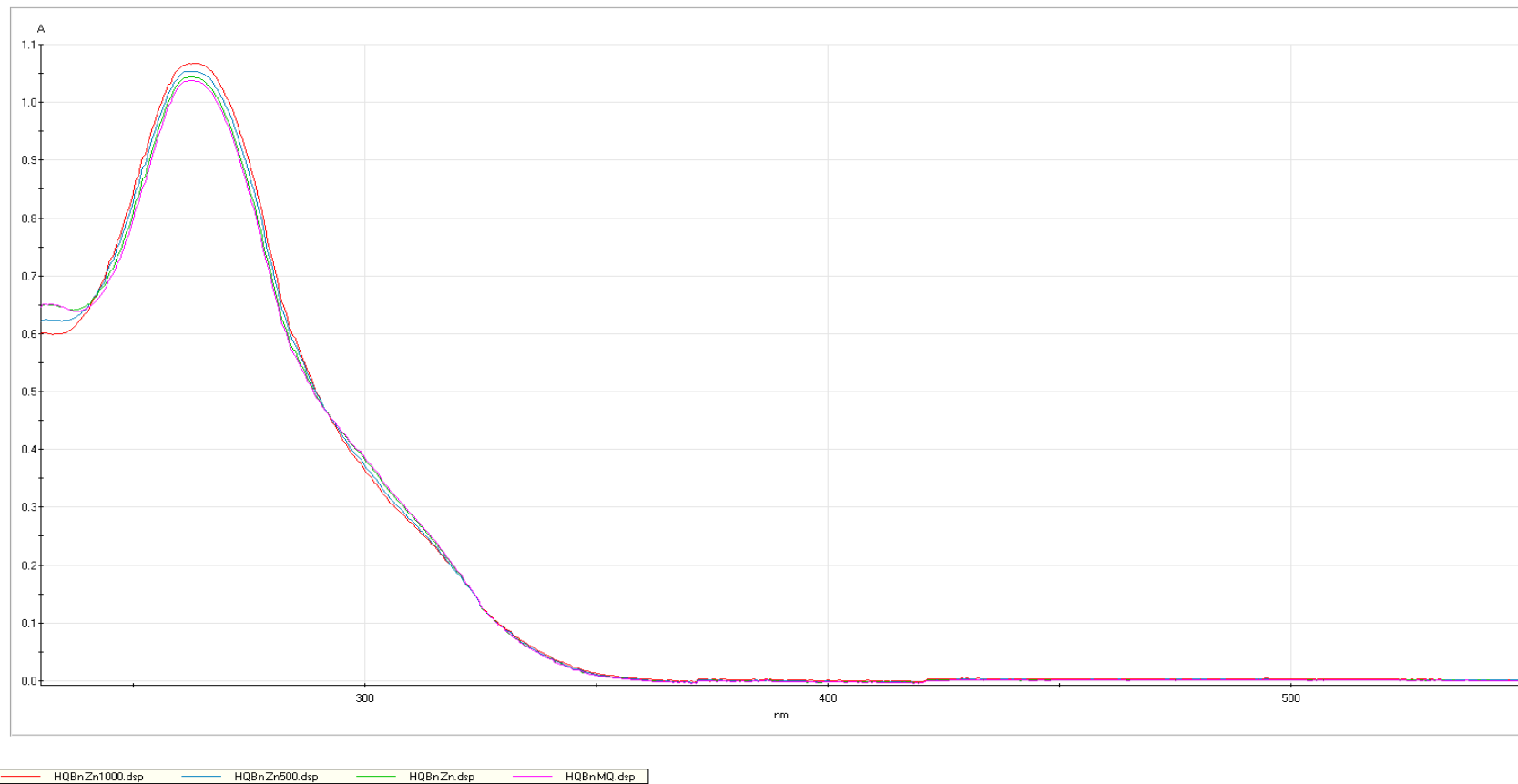
V slabě kyselém pH (6,8) byl neúčinnějším a nejvýznamnějším chelátorem v porovnání s ostatními testovanými látkami opět H2QPyQ. Zdvojené molekuly s uhlíkatými řetězci chelatovaly na stejné úrovni stejně jako terc.butylový derivát. Pouze terc.butylový der. (HQPhptBu) a zdvojená molekula spojená přes 4-C můstek (H2Q4Q) byly stejně účinnými chelátory jako methoxybenzylový derivát (HQPhpOMe). Statisticky nejméně efektivními chelátory byly naftylový der. (HQnaph), cyklopentylpropanolový (HQetCp) a thienylový derivát (HQthi, viz Obr. 24).

V neutrálním pH vykazoval H2QPyQ v porovnání s dalšími testovanými látkami nejvyšší chelatační aktivitu. Methoxybenzylový derivát (HQPhpOMe) byl stejně účinným chelátorem jako terc.butylový (HQPhptBu), ale v porovnání s benzylovým derivátem (HQBn) vykazoval vyšší schopnost chelatace. Nicméně, statisticky významnější než methoxybenzylový derivát (HQPhpOMe) byly zdvojené látky s 3 a 4-uhlíkatými můstky (H2Q3Q a H2Q4Q). Na stejnou úroveň chelatace cyklopentapropanolového der. se řadil benzylový, terc.butylový der. a zdvojená molekula propojená 3-uhlíkatým řetězcem (viz Obr. 25). Ostatní testované látky nebyly do těchto schémat zahrnuty, protože jejich schopnost chelatovat Zn^{2+} nedosahovala nad 10 %.

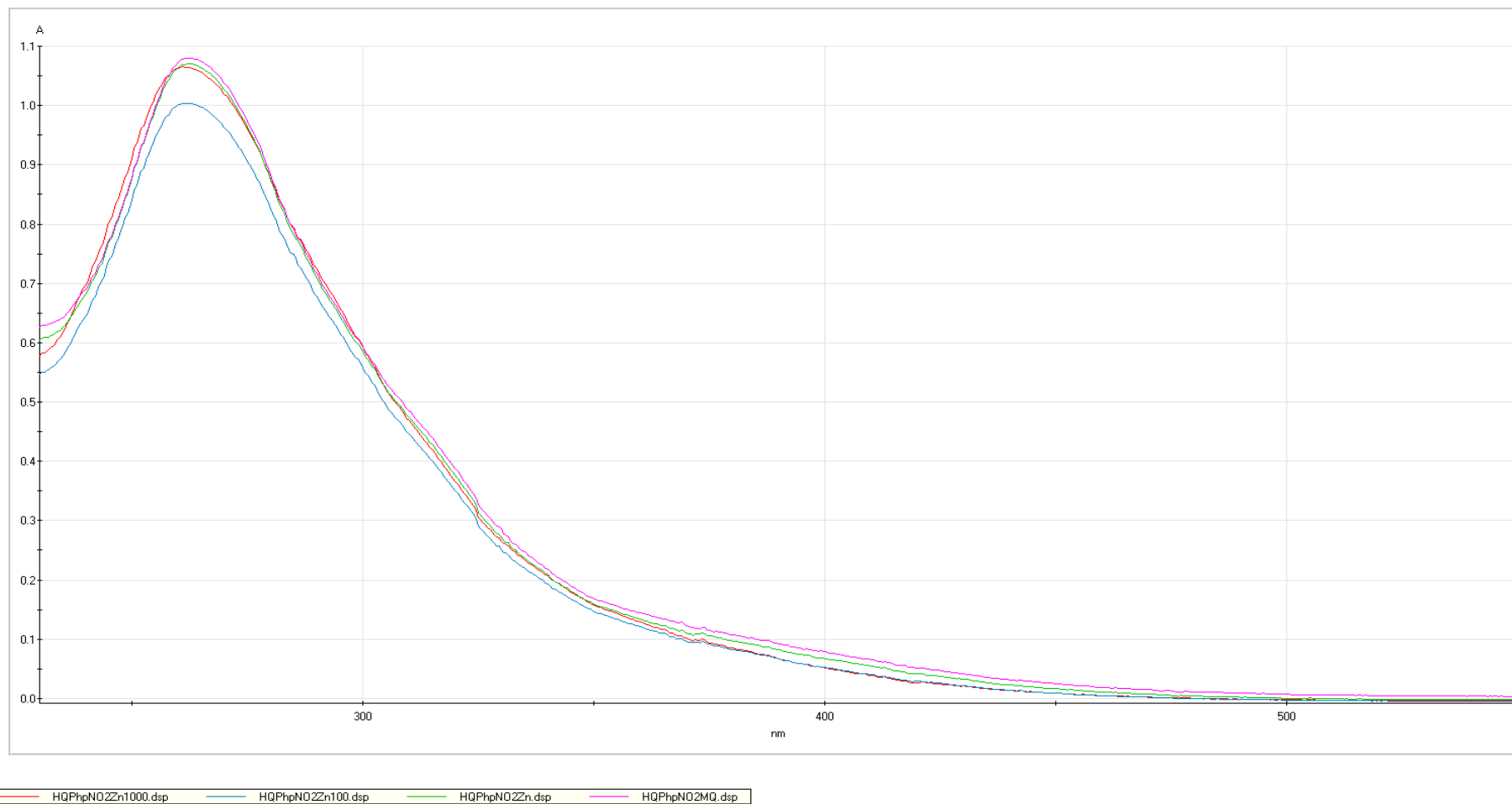


Obr. 26: Závislost procentuálního množství chelatovaného zinku Zn^{2+} na koncentraci chelátorů znázorněné pomocí 95% konfidenčních intervalů při čtyřech různých pH. **A)** pH 4,5 **B)** pH 5,5 **C)** pH 6,8 **D)** pH 7,5. V případě pH 4,5 nebylo možné zkonstruovat konfidenční intervaly u méně účinných látek (H2Q3Q a HQetCp).

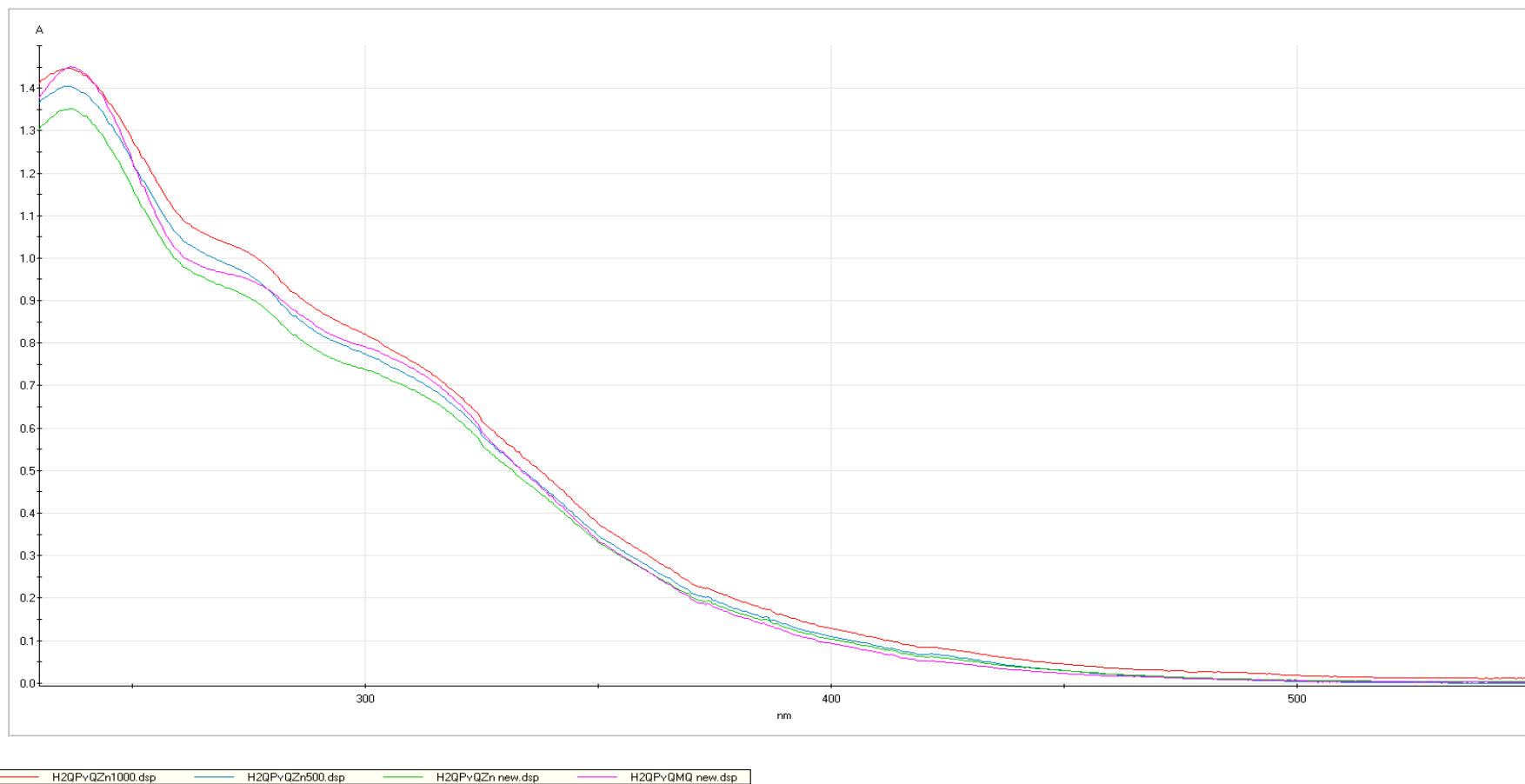
Pro hlubší porovnání nejučinnějších chelátorů (H2Q4Q, H2Q3Q, H2QPyQ, HQetCp) byly také připraveny konfidenční intervaly (Obr. 26). Pro pozitivní kontrolu byl znovu zařazen TPEN. Z grafů je patrná nejvyšší účinnost TPEN následovaná H2Q4Q, který byl účinnější než H2QPyQ při pH 7,5 ale výrazně méně účinný než tato látka při pH 4,5. Při pH 5,5 a 6,8 nebyl mezi těmito látkami nalezen statisticky významný rozdíl při použití konfidenčních intervalů. Zbývající 2 látky (H2Q3Q a HQetCp) byly stejně účinné ale ve většině případů méně účinné než předchozí látky.



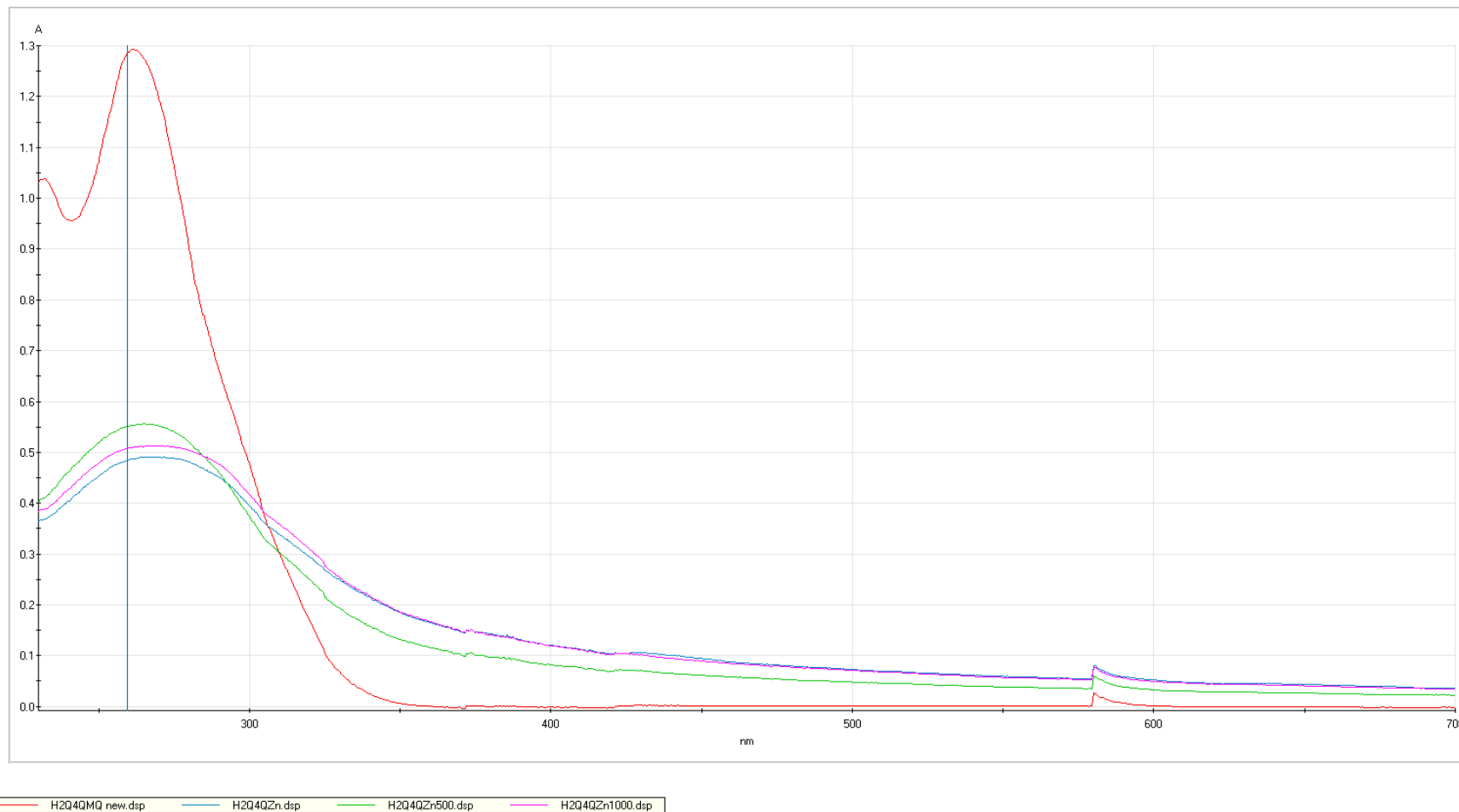
Obr. 27: Absorpční spektra HQBn se Zn²⁺ v poměrech chelátor: Zn²⁺ - 1:1000 (červená barva); 1:500 (modrá barva); 1:1 (zelená barva) a samotný chelátor ve stejné koncentraci (růžová barva). Finální koncentrace chelátoru byla vždy 50 μM.



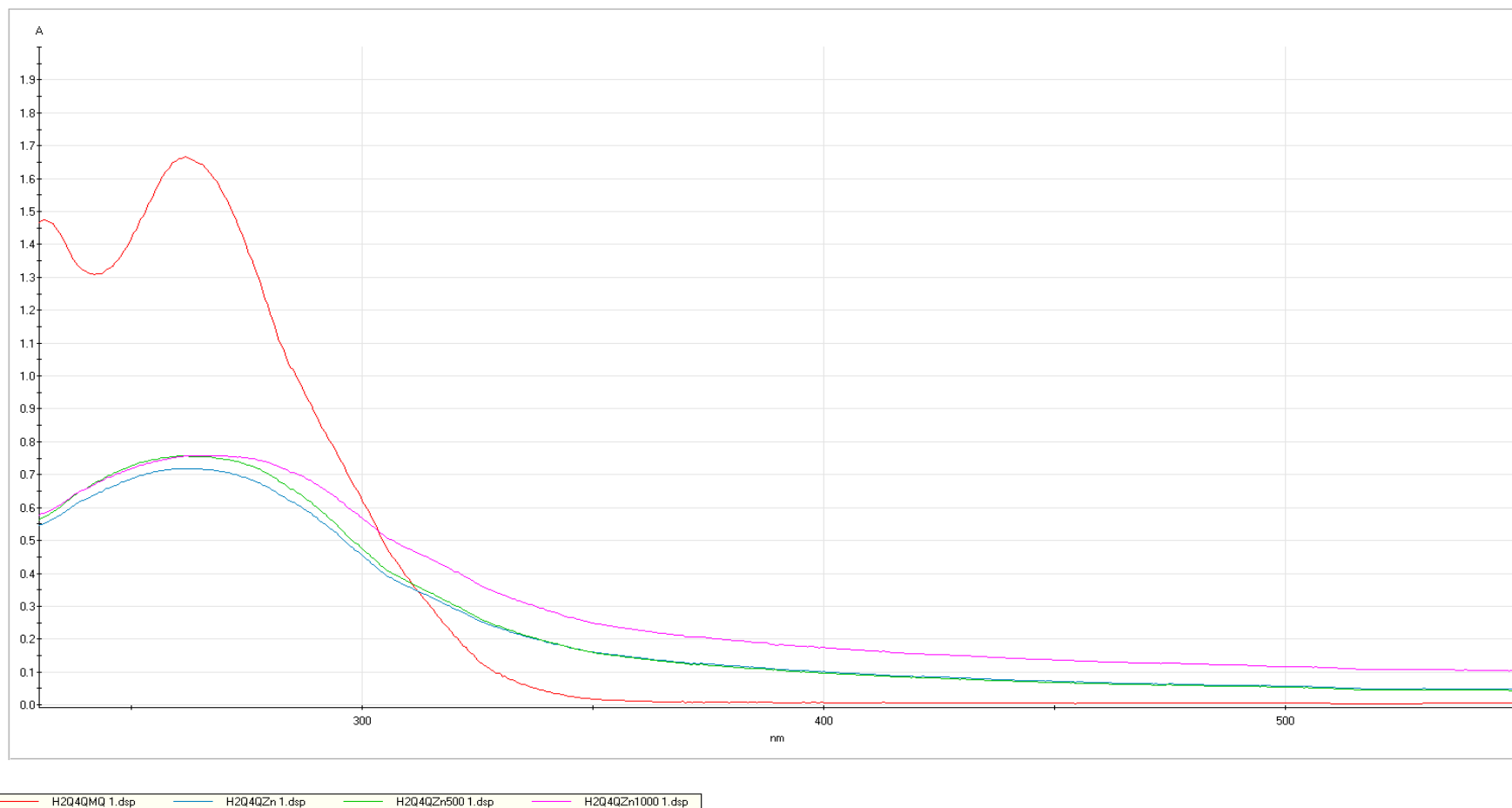
Obr. 28: Absorpční spektra HQPhpNO₂ se Zn²⁺ v poměrech chelátor: Zn²⁺ - 1:1000 (červená barva); 1:500 (modrá barva); 1:1 (zelená barva) a samotný chelátor ve stejné koncentraci (růžová barva). Finální koncentrace chelátoru byla vždy 50 μM.



Obř. 29: Absorpční spektra H2QPyQ se Zn²⁺ v poměřech chelátor: Zn²⁺ - 1:1000 (čřvená barva); 1:500 (modřá barva); 1:1 (zelená barva) a samotný chelátor ve stejné koncentraci (řůřová barva). Finální koncentrace chelátoru byla vždy 50 μM.



Obr. 30: Absorpční spektra H2Q4Q se Zn²⁺ v poměrech chelátor: Zn²⁺ - 1:1000 (červená barva); 1:500 (modrá barva); 1:1 (zelená barva) a samotný chelátor ve stejné koncentraci (ružová barva). Finální koncentrace chelátoru byla vždy 50 μM.



Obr.31 Absorpční spektra H2Q4Q se Zn²⁺ v koncentracích chelátor: Zn²⁺ - 1:1000 (červená barva); 1:500 (modrá barva); 1:1 (zelená barva) a samotný chelátor ve stejné koncentraci (růžová barva). Finální koncentrace chelátoru byla vždy 50 μM.

V dalším kroku byla změřena UV-vis spektra vybraných acylpyrazolonů (Obr. 27-30). Za účelem porovnání s výsledky chelatace získanými nepřímou kompetitivní metodou výše. Pro měření byly stanoveny vlnové délky od 230 do 550 nm. Byla porovnávána spektra látek a roztoků zinku v poměrech 1:1, 1:5, 1:10 a 1:0, kde namísto zinečnatých iontů bylo napipetováno stejné množství Mili-Q. U látek HQBn, HQPhpNO₂ a H₂QPyQ nedošlo k posunu absorpčních spekter ani po přidavku zinku. Pouze u látky H₂Q₄Q k určité změně absorpčního spektra došlo. Tento nález byl překvapivý a pro potvrzení správnosti výsledku bylo měření zopakováno, nález byl ale stejný (Obr.31). Význam tohoto fenoménu není jasný a vyžádá si další měření.

5 DISKUZE

Zinek je důležitým prvkem v lidském organismu zajišťující širokou škálu významných funkcí, které jsou primárně závislé na jeho celkovém množství. V případě zvýšené koncentrace zinku v těle může docházet k řadě patologických stavů. V porovnání s deficitem zinku je jeho intoxikace stav spíše raritní, přesto se s ním v některých případech můžeme setkat. Dochází k tomu například na pracovištích, kde jsou zaměstnanci vystaveni masivní expozici zinkového prachu nebo například při podávání vysokých dávek zinku p. o. suplementy (Plum et al. 2010).

Chelatační terapie je preferovanou léčebnou metodou pro odstranění toxických nebo i nadbytečných kovů z organismu. Chelatační činidla vytvářejí komplex s nadbytečným kovem tzv. chelát, tím tento kov vyváží z intra- nebo extracelulárních oblastí a vyloučí ho ven z organismu.

Tato práce se konkrétně zaměřuje na 11 látek ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů a posuzuje se u nich chelatační aktivita při různých pato(fyziologických) hodnotách pH. Měření probíhalo při čtyřech různých hodnotách pH, se kterými se v lidském organismu můžeme setkat při různých patologických i fyziologických stavech. Například pH 4,5; 5,5 a 6,8; představují kyselé hodnoty, které mohou simulovat patologickou acidózu, která v praxi může být způsobená závažnou ischemií, kdežto pH 7,5 odpovídá neutrálním hodnotám.(Ambrosio et al. 1987) Pro naměření výsledků byla využita spektrofotometrie, která poskytla poměrně rychlé provedení jednotlivých testů a zajistila i jejich relativní přesnost. Pro pozitivní kontrolu byl použit známý chelátor zinku TPEN (N,N,N,N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin), který je nejvíce využívaným experimentálním intracelulárním chelátorem zinku (Radford et al. 2013).

Tyto látky ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů již byly testovány se železnatými a železitými ionty ve studii Filipický et al. 2012. Predikovalo se, že by chelatace s železnatými ionty mohla být obdobná nebo dokonce analogická výsledkům se zinečnatými ionty, jelikož se jedná také o dvoumocné kationty. Filipický et al. zjistili, že se železnatými ionty byly v případě H2QPyQ chelátovány ve vyšší míře při klesajícím pH, což je velmi neobvyklý nález (Filipický et al. 2012). I v této studii byl H2QPyQ velmi účinný, ale tento vztah k pH nebyl u zinečnatých iontů pozorován. Naopak překvapivě byla u H2Q4Q pozorována kompletní chelatace při pH 4,5 zatímco účinnost

chelatace při vyšších pH byla paradoxně nižší. Většina látek byla ale relativně slabými chelátory zinečnatých iontů a tímto byla spíše úvodní predikce této práce vyvrácena. Většina acylpyrazolonů sice zinečnaté ionty chelatovala ale to až při nejvyšších poměrech a často jen při vyšším pH a v drtivé většině případů i s nižší účinností.

Není zcela jasné, proč látka H2Q4Q chelatovala zinečnaté ionty téměř 100 %. Vzhledem k tomu, že se jedná o dimerní látku se dvěma acylpyrazolonovými skupinami, tzn. dvěma chelatačními místy, tak by bylo možné sice takový potenciál předpokládat, ale při poměru 1:1 byla chelatační účinnost této látky nízká. V případě velmi účinných chelátorů se dvěma vazebnými místy bychom v poměru 1:1, respektive i 1:2, chelátor:Zn²⁺ ionty, měli získat 100 % chelataci. Tyto výsledky kontrastují se studií od Filipského a spol, kde navíc obě dimerní látky H2Q3Q a H2Q4Q vyšly jako vysoce efektivní chelátory železnatých iontů. Se zinečnatými ionty tyto látky totiž chelatovaly maximálně do 50 %.

Chelatačními centry testovaných 4-acylpyrazol-5-onů jsou oba atomy kyslíku v ketoskupině, které jsou stabilizovány v oxo- nebo enol- tautomerii díky konjugaci s aromatickým kruhem (Marchetti et al. 2005). Skupiny vystupující jako donoři elektronů např. terc.butyl (HQPhptBu) jsou nejspíš výhodnější než akceptory elektronů jako je nitroderivát (HQPhNO₂). Zdvojené molekuly látek H2Q3Q a H2Q4Q jsou spojené přes 3-C a 4-C můstky, kdežto u H2QPyQ jsou spojeny přes pyridin. Na základě toho je možné odvodit, že zinek - chelatační schopnost chelátorů je odvozena od strukturních obměn, kdy propojení přes pyridinovou skupinu se zdá být efektivnější. Bude to asi souviset s přítomností atomu N, který se vyskytuje jen u této látky.

V zásadě většina z testovaných látek reagovala až při vyšších koncentracích řádově 10:1 a 100:1 se Zn²⁺. Při nižších koncentracích 1:10 a 1:1 nereagovala žádná z testovaných látek s výjimkou H2QPyQ, u kterého byla u některých pH nalezena chelatace i v poměru 1:1 (Obr. 18). Z toho vyplývá, že látky ze skupiny acylpyrazolonů zřejmě nemají vysokou afinitu k zinečnatým iontům a je potřeba vyšších koncentrací těchto látek, aby se zinkem vytvořily komplex. Lze tedy shrnout, že tyto látky nebudou moci nahradit TPEN, protože jsou výrazně slabšími chelátory v porovnání s ní.

V závěrečném kroku jsme chtěli prokázat chelatační vlastnosti těchto látek i za použití přímé spektrofotometrie. Přepokládali jsme, že přídavek zinečnatých iontů

povede ke změně spektra, tj. změní se maximum absorbance testovaných látek. Toto jsme ale neprokázali. Tento fenomén je u zinku znám, většina jeho solí je bezbarvá.(Goodwin 2017) Je tedy pravděpodobné, že přidavek zinku v tomto případě nemění barvu testovaných látek, i když s nimi tvoří komplexy.

ZÁVĚR

Na základě získaných výsledků této analýzy je možné konstatovat, že většina z testovaných 4-acylpyrazol-5-onů chelatuje zinečnaté ionty spíše zanedbatelně nebo až ve vysokých koncentračních poměrech ve vztahu k těmto iontům. Pouze H2QPyQ s rostoucím pH vykazuje vyšší hodnoty chelatace iontů, při neutrálním pH 7,5 až okolo 75 %. Zajímavým výsledkem je vysoká schopnost tvořit zinečnaté komplexy u látky H2Q4Q při kyselém pH 4,5, která dosahuje až 100 % chelatovaných iontů. Tyto obě nejúčinnější látky H2Q4Q a H2QPyQ se tedy chovají zcela odlišně při nejvyšším a nejnižším pH. Naopak při porovnání v pH 5,5 a 6,8 mezi nimi nebyla nalezena ze statistického hlediska odlišnost v účinnosti.

Závěrem lze říci, že deriváty ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů se přes jejich určitou schopnost chelatace nezdají být vhodnými kandidáty pro substituci experimentálního zinečnatého chelátoru TPEN, který byl ve všech pH účinnější než všechny testované látky.

POUŽITÁ LITERATURA

- Aaseth, J., M. A. Skaug, Y. Cao and O. Andersen (2015). "Chelation in metal intoxication--Principles and paradigms." J Trace Elem Med Biol **31**: 260-266.
- Abu-Hamdan, D. K., S. D. Migdal, R. Whitehouse, P. Rabbani, A. S. Prasad and F. D. McDonald (1981). "Renal handling of zinc: effect of cysteine infusion." Am J Physiol **241**(5): F487-494.
- Ambrosio, G., J. L. Zweier, W. E. Jacobus, M. L. Weisfeldt and J. T. Flaherty (1987). "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 **76**(4): 906-915.
- Andersen, O. (1999). "Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication." Chem Rev **99**(9): 2683-2710.
- Andreini, C. and I. Bertini (2012). "A bioinformatics view of zinc enzymes." J Inorg Biochem **111**: 150-156.
- Baum, C. R. (1999). "Treatment of mercury intoxication." Curr Opin Pediatr **11**(3): 265-268.
- Besnard, P., I. Niot, H. Poirier, L. Clément and A. Bernard (2002). "New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine." Mol Cell Biochem **239**(1-2): 139-147.
- Bouron, A. and J. Oberwinkler (2014). "Contribution of calcium-conducting channels to the transport of zinc ions." Pflugers Arch **466**(3): 381-387.
- Canzoniero, L. M., S. L. Sensi and D. W. Choi (1997). "Measurement of intracellular free zinc in living neurons." Neurobiol Dis **4**(3-4): 275-279.
- Catapano, M. C., V. Tvrđý, J. Karlíčková, L. Mercolini and P. Mladěnka (2018). "A simple, cheap but reliable method for evaluation of zinc chelating properties." Bioorg Chem **77**: 287-292.
- Colvin, R. A., W. R. Holmes, C. P. Fontaine and W. Maret (2010). "Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis." Metallomics **2**(5): 306-317.
- Corbo, M. D. and J. Lam (2013). "Zinc deficiency and its management in the pediatric population: a literature review and proposed etiologic classification." J Am Acad Dermatol **69**(4): 616-624.e611.
- Cossack, Z. T. (1991). "Decline in somatomedin-C (insulin-like growth factor-1) with experimentally induced zinc deficiency in human subjects." Clin Nutr **10**(5): 284-291.
- Cousins, R. J. (1985). "Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin." Physiol Rev **65**(2): 238-309.
- Eom, K. S., J. S. Cheong and S. J. Lee (2016). "Structural Analyses of Zinc Finger Domains for Specific Interactions with DNA." J Microbiol Biotechnol **26**(12): 2019-2029.
- Filipský, T., P. Mladěnka, K. Macáková, R. Hrdina, L. Saso, F. Marchetti and C. Pettinari (2012). "In vitro characteristics of 1-phenyl-3-methyl-4-acylpyrazol-5-ones iron chelators." Biochimie **94**(1): 125-131.
- Flora, S. J., R. Bhattacharya and R. Vijayaraghavan (1995). "Combined therapeutic potential of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and calcium disodium edetate on the mobilization and distribution of lead in experimental lead intoxication in rats." Fundam Appl Toxicol **25**(2): 233-240.

- Flora, S. J. and V. Pachauri (2010). "Chelation in metal intoxication." Int J Environ Res Public Health **7**(7): 2745-2788.
- Fosmire, G. J. (1990). "Zinc toxicity." Am J Clin Nutr **51**(2): 225-227.
- Foster, M., A. Chu, P. Petocz and S. Samman (2013). "Effect of vegetarian diets on zinc status: a systematic review and meta-analysis of studies in humans." J Sci Food Agric **93**(10): 2362-2371.
- Fournier, L., G. Thomas, R. Garnier, A. Buisine, P. Houze, F. Pradier and S. Dally (1988). "2,3-Dimercaptosuccinic acid treatment of heavy metal poisoning in humans." Med Toxicol Adverse Drug Exp **3**(6): 499-504.
- Fukada, T., S. Yamasaki, K. Nishida, M. Murakami and T. Hirano (2011). "Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling." J Biol Inorg Chem **16**(7): 1123-1134.
- Gaither, L. A. and D. J. Eide (2001). "Eukaryotic zinc transporters and their regulation." Biometals **14**(3-4): 251-270.
- Ghasemi, A., S. Zahediasl, F. Hosseini-Esfahani, L. Syedmoradi and F. Azizi (2012). "Pediatric reference values for serum zinc concentration in Iranian subjects and an assessment of their dietary zinc intakes." Clin Biochem **45**(15): 1254-1256.
- Goodwin, F. E. (2017). Zinc Compounds. In: Kirk-Othmer Encycl of Chem Tech. John Wiley & Sons, Inc. New York: 1-13.
- Grasedyck, K. (1988). "[D-penicillamine--side effects, pathogenesis and decreasing the risks]." Z Rheumatol **47 Suppl 1**: 17-19.
- Guldager, B., P. J. Jørgensen and P. Grandjean (1996). "Metal excretion and magnesium retention in patients with intermittent claudication treated with intravenous disodium EDTA." Clin Chem **42**(12): 1938-1942.
- Haase, H. and L. Rink (2014). "Zinc signals and immune function." Biofactors **40**(1): 27-40.
- Hara, T., T. A. Takeda, T. Takagishi, K. Fukue, T. Kambe and T. Fukada (2017). "Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis." J Physiol Sci **67**(2): 283-301.
- Hirano, T., M. Murakami, T. Fukada, K. Nishida, S. Yamasaki and T. Suzuki (2008). "Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule." Adv Immunol **97**: 149-176.
- Chabosseau, P., E. Tuncay, G. Meur, E. A. Bellomo, A. Hessels, S. Hughes, P. R. Johnson, M. Bugliani, P. Marchetti, B. Turan, A. R. Lyon, M. Merckx and G. A. Rutter (2014). "Mitochondrial and ER-targeted eCALWY probes reveal high levels of free Zn²⁺." ACS Chem Biol **9**(9): 2111-2120.
- Chimienti, F., M. Aouffen, A. Favier and M. Seve (2003). "Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate." Curr Drug Targets **4**(4): 323-338.
- Jackson, M. J. (1989). Physiology of zinc: general aspects. Zinc in Hum Biol. London, Springer. **388**: 1-14.
- Kambe, T., T. Tsuji, A. Hashimoto and N. Itsumura (2015). "The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism." Physiol Rev **95**(3): 749-784.
- Kamizono, A., M. Nishizawa, Y. Teranishi, K. Murata and A. Kimura (1989). "Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Gen Genet **219**(1-2): 161-167.
- Kawachi, M., Y. Kobae, T. Mimura and M. Maeshima (2008). "Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity." J Biol Chem **283**(13): 8374-8383.

- Kenny, F., K. Sriram and J. B. Hammond (1989). "Clinical zinc deficiency during adequate enteral nutrition." J Am Coll Nutr **8**(1): 83-85.
- Kim, A. M., M. L. Bernhardt, B. Y. Kong, R. W. Ahn, S. Vogt, T. K. Woodruff and T. V. O'Halloran (2011). "Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs." ACS Chem Biol **6**(7): 716-723.
- Kim, J. E., S. R. Yoo, M. G. Jeong, J. Y. Ko and Y. S. Ro (2014). "Hair zinc levels and the efficacy of oral zinc supplementation in patients with atopic dermatitis." Acta Derm Venereol **94**(5): 558-562.
- Knudtson, M. L., D. G. Wyse, P. D. Galbraith, R. Brant, K. Hildebrand, D. Paterson, D. Richardson, C. Burkart and E. Burgess (2002). "Chelation therapy for ischemic heart disease: a randomized controlled trial." Jama **287**(4): 481-486.
- Krezel, A. and W. Maret (2008). "Thionein/metallothionein control Zn(II) availability and the activity of enzymes." J Biol Inorg Chem **13**(3): 401-409.
- Leonard, D., R. Koca, C. Acun, S. Cinar, E. Estürk, G. Ustündag, S. Herron, M. M. Butterfly and J. A. Zenel (2007). "Visual diagnosis: three infants who have perioral and acral skin lesions." Pediatr Rev **28**(8): 312-318.
- Lewis, G. (1938). "Acids and Bases." Journ of the Frankl Inst **226**(3): 293-313.
- Livingstone, C. (2015). "Zinc: physiology, deficiency, and parenteral nutrition." Nutr Clin Pract **30**(3): 371-382.
- Lowe, N. M., K. Fekete and T. Decsi (2009). "Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review." Am J Clin Nutr **89**(6): 2040s-2051s.
- Maret, W. (2011). "Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins." Biometals **24**(3): 411-418.
- Maret, W. (2013). "Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life." Adv Nutr **4**(1): 82-91.
- Maret, W. and H. H. Sandstead (2006). "Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation." J Trace Elem Med Biol **20**(1): 3-18.
- Marchetti, F., C. Pettinari and R. Pettinari (2005). "Acylypyrazolone ligands: Synthesis, structures, metal coordination chemistry and applications." Coordination chemistry reviews **249**(24): 2910-2921.
- McCranor, B. J., R. A. Bozym, M. I. Vitolo, C. A. Fierke, L. Bambrick, B. M. Polster, G. Fiskum and R. B. Thompson (2012). "Quantitative imaging of mitochondrial and cytosolic free zinc levels in an in vitro model of ischemia/reperfusion." J Bioenerg Biomembr **44**(2): 253-263.
- Miller, K. L., R. S. Liebowitz and L. K. Newby (2004). "Complementary and alternative medicine in cardiovascular disease: a review of biologically based approaches." Am Heart J **147**(3): 401-411.
- Miller, L. V., K. M. Hambidge, V. L. Naake, Z. Hong, J. L. Westcott and P. V. Fennessey (1994). "Size of the zinc pools that exchange rapidly with plasma zinc in humans: alternative techniques for measuring and relation to dietary zinc intake." J Nutr **124**(2): 268-276.
- Mocchegiani, E., J. Romeo, M. Malavolta, L. Costarelli, R. Giacconi, L. E. Diaz and A. Marcos (2013). "Zinc: dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly." Age (Dordr) **35**(3): 839-860.
- O'Dell, B. L. (2000). "Role of zinc in plasma membrane function." J Nutr **130**(5S Suppl): 1432s-1436s.
- O'Dell, B. L., P. M. Newberne and J. E. Savage (1958). "Significance of dietary zinc for the growing chicken." J Nutr **65**(4): 503-518.

- Outten, C. E. and T. V. O'Halloran (2001). "Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis." Science **292**(5526): 2488-2492.
- Palmiter, R. D. and S. D. Findley (1995). "Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc." Embo j **14**(4): 639-649.
- Pearson, R. G. (1963). "Hard and soft acids and bases." Journal of the American Chemical Society **85**: 3533-3539.
- Penny, M. E. (2013). "Zinc supplementation in public health." Ann Nutr Metab **62 Suppl 1**: 31-42.
- Plum, L. M., L. Rink and H. Haase (2010). "The essential toxin: impact of zinc on human health." Int J Environ Res Public Health **7**(4): 1342-1365.
- Prasad, A. S., J. A. Halsted and M. Nadimi (1961). "Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia." Am J Med **31**: 532-546.
- Qin, Y., P. J. Dittmer, J. G. Park, K. B. Jansen and A. E. Palmer (2011). "Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn²⁺ with genetically encoded sensors." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(18): 7351-7356.
- Radford, R. J. and S. J. Lippard (2013). "Chelators for investigating zinc metalloneurochemistry." Curr Opin Chem Biol **17**(2): 129-136.
- Rousseaux, C. G. and L. G. MacNabb (1992). "Oral administration of D-penicillamine causes neonatal mortality without morphological defects in CD-1 mice." J Appl Toxicol **12**(1): 35-38.
- Sandstead, H. H., A. S. Prasad, A. R. Schulert, Z. Farid, A. Miale, Jr., S. Bassilly and W. J. Darby (1967). "Human zinc deficiency, endocrine manifestations and response to treatment." Am J Clin Nutr **20**(5): 422-442.
- Shusterman, E., O. Beharier, L. Shiri, R. Zarivach, Y. Etzion, C. R. Campbell, I. H. Lee, K. Okabayashi, A. Dinudom, D. I. Cook, A. Katz and A. Moran (2014). "ZnT-1 extrudes zinc from mammalian cells functioning as a Zn(2+)/H(+) exchanger." Metallomics **6**(9): 1656-1663.
- Tapiero, H. and K. D. Tew (2003). "Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins." Biomed Pharmacother **57**(9): 399-411.
- Taylor, K. M. and R. I. Nicholson (2003). "The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters." Biochim Biophys Acta **1611**(1-2): 16-30.
- Turnlund, J. R., J. C. King, W. R. Keyes, B. Gong and M. C. Michel (1984). "A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and alpha-cellulose." Am J Clin Nutr **40**(5): 1071-1077.
- Vallee, B. L. and D. S. Auld (1990). "Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins." Biochemistry **29**(24): 5647-5659.
- Vallee, B. L. and K. H. Falchuk (1993). "The biochemical basis of zinc physiology." Physiol Rev **73**(1): 79-118.
- Willoughby, J. L. and C. N. Bowen (2014). "Zinc deficiency and toxicity in pediatric practice." Curr Opin Pediatr **26**(5): 579-584.
- Yamasaki, S., K. Sakata-Sogawa, A. Hasegawa, T. Suzuki, K. Kabu, E. Sato, T. Kurosaki, S. Yamashita, M. Tokunaga, K. Nishida and T. Hirano (2007). "Zinc is a novel intracellular second messenger." J Cell Biol **177**(4): 637-645.