

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**STANOVENÍ CHELATAČNÍCH VLASTNOSTÍ 6,7-DIHYDROXYKUMARINU**

Rigorózní práce

Konzultant: PharmDr. Tomáš Filipický, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Mgr. Jan Kolouch

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Podpis .....

Rád bych poděkoval všem svým blízkým, kteří mě podporovali při vypracování této práce. Můj největší dík patří PharmDr. Tomášovi Filipskému, Ph.D., který mi svým odborným dohledem, cennými radami a velice přátelským přístupem pomohl sestavit tuto práci. Dále bych chtěl poděkovat doc. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D. a PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za asistenci při experimentálních činnostech spojených s touto prací.

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Jan Kolouch

Konzultant: PharmDr. Tomáš Filipický, Ph.D.

Název rigorózní práce: Stanovení chelatačních vlastností 6,7-dihydroxykumarinu

Železo je nepostradatelným elementem v lidském těle. Tento prvek sehrává nezastupitelnou roli v řadě metabolických reakcí, mezi něž patří např. transport kyslíku a syntéza DNA. Mezi esenciální vlastnosti železa patří schopnost přenášet elektrony a facilitovat katalytické reakce. Tyto reakce jsou umožněny oxidačně-redukčními vlastnostmi železa, které se běžně vyskytuje ve dvou oxidačních stavech, tj.  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Nicméně, tento prvek může katalyzovat nejen prospěšné, ale také toxické reakce. Jednou z nich je Fentonova reakce, která vede k tvorbě volných kyslíkových radikálů, které působí toxicky na okolní tkáň.

V této rigorózní práci jsme se zaměřili na analýzu chelatační vlastností 6,7-dihydroxykumarinu (67DHC) při různých pH (4,5, 5,5, 6,8 a 7,5) pomocí kompetitivní a přímé UV-Vis spektrometrie. Dále jsme zjišťovali redukční aktivitu 67DHC při pH 4,5 a 5,5.

Přímou UV-Vis spektrometrií jsme zjistili, že 67DHC chelatoval  $\text{Fe}^{2+}$  ionty při pH 5,5, 6,8 a 7,5 v chelatačním poměru 2:1 (67DHC: $\text{Fe}^{2+}$ ). Naproti tomu  $\text{Fe}^{3+}$  ionty byly chelatovány při pH 6,8 a 7,5 v chelatačním poměru 1,5:1 (67DHC: $\text{Fe}^{3+}$ ). Dále jsme pomocí kompetitivní UV-Vis spektrometrie zjistili, že 67DHC chelatoval  $\text{Fe}^{2+}$  ionty při pH 5,5, 6,8 a 7,5 a významně redukoval  $\text{Fe}^{3+}$  ionty při pH 4,5, přičemž redukce při pH 5,5 byla minimální.

Na základě výsledků uvedených v této práci lze předpokládat, že 67DHC je vhodným chelátorem zejména při vyšších hodnotách pH.

## Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Jan Kolouch

Consultant: PharmDr. Tomáš Filipický, Ph.D.

Title of thesis: Assessment of chelating properties of 6,7-dihydroxycoumarin

Iron is an indispensable element in the human body. This element plays irreplaceable role in many metabolic processes, such as transport of oxygen and synthesis of DNA. The essential feature of iron is its ability to transport electrons and facilitation of catalytic reactions. These reactions are realized by redox properties of iron, which naturally occurs at two different oxidation states, i.e.  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ . Nevertheless, this element can catalyze not only beneficial, but also toxic reactions. One of those is Fenton reaction, which results in the formation of reactive oxygen species that are toxic to the surrounding tissue.

In this thesis we have focused on the assessment of chelating properties of 6,7-dihydroxycoumarin (67DHC) at various pH conditions (4.5, 5.5, 6.8 and 7.5) using both competitive and direct UV-Vis spectrophotometry. Further, we have evaluated its reducing activity at pH 4.5 and 5.5.

By the analysis of UV-Vis absorption spectra we have found out, that 67DHC chelated  $\text{Fe}^{2+}$  ions at pH 5.5, 6.8 and 7.5 at the chelating ratio 2:1 (67DHC: $\text{Fe}^{2+}$ ). Contrary,  $\text{Fe}^{3+}$  ions were chelated at pH 6.8 and 7.5 at the chelating ratio 1.5:1 (67DHC: $\text{Fe}^{3+}$ ). Using the competitive UV-Vis spectrophotometry we have concluded that 67DHC chelated  $\text{Fe}^{2+}$  ions at pH 5.5, 6.8 and 7.5 and significantly reduced  $\text{Fe}^{3+}$  ions at pH 4.5, while the reduction at pH 5.5 was minimal.

On the basis of the stated results, it is predictable that 67DHC is a promising iron chelator at the higher pH conditions in particular.

## Obsah

1. Seznam zkratek.....	1
2. Úvod.....	3
3. Teoretická část.....	4
3.1. Železo.....	4
3.1.1. Absorpce železa.....	4
3.1.2. Distribuce železa.....	5
3.1.3. Metabolismus a regulace železa.....	5
3.1.4. Železo nevázané na transferrin.....	7
3.1.5. Patofyziologie železa.....	7
3.1.5.1. Ateroskleróza.....	7
3.1.5.2. Akutní koronární příhody.....	8
3.1.5.3. Diabetes mellitus.....	8
3.1.5.4. Vrozená hemochromatóza.....	9
3.1.5.5. Thalasémie.....	10
3.2. Chelátory železa užívané v klinické praxi.....	12
3.2.1. Deferoxamin.....	12
3.2.2. Deferipron.....	12
3.2.3. Deferasirox.....	13
3.2.4. Dexrazoxan.....	13
3.3. Kumariny.....	14
3.3.1. Toxicita.....	14
3.3.2. Klasifikace.....	15
3.3.2.1. Přírodní kumariny.....	15
3.3.2.2. Syntetické kumariny.....	17
3.3.3. Farmakologické účinky kumarinů.....	17
3.3.3.1. Antioxidační.....	17

3.3.3.2.	Ostatní účinky kumarinů .....	18
4.	Cíl práce.....	20
5.	Materiál a metody.....	21
5.1.	Přímá UV-Vis spektrometrie.....	21
5.1.1.	Vybavení.....	21
5.1.2.	Chemikálie .....	21
5.1.3.	Kalibrace iontů železa.....	21
5.1.4.	Ionty železa a pH prostředí .....	21
5.1.5.	Hodnocení absorpčního maxima .....	22
5.1.6.	Jobova metoda .....	22
5.1.7.	Statistická analýza.....	22
5.2.	Kompetitivní spektrometrie .....	23
5.2.1.	Vybavení .....	23
5.2.2.	Chemikálie .....	23
5.2.3.	Kalibrace iontů železa.....	23
5.2.4.	Ionty železa a pH prostředí .....	23
5.2.5.	Postup a hodnocení chelatace a redukce.....	24
5.2.6.	Statistická analýza.....	24
6.	Výsledky.....	25
6.1.	Přímá UV-Vis spektrometrie.....	25
6.2.	Kompetitivní UV-Vis spektrometrie.....	35
7.	Diskuze .....	36
8.	Závěr.....	39
9.	Literatura .....	40

## 1. Seznam zkratek

67DHC	6,7-dihydroxykumarin
COX	Cyklooxygenáza
CYP	Cytochrom P
Dcytb	Duodenální cytochrom b
DFO	Deferoxamin
DFP	Deferipron
DFX	Deferasirox
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	„divalent metal transporter“
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
Fpn	Ferroportin
GGT	Gammaglutamyl transferáza
HAMP	„hepcidin antimicrobial peptide“
Hb	Hemoglobin
HbH	Hemoglobin H
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HFE	„human hemochromatosis protein“
HIV	„human immunodeficiency virus“
HJV	Hemojuvelin
HO	Hemoxygenáza
ICHS	Ischemická Choroba Srdeční
LDL	„low density lipoprotein“
LOX	Lipoxygenáza
NTBI	„non transferrin bound iron“
OMIM	„online mendelian inheritance in man“
PANC	„pancreatic cell“
RNS	„reactive nitrogen species“
ROS	„reactive oxygen species“
RSS	„reactive sulphur species“
SLC	„solute carrier“
TfR1	Transferrin receptor 1



TfR1	Transferrin receptor 2
UV-Vis	Ultrafialovo-viditeľný

## 2. Úvod

Kumariny jsou skupinou heterocyklických sloučenin, které jsou v současné době velmi detailně zkoumány. Název těchto sloučenin je odvozen od *Coumarouna odorata* Willd. (syn. *Dipteryx odorata*, Fabaceae, Silovoň obecný), z kterého byl poprvé izolován samotný kumarin. Tyto sloučeniny jsou široce se vyskytujícími sekundárními metabolity, které lze nalézt nejen v řadě druhů rostlin, ale také v některých mikroorganismech a houbách.<sup>(1, 2)</sup>

Samotné studium kumarinů započalo již před více než 200 lety, přičemž v současné době tyto sloučeniny poutají pozornost mnoha odborníků po celém světě. Je to zejména díky jejich širokému spektru účinků jako např. protizánětlivých, antioxidačních, antikoagulačních, protinádorových a antivirových. Tyto látky rovněž patří mezi často užívaná aditiva v potravinářském a kosmetickém průmyslu, zejména díky jejich intenzivní vůni.<sup>(2)</sup>

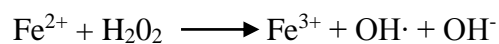
Kumariny vykazují strukturní variabilitu, která je závislá na rozličných substitucích základního kumarinového jádra. S těmito změnami jsou spojeny i významné rozdíly v biologické aktivitě jednotlivých zástupců. Předmětem výzkumu jsou kumariny nejen přírodního původu, ale také syntetické substance, které umožňují detailnější porozumění vztahů mezi chemickou strukturou a účinkem.<sup>(3)</sup>

Tato rigorózní práce je věnována bližší charakteristice železo-chelatačních vlastností 6,7-hydroxykumarinu, který vykazuje antioxidační účinky.<sup>(1, 3)</sup>

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Železo

Železo je nepostradatelným elementem v lidském těle. Tento prvek sehrává nezastupitelnou roli v řadě metabolických reakcí, např. při transportu kyslíku a syntéze DNA. Mezi esenciální vlastnosti železa patří schopnost přenášet elektrony a facilitovat katalytické reakce. Tyto reakce jsou umožněny oxidačně-redukčními vlastnostmi železa, které se běžně vyskytuje ve dvou oxidačních stavech, tj.  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Nicméně, tento prvek může katalyzovat nejen prospěšné, ale také toxické reakce. Jednou z nich je Fentonova reakce, která vede k tvorbě volných kyslíkových radikálů (Obr. 1). Při této reakci vzniká hydroxylový radikál, který je považován za jeden z nejškodlivějších biologických oxidantů.<sup>(4, 5)</sup>



Obr. 1 Fentonova reakce.

##### 3.1.1. Absorpce železa

Železo je do lidského těla přijímáno potravou jednak ve formě anorganických solí (zelenina a jiná rostlinná strava), ale také ve formě organické, tj. ferritin a hem (strava živočišná). Vstřebávání železa probíhá v tenkém střevě, zejména v duodenu, přičemž běžná lidská strava obsahuje 10-20 mg železa/den a vstřebatelnost tohoto prvku se pohybuje mezi 5-10 %.<sup>(6)</sup>

Před samotným transportem přes buněčnou membránu dochází k redukci  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  za účasti duodenálního cytochromu b. Následně je zredukovaný ion transportován přes apikální membránu enterocytů pomocí DMT1 („divalent metal transporter 1“), přičemž tento transportér se řadí do skupiny SLC („solute carrier“) přenašečů. V případě, že zdrojem železa je hem, dochází k jeho transportu do enterocytů zatím neznámou cestou, kdy je  $\text{Fe}^{2+}$  uvolněn za katalýzy HO-1 (hemoxygenáza-1).  $\text{Fe}^{2+}$  je následně transportován pomocí přenašeče ferroportinu do krevního řečiště, přičemž zároveň dochází k reoxidaci na  $\text{Fe}^{3+}$ , a vazbě na specifický transportní protein transferrin.<sup>(4)</sup>

### 3.1.2. Distribuce železa

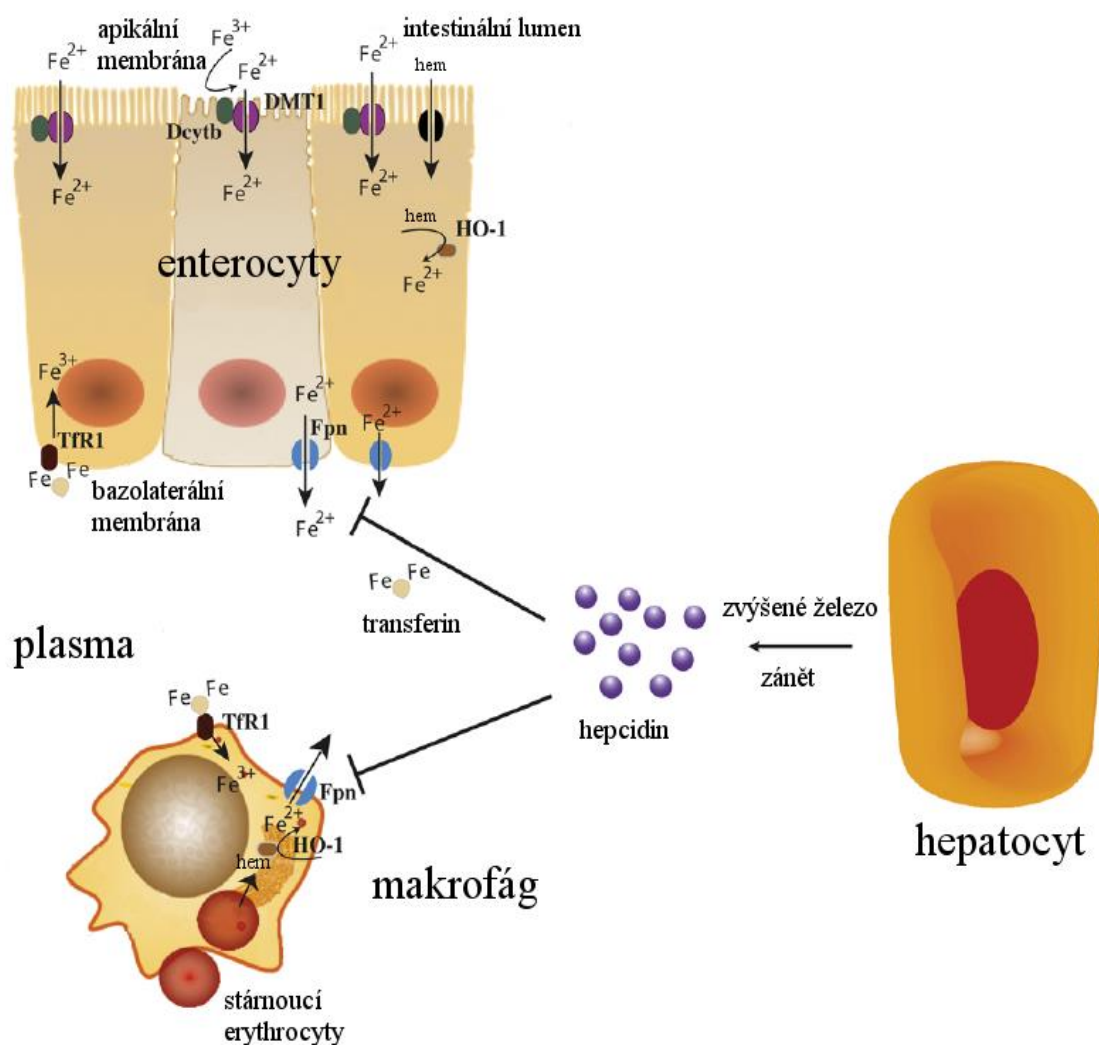
Celkové množství železa v těle dospělého člověka je přibližně 3,5-4 g. Nejvíce se nachází v hemoglobinu červených krvinek (přibližně 2,5 g), makrofázích (až 600 mg), myoglobinu svalové tkáně (až 300 mg) a v neposlední řadě také v játrech (1 g).<sup>(4, 6)</sup>

Jak již bylo diskutováno výše, železo se v organismu vyskytuje ve dvou oxidačních stavech, tj. ve ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a ferri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) formě. Ferro forma se vyskytuje v hemu, kdežto v zásobních a transportních proteinech je železo uskladněno ve ferri formě. Železo je distribuováno k jednotlivým orgánům ve vazbě na transferrin. Zásobní forma železa je vázána na ferritin a případně hemosiderin, což je degradační produkt ferritinu.<sup>(4, 6)</sup>

### 3.1.3. Metabolismus a regulace železa

Metabolismus tohoto prvku je tvořen uzavřeným systémem, v němž je většina železa rekonstituována a malé ztráty jsou doplněny potravou. Železo je vylučováno z organismu zejména exfoliací buněk gastrointestinálního traktu. U žen dochází k výraznějším ztrátám prostřednictvím menstruačního krvácení.<sup>(6)</sup>

Železo se do krevního řečiště dostává vstřebáváním z tenkého střeva, z hemoglobinu stárnoucích erytrocytů a uvolněním ze zásob (tj. ze sleziny, jater a kostní dřeně). Stárnoucí erytrocyty jsou fagocytovány makrofágy retikuloendoteliálního systému, které metabolizují hemoglobin a následně uvolňují železo do krve. Za fyziologických podmínek pochází 85-90 % železa právě z rozpadlých erytrocytů. Železo vytváří komplex s transferrinem a následně se tento komplex váže na receptory cílových buněk zejména kostní dřeně. Poté probíhá endocytóza a uvolnění železa do buněk. Naproti tomu, bílkovinná část transferrinu, tj. apotransferrin, se vylučuje z buňky exocytózou.<sup>(4, 6)</sup>



**Obr. 2** Metabolismus a regulace železa. DMT1 („divalent metal transporter 1“), Dcytb (duodenální cytochrom b), HO-1 (hemoxygenáza 1), TfR1 (transferin receptor 1), Fpn (ferroportin). Převzato a upraveno z Wang a Pantopoulos (2011).<sup>(4)</sup>

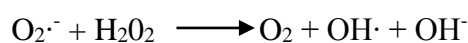
Kritickým bodem regulace homeostázy železa je sekrece tohoto prvku z enterocytů a makrofágů pomocí přenašeče ferroportinu, který je exprimován na krevních pólech těchto struktur (Obr. 2). Tento proces je regulován negativní zpětnou vazbou pomocí hepcidinu, což je peptidický hormon syntetizovaný v játrech, který svou vazbou na ferroportin inhibuje transport železa do krve. Syntéza tohoto hormonu je stimulována při vysokých hladinách železa a při zánětlivých stavech. Přítomnost hepcidinu snižuje hladiny železa v krevním řečišti, což má za následek sníženou dostupnost tohoto prvku, např. pro bakterie, které ho potřebují ke svému růstu.<sup>(4)</sup>

### 3.1.4. Železo nevázané na transferrin

Termínem „non transferrin bound iron“ (NTBI) je definováno volné železo přítomné v plazmě nebo séru, které není vázáno na transferrin a další struktury, např. hem, hemosiderin. V případě, že železo je ve vázané formě, jsou jeho toxické účinky významně redukovány.<sup>(7)</sup> V opačném případě je stimulována tvorba volných kyslíkových radikálů a následné poškození řady orgánových soustav. Za fyziologických podmínek se transferrin vyskytuje v plazmě ve velkém nadbytku a snadno váže volné ionty železa. Za těchto podmínek nepřesahují plazmatické hladiny volného železa 1 μmol/L. Ve většině případů takto nízké koncentrace nejsou ani detekovatelné jakýmkoliv zařízením. U pacientů trpících onemocněním spojeným s významným nadbytkem železa, např. thalasémie, hemochromatóza, je vazebná kapacita transferrinu vyčerpána, což vede k významnému nárůstu plazmatických hladin tohoto prvku. Na druhou stranu, existují případy, při kterých jsou detekovány zvýšené hladiny volného železa a zároveň nedochází k přesycení transferrinu. K těmto stavům se pojí řada hypotéz, přičemž mezi nejčastější odůvodnění těchto okolností se řadí vysoký příjem železa a neefektivní hospodaření s tímto prvkem.<sup>(7)</sup>

### 3.1.5. Patofyziologie železa

Progrese řady onemocnění je spjata s oxidačním stresem a tvorbou volných kyslíkových radikálů. Ionty železa jsou katalyzátory několika reakcí, jejichž výsledkem je tvorba volných radikálů. Bližší charakteristiku těchto chemických dějů popisují Fentonova a Haber-Weissova reakce (Obr. 1 a 3).



Obr. 3 Haber-Weissova reakce.

Bylo prokázáno, že volné železo podporuje oxidační reakce např. u aterosklerózy, akutních koronárních příhod či u diabetu mellitu.<sup>(7)</sup> Na druhou stranu, abnormální hladiny železa jsou spojeny s mnohými onemocněními jako thalasémie nebo hemochromatóza.<sup>(8)</sup>

#### 3.1.5.1. Ateroskleróza

Základní patogeneze aterosklerózy zahrnuje nevyvážený metabolismus lipidů a maladaptivní imunitní reakce, které jsou spojeny s chronickým zánětem arteriální stěny.

Progrese tohoto onemocnění vede ke zmenšení průsvitu zejména velkých tepen, což má za následek zhoršené prokrvení tkání a v nejzávažnějších případech může vést až k nekróze a poškození buněk.<sup>(9)</sup>

Spojitosť mezi vysokými hladinami železa a incidencí kardiovaskulárních chorob byla publikována již v roce 1981.<sup>(10)</sup> Železo se významnou měrou podílí na oxidaci LDL lipoproteinů, které se následně hromadí v endotelu velkých arterií. Takto oxidovaný LDL lipoprotein má jednak přímý cytotoxický účinek na buňky endotelu, ale také chemotakticky přitahuje monocyty, které se postupně transformují na makrofágy, čímž dochází k progresi onemocnění.<sup>(11)</sup>

### **3.1.5.2. Akutní koronární příhody**

Mezi akutní koronární příhody se řadí akutní infarkt myokardu a nestabilní angina pectoris, přičemž tyto onemocnění zároveň patří mezi akutní formy ischemické choroby srdeční (ICHS). Příčinou těchto akutních příhod je nejčastěji významné snížení průtoku krve koronárními arteriemi, které je v drtivé většině založeno na progresi aterosklerózy.<sup>(12)</sup>

V nedávné studii s 1701 analyzovanými subjekty se prokázala statisticky významná spojitosť mezi vysokými hladinami železa a mortalitou u koronárních příhod. Průměrná koncentrace iontů železa byla signifikantně vyšší u zemřelých než u přeživších (0,45 vs. 0,37  $\mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0.016$ ).<sup>(13)</sup>

### **3.1.5.3. Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus je nejčastěji charakterizován narušeným metabolismem základních živin. Tento jev je velice úzce spojen se zvýšenou hladinou glukózy a inzulínovou resistencí, přičemž oba tyto děje vybočují ze svých fyziologických mezí. Možné asociace mezi tímto onemocněním a zvýšenými hladinami železa byly poprvé pozorovány u pacientů s vrozenou hemochromatózou.<sup>(7, 14)</sup>

Přesný mechanismus vlivu železa v patogenezi diabetu je stále nejasný, nicméně řada odborníků se shoduje na několika možných hypotézách. Mezi nejdiskutovanější patří vliv železa na oxidační stres, který navozuje apoptózu pankreatických ostrůvků. Destrukci těchto struktur dochází k významnému snížení hladin insulínu. K rychlému poškození pankreatických ostrůvků negativně rovněž přispívá zvýšená exprese DMT transportérů, což je spojeno s vyšší koncentrací volného železa v těchto strukturách.<sup>(7, 14)</sup>

Další z hypotéz popisuje významně zvýšenou prevalenci insulinové resistance u pacientů trpících thalasemií nebo hemochromatózou.<sup>(14)</sup>

### 3.1.5.4. Vrozená hemochromatóza

Hemochromatóza je charakterizována hromaděním toxických koncentrací železa v parenchymatických buňkách jater, srdce, a endokrinních žláz. Patogeneze tohoto onemocnění je založena na mutaci genů, které ovlivňují vstup železa do krevního řečiště.<sup>(15)</sup>

Podle „Online Mendelian Inheritance in Man“ (OMIM) jsou v současné době definovány 4 typy vrozené hemochromatózy (Tab. 1).

Forma	Klasická hemochromatóza	Juvenilní vrozená hemochromatóza		TfR2 vrozená hemochromatóza	Přesycení ferroportinu
<b>OMIM klasifikace</b>	Typ 1	Typ 2, subtyp A	Typ 2, subtyp B	Typ 3	Typ 4
<b>Postižený gen</b>	HFE	HJV	HAMP	TfR2	SLC40A1
<b>Postižené struktury</b>	HFE	Hemojuvelin	Hepcidin	Transferrin receptor 2	Ferroportin
<b>Funkce struktury</b>	Facilitace vychytávání železa vázaného na transferrin, modulace exprese hepcidinu	Modulace exprese hepcidinu	Down-regulace uvolňování železa z enterocytů a makrofágů	Vychytávání železa na povrchu hepatocytů	Uvolňování železa z enterocytů, makrofágů nebo hepatocytů
<b>Dědičnost</b>	Autosomálně recesivní	Autosomálně recesivní	Autosomálně recesivní	Autosomálně recesivní	Autosomálně dominantní
<b>Postižení orgánů</b>	Různé	Vysoké	Vysoké	Různé	Nízké
<b>Období rozvoje</b>	Čtvrtá nebo pátá životní dekáda	Druhá až třetí životní dekáda	Druhá až třetí životní dekáda	Čtvrtá nebo pátá životní dekáda	Čtvrtá nebo pátá životní dekáda

**Tab. 1:** „Hepcidin antimicrobial peptide“ (HAMP), „human hemochromatosis protein“ (HFE), hemojuvelin (HJV), „solute carrier“ (SLC), „transferrin receptor 2“ (TfR2). Přehled typů vrozené hemochromatózy podle OMIM. Převzato a upraveno z Pietrangelo (2010).<sup>(16)</sup>

Při mutaci jednotlivých genů dochází k rozvoji příslušného typu hemochromatózy, přičemž existují i takové případy, při kterých dochází k mutacím více genů najednou. Při mutaci genu HFE („human hemochromatosis protein“) nebo TfR2

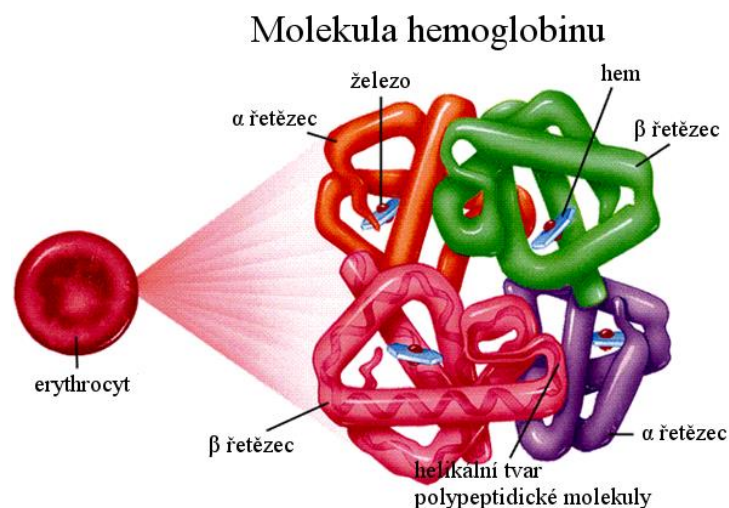


(„transferrin receptor 2“) dochází ke zvýšenému uvolňování železa do krevního řečiště, které je kompenzováno sekrecí hepcidinu, na jehož expresi se významně podílejí geny HJV (hemojuvelin) a HAMP („hepcidin antimicrobial peptide“). Díky těmto skutečnostem dochází při mutaci HFE nebo Tfr2 k pozvolnější kumulaci železa v jednotlivých tkáních. Pokud dojde k mutaci HJV nebo HAMP, množství hepcidinu v krvi je významně sníženo a kumulace železa je podstatně rychlejší. Mutace SLC40A1 genu vede ke snížené expresi ferroportinu, což má za následek sníženou regulační schopnost hepcidinu.<sup>(16)</sup>

Ve více než 80 % případů hemochromatózy se jedná o mutaci HFE genu. U bělošské populace severní Evropy je prevalence této mutace výrazně vyšší než např. u Jihoevropanů, Asiatů či u černošské populace. Zbýlých 20 % je tvořeno ostatními typy hemochromatózy, přičemž tyto choroby jsou rozšířeny v různých částech světa, bez ohledu na rasový původ.<sup>(16)</sup>

### 3.1.5.5. Thalasémie

Thalasémie je vrozené onemocnění, při němž je narušena tvorba bílkovinných součástí krevního barviva hemoglobinu. Globinová část hemoglobinu se skládá ze dvou typů proteinových struktur –  $\alpha$  a  $\beta$ . Tyto struktury jsou v globinové části zastoupeny v párech a dohromady tvoří tetramerní strukturu s hemovou skupinou ve svém středu (Obr. 4).<sup>(17)</sup>



**Obr. 4:** Struktura hemoglobinu. Převzato a upraveno z Ghodekar a Grampurohit (2010).<sup>(17)</sup>

V případě, že je narušena syntéza jednoho z těchto dvou řetězců, dochází k tvorbě patologických forem globinové části a k významným změnám ve struktuře, což má za

následek sníženou afinitu kyslíku k hemoglobinu a zároveň sníženou dodávku kyslíku do okolních tkání a orgánů. Podle postižení jednotlivých řetězců je toto onemocnění definováno jako  $\alpha$ - či  $\beta$ -thalasémie.<sup>(17)</sup>

Syntéza  $\alpha$ -řetězce je kódována čtyřmi geny, přičemž v případě že jeden či více genů neplní svou funkci, dochází k rozvoji thalasémie. V současné době jsou rozlišovány dvě klinicky významné formy  $\alpha$ -thalasémie. První je Hb Bartův fetální hydropsový syndrom a druhou je HbH onemocnění.<sup>(17, 18)</sup>

U prvního případu jsou postiženy všechny 4 geny kódující  $\alpha$ -řetězec. Při rozvoji této choroby dochází k nadměrnému hromadění tekutin v plodu před narozením, anémií, zvětšení jater a sleziny, srdečním postižením nebo urogenitálním potížením. Anemické edematózní děti umírají v děloze v posledním trimestru nebo časně po porodu. Hb Bartův fetální hydropsový syndrom je neléčitelná choroba, které se dá předejít včasnou diagnózou v prenatálním období. Toto onemocnění je nejčastěji detekováno mezi 22. a 28. týdnem těhotenství při běžném sonografickém vyšetření.<sup>(18)</sup>

HbH onemocnění navozuje mírné až středně těžké anémie, zvětšení jater a sleziny, mírnou hepatitidu a v některých případech také kosterní změny. Příznaky tohoto onemocnění se nejčastěji projevují v brzkém dětství a postižení pacienti se většinou dožívají dospělosti. Tato choroba se klinicky projevuje při postihu tří ze čtyř genů kódujících  $\alpha$ -řetězec.<sup>(18)</sup>

Oproti  $\alpha$ -řetězci,  $\beta$ -řetězec je kódován 2 geny. Postižení těchto genů navozuje  $\beta$ -thalasémii, při které dochází k nedostatečné syntéze  $\beta$ -řetězce globinu. Při nízké tvorbě  $\beta$ -globulinu dochází k hromadění  $\alpha$ -globulinu, protože ne všechny nasyntetizovaný  $\alpha$ -globulin se využije k párování s  $\beta$ -řetězcem. Přebytečný  $\alpha$ -globulin se formuje do tzv. inkluzí, které vedou k poškození erytroidních prekurzorů v kostní dřeni a ve slezině, což způsobuje neefektivní tvorbu červených krvinek.  $\beta$ -thalasémie je rozlišována na 2 základní formy.<sup>(17, 19)</sup>

První, závažnější forma – thalasémie major, je charakterizována rozvojem většinou během prvních dvou let života. S tímto onemocněním jsou spojeny zpomalený růst, problémy s příjmem potravy, bledost, hepatitida, průjmy, zvětšení sleziny, atd. Včasná diagnóza tohoto onemocnění vede k léčbě krevními transfuzemi, která je částečně schopna minimalizovat některé symptomy. U pacientů, kteří jsou dostatečně zaléčeni transfuzemi, dochází v období okolo 11 roku k rozvoji systémových komplikací. Paradoxně, tato léčba vede k hromadění železa v organismu, s čímž jsou spojeny právě systémové poškození srdce, jater a endokrinních žláz. Současná léčba krevními

transfuzemi je doplněna chelatační terapií, která minimalizuje toxické účinky volného železa na parenchymatické orgány.<sup>(19)</sup>

U druhé, méně závažné formy – thalasémie intermedia, se první příznaky objevují v brzkém dětství nebo později během dospělosti. Klinické příznaky zahrnují hepatitidu, zvětšení jater a sleziny, cholelithiázu nebo různé kostní změny zahrnující osteoporózu či osteopenii. Ve většině případů se pacienti neléčí krevními transfuzemi. Vysoké hladiny volného železa jsou způsobeny zvýšenou absorpcí železa z gastrointestinálního traktu, což je spojeno s nedostatkem hepcidinu, který sehraává významnou roli v homeostáze železa. V některých případech se mohou objevit systémové komplikace, které mohou dosahovat stejné závažnosti jako u dostatečně léčených pacientů trpících thalasémií major.<sup>(19)</sup>

## **3.2. Chelátory železa užívané v klinické praxi**

### **3.2.1. Deferoxamin**

Při dlouhodobé léčbě krevními transfuzemi může docházet k hromadění volného železa v krevním řečišti. U takových onemocnění je důležité ke krevním transfuzím zařadit i chelatační terapii, která je schopna minimalizovat toxické účinky železa.

Prvním užívaným léčivem byl deferoxamin (DFO), který byl vyvinut před více než čtyřiceti lety a byl doslova etalonem v léčbě. Toto léčivo je efektivním nástrojem pro snížení plazmatických hladin volného železa a zároveň pro prevenci endokrinních a kardiovaskulárních komplikací. Z fyzikálně-chemických vlastností, DFO chelatuje železo v chelatačním poměru 1:1. Dále, kvůli vysoké molekulové hmotnosti a vysoce hydrofilním vlastnostem, špatně proniká do většiny buněk, s výjimkou hepatocytů. Po perorálním podání se také velmi špatně vstřebává a jeho biodostupnost je velmi nízká. Z toho plyne nutnost pomalého intravenózního nebo subkutánního podání po dobu 8-12 hodin 5-7 dní v týdnu. Díky těmto vlastnostem je compliance pacientů k této léčbě poměrně nízká, odhaduje se na 60 až 80 %.<sup>(20)</sup>

Výše zmíněné nevýhody DFO vedly k výzkumu vhodnějších perorálních chelátorů železa.<sup>(20)</sup>

### **3.2.2. Deferipron**

Po dlouhém čekání byl v roce 1999 poprvé schválen Evropskou lékovou agenturou deferipron (DFP), který se používá pro léčbu pacientů, u kterých je léčba

deferoxaminem nedostatečná nebo kontraindikovaná.<sup>(21)</sup> Toto léčivo je schopno chelatovat železo a zároveň pronikat do kardiomyocytů a makrofágů. Dále, napomáhá transportu železa z extracelulárních prostorů do mitochondrií a buněčných jader a v neposlední řadě mobilizuje železo z buněk přetížených železem do kostní dřeně, kde dochází k syntéze hemu.<sup>(20)</sup>

DFP se užívá perorálně, nejčastěji 3x denně, pokud se používá v monoterapii. Avšak, řada odborníků a studií se shodují na významném aditivním efektu dvojkombinace DFP s DFO. Předpokládá se, že volné železo je nejprve chelatováno prvním jmenovaným v místech, kam DFO velmi špatně proniká a následně DFP poskytuje volné železo DFO.<sup>(20)</sup>

### **3.2.3. Deferasirox**

Deferasirox (DFX) je perorální chelátor železa indikovaný u pacientů s  $\beta$ -thalasémií major s chronickým přetížením železem s častými transfuzemi krve ve věku od 6 let. Toto léčivo se také užívá v případech, kdy je léčba deferoxaminem kontraindikována nebo nevhodná. DFX byl poprvé schválen Evropskou lékovou agenturou v roce 2006.<sup>(20, 22)</sup>

DFX je dalším perorálním chelátorem železa, indikovaným při stavech spojených s potransfuzním přetížením železem. Nejčastěji se denní dávka pohybuje v rozmezí 20-30 mg/kg. Schválenou lékovou formou jsou dispergovatelné tablety, které se rozpouštějí ve sklenici vody, pomerančového nebo jablečného džusu (100-200 ml), dokud se nevytvoří jemná suspenze. Plazmatický poločas DFX se pohybuje mezi 11-19 hodinami. Díky těmto vlastnostem je DFX velmi dobře tolerován a compliance pacientů k léčbě v mnoha případech přesahuje 80 %.<sup>(20)</sup>

V řadě studií byla prokázána efektivita a bezpečnost tohoto léčiva užívaného monoterapeuticky při stavech spojených s přetížením železem.<sup>(23, 24)</sup> V současné době, není úplně jasně prokázán aditivní či synergický efekt dvojkombinace DFX s DFO.<sup>(20)</sup> U některých zvířecích modelů se tato účinnost nepodařila prokázat.<sup>(25)</sup> Na druhou stranu, existují různé studie či jednotlivá hlášení, tvrdící přesný opak.<sup>(26, 27)</sup>

### **3.2.4. Dexrazoxan**

Dexrazoxan je dalším významným chelátorem železa užívaným v klinické praxi. Oproti výše zmíněným léčivům, dexrazoxan je indikován k léčbě extravazace a kardiotoxicity navozené anthracykliny. Extravazace je definována jako únik látky

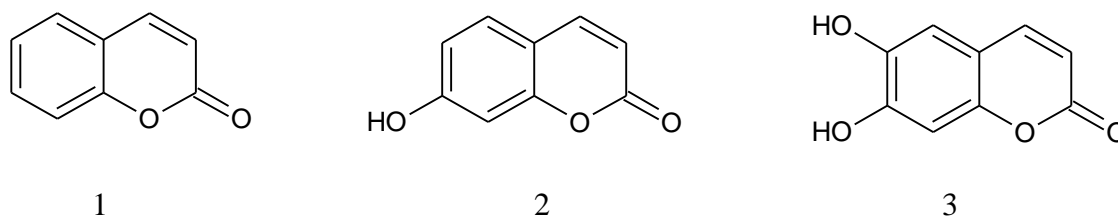
(cytostatika) z cévy nebo nechtěná aplikace látky do tkáně. Při extravazaci anthracyklinů dochází k závažnému poškození okolních tkání. V případě neléčené extravazace může dojít k nekróze či ztrátě funkce daných tkání či orgánů.<sup>(28, 29)</sup>

Anthracykliny jsou cytostatika indikována pro léčbu řady nádorových onemocnění. Jejich nebezpečí tkví zejména v navozené kardiotoxicitě, která je způsobena enzymatickou redukcí části jejich skeletu. Výsledkem těchto degradačních dějů je tvorba hydroxylového radikálu. Druhá, neenzymatická cesta vzniku volných radikálů, je navozena konjugací anthracyklinů s volnými ionty železa v buněčném prostoru. Dexrazoxan je schopen chelatovat volné ionty železa, čímž je snížen železo-dependentní oxidační stres.<sup>(29, 30)</sup>

### 3.3. Kumariny

Kumariny jsou fenolické sloučeniny vyskytující se jako sekundární metabolity v řadě rostlin, bakterií a hub. V současné době již bylo identifikováno více než 1300 zástupců. I přes nepřebornou variabilitu účinku, jejich přesný význam v rostlinách je nejasný. Předpokládá se, že hlavní úlohu sehrávají jako regulátory růstu, bakteriostatické, fungistatické nebo dokonce i jako odpadní produkty. Kumariny se nejčastěji nacházejí v semenech, plodech, kořenech a listech rostlin patřících do různých čeledí, např.: Rutaceae, Apiaceae, Clusiaceae, Caprifoliaceae.<sup>(31, 32)</sup>

Základní struktura je tvořena benzopyranovým kruhem, přičemž nejjednodušší zástupce, který dal jméno celé skupině těchto sloučenin, kumarin, obsahuje keto skupinu v poloze 2 benzopyranového skeletu (Obr. 5).<sup>(31, 32)</sup>



**Obr. 5:** Kumarin (1) a některé jeho deriváty vyskytující se v rostlinách. Umbeliferon (2) (7-hydroxycoumarin), esculetin (3) (6,7-dihydroxycoumarin).

#### 3.3.1. Toxicita

Kumariny jsou metabolizovány prostřednictvím cytochromu P450 (CYP 450), kdy dochází k následujícím procesům: epoxidace v pozicích C-3 a C-4, za tvorby kumarin-3,4-epoxidu, a hydroxylace v poloze 7 základního skeletu. Degradací produkt

obsahující epoxidickou skupinu může být buď konjugován s glutathionem, čímž jsou jeho toxické účinky eliminovány, nebo může dojít k další metabolizaci na *ortho*-hydroxyfenyl acetaldehyd, kterému je přisuzována hepatotoxická aktivita. Bylo rovněž zjištěno, že tento proces probíhá u lidí pouze minimálně, a to i v případě deficiencie 7-hydroxylace.<sup>(1)</sup>

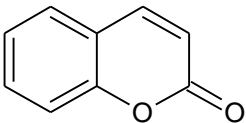
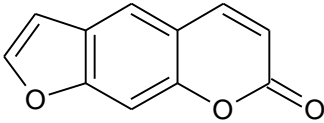
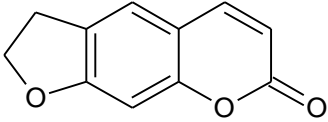
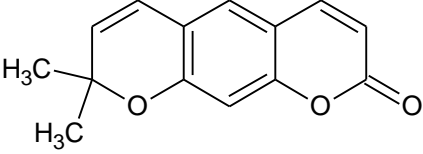
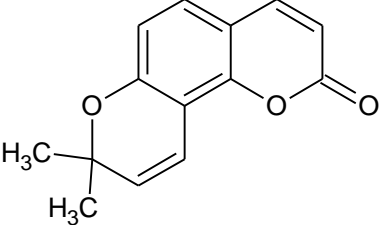
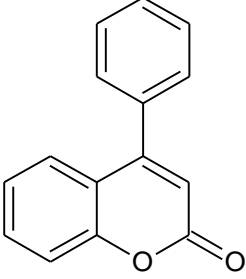
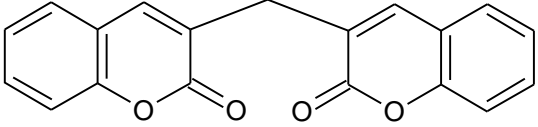
Podstata a důkazy hepatotoxicity kumarinů jsou detailně zkoumány a všechny okolnosti spojené s tímto stavem nejsou dosud úplně objasněny. U některých jedinců byla dokonce pozorována zvýšená náchylnost k toxickému působení kumarinů. Předpokládá se, že zvýšené hladiny gamma glutamyl transferázy (GGT) a předešlé epizody hepatitidy by mohly být klasifikovány jako rizikové faktory.<sup>(1)</sup>

Jedna z cest, která vede k omezení škodlivých účinků těchto sloučenin, je příprava syntetických derivátů s výhodnějšími vlastnostmi. Zajímavými jsou např. 4-methylderiváty, u kterých právě methyl skupina blokuje degradaci kumarinů na epoxidické deriváty.<sup>(1)</sup>

### **3.3.2. Klasifikace**

#### **3.3.2.1. Přírodní kumariny**

V současné době je identifikováno přibližně 300 přírodních kumarinů. Nejčastěji jsou klasifikovány podle základní struktury do 6 následujících skupin: jednoduché kumariny, furanokumariny, dihydrokumariny, pyranokumariny, fenylkumariny a biskumariny. Fyzikálně-chemické vlastnosti a biologická aktivita jsou úzce spjaty s jejich chemickou strukturou (Tab. 2).<sup>(32)</sup>

Typ	Základní chemická struktura	Zástupce	Farmakologický účinek
Jednoduché kumariny		Kumarin Esculetin Fraxin Umbeliferon	Protizánětlivý Cytostatický Antioxidační Antiadipogenní Neuroprotektivní Antiadipogenní Antioxidační Antituberkulotický
Furanokumariny		Psoralen Bergapten	Antimykotický Antituberkulotický Antituberkulotický
Dihydrofuranokumariny		Anthogenol	Antibakteriální
Pyranokumariny – lineární typ		Grandvittin	Antibakteriální
Pyranokumariny – angulární typ		Inophyllin A, B, C, E, P, G1, G2	Antivirotický
Fenylkumariny		Isodispar B, dispariol B	Neznámý
Biskumariny		Dikumarol	Antikoagulační

**Tab. 2:** Klasifikační přehled přírodních kumarinů. Převzato a upraveno z Venugopala a Rashmi (2013).<sup>(32)</sup>

### 3.3.2.2. Syntetické kumariny

Mezi syntetické kumariny se řadí mnoho sloučenin, které vycházejí ze svých přírodních předloh. K typickým příkladům patří již výše diskutované 4-methylderiváty, u nichž bylo dosaženo významného snížení toxicity. Tyto syntetické sloučeniny nejsou schopny vazby na CYP 450, čímž je znemožněna tvorba epoxidických derivátů.<sup>(33)</sup>

K dalším významným syntetickým sloučeninám se řadí 3-fenylkumariny, 3-ethoxycarbonylethylkumariny, 3-ethoxycarbonylmethylkumariny, 4-hydroxy-bis-kumariny a další.<sup>(1)</sup>

### 3.3.3. Farmakologické účinky kumarinů

#### 3.3.3.1. Antioxidační

Zajímavou vlastností kumarinů je jejich antioxidační aktivita. K pro-oxidantům se řadí volné radikály, které jsou definovány jako atomy, molekuly nebo ionty s alespoň jedním nepárovým elektronem, které mají vysoký potenciál reagovat s okolními molekulami. Volné radikály jsou součástí skupin reaktivních forem kyslíku (ROS – „reactive oxygen species“), dusíku (RNS – „reactive nitrogen species“) a síry (RSS – „reactive sulphur species“). ROS zahrnují volné radikály jako např. superoxidový radikál  $O_2^{\cdot-}$ , perhydroxylový radikál  $HO_2^{\cdot}$ , hydroxylový radikál  $OH^{\cdot}$  a další. V organismech jsou vyvinuty antioxidační mechanismy založené na vychytávacích, chelatačních a enzymatických aktivitách, které vedou k neutralizaci těchto radikálů. Antioxidantem může být molekula, která je schopná přijmout či darovat alespoň jeden elektron danému radikálu, čímž dojde k jeho neutralizaci. V některých případech se molekuly antioxidantu mohou přeměnit na jiný méně aktivní a méně nebezpečný radikál.<sup>(3)</sup>

Pro vychytávací aktivitu se jako naprosto zásadní jeví přítomnost dvou hydroxylových skupin v *ortho* postavení na kruhu A. Mezi nejúčinnější deriváty se řadí 6,7-dihydroxykumariny a 7,8-dihydroxykumariny. U 7,8-dihydroxy derivátů se aktivita může ještě zvýšit díky substituci karboxylovou skupinou v poloze 5 základního skeletu. Při substituci kruhu A hydroxylovými skupinami v poloze *meta*, dochází k výraznému snížení antioxidační aktivity.<sup>(1)</sup>

Chelatačně aktivní kumariny jsou často i velmi dobrými sloučeninami vychytávajícími volné radikály (tj. scavengery). Pro chelataci iontů železa je zásadní přítomnost *ortho*-dihydroxy nebo *ortho*-diacetoxy skupin na kruhu A. Kumariny s pouze



methoxylovými skupinami, jednou hydroxylovou nebo dvěma hydroxylovými či acetoxylovými skupinami v poloze *meta*, vykazují pouze zanedbatelnou schopnost chelátovat ionty železa. Na druhou stranu, jak již bylo diskutováno výše, kumariny jsou schopny redukovat  $\text{Fe}^{3+}$  ionty na  $\text{Fe}^{2+}$ . Zreduované  $\text{Fe}^{2+}$  se účastní známé Fentonovy reakce, jejímž produktem je hydroxylový radikál (Obr. 1).

K správné interpretaci antioxidačních vlastností kumarinů je nutné přiřadit další parametr, kterým je koncentrační poměr mezi ionty kovu a kumarinu. Tento parametr byl předmětem výzkumu u dihydroxymethylkumarinů, kdy při nízkých koncentračních poměrech kumarin:ionty železa, docházelo jen k zanedbatelné chelataci. Naproti tomu při nadbytku kumarinů v koncentračních poměrech s ionty železa byla pozorována významná chelatace iontů tohoto kovu za tvorby stabilního komplexu. Zároveň bylo zjištěno, že redukce  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  byla významně omezena. Naopak při zkoumání méně účinných chelátorů železa, např. diacetoxy-4-methylkumarin, bylo zpozorováno, že při vzrůstajících koncentracích kumarinu, dochází k minimální chelataci a významné redukci iontů tohoto kovu.<sup>(1)</sup>

V poslední řadě jsou kumariny schopny interagovat s řadou enzymů podílejících se na tvorbě volných radikálů. Strukturní vlastnosti a vazba jednotlivých zástupců na enzymy se výrazně liší a v některých případech nejsou specifické strukturní vlastnosti substrátů jasně popsány. K významným inhibitorům xanthinoxidázy, lipooxygenázy (LOX) a cyklooxygenázy (COX) se řadí esculetin (6,7-dihydroxykumarin). LOX a COX jsou poměrně významně inhibovány také dalšími deriváty 6,7-dihydroxykumarinu (např. 4-methylesculetin) a 7,8-dihydroxykumarinu (např. daphnetin).<sup>(1)</sup>

Z farmakologického hlediska je antioxidační aktivita esculetinu zprostředkována mnohými mechanismy. K dalším faktům potvrzujícím účinky této sloučeniny se řadí např. studie s 21 sloučeninami izolovanými z rostlin, ve které byl esculetin vyhodnocen jako nejúčinnější vychytávač DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) a hydroxylového radikálu. V této studii byl také zaznamenán inhibiční účinek esculetinu na peroxidaci lipidů, přičemž výsledný efekt tohoto kumarinu byl významně vyšší než u  $\alpha$ -tokoferolu.<sup>(3)</sup>

34)

### 3.3.3.2. Ostatní účinky kumarinů

Kumariny jsou různorodou skupinou sloučenin s širokou sférou farmakologických účinků.

K velice známým zástupcům se řadí dikumarol, který vykazuje antikoagulační aktivitu. Tato sloučenina dala strukturní základ dodnes užívanému warfarinu, který je i přes značné nevýhody stále jedním z nejužívanějších léčiv v léčbě onemocnění spojených s trombotickými stavy. Dikumarol působí jako inhibitor vitamin K reductázy, přičemž redukovaná forma vitaminu K je důležitá k syntéze funkčních koagulačních a antikogulačních faktorů.<sup>(32)</sup>

U řady kumarinů byla také zjištěna významná antibakteriální aktivita. U sloučenin s rozsáhlými uhlovodíkovými substituenty, jako např. ammosesinol a ostrutin byla zjištěna aktivita proti G<sup>+</sup> bakteriím. U methylkumarinů a methoxykumarinů, s methyl či methoxy skupinou v poloze 6 či 7, byla prokázána antibakteriální aktivita proti *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>(32, 35)</sup>

K dalším zajímavým účinkům těchto sloučenin patří antivirotická aktivita. Některé kumariny jsou schopny působit jako nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy viru HIV-1. Z přírodních zástupců se jedná zejména o polycyklické sloučeniny patřící do dvou hlavních skupin: kalanolidů a inophyll. Tyto sloučeniny pochází z tropických stromů čeledi Calophyllaceae. Při *in vitro* testech byla prokázána účinnost těchto sloučenin i proti zmutovaným formám reverzní transkriptázy HIV-1, což přisuzuje těmto sloučeninám obrovský potenciál.<sup>(36)</sup>

V neposlední řadě byla u kumarinů zjištěna cytostatická aktivita. V současné době probíhá detailní zkoumání těchto sloučenin v různých indikacích, mezi něž patří např. nádorové onemocnění pankreatu. Angelmarin, izolovaný z *Angelica pubescens* (Apiaceae) vykazoval přímou cytotoxickou aktivitu proti pankreatickým rakovinným buňkám PANC-1. Ze struktury angelmarinu byli odvozeny další syntetické deriváty s významnou cytotoxickou aktivitou.<sup>(37)</sup>

## 4. Cíl práce

Cílem této práce byla experimentální analýza chelatačních vlastností 6,7-dihydroxykumarinu při různých pH (4,5, 5,5, 6,8 a 7,5) pomocí kompetitivní a přímé UV-Vis spektrometrie.

## **5. Materiál a metody**

### **5.1. Přímá UV-Vis spektrometrie**

#### **5.1.1. Vybavení**

Všechny vzorky byly měřeny UV-Vis spektrofotometrem HELIOS GAMMA (ThermoScientific Inc., USA). Zaznamenání absorpčních spekter bylo umožněno pomocí VISIONlite softwaru (verze 2.2, ThermoScientific Inc., USA). Vzorky byly měřeny v polystyrenových nebo UV-Vis kyvetách (BrandTech Scientific Inc., Velká Británie). Během měření byly využity analytické váhy KERN ALT-220 4NM (Kern, Německo).

#### **5.1.2. Chemikálie**

6,7-dihydroxykumarin (67DHC), heptahydrát síranu železnatého, hexahydrát chloridu železitého, vínan železitý, hydroxylamin hydrochlorid, sodná sůl kyseliny 3-(2-pyridyl)-5,6-difenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonové kyseliny (ferrozin), octan sodný, kyselina octová, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) a sodná sůl HEPES kyseliny byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Německo). Methanol byl zakoupen od firmy J.T.Baker (Avantor Performance Materials Inc., USA). Ultračistá voda byla získána pomocí přístroje Milli-Q RG od firmy Merck Millipore (USA).

#### **5.1.3. Kalibrace iontů železa**

Kalibrace iontů železa byla provedena podle standardizovaného postupu.<sup>(5)</sup> Před každým experimentem byla koncentrace iontů železa v připraveném zásobním roztoku ověřena pomocí ferrozinu. Tato sloučenina vytváří s ionty železa stabilní fialové komplexy s absorpčním maximem při vlnové délce 562 nm. Pro kalibraci železitých iontů bylo přidáno redukční činidlo hydroxylamin, které zredukovalo železité ionty na železnaté, a jejich koncentrace se následně stanovila pomocí ferrozinu.<sup>(5)</sup>

#### **5.1.4. Ionty železa a pH prostředí**

Hodnocení stechiometrie bylo provedeno při čtyřech různých patofyziologicky významných hodnotách pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Pro obě nižší pH, byl použit 15 mM octanový pufr, kdežto pro pH 6,8 a 7,5 byl použit HEPES pufr. Z důvodu zvýšené oxidace železnatých iontů při pH 7,5, byl přidán k HEPES pufru hydroxylamin ve finální

koncentraci 5 mM. Při měření chelatace železitých iontů při pH 7,5, byl použit HEPES pufr bez hydroxylaminu. Z důvodu špatné rozpustnosti železitých iontů v reakční směsi byly pro měření chelatace železitých iontů použity dvě soli, tj. hexahydrát chloridu železitého a vínan železitý. Hexahydrát chloridu železitého byl použit pro pH 4,5 a 5,5 a vínan železitý pro pH 6,8 a 7,5.<sup>(5)</sup>

### **5.1.5. Hodnocení absorpčního maxima**

Nejprve byla změřena absorpční spektra 67DHC od 220 do 800 nm. Dále se určila vlnová délka absorpčního maxima 67DHC ( $\lambda_{Smax}$ ) při všech měřených hodnotách pH. Molární absorpční koeficient testované látky ( $\epsilon_S$ ) byl spočítán podle Lambert-Beerova zákona. Stejně jako u substance, se určila vlnová délka absorpčního maxima vytvořených komplexů ( $\lambda_{Cmax}$ ) a molárního absorpčního koeficientu ( $\epsilon_C$ ). Tato spektra byla měřena při různých koncentračních poměrech od 1:6 do 1:10 (testovaná látka:železo). Slepý vzorek se skládal z pufru a rozpouštědla (methanol) v poměru 2:1 (pufr:rozpouštědlo).<sup>(5)</sup>

### **5.1.6. Jobova metoda**

K určení stechiometrie probíhajících reakcí byla v této práci použita Jobova metoda, jejíž základní princip spočívá v konstantní celkové molární koncentraci dvou reagentů, přičemž poměry molárních koncentrací se mění v rámci série vzorků.

Vodný roztok železitých nebo železnatých iontů byl po dobu 3 minut míchán s methanolickým roztokem testovaného 67DHC v různých koncentračních poměrech od 0,25:1 do 6:1 (testovaná látka:železo) a následně změřen. Takto se změřila absorpční spektra při všech čtyřech hodnotách pH. Slepý vzorek se skládal z pufru a rozpouštědla v poměru 2:1 (pufr:rozpouštědlo).<sup>(5)</sup>

### **5.1.7. Statistická analýza**

Všechna měření probíhala dvakrát za užití dvou různých zásobních roztoků. Data jsou vyjádřena jako průměr se směrodatnou odchylkou.

## **5.2. Kompetitivní spektrometrie**

### **5.2.1. Vybavení**

Všechny vzorky byly měřeny spektrofotometrem pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA). Vzorky byly měřeny v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Během měření byly využity analytické váhy KERN ABT120-5DM (Kern, Německo) a třepačka pro mikrotitrační destičky IKA® MS 3 (IKA, Německo).

### **5.2.2. Chemikálie**

6,7-dihydroxykumarin (67DHC), heptahydrát síranu železnatého, hexahydrát chloridu železitého, hydroxylamin hydrochlorid, sodná sůl kyseliny 3-(2-pyridyl)-5,6-difenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonové kyseliny (ferrozin), octan sodný, kyselina octová, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES), sodná sůl HEPES kyseliny a dimethylsulfoxid (DMSO) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Německo).

### **5.2.3. Kalibrace iontů železa**

Kalibrace iontů železa byla provedena podle standardizovaného postupu.<sup>(38)</sup> Před každým experimentem byla koncentrace iontů železa v připraveném zásobním roztoku ověřena pomocí ferrozinu. Tato sloučenina vytváří s ionty železa stabilní fialové komplexy s absorpčním maximem při vlnové délce 562 nm. Pro kalibraci železitých iontů bylo přidáno redukční činidlo hydroxylamin, které zredukovalo železité ionty na železnaté a jejich koncentrace se následně stanovila pomocí ferrozinu.<sup>(38)</sup>

### **5.2.4. Ionty železa a pH prostředí**

Hodnocení chelatace železnatých iontů bylo provedeno při čtyřech různých patofyziologicky významných hodnotách pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Pro obě nižší pH, byl použit 15 mM octanový pufr, kdežto pro pH 6,8 a 7,5 byl použit HEPES pufr. Dále, z důvodu zvýšené oxidace železnatých iontů při pH 7,5, byl do reakční směsi přidán hydroxylamin. Chelatace železitých iontů se měřila jen při pH 4,5, přičemž se k reakční směsi přidal hydroxylamin, který zredukoval železité ionty na železnaté, a tyto zredukované ionty byly předmětem měření. Zdrojem železnatých iontů byl heptahydrát

síranu železnatého, kdežto pro měření železitých iontů byl použit hexahydrát chloridu železitého.<sup>(38)</sup>

### **5.2.5. Postup a hodnocení chelatace a redukce**

Při měření chelatace bylo do všech jamek mikrotitračních destiček napipetováno: pufr, methanolický roztok 67DHC nebo methanol (kontrola), vodný roztok hydroxylaminu (jen pro:  $\text{Fe}^{2+}$  – pH 7.5;  $\text{Fe}^{3+}$  – pH 4.5), vodný roztok iontů železa a vodný roztok ferrozinu (testovací jamky) nebo voda. Destička se protřepala po dobu 2 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nebo 3 minut ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ihned po přidání ferrozinu, a následně po 5 minutách, se změřila absorbance vzorků při 562 nm. Z hodnot absorbancí po 5 minutách se vypočítala výsledná chelatační aktivita 67DHC.<sup>(38)</sup>

Dále, při měření redukce železitých iontů bylo do jamek mikrotitrační destičky napipetováno: pufr, methanolický roztok 67DHC nebo vodný roztok hydroxylaminu (pozitivní kontrola), vodný roztok železitých iontů a vodný roztok ferrozinu (testovací jamky) nebo vody. Následně, stejně jako u chelatace, se změřila absorbance při 562 nm ihned po přidání ferrozinu a po 5 minutách. Z hodnot absorbancí po 5 minutách se vyjádřila redukční aktivita.<sup>(38)</sup>

### **5.2.6. Statistická analýza**

Všechna měření probíhala dvakrát, za užití dvou různých zásobních roztoků. Data jsou vyjádřena jako průměr se směrodatnou odchylkou.

## 6. Výsledky

### 6.1. Přímá UV-Vis spektrometrie

V Tab. 3 jsou uvedeny vlnové délky absorpčních maxim testované látky (67DHC) a jejich komplexů s železem. Absorpční spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek od 220 do 800 nm. Jejich analýzou jsme zjistili, že absorpční maxima 67DHC jsou při 347-350, 298, 251-256 a 227-229 nm, a odpovídajících komplexů s ionty železa při 350-386, 270-299 a 236-242 nm.

pH 4,5			pH 5,5			pH 6,8			pH 7,5		
67DHC	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	67DHC	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	67DHC	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	67DHC	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>
347,3 ± 0,3	*	*	346,3 ± 0,3	350,5 ± 0,5	370,1 ± 0,8	347,8 ± 0,3	374,3 ± 0,8	376,3 ± 2,8	350,8 ± 1,8	386,2 ± 2,5	378,3 ± 0,8
298,3 ± 0,3	*	*	298,3 ± 0,3	299,3 ± 0,3	*	298,8 ± 0,3	270,8 ± 1,3	*	298,3 ± 0,3	277,1 ± 1,0	*
256,0 ± 0,5	*	*	258,3 ± 1,8	*	*	253,0 ± 0,5	236,5 ± 1,0	*	251,5 ± 0,1	242,3 ± 0,1	*
228,8 ± 0,3	*	*	228,0 ± 1,0	*	*	229,5 ± 1,3	*	*	227,8 ± 0,8	*	*

**Tab. 3.** Vlnové délky absorpčních maxim 6,7-dihydroxykumarinu (67DHC) a odpovídajících komplexů. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. \*žádná nebo nízká chelatace.

V Tab. 4 jsou uvedeny molární absorpční koeficienty absorpčních maxim 67DHC a jeho odpovídajících komplexů s ionty železa.

pH 4,5			pH 5,5			pH 6,8			pH 7,5		
67DHC	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	67DHC	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	67DHC	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	67DHC	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>
10863,1 ± 2357,2	*	*	10266,0 ± 3254	10116,6 ± 196,6	13679,6	10072,3 ± 2927,7	13194,8 ± 785,2	10270,7 ± 909,3	12098,1 ± 4061,9	13555,7 ± 2724,3	13426,1 ± 353,9
5877,2 ± 1262,8	*	*	5004,2 ± 1895,8	4555,4 ± 155,4	*	4670,8 ± 1249,2	8806,0 ± 794,1	*	5456,1 ± 1444	6706,7 ± 1333,3	*
4070,3 ± 889,6	*	*	2489,1 ± 610,2	*	*	3517,2 ± 902,8	13238,3 ± 1081,7	*	4172,8 ± 787,2	10575,7 ± 1744,3	*
12648 ± 2672,1	*	*	10940,2 ± 2819,8	*	*	12739,3 ± 1041,7	*	*	12963,4 ± 3276,6	*	*

**Tab. 4.** Molární absorpční koeficienty 6,7-dihydroxykumarinu (67DHC) a odpovídajících komplexů. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. \*žádná nebo nízká chelatace.

Na základě níže uvedených výsledků bylo zjištěno, že 67DHC chelatuje Fe<sup>2+</sup> ionty při pH 5,5, 6,8 a 7,5 v chelatačním poměru 2:1 (Obr. 6, 7 a 8). Při pH 4,5 nebyl stanoven chelatační poměr z důvodu minimální chelatace Fe<sup>2+</sup> iontů (Obr. 5).

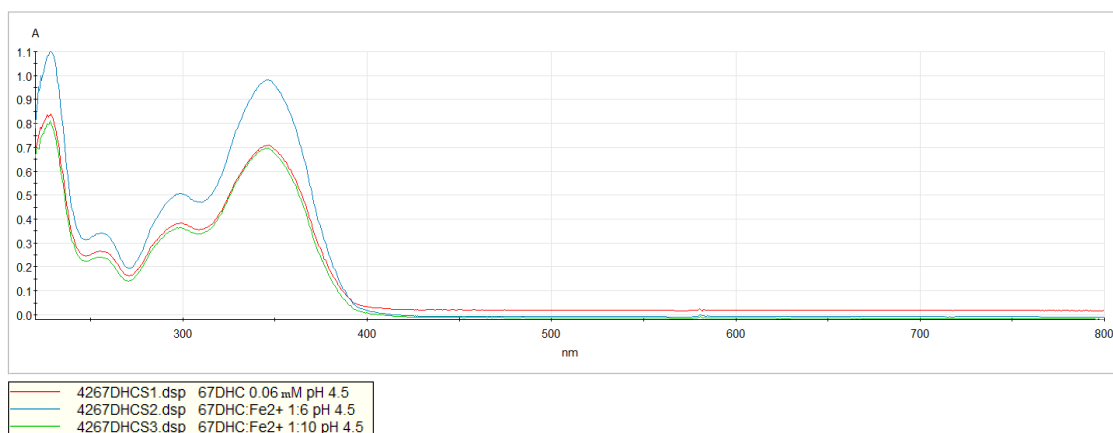
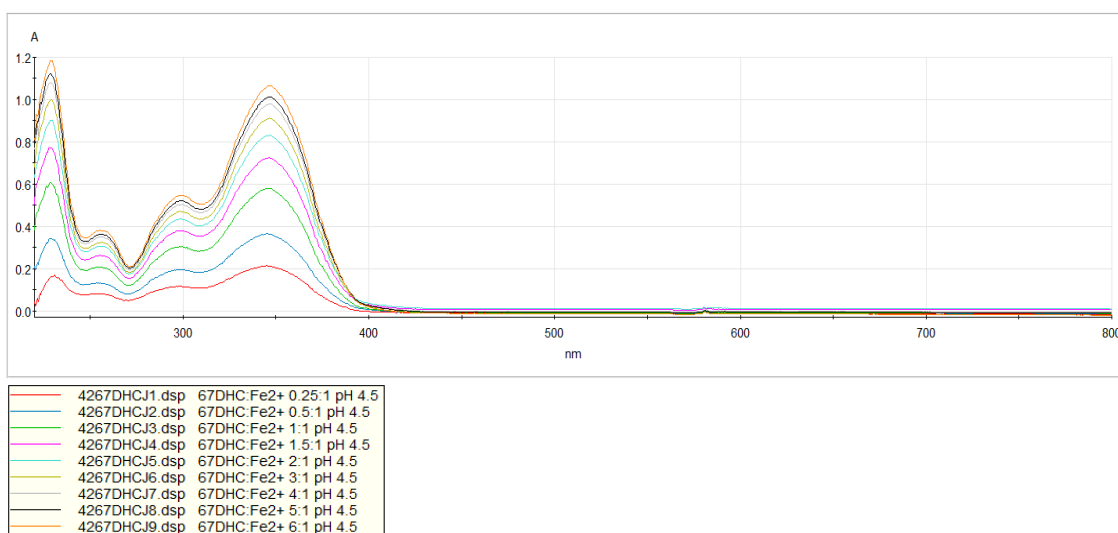
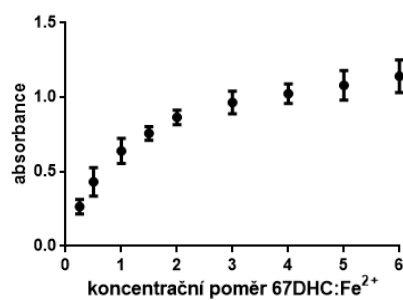


Dále  $\text{Fe}^{3+}$  ionty jsou chelátovány při pH 6,8 a 7,5 v chelatačním poměru 1,5:1 (Obr. 11 a 12). Při pH 4,5 a 5,5 nebyl určen chelatační poměr z důvodu minimální chelatace  $\text{Fe}^{3+}$  iontů (Obr. 9 a 10).

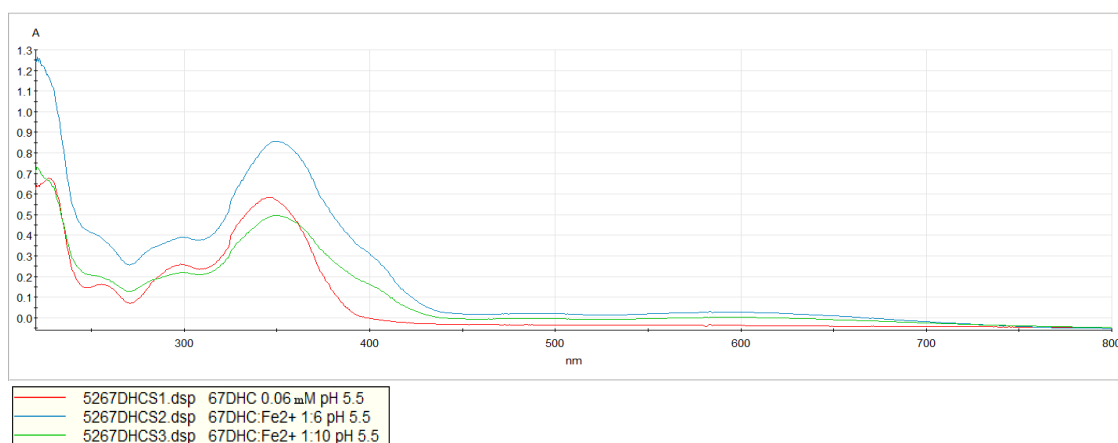
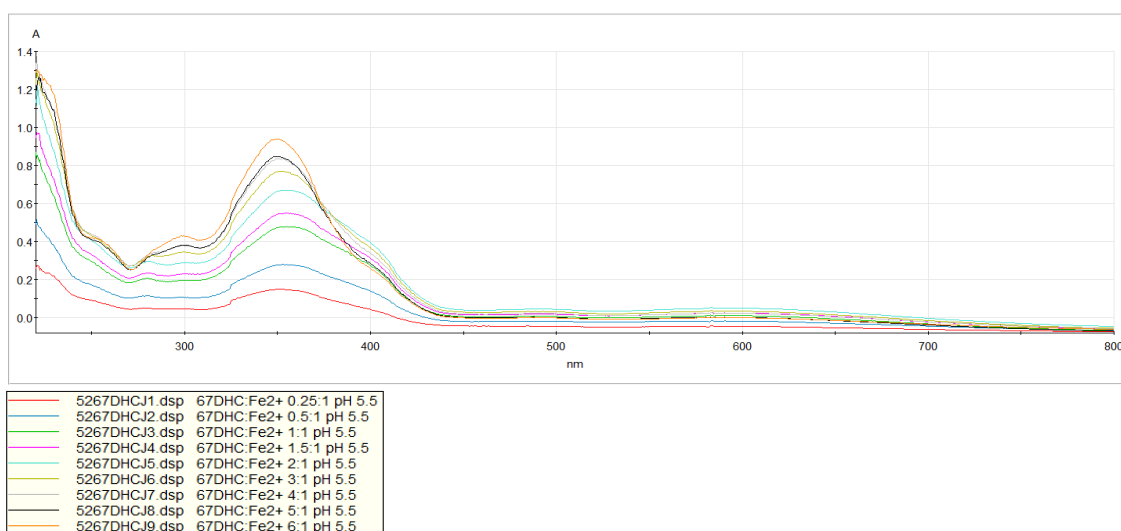
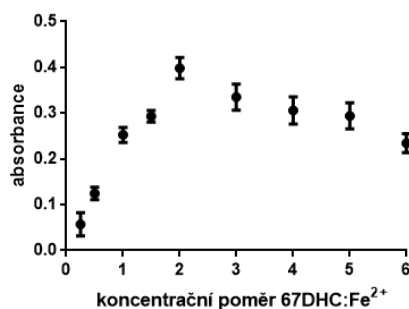
V Tab. 5 jsou shrnuty zjištěné chelatační poměry 67DHC: $\text{Fe}^{n+}$  pro jednotlivá stanovení.

Kumarin: $\text{Fe}^{n+}$	pH 4,5		pH 5,5		pH 6,8		pH 7,5	
	$\text{Fe}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Fe}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Fe}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Fe}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$
<b>67DHC:<math>\text{Fe}^{n+}</math></b>	*	*	2:1	*	2:1	1,5:1	2:1	1,5:1

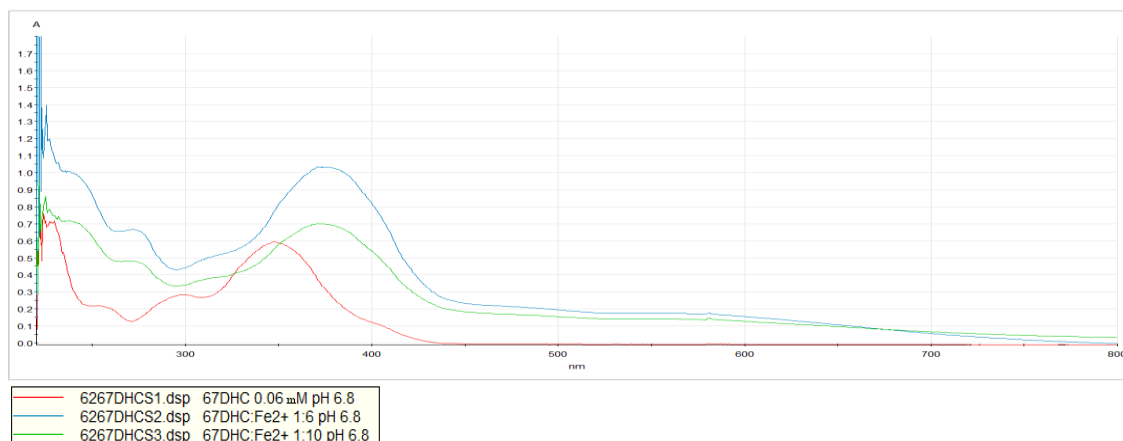
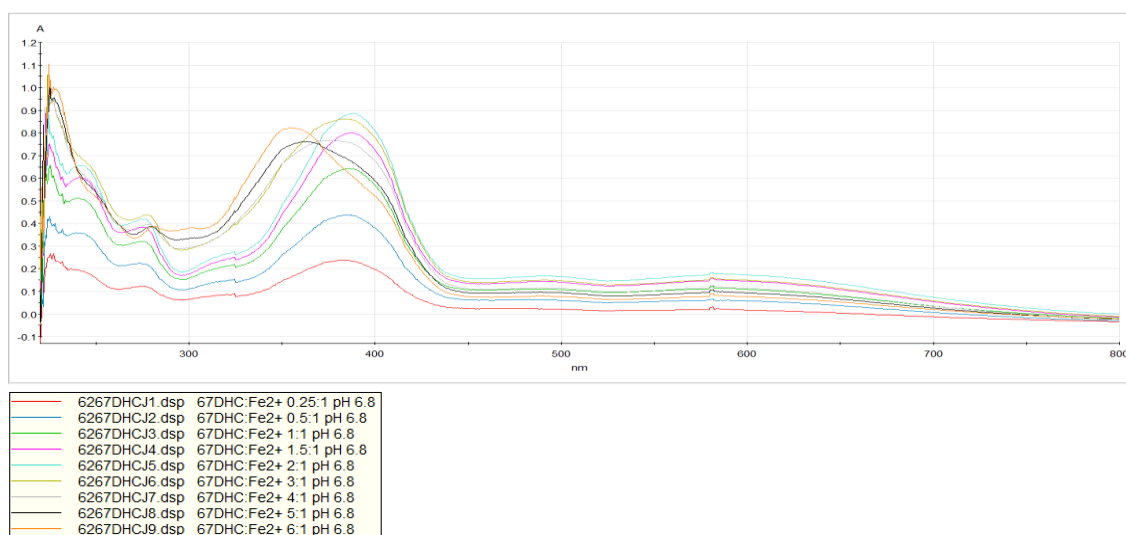
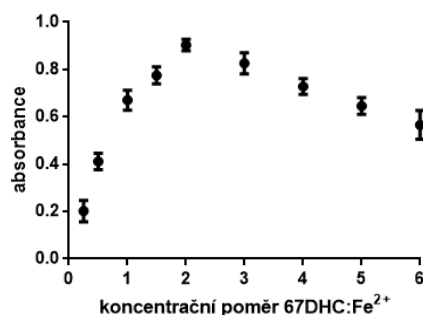
**Tab. 5.** Chelatační poměry 6,7-dihydroxykumarinu (67DHC: $\text{Fe}^{n+}$ ) při jednotlivých pH. \*žádná nebo nízká chelatace.

**A****B****C**

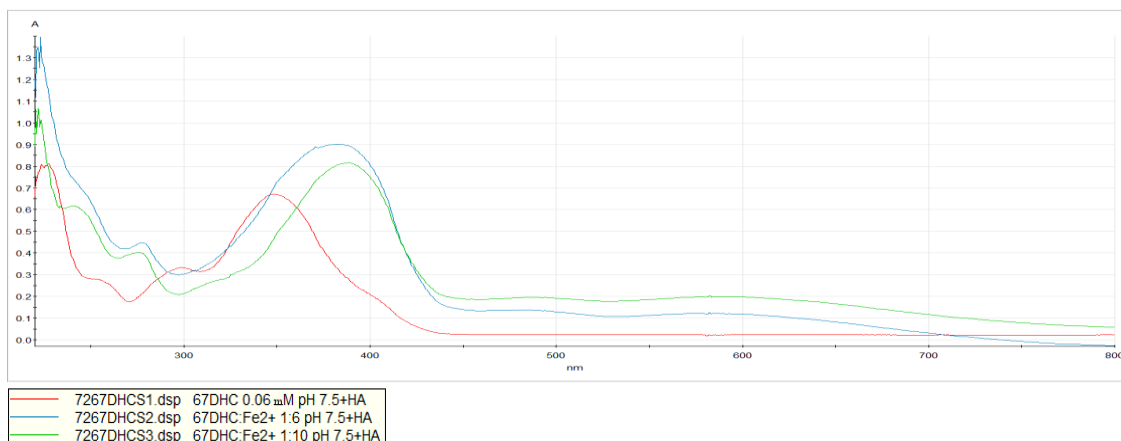
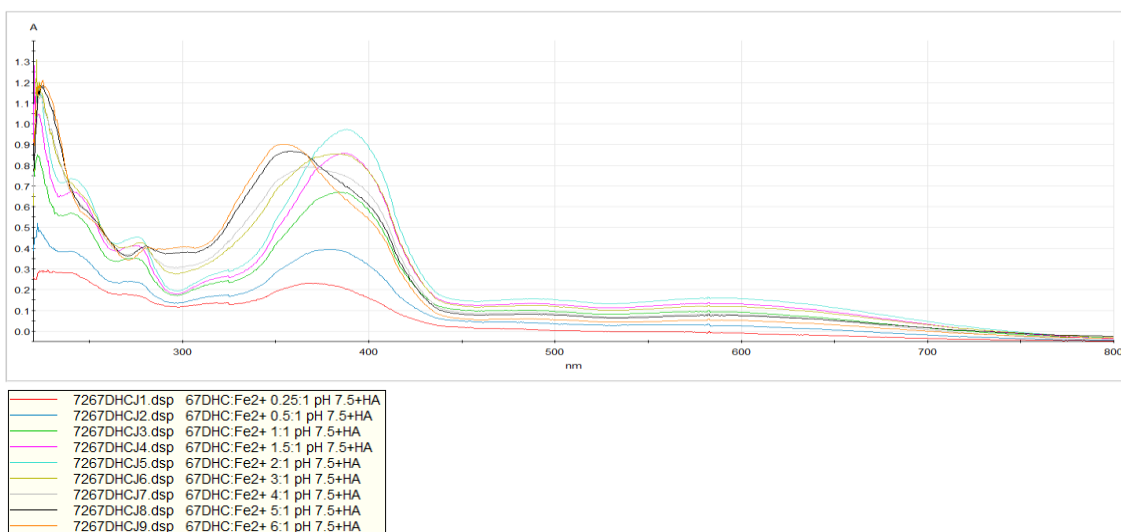
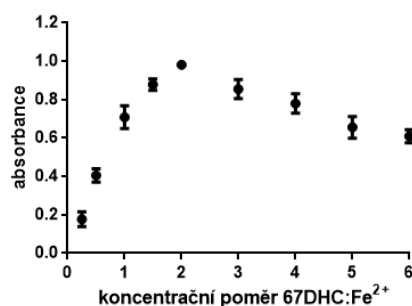
**Obr. 5:** 67DHC a Fe<sup>2+</sup> při pH 4,5. 6,7-dihydroxykumarin (67DHC). A) Absorpční spektra 67DHC (červená křivka) s absorpčními maximy při vlnové délce 347, 298, 258 a 228 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>2+</sup> při pH 4,5. C) Jobova metoda a závislost koncentračních poměrů na absorbanci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

**A****B****C**

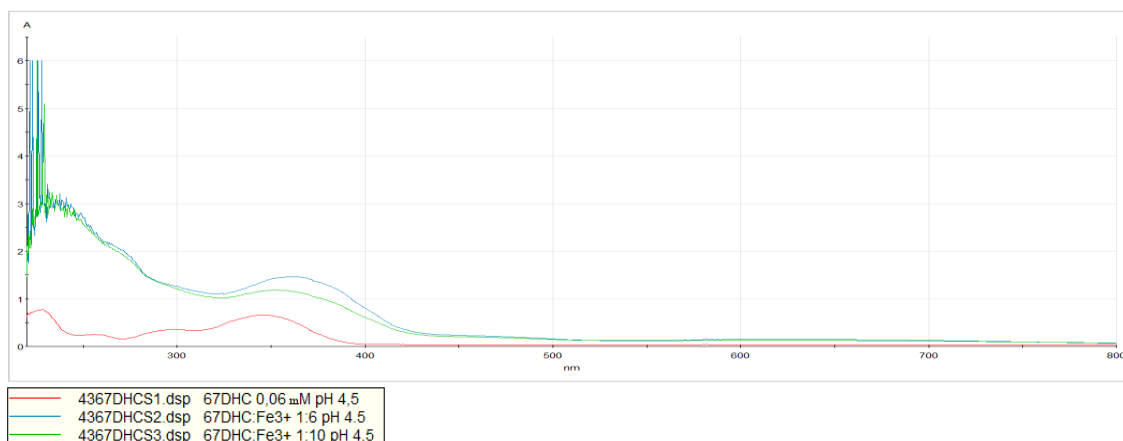
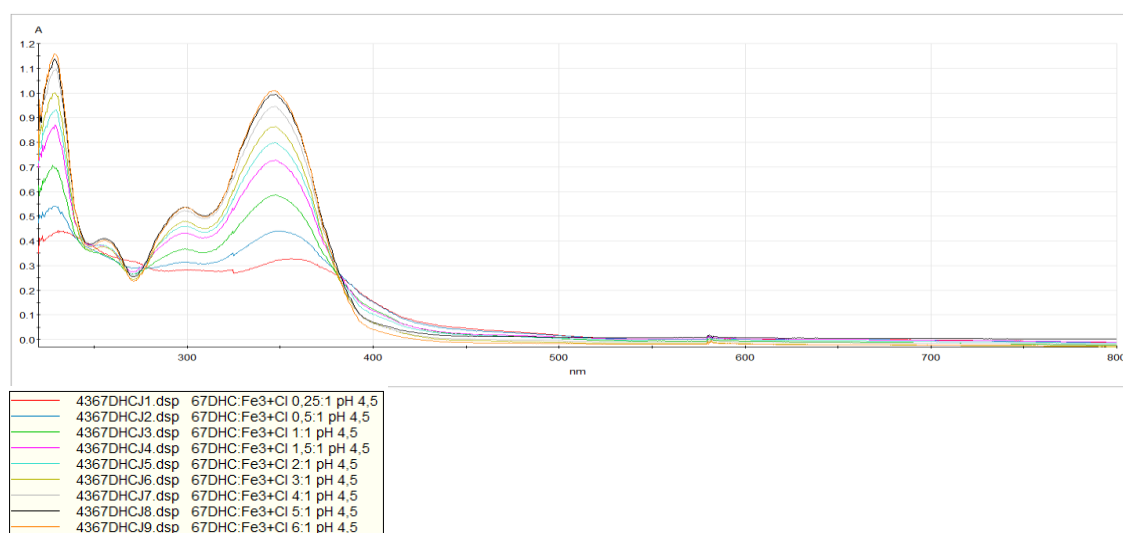
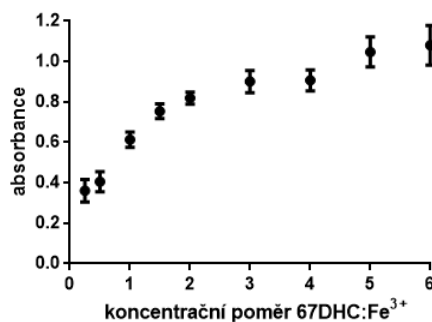
**Obr. 6:** 67DHC a Fe<sup>2+</sup> při pH 5,5. 6,7-dihydroxykumarin (67DHC). A) Absorpční spektra 67DHC (červená křivka) s absorpčními maximy při vlnové délce 346, 299, 258, a 228 nm a odpovídajících komplexů 67DHC:železo při 350 nm, a 299 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>2+</sup> při pH 5,5. C) Jobova metoda a závislost koncentračních poměrů na absorbanci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

**A****B****C**

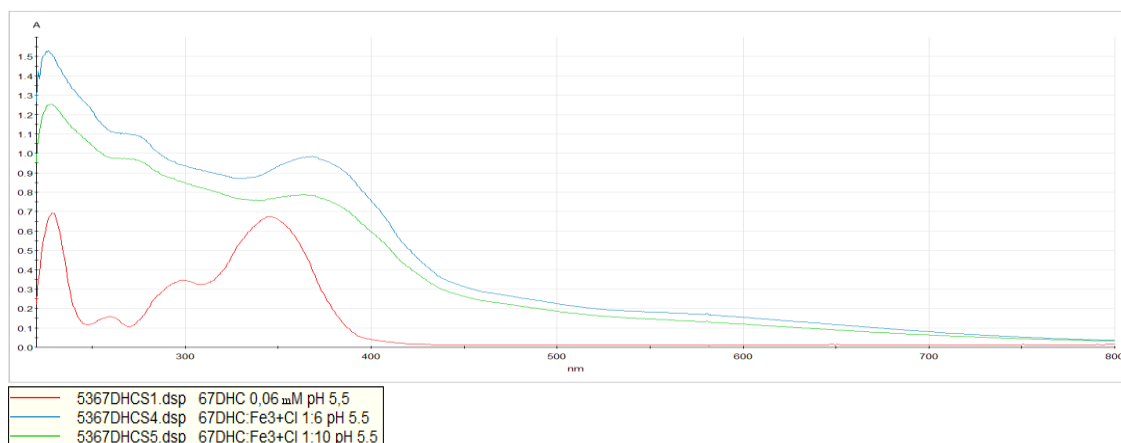
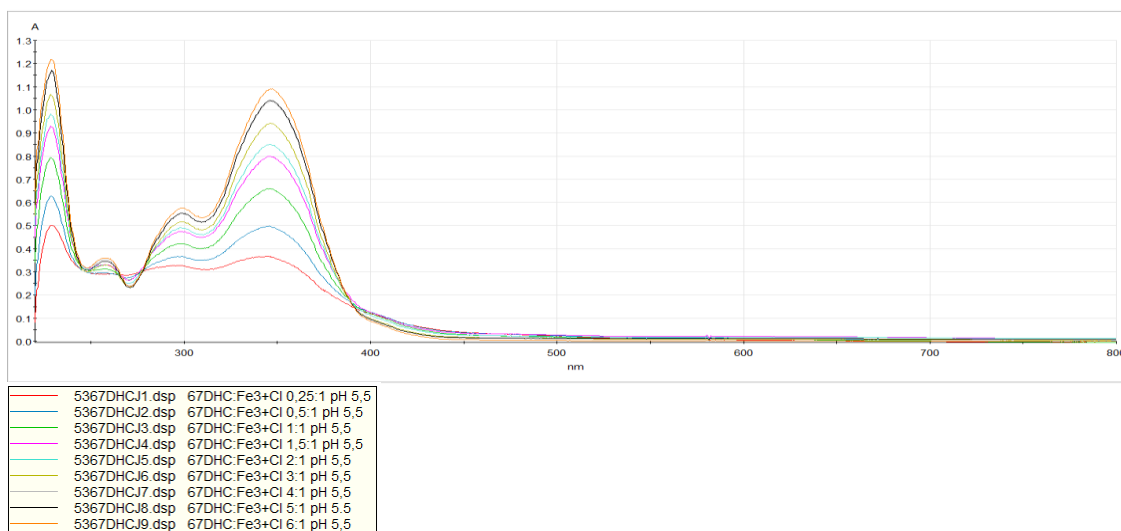
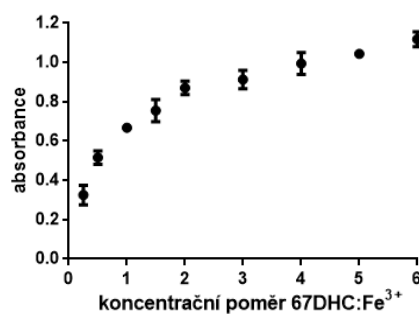
**Obr. 7:** 67DHC a Fe<sup>2+</sup> při pH 6,8. 6,7-dihydroxykumarin (67DHC). A) Absorpční spektra 67DHC s absorpčními maximy při vlnové délce 347, 298, 253, a 229 nm a odpovídajících komplexů 67DHC:železo při 374, 270 a 236 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>2+</sup> při pH 6,8. C) Jobova metoda a závislost koncentračních poměrů na absorbanci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

**A****B****C**

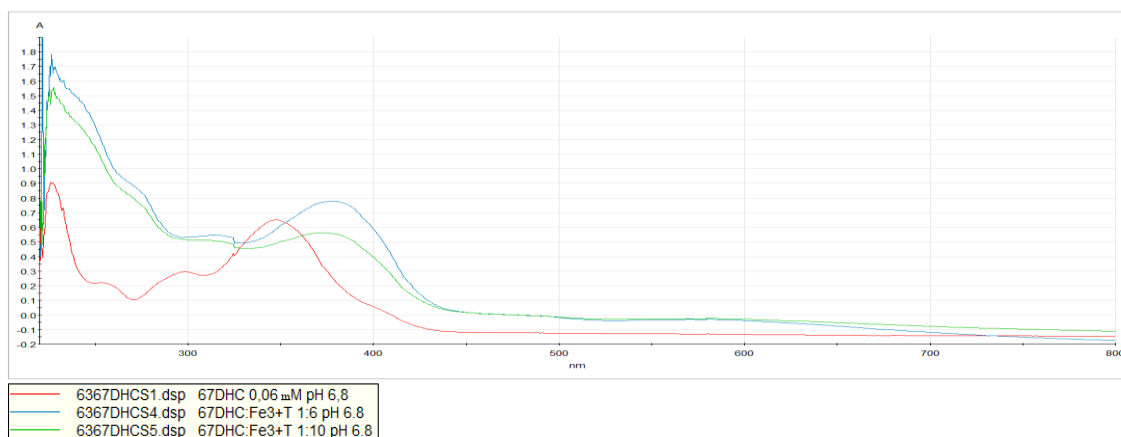
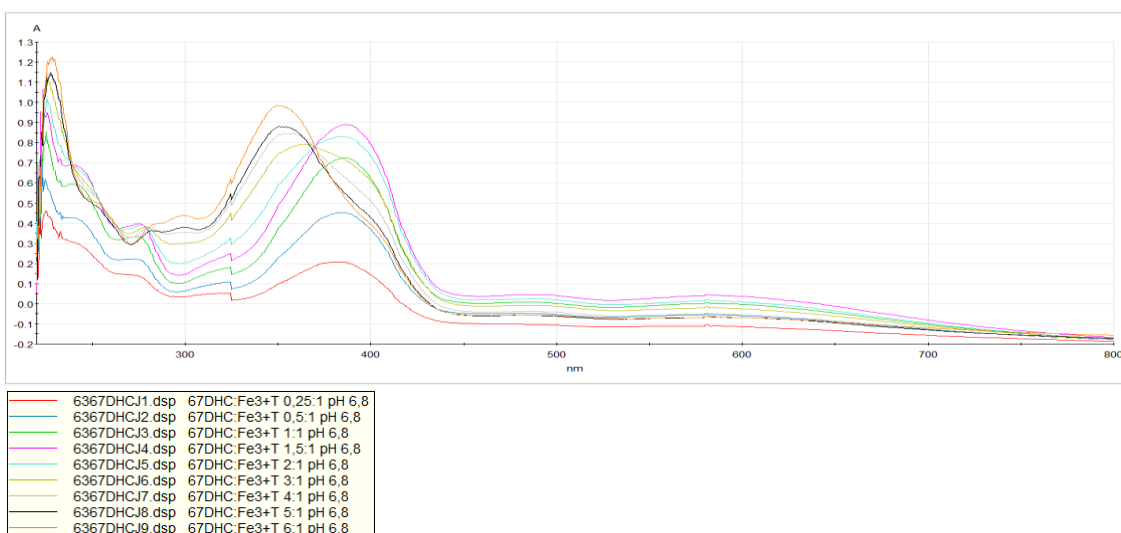
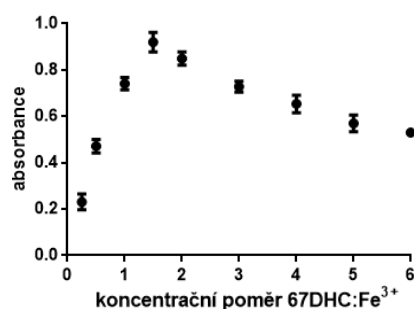
**Obr. 8:** 67DHC a Fe<sup>2+</sup> při pH 7,5. 6,7-dihydroxykumarin (67DHC). A) Absorpční spektra 67DHC s absorpčními maximy při vlnové délce 350, 298, 251, a 227 nm a odpovídajících komplexů 67DHC:železo při 386, 277 a 242 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>2+</sup> při pH 7,5. C) Jobova metoda a závislost koncentračních poměrů na absorbanci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

**A****B****C**

**Obr. 9:** 67DHC a Fe<sup>3+</sup> při pH 4,5. 6,7-dihydroxykumarin (67DHC). A) Absorpční spektra 67DHC (červená křivka) s absorpčními maximy při vlnové délce 347, 298, 258 a 228 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>3+</sup> při pH 4,5. C) Jobova metoda a závislost koncentračních poměrů na absorbanci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

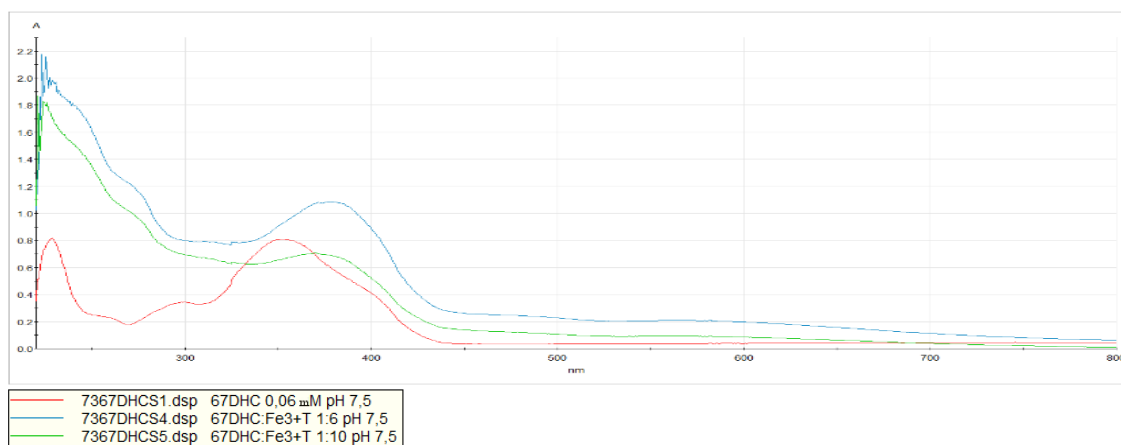
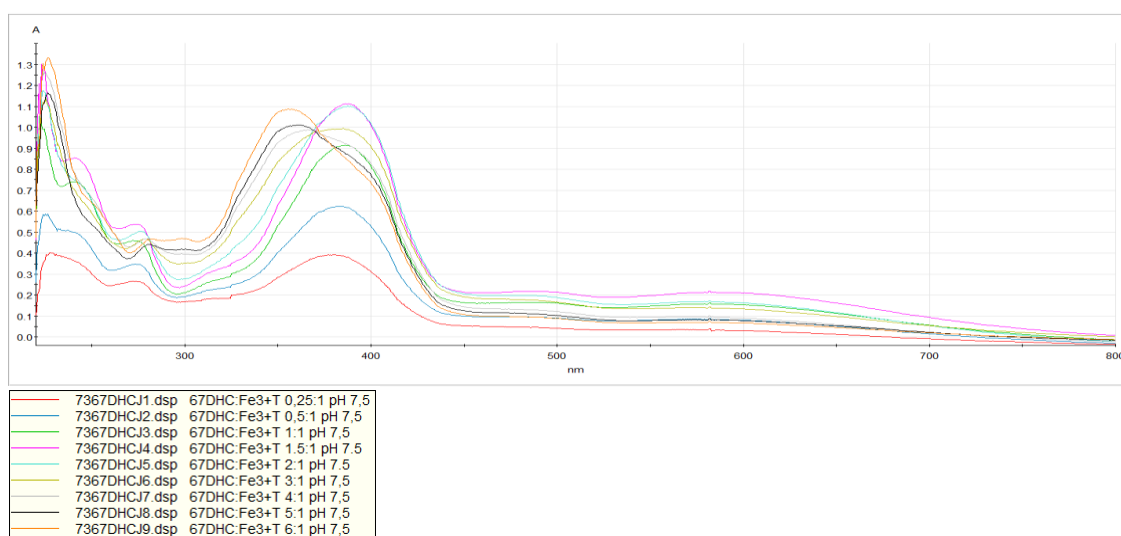
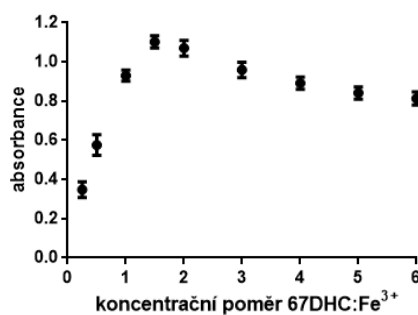
**A****B****C**

**Obr. 10:** 67DHC a Fe<sup>3+</sup> při pH 5,5. 6,7-dihydroxykumarin (67DHC). A) Absorpční spektra 67DHC (červená křivka) s absorpčními maximy při vlnové délce 346, 299, 258, a 228 nm a odpovídajícího komplexu 67DHC:železo při 370 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>3+</sup> při pH 5,5. C) Jobova metoda a závislost koncentračních poměrů na absorbanci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

**A****B****C**

**Obr. 11:** 67DHC a Fe<sup>3+</sup> při pH 6,8. 6,7-dihydroxykumarin (67DHC). A) Absorpční spektra 67DHC (červená křivka) s absorpčními maximy při vlnové délce 346, 299, 258, a 228 nm a odpovídajícího komplexu 67DHC:železo při 376 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>3+</sup> při pH 6,8. C) Jobova metoda a závislost koncentračních poměrů na absorbanci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

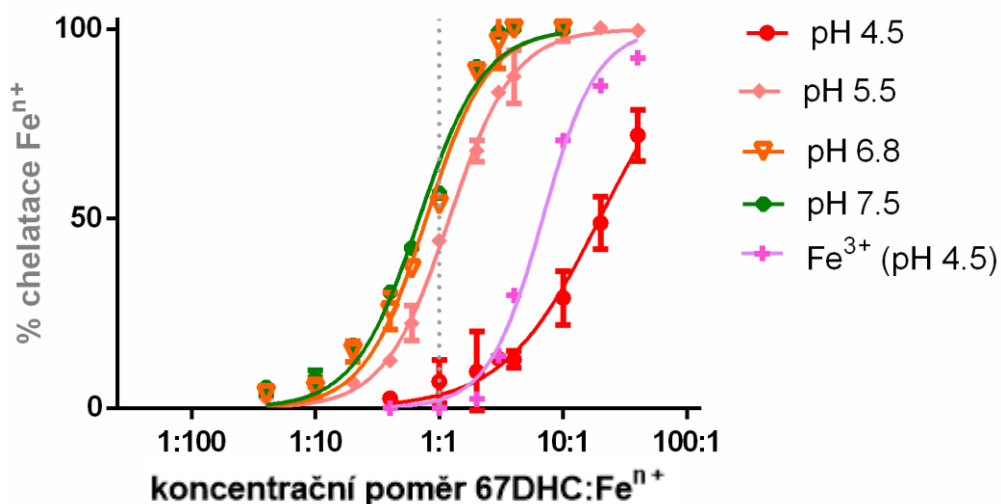


**A****B****C**

**Obr. 12:** 67DHC a Fe<sup>3+</sup> při pH 7,5. 6,7-dihydroxykumarin (67DHC). A) Absorpční spektra 67DHC (červená křivka) s absorpčními maximy při vlnové délce 350, 298, 251, a 227 nm a odpovídajícího komplexu 67DHC:železo při 378 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>3+</sup> při pH 7,5. C) Jobova metoda a závislost koncentračních poměrů na absorbanci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

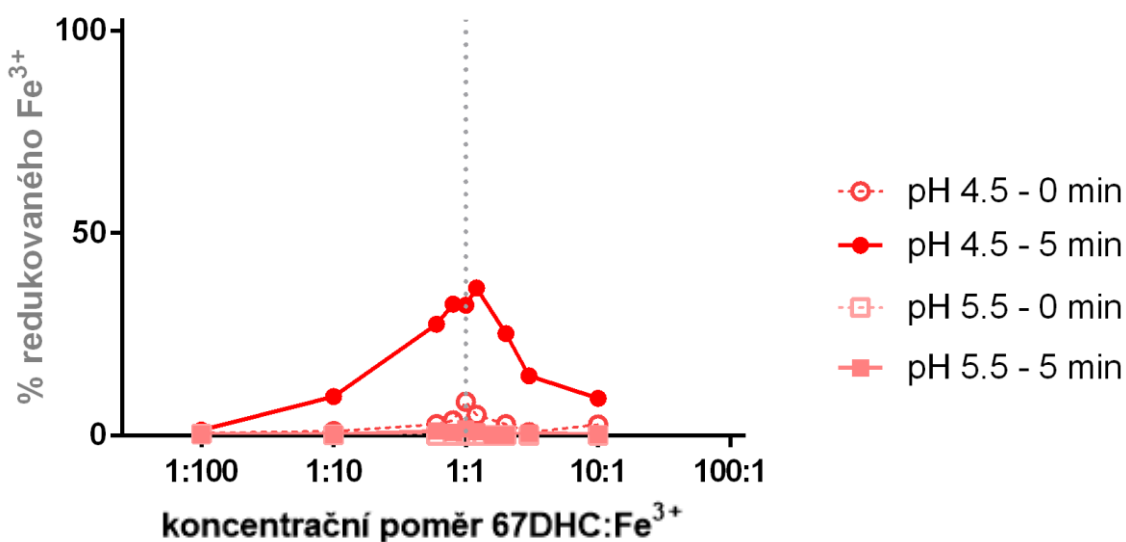
## 6.2. Kompetitivní UV-Vis spektrometrie

Při kompetitivní UV-Vis spektrometrii byla pozorována významná chelatace  $\text{Fe}^{2+}$  iontů při pH 5,5, 6,8 a 7,5. Při pH 4,5 byla chelatace  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  iontů výrazně nižší (Obr. 13).



Obr. 13: 6,7-dihydroxykumarin (67DHC) a chelatace  $\text{Fe}^{2+}$  při pH 4,5; 5,5; 6,8; 7,5 a  $\text{Fe}^{3+}$  při pH 4,5.

Kromě chelatačních vlastností jsme se zabývali i analýzou redukčních vlastností 67DHC (Obr. 14). Byla zjištěna významná redukční aktivita 67DHC při pH 4,5. Při koncentračním poměru 1:1 dosahovala přibližně 30 %. Redukce při pH 5,5 byla minimální.



Obr. 14: 6,7-dihydroxykumarin (67DHC) a redukce  $\text{Fe}^{3+}$  při pH 4,5 a 5,5.

## 7. Diskuze

Cílem této práce byla analýza chelatačních vlastností 6,7-dihydroxykumarinu. Pro tyto účely byla použita metoda přímé a kompetitivní UV-Vis spektrometrie. Při přímé UV-Vis spektrometrii jsme stanovovali absorbanci vzniklých komplexů 67DHC a iontů železa. Měřením jsme zjistili, že 67DHC významně chelatuje  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  ionty při pH 5,5 (jen  $\text{Fe}^{2+}$ ), 6,8 a 7,5. Podobných výsledků jsme dosáhli i pomocí kompetitivní UV-Vis spektrometrie, kde jsme sledovali chelataci iontů železa s využitím ferrozinu jako indikátoru. Při tomto měření jsme zaznamenali významnou chelataci  $\text{Fe}^{2+}$  iontů při pH 5,5, 6,8 a 7,5. Při pH 4,5 byla zjištěna výrazně nižší chelatace  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů.

Neschopnost kumarinů chelatovat ionty železa v kyselém prostředí (pH 4,5) byla již dříve diskutována ve studii Mladěnka et al. 2010<sup>(39)</sup>, ve které byli zkoumány 4-methylkumariny, mezi nimiž byl zastoupen i 4-methyl derivát námi zkoumaného 67DHC, tj. 6,7-dihydroxy-4-methylkumarin (4-methylesculetin). Tento 4-methyl derivát vykazoval schopnost chelatovat ionty železa rovněž při pH 5,5, 6,8 a 7,5. Nejúčinnějším chelátorem iontů železa byl v této studii 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin, který při pH 7,5 dosáhl stejné chelatační aktivity jako referenční deferoxamin. Naproti tomu, kumariny s jednou hydroxylovou, dvěma methoxy nebo hydroxy skupinami v *meta* poloze na základním skeletu vykazovali minimální chelataci. Souhrnně lze říci, že zásadní výhodou 4-methylkumarinů je jejich neschopnost vazby na CYP 450, čímž je znemožněna tvorba toxických epoxidických derivátů.<sup>(33, 39)</sup>

V porovnání s touto prací, která se zabývá přímou interakcí kumarinu a iontů železa, se v současné době většina výzkumných týmů zaměřuje spíše na děje, které jsou ionty tohoto kovu katalyzovány. K těmto dějům se řadí např. peroxidace lipidů a Fentonova reakce.<sup>(1)</sup>

Touto prací jsme prokázali chelatační aktivitu 67DHC. Nicméně, jak již bylo diskutováno v předchozích kapitolách, řada kumarinů s významnou chelatační aktivitou má zároveň i dobrou schopnost vylučovat volné radikály. Vhodným příkladem je studie s osmi testovanými kumariny, mezi nimiž byl zahrnut i 67DHC, ve které byla sledována scavengerová aktivita hydroxylového radikálu, DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) radikálu a inhibice xantinoxidázy. Ve všech případech byl 67DHC vyhodnocen jako nejsilnější antioxidant. Jako druhý nejúčinnější antioxidant byl vyhodnocen jeho 4-methyl derivát – 4-methylesculetin.<sup>(40)</sup>

V další studii se sledovala inhibiční aktivita extraktu kumarinů na peroxidaci lipidů indukovanou  $\text{Fe}^{2+}$  ionty a kyselinou askorbovou v mozkové tkáni potkanů. Extrakt byl izolován z drogy Cortex Fraxini, pocházející z Taiwanských rostlin rodu Fraxinus. Tato rostlinná droga je bohatá na obsah následujících *ortho*-dihydroxy kumarinů: esculin, 67DHC, fraxin a fraxetin. V této studii byla potvrzena inhibiční aktivita extraktu z rostlinné drogy na peroxidaci lipidů.<sup>(41)</sup>

V této práci jsme dále sledovali redukci  $\text{Fe}^{3+}$  iontů pomocí kompetitivní UV-Vis spektrometrie. Zjistili jsme, že 67DHC redukoval  $\text{Fe}^{3+}$  ionty při pH 4,5 s nejvyšší redukční aktivitou v rozmezí koncentračních poměrů 1:10 až 10:1 (67DHC: $\text{Fe}^{3+}$ ). Při pH 5,5 byla redukce  $\text{Fe}^{3+}$  iontů minimální. Naše výsledky jsou částečně v souladu s poznatky týkajícími se redukční aktivity 4-methylkumarinů.<sup>(39)</sup> V této studii vykazovaly *ortho*-dihydroxy-4-methylkumariny při pH 4,5 nejvyšší redukční aktivitu v koncentračním poměru 1:1 až 10:1 (kumarin: $\text{Fe}^{3+}$ ). Při zvyšující se koncentraci *ortho*-dihydroxy-4-methylkumarinů, redukční aktivita klesala, což se potvrdilo i v našem měření. Při pH 5,5 byla redukční aktivita přibližně třetinová ve srovnání s pH 4,5. V našem měření byla redukce při pH 5,5 minimální. Jedním z důvodů by mohla být horší rozpustnost  $\text{Fe}^{3+}$  iontů při vyšších pH. Pro detailnější pochopení by bylo potřeba provést další měření, ze kterých by se daly odvodit patřičné závěry.<sup>(39)</sup>

Souhrnně lze říci, že se v této práci podařilo potvrdit již dříve publikované strukturální požadavky na účinné chelátory iontů železa.<sup>(1, 39)</sup> Pro kumariny je zásadní přítomnost *ortho*-dihydroxy nebo *ortho*-diacetoxy skupin na kruhu A. Podle publikovaných studií, sloučeniny s pouze methoxylovými skupinami, jednou hydroxylovou nebo dvěma hydroxylovými či acetoxylovými skupinami v poloze *meta*, chelatují ionty železa podstatně méně.<sup>(1, 39)</sup>

Dalším velice důležitým parametrem je koncentrační poměr kumarinu a iontů železa. Naším měřením jsme zjistili, že 67DHC chelatoval při chelatačních poměrech 2:1 (67DHC: $\text{Fe}^{2+}$ ), respektive 1,5:1 (67DHC: $\text{Fe}^{3+}$ ). Chelatace iontů železa probíhala při pH 5,5, 6,8 a 7,5.

Při komplexním zhodnocení antioxidačních vlastností 67DHC je potřeba zvážit i schopnost redukovat  $\text{Fe}^{3+}$  ionty. Vzniklé  $\text{Fe}^{2+}$  vstupují do Fentonovy reakce vedoucí ke vzniku hydroxylového radikálu, který poškozuje okolní tkáň. Z našich výsledků lze usoudit, že 67DHC není vhodným chelátorem iontů železa v pH 4,5, protože vykazuje redukční aktivitu  $\text{Fe}^{3+}$  iontů při tomto pH. Naproti tomu, při vyšších pH, zejména 6,8 a 7,5, byla zjištěna výrazná chelatace a podle publikovaných výsledků *ortho*-dihydroxy-4-

methylokumarinů lze předpokládat, že by redukce  $\text{Fe}^{3+}$  iontů při těchto pH neměla probíhat.<sup>(1, 39)</sup>

## 8. Závěr

Analýzou výsledků jsme zjistili, že 67DHC je schopný chelatovat ionty železa při pH 5,5, 6,8 a 7,5. V pH 5,5 byla pozorována chelatace jen při měření  $\text{Fe}^{2+}$  iontů. 67DHC chelatuje ionty železa v chelatačních poměrech 2:1 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nebo 1,5:1 ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

Na základě schopnosti 67DHC redukovat  $\text{Fe}^{3+}$  při pH 4,5 lze předpokládat, že tento kumarin je vhodnějším antioxidantem/chelátorem zejména při vyšších pH.

Pro detailnější charakteristiku antioxidačních vlastností by bylo velice přínosné analyzovat i chelataci iontů mědi, protože ionty tohoto kovu se také podílejí na tvorbě volných kyslíkových radikálů.

## 9. Literatura

1. Filipský T, Říha M, Macáková K, Anzenbacherová E, Karlíčková J, Mladěnka P. Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging, metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes. *Curr Top Med Chem*. 2015;15(5):415-31.
2. Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr Med Chem*. 2005;12(8):887-916.
3. Kostova I, Bhatia S, Grigorov P, et al. Coumarins as antioxidants. *Curr Med Chem*. 2011;18(25):3929-51.
4. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J*. 2011;434(3):365-81.
5. Filipský T, Říha M, Hrdina R, Vávrová K, Mladěnka P. Mathematical calculations of iron complex stoichiometry by direct UV-Vis spectrophotometry. *Bioorg Chem*. 2013;49:1-8.
6. Trojan S. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing a.s.; 2003. s. 132-35.
7. Patel M, Ramavataram DV. Non transferrin bound iron: nature, manifestations and analytical approaches for estimation. *Indian J Clin Biochem*. 2012;27(4):322-32.
8. Fleming RE, Ponka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med*. 2012;366(4):348-59.
9. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410-22.
10. Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*. 1981;1(8233):1293-4.

11. Shah SV, Alam MG. Role of iron in atherosclerosis. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(3 Suppl 1):80-3.
12. Fialová D, Vlček J. *Klinická Farmacie I*: Grada Publishing, a.s.; 2011. s. 120-21.
13. Steen DL, Cannon CP, Lele SS, et al. Prognostic evaluation of catalytic iron in patients with acute coronary syndromes. *Clin Cardiol.* 2013;36(3):139-45.
14. Swaminathan S, Fonseca VA, Alam MG, Shah SV. The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care.* 2007;30(7):1926-33.
15. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2383-97.
16. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology.* 2010;139(2):393-408, 408.e1-2.
17. Ghodekar SR, Grampurohit ND, Kadam SS, Thorat RM. Thalassemia: A review. *International Journal of Pharma Research & Development - Online (IJPRD).* 2010;2(10):101-108.
18. Origa R, Moi P, Galanello R, Cao A. Alpha-thalassemia. *GeneReviews(R).* Seattle (WA): University of Washington, Seattle. 2013; 1-25.
19. Cao A, Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *GeneReviews(R).* Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2015; 1-32.
20. Poggiali E, Cassinerio E, Zanaboni L, Cappellini MD. An update on iron chelation therapy. *Blood Transfus.* 2012;10(4):411-22.
21. Souhrn údajů o přípravku - Ferriprox 500 mg potahované tablety, Evropská Léková Agentura (EMA). 2013;1-56.



22. Souhrn údajů o přípravku - Exjade 125 mg dispergovatelne tablety, Evropská Léková Agentura (EMA). 2015; 1-78.
23. Cappellini MD, Cohen A, Piga A, et al. A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. *Blood*. 2006;107(9):3455-62.
24. Pennell DJ, Porter JB, Cappellini MD, et al. Continued improvement in myocardial T2\* over two years of deferasirox therapy in  $\beta$ -thalassemia major patients with cardiac iron overload. *Haematologica*. 2011;96(1):48-54.
25. Otto-duessel M, Brewer C, Gonzalez I, Nick H, Wood JC. Safety and efficacy of combined chelation therapy with deferasirox and deferoxamine in a gerbil model of iron overload. *Acta Haematol*. 2008;120(2):123-8.
26. Lal A, Porter J, Sweeters N, et al. Combined chelation therapy with deferasirox and deferoxamine in thalassemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2013;50(2):99-104.
27. Voskaridou E, Komninaka V, Karavas A, Terpos E, Akianidis V, Christoulas D. Combination therapy of deferasirox and deferoxamine shows significant improvements in markers of iron overload in a patient with  $\beta$ -thalassemia major and severe iron burden. *Transfusion*. 2014;54(3):646-9.
28. Mechl Z, Brančíková D. Nežádoucí účinky protinádorové léčby a jejich léčba. *Med Pro Prax*.6(6):325-9.
29. Muthuramalingam S, Gale J, Bradbury J. Dexrazoxane efficacy for anthracycline extravasation: use in UK clinical practice. *Int J Clin Pract*. 2013;67(3):244-9.
30. Hortobágyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*. 1997;54 Suppl 4:1-7.

31. Musa MA, Cooperwood JS, Khan MO. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Curr Med Chem*. 2008;15(26):2664-79.
32. Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int*. 2013;2013:963248.
33. Pedersen JZ, Oliveira C, Incerpi S, et al. Antioxidant activity of 4-methylcoumarins. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(12):1721-8.
34. Thuong PT, Hung TM, Ngoc TM, et al. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships. *Phytother Res*. 2010;24(1):101-6.
35. De souza SM, Delle monache F, Smânia A. Antibacterial activity of coumarins. *Z Naturforsch, C, J Biosci*. 2005;60(9-10):693-700.
36. Kostova I. Coumarins as inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Curr HIV Res*. 2006;4(3):347-63.
37. Devji T, Reddy C, Woo C, Awale S, Kadota S, Carrico-moniz D. Pancreatic anticancer activity of a novel geranylgeranylated coumarin derivative. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(19):5770-3.
38. Mladěnka P, Macáková K, Filipický T, et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem*. 2011;105(5):693-701.
39. Mladenka P, Macáková K, Zatloukalová L, et al. In vitro interactions of coumarins with iron. *Biochimie*. 2010;92(9):1108-14.
40. Lin HC, Tsai SH, Chen CS, et al. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(6):1416-25.

41. Wu C-R, Huang M-Y, Lin Y-T, Ju H-Y, Ching H. Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. *Food Chem.*2007;104(4):1464-71.