

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

**Železo – chelatační účinky metabolitů flavonoidů – malých
polyfenolických látek**

**Iron – chelating effects of flavonoid metabolites – small polyphenolic
substances**

Diplomová práce

Vypracovala: Nikol Vavřichová

Vedoucí diplomové práce: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

V Hradci Králové

Dne

Nikol Vavřichová

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Kateřině Macákové Ph.D. za vedení práce, poskytnuté materiály, pomoc při experimentálním měření a především za cenné rady a vstřícnost při řešení a zpracování diplomové práce. Děkuji také Doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. a celé výzkumné skupině Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie za poskytnutí zkoumaných látek. Zároveň bych ráda poděkovala celé katedře Farmaceutické botaniky a ekologie za poskytnutí laboratoře a potřebného vybavení pro naměření experimentální části práce. Tato diplomová práce vznikla v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2016 260 292.

Obsah

1	Úvod	6
2	Teoretická část	8
2.1	Funkce železa v organismu	8
2.2	Choroby spojované s nadbytkem železa v organismu	12
2.2.1	Primární hemochromatóza	12
2.2.2	Sekundární hemochromatóza	13
2.2.3	Léčba nadbytku železa	14
2.3	Chelatace železa	15
2.3.1	Deferoxamin	16
2.3.2	Deferipron	17
2.3.3	Deferasirox	19
2.4	Charakteristika testovaných látek a jejich biologická aktivita	20
2.4.1	Flavonoidy	20
2.4.2	Metabolismus flavonoidů	22
2.4.3	Testované látky	23
3	Cíl práce	28
4	Experimentální část	29
4.1	Materiál	29
4.1.1	Použité chemikálie	29
4.1.2	Testované látky	29
4.1.3	Přístroje	30
4.2	Metody	30
4.2.1	Příprava zásobních roztoků	30
4.2.2	Zkouška zásobních roztoků iontů železa	31
4.2.3	Kalibrace železnatých iontů	31
4.2.4	Chelatace železnatých iontů	32
4.2.5	Chelatace Fe ^{2+/3+} iontů	33
4.2.6	Redukce železitých iontů	34
5	Výsledky	36
5.1	Kalibrační křivka železnatých iontů	36

5.2	Chelatační účinnost testovaných látek	37
5.3	Redukční účinnost testovaných látek	39
6	Diskuze	40
7	Závěr	43
8	Seznam zkratk	44
9	Použitá literatura	45
10	Abstrakt	50
11	Abstract	51

1 Úvod

Lidské tělo je tvořeno z jednotlivých prvků, tyto prvky rozlišujeme, dle jejich podílu na stavbě organismu na makrobiogenní a mikrobiogenní. V rámci mikrobiogenních prvků existuje skupina biogenních kovů, ze kterých jsou v organismu nejvíce zastoupeny ionty železa. Množství železa v těle je rozdílné u žen (cca 2 g) a u mužů (cca 5g). Nejvíce železa je v organismu využíváno na stavbu hemoglobinu, kde slouží jako přenašeč dýchacích plynů, současně je stavební součástí myoglobinu a je nezbytné jako kofaktor enzymů katalyzujících biochemické děje. Nevyužité železo je ukládáno ve formě zásobních proteinů. Organismus získává největší podíl železa z rozpadlých erytrocytů, tím je zajištěn koloběh iontů železa a při normální funkci regulačních procesů není zapotřebí jejich zvýšený příjem potravou [1, 2].

Problém nastane při narušení rovnováhy metabolismu železa. Může docházet jak k nedostatku železa v organismu, tak k jeho nadbytku. Oba stavy jsou pro lidské tělo nežádoucí. Nedostatečné množství iontů železa v organismu může mít několik příčin, mezi které se řadí krvácení (například silné menstruační krvácení, krvácení v gastrointestinálním traktu), porucha recyklace železa, nízký příjem v potravě (charakteristické pro rozvojové země), porucha reabsorpce železa nebo zvýšená potřeba železa při růstu, těhotenství nebo laktaci. Dlouhodobý nedostatek železa může vést až ke vzniku anémie. Druhou výchytkou z rovnovážného stavu je nadbytek železa v organismu, k němuž dochází buď na základě dědičnosti, onemocnění označujeme jako primární hemochromatózu, nebo v důsledku porušení metabolismu železa, kde se jedná o sekundární hemochromatózu. Mezi další příčiny hromadění železa v těle patří porucha krvetvorby, zvýšený příjem železa z potravy, nepřiměřené užívání léčiv s obsahem železa nebo také časté krevní transfuze. Nadměrný obsah železa v těle podporuje tvorbu volných radikálů, která vede k oxidativnímu poškození buněk. Dále dochází k hromadění železa, především v parenchymatózních orgánech, což může vyústit až v poškození jejich funkce. Léčba je prováděna buď pravidelnými venepunkcemi, nebo jsou používány látky se schopností navázat nadbytečné železo [3, 4].

Látky vážící volné železo jsou označovány jako chelátory, prakticky fungují tak, že naváží volné ionty kovu, čímž vytvoří komplex, který je následně vyloučen z organismu. V klinické praxi jsou využívány látky deferoxamin, deferipron a deferasirox. Velkou nevýhodou první zmíněné látky je dlouhotrvající intravenózní

aplikace, což vede ke snížené compliance pacientů k léčbě. Následující dvě chelátotvorné látky se sice podávají perorálně, čímž je zvýšena compliance, ale projevují se nižší účinností a nežádoucími účinky. Z tohoto důvodu je vhodné hledat nové alternativní látky, které by se daly využít v léčbě nadbytku železa [5].

Flavonoidy jsou přírodní látky s antioxidační aktivitou a chelatačními vlastnostmi. Byly zkoumány vztahy mezi jejich strukturou a schopností vychytávat ionty kovů. Jedná se však o složité látky, které jsou v organismu metabolizovány na jednodušší sloučeniny [6]. Z tohoto důvodu se tato práce zabývá studiem železo – chelatačních schopností vybraných metabolitů flavonoidů (kyselina benzoová, kyselina 3 – hydroxybenzoová, kyselina 4 – hydroxybenzoová, kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová, kyselina 4 – methoxysalicylová, kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová, kyselina 2,4,6 – trihydroxybenzoová, kyselina hippurová) a následným odvozením vlivu jejich struktury na schopnost chelatovat ionty železa. Výsledky chelatační aktivity zkoumaných látek byly porovnávány s deferoxaminem jako standardem.

Doposud jsme zde popisovali pouze pozitivní vliv flavonoidů na lidský organismus, nesmíme však zapomenout na fakt, že flavonoidy mohou mít mimo chelatačních také prooxidativní vlastnosti. Mechanismus účinku není přesně znám, ale je přikládán redoxní aktivitě přechodných kovů, které mohou zapříčinit vznik volných radikálů. V našem případě se jedná o ionty železa, kde jsou železnaté ionty katalyzátorem Fentonovy reakce, která vede ke vzniku hydroxylových radikálů [7]. Pokud by tedy testované látky měly mimo chelatačních účinků ještě schopnost redukovat železité ionty, mohlo by docházet k nežádoucím účinkům a to k poškození buněk vzniklými volnými radikály. Z tohoto důvodu jsme v této práci neopomněli stanovit i redukční aktivitu testovaných látek.

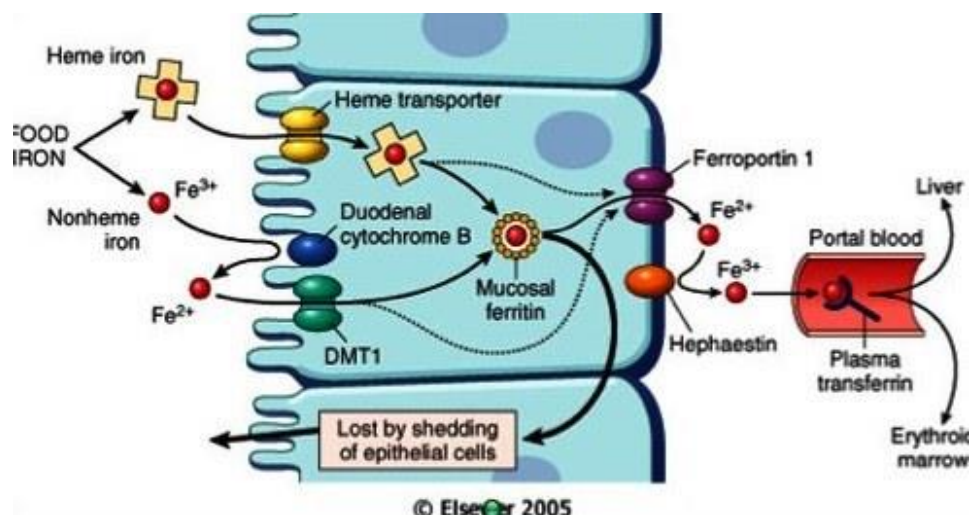
2 Teoretická část

2.1 Funkce železa v organismu

Železo je jedním ze stopových prvků, které jsou nezbytné pro správné fungování organismů. V lidském těle existuje ve formě iontů železnatých a železitých. Průměrný obsah železa v organismu se liší dle pohlaví, u žen odpovídá přibližně 35 mg/kg, u mužů 45 mg/kg. Z tohoto množství železa je 60-70 % vázáno v hemoglobinu, 20 – 30 % se nalézá ve formě zásobního železa, 10 % tvoří takzvané funkční železo, které je například vázáno v enzymech, zbylé 1 % existuje volně v krevním oběhu [2]. Železo je z organismu vylučováno ve velmi malém množství a jeho výdej nepodléhá žádným specifickým regulačním mechanismům. Do organismu je doplňováno z potravy ve formě Fe^{2+} a Fe^{3+} , k jejichž absorpci dochází především v duodenu. Denní příjem by měl činit 10 – 20 mg železa, vzhledem k vyšším ztrátám (menstruace, těhotenství, laktace) potřebují ženy přijímat více železa než muži. Přihlédne-li se k celkově nízkému příjmu a minimálnímu výdeji, je většina železa v organismu reabsorbována, k tomu dochází především u hemového železa [4].

Z potravy je železo absorbováno ve dvou formách, a to jako hemové (součást krevního barviva) a nehemové (Obr. 1). Železo vázané v hemu je absorbováno přes HCP (heme carrier protein) transportér, specifický přenašeč pro hem. Uvnitř enterocytu dojde k degradaci hemu působením enzymu HO – 1 (hemoxygenáza 1). Ionty železa uvolněné z hemu jsou následně vázány jako Fe^{3+} na buněčný feritin nebo vytváří buněčnou zásobárnu železa (buněčný pool). V nehemových sloučeninách existují jak ionty železnaté (Fe^{2+}), tak železité (Fe^{3+}). K absorpci iontů železa dochází v duodenu, při čemž dvoumocné ionty železa se lépe absorbují z prostředí s neutrálním nebo kyselým pH, reálně tedy dochází k jejich vstřebávání na začátku duodena (pars superior), kde ještě zůstává nízké pH díky natrávené potravě, která sem přichází ze žaludku. Co se týče trojmocných iontů železa, ty jsou lépe vstřebávány z prostředí s alkalickým pH, čemuž v organismu odpovídá část duodena za ústím vývodu z pankreatu (pars descendens). V duodenu jsou ionty Fe^{3+} redukovány činností ferireduktázy (duodenální cytochrom b) a redukčních činidel (kyselina askorbová, cystein, histidin) na Fe^{2+} . Syntéza duodenálního cytochromu b je stimulována hypoxií, nedostatkem železa, nebo také hypotransferinemií (geneticky podmíněný nedostatek transferinu). Po redukci následuje transport přes apikální membránu do enterocytu

pomocí specifického přenašeče DMT 1 (divalent metal transporter 1). Přes DMT 1 jsou absorbovány i některé další dvouvalné ionty kovů na příklad zinku, mědi, niklu nebo olova. Uvnitř buňky dochází k oxidaci Fe^{2+} pomocí enzymu ceruloplazminu na Fe^{3+} . Trojmocné ionty jsou následně navázány na feritin, uvolněny do krve nebo se stanou součástí intracelulárního poolu. Železo je uvolňováno z buňky do krevního řečiště ve formě Fe^{2+} za pomoci transmembránového proteinu ferroportinu. Vyloučené dvoumocné ionty jsou ihned oxidovány na trojmocné činností hephaestinu (homolog ceruloplasminu) a následně navázány na transferin, transportní glykoprotein se dvěma vazebnými místy pro železo. Běžně jsou vazebná místa obsazena ze 30 %, v případě nadbytku železa dojde k obsazení veškerých vazebných míst, nenavázané nadbytečné železo se nachází v organismu vázané na citrát. Transferin tedy rozvádí železo krvením řečištěm do organismu. Buňky, které potřebují železo, váží komplex transferin – železo pomocí transferinového receptoru 1. Navázaný transferin je následně endocytován. V endosomu dochází k uvolnění Fe^{3+} z transferinu, k jeho redukci a transportu pomocí DMT-1 z endosomu do buňky. Samotný transferin je následně exocytován zpět do krevního řečiště. Nejvíce železa z transferinu je využíváno v kostní dřeni k erythropoéze. Železo, které není absorbováno, vytváří ve střevě komplexní sloučeniny s ftaláty a polyfenoly, které jsou z organismu vyloučeny stolicí [1, 8, 9].



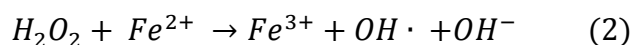
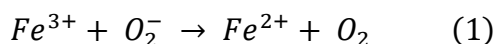
Obr. 1: Schéma absorpce železa [10]

Ze železa, které není využito na erythropoézu jsou tvořeny zásobárny a to ve formě feritinu nebo hemosiderinu. Struktura feritinu je tvořena dvaceti čtyřmi proteinovými podjednotkami, ty jsou uspořádány do tvaru koule, uprostřed které je vytvořena dutina, kde je uchováváno železo ve formě krystalů ferihydrátu. Existují dva typy proteinových podjednotek a to H (heavy) a L (light). Feritiny v jednotlivých tkáních se od sebe odlišují různým zastoupením H a L podjednotek a jsou označovány jako izoferitiny. Feritin v srdeční tkáni je tvořen především H podjednotkou, zatímco v játrech pojednotkou L. Dvoumocné železo prochází dovnitř struktury feritinu jedním ze šesti pórů, kde je oxidováno na trojmocné prostřednictvím H podjednotky, která má feroxidázovou aktivitu. Díky činnosti H podjednotky je železo rychle uskladňováno ve formě Fe^{3+} a je také rychleji uvolňováno. L podjednotky naopak přijímají železo pomaleji a skladují jej po delší dobu. Jedna molekula feritinu je schopna pojmout několik tisíc atomů železa. Druhým způsobem pro uskladnění železa je hemosiderin. Jeho struktura je tvořena proteiny, sacharidy a lipidy. Molekula hemosiderinu je pravděpodobně degradačním produktem feritinu a v organismu se objevuje v mnohem menším množství než feritin [2, 8, 9].

Pro železo neexistuje v organismu specifický vylučovací proces, z těla se dostává odlupováním buněk epidermis nebo buněk trávicího traktu. Ztráty železa činí přibližně 1 mg/den u mužů a 2 mg/den u žen. Pouze tyto denní ztráty jsou vyrovnávány příjmem železa z potravy, zbylé železo je v rámci organismu recyklováno přes makrofágy. Vzhledem k tak malým ztrátám je nutná přísná regulace metabolismu železa jak na buněčné úrovni, tak i systémově. Regulace na buněčné úrovni je řízena pomocí translace mRNA, kdy podle obsahu železa v buňce jsou nebo nejsou syntetizovány proteiny. Tento proces je řízen systémem iron responsive proteins (IRPs) – iron responsive elements (IREs). V případě nedostatku železa dojde k vazbě IRPs na IREs a tento komplex následně ovlivňuje aktivitu dané mRNA. Například pokud je v buňce nedostatek železa, dochází k vazbě IRPs na IREs pro feritin a ferroportin, tím je pozastavena translace těchto proteinů a železo je zadržováno v buňkách. V rámci systémové regulace je uplatňován hepcidin. Tento protein syntetizovaný v játrech se skládá z dvaceti pěti aminokyselin a v jeho struktuře se vyskytují čtyři disulfidické můstky. Hepcidin se váže na ferroportin, čímž je ferroportin internalizován dovnitř buňky a poté degradován, tím dochází ke snížení exportu železa ven z buňky. Při nadbytku železa v organismu se produkce hepcidinu zvyšuje, stejně tak je tomu při

zánětu. Naopak při nedostatku železa, anebo při hypoxii (je nutné stimulovat erytropoézu) se tvorba hepcidinu sníží. Jedná se o negativní regulátor uvolňování železa z makrofágů a jeho reabsorbce v tenkém střevě. Nadbytek hepcidinu znamená málo železa vázaného na trasferin, což vede ke snížené dodávce železa do kostní dřeně a tedy k omezení erytropoézy až ke vzniku anémie, na druhou stranu se železo stane nedostupným pro bakterie a dojde k pozastavení jejich růstu [4, 8].

Jakožto makrobiogenní prvek je železo nezbytné pro správné fungování organismu. V první řadě umožňuje přenášet kyslík z plic k jednotlivým orgánům, jelikož je součástí molekuly hemu. Hem spolu s globinem vytváří molekulu hemoglobinu, červeného krevního barviva, které je hlavní funkční součástí erytrocytů. V další řadě tvoří součást mnoha enzymů, které katalyzují řadu biologických dějů. Mezi tyto procesy patří metabolismus nukleových kyselin, proteinů nebo například myelinu, železo zde funguje v rámci enzymů jako přenašeč elektronů. V neposlední řadě je železo nezbytné v procesu buněčné proliferace a diferenciaci, stárnutí buněk a apoptózy, účastní se i stavby neuronálních dendritů. Významnou roli hraje i v rámci imunitního systému. Železo ovšem nemá pouze pozitivní vliv na organismus, je tedy vhodné zmínit i negativní stránky jeho působení. Ionty železa se velkou měrou podílejí na Haber – Weissově a Fentonově reakci, při kterých dochází ke vzniku volných radikálů (Obr. 2). Železo zde má dvojí funkci, a to jak donoru, tak akceptoru elektronů. Tato schopnost je zapříčiněna neúplným obsazením předposledního elektronového obalu atomu železa. Během Haber – Weissovy reakce dochází k redukci Fe^{3+} iontů na Fe^{2+} působením superoxidu (1). Na tuto reakci navazuje Fentonova reakce, kde vzniklý Fe^{2+} reaguje s peroxidem vodíku za vzniku Fe^{3+} a hydroxylového radikálu (2). Zmíněné reakce jsou nežádoucím jevem, protože volné radikály mohou vážně poškodit organismus. Právě z tohoto důvodu se lidské tělo snaží zabránit jejich tvoření, a to například vazbou přebytečných iontů Fe^{2+} na specifické proteiny, jejich chelatací anebo oxidací na Fe^{3+} . Důležité je také odstranění již vzniklých hydroxylových radikálů, tomu napomáhají katalázy a glutathionperoxidázy [1, 8, 11].



Obr. 2: Haber – Weissova (1) a Fentonova reakce (2) [11]

2.2 Choroby spojované s nadbytkem železa v organismu

V organismu neexistuje specifický mechanismus pro vylučování železa, proto podléhá metabolismus železa přísné regulaci. Z tohoto důvodu se jakákoli abnormalita projeví celkovým nadbytkem, anebo nedostatkem iontů železa v organismu. Protože množství železa v zásobárnách se téměř nemění, jsou výchyly zaznamenávány především v množství volných iontů železa v krvi, popřípadě v nátěrech kostní dřeně. Nedostatek železa se projeví sníženou hladinou volného železa v plazmě nebo nepřítomností barvitelného železa v nátěrech kostní dřeně. Příčin nedostatku železa může být několik, patří mezi ně ztráty krve, narušení recyklace železa (například při zánětech), nedostatečný příjem železa z potravy (špatná výživa), narušení resorpce železa v důsledku sníženého množství HCl v žaludku nebo současné podání potravy obsahující látky vážící železo (fytáty, třísloviny, šťavelany), k nedostatku může docházet i v důsledku zvýšené potřeby železa, ke které dochází v těhotenství, při laktaci nebo růstu. Chronický nedostatek vede ke vzniku hypochromní mikrocytární anémie. Léčba spočívá v suplementaci železa, kdy je možno podpořit reabsorpci železa podáváním kyseliny askorbové. Klinický obraz pacientů s nedostatkem železa představuje především poškození sliznic, kdy dochází k jejich ztenčování a k ukládání kreatinu. Změny na sliznici jícnu se mohou projevit až dysfagií, ztenčená sliznice žaludku znamená vyšší riziko vzniku gastritid, případně achlorhydrie [3, 4].

Druhou výchytkou, oproti fyziologickému množství železa v těle, je jeho nadbytek. Železo se z organismu vylučuje minimálně, a proto dochází při jeho zvýšeném příjmu k přetížení organismu. Tento stav nastává jak díky zvýšenému příjmu železa, tak na podkladě poruch metabolismu železa. Onemocnění, které je charakterizováno nadbytkem železa v organismu, se označuje jako hemochromatóza. Ta může být jak primární, vzniklá na základě dědičnosti, tak sekundární, která je charakterizována poruchami využití železa [4].

2.2.1 Primární hemochromatóza

Primární hemochromatóza je autozomálně recesivní onemocnění vyskytující se častěji u mužů. Toto onemocnění je nejčastěji zapříčiněné bodovou mutací genu pro HFE protein, který hraje důležitou roli v regulaci syntézy hepcidinu v játrech. Expres hepcidinu je ovlivňována nejen HFE proteinem (human hemochromatosis protein), ale i transferinovým receptorem 2 (TRF 2) a hemojuvelinem (HJV). Ke vzniku

onemocnění, tak může dojít i v případě defektu genu pro TRF 2 nebo HJV, popřípadě je možná porucha přímo hepcidinu, nebo dokonce i ferroportinu, který reaguje na změny množství hepcidinu. Nejčastější příčinou je ale mutace HFE genu, která vede ke snížené tvorbě hepcidinu, což znamená omezenou regulaci množství železa v organismu. V případě že je exprese hepcidinu snížena, dochází ke zvýšené absorpci železa v gastrointestinálním traktu a zároveň k nadměrnému uvolňování železa z buněk, čímž vzrůstá koncentrace volných iontů železa v plazmě. Dalším varovným signálem je zvýšená saturace feritinu a transferinu [3, 4, 12].

Na základě dlouhodobě zvýšené hladiny železa v krvi, dochází ke kumulaci železa v orgánech, primárně v játrech, srdci, pankreatu, kloubech nebo endokrinním systému a to hlavně ve formě hemosiderinu. Nadbytek iontů železa zvyšuje množství volných radikálů, které jsou zodpovědné za zvýšený oxidativní stres a tím i poškození buněk. Neléčená hemochromatóza může vést přes jaterní fibrózu či cirhózu, až k rakovině jater, dále může způsobovat sexuální dysfunkce, kardiomyopatii, u které hrozí vyústění až v srdeční selhání, diabetes mellitus, osteoartrózu nebo také změnu kožní pigmentace. Zvýšené ukládání železa v pankreatu v kombinaci se změnou pigmentace kůže, v důsledku stimulované tvorby melaninu, vede k onemocnění označovanému jako „bronzový diabetes“ (diabetes mellitus + tmavohnědé zbarvení kůže). Těmito symptomy se primární hemochromatóza projevuje až ve středním věku, přibližně po čtyřicátém roce života, do té doby ji lze prokázat pouze laboratorními testy. Pokud je toto onemocnění podchyceno v rané fázi, lze zmírnit následky a to opakovanými venepunkcemi nebo pomocí chelatační terapie [3, 13, 14].

2.2.2 Sekundární hemochromatóza

Ke vzniku sekundární hemochromatózy dochází v návaznosti na poruchy využití železa při onemocnění jater, nedostatečné tvorbě transferinu nebo může být způsobena nadměrným příjmem železa. U některých anémií způsobených poruchou syntézy hemoglobinu může zároveň docházet k poruše využití železa organismem. Příkladem může být hereditární sideroblastická anémie, kde dochází k poruše syntézy kyseliny δ – aminolevulové, která je mezistupněm v syntéze hemu. Tím přestává být využíváno železo v organismu a dochází k jeho nahromadění v orgánech. Stejně tomu je u β – talasemie, kdy dochází k nedostatečné produkci β – řetězců globinu, způsobené mutací genu pro β – globin, čímž dochází k nedostatečné syntéze hemoglobinu A.

Nedostatek hemoglobinu vede k narušení upotřebení železa k syntéze erytrocytů, a tak dochází k hromadění železa v těle. K intoxikaci organismu železem může dojít jak u perorálního podávání přípravků se železem, tak při jejich parenterální aplikaci. Nejčastější příčinou však jsou chronicky opakované transfuze, které potlačují přirozenou erythropoézu, čímž dochází ke sníženému využití železa. Časté transfuze způsobují hemosiderózu orgánů, ale nedochází při nich k projevům orgánového poškození [4, 13, 15].

2.2.3 Léčba nadbytku železa

Vzhledem k závažným problémům, které způsobuje nadbytek železa v organismu, je nutné jeho hladinu snižovat. U primární hemochromatózy je optimální léčebná metoda prozatím stále hledána. V současné době se ke snížení hladiny železa v plazmě, u pacientů s primární hemochromatózou, využívají opakované venepunkce. V počáteční fázi léčby musí být venepunkce opakovány v pravidelných intervalech, a to jednou týdně 500 ml krve. Po dosažení sideropenie následuje léčba udržovací, během které se provádí občasná terapeutické odběry krve. Ty probíhají většinou jednou za tři měsíce, ale načasování je individuální. Hodnotí se hladina feritinu v séru, kdy je žádoucí udržet hodnoty kolem 50 ng/ml. Při intoleranci venepunkcí, se lze uchýlit k chelatační terapii, ke které se využívá parenterálně podávaný deferoxamin, perorální deferipron nebo deferasirox. Další možností je erythrocytaferéza, která umožňuje dva až třikrát rychlejší odstraňování železa z organismu. Při této proceduře jsou z krve selektivně filtrovány červené krvinky. Erythrocytaferéza je využívána pouze u pacientů s kontraindikací venepunkcí, protože u pacientů, kteří tolerují venepunkci, nemá významnější přednosti a také proto, že je finančně náročná [16–18].

U pacientů postižených sekundární hemochromatózou jsou k léčbě využívány látky schopné chelatovat nadbytečné železo. K chelatační terapii se nejčastěji využívá deferoxamin. Tato látka je velice účinný chelátor, ovšem jeho nevýhodou je forma aplikace, podává se parenterálně jako dlouhodobá kontinuální infuze. Aplikace probíhá většinou přes noc, což je pro pacienty přijatelnější, ale i tak stále nevýhodné. K dispozici existují i parenterální přípravky deferipron a deferasirox. Byly provedeny studie, zkoumající přínos kombinační léčby a to užívání deferoxaminu a deferipronu, kde deferipron proniká do buněk, ze kterých odstraňuje železo a následně ho přenesení na deferoxamin, který se spolu s navázaným železem vyloučí močí. Bylo dokázáno, že tato

kombinace napomáhá rychlejšímu odstranění železa, především u pacientů s poškozeným myokardem v důsledku nadměrného ukládání železa [18, 19].

2.3 Chelatace železa

Schopnost některých látek vázat ionty kovů je označována jako chelatace. Tato vlastnost je spojována s charakteristickou strukturou látky. Jedná se o komplexní sloučeniny skládající se z centrálního atomu a ligandu. Centrální atom je tvořen iontem kovu, ligandy bývají větší molekuly, které se na centrální atom mohou vázat dvěma nebo více vazbami. Jsou tedy rozlišovány ligandy dvouvazné až vícevazné. Konkrétně železo má schopnost akceptovat až šest volných elektronů od ligandů a takovéto uspořádání vytvoří oktaedr. Tato konfigurace zajišťuje sloučenině stabilitu. Stabilita chelátů je dána mírou afinity ligandu k centrálnímu atomu, ionty kovů s menší afinitou k ligandu jsou vytěsňovány kovy s vyšší afinitou k molekule ligandu, protože tak vzniká stabilnější komplex [20, 21].

Látky s chelatační aktivitou jsou široce využívány. V analytické chemii slouží jako indikátory, další uplatnění naleznou i v průmyslu, kde slouží k extrahování kovů a některé jsou využívány jako barviva. V této práci nás zajímá především využití těchto látek v medicíně, kde naleznou uplatnění například při otravách těžkými kovy. Dochází zde k vytěsnění centrálního atomu těžkým kovem díky jeho vyšší afinitě k ligandu. Ionty těžkých kovů vytvoří po navázání na ligand rozpustný komplex, který je následně vyloučen z těla močí. Obdobně je tomu při poruchách metabolismu některých iontů kovů, například železa nebo mědi. Chelátory lze využít také jako antioxidanty, protože váží nadměrné množství kovových iontů, a tak zabraňují jejich účasti na vzniku reaktivních forem kyslíku, které poškozují buňky lidského těla [20].

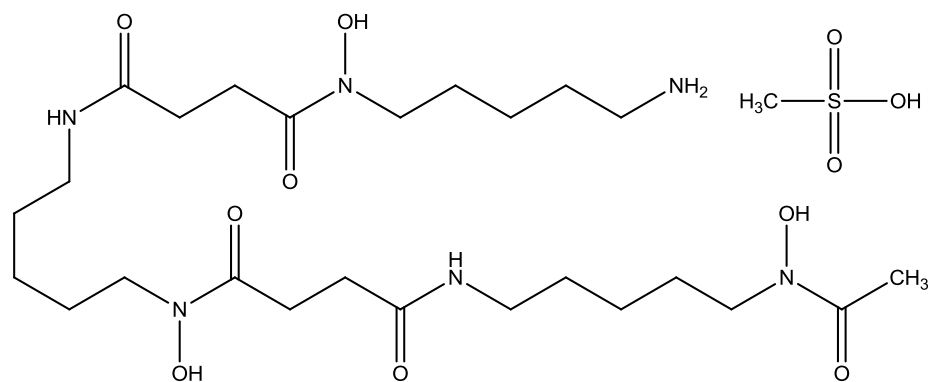
Mezi látky schopné chelatace patří jak syntetické sloučeniny, tak mnohé přírodní látky. Do první zmíněné skupiny řadíme edetan vápenato-disodný, který se uplatňuje při otravách olovem a dále deferipron a deferasirox, všechny využívané k odstranění nadbytečných iontů železa z organismu. Mezi přírodní látky patří flavonoidy, vitaminy, především vitamin C, dále aminokyseliny nebo pektin, klinicky využívaný je deferoxamin [22–24].

2.3.1 Deferoxamin

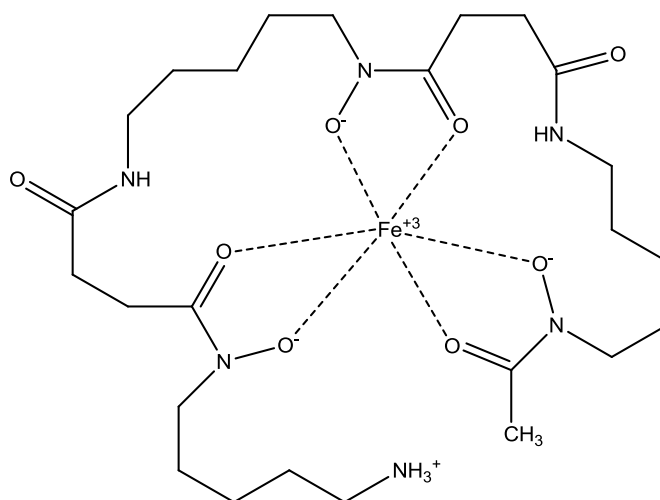
Jako první chelatační činidlo pro ionty železa se v klinické praxi začal používat deferoxamin a to ve formě soli jako deferoxamin mesylát (Obr. 3). Jedná se o přírodní látku izolovanou ze *Streptomyces pilosus*. Tento šestivazný ligand se třemi hydroxámovými funkčními skupinami vytváří komplexy s trojmocnými ionty železa případně i hliníku a to v molárním poměru 1:1 (Obr. 4). To znamená, že 1 g deferoxaminu může vázat až 85 mg Fe^{3+} . Dvojmocné ionty mají nižší afinitu k ligandu, což znamená, že tvoří méně stabilní komplexy než ionty trojmocné. Deferoxamin vytváří komplexy jak s volnými železitými ionty, tak se železem vázaným a to ve formě feritinu a hemosiderinu, železo z transferinu nebo hemoglobinu vázáno není. Vzniklý komplex je označován jako feroxamin. Navázané železo je vylučováno z největší části močí, menší množství odchází z těla stolicí (především důsledkem intrahepatální chelatace) [21, 25, 26].

Velkou nevýhodou je hydrofilní povaha molekuly deferoxaminu a taktéž jeho krátký plazmatický poločas. V praxi to znamená, že není možné podávání per os, v čemž hraje roli jak hydrofilita molekuly, tak nízká intestinální absorpce. Biologická dostupnost po perorálním podání je nižší než 2 %, proto je nutné deferoxamin aplikovat parenterálně a to jako pomalou podkožní infuzi nebo ve formě intramuskulárních injekcí, v krajních případech lze zvolit i intravenózní formu podání. Vzhledem k tomu, že subkutánní infuze trvají v průměru 8 až 12 hodin (přes noc), jsou aplikovány minimálně 5 dní v týdnu a léčba je dlouhodobá, compliance pacientů není příliš vysoká. Přičtou-li se k tomu nežádoucí účinky jako nevolnost, urtikárie, poruchy zraku a růstu, nabízí se prostor pro hledání léčiva s lepšími vlastnostmi, kde hlavním požadavkem bude perorální podávání [5, 21, 26].

Deferoxamin je k dostání pod obchodním názvem Desferal. Jedná se o lyofilizát určený pro přípravu injekčního roztoku. Pro rozpuštění použijeme předepsané množství vody pro injekce [26].



Obr. 3: Deferoxamini mesilas

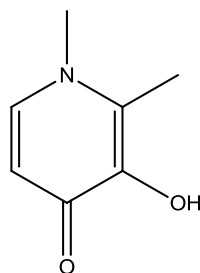


Obr. 4: Komplex deferoxaminu s železitým iontem

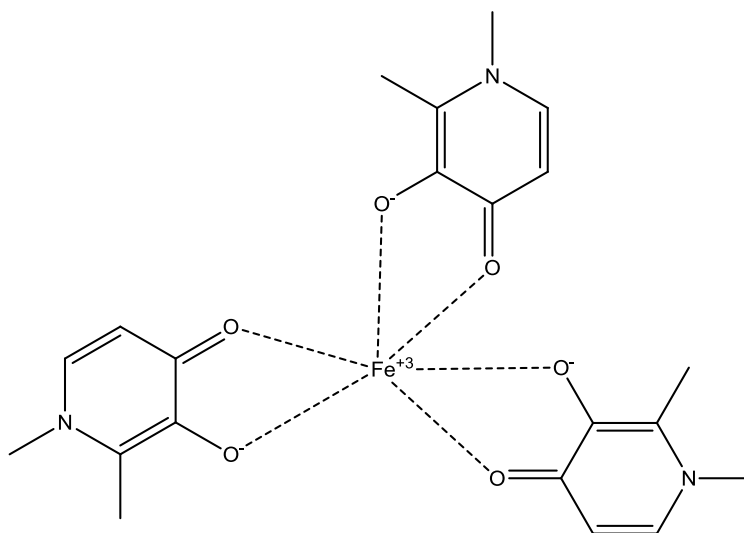
2.3.2 Deferipron

Pro pacienty, u kterých je kontraindikováno podávání deferoxaminu, je zde alternativa a tou je deferipron (Obr. 5). Jedná se o dvouvazný syntetický hydroxypiridon schopný vázat železité ionty v molárním poměru 3:1 (Obr. 6). Deferipron je velice dobře absorbován z trávicího traktu, a proto je jeho velkou výhodou perorální podávání. Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 45 až 60 minutách v případě užití léku nalačno, pokud je lék podán po jídle, prodlouží se tento interval až na 2 hodiny. Standardní dávka pro zabránění ukládání železa je 25 mg/kg podávaná třikrát denně.

Mezi nežádoucí účinky užívání deferipronu je zahrnována agranulocytóza, gastrointestinální potíže nebo arthropatie. Závažným rizikem je neutropenie, která byla zaznamenána přibližně u 5 % pacientů léčených deferipronem. Kvůli tomuto nežádoucímu účinku je nutné během léčby kontrolovat počet neutrofilních granulocytů a to pravidelně každý týden. Efektivita snižování koncentrace železa v organismu je srovnatelná s účinky deferoxaminu. Pro léčbu je velmi často využívána kombinace deferoxaminu s deferipronem v důsledku zvýšené clearance železa. Na trhu je dostupný pod komerčním názvem Ferriprox [5, 21, 27].



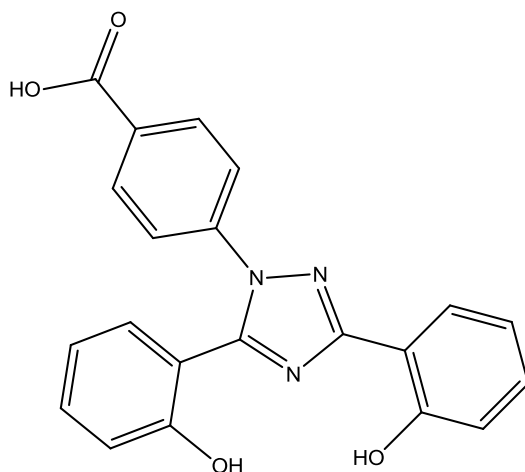
Obr. 5: Deferipron



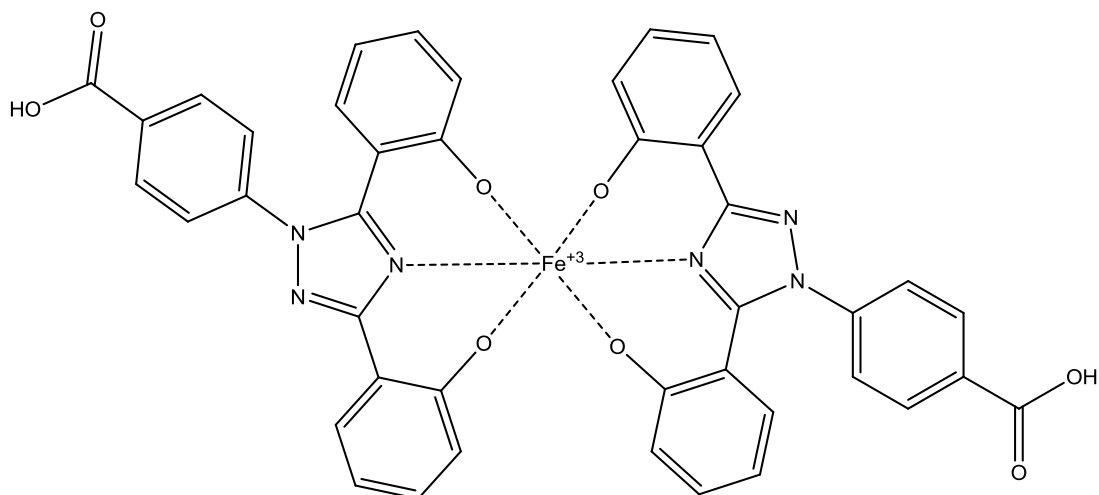
Obr. 6: Komplex deferipronu s železitým iontem

2.3.3 Deferasirox

Dalším zástupcem perorálních chelátorů železa je látka deferasirox (Obr. 7). Stejně jako předchozí dva zástupci vychytává především trojmocné železo. Toto trojvazné chelatační činidlo chelatuje železité ionty v molárním poměru 2:1 (Obr. 8). Deferasirox je absorbován v gastrointestinálním traktu a jeho vstřebávání je podpořeno užitím po jídle s vyšším obsahem tuku. Biologická dostupnost perorální formy je cca 70 % v porovnání s intravenózní aplikací. V krevní plazmě se váže na proteiny, především na albumin. Oproti předchozím zástupcům má odlišný způsob vylučování, vzniklé cheláty jsou vylučovány primárně stolicí. Velkou výhodou je, že se lék užívá pouze jednou denně, čímž roste compliance pacientů k léčbě. K častěji se vyskytujícím nežádoucím účinkům patří gastrointestinální diskomfort, vyrážka nebo zvýšené hodnoty kreatininu v krvi. Mezi závažnější problémy je řazen fakt, že je deferasirox toxický pro oči a uši a může způsobovat Fanconiho syndrom (renální tubulopatie). Dostupný je pod firemním názvem Exjade [5, 28].



Obr. 7: Deferasirox

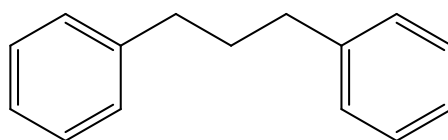


Obr. 8: Komplex deferasiroxu s železitým iontem

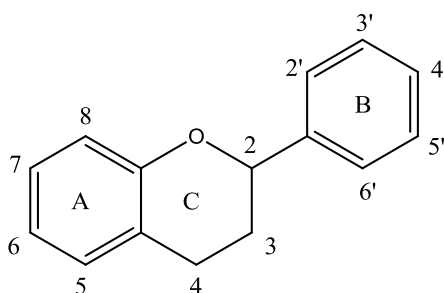
2.4 Charakteristika testovaných látek a jejich biologická aktivita

2.4.1 Flavonoidy

Rostliny produkují řadu látek s biologickou aktivitou, mezi rozsáhlou skupinu těchto sloučenin patří polyfenoly, sekundární metabolity rostlin. Jedná se o deriváty benzenu substituované hydroxylovými skupinami. Polyfenoly jsou rozdělovány na základní skupiny dle struktury jejich uhlíkového skeletu, a to na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany. Nejrozsáhlejší skupinu tvoří flavonoidy, které jsou deriváty difenylpropanu (Obr. 9) nebo fenylochromanu (Obr. 10). Základní struktura flavonoidů se skládá ze dvou benzenových kruhů spojených řetězcem tvořeným třemi uhlíky, který je většinou součástí pyranového jádra. V přírodě se vyskytují ve formě flavonoidních glykosidů. Nejčastější cukernou složkou je glukóza nebo rhamnóza vázaná v poloze 3. Dále může být substituována i molekula sacharidu například kyselinou benzoovou, malonovou nebo gallovou. Při substituci hydroxylovými skupinami a sacharidy dochází ke zvyšování rozpustnosti ve vodě. Dle předchozího výčtu je zřejmé, že se jedná o rozsáhlou skupinu látek s velice rozmanitým složením. Další členění flavonoidů může být následující: flavanoly, flavonoly, flavony, flavanony, anthokyanidiny, isoflavony [29, 30].



Obr. 9: Difenylypropan



Obr. 10: Fenylychroman

V přírodě jsou flavonoidy široce rozšířené, jsou obsaženy jak v ovoci, tak v zelenině. Mezi nejvýznamnější zdroje patří citrusové plody (pomeranč, grapefruit), slupka hroznového vína, jablka, bobulové plody jako například borůvky (obsahují hlavně antokyany), ze zeleniny sem náleží cibule, brokolice, špenát, kapusta nebo sója (isoflavony). Dalšími významnými pochutinami s obsahem flavonoidů jsou čaj a čokoláda. Je prokázáno, že konzumace potravin bohatých na flavonoidy prospívá lidskému zdraví. Flavonoidy působí pozitivně jako prevence mnohých nemocí, například alergií, kardiovaskulárních potíží, jaterních onemocnění, zánětů, dokonce i některých typů rakoviny. Za účinky flavonoidů stojí především jejich antioxidační aktivita, jsou schopny vychytávat volné radikály a také zabraňovat jejich vzniku. Již vzniklé volné radikály jsou flavonoidy neutralizovány díky jejich schopnosti uvolnit vodíkový atom, který následně reaguje s hydroxylovým radikálem za vzniku molekuly vody. Flavonoidy dokáží chelátovat ionty kovů, především železa a mědi, čímž zabraňují tvorbě volných radikálů. Tato schopnost je vázána na přítomnost fenolické skupiny v molekule flavonoidů. V neposlední řadě ovlivňují funkci řady enzymů a také napomáhají při regulaci buněčného cyklu [6, 31–33].

2.4.2 Metabolismus flavonoidů

Flavonoidní glykosidy jsou stabilní sloučeniny, které nejsou rozkládány vařením, ani kyselým pH žaludku. Jedná se o látky s různou strukturou, která významně ovlivňuje způsob absorpce. Flavonoidy se v přírodě vyskytují jako aglykony nebo s navázaným cukrem jako glykosidy. Až na flavanoly (katechiny, proantokyany) se flavonoidy vyskytují ve formě glykosidů. Metabolismus flavonoidních glykosidů a aglykonů je odlišný. Rozdílem je, že aglykony jsou na rozdíl od glykosidů omezeně absorbovány již ze žaludku. Z tenkého střeva jsou flavonoidy absorbovány z 2 – 15 %. U glykosidů existují dva způsoby absorpce. V rámci prvního dochází k odštěpení cukerné složky v tenkém střevě působením hydrolázy kartáčového lemu střeva, konkrétně se jedná o laktáza-florizin hydrolázu. Vzniklé aglykony jsou transportovány do enterocytů pasivní nebo usnadněnou difúzí. Alternativním způsobem dochází nejprve k transportu glykosidu do enterocytů díky transportéru cukrů, kterým je například transportér SGLT 1 (sodium – glucose linked transporter). Uvnitř buňky je molekula glykosidu štěpena cytosolickou β – glukosidázou na cukernou složku a aglykon. Ve větším množství jsou flavonoidy metabolizovány prvním způsobem. Z enterocytů jsou aglykony uvolňovány do krve a rozváděny po těle. V játrech dochází ke konjugaci aglykonů, ta je katalyzována transferázami, jako jsou UDP – glukuronosyl transferáza, sulfotransferáza nebo katecho – O – methyl transferáza. Tyto konjugáty jsou vylučovány žlučí zpět do střeva, kde mohou být v tenkém střevě znovu štěpeny, anebo pokračují do tlustého střeva. V tlustém střevě dochází k deglykosylaci působením střevní mikroflóry, následuje transport do enterocytů a z něho do krve. Alternativou je rozklad flavonoidů na jednoduché fenolické sloučeniny, které se poté taktéž transportují do buněk a následně do krve [31, 34].

2.4.3 Testované látky

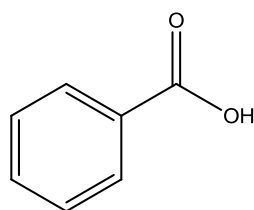
Z rozsáhlého množství polyfenolických látek byly pro tuto práci vybrány látky ze skupiny fenolických kyselin a to deriváty benzoové kyseliny. Tyto látky jsou v malé míře obsaženy přímo v rostlinách, ale také vznikají metabolismem flavonoidů v tlustém střevě. Fenolické látky byly vybrány proto, aby se zjistilo, zda jsou produkty rozkladu flavonoidů schopny chelatovat ionty železa v organismu, anebo zda je tato vlastnost vázána na složitější strukturu flavonoidů.

Mezi fenolickými kyselinami jsou rozlišovány dvě základní kategorie, kterými jsou deriváty kyseliny skořicové a deriváty kyseliny benzoové. Látky první zmíněné skupiny se v potravě vyskytují ve větším množství než deriváty benzoové kyseliny. Mezi hlavní zástupce derivátů kyseliny skořicové patří *p*-kumarová kyselina, dále kyselina kávová, sinapová nebo ferulová. Tyto látky se vyskytují především ve vázané formě a to jako glykosidy nebo estery. Přírodními zdroji těchto derivátů jsou káva, borůvky, kiwi, třešně, jablka nebo také obilná zrna. Nejvyšších koncentrací derivátů hydroxyskořicové kyseliny je dosaženo při růstu plodů, naopak v průběhu dozrávání ovoce dochází k poklesu obsahu těchto látek. Mezi deriváty kyseliny benzoové je řazena kyselina gallová nebo protokatechová. Obecně se tyto deriváty vyskytují v lidské stravě málo, jsou obsaženy v některém červeném ovoci, jako jsou borůvky nebo maliny a v malém množství v olivovém oleji. Nejvýznamnějším zdrojem hydroxybenzoových kyselin jsou listy čajovníku, které mohou obsahovat až 4,5 g kyseliny gallové na kilogram čerstvých listů. Jejich koncentrace v lidském organismu je však vyšší než tvoří jejich příjem v potravě, což je zapříčiněno právě metabolismem polyfenolických látek. Například kyselina protokatechová je hlavním metabolitem rozkladu antokyanů [35, 36]. Z tohoto důvodu nás v této práci zajímaly metabolity polyfenolických látek, pro náš výzkum jsme použili tyto látky:

Kyselina benzoová

Základním kamenem, od kterého je odvozena celá skupina polyfenolických kyselin, je právě kyselina benzoová (obr. 11). V přírodních zdrojích je obsažena v bobulovitých plodech, některém koření, listech čajovníku, kávových bobech, medu nebo houbách. Kyselina benzoová byla poprvé získána z pryskyřice obsažené v kůře stromů rodu *Styrax*. Pryskyřice benzoe, jak je také nazývána, se díky své vůni přidává do kadidel, nebo je využívána při výrobě parfémů, ve kterých slouží jako stabilizátor

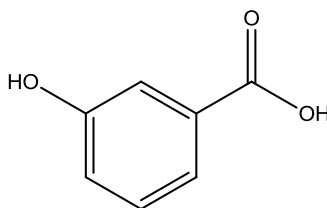
vůně. Obecně jsou rozlišovány dva druhy pryskyřice benzoe, kdy obě dvě mají článek v platném Českém lékopisu. Jedná se o benzoovou pryskyřici sumaterskou, získávanou ze *Styrax benzoin*, a benzoovou pryskyřici siamskou ze *Styrax tonkinensis*. Z obou těchto pryskyřic jsou připravovány odpovídající tinktury, *Benzois sumatrani tinctura* a *Benzois tonkinensis tinctura*. Syntetická kyselina benzoová se uplatňuje v potravinářství jako konzervační přísada, díky své schopnosti potlačit mikrobiální růst [37, 38].



Obr. 11: Kyselina benzoová

Kyselina 3 - hydroxybenzoová

Tato sloučenina je obsažena v avokádu, borůvkách, brusinkách, mišpulích a pivu. Je agonistou HCA receptorů (Hydroxy Carboxylic Acid receptors) na adipocytech. Aktivací těchto receptorů dochází k inhibici lipolýzy v adipocytech, z toho je vyvozeno, že kyselina 3 - hydroxybenzoová (Obr. 12) může mít pozitivní roli při kontrole dyslipidemie [39].

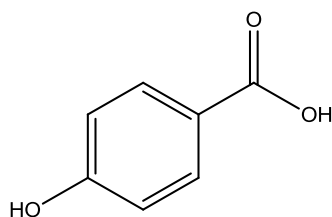


Obr. 12: Kyselina 3 – hydroxybenzoová

Kyselina 4 - hydroxybenzoová

Tato kyselina, označovaná také jako *p* - hydroxybenzoová (Obr. 13), se vyskytuje v rostlinách rodu *Vitex*, dále v třezalce tečkované (*Hypericum perforatum*),

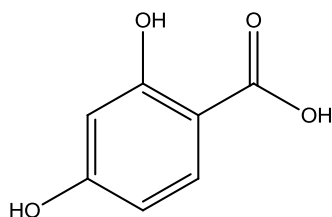
kokosovníku ořechoplodém (*Cocos nucifera*), některých houbách (*Ganoderma lucidum*, *Russula virescens*), nebo v oleji získávaném z plodů palmy acai (*Euterpe oleracea*). Při metabolismu katechinů obsažených v zeleném čaji je hlavním metabolitem právě kyselina 4 – hydroxybenzoová. Estery této kyseliny jsou hromadně označovány jako parabeny, používají se jako konzervační látky v kosmetice. Kyselina *p* - hydroxybenzoová má antioxidační účinky, na druhou stranu její estrogenní aktivita stimuluje růst nádorových buněk prsu [40].



Obr. 13: Kyselina 4 – hydroxybenzoová

Kyselina 2,4 - dihydroxybenzoová

Jedná se o produkt metabolismu antokyanů obsažených v plodech višně obecné (*Prunus cerasus*). Hlavním zástupcem těchto antokyanů je cyanidin, který je v organismu rozkládán na kyselinu protokatechovou, 2,4 - dihydroxybenzoovou (Obr. 14) a 2,4,6 - trihydroxybenzoovou [41].

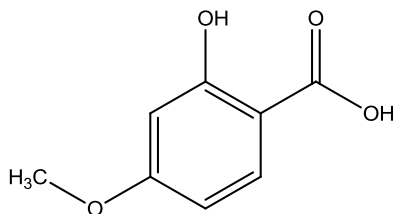


Obr. 14: Kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová

Kyselina 4 - methoxysalicylová

Kyselina 2 - hydroxy - 4 - methoxybenzoová (Obr. 15), jak je také označována, byla izolována z kořenů rostlin *Hemidesmus indicus*, *Periploca sepium* a z nadzemní části rostliny *Platycodon grandiflorum*. Bylo zjištěno, že tato látka má antioxidační

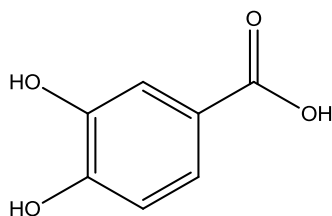
účinky a lze ji rovněž využít jako antidotum. Při testech na laboratorních potkanech byl zjištěn její pozitivní vliv na játra, ledviny a pankreas postižené onemocněním diabetes mellitus [42–45].



Obr. 15: Kyselina 4 – methoxysalicylová

Kyselina 3,4 - dihydroxybenzoová

Kyselinu protokatechovou (Obr. 16) nalezneme v kiwi, hořčičném semínku nebo pohance a jako většinu hydroxybenzoových kyselin také v červeném ovoci. Současně je hlavním metabolitem polyfenolických látek a to především antokyanů a procyanidinů. Má protizánětlivé, antioxidační a neuroprotektivní účinky. Při pokusech na laboratorních potkanech byly dokonce zjištěny i účinky antihiperglykemické [39].

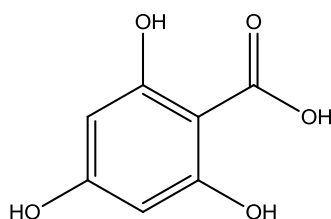


Obr. 16: Kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová

Kyselina 2,4,6 - trihydroxybenzoová

Tato kyselina, taktéž označovaná jako kyselina floroglucinová, je spolu s kyselinou protokatechovou produktem oxidace quercetinu. Ke vzniku této kyseliny dochází taktéž při metabolizaci katechinu bakteriemi *Acinetobacter calcoaceticus*. Bylo zjištěno, že při fermentaci zeleného a černého čaje dochází k rozkladu obsažených

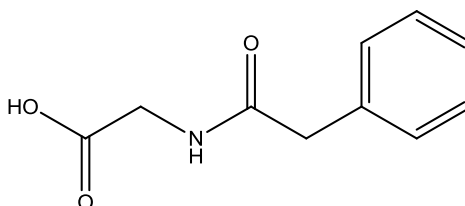
flavonoidů na jednoduché fenolické látky, mezi nimiž se objevuje i kyselina 2,4,6 - trihydroxybenzoová (Obr. 17) [31, 46, 47].



Obr. 17: Kyselina 2,4,6 – trihydroxybenzoová

Kyselina benzoylaminoctová

Kyselina hippurová, jak je kyselina benzoylaminoctová taktéž nazývána, je součástí moči, kde se její obsah zvyšuje po konzumaci potravin obsahujících fenolické sloučeniny, jako jsou čaj, víno nebo ovocné džusy. Rozkladem fenolických sloučenin dochází přes meziprodukty ke vzniku kyseliny benzoové, která je konjugována s aminokyselinou glycinem za vzniku kyseliny hippurové (Obr. 18), ta je poté z organismu vyloučena močí. Kyselina hippurová byla taktéž nalezena jako produkt fermentace citrusových plodů a rutinu. Koncentrace kyseliny hippurové v moči je využívána jako ukazatel při monitorování vystavení organismu toluenu [31, 48].



Obr. 18: Kyselina benzoylaminoctová

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je:

- Stanovit schopnost testovaných látek (kyselina benzoová, kyselina 3 – hydroxybenzoová, kyselina 4 - hydroxybenzoová, kyselina 2,4 - dihydroxybenzoová, kyselina 4 - methoxysalicylová, kyselina 3,4 - dihydroxybenzoová, kyselina 2,4,6 - trihydroxybenzoová a kyselina benzoylaminoctová) chelatovat železité a železnaté ionty při různých pH: 4,5, 5,5, 6,8 a 7,5.
- Porovnat naměřené hodnoty testovaných látek mezi sebou a v porovnání s železo – chelatační aktivitou deferoxaminu.
- Z naměřených hodnot odvodit vliv struktury testovaných látek na schopnost chelatovat ionty železa.
- Změřit schopnost testovaných látek redukovat železité ionty.

4 Experimentální část

4.1 Materiál

Mikrotitrační destičky

Mikropipety

Vícekanálové pipety

Špičky k mikropipetám, různé velikosti

Zkumavky Eppendorf o různém objemu

Zkumavky 15 ml s uzávěrem

4.1.1 Použité chemikálie

Použité chemikálie byly získány od výrobce Sigma–Aldrich (Německo)

DMSO (dimethylsulfoxid)

Ferozin (sodná sůl kyseliny 4,4'–(3–(2–pyridinyl)–1,2,4–triazin–5,6–diyl) bisbenzensulfonové)

Chlorid železitý ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Hydroxylamin chlorid ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$)

Síran železnatý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

HEPES (4–(2–hydroxyethyl)–1–piperazin ethansulfonová kyselina)

HEPES sodná sůl

Kyselina octová (CH_3COOH)

Octan sodný ($\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$)

4.1.2 Testované látky

Deferoxamin použitý jako standard byl získán od výrobce Novartis (Švýcarsko)

Testované látky: kyselina benzoová, kyselina 3 – hydroxybenzoová, kyselina 4 - hydroxybenzoová, kyselina 2,4 - dihydroxybenzoová, kyselina 4 - methoxysalicylová, kyselina 3,4 - dihydroxybenzoová, kyselina 2,4,6 - trihydroxybenzoová a kyselina benzoylaminoctová kyselina byly získány od výrobce Sigma–Aldrich (Německo)

4.1.3 Přístroje

Měření bylo prováděno spektrofotometrem Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

Pro přípravu vzorků byla využita třepačka mikrotitračních destiček MS 3 digital (IKA®– Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)

K usnadnění rozpouštění byla použita třepačka zkumavek VORTEX 3 (IKA®– Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo) a laboratorní ultrazvuková vana K-2L (Kraintek s.r.o., Podhájska, Slovensko)

4.2 Metody

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok železnatých iontů

- nejprve byl připraven roztok ze síranu železnatého o koncentraci 5mM rozpouštěním $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v destilované vodě
- pro další testování byl následně roztok zředěn na 250 μM
- molekulová hmotnost $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 278,02 g/mol

Zásobní roztok železitých iontů

- nejprve byl připraven roztok z chloridu železitého o koncentraci 5mM rozpouštěním $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v destilované vodě
- pro další testování byl roztok zředěn v čas potřeby na 250 μM
- molekulová hmotnost $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 270,29 g/mol

Zásobní roztok ferozinu

- roztok o koncentraci 5mM byl připraven rozpouštěním ferozinu v destilované vodě
- molekulová hmotnost ferozinu: 492,5 g/mol

Zásobní roztok hydroxylaminu

- roztok o koncentraci 10 mM byl připraven smísením hydroxylaminu s destilovanou vodou
- molekulová hmotnost $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$: 69,49 g/mol

Roztoky testovaných látek

- roztok o požadované koncentraci byl připraven rozpuštěním dané látky v DMSO

Roztoky pufrů pro pH 4,5 a 5,5

- smísením vodných roztoků octanu sodného a kyseliny octové byl připraven acetátový pufr, pH bylo upraveno pomocí pH metru

Roztoky pufrů pro pH 6,8 a 7,5

- smísením vodných roztoků HEPES sodné soli a HEPES kyseliny byl připraven HEPES pufr, pH bylo upraveno pomocí pH metru

4.2.2 Zkouška zásobních roztoků iontů železa

Zkouška pro železnaté ionty

Pro důkaz správnosti přípravy zásobního roztoku železnatých iontů je nutno provést kontrolu obsahu Fe^{2+} . Do jamky mikrotitrační destičky se napipetuje 150 μl pufru o pH 6,8, 50 μl připraveného zásobního roztoku železnatých iontů (250 μM) a 50 μl zásobního roztoku ferozinu (5 mM). Po napipetování se neprodleně měří absorbance při vlnové délce 562 nm. Pokud se hodnoty absorbance pohybují okolo hodnoty 1,0, roztok vyhovuje zkoušce a lze ho použít k dalšímu měření.

Zkouška pro železitě ionty

Pro důkaz správnosti přípravy zásobního roztoku železitých iontů je nutno provést kontrolu obsahu Fe^{3+} . Do jamky mikrotitrační destičky se napipetuje 150 μl pufru o pH 4,5, 50 μl připraveného zásobního roztoku železitých iontů (250 μM), 50 μl zásobního roztoku hydroxylaminu (10 mM) a 50 μl zásobního roztoku ferozinu (5 mM). Po napipetování se neprodleně měří absorbance při vlnové délce 562 nm. Pokud se hodnoty absorbance pohybují okolo hodnoty 1,0, roztok vyhovuje zkoušce a lze ho použít pro další měření.

4.2.3 Kalibrace železnatých iontů

Pro interpretaci výsledků je nutné vytvořit kalibrační křivku závislosti absorbance na koncentraci železnatých iontů. Za zásobního roztoku pro železnaté ionty byly připraveny roztoky o koncentracích: 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM a 250 μM . Současně se vytvořila kontrolní řada bez obsahu Fe^{2+} , místo zásobního roztoku železnatých iontů bylo napipetováno rozpouštědlo. Do jamek mikrotitrační destičky se

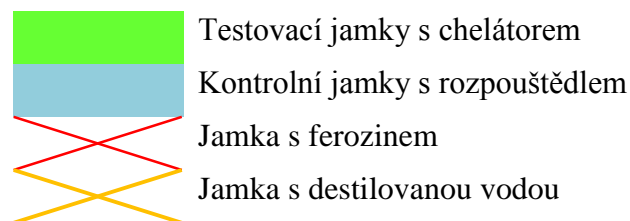
napipetuje 150 μl pufru o pH 6,8, 50 μl roztoku železnatých iontů o dané koncentraci a 50 μl zásobního roztoku ferozinu (5 mM). Pro kontrolu správnosti měření se vytvoří jamky se slepými vzorky, ty obsahují všechny výše uvedené složky až na ferozinu, místo kterého se použije destilovaná voda. Po napipetování se okamžitě měří absorbance při vlnové délce 562 nm. Z naměřených hodnot se sestaví graf závislosti absorbance na koncentraci železnatých iontů.

4.2.4 Chelatace železnatých iontů

S pufrů o pH 4,5, 5,5, 6,8

- 1) Měření probíhalo dle zobrazeného schématu (Obr. 19), kde pro každou koncentraci testované látky byly použity čtyři jamky, ze kterých vždy dvě byly testovací, obsahovaly zásobní roztok ferozinu a dvě slepé, kde byla napipetována místo ferozinu destilovaná voda. Pro kontrolu měření byly použity jamky bez obsahu chelátoru, místo kterého bylo pipetováno rozpouštědlo (DMSO).

Koncentrace testované	25 mM	10 mM	1 mM	0 mM
Ferozin				
Ferozin				
Slepé vzorky				
Slepé vzorky				



Obr. 19: Schéma rozložení na mikrotitrační destičce

- 2) Do všech jamek se napipetuje 150 μl daného pufru.
- 3) Do testovacích jamek se napipetuje 50 μl roztoku testovaných látek daných koncentrací (25 mM, 10 mM, 1 mM a 0 mM). Do kontrolních jamek se napipetuje 50 μl rozpouštědla (DMSO).

- 4) Následně se napipetuje 50 μl zásobního roztoku železnatých iontů (250 μM) do všech jamek.
- 5) Mikrotitrační destička se nechá dvě minuty třepat na třepačce.
- 6) V dalším kroku se přidá do testovacích jamek 50 μl zásobního roztoku ferozinu a do slepých jamek 50 μl destilované vody.
- 7) Neprodleně se měří absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 8) Absorbance se měří znovu po pěti minutách od napipetování ferozinu. Start druhého měření za 4 min 30 s.

S pufrům o pH 7,5

- 1) Měření probíhalo dle zobrazeného schématu (Obr. 19), kde pro každou koncentraci testované látky byly použity čtyři jamky, ze kterých vždy dvě byly testovací, obsahovaly zásobní roztok ferozinu a dvě slepé, kde byla napipetována místo ferozinu destilovaná voda. Pro kontrolu měření byly použity jamky bez obsahu chelátoru, místo kterého bylo pipetováno rozpouštědlo (DMSO).
- 2) Do všech jamek se napipetuje 150 μl pufru o pH 7,5
- 3) Do testovacích jamek se napipetuje 50 μl roztoku testovaných látek daných koncentrací (25 mM, 10 mM, 1 mM a 0 mM). Do kontrolních jamek se napipetuje 50 μl rozpouštědla (DMSO).
- 4) Napipetuje se 50 μl hydroxylaminu (10 mM) do všech jamek.
- 5) Následně se napipetuje 50 μl zásobního roztoku železnatých iontů (250 μM) do všech jamek.
- 6) Mikrotitrační destička se nechá dvě minuty třepat na třepačce.
- 7) V dalším kroku se přidá do testovacích jamek 50 μl zásobního roztoku ferozinu a do slepých jamek 50 μl destilované vody.
- 8) Neprodleně se měří absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 9) Absorbance se měří znovu po pěti minutách od napipetování ferozinu. Start druhého měření za 4 min 30 s.

4.2.5 Chelatace $\text{Fe}^{2+/3+}$ iontů

S pufrům o pH 4,5

- 1) Pro každou koncentraci testované látky byly použity čtyři jamky, ze kterých vždy dvě byly testovací, obsahovaly zásobní roztok ferozinu a

dvě slepé, kde byla napipetována místo ferozinu destilovaná voda. Pro kontrolu měření byly použity jamky bez obsahu chelátoru, místo kterého bylo pipetováno rozpouštědlo (DMSO).

- 2) Do všech jamek se napipetuje 150 μ l pufru o pH 4,5
- 3) Do testovacích jamek se napipetuje 50 μ l roztoku testovaných látek daných koncentrací (10 mM, 1 mM a 0,1 mM). Do kontrolních jamek se napipetuje 50 μ l rozpouštědla (DMSO).
- 4) Ze zásobního roztoku železitých iontů (5 mM) se naředí čerstvý roztok o koncentraci 250 μ M, kterého se napipetuje do všech jamek 50 μ l.
- 5) Mikrotitrační destička se nechá dvě minuty třepat na třepačce.
- 6) Následně se napipetuje 50 μ l zásobního roztoku hydroxylaminu (10 mM) do všech jamek.
- 7) Mikrotitrační destička se nechá ještě jednu minutu třepat na třepačce.
- 8) V dalším kroku se přidá do testovacích jamek 50 μ l zásobního roztoku ferozinu a do slepých jamek 50 μ l destilované vody.
- 9) Neprodleně se měří absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 10) Absorbance se měří znovu po pěti minutách od napipetování ferozinu. Start druhého měření za 4 min 30 s.

4.2.6 Redukce železitých iontů

S pufrů 4,5, 5,5, 6,8 a 7,5

- 1) Pro každou koncentraci testované látky byly použity čtyři jamky, ze kterých vždy dvě byly testovací, obsahovaly zásobní roztok ferozinu a dvě slepé, kde byla napipetována místo ferozinu destilovaná voda. Dále byly použity jamky bez obsahu chelátoru, místo kterého bylo pipetováno rozpouštědlo (DMSO). Jako kontrolní jamky jsou použity jamky s hydroxylaminem místo testované látky.
- 2) Do všech jamek se napipetuje 150 μ l daného pufru do testovacích jamek a 150 μ l pufru o pH 4,5 do kontrolních jamek.
- 3) Napipetuje se 50 μ l roztoků testovaných látek o dané koncentraci (25 mM, 2,5 mM, 0,25 mM, 0,025 mM a 0 mM) do testovacích jamek, kde se u koncentrace 0 mM pipetuje rozpouštědlo. Do kontrolních jamek se napipetuje 50 μ l zásobního roztoku hydroxylaminu.

- 4) Ze zásobního roztoku železitých iontů (5 mM) se naředí čerstvý roztok o koncentraci 250 μM , kterého se napipetuje do všech jamek 50 μl .
- 5) Mikrotitrační destička se nechá dvě minuty třepat na třepačce.
- 6) V dalším kroku se přidá do testovacích jamek 50 μl zásobního roztoku ferozinu a do slepých jamek 50 μl destilované vody.
- 7) Neprodleně se měří absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 8) Absorbance se měří znovu po pěti minutách od napipetování ferozinu. Start druhého měření za 4 min 30 s.

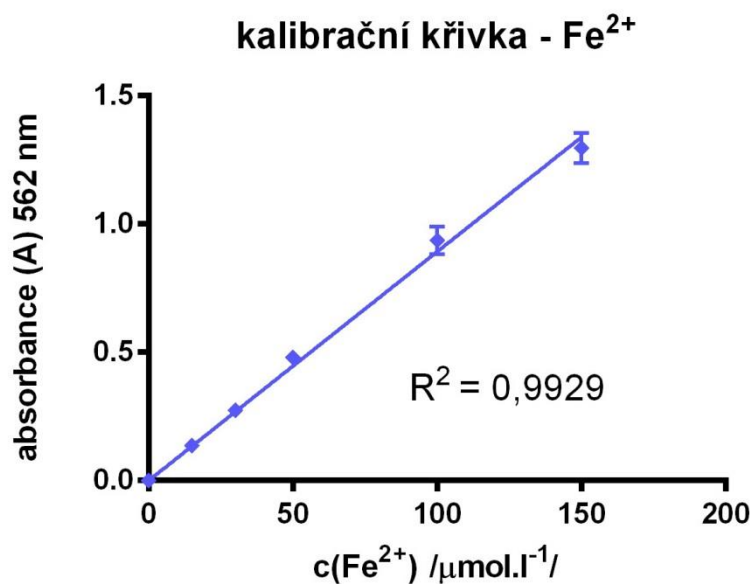
5 Výsledky

5.1 Kalibrační křivka železnatých iontů

Jedná se o graf závislosti absorbance na koncentraci železnatých iontů (Obr. 20). Byla změřena absorbance u koncentrací 0 μM , 15 μM , 30 μM , 50 μM , 100 μM a 150 μM . Hodnoty jsou zaznamenány v Tabulce 1. Z naměřených hodnot je patrné, že se jedná o lineární závislost.

$c(\text{Fe}^{2+})/\mu\text{mol.l}^{-1}$	0	15	30	50	100	150
Absorbance (A)	0	0,14	0,27	0,48	1,01	1,36
562 nm	0	0,14	0,28	0,48	0,92	1,31
	0	0,14	0,28	0,48	0,94	1,30
	0	0,13	0,27	0,48	0,88	1,22
Absorbance	0	0,1375	0,275	0,48	0,9375	1,2975

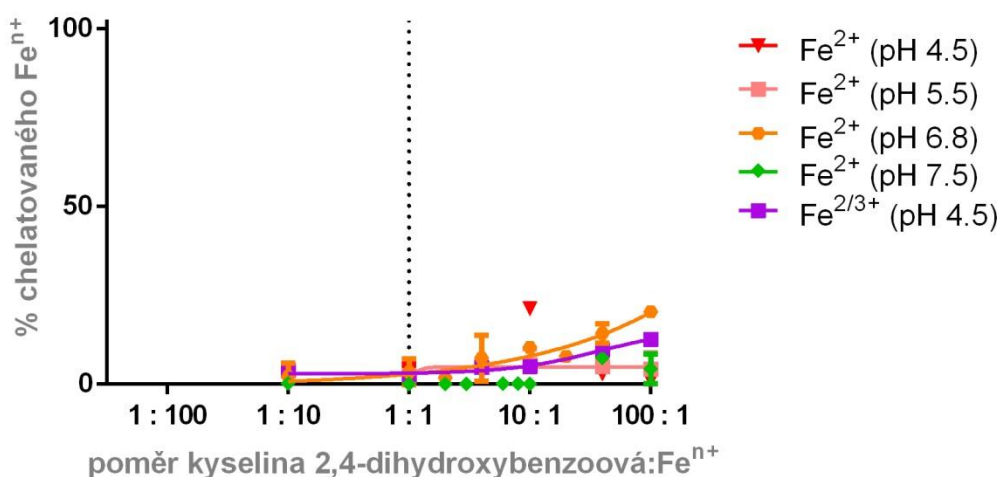
Tabulka 1: Naměřené hodnoty absorbance různých koncentrací železnatých iontů



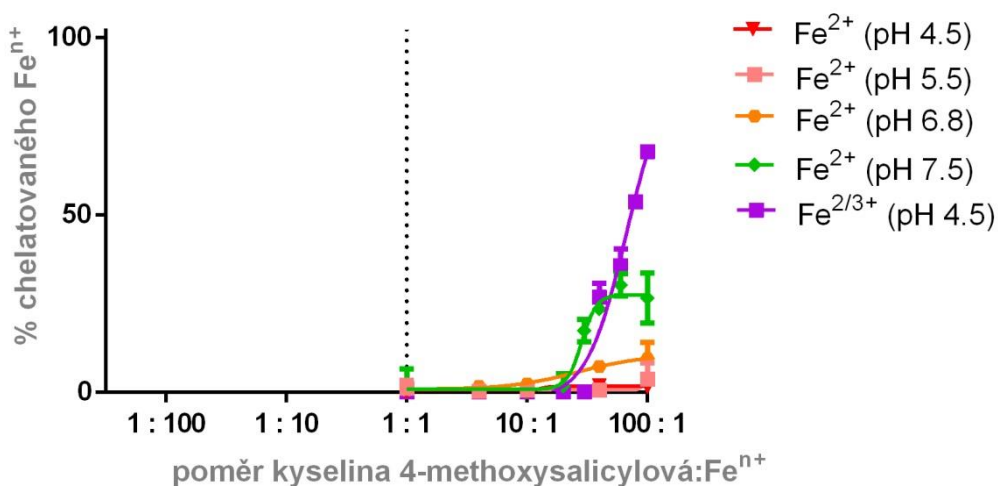
Obr. 20: Kalibrační křivka železnatých iontů

5.2 Chelatační účinnost testovaných látek

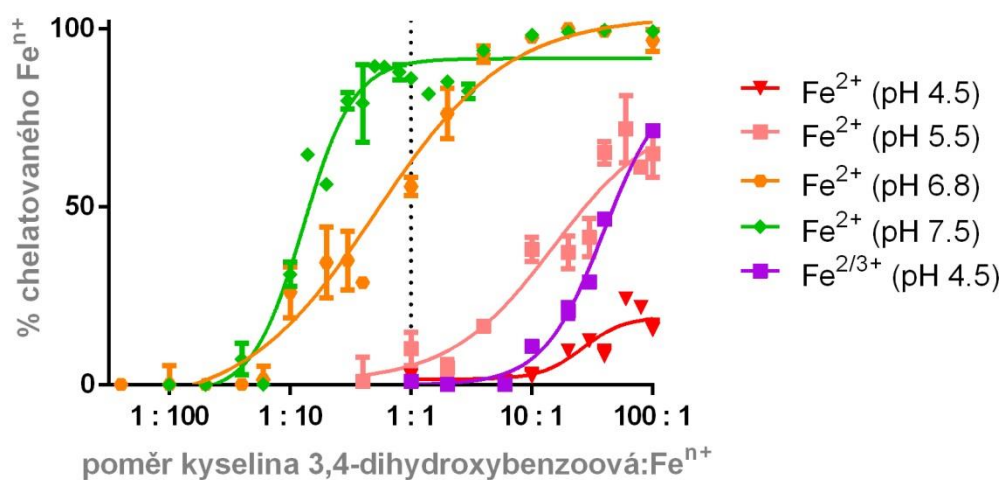
Mezi zkoumanými látkami vykazovaly chelatační aktivitu pouze kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová, kyselina 4 – methoxysalicylová a kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová, ostatní látky schopnost chelatovat ionty železa nevykázaly. Z naměřených hodnot u látek schopných chelatovat ionty železa byly sestaveny grafy (Obr. 21 – 23). Chelatační aktivita byla porovnávána s aktivitou deferoxaminu jako referenční látkou (Obr. 24).



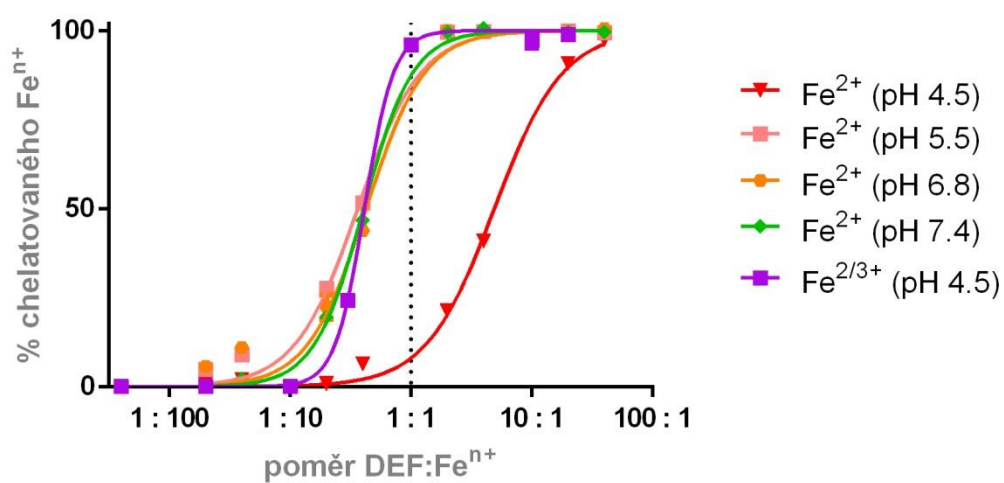
Obr. 21: Železo-chelatační aktivita kyseliny 2,4 – dihydroxybenzoové



Obr. 22: Železo-chelatační aktivita kyseliny 4 – methoxysalicylové



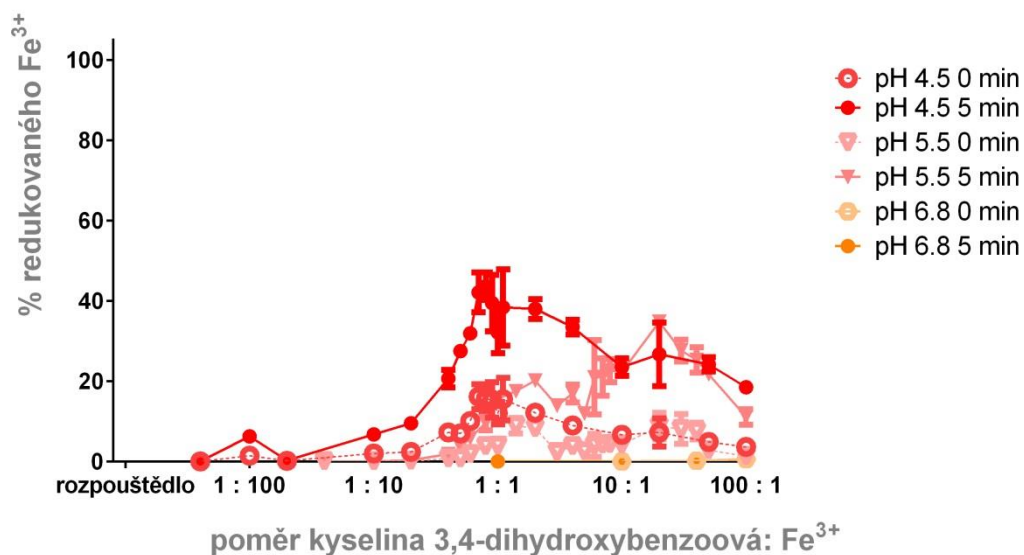
Obr. 23: Železo-chelatační aktivita kyseliny 3,4 – dihydroxybenzoové



Obr. 24: Železo-chelatační aktivita deferoxaminu

5.3 Redukční účinnost testovaných látek

U testovaných látek byly stanoveny i jejich redukční účinky. Ze všech těchto látek měla schopnost redukovat železité ionty pouze kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová. Z naměřených hodnot byl sestaven graf (Obr. 24).



Obr. 25: Redukční aktivita kyseliny 3,4 – dihydroxybenzoové

6 Diskuze

Flavonoidy jsou široce rozšířené přírodní látky, které jsou obsaženy v mnoha rostlinách, popřípadě jejich plodech. Z potravy je jich do organismu přijímáno značné množství. Z tohoto důvodu jsou podrobně zkoumány jejich účinky na lidské zdraví, mezi kterými nalezneme i výzkum jejich chelatační aktivity. Flavonoidy ale v organismu podléhají metabolismu a jsou rozkládány na jednoduché polyfenolické sloučeniny, jejichž účinky jsou zatím prozkoumány v menší míře. Cílem této práce bylo stanovit schopnost testovaných látek chelatovat železité a železnaté ionty, porovnat tuto schopnost s klinicky používaným chelátorem deferoxaminem a odvodit vztah struktury na chelatační aktivitu. Klinicky používaný deferoxamin je účinný, ale vzhledem k nežádoucím účinkům, nízké compliance pacientů a finanční náročnosti léčby se hledají nové alternativy. Dále byly testovány i redukční účinky testovaných látek.

Chelatační i redukční aktivita testovaných látek byla stanovena metodou mikrotitrace, detekce byla provedena spektrofotometricky. Indikátorem použitým v této práci byl ferozin, ten tvoří komplexy s železnatými ionty, které vykazují maximální absorpci při 562 nm. Při této vlnové délce bylo měřeno množství vzniklých komplexů s ionty železa, které nebyly vázány testovanými látkami. Lineární závislost absorbance na množství chelatovaných Fe^{2+} iontů byla ověřena naměřením kalibrační křivky (Obr. 20) s vysokou hodnotou spolehlivosti ($R^2=0,9929$). Použitý indikátor ferozin vytváří komplexy pouze s Fe^{2+} ionty, proto bylo při testování u pH 7,5 (riziko oxidace Fe^{2+}) a redukce použito redukční činidlo hydroxylamin. Měření probíhalo bezprostředně po přidání ferozinu a poté znovu po pěti minutách, kvůli možnému uvolnění železa z nestabilních komplexů.

Ze všech testovaných látek projevíly schopnost chelatovat železo pouze tři a to: kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová, kyselina 4 – methoxysalicylová a kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová. Všechny tři zmíněné látky vykazovaly vyšší schopnost chelatovat ionty železa při vyšších hodnotách pH, kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová při pH 6,8 a zbylé dvě látky při pH 7,5 (Obr. 21-23). K této skutečnosti dochází patrně proto, že při vyšším pH dochází ke snadnějšímu sdílení volného elektronového páru z hydroxylové skupiny a železo je tak snadněji vázáno do komplexů s chelátorem.

Chelatační aktivitu hodnotíme ze dvou hledisek, prvním hlediskem je množství chelatovaných iontů železa v procentech a druhým hlediskem je poměr testované látky

k iontům železa. Tento poměr nám značí, kolik molekul chelátoru je nutné pro navázání jedné molekuly železa. Z testovaných látek, které prokázaly chelatační aktivitu, projevila nejvyšší schopnost vázat ionty Fe^{2+} kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová, která byla schopna chelatovat téměř 100 % železa v poměru 1:1 při pH 7,5 (Obr. 23). Zbylé dvě látky neprokázaly tak vysokou chelatační aktivitu. Kyselina 4 – methoxysalicylová navázala 25 % iontů Fe^{2+} v poměru 100:1 při pH 7,5 (Obr. 22). Kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová nejlépe chelatovala při pH 6,8 a při poměru 100:1 navázala méně než 25 % iontů Fe^{2+} (Obr. 21). V porovnání s chelatační aktivitou deferoxaminu (Obr. 24) se jeho účinkům nejvíce přiblížila kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová. Zbylé dvě látky se deferoxaminu nevyrovnaly ani jedním parametrem.

Testována také byla schopnost chelatovat ionty železité a to při pH 4,5. Zde byla chelatační aktivita u testovaných látek mnohem nižší. U kyseliny 3,4 – dihydroxybenzoové a kyseliny 4 – methoxysalicylové byla zaznamenána obdobná schopnost vázat ionty $\text{Fe}^{2/3+}$. Obě látky navázaly přibližně 75 % iontů $\text{Fe}^{2/3+}$ v poměru 100:1 (Obr. 22,23). Co se týče kyseliny 2,4 – dihydroxybenzoové byla naměřena velice nízká chelatační aktivita, látka byla schopna navázat pouze méně než 25 % iontů $\text{Fe}^{2/3+}$ a to v poměru 100:1 (Obr. 21). DFO váže 100 % iontů $\text{Fe}^{2/3+}$ a to v poměru 1:1 (Obr. 24). Žádná z testovaných látek tedy nevykázala obdobnou účinnost.

Z naměřených hodnot lze odvodit závislost chelatační aktivity na struktuře látky. Všechny testované látky ve své struktuře obsahovaly šestiuhlíkaté aromatické jádro. Látky, které neměly aromatické jádro substituované hydroxylovou skupinou, nevykazovaly chelatační aktivitu, v našem případě kyselina benzoová a kyselina benzoylaminoctová. Stejně tomu bylo v případě látek, které měly na aromatickém jádře vázanu pouze jednu hydroxylovou skupinu, z testovaných látek se jedná o kyselinu 3 – hydroxybenzoovou a kyselinu 4 – hydroxybenzoovou. Chelatační aktivitu prokázaly látky substituované dvěma hydroxylovými skupinami na aromatickém jádře. Kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová prokázala vyšší schopnost vázat ionty železa než kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová, tuto skutečnost přisuzuji faktu, že jsou hydroxylové skupiny umístěny blíže k sobě než v případě kyseliny 2,4 – dihydroxybenzoové. Chelatační aktivitu také projevila kyselina 4 – methoxysalicylová, kde methoxylová skupina je stejně jako hydroxylová skupina schopná poskytnout elektronový pár. Methoxylová skupina je silnějším donorem než hydroxylová skupina, a proto se schopnost chelatace projeví již při monosubstituci methoxylovou skupinou.

Výše uvedené závislosti aktivity na struktuře se shodují s dříve publikovanými výsledky u flavonoidů, ze kterých naše testované látky vznikají [33].

Měření redukční aktivity probíhalo bezprostředně po přidání ferozinu a poté po pěti minutách. Z testovaných látek projevila redukční účinky pouze kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová. Redukce probíhala pouze při nízkém pH (4,5 a 5,5). Množství redukovaných iontů železa bylo větší vždy při měření po pěti minutách, protože jsou železité ionty nestabilní z důvodu jejich redukce světlem. K nejvyšší redukční aktivitě při měření bezprostředně po přidání ferozinu došlo při pH 4,5, kdy bylo redukováno 20 % Fe^{3+} v poměru 1:1. Při měření 5 minut po přidání ferozinu došlo k nejvyšší redukční aktivitě taktéž při pH 4,5, redukováno bylo 45 % Fe^{3+} v poměru 1:1. Vyšší schopnost redukovat se ještě projevila po pěti minutách při pH 5,5, kdy bylo redukováno 40 % Fe^{3+} v poměru 50:1 (Obr. 24).

Obecně lze prohlásit, že nejúčinnější chelátor z testovaných látek je kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová, jejíž výsledky jsou podobné výsledkům DFO. Ve struktuře jsou pro schopnost chelatace důležité substituenty s volnými elektronovými páry jako je hydroxylová nebo methoxylová skupina vázané na aromatickém jádře. Vzhledem k malému souboru testovaných látek je obtížné definovat vztah mezi strukturou a účinkem přesně. Při pH 7,5, kdy kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová prokázala nejvyšší chelatační aktivitu, se nežádoucí redukční aktivity obávat nemusíme. Schopnost redukovat Fe^{3+} ionty byla zjištěna při nižších pH a pohybovala se okolo 20 %.

Pro detailnější porovnání vztahu struktury a účinku by bylo potřeba testování většího souboru látek, zároveň nejsou v současné době k dispozici žádná data vhodná k porovnání s našimi výsledky. Je však možné porovnat chelatační aktivitu testovaných látek s flavonoidy, ze kterých tyto látky vznikají. Na příklad z publikovaných prací vyplývá, že katechiny chelatují přibližně 50 % iontů železa v poměru 2:1, nejsou tedy příliš silnými chelátory. Jejich metabolismem vzniká kyselina 4 – hydroxybenzoová, která nevykázala chelatační aktivitu. Naopak kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová, která je v neutrálním prostředí svou chelatační aktivitou srovnatelná s deferoxaminem, je hlavním metabolitem flavonoidu kvercetin. Dle výsledků z publikovaných prací bylo zjištěno, že kvercetin je v neutrálním prostředí taktéž chelatační aktivitou srovnatelný s deferoxaminem [33]. Z těchto výsledků vyplývá, že metabolismem chelatačně aktivních flavonoidů, vznikají metabolity schopné chelatovat ionty železa a naopak metabolismem neaktivních flavonoidů vznikají látky taktéž neaktivní.

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem železo – chelatační aktivity metabolitů flavonoidů, jedná se o malé polyfenolické látky. Pro tuto práci byly vybrány deriváty kyseliny benzoové: kyselina benzoová, kyselina 3 – hydroxybenzoová, kyselina 4 – hydroxybenzoová, kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová, kyselina 4 – methoxysalicylová, kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová a kyselina benzoylaminoctová. Z těchto látek vykazovaly chelatační aktivitu pouze kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová, kyselina 4 – methoxysalicylová a kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová. Veškeré výsledky byly porovnány s klinicky používaným chelátorem deferoxaminem jako standardem. Nejúčinnějším chelátorem byla kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová, která měla chelatační aktivitu blížíci se hodnotám deferoxaminu. U zbylých dvou látek byla schopnost chelatovat ionty železa v porovnání s deferoxaminem nízká. Chelatační aktivita byla měřena při různých pH prostředí, tato aktivita se zvyšovala se zvyšujícím se pH, neoptimálnější prostředí proto bylo pH 7,5.

Z naměřených hodnot jsme se pokusili vyvodit vztah mezi strukturou a účinkem. Nezbytné pro chelatační aktivitu se zdá být aromatické jádro substituované skupinami s volnými elektronovými páry. Ideální se jeví substituce dvěma hydroxylovými skupinami na sousedních uhlících aromatického jádra. Substituce pouze jednou hydroxylovou skupinou není pro účinek dostačující. Chelatační aktivitu jeví i substituce methoxylovou skupinou.

U testovaných látek jsme zjišťovali i jejich schopnost redukovat železité ionty, z důvodu možného vzniku nežádoucích volných radikálů. Jedinou látkou schopnou redukce byla kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová, která byla redukovala 20 % železitých iontů v poměru 1:1 při pH 4,5. Při vyšším pH k redukci nedocházelo.

8 Seznam zkratek

DMSO	dimethylsulfoxid
DMT 1	divalent metal transporter 1
HCA receptory	hydroxyl carboxylic acid receptors
HCP	heme carrier protein
HFE protein	human hemochromatosis protein
HJV	hemojuvelin
HO – 1	hemoxygenáza 1
IREs	iron responsive elements
IRPs	iron responsive proteins
SGLT 1	sodium – glucose linked transporter
TRF 2	transferinový receptor 2

9 Použitá literatura

- [1] Z. Wilhelm, “Co je dobré vědět o železe,” *Prakt. lékařství*, vol. 46, no. 1, pp. 41–44, 2007.
- [2] M. Penka and E. Tesařová, *Hematologie a transfuzní lékařství I.*, 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011.
- [3] E. Nečas and A. Kol., *Obecná patologická fyziologie*, 1. dotisk. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2007.
- [4] S. Silbernagl and F. Lang, *Atlas patofyziologie*, Překlad 2. Praha: Grada Publishing, a.s., 2012.
- [5] A. J. Baksi and D. J. Pennell, “Randomized controlled trials of iron chelators for the treatment of cardiac siderosis in thalassaemia major,” *Front. Pharmacol.*, vol. 5, Sep. 2014.
- [6] N. Sugihara, T. Arakawa, M. Ohnishi, and K. Furuno, “Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 27, no. 11–12, pp. 1313–23, Dec. 1999.
- [7] K. Macáková, P. Mladěnka, T. Filipický, M. Říha, L. Jahodář, F. Trejtnar, P. Bovicelli, I. Proietti Silvestri, R. Hrdina, and L. Saso, “Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols,” *Food Chem.*, vol. 135, no. 4, pp. 2584–2592, Dec. 2012.
- [8] T. Sedláčková and J. Racek, “Metabolismus železa a jeho regulace,” *Klin. Biochem. a Metab.*, vol. 38, no. 1, pp. 17–23, 2009.
- [9] P. Mladenka, R. Hrdina, M. Hübl, and T. Simůnek, “The fate of iron in the organism and its regulatory pathways.,” *Acta medica (Hradec Králové) / Univ. Carolina, Fac. Medica Hradec Králové*, vol. 48, no. 3–4, pp. 127–35, 2005.
- [10] KarenEC265, “Hematologic Pathology.” [Online]. Available: <https://quizlet.com/3430861/hematologic-pathology-flash-cards/>. [Accessed: 14-Feb-2016].
- [11] P. Mladenka, T. Simůnek, M. Hübl, and R. Hrdina, “The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism.,” *Free Radic. Res.*, vol. 40, no. 3, pp. 263–72, Mar. 2006.

- [12] M. m. Heeney, "Iron clad: iron homeostasis and the diagnosis of hereditary iron overload.," *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2014, no. 1, pp. 202–9, Dec. 2014.
- [13] J. Mačák and J. Mačáková, *Patologie*, 1.vydání ed. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004.
- [14] S. F. Leitman, "Hemochromatosis: the new blood donor.," *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2013, no. 1, pp. 645–50, Dec. 2013.
- [15] C. Casu and S. Rivella, "Iron age: novel targets for iron overload.," *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2014, no. 1, pp. 216–21, Dec. 2014.
- [16] J. Horák and A. Kol., *Hemochromatóza*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010.
- [17] T. Sundic, T. Hergiv, S. Hannisdal, J. Assmus, R. J. Ulvik, R. W. Olausson, and S. Berentsen, "Erythrocytapheresis compared with whole blood phlebotomy for the treatment of hereditary haemochromatosis.," *Blood Transfus.*, vol. 12 Suppl 1, pp. s84–9, Jan. 2014.
- [18] J. Marek and A. Kol., *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, 4. přeprac. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010.
- [19] Y. Aydinok, A. Kattamis, M. D. Cappellini, A. El-Beshlawy, R. Origa, M. Elalfy, Y. Kilinc, S. Perrotta, Z. Karakas, V. Viprakasit, D. Habr, N. Constantinovici, J. Shen, and J. B. Porter, "Effects of deferasirox-deferoxamine on myocardial and liver iron in patients with severe transfusional iron overload," *Blood*, vol. 125, no. 25, pp. 3868–3877, Jun. 2015.
- [20] Encyclopædia Britannica, "Chelate," *Encyclopædia Britannica Online*. [Accessed: 08-Feb-2016].
- [21] V. Corcé, S. G. Gouin, S. Renaud, F. Gaboriau, and D. Deniaud, "Recent advances in cancer treatment by iron chelators," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 26, no. 2, pp. 251–256, Jan. 2016.
- [22] H. Lüllmann, K. Mohr, and M. Wehling, *Farmakologie a toxikologie*, 1.české vy. Praha: Grada Publishing, a.s., 2002.
- [23] Q. Zhai, A. Narbad, and W. Chen, "Dietary Strategies for the Treatment of Cadmium and Lead Toxicity," *Nutrients*, vol. 7, no. 1, pp. 552–571, Jan. 2015.

- [24] F. Hupston, “Top foods that chelate the body of heavy metals,” 2013. [Online]. Available: http://www.naturalnews.com/038670_heavy_metals_chelation_foods.html#. [Accessed: 10-Mar-2016].
- [25] I. National Center for Biotechnology, “Deferoxamin mesylate,” *PubChem Compound Database*. [Online]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Deferoxamine_mesylate#section=Pharmacology-and-Biochemistry. [Accessed: 09-Feb-2016].
- [26] “SPC přípravku Desferal.” [Online]. Available: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0016470&tab=texts>. [Accessed: 09-Feb-2016].
- [27] “SPC přípravku Ferriprox.” [Online]. Available: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0029317&tab=texts>. [Accessed: 11-Feb-2016].
- [28] “SPC přípravku Exjade.” [Online]. Available: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0027803&tab=texts>. [Accessed: 11-Feb-2016]
- [29] M. Andjelkovic, J. Vancamp, B. Demeulenaer, G. Depaemelaere, C. Socaciu, M. Verloo, and R. Verhe, “Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups,” *Food Chem.*, vol. 98, no. 1, pp. 23–31, 2006.
- [30] K. Volf and F. Andrs, *Flavonoidy a jejich biologické působení*, Praha, 2015.
- [31] K. Gao, A. Xu, C. Krul, K. Venema, Y. Liu, Y. Niu, J. Lu, L. Bensoussan, N. P. Seeram, D. Heber, and S. M. Henning, “Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity.” *J. Nutr.*, vol. 136, no. 1, pp. 52–7, Jan. 2006.
- [32] M. Říha, J. Karličková, T. Filipický, K. Macáková, L. Rocha, P. Bovicelli, I. P. Silvestri, L. Saso, L. Jahodář, R. Hrdina, and P. Mladěnka, “In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 62, pp. 32628–32638, 2014.

- [33] P. Mladěnka, K. Macáková, T. Filipický, L. Zatloukalová, L. Jahodář, P. Bovicelli, I. P. Silvestri, R. Hrdina, and L. Saso, “In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, no. 5, pp. 693–701, May 2011.
- [34] G. Williamson, “Common Features in the pathways of absorption and metabolism of flavonoids,” in *Phytochemicals: Mechanisms of action*, CRC Press, 2004, pp. 21–29.
- [35] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, “Polyphenols: food sources and bioavailability,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 727–47, May 2004.
- [36] M. D’Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, and R. Masella, “Polyphenols, dietary sources and bioavailability,” *Ann. dell’Istituto Super. di sanità*, vol. 43, no. 4, pp. 348–61, 2007.
- [37] M. zdravotnictví ČR, *Český lékopis 2009*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009.
- [38] L. Crampton, “Health Effects of Benzoic Acid, Sodium Benzoate and Benzene,” 2014. [Online]. Available: <http://hubpages.com/health/Effects-of-Benzoic-Acid-and-Benzoates-in-Food-and-Medicines>. [Accessed: 08-Mar-2016].
- [39] B. H. Juurlink, H. J. Azouz, A. M. Aldalati, B. M. AlTinawi, and P. Ganguly, “Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system,” *Nutr. J.*, vol. 13, no. 1, p. 63, 2014.
- [40] the free encyclopedia Wikipedia, “4-hydroxybenzoic acid.” [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/4-Hydroxybenzoic_acid. [Accessed: 09-Mar-2016].
- [41] N. P. Seeram, L. D. Bourquin, and M. G. Nair, “Degradation Products of Cyanidin Glycosides from Tart Cherries and Their Bioactivities,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 10, pp. 4924–4929, Oct. 2001.
- [42] K. Kannabiran and M. Gayathri, “Effect of 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid from the roots of *Hemidesmus indicus* on streptozotocin-induced diabetic rats,” *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 71, no. 5, p. 581, 2009.
- [43] L. Wang, Z. Yin, L. Zhang, W. Ye, X. Zhang, W. Shen, and S. Zhao, “[Chemical constituents from root barks of *Periploca sepium*],” *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, vol. 32, no. 13, pp. 1300–2, 2007.
- [44] I. Mazol, M. Gleńsk, and W. Cisowski, “Polyphenolic compounds from *Platycodon grandiflorum* A. DC.,” *Acta Pol. Pharm.*, vol. 61, no. 3, pp. 203–8.

- [45] M. Gayathri and K. Kannabiran, "2-hydroxy 4-methoxy benzoic acid isolated from roots of *Hemidesmus indicus* ameliorates liver, kidney and pancreas injury due to streptozotocin-induced diabetes in rats.," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 48, no. 2, pp. 159–64, Feb. 2010.
- [46] I. G. Zenkevich, A. Y. Eshchenko, S. V. Makarova, A. G. Vitenberg, Y. G. Dobryakov, and V. A. Utsal, "Identification of the Products of Oxidation of Quercetin by Air Oxygen at Ambient Temperature," *Molecules*, vol. 12, no. 3, pp. 654–672, Mar. 2007.
- [47] M. Arunachalam, N. Mohan, R. Sugadev, P. Chellappan, and A. Mahadevan, "Degradation of (+)-catechin by *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1621, no. 3, pp. 261–265, Jun. 2003.
- [48] T. H. M. Database, "Hippuric acid." [Online]. Available: <http://www.hmdb.ca/metabolites/hmdb00714>. [Accessed: 09-Mar-2016].

10 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Nikol Vavřichová

Školitel: Ing. Kateřina Macáková Ph.D.

Název diplomové práce: Železo – chelatační účinky metabolitů flavonoidů – malých polyfenolických látek (2015/2016)

Železo je biogenní prvek nezbytný pro správnou funkci organismu. Neexistuje pro něj specifický vylučovací proces, proto se i nejmenší narušení rovnováhy projeví jeho nedostatkem, nebo nadbytkem v organismu. Nadbytek železa vede ke vzniku hemochromatózy, jejíž terapie je založena na použití železo – chelatačních látek. V současné době existují tři klinicky používané chelátory: deferoxamin, deferasirox a deferipron. Tyto látky však nejsou pro terapii optimální (nežádoucí účinky, nevhodná léková forma). Z tohoto důvodu je vytvořen prostor pro hledání nových léčiv.

Flavonoidy jsou přírodní látky mající pozitivní vliv na lidský organismus. Mezi nejvíce probádané účinky patří antioxidační a železo – chelatační aktivita. Flavonoidy se však v organismu rozkládají. Nasnadě je tedy otázka, zda jsou i metabolity flavonoidů schopny chelatovat ionty železa. Pro naši práci byly vybrány látky ze skupiny derivátů kyseliny benzoové: kyselina benzoová, kyselina 3 – hydroxybenzoová, kyselina 4 – hydroxybenzoová, kyselina 2,4 – dihydroxybenzoová, kyselina 4 – methoxysalicylová, kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová a kyselina hippurová. Chelatační aktivita byla měřena spektrofotometricky, jako indikátor byl použit ferozin. Výsledky byly porovnány s deferoxaminem jako standardem. Měření probíhalo při různých pH (4,5, 5,5, 6,8 a 7,5).

Nejvyšší chelatační aktivitu vykazovala kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová při pH 7,5. Výsledné hodnoty byly srovnatelné s deferoxaminem. Z výsledků byl odvozen vztah mezi strukturou a účinkem. Účinné byly látky s aromatickým jádrem substituovaným dvěma hydroxylovými skupinami (nejlépe na sousedních uhlících) nebo methoxylovou skupinou. Z těchto poznatků vyvozujeme, že je nezbytné, aby substituenty měly volné elektrony, které následně mohou sdílet s iony železa. Testována byla i redukční aktivita zmíněných látek z důvodu možných nežádoucích účinků. Schopnost redukovat železité ionty prokázala pouze kyselina 3,4 – dihydroxybenzoová a to při nízkých hodnotách pH, kdy redukovala pouze 20 % iontů.

11 Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical botanic and ecology

Candidate: Nikol Vavřichová

Supervisor: Ing. Kateřina Macáková Ph.D.

Title of diploma thesis: Iron – chelating effects of flavonoid metabolites – small polyphenolic substances (2015/2016)

Iron is a trace element which is necessary for function of an organism. There is no specific excretion mechanism for iron, therefore any deflection causes deficiency or abundance. Iron abundance leads to hemochromatosis. An application of iron chelators is a treatment of choice for hemochromatosis. There are three clinically used chelators for treatment of iron overload: deferoxamine, deferasirox and deferiprone. These drugs are inappropriate for therapy (side effects, dosage form). Therefore there is a place for searching for new types of medicine for treatment of hemochromatosis.

Flavonoids are natural substances with positive influence on a human organism. The most investigated effects are antioxidant and chelating activity. As flavonoids are metabolised in a human body, there is an arising question if flavonoid metabolites are also able to chelate iron ions. For this work we chose derivatives of benzoic acid: benzoic acid, 3 – hydroxybenzoic acid, 4 – hydroxybenzoic acid, 2,4 – dihydroxybenzoic acid, 4 – methoxysalicylic acid, 3,4 – dihydroxybenzoic acid and hippuric acid. Chelation activity was measured by spectrophotometry, using ferozine as an indicator. Results were compared with deferoxamine as standard. Our measurement was carried out in different pH levels (4,5, 5,5, 6,8, 7,5).

The best chelator of the tested substances was 3,4 – dihydroxybenzoic acid in pH 7,5. The results were compared to the values of deferoxamine. The structure influence on iron chelating activity was deduced from our results. The ability to chelate iron ions was shown up by the substances with aromatic ring having two hydroxyl groups or one methoxyl group. The highest chelating activity was observed on the substance having two hydroxyl groups bonded to the neighbouring carbons in an aromatic ring. These findings indicate that it is necessary for a substituent to have free electrons that can be shared with iron ions. Because of possible side effects the reducing activity was investigated. The ability to reduce ferric ions was observed only by 3,4 – dihydroxybenzoic acid and it was the highest in medium of low pH (4,5), whereby it has reduced 20% of ferric ions.