

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

CHELATACE ŽELEZNATÝCH IONTŮ DERIVÁTY XANTHEN-3-ONU

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Lucie Pohanová

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.

Ráda bych poděkovala doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování této diplomové práce. Mé poděkování patří též PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za příjemnou spolupráci při získávání údajů pro experimentální část práce.

Abstrakt v češtině

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Lucie Pohanová

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

Název diplomové práce: Chelatace železnatých iontů deriváty xanthen-3-onu

Železo je esenciální prvek, důležitý pro správnou funkci buněk. Dysbalance hladiny železa může vést k závažným onemocněním. Jelikož neexistuje exkreční mechanismus, je jeho homeostáza regulována na úrovni vstřebávání ve střevě. K nadbytku železa, který vede k poškození tkání z důvodu katalýzy tvorby volných radikálů, dochází z důvodu genetických onemocnění jako je hemochromatóza nebo při častém podávání transfúzí. Racionální terapií při přetížení železem je podávání jeho chelátorů.

Cílem této studie bylo zhodnotit schopnost derivátů 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-onu (syntetizovaných na Univerzitě v Sarajevu - Dr. Durić) chelatovat železo ve 4 (pato)fyziologických relevantních pH podmínkách. Ke stanovení míry chelatace byla použita ferozinová spektrofotometrická metoda.

Měření ukázalo závislost chelatačního účinku na pH. Se snižujícím se pH, chelatační účinek klesal. Při pH 7.5 prokázala většina látek 100% chelataci železnatých iontů ve stechiometrickém poměru 1:1. V prostředí s pH 6.8 byl chelatační účinek u všech látek slabší, největší efektivitu měly deriváty 4'-dimethylamino a 4'-trifluoromethyl. Při pH 5.5 poklesla tvorba komplexů u většiny látek na polovinu. Při pH 4.5 byla chelatační schopnost výrazně snížena.

Z výsledku vyplývá, že deriváty 4'-dimethylamino a 4'-trifluoromethyl prokázaly při vyšších pH nejefektivnější schopnost chelatace. Naproti tomu lze říci, že nebyly prokázány větší rozdíly v chelataci při modifikaci substituentů na 9-arylovém kruhu 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-onu.

Abstrakt v angličtině

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Lucie Pohanová

Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

Title of Thesis: Chelation of ferrous ions by xanthen-3-one derivatives

Iron is an essential element important for proper function of cells. Imbalance of iron levels can lead to serious diseases. Since there is no excretory mechanism, the homeostasis is regulated at the level of absorption in the intestine. The iron overload, which leads to tissue damage due to catalysis of the formation of free radicals, occur because of genetic disorders such as hemochromatosis or owing to frequent administration of transfusions. Rational therapy for iron overload is the administration of the chelators.

The aim of this study was to evaluate the ability of derivatives of 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-one (synthesized at the University of Sarajevo - Dr. Durić) to chelate iron in 4 (patho) physiologically relevant pH conditions. The ferrozine spectrophotometric method was used to determine the degree of chelation.

Measurements showed dependency of the chelating effect on pH: lowering pH resulted in the decrease of the effect. At pH 7.5, most of the substances showed 100% ferrous ion chelation in the stoichiometric ratio of 1 : 1. In the case of pH 6.8, the chelating effect of all substances was weaker, highest efficiency had 4'-dimethylamino and 4'-trifluoromethyl derivatives. At pH 5.5 the formation of complexes with most substances decreased by a half. At pH 4.5 the chelating ability was greatly reduced.

The results indicate that the derivatives 4'-dimethylamino and 4'-trifluoromethyl proved to be the most effective at high pH. In contrast, it can be said that there was no huge differences in the chelation due to the modification of substituents on the 9-aryl ring of 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-one.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část	2
2.1. Fyziologie železa	2
2.2. Reaktivita železa	5
2.3. Patofyziologie železa	6
2.3.1. Nedostatek železa	6
2.3.2. Nadbytek železa.....	8
2.5. Chelatace železa.....	9
2.5.1. Deferoxamin	10
2.5.2. Deferipron.....	11
2.5.3. Deferasirox.....	11
2.5.4. Kombinace v léčbě.....	12
2.6. Detekce železa	13
2.6.1. Ferozin	13
2.7. Deriváty xanthen-3-onu	14
3. Experimentální část.....	15
3.1. Cíl práce.....	15
3.2. Materiály a metodika	16
3.2.1. Použité chemikálie.....	16
3.2.2. Přístroj.....	17
3.2.3. Postup.....	17
3.2.4. Matematické zpracování a statistická analýza	19
3.3. Výsledky	20
3.4. Diskuze	28

3.5.Závěr	30
4.Použité zkratky	31
5.Literatura.....	32

1. Úvod

Železo je důležitý mikrobiogenní prvek lidského těla, zapojený v řadě biologických procesů. Podílí se na transportu kyslíku, přenosu elektronů v dýchacím řetězci a syntéze DNA. Jeho hladina v organismu je striktně regulována na úrovni vstřebávání v tenkém střevě. Železo nemá překvapivě v těle aktivní exkreční mechanismus, a tak je jeho vylučování dáno pouze pasivně odlučováním střevní a urogenitální sliznice.

V některých případech dochází k výkyvům této rovnováhy iatrogeně nebo v důsledku genetického onemocnění. Nebezpečí přináší nejen jeho nadbytek, ale i nedostatek. Nedostatečný přísun může vést k zastavení růstu buněk až k jejich odumírání. Při nadbytku hrozí ukládání železa do tkání a narušení jejich funkce. Jedním z mechanismů je schopnost železa katalyzovat tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS). Tyto produkty jsou velice reaktivní, mohou reagovat s aminokyselinami, lipidy, enzymy a narušovat jejich funkce.

Onemocnění jsou poměrně častá, a proto je zvýšený zájem o hledání účinné a bezpečné terapie. Nedostatek železa řešíme vyváženou stravou, potravními doplňky, léčivými s obsahem železa či v případě závažnějších poruch, např. tvorby hemoglobinu, pomocí krevních transfuzí. Při akutním nebo chronickém nadbytku železa se používají jeho chelátory nebo v některých případech flebotomie. Deferoxamin (DFO) je nejstarší používanou látkou s nutností parenterální aplikace. Novějšími perorálními chelátory jsou deferipron a deferasirox.

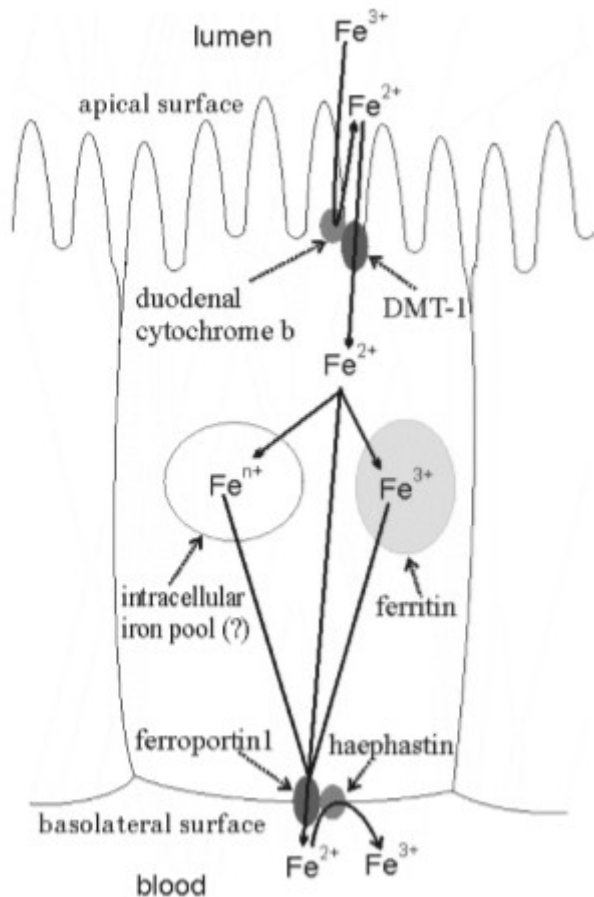
2. Teoretická část

2.1. Fyziologie železa

Železo je esenciální stopový prvek důležitý pro správné fungování buněk. Účastní se fyziologických procesů, především transportu kyslíku v hemoglobinu, tvorbě ATP v cytochromech a syntézy DNA. Homeostáza železa je klíčová, neboť jeho dysbalance je spojena se závažnými až život ohrožujícími stavy. Nedostatek železa při sníženém příjmu potravou, nedostatečné absorpci či ztrátách krve může vést k zastavení buněčného růstu. Zvýšená hladina je pro organismus riziková pro jeho potenciál katalyzovat tvorbu volných radikálů, které způsobují oxidaci a poškození buněk (Mladěnka et al. 2005).

Jako přirozenou součást potravy můžeme železo přijímat ve dvou hlavních formách, hemové a nehemové. Mezi nejbohatší železo obsahující potraviny patří libové maso, mořské plody, ořechy, fazole a celozrnné obiloviny (*U.S. Department of Health & Human Services*. 2016). Množství železa v organismu se liší podle hmotnosti, pohlaví, hladiny hemoglobinu a velikosti zásob v organismu (Cairo et al. 2014). Tělo dospělého člověka obsahuje 3-4 g železa, což je oproti ostatním přechodným kovům nejvyšší množství (Hirayama a Nagasawa 2017). Muž s průměrnou výškou má asi 4 gramy, ženy 3.5 gramu a děti 3 gramy a méně. Toto množství je v těle vázáno v krvi v hemoglobinu a transferinu, v tkáních pak ve ferritinu, hemosiderinu a enzymech a ve svalech v myoglobinu (webová strana Iron Disorders Institute 2009).

Po příjmu potravou dochází ke vstřebávání v horní části tenkého střeva přes enterocyty. Pokud je železo přijímáno ve formě železitých iontů, dochází nejprve k jejich redukci pomocí duodeálního cytochromu b, který je umístěn na apikální straně enterocytů v blízkosti transportního proteinu DMT1 (divalent metal transporter 1), nebo pravděpodobně také za pomoci reduktantů přítomných v potravě (např. vitamin C). Po transportu do vnitřního prostoru buňky, je železo buď využito, uskladněno nebo uvolněno do cirkulace. Jeho „vnitřní zásobárnou“ je feritin, komplex trojmocného železa a proteinu apoferritinu. Transmembránový protein ferroportin 1 umožňuje vstup do cirkulace a navázání na transferin, což je hlavní extracelulární transportní protein železa (viz Obr. 1) (Mladěnka et al. 2005).



Obr. 1: Schéma ukazující absorpci železa v lumenu tenkého střeva a jeho přechod enterocytem. Převzato z Mladěnka (2005). Železo ve formě železitých iontů musí být nejprve redukováno duodenálním cytochromem b na apikální straně membrány. Pomocí dvojmocného transportéru kovů DMT-1 jsou redukované železnaté ionty transportovány skrz membránu enterocytů. Železo může být v buňce začleněno do feritinu, stát se součástí intracelulární labilní složky železa, nebo rovnou transportováno do krve.

Komplex železa a transferinu je portální krví dopraven do jater nebo tkání. Pomocí transferinového receptoru 1 (TFR1) na povrchu buněk dochází k endocytóze tohoto komplexu. K uvolnění železa do cytosolu je potřeba acidifikace endosomu a pravděpodobně zapojení stejného transportéru jako v případě absorpce - DMT1. V buňkách může být železo použito k syntéze proteinů, uskladněno jako feritin, nebo je efluxním transportérem ferroportinem opět transportováno do oběhu. V kmenových buňkách erytroidní linie je popsána navíc redukce endosomální ferrireductasou Steap3, jinak je proces stejný. Při syntéze červených krvinek je nutný transport železa do mitochondrií, kde se zapojuje do biosyntézy krevního barviva hemu a Fe-S

proteinových klastrů. Staré erythrocyty jsou fagocytovány retikuloendoteliálními makrofágy a uvnitř fagolysosomu je hemoglobin degradován. Štěpením protoporphyrinového kruhu hemové skupiny je železo uvolněno a následně transportováno do systémového oběhu nebo skladováno. Zmíněné makrofágy jsou rezervoárem až poloviny železa v těle (Collins et al. 2010).

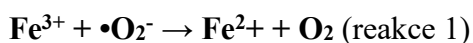
Významnou funkci má hematoencefalická bariéra, která odděluje mikrocirkulaci a mozkovou tkáň. Mezi endoteliálními buňkami jsou tzv. těsné spoje (tight junction) a systém efluxních a influxních mechanismů pro striktní regulaci transportu látek z krve do mozkové tkáně. Regulace hladiny železa prostupující do mozku je klíčová, nerovnováha může vést k neurologickým onemocněním jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba. Další podstatnou biologickou membránou a součástí reprodukčního systému je placenta, orgán pro výživu plodu. Transport placentou probíhá v případě železa jednosměrně z matčiny krve do krve plodu a výhradně za účasti transferinu. Množství receptorů pro transferin na matčině straně placenty udává potřeba plodu. Prioritně je v těhotenství železo dodáváno plodu, syntéza hemoglobinu matky a tvorba dalších železo vyžadujících molekul je až sekundární, proto je často vhodná suplementace železa v těhotenství, i když se předpokládá jeho zvýšená absorpce (Duck a Connor 2016).

Potřeba železa především pro erythropoézu je kontrolována hepcidinem, peptidovým hormonem syntetizovaným v játrech. Inhibuje uvolňování železa z enterocytů a důležitých zásobních míst v těle. Autokrinní aktivitou ovlivňuje hepatocyty a endokrinně působí na makrofágy retikuloendoteliálního systému. Také je diskutována jeho role jako mediátoru u vrozené imunity (Collins et al. 2010, Ganz 2003). Je-li hladina železa vysoká, kostní morfogenetický protein (BMP) fosforyluje protein Smad, což vede ke zvýšení exprese hepcidinu. Vazbou na ferroportin vyvolává jeho internalizaci, zabraňuje tím vstřebávání a uvolnění železa z enterocytů do oběhu (Andriopoulos et al. 2009, Nemeth et al. 2004, Pigeon et al. 2001). Pokud se hladina železa sníží, dojde k supresi produkce hepcidinu (Frazer et al. 2002). Ferroportin je opět přítomem na bazolaterální membráně enterocytů a železo tak může být transportováno z cytoplazmy enterocytů do oběhu (Sedláčková a Racek 2009).

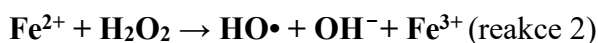
2.2. Reaktivita železa

Existuje obecná shoda, že přechodné kovy mohou vyvolat tvorbu volných radikálů. Železo má schopnost přijmout nebo darovat elektron a konvertovat se tak mezi oxidačními stavy železnatých (Fe^{2+}) a železitých (Fe^{3+}) iontů. Vzhledem k tomu, že železité ionty jsou relativně biologicky inaktivní formou, železnaté ionty jsou zodpovědné za vytvoření části reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou vést k peroxidaci lipidů a poškození nukleových kyselin či proteinů (Hippeli a Elstner 1999, Mladěnka et al. 2005).

Železo se zásadním způsobem podílí na tvorbě ROS, včetně superoxidu ($\bullet\text{O}_2^-$), peroxidů (H_2O_2 a ROOH) a volných radikálů ($\text{HO}\bullet$ a $\text{RO}\bullet$) (Dixon a Stockwell 2014). Superoxid snadno vzniká jedoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku. S železitými ionty může iniciovat další kaskádu oxidačního stresu redukcí železitých iontů (reakce 1). K jeho produkci také obvykle dochází působením NADPH-oxidázy při zánětu s přítomnými neutrofily a makrofágy, nebo enzymem xanthinoxidázou.



Peroxid vodíku, který vzniká dismutací superoxidu nebo produkcí některých enzymů, je převeden na hydroxylový radikál Fentonovou reakcí (reakce 2), která vyžaduje přechodné kovy, např. právě železnaté ionty. Dvojmocné železo se také může vázat na molekulární kyslík a vytvářet velmi reaktivní perferyl ionty.



Haberova-Weissova reakce je souhrnný název pro reakce 1 a 2, kde superoxid reaguje s peroxidem vodíku za přítomnosti železnatých iontů na hydroxylový aniont a velmi reaktivní hydroxylový radikál. Železo je uvolňováno vlivem superoxidu z Fe-S klastrů různých enzymů. Ty obsahují ionty železa jako součást prostetických skupin sloužících k přenosu elektronů (Hippeli a Elstner 1999, Mladěnka et al. 2006).

2.3. Patofyziologie železa

2.3.1. Nedostatek železa

Deficit železa je jedním z nejrozšířenějších potravních problémů a nejčastější příčinou anémie. Více než dvě miliardy lidí v rozvojových i rozvinutých zemích trpí anemií z nedostatku tohoto esenciálního prvku (WHO, 2017).

Anémie je nejčastější hematologická porucha široké etiologie. Nejjednodušší je její morfologické rozdělení podle velikosti erytrocytů na normocytární, mikrocytární a makrocytární, Podle koncentrace hemoglobinu se může dělit na normochromní, hypochromní a hyperchromní. Nejčastějším typem je již zmíněná anémie z nedostatku železa, následovaná talasemií a anemií chronických onemocnění. Sedmdesát procent všech hospitalizací je způsobeno právě nedostatkem železa nebo chronickým onemocněním (van Hove et al. 2000).

2.3.1.1. Anémie z nedostatku železa

Anémie je charakterizována sníženou koncentrací hemoglobinu (Hb) pod 130 g/L u dospělých mužů, 120 g/L u dospělých žen a při těhotenství pod 110 g/L (WHO, 2011). Nízkých hodnot dosahuje také hematokrit a celkově dochází ke snížení až vyčerpání zásobních forem železa (Braga a Taddei 2011). Dalšími parametry pro určení diagnózy je hladina feritinu v séru a celková vazebná kapacita pro železo (TIBC – z anglického Total Iron Binding Capacity) na transferinu. Dobrým ukazatelem také bývá hodnota sérového feritinu, ale v případě zánětu, malignit nebo onemocnění jater může být falešně pozitivní (Guyatt et al 1992). Nadějně jsou nové diagnostické metody, například měření retikulocytů, což jsou nevyzrálé erytrocyty cirkulující 1-2 dny v periferní krvi, pomocí průtokové cytometrie (Brugnara et al. 1994).

Mezi rizikové skupiny patří jedinci s nízkou rozmanitostí potravy, děti, kojící a těhotné ženy, a ženy s těžkými menstruacemi (Camaschella 2017). Ke ztrátám železa dochází i u lidí s nenápadným vnitřním krvácením, chronickými chorobami, gastritidou a malabsorpčním syndromem, jako je celiakie. Další příčinou je snížená střevní absorpce či zvýšené nároky organismu (Bermejo a Garcia-Lopez 2009). Léčba zahrnuje primárně odstranění příčin ztrát krve a zároveň nutnost zvýšeného příjmu železa, nejčastěji ve formě perorálních tablet. Jen u závažných případů je nutno zvolit parenterální terapii (Čermák et al. 1994).

2.3.1.2. Hemoglobinopatie

Beta-talasemia major je jednou z nejčastějších dědičných nemocí, vyznačující se nedostatečnou syntézou hemoglobinového řetězce a neefektivní erytropoézou (Rund a Rachmilewitz 2005). Existuje řada genetických variant talasemie související s hemoglobinem (Hb) a jeho řetězci (α , β , γ , δ a ϵ). Různé talasemií mají variabilní patologický dopad, od mírné a asymptomatické anémie až k smrti jedince. Hlavní skupina pacientů s talasemií má život ohrožující klinické projevy, které vyžadují celoživotní léčbu pravidelnými krevními transfúzemi (Kontoghiorghe a Kontoghiorghes 2016a). Beta-thalassemie major patří mezi nemoci s nejvyšší mortalitou a morbiditou z této skupiny, a to jak z důvodu její genetické příčiny, tak z následků hromadění železa při léčbě transfúzí (Kontoghiorghe a Kontoghiorghes 2016b).

Srpkovitá anémie je dědičná chronická hemolytická anémie, jejíž příčinou je substituce jedné aminokyseliny v beta-globinovém řetězci a produkci abnormálního hemoglobinu S (HbS). Na rozdíl od normálního hemoglobinu, HbS polymeruje při nízké hladině kyslíku a způsobuje přeměnu normálně pružných červených krvinek na tuhé struktury srpkovitého tvaru, které zabraňují dostatečné mikrocirkulaci krve. Tento klinický proces je kontinuální, objevují se však epizodické exacerbace, které mohou vést k závažné vazookluzi a bolesti, plicnímu selhání, či mrtvici (Powars et al. 2005). Veškeré pozorované komplikace jsou způsobené vaskulárním onemocněním a nekrózou tkání, ke které dochází v důsledku chronicity (Detterich et al. 2015). Cílem léčby je zmírnění symptomů, prevence a zastavení komplikací. Obecnou terapií srpkovité anémie je podávání krevních transfúzí (de Montalembert et al. 2011).

2.3.2. Nadbytek železa

Onemocnění z nadbytku železa má mnohé příčiny. Důvodem mohou být genetické poruchy jako je hereditární hemochromatóza, chronická léčba transfúzemi, či chronická hepatitida (Mobarra et al. 2016).

2.3.2.1. Hemochromatóza

Mezi nejčastější genetické poruchy patří hereditární hemochromatóza spojená s mutací genu HFE. U nemocných dochází ke zvýšenému vstřebávání železa v duodenu a jeho následnému hromadění v organismu. V dospělosti se objevují první nespecifické příznaky jako je únava, bolest kloubů, erektilní dysfunkce a ukládání kožního pigmentu. S postupem času dochází k závažnějším projevům. S hromaděním železa v játrech je spojena jejich fibrotizace až cirhóza, poškození srdečních buněk způsobuje arytmie a zásah do endokrinního systému může vést ke vzniku diabetes mellitus či hypotyreóze (Feder et al. 1996). V léčbě hemochromatózy může být účinná flebotomie a erythroferéza (60). Při intoleranci či selhání bývají do terapie zařazeny chelátory železa (Cançado et al. 2015, Fabio G et al. 2007).

Další genetickou příčinou může být africký typ hemochromatózy, nedostatek enzymů (pyruvát kinázy, glukóza-6-fosfátdehydrogenasy /G6PD/) a vzácné poruchy transportních proteinů (atransferinemie, aceruloplasminemie) (Mobarra et al. 2016).

2.3.2.2. Sekundární přetížení železem

Sekundární nadbytek železa často vzniká při nekompenzované transfúzní terapii. Terapie zlepšuje kvalitu života a prodlužuje délku života, je ovšem spojena s výskytem sekundárního přetížení železem a jeho následky (Kushner et al. 2001). Opakované transfúze mohou vést k toxickému vlivu železa na játra, slezinu, srdce a endokrinní systém. Depozita železa v srdci dávají podklad vzniku kardiomyopatii, jenž je hlavní příčinou morbidity a mortality u pacientů s thalassemií. Následné městnavé srdeční selhání tvoří až 70% úmrtí. Endokrinní komplikace zahrnují sekundární hypogonadismus, malý vzrůst, diabetes mellitus a hypotyreózu. Proti těmto komplikacím chronické infúzní terapie se využívá chelatační léčby (Galanello a Origa 2010, Toumba et al. 2007).

2.5. Chelatace železa

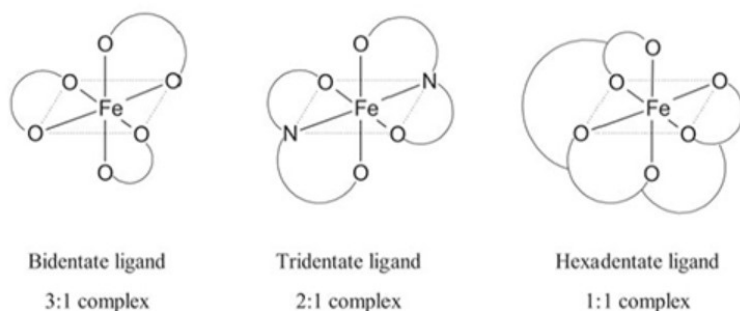
Při chelataci se tvoří komplex, kde je centrální iont přechodného kovu asociován s několika nabitými nebo nenabitými atomy, molekulami či ionty tzv. ligandy. Ligand je buď elektroneutrální molekula, anebo aniont a poskytuje elektronové páry pro vytvoření donor-akceptorové koordinační vazby s centrálním atomem. Podle počtu elektron-donorových atomů se ligandy dělí na monodentální, bidentální a multidentální. (viz Obr. 2) (Andersen 1999, Blažek 2004). Železo může vázat koordinační vazbou až šest ligandů za vzniku oktahedrálního uspořádání. Nejvyšší afinita se tedy očekává u hexadentálního ligandu, vázající železo v poměru 1:1. Chelatační činidla bidentální (poměr 3:1) nebo tridentální (poměr 2:1), která se váží pouze na dvě nebo tři z dostupných míst, mohou v případě nízké koncentrace potencovat redoxní mechanismus a tím podporovat vznik volných radikálů (Hider a Zhou 2005). Nicméně, obsazení všech koordinačních míst s vytlačněním molekul vody v první sféře, vylučuje navázání peroxidu na komplex železnatých iontů s chelátorem a následné pokračování Fentonovy reakce (Graf et al. 1984).

Látky schopné chelatovat železo jsou chemicky rozmanité struktury, společný je obvykle typický výskyt kyslíku, dusíku nebo síry, jakožto donorových atomů. Druh donorového atomu ovlivňuje preferenci ligandu k Fe (II) nebo Fe (III) oxidačnímu stavu (Kalinowski a Richardson 2005).

Chelatační činidla jsou buď přírodní sloučeniny, odvozené od mikroorganismů (siderofory), anebo syntetického původu (Hatcher et al. 2009). V současné terapii se používají deferoxamin, deferipron, deferasirox a jejich kombinace (Botzenhardt et al. 2016). Vhodné vlastnosti perorálního chelátoru železa jsou:

- selektivita a afinita pro železo
- molekulová hmotnost nižší než 400 Da
- dostatečná lipofilita pro gastrointestinální absorpci a intracelulární chelataci
- nízká toxicita (Faa a Crisponi 1999)

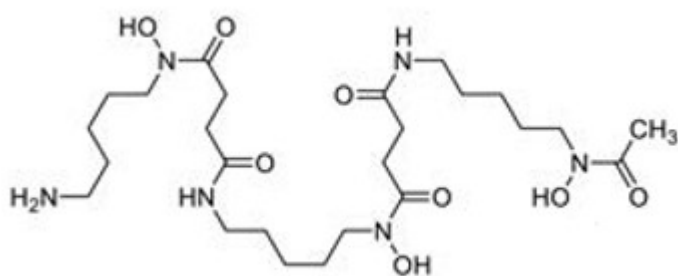
Rostoucí zájem je o přírodní chelátory železa tzv. fytochemikálie, které inhibují oxidační stres a nacházejí se v potravinách rostlinného původu. Řadí se mezi ně proanthokyanidiny, flavanoly, flavonoly a antokyany, obsahující ve své molekule katecholu podobné uskupení, které je známé u mikrobiálních sideroforů a schopné vázat železo (Hatcher et al. 2009).



Obr.2: Schematické znázornění tvorby chelátových kruhů u komplexů kov-ligand. Převzato z Hider (2014)

2.5.1. Deferoxamin

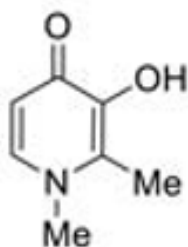
Deferoxamin je přirozeně se vyskytující siderofor hydroxámového typu, produkován *Streptomyces pilosus*. Jedná se o hexadentální chelátor, který s železnatými ionty tvoří termodynamicky stabilní komplexy v poměru 1:1. Následně dochází k jejich vyloučení močí a žlučí (Faa a Crisponi 1999). Kvůli své hydrofilítě (viz Obr. 3) a molekulové hmotnosti neprochází významně do buněk s výjimkou hepatocytů. V tomto případě se jedná zřejmě o nějaký transportér. Klinická data ukazují, že je deferoxamin účinný při snižování hladiny sérového feritinu, jaterního železa a při prevenci endokrinních komplikací. Dlouhodobá léčba DFO je také spojena se snížením srdeční morbidity a lepším přežitím pacientů. Největší nevýhodou je kontinuální podávání ve formě subkutánního či intravenózního roztoku. Podání je pomalé, trvá kolem 8-12 hodin a k dobrému výsledku by mělo být prováděno pětkrát týdně. Z těchto důvodů není vždy dosaženo adherence pacientů a optimalizace léčby (Poggiali et al. 2012).



Obr.3: Molekulární struktura deferoxaminu. Převzato z Hider (2014)

2.5.2. Deferipron

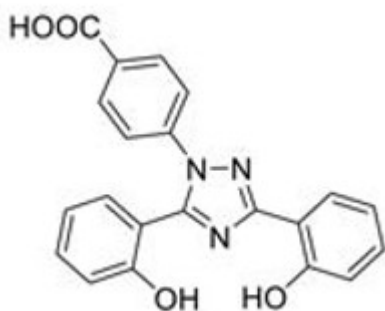
Deferipron je malá, lipofilní molekula (viz Obr. 4). Jako bidentální chelátor, váže železo v poměru 3:1 (Poggiali et al. 2012). Vzhledem ke své vyšší lipofilitě snadno prostupuje přes membránu buněk a tvoří komplexy s železnatými ionty, které jsou následně uvolněny z buňky a vylučovány převážně močí (70%) (Faa a Crisponi 1999). Oproti deferoxaminu má výhodu dostatečného vstřebávání ze zažívacího traktu, a tedy možnosti perorálního podání. Biologický poločas je ale poměrně krátký a musí se užívat třikrát denně (Poggiali et al. 2012). Dalším přínosem je jeho větší účinnost v odstraňování železa ze srdce (Hatcher et al. 2009). Nicméně s jeho dobrou prostupností membránami může souviset i potenciální toxicita při prostupu hematoencefalickou a placentární bariérou (Faa a Crisponi 1999).



Obr. 4: Molekulární struktura deferipronu. Převzato z Hider (2014)

2.5.3. Deferasirox

Deferasirox je nejnovější perorální chelátor železa (viz Obr. 5). Jedná se o tridentální ligand, který chelatuje železo v poměru 2:1. Obdobně jako deferoxamin snižuje hladinu železa v játrech a hladinu sérového hemoglobinu, avšak adherence pacientů je výrazně příznivější, jelikož ho lze podávat perorálně jen jednou denně, díky delšímu biologickému poločasu. V současné době je schválen v mnoha zemích po celém světě k léčbě chronického přetížení organismu železem v důsledku krevních transfuzí u pacientů ve věku 2 let a starších. Účinnost a bezpečnost deferasiroxu byla hodnocena u pacientů s beta-thalasemií a u širokého rozsahu pacientů s jinými druhy anémií včetně myelodysplastického syndromu, srpkovité anémie, aplastické anémie, Diamond-Blackfan anémie a u dalších vzácných hematologických onemocnění (Poggiali et al. 2012).



Obr. 5: Molekulární struktura deferasiroxu. Převzato z Hider (2014)

2.5.4. Kombinace v léčbě

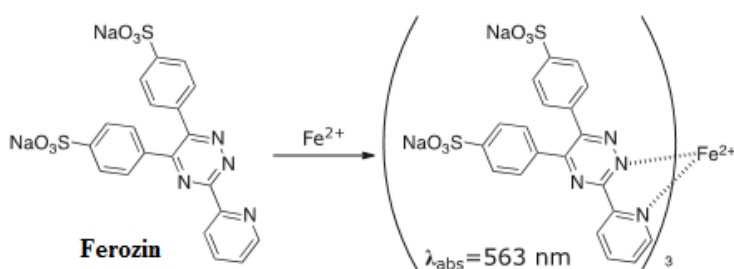
Někteří pacienti mají tak velkou kumulaci železa v organismu, že léčba jedním chelátorem je nedostačující. V případech, kdy nedochází k navození dostatečné exkrece železa, přichází v úvahu kombinace dvou chelátorů. Kombinace deferoxamin a deferipron je klasickou kombinací doporučenou pro těžké přetížení srdce železem (Karami et al. 2011, Rashidi et al. 2007). Poměrně novou v praxi používanou kombinací je deferipron a deferasirox (Alavi et al. 2014, Totadri et al. 2015, Voskaridou et al. 2011). Použití této kombinace se ukazuje více účinnější v odstranění železa ze srdce a jater při sideróze. To je pravděpodobně důsledkem synergických efektů a schopností deferasiroxu a deferipronu vstupovat do buněk a chelatovat intracelulární železo (Cappellini 2005, Piga A et al. 2010).

2.6. Detekce železa

K měření kvantitativního množství železa kolorimetrickou metodou se používají chromogenní chelátory tvořící s železem barevné komplexy. Intenzita zabarvení je přímo úměrná koncentraci železa ve vzorku. Absorpce ve viditelném spektru souvisí s přenosem náboje mezi kovem a ligandem. Stanovení se jednoduše provede UV-VIS spektrometrem v mikrotitrační destičce nebo v kyvetě. Mezi používané indikátory patří ferozin, Ferene-S, bathofenantrolin atd. (Hirayama a Nagasawa 2017).

2.6.1. Ferozin

Ferozin (viz Obr. 6) je ve vodě velmi rozpustný, specifický indikátor železnatých iontů. Ve struktuře má dvě fenylsulfátové skupiny zodpovědné za jeho dobrou rozpustnost ve vodě, navázané na 1,2,4-triazin. Dalším substituentem na triazinu je pyridylová skupina v poloze 3. Spolu vytváří základ chelatačního jádra a s železem tvoří v poměru 3:1 intenzivně zbarvený komplex s maximem absorpance při 563 nm (Hirayama a Nagasawa 2017).



Obr. 6: Chemický indikátor pro kolorimetrickou detekci železa. Tvorba komplexu ferozinu a železnatých iontů. Modifikováno dle: Hirayama a Nagasawa (2017)

2.7. Deriváty xanthen-3-onu

Xantheny a benzoxantheny představují skupinu potenciálně biologicky aktivních heterocyklů s širokým spektrem farmakologických účinků, jako jsou například antibakteriální (Hideo 1981), antivirové (Lamberk et al. 1997), protizánětlivé (Hafez et al. 2008) a protektivní pro kardiovaskulární systém (Jiang et al. 2004). Používají se také jako barviva a fluorescenčně citlivé materiály (Banerjee a Mukherjee 1981, Knight a Stephens 1989). Ambice by mohly mít v terapii rakoviny, Alzheimerovy choroby, aterosklerózy a degenerace centrálního nervového systému (Shahidi a Naczki 1995).

Vzhledem ke všem těmto příznivým vlastnostem jejich syntéza přitáhla velkou pozornost v oblasti medicínské a farmaceutické chemie.

Struktura nově syntetizovaných 9-aryl substituovaných 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-on derivátů byla ověřena analytickými metodami (infračervenou a hmotnostní spektrometrií). Antioxidační potenciál derivátů byl měřen elektrochemickou metodou cyklické voltametrie. Ze studie vyplývá, že substituce vodíku na fenylovém kruhu elektron-donorovou skupinou ovlivní redukční schopnost sloučenin, snížením biologického oxidačního potenciálu. Další antioxidační *in vivo* testy jsou nezbytné pro potvrzení potenciálního využití těchto derivátů v prevenci a léčbě onemocnění. Vzhledem k tomu, že byla prokázána korelace antioxidačního potenciálu s protinádorovou aktivitou, syntetizované deriváty xanthen-3-onu s dobrým antioxidačním potenciálem budou nadále hodnoceny jako potenciální antiproliferativní činidla (Veljović et al. 2015).

3. Experimentální část

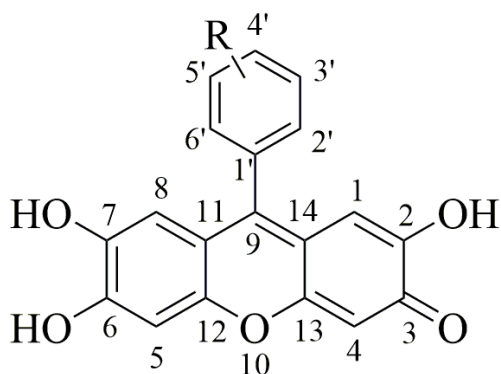
3.1. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit interakce deseti derivátů 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-onu s železnatými ionty ve 4 relevantních (pato)fyziologických pH podmínkách. Současně byla provedena analýza chelatace železitých iontů při pH 4.5. Kromě zjištění schopnosti chelatovat železo byl vedlejším cílem i odhad stechiometrie chelatace.

3.2. Materiály a metodika

3.2.1. Použité chemikálie

Síran železnatý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), chlorid železitý (FeCl_3), ferozin (sodná sůl 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-*p,p'*-bisbenzensulfonové kyseliny), dimethylsufoxid (DMSO), hydroxylamin chlorid (HA), kyselina octová, octan sodný, kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová (HEPES) a HEPES sodná sůl byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Německo), methanol byl od J.T. Baker (USA), testované látky (deriváty 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-onu) byly syntetizovány na Univerzitě v Sarajevu. (viz Obr. 7).



Obr. 7: Základní struktura derivátů 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-onu.

- 1: 3',4'-dihydroxy
- 2: 2'-hydroxy-3'-methoxy
- 3: 3',5'-dimethoxy-4'-hydroxy
- 4: 3'-methoxy-5'-nitro-4'-hydroxy
- 5: 4'-ethoxy
- 6: 3'-bromo
- 7: 2'-chloro-6'-fluoro
- 8: 4'-dimethylamino
- 9: 4'-trifluoromethyl
- 10: 4'-acetamido

3.2.2. Přístroj

Absorbance byla měřena na přístroji Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., USA)

3.2.3. Postup

3.2.3.1. Příprava zásobních roztoků

1. Roztok ferozinu 5 mM připraven v destilované vodě ($M_w=492,5$ g/mol)
2. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 μM v destilované vodě ($M_w=278,02$ g/mol).
3. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,5 - 7.5 mM v destilované vodě ($M_w = 270,3$ g / mol / - zásobní roztok Fe^{3+})
4. Hydroxylamin chlorid (HA) 10 mM v destilované vodě ($M_w=69,49$ g/mol)
5. Pufry acetátové (pH 4.5 a 5.5) a HEPES (pH 6.8 a 7.5) v koncentraci 15 mM

3.2.3.2. Příprava testovaných roztoků

Roztoky testovaných chelátorů železa (základní koncentrace 10 mM, 1 mM, 0,1 mM) byly naředěny v DMSO.

3.2.3.3. Standardní operační postup – kontrola železa

Zkouška pro železnaté ionty byla prováděna pokaždé před použitím jejich nového roztoku. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μl DMSO, 50 μl Fe^{2+} o koncentraci 250 μM a 50 μl Ferozinu a koncentraci 5 mM. Dále následovalo kontrolní měření absorbance při 562 nm. Vyhovující hodnota byla 1.0 ± 0.05 .

3.2.3.4. Měření kalibrační křivky železnatých iontů

1. Do všech určených jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μl pufru
2. Přidání 50 μl požadované koncentrace železnaté soli a pro $c = 0$ bylo přidáno stejné množství destilované vody.
3. Přidání 50 μl roztoku ferozinu do poloviny jamek (x) a stejné množství destilované vody do druhé poloviny jamek (x) viz Tab. 1.
4. Měření absorbance při 562 nm ihned a po 5 minutách.

Tab. 1: Tabulka znázorňující měření kalibrační křivky železnatých iontů

	kontrola - přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 0 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 75 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 150 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 250 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 500 \mu\text{M}$	přidaná $c(\text{Fe}^{2+}) = 750 \mu\text{M}$
ferrozin	x	x	x	x	x	x
slepé vzorky	x	x	x	x	x	x

3.2.3.5. Test chelatace železnatých iontů

1. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μl požadovaného pufru do všech jamek.
2. Přidání 50 μl roztoku testovaných chelátorů v různých koncentracích do příslušných jamek a stejné množství rozpouštědla (DMSO) do jamek kontrolních.
3. Pouze při pH 7.5 navíc přidání 50 μl HA o koncentraci 10 mM do všech jamek z důvodu zabránění oxidace železnatých iontů při tomto pH.
4. Přidání 50 μl roztoku železnatých iontů o koncentraci 250 μM do všech jamek.
5. Míchání po dobu 2 minut.
6. Přidání 50 μl roztoku ferozinu o koncentraci 5 mM do jamek (x) a 50 μl destilované vody do jamek určených pro slepý vzorek (x) viz Tab. 2.
7. Následovné okamžité měření absorbance při 562 nm a další měření po 5 minutách

Tab. 2: Tabulka znázorňující měření chelatace železnatých iontu u vybraných koncentrací testované látky.

	koncentrace testované látky			
	$c=0,5\text{mM}$	$c=0,25\text{mM}$	$c=0,125\text{mM}$	$c=0 \text{ mM}$ (kontrolní)
Ferozin (testované vzorky)	x	x	x	x
Destilovaná voda (slepé vzorky)	x	x	x	x

3.2.3.6. Test chelatace železitých iontů

1. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μl požadovaného pufru do všech jamek.
2. Přidání 50 μl roztoku testovaných chelátorů v různých koncentracích do příslušných jamek a stejné množství DMSO (rozpuštědla chelátorů) do jamek kontrolních.
3. Příprava čerstvého 250 μM roztoku Fe^{3+} ze zásobního roztoku.
4. Přidání 50 μl tohoto 250 μM roztoku Fe^{3+} do všech jamek.
5. Míchání po dobu 2 minut.
6. Přidání 50 μl HA o koncentraci 10 mM do všech jamek z důvodu redukce zbývajících železnatých iontů.
7. Míchání po dobu 1 minuty.
8. Přidání 50 μl roztoku ferozinu o koncentraci 5 mM do jamek (x) a 50 μl destilované vody do jamek určených pro slepý vzorek (x)
9. Následovné okamžité měření absorbance při 562 nm a další měření po 5 minutách

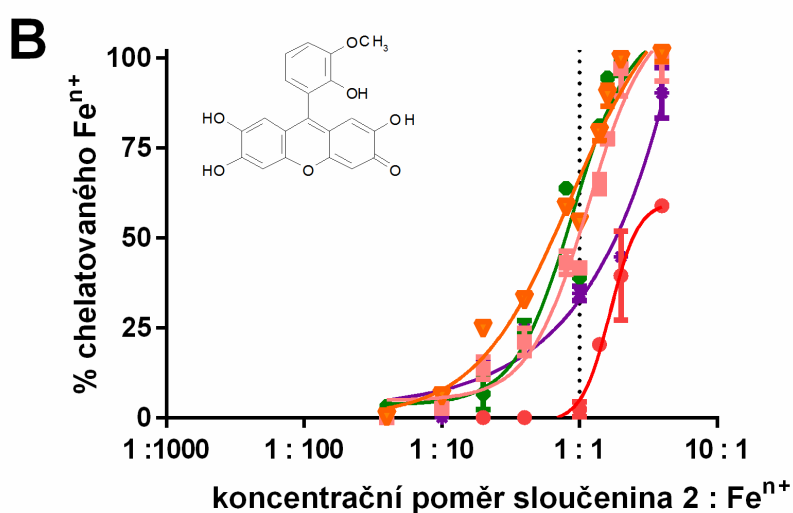
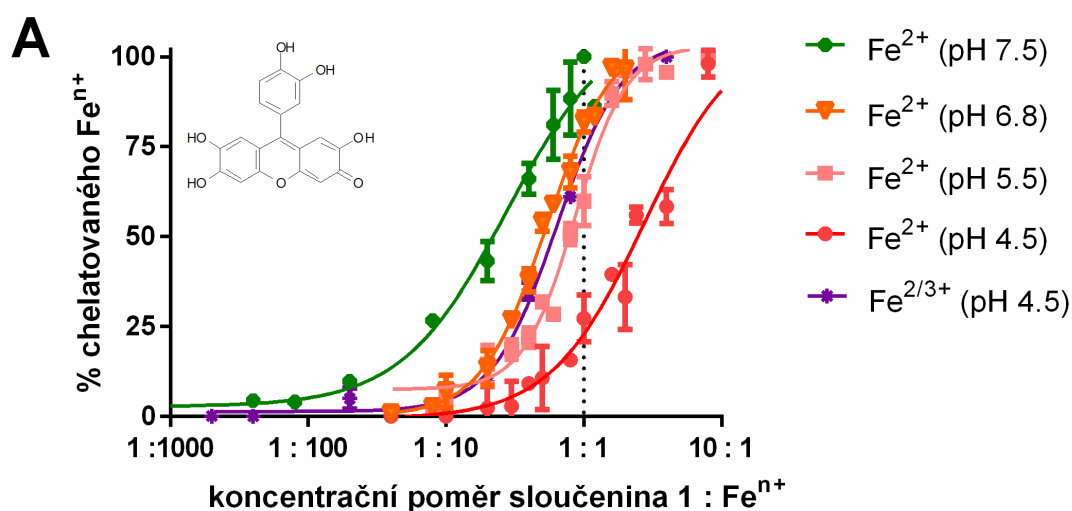
3.2.4. Matematické zpracování a statistická analýza

Množství nezchelatovaného železa byl vypočítáno z rozdílu absorbance mezi testovaným (s indikátorem) a jeho odpovídající slepým vzorkem (bez indikátoru) děleno rozdílem absorbancí kontrolního vzorku (známé množství kovu bez testované substance) a jeho slepý vzorku (tj. železa bez indikátoru). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Rozdíly chelatačního potenciálu byly porovnány za pomoci 95% konfidenčních intervalů chelatačních křivek. U všech statistických postupů byl použit GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, USA).

3.3. Výsledky

Schopnost chelatovat železo prokázaly všechny testované sloučeniny, všeobecně s podobnou účinností, která klesala s pH.

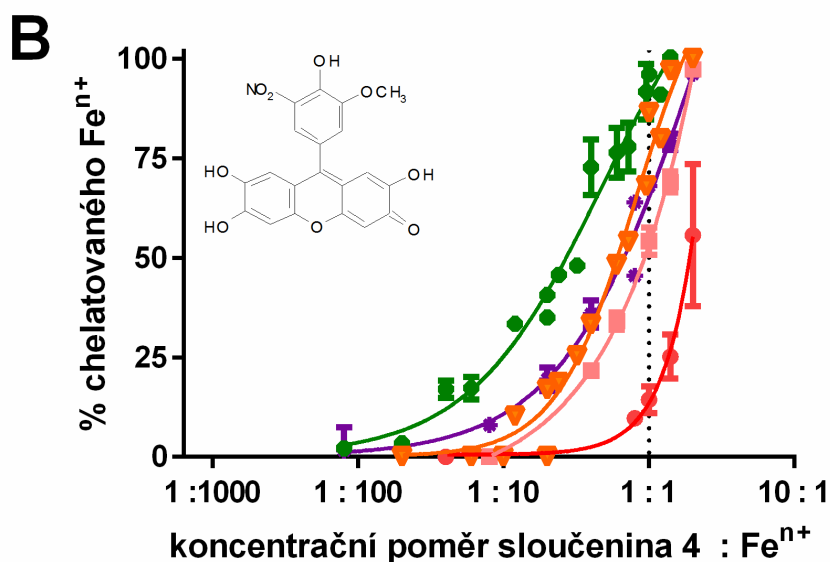
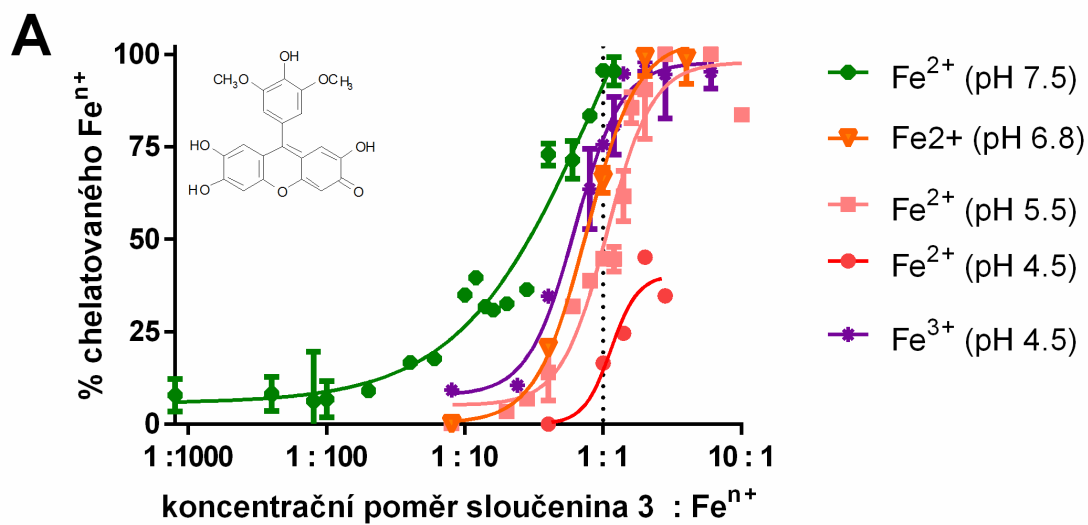
Při pH 7.5 docházelo k téměř kompletní chelataci v poměru 1:1 u všech sloučenin vyjma derivátu 2'-hydroxy-3'-methoxy, který s poměrem 2:1 chelatoval železnaté ionty (zhruba 50% chelatace při poměru 1:1). Při pH 6.8 byly neúčinnější deriváty 4'-dimethylamino a 4'-trifluoromethyl. Při pH 5.5 nastal pokles chelatace na polovinu s poměrem 2:1 u všech derivátů, jen 4'-dimethylaminoderivát byl znatelně méně účinný. Tato látka měla obecně zajímavé chelatační účinky – při pH 7.5 a 6.8 byla společně s trifluormethylovým derivátem neúčinnější, ale jejich chelatační účinky při nižších pH byly výrazně nižší. Při pH 4.5 nebyly signifikantní rozdíly mezi testovanými látkami kromě derivátu 4'-trifluoromethyl, který byl opět neúčinnější. Chelatace Fe^{3+} byla měřena při pH 4.5 a účinky látek můžeme rozdělit do tří podskupin. První a největší skupina látek chelatovala efektivně v pravděpodobném poměru 2:1. Méně účinnými byly 2'-hydroxy-3'-methoxy, 4'-ethoxy, 2'-chloro-6'-fluoro and 3'-bromo deriváty a jako nejméně účinný se ukázal derivát 4'-trifluoromethyl. Porovnání chelatační účinnosti při různých pH je na Obr. 8-12. Příklad porovnání chelatace pomocí konfidenčních intervalů je na Obr. 13. Grafické souhrnné znázornění je pak v Obr. 14.



Obr. 8: Chelatace železa deriváty xanthen-3-onu.

A: 3',4'-dihydroxy derivát při pH 7.5 chelatoval železo v poměru 1:1 stoprocentně. S klesajícím pH (6.8 a 5.5) chelatační schopnost klesala a u pH 4.5 docházelo k úplné chelataci Fe²⁺ až ve vysokém poměru 10:1, látka:železo.

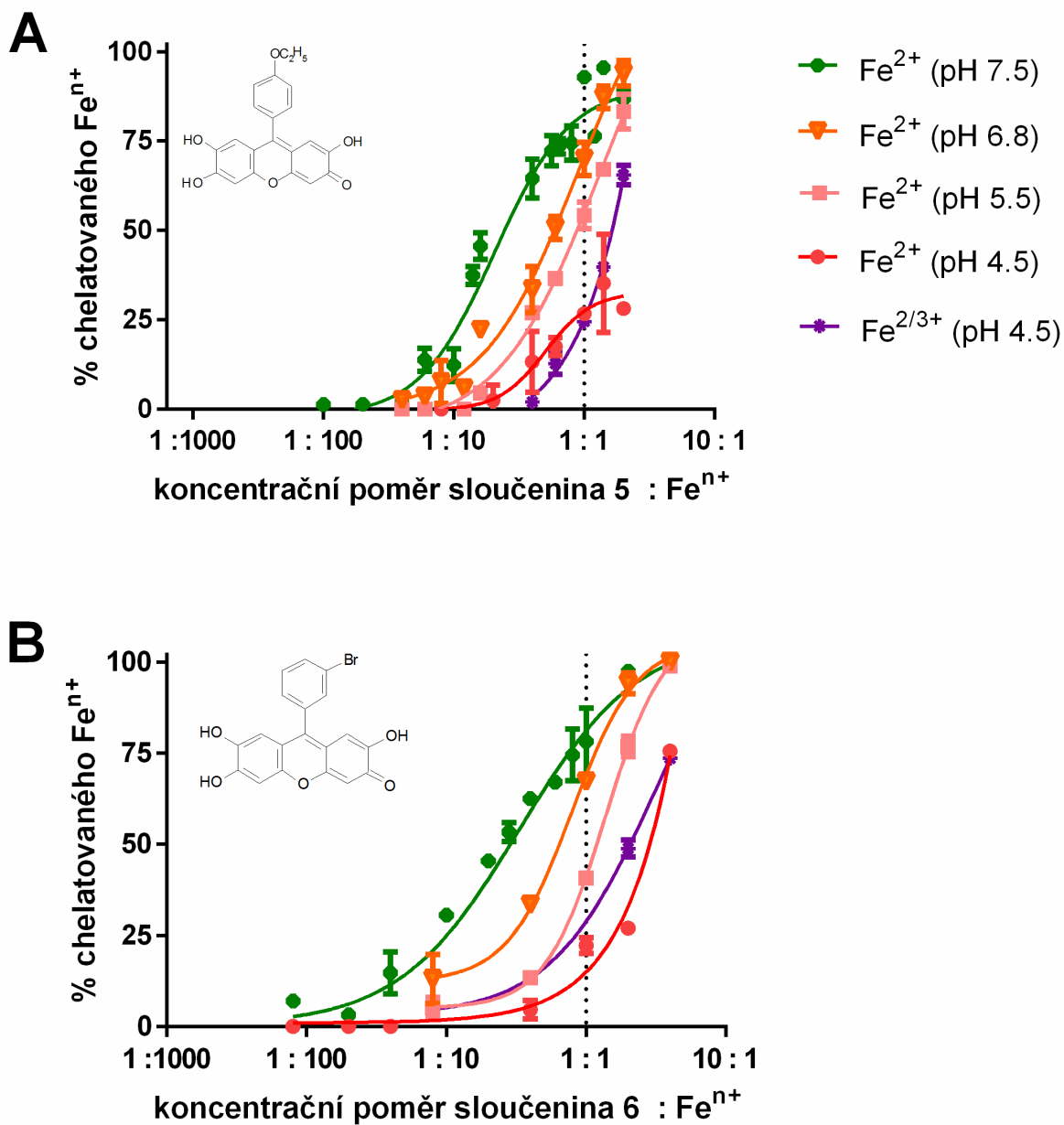
B: 2'-hydroxy-3'-methoxy při pH 7.5, 6.8 i 5.5 chelatovat železo v poměru 1:1 pouze z 50%. Při pH 4.5 byla v testovaném rozmezí nalezena max. 50% chelatace Fe²⁺ a docházelo k ní až při vyšších poměrech.



Obr. 9: Chelatace železa deriváty xanthen-3-onu.

A: 3',5'-dimethoxy-4'-hydroxy vykazuje 100% chelataci při pH 7.5 v poměru 1:1 a v poměru 2:1 při pH 6.8 a 5.5. Chelatace Fe²⁺ při pH 4.5 byla pod 50%.

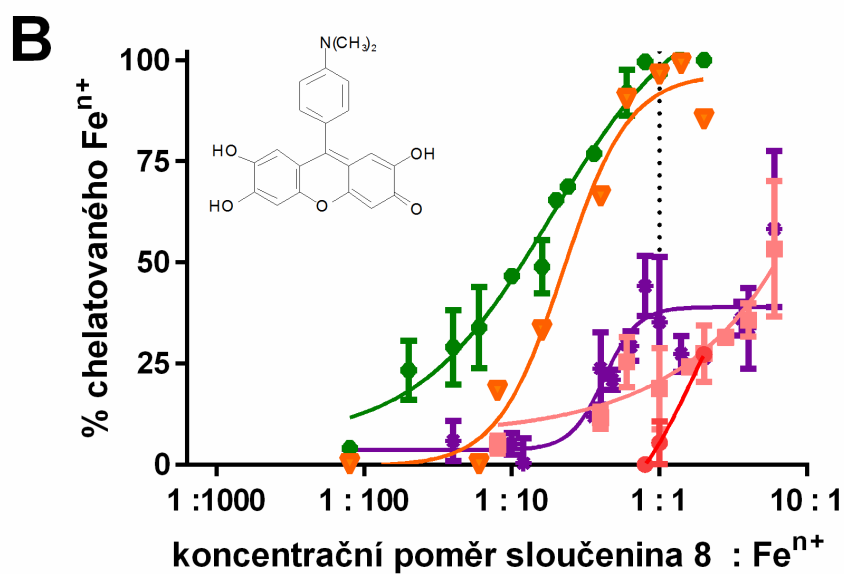
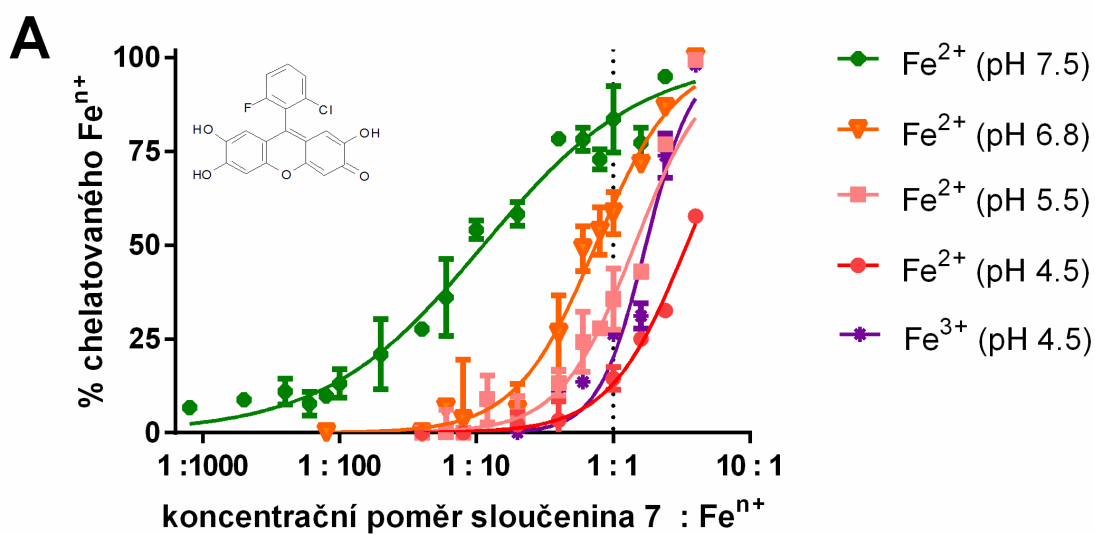
B: 3'-methoxy-5'-nitro-4'-hydroxy chelatoval železo 100% v poměru 1:1 při pH 7.5, při pH 6.8 a 5.5 chelatační účinnost poklesla. V kyselém pH 4.5 byl pokles chelatace železnatých iontů ještě vyšší.



Obr. 10: Chelatace železa deriváty xanthen-3-onu.

A: 4'-ethoxy vykazoval 100% chelataci při pH 7.5, 6.8 a 5.5, ale Fe^{2+} chelatační účinnost při pH 4.5 výrazně poklesla.

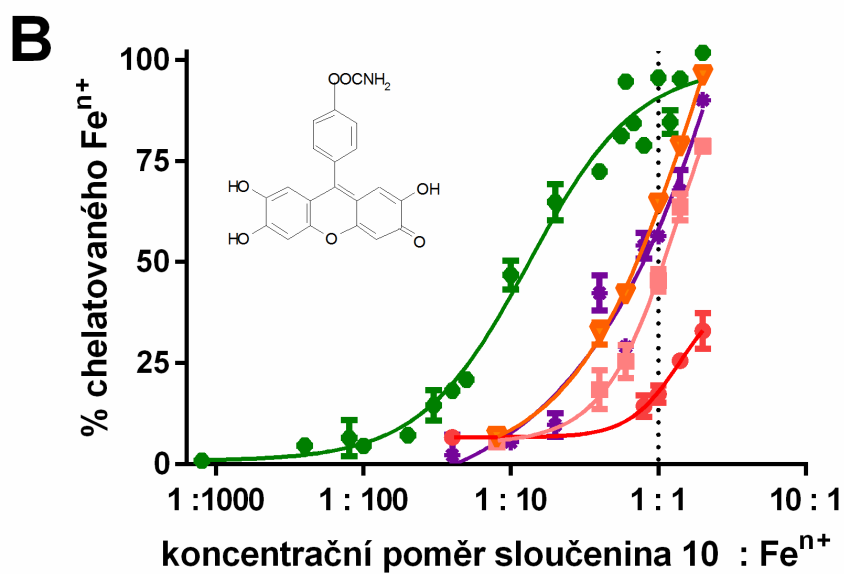
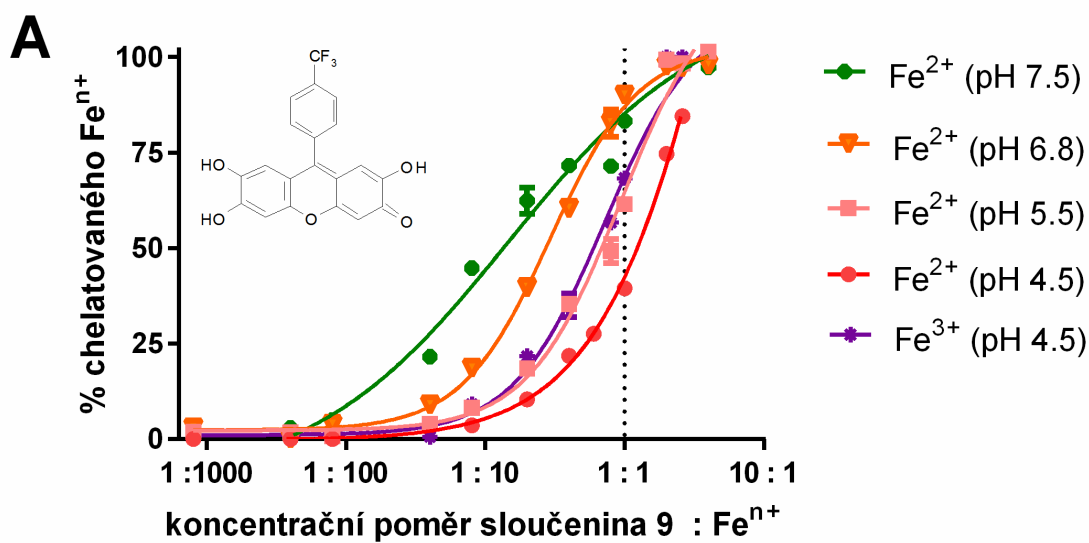
B: 3'-bromo derivát chelatoval železo o něco méně efektivně než většina sloučenin.



Obr. 11: Chelatace železa deriváty xanthen-3-onu.

A: 2'-chloro-6'-fluoro derivát chelatoval železo o něco méně efektivně než většina sloučenin.

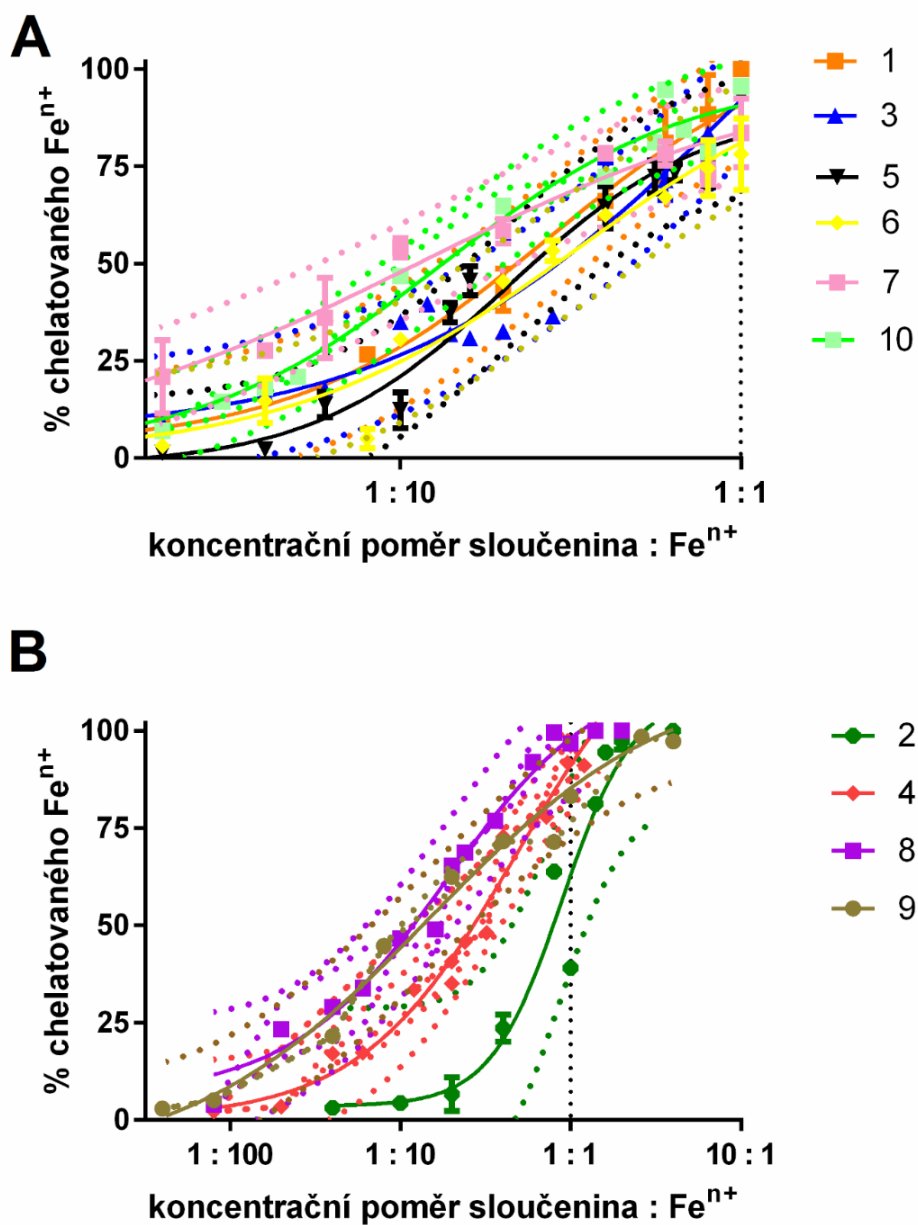
B: 4'-dimethylamino derivát prokázal velmi dobrou chelataci při pH 7.5 a 6.8, ale při nižších pH chelatační aktivita aktivita neobvykle klesla.



Obr. 12: Chelatace železa deriváty xanthen-3-onu.

A: 4'-trifluoromethyl vychází v porovnání s ostatními jako nejlepší chelátor.

B: 4'-acetamido je při vyšších pH poměrně efektivní chelatační látka, ale při pH 4.5 je chelatace železa zanedbatelná.



Obr. 13: Porovnání schopnosti testovaných sloučenin chelatovat železo při pH 7.5

1: 3',4'-dihydroxy;

2: 2'-hydroxy-3'-methoxy;

3: 3',5'-dimethoxy-4'-hydroxy;

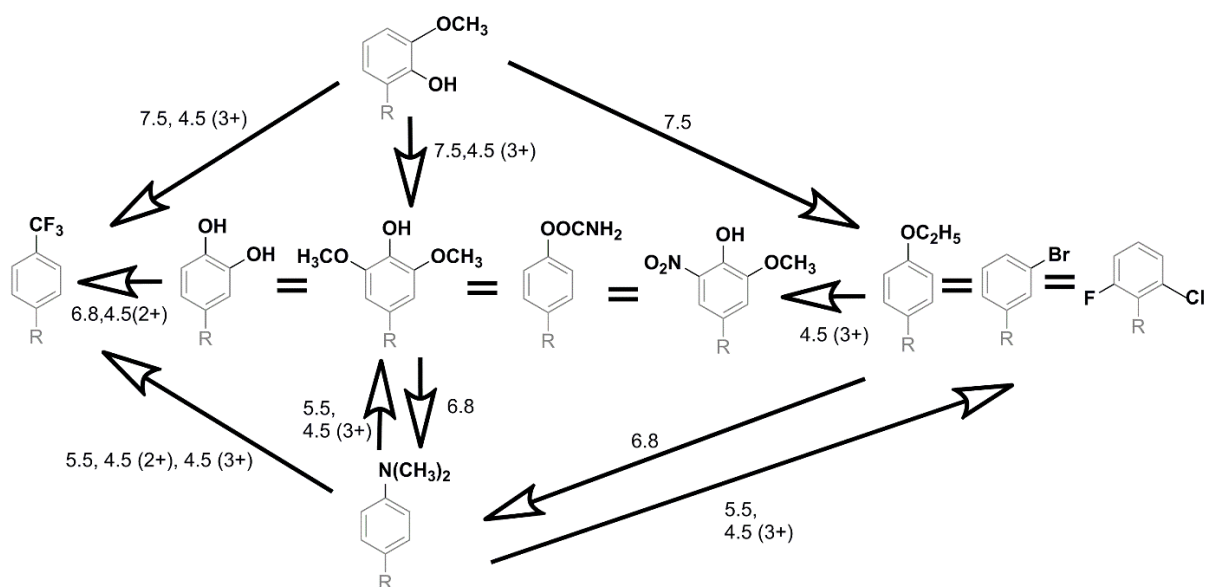
4: 3'-methoxy-5'-nitro-4'-hydroxy;

5: 4'-ethoxy; 6: 3'-bromo;

7: 2'-chloro-6'-fluoro; 8: 4'-dimethylamino;

9: 4'-trifluoromethyl;

10: 4'-acetamido



Obr. 14: Schéma znázorňující rozdíly testovaných látek v chelataci železa. Směr šipek ukazuje k více aktivnímu substituentu. Čísla u šipek znázorňují pH, při kterém byly zjištěny rozdíly v chelataci.

3.4. Diskuze

Spektrum možností chelatační terapie se zvyšuje souběžně s rostoucí škálou nově prokázaných potenciálních chelátorů. Vývoj a zavedení deferipronu a deferasiroxu, syntetických chelatačních činidel s lepším farmakologickým účinkem oproti deferoxaminu, do praxe představuje významný úspěch posledních let. Přestože nové chelatační látky nejsou často bez toxicity, jsou testovány i v dalších potenciálních indikacích (Kwiatkowski 2008, Vichinsky 2008). Jejich aplikace může být zaměřena na širokou škálu případů spojených s oxidačním stresem, kardiovaskulárními, neurodegenerativními, zánětlivými či maligními onemocněními. V mnoha z těchto oblastí vystupují chelatační látky velmi slibně v různých fázích klinického výzkumu (Devanur et al. 2008).

Poměrně prozkoumanou skupinou látek jsou flavonoidy, v přírodě hojně se vyskytující polyfenolické metabolity rostlin. Jeden s nejrozšířenějším zastoupením v potravě je flavonol kvercetin. Vícenásobné hydroxylové skupiny jsou zodpovědné za jejich antioxidační a chelatační potenciál. Zachytit a inaktivovat volné radikály umožňuje především proton-donorová vlastnost přítomné katecholové skupiny na B-kruhu. Neméně důležitá je přítomnost 4-oxoskupiny v konjugaci s nenasycenými vazbami v okolí. Navíc přítomnost dalších hydroxylových skupin přispívá k schopnosti chelatovat ionty kovů a předcházet tak katalytickému rozpadu peroxidu vodíku (Flora 2009).

Studie *in vitro* prokázala, že nejefektivnější vazebné místo flavonoidů pro železo představuje 6,7-dihydroxy struktura. Toto místo může být začleněno do baikaleinové struktury, která podobně jako deferoxamin tvořila komplexy s železem ve stechiometrii 1:1. Látky kvercetin a myricetin, které mají všechny tři strukturální požadavky, byly stejně aktivní jako baikalein nebo deferoxamin v neutrálních podmínkách, ale zřetelně méně aktivní při nižším pH (Mladěnka et al. 2011).

Ve studii interakcí kumarinů s železem byly orto-dihydroxyderiváty nejúčinnější chelátory železa a 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin dokonce dosáhl účinnosti deferoxaminu v neutrálním pH. Nicméně tyto ortho-dihydroxykumariny neváží železo pevně v kyselých podmínkách (např. při akutním infarktu myokardu) a navíc redukují ionty železa a mohly by tak vést k zesílení Fentonovy reakce (Mladěnka et al. 2010).

Nově synteticky připravené deriváty xanthen-3-onu se vyznačují vcelku podobnou strukturou jako zmíněné flavonoidy. Mají katecholovou (6,7-dihydroxy) skupinu a keto-hydroxy uskupení v poloze 2,3 xanthen-3-onu. Jejich chelatační účinek je rovněž nejefektivnější při neutrálním pH a s klesajícím pH klesá. Většina testovaných látek měla

stechiometrický poměr chelatace 1:1 při pH 7.5, což je další společný jev. Jelikož výsledky neprokázaly větší rozdíly v chelatační účinnosti, která byla z širšího hlediska vcelku podobná, předpokladaným místem chelatace všech derivátů jsou právě výše zmíněné funkční skupiny základního skeletu.

Z měření vyplývá, že substituce na fenylu má určitý vliv na míru chelatace železa. Většina substituentů má kladný mezomerní efekt a mají podobný vliv, jsou však patrné určité rozdíly. Jako jednoznačně nevýhodný substituent se prokázala 2'-OH skupina, pravděpodobně interferuje s chelatačním místem. Překvapivě derivát 3',4'-dihydroxy, který má ve své struktuře další katecholové uskupení, neprokázal vyšší chelatační schopnost než ostatní sloučeniny. Jednou z otázek je, proč substituent 4'-trifluoromethyl prokázal nejlepší účinnost, a proč výrazně klesla účinnost u derivátu 4'-dimethylamino při kyselém pH. Zatím není přesně objasněn vliv mezomerního efektu substituentů a pH na průběh chelatace. V literatuře není příliš údajů o derivátech xanthen-3-onu v této ani podobné oblasti. Jedná se o nepříliš prozkoumané látky, které mohou být předmětem dalších studií.

3.5.Závěr

V rámci této diplomové práce byla analyzována chelatační schopnost poměrně nových derivátů 2,6,7-trihydroxyxanthen-3-onu s ionty železa. Z měření vyplývá, že chelatační aktivitu vykazuje všech 10 zkoušených derivátů, vcelku v obdobné míře. Také byl zjištěn pokles chelatační schopnosti v závislosti na pH. Zatímco při pH 7.5 docházelo téměř k stoprocentní chelataci, při pH 5.5 již schopnost poklesla na polovinu. Derivát 4'-trifluoromethyl se ukázal jako neúčinnější.

4.Použité zkratky

DMSO – dimethylsulfoxid

DMT-1 – dvojmocný transportér kovů 1 z anglického „divalent metal transporter 1“

HA – hydroxylamin chlorid

ROS – reaktivní formy kyslíku z anglického „reactive oxygen species“

5.Literatura

Alavi S, Sadeghi E, Ashenagar A. Efficacy and safety of combined oral iron chelation therapy with deferasirox and deferiprone in a patient with betathalassemia major and persistent iron overload. *Blood Research* 2014;49:72-3.

Andersen O. Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication. *Chemical Review* 1999;99(9):2683-710.

Andriopoulos B Jr, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature Genetics*. 2009;41(4):482–7.

Banerjee A, Mukherjee AK, Chemical Aspects of Santalin as a Histological Stain. *Stain Technology* 1981;56(2):83.

Bermejo F, Garcia-Lopez S. A guide to diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia in digestive diseases. *World Journal of Gastroenterology* 2009;15(37):4638-43

Blažek J. Přehled chemického názvosloví. Praha: SPN-pedagogické nakladatelství 2004. ISBN 80-7235-260-1.

Botzenhardt S, Li N, Chan EW, Sing ChW, Wong ICK, Neubert A. Safety profiles of iron chelators in young patients with haemoglobinopathies. *European Journal of Haematology*. 2016;98:198–217

Braga JAP, Taddei JA. Anemias carenciais. *Nutrição em saúde pública*. Rio de Janeiro: Rubio 2011;197-209. [ISBN 978-85-7771-0744].

Brugnara C, Laufer MR, Friedman AJ, Bridges K, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content (CHr): early indicator of iron deficiency and response to therapy. *Blood* 1994;83:3100–1.

Cairo RCA, Silva LR, Bustani NC, Marques CDF. Iron deficiency anemia in adolescents; a literature review. *Nutritión Hospitalaria* 2014;29(6):1240-1249

Camaschella C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Reviews* 2017; [IN PRESS]. DOI: 10.1016/j.blre.2017.02.004

Cançado R, et al. Deferasirox in patients with iron overload secondary to hereditary hemochromatosis: results of a 1-yr Phase 2 study. *European Journal of Haematology* 2015;95(6):545-50.

Cappellini M. Iron-chelating therapy with the new oral agent ICL670 (Exjade®). *Best Practice & Research* 2005;18:289-98.

Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews* 2010;68(3):133-147

Čermák J, Gregora E, Lachmanová J, Brabec V. Zásoby železa u pacientů s chronickým ledvinným selháním léčených rekombinantním lidským erytropoetinem. *Vnitřní Lékařství* 1994;40:174–178.

Detterich JA, Kato RM, Rabai M, Meiselman HJ, Coates TD, Wood JC. (2015) Chronic transfusion therapy improves but does not normalize systemic and pulmonary vasculopathy in sickle cell disease. *Blood* 2015;126:703–710.

Devanur LD, Evans RW, Evans PJ, Hider RC. Chelator-facilitated removal of iron from transferrin: relevance to combined chelation therapy. *Biochemical Journal* 2008; 409:439–447.

Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen in cell death. *Nature Chemical Biology* 2014;10:9-17.

Duck KA, Connor JR. Iron uptake and transport across physiological barriers. *Biometals* 2016;29:573–591.

Faa G, Crisponi G. Iron chelating agents in clinical practice. *Coordination Chemical Reviews* 1999;184:291–310.

Fabio G, Minonzio F, Delbini P, Bianchi A, Cappellini MD. Reversal of cardiac complications by deferiprone and deferoxamine combination therapy in a patient affected by a severe type of juvenile hemochromatosis (JH). *Blood* 2007;109(1):362-4.

Feder JN, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics* 1996;13:399–408.

Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009;2(4):191-206.

Frazer DM, et al. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 2002;123:835–44.

Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet Journal Rare Disease* 2010;5:11.

Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation 2003;102(3):783-788.

Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *The Journal of Biological Chemistry* 1984;259 (6):3620-3624.

Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, McIlroy W, Patterson C. Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *Journal of General Internal Medicine* 1992;7:145–53.

Hafez HN, Hegab MI, Ahmed-Farag IS, el-Gazzar AB. A facile regioselective synthesis of novel spiro-thioxanthene and spiro-xanthene-9',2-[1,3,4]thiadiazole derivatives as potential analgesic and anti-inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008;18(16):4538-43.

Hatcher HC, Singh RN, Torti FM, Torti SV. Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use. *Future Medicinal Chemistry* 2009;1(9):1643-70

Hideo T. Japanese Kokai Tokkyo Koho. JP 56005480. *Chemical Abstract* 1981;95:80922b.

Hider RC, Zhou T. The design of orally active iron chelators. *Annals of the New York Academy of Sciences USA* 2005;1054:141–154.

Hippeli S, Elstner EF. Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. *FEBS Letters* 1999;443:1-7.

Hirayama T, Nagasawa H. Chemical tools for detecting Fe ions. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2017;60:39-48.

van Hove L, Schisano T, Brace L. Anemia Diagnosis, Classification, and Monitoring Using Cell-Dyn Technology Reviewed for the New Millennium. *Laboratory Hematology* 2000;6:93-108.

Jiang D-J, Dai Z, Li Y-J. Pharmacological Effects of Xanthenes as Cardiovascular Protective Agents. *Cardiovascular Drug Reviews* 2004;22:91–102.

Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological Reviews* 2005;57:547–583

Karami H, et al. Deferiprone plus deferoxamine versus deferoxamine iron chelation in beta thalassemia major. *Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ* 2011;7:227-34.

Knight CG, Stephens T. Xanthene-dye-labelled phosphatidylethanolamines as probes of interfacial pH. Studies in phospholipid vesicles. *Biochemical Journal* 1989;258(3):683-7.

Kontoghiorghes ChN, Kontoghiorghes GJ. Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients

with nontransfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Design, Development and Therapy* 2016;10:465-481.

Kontoghiorghes ChN, Kontoghiorghes GJ. New developments and controversies in iron metabolism and iron chelation therapy. *World Journal of Methodology* 2016;6(1):1-19.

Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary Iron Overload. *Hematology American Society of Hematology Education Program* 2001;47-61.

Kwiatkowski JL. Oral iron chelators. *Pediatric Clinics of North America* 2008; 55:461–482.

Lamberk RW, Martin JA, Merrett JH, Parkes KEB, Thomas GJ. PCT International Application WO 9706178. *Chemical Abstract* 1997;126:P212377y.

Mladěnka P, Hrdina R, Hübl M, Šimůnek T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica* 2005;48(3-4):127-135.

Mladěnka P, et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2011;105(5):693-701.

Mladěnka P, et al. In vitro interactions of coumarins with iron. *Biochimie* 2010;92(9):1108-14.

Mladěnka P, Šimůnek T, Hübl M, Hrdina R. The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radical Research* 2006;40(3):263–272.

Mobarra N, et al. A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 2016;10(4):239-247.

de Montalembert M, Ferster A, Colombatti R, Rees DC, Gulbis B; European Network for Rare and Congenital Anaemias. ENERCA clinical recommendations for disease

management and prevention of complications of sickle cell disease in children. *American Journal of Hematology* 2011;86(1):72-5.

Nemeth E, et al. Heparidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090–3.

Piga A, et al. Deferiprone. *Annals of the New York Academy of Sciences USA* 2010;1202:75-8.

Pigeon C, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal Biological Chemistry* 2001;276:7811–9.

Poggiali E, Cassinerio E, Zanaboni L, Cappellini MD. An update on iron chelation therapy. *Blood Transfusion* 2012;10:411-22.

Powars DR, Chan LS, Hiti A, Ramicone E, Johnson C. Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:363–376.

Rashidi ghader F, Kosaryan M, Karami H. Assessment of the effect of combination therapy with deferiprone and desferrioxamine on cardiac complications in major Thalassemia. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2007;17:12-9.

Rombout-Sestrienkova E, et al. End-Stage Cardiomyopathy Because of Hereditary Hemochromatosis Successfully Treated With Erythrocytapheresis in Combination With Left Ventricular Assist Device Support. *Circulation-Heart Failure* 2014;7:541-543.

Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *The New England Journal of Medicine* 2005;353:1135–1146.

Sedláčková T, Racek J. Metabolismus železa a jeho regulace. *Klinická Biochemie a Metabolismus* 2009;17(38):17–23.

Shahidi F, Naczk M. Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Company Incorporated Lancaster PA 1995:331 ISBN 9781566762793.

Totadri S, et al. The deferiprone and deferasirox combination is efficacious in iron overloaded patients with β -thalassemia major: a prospective, single center, open-label study. *Pediatric Blood & Cancer* 2015;62:1592-6.

Toumba M, Sergis A, Kanaris C, Skordis N. Endocrine complications in patients with thalassaemia major. *Pediatric Endocrinology Reviews* 2007;5:642–648.

Veljović E, et al. 9 -Aryl Substituted Hydroxylated Xanthen-3-ones: Synthesis, Structure and Antioxidation Potency Evaluation. *Croatia Chemica Acta* 2015;88:121.

Vichinsky E. Clinical application of deferasirox: practical patient management. *American Journal of Hematology* 2008; 83:398–402.

Voskaridou E, Christoulas D, Terpos E. Successful chelation therapy with the combination of deferasirox and deferiprone in a patient with thalassaemia major and persisting severe iron overload after single-agent chelation therapies. *British Journal of Haematology* 2011;154:6546.

Webové stránky

Anonym. How Much Iron is in the body. In: *Iron Disorders Institute*. 2009. Dostupné na URL: <http://www.irondisorders.org/how-much-iron-is-in-the-body/>.

Přístupné 15.3.2017 – citováno v textu jako „webová strana Iron Disorders Institute 2009“

Anonym. National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements. In: *U.S. Department of Health & Human Services*. 2016. Dostupné na URL: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-HealthProfessional/>.

Přístupné 21.2.2017 – citováno v textu jako „U.S. Department of Health & Human Services. 2016.“

World Health Organization. Micronutrient deficiencies. Iron deficiency anemia. In: *World Health organization* 2017. Dostupné na URL: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/>. Přístupné 18.4.2017. Citováno v textu jako „WHO, 2017“

World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. In: *World Health Organization* 2011. Dostupné na URL: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin/en/>. Přístupné 19.4.2017 Citováno v textu jako „WHO, 2011“