

Univerzita Karlova
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

***IN VITRO* ŠTÚDIE NOVÝCH DERIVÁTOV CHELÁTORU ŽELEZA
SALICYLALDEHYDIZONIKOTINOYLHYDRAZÓNU**

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Odborní konzultanti: PharmDr. Hana Jansová, Ph.D.

Mgr. Jan Kubeš

Hradec Králové 2020

Nikola Matášová

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Tato práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.“

V Hradci Králové

Nikola Maťašová

Pod'akovanie

Rada by som sa poďakovala vedúcemu diplomovej práce prof. PharmDr. Tomášovi Šimůnkovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie a rady. Ďalej mojim konzultantom PharmDr. Hane Jansovej, Ph.D. a Mgr. Janovi Kubešovi za ich pomoc, rady a trpezlivosť pri vykonávaní experimentálnej práce a Mgr. Janovi Kubešovi zvlášť za jeho ochotu a čas pri vypracovávaní diplomovej práce. Rovnako za odbornú konzultáciu a pripomienky ďakujem aj doc. PharmDr. Jaroslavovi Rohovi, Ph.D. V neposlednom rade sa chcem poďakovať mojej rodine a priateľom.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Nikola Maťašová
Školitel': prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.
Konzultanti: PharmDr. Hana Jansová, Ph.D.
Mgr. Jan Kubeš

Názov diplomovej práce: *In vitro* štúdie nových derivátov chelátoru železa
salicylaldehydizonikotinoylhydrazónu

Ochorenia srdca patria celosvetovo medzi najčastejšie príčiny smrti a invalidity. Významnú rolu v rozvoji kardiovaskulárnych ochorení zohráva oxidačný stres, ktorého generátorom a/alebo propagátorom môžu byť aj ióny železa. Nadmerné množstvo tohto kovu vedie k apoptóze, nekróze alebo nedávno popísanej regulovanej bunecnej smrti – ferroptóze. Tento typ bunecnej smrti sa spája s kardiomyocytmi, ale objavili sa aj štúdie popisujúce prepojenie ferroptózy s ďalšími patologickými stavmi ako sú nádorové ochorenia, ochorenia nervového systému, ischemicko-reperfúzne poškodenia, poškodenia obličiek a ochorenia krvi. Preto je výskum chelátorov železa, schopných so železom vytvoriť netoxický komplex, a tak zabrániť bunecnej smrti, sľubný nielen z pohľadu kardiovaskulárnych chorôb.

Táto práca je zameraná na *in vitro* štúdium nových potencionálnych chelátorov železa odvodených od štruktúry salicylaldehydizonikotinoylhydrazónu (SIH). SIH selektívne a pevne chelatuje ióny železa vo vnútri buniek a obmenou jeho molekuly sme chceli získať výhodnejšie vlastnosti. Testovali sme spolu 9 nových chelátorov a porovnali sme ich s vlastnosťami referenčnej látky SIH. Experimenty boli vykonávané na jednej z najčastejšie využívanej bunecnej línie pre výskum kardiovaskulárnych ochorení, na potkaních kardiomyoblastoch H9c2. Protektívne vlastnosti látok boli zhodnotené po 24 hodinách, vlastná toxicita látok bola testovaná po 24 a 72 hodinách inkubácie. Viabilita buniek bola vyhodnocovaná pomocou testu vychytávania neutrálnej červene. Po analýze protektívnych a toxických vlastností látok, sme identifikovali niekoľko cytoprotektívne účinných látok, ale ani jeden z nových skúšaných derivátov nepreukázal lepšie vlastnosti v porovnaní so SIH.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Nikola Mat'ášová

Supervisor: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Consultants: PharmDr. Hana Jansová, Ph.D.

Mgr. Jan Kubeš

Title of diploma thesis: *In vitro* study of novel derivatives of iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone

Heart disease is one of the most common causes of death and disability worldwide. Oxidative stress, which can also be generated or propagated by iron ions, plays an important role in the development of cardiovascular diseases. Excessive amounts of this metal lead to the apoptosis, necrosis, as well as recently described regulated cell death - ferroptosis. This type of cell death is associated with cardiomyocytes, but studies have also been described linking ferroptosis to other pathological conditions, such as cancer, nervous system disease, ischemia-reperfusion injury, kidney damage and blood disease. Therefore, research on iron chelators capable of forming a non-toxic complex with iron and thus preventing cell death is promising not only from the point of view of cardiovascular diseases.

This work is focused on the *in vitro* study of new potential iron chelators derived from the structure of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). SIH selectively and firmly chelates iron ions inside cells and by changing its molecule we wanted to obtain more advantageous properties. We tested a total of 9 new chelators and compared them with the properties of the reference substance SIH. The experiments were performed on the most frequently used cell line for the study of cardiovascular diseases, on rat H9c2 cardiomyoblasts. The protective properties of the substances were evaluated after 24 hours, the intrinsic toxicity of the substances was tested after 24 and 72 hours of incubation. Cell viability was assessed using a neutral red uptake assay. After analysis of the protective and toxic properties of the substances, we have identified several cytoprotective agents, however, none of the new tested derivatives showed better properties compared to SIH.

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická časť	8
2.1	Železo	8
2.1.1	Hemoproteíny	8
2.1.2	Fe-S proteíny.....	8
2.1.3	Ďalšie proteíny obsahujúce železo	9
2.2	Metabolizmus železa	9
2.2.1	Absorpcia železa	9
2.3	Železo a oxidačný stres.....	11
2.4	Ferroptóza	12
2.5	Poruchy metabolizmu železa	13
2.5.1	Choroby z nedostatku Fe	13
2.5.2	Choroby z preťaženia Fe	14
2.6	Chelátory železa	14
2.6.1	Prírodné chelátory Fe	15
2.6.1.1	Siderofory.....	15
2.6.1.1.1	Deferioxamin (Desferrioxamin; DFO).....	15
2.6.1.1.2	Desferri-exochelíny	16
2.6.1.2	Rastlinné chelátory	16
2.6.2	Syntetické chelátory Fe	16
2.6.2.1	Deferipron	16
2.6.2.2	Deferasirox	17
2.6.2.3	Aroylhydrazóny	17
2.6.2.3.1	Pyridoxalizonikotinoylhydrazón (PIH)	17
2.6.2.3.2	Salicylaldehydizonikotinoylhydrazón (SIH)	17
2.6.2.4	Thiosemikarbazóny.....	18

3	Ciele práce	19
4	Materiál a metodika.....	20
4.1	Materiál.....	20
4.1.1	Bunková línia	20
4.1.2	Prístrojové vybavenie a pomôcky	20
4.1.3	Reagencie a chemikálie	21
4.2	Metodika	24
4.2.1	Kultivácia.....	24
4.2.2	Pasážovanie.....	24
4.2.3	Stanovenie počtu živých buniek počítaním na Bürkerovej komôrke.....	24
4.2.4	Nasadzovanie buniek na pokus	25
4.2.5	Stanovenie protekcie buniek testovanými látkami pred modelovým oxidačným stresom.....	25
4.2.6	Stanovenie vlastnej toxicity testovaných látok	25
4.2.7	Stanovenie životaschopnosti buniek – neutral red uptake assay.....	26
4.2.8	Stanovenie účinnosti chelátácie Fe v bunkách - Calcein green-AM assay	26
4.2.9	Štatistické spracovanie dát.....	27
5	Výsledky	28
5.1	Stanovenie účinnosti chelátácie Fe v bunkách - Calcein green-AM assay	28
5.2	Stanovenie protekcie buniek testovanými látkami pred modelovým oxidačným stresom.....	30
5.3	Stanovenie vlastnej toxicity testovaných látok	33
6	Diskusia	38
7	Záver.....	42
8	Zoznam skratiek	43
9	Literatúra.....	45

1 Úvod

Táto diplomová práca nadväzuje na dlhoročný výskum chelátorov železa a ich kardioprotektívnych účinkov prebiehajúci na Katedre biochemických vied Farmaceutickej fakulty UK v Hradci Králové. Chelátor SIH v predchádzajúcich *in vitro* experimentoch preukázal výraznú protekciu proti indukovanému oxidačnému stresu (Šimůnek et al., 2005). Avšak jeho nedostatkom je rýchla hydrolýza hydrazónovej väzby, krátky biologický polčas a toxicita spôsobená depléciou železa. Pre zlepšenie týchto parametrov boli navrhnuté a testované nové chelátory a prochelátory odvodené od štruktúry SIH (Jansová et al., 2014; Jansová et al., 2018; Potuckova et al., 2014). S rovnakou víziou získania derivátu s výhodnejšími vlastnosťami sme sa v predloženej práci venovali testovaniu nových analógov SIH.

2 Teoretická časť

2.1 Železo

Železo patrí medzi najviac zastúpené prvky na povrchu Zeme. Spadá do skupiny prechodných kovov. Pri oxidačno-redukčných reakciách, nevyhnutných pre základné biologické procesy, ľahko prijíma i dáva elektróny. Železo zohráva dôležitú úlohu v takmer všetkých živých organizmoch (Dev & Babitt, 2017). Jeho nadmerné množstvo je však cytotoxické a môže viesť k rôznym ochoreniam (Nakamura et al., 2019). V ľudskom tele je súčasťou štruktúry proteínov ako zložka hému, Fe-S klastrov a ďalších funkčných skupín (Dev & Babitt, 2017).

2.1.1 Hemoproteíny

Prostetickou skupinou hemoproteínov je hém, vznikajúci spojením železa s protoporfyrínom IX enzýmom ferrochelatáza. Termín hém sa používa pre protoporfyrín IX so železnatými iónmi (Fe^{2+}). Železo je enzýmom hemooxygenáza oxidované na železitú formu hemin. V štruktúre hému má atóm železa (Fe^{2+}) 6 koordinačných väzieb, 4 v rovine sú spojené s dusíkmi pyrrolu porfyrínového makrocyklu, zvyšné dva sa nachádzajú jeden nad a druhý pod rovinou porfyrínového kruhu. Jedna z týchto väzieb je koordinovaná na histidínový zvyšok globínového reťazca, druhá zvyčajne vo väzbe na kyslík (Phillips, 2019; Murray et al., 1998).

Hém plní funkciu veľkého počtu proteínov ako O_2 prenášač (hemoglobín), O_2 zásoba (myoglobín), elektrónový prenášač (cytochróm *c* dýchacieho reťazca) a aktivátor molekulového O_2 (cytochrómy P_{450} , katalázy, peroxidázy). Najväčšia denná produkcia hému je v kostnej dreni pri tvorbe červených krviniek. Hém syntetizovaný v pečeni je v najväčšej miere začlenený do štruktúry cytochrómov P_{450} , enzýmov zodpovedných za metabolizáciu širokej palety chemických látok, zahrňujúcich endogénne steroidy, vitamíny, mastné kyseliny a liečivá (Phillips, 2019; Shimizu et al., 2019).

2.1.2 Fe-S proteíny

Fe-S proteíny vo svojej štruktúre obsahujú atómy železa a síry, ktoré vytvárajú klastry, najmä vo formách $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ a $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, kedy sú spojené s proteínovým reťazcom najčastejšie cez síru aminokyseliny cysteínu. V prírode vystupujú ako jedny z najrozšírenejších a najuniverzálnejších kofaktorov. Zúčastňujú sa rozličných biochemických procesoch, kde plnia úlohu elektrónového transportéra, viažu a aktivujú substráty, tvoria zásobu Fe/S, plnia

štruktúrálnu funkciu, významne sa podieľajú pri regulácii a expresii génov a enzýmovej aktivite (Johnson et al., 2005).

2.1.3 Ďalšie proteíny obsahujúce železo

Jedná sa o skupinu proteínov, ktoré majú široké spektrum funkcií, ako je napríklad degradácia aromatických molekúl, oxidácia mastných kyselín, posttranslačná úprava aminokyselín, syntéza DNA, RNA, regulácia transkripcie a translácie, tiež transport a skladovanie železa. Najdôležitejší proteín s transportnou úlohou je transferín a skladovacou feritín (Crichton et al., 2001).

2.2 Metabolizmus železa

Ako bolo uvedené vyššie, železo je esenciálny prvok rôznych metabolických procesov. Na rozdiel od ďalších minerálov je jeho hladina v ľudskom tele kontrolovaná len prostredníctvom absorpcie. Exkrécia železa je neregulovaný proces. U dospelého muža a nemenštrujúcej ženy dôjde za fyziologických podmienok denne k strate približne 1 mg železa. Z toho 50 - 60 % exkréciou cez tráviaci trakt vylučovaním žlče a buniek mukózy, ďalej potením, vypadávaním vlasov, deskvamáciou kože a rýchlym obratom a stratou erytrocytov. V ľudskom tele sa železo vyskytuje v najväčšej miere v erytrocytoch ako súčasť hému hemoglobínu (približne 2 g železa u muža a 1,5 g u ženy), v menšej miere je súčasťou zásobných proteínov (feritín a hemosiderín 0,8 – 1,0 g) a v svalových bunkách ako myoglobín (0,3 g). Celkové množstvo železa v tele dospelého človeka tvorí 4,0 – 4,5 g. Tieto hodnoty môžu byť nižšie u žien z dôvodu straty krvi pri menzes, kedy sa priemerný rozsah straty železa pohybuje v hodnotách 1,4 - 3,2 mg železa za deň (Ems & Huecker, 2019; Masopus & Průša, 1999; Wills et al., 1997).

2.2.1 Absorpcia železa

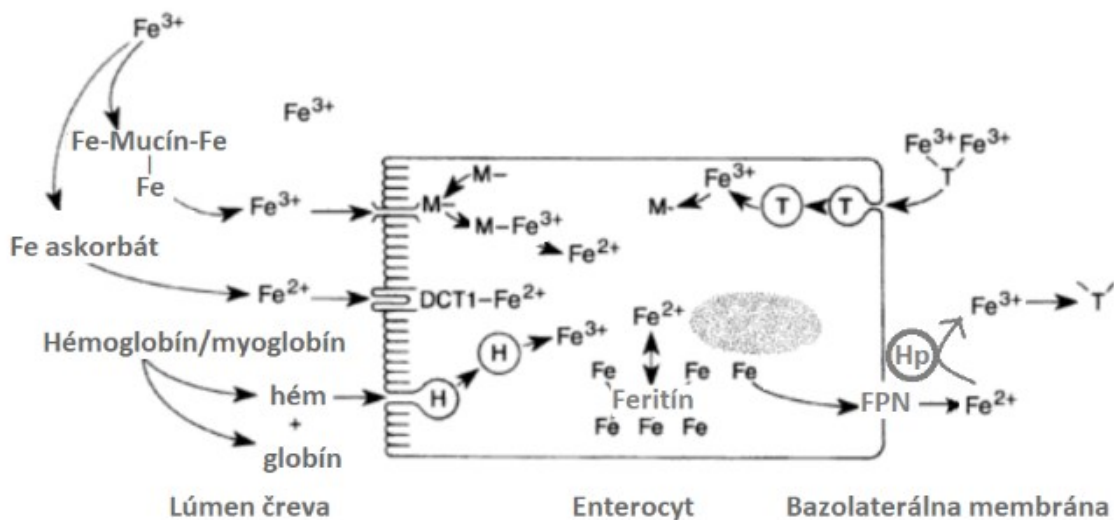
Zdrojom železa pre ľudský organizmus je potrava, kde sa vyskytuje buď ako hémové alebo nehémové, zvyčajne vo väzbe na proteíny, v prípade nehémového železa aj na polysacharidy. Hoci sa strata železa pohybuje v rozmedzí 1 - 3,2 mg na deň, odporúčané dávky pre príjem sú 10-krát vyššie, pretože iba 10 % a menej je z potravy absorbovaných (Wills et al., 1997). Najlepšie sa utilizuje železo z hemoglobínu, teda z mäsa a pečene, horšie zo zeleniny. V prítomnosti fosfátov a fytínu vytvára nerozpustné komplexy a využitie železa sa ešte zhoršuje. Na druhej strane kyselina askorbová podporuje vstrebávanie, neplatí to však pre železo vo forme hému. Množstvo absorbovaného železa závisí najmä od potrieb organizmu.

Pri deplécii zásob železa a zvýšenej erytropoéze sa absorpcia zvyšuje, naopak pri dostatočných zásobách a zníženej erytropoéze sa spomaľuje (Hořejší et al., 1979).

Železo je resorbované v hornej časti tenkého čreva vo forme železnatých iónov. Pre jeho zachytenie z potravy a transport z črevnej sliznice do plazmy sa vyžaduje aktívny transport (Racek, 2006). Mechanizmus v iniciálnej fáze sa však v prípade hémového a nehémového železa líši. Keď nastane vo vnútri mukózných buniek čreva uvoľnenie železa z jeho hémovej štruktúry, je pripojené k nehémovej zásobe a ďalšie metabolické procesy sú už spoločné. Väčšina nehémového železa prijatého v potrave je vo forme železitých iónov (Barton & Edwards, 2000). K vstrebávaniu je potrebná kyslá žalúdočná šťava, v ktorej sa proteíny viažuce železo denaturujú a následne sa pôsobením pepsínu hydrolyzujú. To vedie k uvoľneniu železa. Trojmocné železo má tendenciu pri pH 7 za prítomnosti kyslíka precipitovať. Avšak železité ióny, uvoľnené v kyslom prostredí, sa viažu na mucín žalúdka. V tomto komplexe zostávajú rozpustné aj pri pH 7 a ako súčasť natrávanej potravy pokračujú do ďalších častí gastrointestinálneho traktu (Wills et al., 1997). Ďalším mechanizmom je aj redukcia železitých iónov na železnaté a to buď duodenálnym cytochrómom (Dcytb) umiestneným na bunčnej membráne (Han, 2011), alebo redukujúcimi činidlami akým je kyselina askorbová a následný vstup zredukovaných železnatých iónov cez transportéry DCT-1. Naproti tomu u hémového železa sú dôležité hémové receptory umiestnené na povrchu buniek mukózy. Po naviazaní na tieto receptory sa pravdepodobne aktivuje vznik endozómu a hém v nezmenenej forme porfírínu rýchlo vstupuje do bunky, kde dochádza k uvoľneniu železa enzýmom hémoxigenáza (Barton & Edwards, 2000). Nakoniec, prechod železnatých iónov cez bazolaterálnu membránu z vnútra enterocytu do intersticiálneho priestoru, je cez transportér ferroportín (FPN). Tam dochádza hephaestínom, proteínom uloženým na bazolaterálnom povrchu membrány, k ich oxidácií na železité a následne sa tieto ióny viažu na transportný proteín transferín (Han, 2011).

Kontrola absorpcie železa je na niekoľkých úrovniach. Ako prvé hrajú úlohu proteíny zo skupiny integrínov uložené na luminálnej strane bunčnej membrány enterocytov. Tie silno viažu železo, pravdepodobne prevedené z mucínu a pomáhajú transportu železa do cytoplazmy. V cytoplazme enterocytov sa železo viaže na ďalšie proteíny a to na mobilferín, ktorý ho prijíma z integrínového systému a feritín (Wills et al., 1997). Feritín hrá centrálnu rolu pri protekcii bunky pred oxidačným stresom sprostredkovaným železom (Formigari et al., 2007). Aby železo mohlo byť skladované feritínom, musí byť vo forme železitých iónov, preto má tento proteín ferroxidázovú aktivitu. Extracelulárnym plazmatickým proteínom pre železo je transferín. Okrem transportnej úlohy pre trojmocné železo informuje tiež o jeho hladine

v tele. Na bazolaterálnej strane enterocyty sú receptory pre transferín a naviazanému komplexu železo-transferín umožňujú endocytózou vstup do bunky. Následne je železo z vezikuly vo vnútri enterocyty uvoľnené a prostredníctvom down-regulácie DCT-1 a saturáciou mobilferínu ovplyvňuje množstvo absorbovaného kovu (Barton & Edwards, 2000). Negatívnu kontrolu ferroportínu vykonáva v pečeni sa tvoriaci hepcidín, ktorého expresia pri hypoxii klesá (Bresgen & Eckl, 2015).



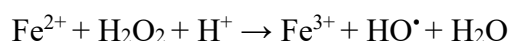
Obrázok 1 Schématické zobrazenie mechanizmu absorpcie železa. Prevzaté a upravené podľa (Barton & Edwards, 2000; Han, 2011).

H – hém; *DCT1* - divalent cation transporter 1; *M* – mobilferín; *FPN* – ferroportín; *Hp* – hephaestín; *T* – transferín

2.3 Železo a oxidačný stres

Vnútri buniek existuje aj redoxne aktívne železo, ktoré ľahko cykluje medzi Fe^{2+} a Fe^{3+} formou, označované ako labile iron pool (LIP). Zastupuje približne 2 % intracelulárneho železa a môže viesť k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS) (Petroněk et al., 2019). ROS majú význam v mnohých intracelulárnych signálnych dráhach zameraných na udržanie vnútornej homeostázy bunky, regulujú funkciu imunitného systému a účastnia sa mnohých pochodov ako druhý poslovia (Sun et al., 2018). Pri nerovnováhe medzi produkovanými ROS a vnútornou antioxidantnou aktivitou bunky hovoríme o oxidačnom strese (Burton & Jauniaux, 2011).

Vznik hydroxylového radikálu popisuje Fentonova reakcia:



Hoci stále nie je isté či produktom Fentonovej reakcie je HO^\bullet alebo FeO^{2+} , predpokladá sa, že pri nízkom pH vzniká HO^\bullet a pri vyššom FeO^{2+} (Koppenol & Hider, 2019). Hydroxylový radikál je vysoko reaktívny a vo vodnom prostredí s polčasom 1 nm *in vivo* reaguje takmer v mieste svojho vzniku (Valko et al., 2006). Vo výsledku dochádza k poškodeniu DNA, lipidov a proteínov a programovanej bunkovej smrti (Martins et al., 2017).

Medzi hlavné druhy ROS ďalej patria superoxidový anión (O_2^-) a peroxid vodíka (H_2O_2). Vo fyziologických podmienkach ochranu tkanív pred poškodením ROS zabezpečuje superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza (GPX), kataláza a ďalšie enzýmy s antioxidačnou aktivitou udržiavaním neutrálnej rovnováhy (Sun et al., 2018).

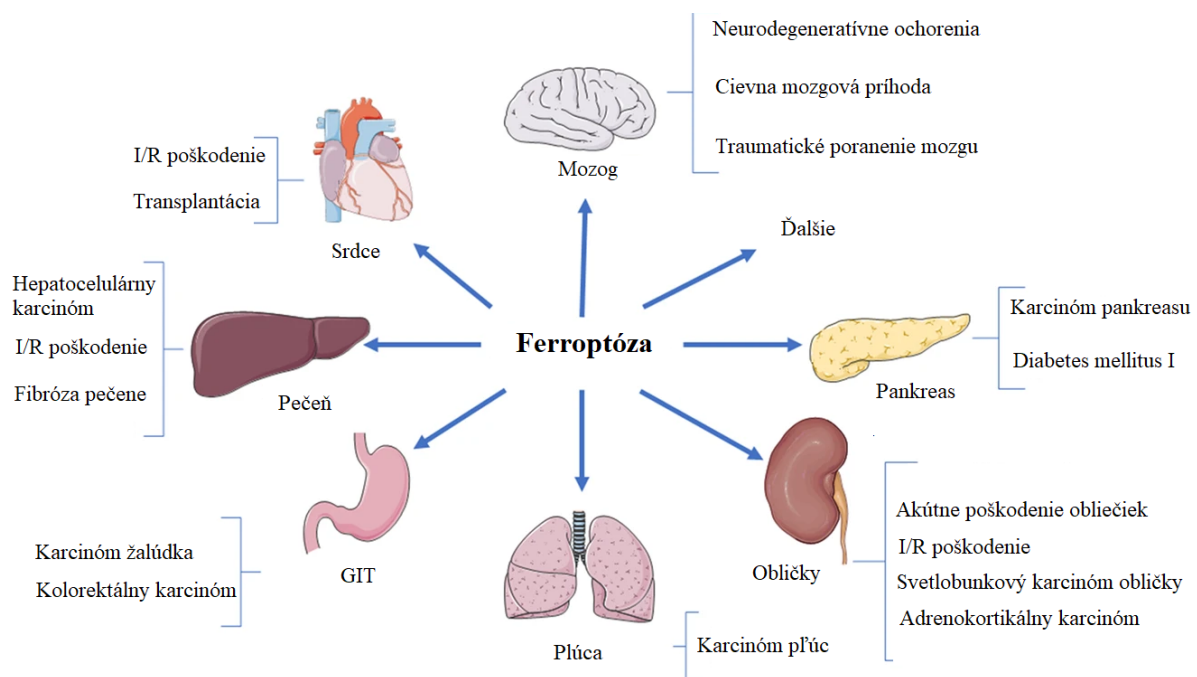
Pri prechýlení rovnováhy na stranu ROS dochádza k oxidačnému stresu, ktorý je primárnym faktorom vzniku nádorových ochorení, očných porúch (vekom podmienená makulárna degenerácia a katarakta) a neurodegeneratívnych chorôb (ataxia, amyotrofická laterálna skleróza, Alzheimerova choroba). Pri rôznych iných ochoreniach sa oxidačný stres vyskytuje sekundárne po prepuknutí primárneho ochorenia, pričom zohráva dôležitú úlohu pri imunitných alebo vaskulárnych komplikáciách. Príkladom môže byť AIDS, septický šok, Parkinsonova choroba alebo renálne zlyhanie (Favier, 2006).

2.4 Ferroptóza

Ferroptóza je nedávno popísaný typ programovanej bunkovej smrti. Vzniká v dôsledku oxidačného stresu vyvolaného intracelulárnym železom a od ostatných známych typov bunkovej smrti sa líši morfológickými, biochemickými a genetickými znakmi. Je jedným z kľúčových faktorov karcinogenézy, neurodegeneratívnych ochorení, cievnej mozgovej príhody, ischemicko–reperfúzneho poškodenia a hrá rolu pri ochoreniach ďalších systémov (obr. 2) (Fang et al., 2019; Kobayashi et al., 2018; Li et al., 2020).

Pri ferroptóze nedochádza k morfológickým zmenám jadra, fragmentácii DNA a aktivite kaspáz. Prejavuje sa zmenšenými mitochondriami, zvýšenou hustotou ich dvojvrstvej membrány a stratou mitochondriálnych krist. Bunečná membrána však zostáva neporušená, jadro je normálnej veľkosti, bez kondenzácie chromatinu. Kľúčovými patofyziologickými črtami ferroptózy sú inaktivácia glutathion peroxidázy 4 (GPX4), oxidácia lipidov železnatými iónmi, akumulácia lipidových peroxidov, ktoré nie sú metabolizované GPX4. Výsledkom je nadmerné množstvo ROS, ktoré podnecuje bunkovú smrť (Li et al., 2020).

Ischemicko-reperfúzne poškodenie srdca je častým problémom po perkutánnej koronárnej intervencii alebo trombolytickej terapii po akútnom infarkte myokardu. Hoci je obnovenie krvného toku nevyhnutné, proces reperfúzie môže spôsobiť ďalšie poškodenie tkaniva (Li et al., 2020). Blokáciou ferroptózy sa môže redukovať závažnosť tohto poškodenia (Fang et al., 2019). Špecifickými inhibítormi ferroptózy sú ferrostatín-1, liproxstatín-1, vitamín E a chelátory železa (Li et al., 2020). Táto práca je zameraná na štúdium potenciálnych chelátorov pri kardiovaskulárnych ochoreniach s možným využitím pri ďalších patologických stavoch.



Obrázok 2 Schématické znázornenie ochorení rozličných systémov s vplyvom ferroptózy. Prevzaté a upravené podľa (Li et al., 2020).

I/R – ischemicko-reperfúzne poškodenie

2.5 Poruchy metabolizmu železa

2.5.1 Choroby z nedostatku Fe

Asi tretina svetovej populácie trpí nedostatkom železa. Popri anémii sú najzávažnejšími prejavmi poškodený mozgový vývoj a kognitívne, behaviorálne a psychomotorické poruchy (Yadav & Chandra, 2011). Nedostatok železa sa spája aj s chronickým srdcových zlyhávaním

(CHSZ), i keď mechanizmus nie je úplne objasnený, po intravenózne terapii železom došlo u pacientov s CHSZ k zlepšeniu stavu (Kang et al., 2017).

2.5.2 Choroby z preťaženia Fe

Najčastejšie ochorenia z preťaženia železom sú hereditárna hemochromatóza (HH), kedy v dôsledku mutácie génov pre proteíny regulujúce absorpciu železa, dochádza k jeho zvýšenému príjmu, ďalej sú to niektoré druhy anémií (talasémia, kongenitálna dyserythropoetická anémia, sideroblastická anémia, myelodysplastický syndróm), pri ktorých sa vstrebávanie železa zvyšuje pre neefektívnu erythropoézu a jeho nadbytok ešte zvýrazní indikovaná transfúzia krvi. Pri týchto ochoreniach množstvo železa prevýši väzobnú kapacitu transferínu a vysoko reaktívna forma železa neviazaného v komplexe s transferínom je vychytávaná bunkami srdca, pečene, endokrinnými žľazami, kde spôsobuje oxidačné poškodenie a vedie ku kardiomyopatiám, cirhóze, diabetu mellitu a ďalším ochoreniam hormonálneho systému (Dev & Babitt, 2017). Zatiaľ čo u HH predstavuje hlavnú liečebnú metódu flebotómia a len u niektorých pacientov sa využívajú chelátory železa, pri talasémii je chelatačná terapia považovaná za nevyhnutnú (Brissot et al., 2018; Aydinok, 2018).

2.6 Chelátory železa

Obecne to sú malé molekuly o molekulovej hmotnosti ~100 - 900 Da. Vo svojej molekule obsahujú donorové atómy kyslíka, dusíka alebo síry pre vytvorenie koordinačnej väzby s atómom železa. Sú viac či menej selektívne pre väzbu so železom, niektoré môžu viazať aj ďalšie kovy ako meď, zinok, horčík a vápnik (Buss et al., 2003). Majú rôzny počet koordinačných väzieb so železom, u hexadentálnych je to šesť, tridentálnych tri a bidentálnych dve (Liu et al., 2002).

Chelátory železa majú, okrem vyššie spomenutých patologických stavov, potencionálne využitie aj u onkologických pacientov, mechanizmom deplécie železa potrebného na rast nádoru alebo v dôsledku redoxných porúch vytvárajú selektívny oxidačný stres v nádore (Buss et al., 2003). V prípade liečby antracyklínovými antibiotikami sa študuje ich podávanie pre zníženie kardiotoxického pôsobenia. Tieto cytostatiká formujú s voľným železom komplexy za vzniku ROS poškodzujúcich peroxidáciou lipidy mitochondriálnych membrán. Zvýšená citlivosť srdcového tkaniva sa vysvetľuje zníženým množstvom enzýmom pre neutralizáciu ROS (SOD, GPX, kataláza) (Cvetković & Scott, 2005).

Ich použitie je možné aj v prípadoch ischemicko-reperfúzneho poškodenia, neurodegeneratívnych ochorení a zápalu, pri ktorých železo môže byť katalyzátorom

oxidačného stresu zodpovedného za poškodenie tkanív. Ďalej sa uvažuje o ich účinkoch pri liečbe malárie, kde by odstránenie prívodu železa pre parazita, mohlo spomaliť jeho rast. (Buss et al., 2003). Dalamagová et al. (2020) rozvinuli hypotézu imunomodulačných, antioxidačných a antivírusových účinkov chelátorov železa pri liečbe nového ochorenia COVID-19 a jeho komplikácií. Opisujú 6 možných mechanizmov účinku chelátorov: 1) inhibíciou replikácie vírusu; 2) znížením dostupnosti železa; 3) upreguláciou B buniek; 4) zvýšením titra neutralizujúcich antivírusových protilátok; 5) potlačením endoteliálneho zápalu; 6) predchádzaním pľúcnej fibrózy a poklesu funkcie pľúc redukciami akumulovaného železa v pľúcach. Vychádzajú z predchádzajúcich experimentov, kde bolo zistené, že zvýšená hladina železa môže podporovať priebeh vírusových ochorení a je spájaná s pľúcnyimi ochoreniami, akútnym respiračným syndrómom a pľúcnou fibrózou, čo sú komplikácie vírusového ochorenia COVID-19.

2.6.1 Prírodné chelátory Fe

2.6.1.1 Siderofory

V prírode sa vyskytujú chelátory, známe ako siderofory, vylučované mnohými baktériami a hubami. Poznáme tri hlavné štruktúrne rodiny: katecholáty, hydroxamáty a karboxyláty. Bolo identifikovaných viac než 500 druhov rozličných sideroforov, pričom niektoré patogény produkujú viacero štruktúrne odlišných typov. Vďaka tejto schopnosti lepšie regulujú oxidačný stres a sú odolnejšie voči imunitnej reakcii hostiteľa. Viazu železité ióny a v porovnaní s transferínom majú k železu vyššiu afinitu (Carver, 2017).

2.6.1.1.1 Deferoxamin (Desferrioxamin; DFO)

Koncom 50. rokov 20. storočia bol objavený metabolit pôdnej baktérie *Streptomyces pilosus*. Patrí do skupiny hydroxámových kyselín (Codd et al., 2018). Je to hexadentálny chelátor a podáva sa parenterálne (Hider & Hoffbrand, 2018). Po pridaní mesylátovej soli DFO Svetovou zdravotníckou organizáciou na zoznam esenciálnych liekov, bol tento chelátor 30 rokov jedinou možnou liečbou pre pacientov so sekundárnym preťažením železom. V súčasnosti sa používa buď v monoterapii alebo sa pridáva do kombinácie so syntetickými chelátormi deferasiroxom a deferipronom. DFO sa používa aj v prípadoch akútnej otravy železom, najmä pri predávkovaní sa suplementami železa dieťaťom (Codd et al., 2018). Predpokladá sa aj jeho imunomodulačný efekt pri niektorých vírusových infekciách ako je tuberkulóza, HIV a EV71 (Williams & Meyer, 2009; Yang et al., 2014). EV71 je jedným z hlavných pôvodcov choroby ruky, nohy, ústa u detí mladších ako šesť rokov. V súčasnosti

proti tomuto vírusu nie je k dispozícii žiadna vakcína alebo antivírusová terapia (Yang et al., 2014). Nedostatkami DFO sú systémové nežiaduce účinky, parenterálne podanie a nízka adhérenca pacientov k liečbe (Hider & Hoffbrand, 2018). Jeho účinok limituje aj slabý prechod membránami a neschopnosť viazať intracelulárne zásoby železa (Lovejoy & Richardson, 2005).

2.6.1.1.2 Desferri-exocheliny

Exocheliny sú produkty *Mycobacterium tuberculosis*. Na rozdiel od DFO sú rozpustné vo vode aj v tukoch, môžu prechádzať bunecnými membránami a chelatovať intracelulárne železo. Vyznačujú sa nízkou alebo žiadnou toxicitou. Považujú sa za potenciálnu liečbu chorôb so zvýšenou hladinou železa. Ich účinok je nutné potvrdiť klinickými štúdiami (Horwitz & Horwitz, 2014).

2.6.1.2 Rastlinné chelátory

Mnoho rastlín obsahuje látky schopné viazať železo. Z rôznych druhov rastlín rodu kurkuma sa získava žltá-oranžová kurkumín, hlavná zložka karmínového korenia, používaný v ázijskej tradičnej medicíne (Unlu et al., 2016). Predpokladá sa, že jeho chelatačná aktivita, má antikarcinogénne účinky, avšak klinické štúdie to nepotvrdili (Hatcher et al., 2008; Nelson et al., 2017). Schopnosti chelatovať ióny železa sú pripisované aj antioxidačné účinky flavanolu quercetínu obsiahnutého v brusniciach. Bola zistená antiproliferatívna aktivita quercetínu pri testovaní s nádorovými bunecnými líniami, pre potvrdenie spojitosti s chelataciou železa sú potrebné ďalšie štúdie. Rovnako aj na antioxidačnom účinku polyfenolov získaných z extraktu semien hrozna či flavonoidov extrahovaných z listu čajovníka sa podieľa ich chelatačná aktivita (Hatcher et al., 2009).

2.6.2 Syntetické chelátory Fe

2.6.2.1 Deferipron

Prvé klinické skúšanie tohto syntetického bidentálneho chelátoru začalo v roku 1989. Výhodou deferipronu, známeho pod skratkami L1, CP20, je možnosť perorálneho podania a rýchla absorpcia. Nežiadúcimi účinkami sú najčastejšie gastrointestinálne problémy, prechodné zvýšenie pečenej enzýmov, arthropatia, neutropénia, no najzávažnejším je agranulocytóza. Deferipron je indikovaný v prípade kontraindikácie alebo neúčinnosti DFO. Veľký multicentrický výskum potvrdil podstatne nižšiu morbiditu i mortalitu na poškodenie srdca pri liečbe deferipronom než u DFO. Deferipron je považovaný ako liečivo druhej voľby u detí od 6 rokov, no v rozvojových krajinách pre vysokú adhérenciu k liečbe a nižšiu cenu sa

uprednostňuje práve deferipron pred odporúčaným deferasiroxom, ktorý je 4x drahší než deferipron a DFO (Hider & Hoffbrand, 2018).

2.6.2.2 Deferasirox

Deferasirox je tridentálny chelátor, ktorý selektívne viaže železité ióny primárne z pečene. Jeho výhodou je možnosť perorálneho podania. V roku 2005 bol FDA (Food and Drug Administration) schválený pre liečbu chronického preťaženia železom po krvných transfúziách pre pacientov od dvoch rokov. Najčastejšie nežiadúce účinky sú horúčka, bolesť hlavy, kašeľ a gastrointestinálne problémy. V kombináčnej terapii s deferipronom sa prejavili v nižšej miere, rovnako ako nežiadúce účinky deferipronu (Stumpf, 2007; Hider & Hoffbrand, 2018).

2.6.2.3 Aroylhydrazóny

2.6.2.3.1 Pyridoxalizonikotinoylhydrazón (PIH)

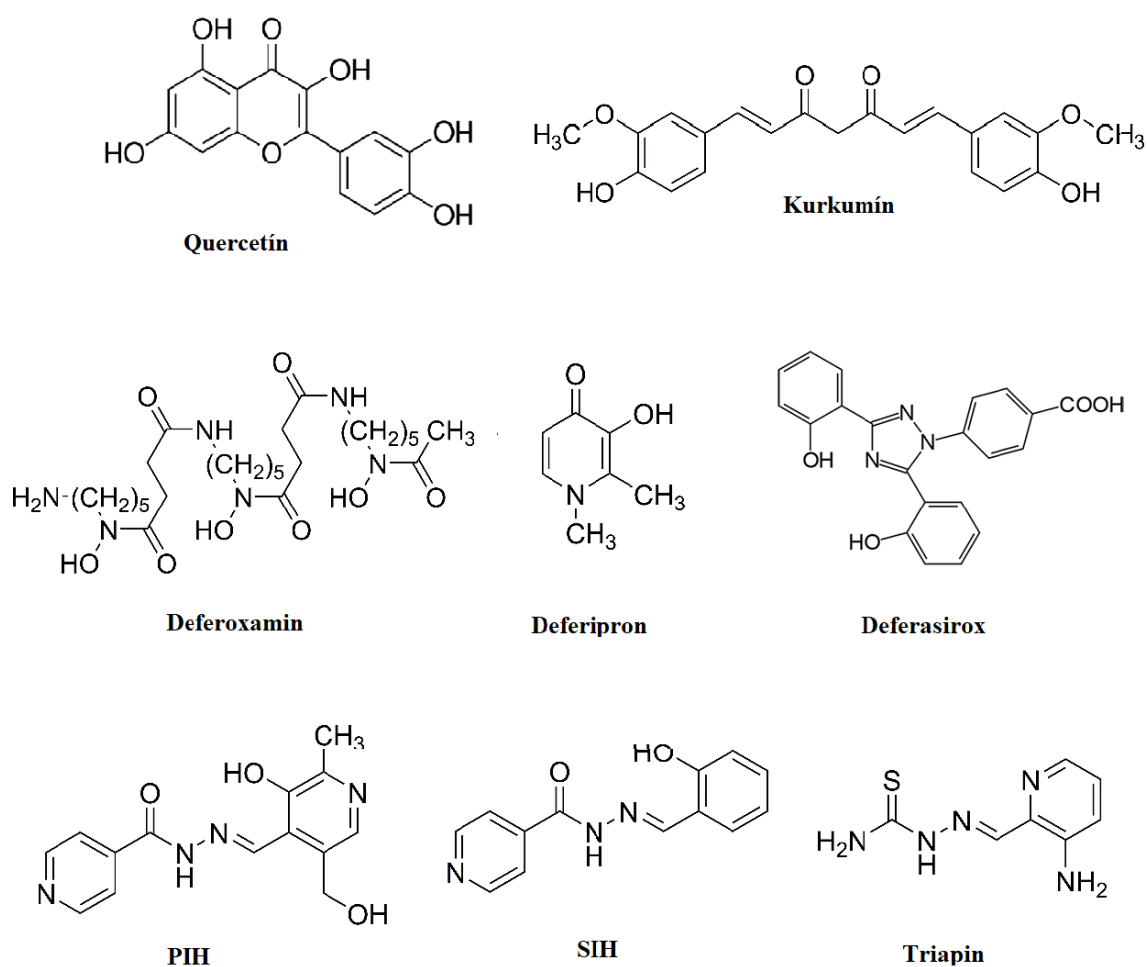
Tento tridentálny chelátor s vysokou biologickou aktivitou má vysokú selektivitu a afinitu k železitým iónom porovnateľnú s DFO. Vo fyziologickom pH je neutrálny a má pomerne nízku molekulovú hmotnosť (286 Da). Vďaka týmto faktorom prechádza bunecnými membránami a je schopný chelatovať intracelulárne železo (Lovejoy & Richardson, 2003). Pre pochopenie vzťahu medzi štruktúrou a účinkom, bolo od molekuly PIH odvodených mnoho derivátov so systematickou substitúcou (Richardson et al., 2009).

2.6.2.3.2 Salicylaldehydizonikotinoylhydrazón (SIH)

Tridentálny chelátor SIH ľahko prestupuje do vnútra bunky a viaže intracelulárne železo. V porovnaní s chelátormi používanými v klinickej praxi (DFO, deferipron, deferasirox) preukázal najlepší pomer cytoprotektívnej aktivity proti indukovanému oxidačnému stresu ku svojej vlastnej toxicite (Bendova et al., 2010). V porovnaní s DFO má výrazne vyššiu účinnosť chrániť kardiomyocyty pred oxidačným stresom vyvolaným H₂O₂ (Šimůnek et al., 2005). Preukázal protektívne vlastnosti aj proti oxidačnému stresu indukovaného *tert*-butylhydroperoxidom a katecholamínmi (Bendova et al., 2010; Hašková et al., 2011). Boli vyvinuté jeho analógy s porovnateľnou cytoprotektívnou aktivitou (Bendova et al., 2010; Jansová et al., 2018). Pre jeho krátky biologický polčas a zníženie toxicity spôsobenej depléciou železa boli vyvinuté prochelátory, ktoré sa aktivujú na účinnú formu SIH kontaktom s ROS (Jansová et al., 2014). Táto práca pokračuje v štúdiu účinkov SIH a jeho nových derivátov.

2.6.2.4 Thiosemikarbazóny

Sú to tridentálne chelátory s donorovým atómom síry. Majú vysokú afinitu ku katiómom železa, medi, gália, kobaltu a zinku (Lovejoy & Richardson, 2005). Potencionálnou látkou pre liečbu nádorových ochorení je Triapine®. V súčasnosti je v tretej fáze klinického hodnotenia. Študuje sa jeho pozitívny efekt v kombinácii s rádioterapiou a cisplatinou u cervikálnych a vaginálnych karcinómoch (Kunos et al., 2019).



Obrázok 3 Chemické štruktúry vybraných chelátorov železa.

3 Ciele práce

In vitro hodnotenie protektívneho potenciálu nových derivátov chelátoru železa SIH na bunčnej línii H9c2 proti indukovanému oxidačnému stresu H₂O₂.

Definovanie vlastnej toxicity testovaných látok po krátkodobej (24 hodín) a dlhodobej (72 hodín) inkubácii s H9c2 bunkami.

Porovnanie a analýza protektívnych a toxických vlastností testovaných látok s vlastnosťami referenčnej látky SIH.

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Bunková línia

Všetky pokusy boli uskutočňované na bunkovej línii H9c2, čo sú potkanie embryonálne kardiomyoblasty. Táto nenádorová bunková línia slúži ako *in vitro* model srdcového tkaniva. Bunky sú vhodné na použitie pre pokusy medzi pasážami P20 - P40.

4.1.2 Prístrojové vybavenie a pomôcky

- vodný kúpeľ Memmert WB 14 LV (Memmert, Nemecko)
- box s laminárnym prúdením Aura 2000 m.a.c. s triedou biohazardu A (BioAir, Taliansko)
- inkubátor buniek s termostatom a reguláciou CO₂ Forma Scientific CO₂ incubator, model 311 (Forma Scientific, USA)
- plastové sterilné kultivačné nádoby T75, Petriho misky 150 mm, 96-jamkové mikrotitračné kultivačné platničky s plochým dnom (Gama, Česká republika)
- laboratórne sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- mikroskúmavky 0,5; 1,5; 2,0 ml (Eppendorf, Nemecko)
- pipetíky Eppendorf easypet (Eppendorf, Nemecko) a BioHit midi plus (BioHit, Fínsko)
- sérologické sterilné pipety rôzneho rozsahu (TPP, Švajčiarsko)
- automatické pipety Eppendorf research rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- pipeta elektronická 8-kanálová e-PET BioHit 50 - 1200 µl (Biohit, Fínsko)
- sterilné špičky rôzneho rozsahu (Memmert, Nemecko)
- invertovaný epifluorescenčný mikroskop Nikon Eclipse TS 100 s objektívom Nikon 10x/0,25 (Nikon, Japonsko)
- čítačka pre spektrofotometrické stanovenie Infinite M 200 s optickým hranolom (Tecan, Rakúsko)
- analytické váhy ScalTec SBC 22
- laboratórne trepačky vortex (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- dosková trepačka Heildolph Titramax 100 (SRN)
- Bürkerova komôrka (Brand, SRN)

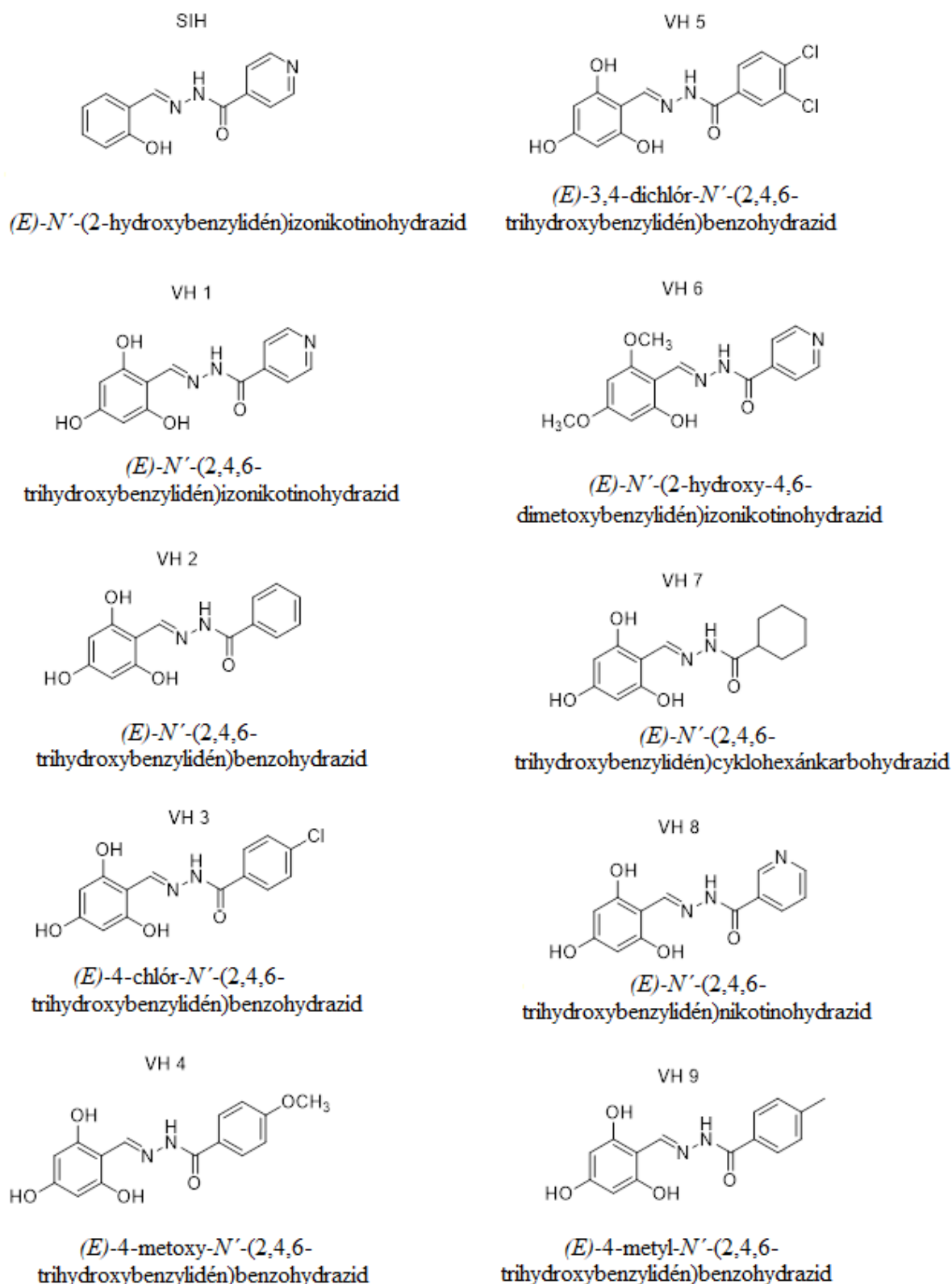
4.1.3 Reagencie a chemikálie

- Dulbecco Modified Eagle's Medium bez pyruvátu sodného (DMEM, Sigma, Nemecko)
- Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Česká republika)
- teplom deaktivované fetálne bovinné sérum (FBS, HyClone)
- bovinný sérový albumín (BSA)
- fosfátový pufer tablety (PBS, Sigma, Nemecko)
- HEPES roztok 1M (Sigma, Nemecko)
- HEPES buffered saline o pH 7,2 (40 mM HEPES; 150 mM NaCl)
- penicilín-streptomycín 100x koncentrovaný roztok (P/S, používaný v koncentrácii 10 000 jednotiek/ml penicilínu a 10 mg/ml streptomycínu, Lonza, Česká republika)
- trypsín s EDTA 10x koncentrovaný roztok (používaný ako 0,5 % trypsín a 0,02 % EDTA roztok, Lonza, Česká republika)
- trypanová modrá (Sigma, Nemecko)
- neutrálna červeň roztok 3,3 g/l (Sigma, Nemecko)
- peroxid vodíka 3% roztok (H₂O₂, Sigma, Švajčiarsko)
- dimethylsulfoxid ≥ 99,9% (DMSO, Sigma)
- roztok kalceinu 2 mM
- roztok citrátu amónno-železitého (FAC)
- ADS pufer o pH 7,4 (NaCl 116 mM, KCl 5,3 mM, MgSO₄·7 H₂O 1,2 mM, 1,13 mM, NaH₂PO₄·H₂O 1,13 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 1 mM, D-glukóza·H₂O 5 mM)
- etanol absolútny p.a. ≥ 99,9% (Penta, Česká republika)
- formaldehyd 36,3% (Penta)
- kyselina octová ľadová p.a. ≥ 99,9% (Penta)
- ultradestilovaná voda (MQ, prístroj Milli-Q RG, Millipore, Česká republika)
- SIH a jeho deriváty (obr. 4):
 - (*E*)-*N'*-(2-hydroxybenzylidén)izonikotinohydrazid (SIH)
 - (*E*)-*N'*-(2,4,6-trihydroxybenzylidén)izonikotinohydrazid (VH1)
 - (*E*)-*N'*-(2,4,6-trihydroxybenzylidén)benzohydrazid (VH2)
 - (*E*)-4-chlór-*N'*-(2,4,6-trihydroxybenzylidén)benzohydrazid (VH3)
 - (*E*)-4-metoxy-*N'*-(2,4,6-trihydroxybenzylidén)benzohydrazid (VH4)
 - (*E*)-3,4-dichlór-*N'*-(2,4,6-trihydroxybenzylidén)benzohydrazid (VH5)
 - (*E*)-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimetoxibenzyldén)izonikotinohydrazid (VH6)

- (*E*)-*N'*-(2,4,6-trihydroxybenzylidén)cyklohexánkarbohydrazid (VH7)
- (*E*)-*N'*-(2,4,6-trihydroxybenzylidén)nikotinohydrazid (VH8)
- (*E*)-4-metyl-*N'*-(2,4,6-trihydroxybenzylidén)benzohydrazid (VH9)

Nové deriváty SIH boli syntetizované na Katedre anorganickej a organickej chémie Farmaceutickej fakulty vo výskumnej skupine doc. PharmDr. Jaroslava Roha, Ph.D.

Zásobné roztoky chelátorov železa boli pripravené v DMSO, aby sa predišlo kontaminácií vzdušnou vlhkosťou a znížil sa rozklad látky boli zmrazené na -25°C . Pre prípravu ostatných roztokov a reagencií bola použitá ultradestilovaná voda.



Obrázok 4 Chemické štruktúry salicylaldehydizonikotinoylhydrazónu (SIH) a od neho odvodených nových derivátov.

4.2 Metodika

4.2.1 Kultivácia

Pre kultiváciu buniek H9c2 bolo použité SCM pripravené z DMEM s pyruvátom (Lonza) obohatené o 10 % FBS, 1 % HEPES a 1 % P/S. Bunky boli kultivované v sterilných plastových kultivačných nádobách T75 a v Petriho miskách v inkubátore pri teplote 37°C a v atmosfére s obsahom oxidu uhličitého (5 %) a konštantnou vlhkosťou vzduchu. Práca s bunkami bola prevádzaná za sterilných podmienok v laminárnom boxe, médium a ďalšie roztoky boli vytemperované na 37°C.

4.2.2 Pasážovanie

Pre zachovanie morfológických vlastností boli bunky pri konfluencii 80 – 90 % pravidelne spasážované, čo bolo každý 3. – 4. deň. Po vyliatí starého média sme bunky opláchli sterilným PBS pufrom, aby sme odstránili zvyšky séra. Následne sme pridali 1 ml trypsínu do T75 a 3 ml trypsínu do Petriho misky, rovnomerne sme ho rozprestrelí po dne kultivačných nádob, fľašu sme tesne uzavreli a inkubovali sme 5 minút, pokým sa bunky nezačali púšťať. Medzitým sme do nových sterilných kultivačných nádob napipetovali potrebné množstvo predohriateho SCM, aby výsledný objem so spasážovanými bunkami bol 15 ml v T75 a 30 ml v Petriho miske. Po 5 minútach inkubácie sme bunky rozvoľnili ešte poklepaním nádoby o dlaň, skontrolovali pod mikroskopom, či sú uvoľnené odo dna a trypsin urýchlene deaktivovali pridaním čerstvého predohriateho SCM, 10 ml do T75 a 20 ml do Petriho misky. Bunky sme dôkladne resuspendovali a preniesli sme dané množstvo suspenzie do pripravených kultivačných nádob, rovnomerne sme ich rozptýlili a vložili do inkubátora, fľašu T75 s povoleným uzáverom. Zvyšné množstvo buniek sme použili pre nasadzovanie na pokus.

4.2.3 Stanovenie počtu živých buniek počítaním na Bürkerovej komôrke

Pre rozlíšenie mŕtvych a živých buniek sa využíva schopnosť živých buniek odstraňovať trypanovú modrú z vnútra bunky, ktorá samovoľne prestupuje membránami. Naopak mŕtve bunky túto schopnosť nemajú a preto je ich sfarbenie modré.

Z dôkladne premiešanej bunkovej suspenzie sme odobrali 100 µl a pridali k rovnakému množstvu 0,4 % roztoku trypanovej modrej. Premiešali sme a nechali spolu inkubovať pri laboratórnej teplote 5 minút. Dobré sme resuspendovali a na obe počítacie plochy Bürkerovej komôrky sme naniesli 10 µl pripravenej suspenzie. Počítali sme len nezafarbené

bunky a to na každej ploche v 5 štvorcoch, súčet buniek v 10 štvorcoch vynásobený 2000 sa rovnal počtu buniek v 1 ml suspenzie.

4.2.4 Nasadzovanie buniek na pokus

Po určení počtu buniek v suspenzii po spasážovaní, sme suspenziu nariedili SCM na koncentráciu 100 000 buniek na ml, bunky sme nasadzovali na 96-jamkovú platničku s plochým dnom v koncentrácií 10 000 buniek na jamku v 100 μ l.

Po 24 hodinách sme SCM vymenili za 100 μ l SFM pripraveného z DMEM bez pyruvátu (SIGMA), 0,47 % BSA, 1 % HEPES a 1 % P/S. V každom experimente sme roztoky testovaných látok pridávali po 48 hodinách od nasadenia buniek na mikroplatničku.

4.2.5 Stanovenie protekcie buniek testovanými látkami pred modelovým oxidačným stresom

Po 24 hodinách od výmeny média so sérom za bezsérové sme pridávali pracovné roztoky testovaných látok v DMSO, pripravené v koncentráciách (300, 100, 10 a 1 mM), spolu s H_2O_2 v roztoku SFM, pričom bola dodržaná finálna koncentrácia 0,1 % DMSO vo všetkých experimentálnych aj kontrolných skupinách. V tejto koncentrácií nebol zaznamenaný žiaden vplyv DMSO na bunečnú viabilitu. Pridávaný objem roztokov bol 200 μ l na jamku.

Schéma pokusu: 1x slepá vzorka (negatívna kontrola viability - bunky inkubované s 10 mM H_2O_2), 1x 200 μ M H_2O_2 , 4x kontrola (100 % viabilita) a vzrastajúce koncentrácie testovaných látok (μ M): 1; 3; 10; 30; 100; 300.

Stanovenie protekcie buniek bolo vyhodnocované po 24 hodinách.

4.2.6 Stanovenie vlastnej toxicity testovaných látok

Stanovenie vlastnej toxicity látok sme prevádzali po 24 a 72 hodinách inkubácie buniek s testovanými látkami. Pracovné roztoky sme pridávali v roztoku SFM, výsledná koncentrácia DMSO vo všetkých experimentálnych aj kontrolných skupinách bola 0,1 %. Pridávaný objem roztokov bol 200 μ l na jamku.

Toxicita látok po 24 hodinách bola stanovená pre koncentráciu 300 μ M u všetkých chelátorov, čo bola maximálne dosiahnuteľná koncentrácia, pri ktorej boli testované látky rozpustné.

Toxicita látok po 72 hodinách bola hodnotená pre vzrastajúce koncentrácie látok. Schéma pokusu: 1x slepá vzorka (negatívna kontrola viability - bunky inkubované s 10 mM

H₂O₂), 5x kontrola (100 % viabilita) a vzrastajúce koncentrácie testovaných látok (μ M): 1; 3; 10; 30; 100; 300.

4.2.7 Stanovenie životaschopnosti buniek – neutral red uptake assay

Test stanovenia životaschopnosti buniek je založený na schopnosti živých buniek inkorporovať neutrálnu červen. Toto farbivo jednoducho penetruje neporušenou bunecnou membránou a akumuluje sa v lyzozómoch živých buniek (Repetto et al., 2008). Po pridaní lyzačného roztoku dochádza k uvoľneniu neutrálnej červenej. Množstvo farbiva je priamo úmerné počtu živých buniek a bolo stanovené spektrofotometrickým meraním absorbancie na čítačke mikrotitračných platničiek Tecan Infinite M 200.

Po exponovaní buniek testovanými látkami (protektia 24 hodín, toxicita 24 a 72 hodín), sme odsali z každej jamky 100 μ l média a pridali sme 100 μ l pracovného roztoku neutrálnej červene 80 μ g/ml v SFM, aby výsledná koncentrácia v každej jamke bola 40 μ g/ml. Následne sme bunky vložili na 2 hodiny do inkubátora pri teplote 37°C v atmosfére s obsahom 5 % CO₂ a konštantnou vlhkosťou vzduchu.

Po 2 hodinách inkubácie sme z každej jamky odsali staré médium s roztokom neutrálnej červene a pridali sme 100 μ l/jamku fixačného roztoku (1 % roztok CaCl₂ v 0,5 % formaldehydu). Nechali sme stáť pri laboratórnej teplote 15 minút. Tým sme zaistili zachytenie buniek na dno mikropatničky. Po 15 minútach sme fixačný roztok odstránili, bunky opláchli 2x 80 μ l/jamku PBS, potom sme pridali 200 μ l/jamku lyzačného roztoku (1 % ľadovej kyseliny octovej v 50 % etanole). Platničky sme nechali 30 minút trepať na trepačke pri laboratórnej teplote, došlo k lýze buniek a zhomogenizovaní obsahu v jamkách. Následne sme zmerali absorbanciu pri 540 nm. Z nameraných hodnôt sme v rámci jednej koncentrácie danej látky vypočítali priemery, od nich sme odčítali hodnotu absorbancie slepej vzorky, ktorú sme vyrátali ako priemer hodnôt nameraných v jamkách s výslednou koncentráciou 10 mM H₂O₂ (viabilita = 0 %). Výsledné hodnoty sme vyjadrili ako percentá kontroly (viabilita = 100 %).

4.2.8 Stanovenie účinnosti chelatacie Fe v bunkách - Calcein green-AM assay (Glickstein et al., 2006)

Kalcein-acetoxymetyléster (kalcein-AM) je nefluorescenčné farbivo, ktoré prestupuje bunkovou membránou a vnútri bunky je konvertované intracelulárnymi esterázami na anionickú formu kalcein, neschopnú prechodu cez bunecnú membránu (Uggeri et al., 2000). Kalcein je fluorescenčné farbivo, ktoré ochotne tvorí komplexy s Fe²⁺ a Fe³⁺. V komplexe s týmito iónmi sa jeho fluorescencia zháša. Keď sa ku komplexu Fe-kalcein pridá testovaný

chelátor, dochádza k odňatiu Fe z komplexu Fe-kalcein a vzniká komplex Fe-chelátor. To sa prejaví zvýšením fluorescence (voľný kalcein). Fluorometricky ($\lambda_{\text{ex}} = 486 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$) môžeme sledovať kinetiku tohto procesu a hodnotiť schopnosť testovaných chelátorov prechádzať bunecnou membránou do vnútra buniek a ich chelatačné vlastnosti.

Po 24 hodinách od nasadenia buniek na mikrotitračnú platničku (viď nasadzovanie buniek) sme vymenili médium za bezsérové SFM s $100 \mu\text{M}$ FAC v objeme $100 \mu\text{l}$ na jamku a nechali sme inkubovať 24 hodín. Potom sme bunky 2x opláchli ADS pufrom ($100 \mu\text{l}/\text{jamku}$), pridali $1 \mu\text{M}$ roztok kalceinu-AM ($100 \mu\text{l}/\text{jamku}$) a inkubovali sme v termostate pri teplote 37°C 10 minút. Následne sme bunky 2x opláchli ADS pufrom ($100 \mu\text{l}/\text{jamku}$) a nechali 25 minút stáť v tme pri laboratórnej teplote. Tak sme bunky 3x opláchli ADS pufrom ($100 \mu\text{l}/\text{jamku}$) a hneď sme zmerali baseline na čítačke Tecan Infinite M 200. Vzápätí sme pripipetovali vzorky testovaných chelátorov v ADS pufre ($100 \mu\text{l}/\text{jamku}$), aby výsledná koncentrácia chelátoru bola 100 nM a pokračovali sme v meraní chelatacie 10 minút (600 s).

4.2.9 Štatistické spracovanie dát

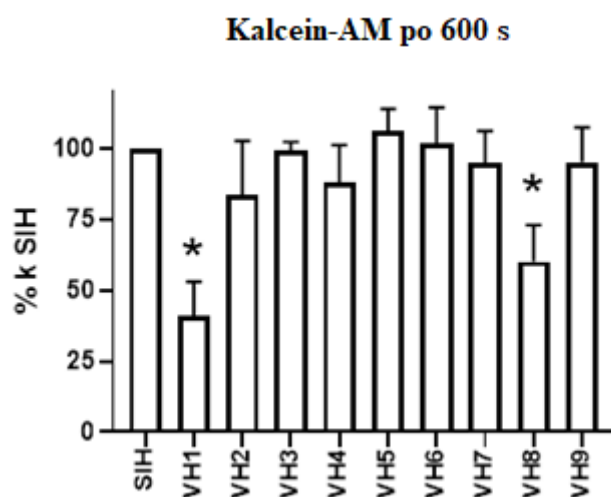
Namerané výsledky sme vyjadrili ako aritmetický priemer hodnôt jednotlivých experimentov so smerodajnými odchýlkami. Štatistické a grafické spracovanie výsledkov sme urobili pomocou programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Štatistickú významnosť sme určili pomocou testu ANOVA s *post hoc* Holm – Sidak testom. Za štatisticky významné výsledky sme považovali hodnoty s $p \leq 0,05$. Pre stanovenie hodnôt IC_{50} (koncentrácia testovanej látky, pri ktorej dochádza k zníženiu 50 % viability oproti kontrole – 100 %) a hodnôt EC_{50} (koncentrácia testovanej látky, pri ktorej dochádza k protekcii 50 % buniek ku kontrole – 100 %) sme použili program GraphPad Prism 8, model Dose-response – inhibition.

5 Výsledky

5.1 Stanovenie účinnosti chelatacie Fe v bunkách - Calcein green-AM assay

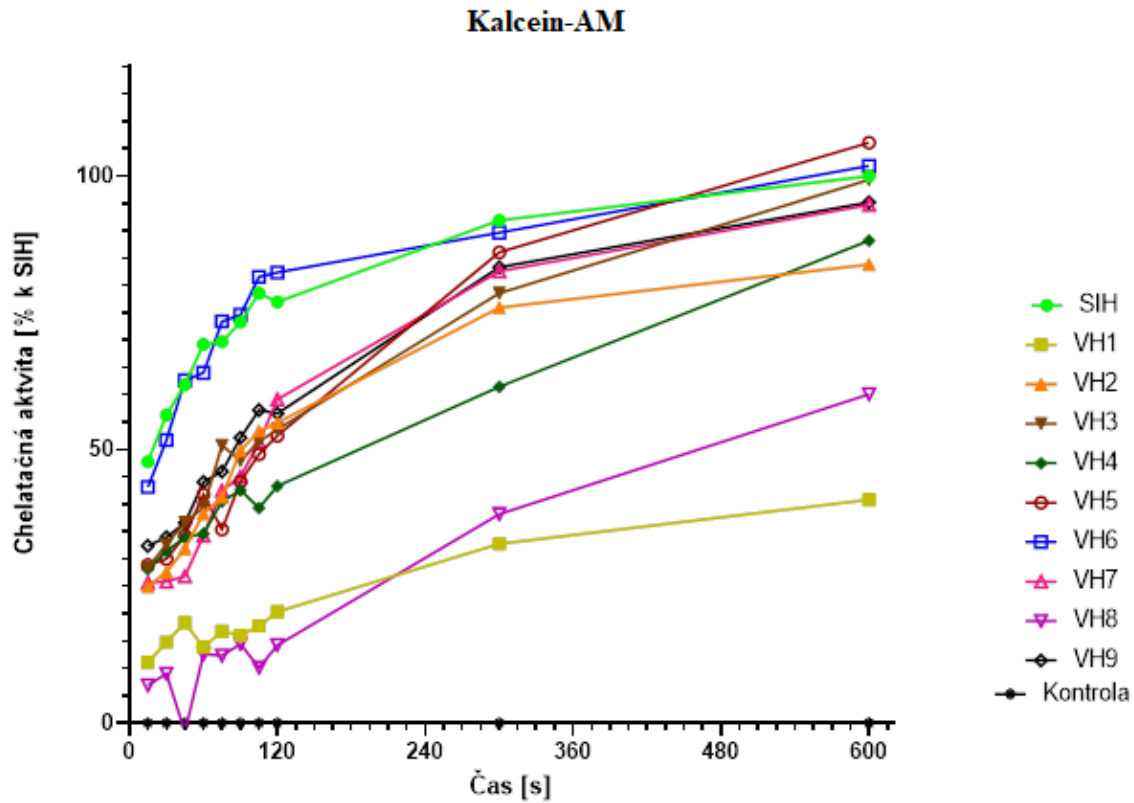
Pre účinok študovaných chelátorov železa je nevyhnutnou podmienkou prestup látky bunecnou membránou a schopnosť vo vnútri buniek chelatovať voľné ióny železa, ktoré sú zodpovedné za toxické poškodenie buniek. Týmto testom sme zhodnotili prestup hodnotených látok bunecnou membránou a zároveň aj ich chelatačné vlastnosti. Výsledky fluorescenčnej intenzity sme vzťahovali k porovnávacej látke SIH, ktorej hodnota predstavuje 100 % a vyjadrili sme ich ako priemer so smerodajnou odchýlkou.

Chelatačná účinnosť derivátov VH1 a VH8 po 10 minútach bola signifikantne nižšia oproti porovnávajúcej látke SIH, v prípade VH1 je to 41 ± 11 % a u VH8 je to 60 ± 11 % k SIH (obr. 5). Tieto hodnoty odráža aj schopnosť protekcie VH1 a VH8 pred navodeným oxidačným stresom, kde tieto látky vykazujú najnižšie protektívne vlastnosti (obr. 7). Preto sa domnievame, že ich nízka ochranná schopnosť je pre ich nedostatočný prestup bunecnou membránou. Ostatné testované látky nevykazujú po 10 minútach signifikantnú odlišnosť voči chelatačnej aktivite SIH (obr. 5). Prvé štyri minúty merania majú najrýchlejšiu chelatačnú aktivitu porovnávacia látka SIH a testovaná látka VH6, avšak po 10 minútach experimentu rozdiel s ostatnými látkami (okrem VH1 a VH8) zaniká (obr. 6). Keďže pri experimentoch na protekciu buniek pred modulovaným oxidačným stresom sme bunky exponovali chelátormi 24 hodín, predpokladáme, že rozdiel v rýchlosti nástupu účinku prvé štyri minúty je bezvýznamný.



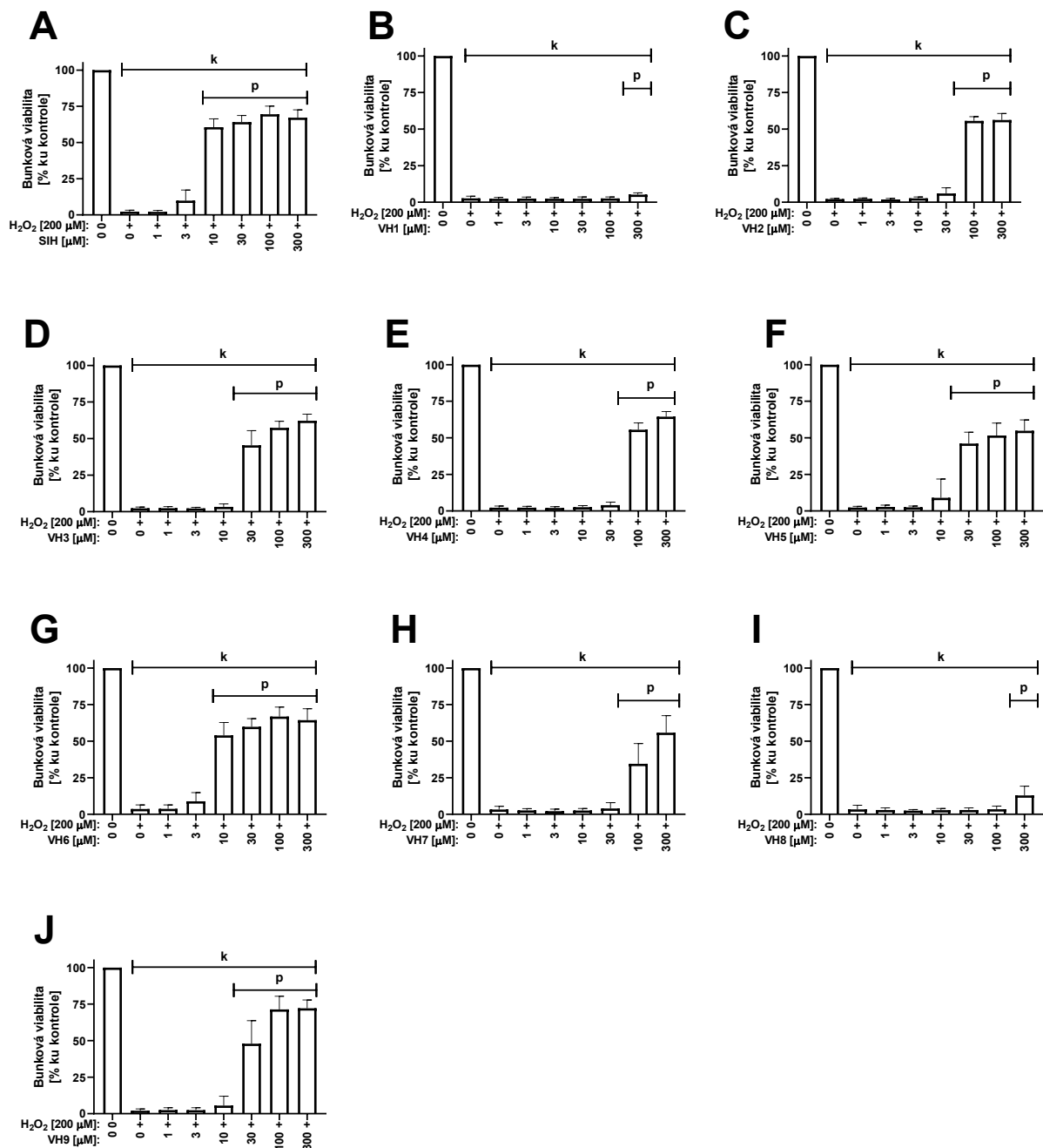
Obrázok 5 Graf znázorňuje zmeny vo fluorescenčnej intenzite po 10 minútach inkubácie s testovanými látkami (všetky v koncentrácií 100 mM). Intenzita fluorescencie je zobrazená

v porovnaní so SIH po 10 minútach (100 %). Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka, počet nezávislých meraní je $n = 4$. Štatistická významnosť bola určená pomocou one-way ANOVA s post hoc Holm-Sidak testom s hladinou významnosti: $* p \leq 0,05$ v porovnaní k SIH.



Obrázok 6 Graf zaznamenáva kinetiku chelatácie Fe vo vnútri buniek jednotlivými testovanými látkami (všetky v koncentrácii 100 mM) v priebehu 10 minút. Hodnoty sú zobrazené v porovnaní so SIH po 10 minútach = 100 %. Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer, počet nezávislých meraní je $n = 4$.

5.2 Stanovenie protekcie buniek testovanými látkami pred modelovým oxidačným stresom



Obrázok 7 Grafy zaznamenávajú protektívny efekt SIH (A) a jeho derivátov VH1 (B), VH2 (C), VH3 (D), VH4 (E), VH5 (F), VH6 (G), VH7 (H), VH8 (I), VH9 (J) na viabilitu buniek H9c2 po 24 hodinách inkubácie s H₂O₂ (200 μM). Bunková životaschopnosť bola zistená za použitia testu vychytávania neutrálnej červenej a výsledky sú vyjadrené ako percentá vztiahnuté ku viabilite kontrolnej skupiny (100 %). Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka, počet nezávislých meraní je n = 4. Štatistická

významnosť bola určená pomocou one-way ANOVA s post hoc Holm-Sidak testom s hladinou významnosti: $p \leq 0,05$ v porovnaní ku kontrole (k); $p \leq 0,05$ v porovnaní k bunkám exponovaným len H_2O_2 ($200 \mu M$) (p).

Bunky sme vystavili oxidačnému stresu, ktorý sme navodili pridaním $200 \mu M H_2O_2$. Schopnosť testovaných látok chrániť pred týmto oxidačným stresom a následným poškodením a smrťou buniek sme hodnotili po 24 hodinách exponovania testom vychytávania neutrálnej červene. Študované látky boli pridávané vo vzrastajúcej koncentrácii a ich ochrannú schopnosť sme vyjadrili ako aritmetický priemer 4 nezávislých meraní voči kontrole (100 %) (obr. 7). Pre každú látku sme vyrátali aj EC_{50} – koncentráciu, ktorá ochráni 50 % buniek proti pôsobeniu H_2O_2 po 24 hodinách inkubácie (tab. 1).

SIH (A): Štatisticky významné zvýšenie viability sme pozorovali od koncentrácie $10 \mu M$ SIH, kedy došlo k ochrane 61 % buniek, pričom najvyššia dosiahnutá protekcia bola pri koncentrácií $100 \mu M$ a to na 69 % úroveň viability kontrolnej skupiny (100 %). Napriek tomu, že nie je pozorovaný signifikantný rozdiel medzi protekciou pri koncentráciách 100 a $300 \mu M$, je zrejmé, že pri koncentrácii $300 \mu M$ dochádza k zníženiu účinnosti SIH a predpokladáme vplyv vlastnej toxicity (obr. 8; 9, A). Vypočítaná hodnota EC_{50} je $5,4 \mu M$ (tab. 1).

VH1 (B): Tento derivát SIH preukázal najnižšie protektívne vlastnosti spomedzi všetkých testovaných látok. Hladina štatistickej významnosti bola dosiahnutá pri najvyššej testovanej koncentrácii $300 \mu M$, kedy bola zaznamenaná viabilita 5 % ku kontrolnej skupine (100 %). EC_{50} tohto derivátu nebola zistená.

VH2 (C): Hladina štatistickej významnosti bola dosiahnutá pri koncentrácii $100 \mu M$, kedy sme dosiahli protekciu 56 % buniek v porovnaní ku kontrole (100 %). Pri najvyššej testovanej koncentrácii $300 \mu M$ nedošlo k ďalšiemu zvýšeniu protekčných vlastností študovanej látky. Vypočítaná hodnota EC_{50} je $49,2 \mu M$ (tab. 1).

VH3 (D): Signifikantné zvýšenie životaschopnosti buniek sme dosiahli pri koncentrácii $30 \mu M$ a to na úroveň 45 % k hodnote viability kontrolnej skupiny (100 %). Najvyšší protektívny účinok bol zaznamenaný u koncentrácie $300 \mu M$, ktorá dokázala ochrániť 62 % buniek ku kontrole (100 %). Vypočítaná hodnota EC_{50} je $25,0 \mu M$ (tab. 1).

VH4 (E): Štatisticky významné zvýšenie životaschopnosti sme dosiahli pri koncentrácii $100 \mu M$ na 56 % k úrovni viability kontrolnej skupiny (100 %). Najvyššia viabilita bola

pri maximálnej testovanej koncentrácii 300 μM a to na 64 % ku kontrole (100 %). Hodnota EC_{50} bola stanovená 67,9 μM (tab. 1).

VH5 (F): Hladinu štatistickej významnosti sme dosiahli pri koncentrácii 30 μM , ktorá ochránila 46 % buniek v porovnaní ku kontrole (100 %). Vzhľadom k obmedzenej rozpustnosti látky, nie je možné hodnotu EC_{50} s presnosťou určiť, avšak rádovo sa pohybuje v stovkách μM . Predpokladáme, že ani vyššie koncentrácie VH5 by nemali výraznejší efekt a maximálny účinok tohto derivátu je dosiahnutie 50 % viability.

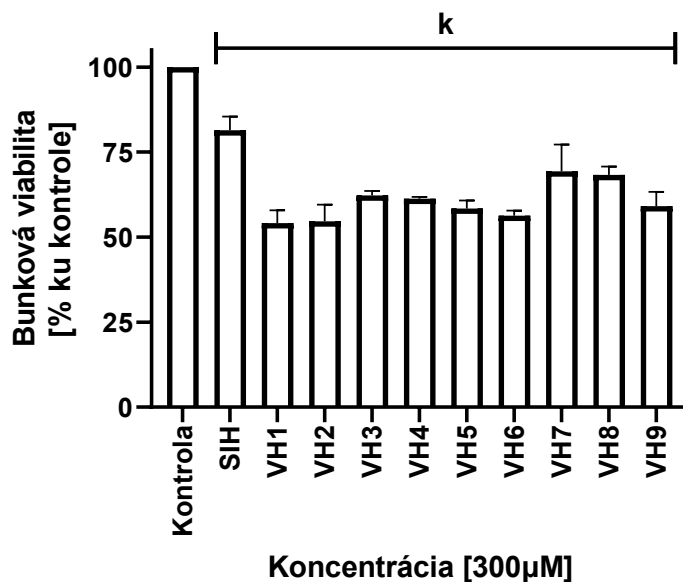
VH6 (G): Ako jediný z derivátov SIH má tento štatisticky významné zvýšenie životaschopnosti už pri koncentrácii 10 μM na 54 % k úrovni viability kontrolnej skupiny (100 %), pričom najvyššia dosiahnutá protekcia bola 67 % a to pri koncentrácii 100 μM . Rovnako ako v prípade SIH pozorujeme pri najvyššej testovanej koncentrácii 300 μM , síce nesignifikantné, ale určité malé zníženie účinnosti. Rovnako ako u chelátora SIH sa môžeme domnievať, že na toto zníženie má vplyv vlastná toxicita látky VH6 (obr. 8; 9, G). Stanovená hodnota EC_{50} je 6,0 μM (tab. 1).

VH7 (H): Prvé štatisticky významné zvýšenie viability buniek je pri koncentrácii 100 μM , kedy sme dosiahli 35 % ochranu ku kontrolnej skupine (100 %). Napriek tomu, že zistená priemerná ochrana buniek pri koncentracii 300 μM je 56 %, vzhľadom k smerodajnej odchýlke nevieme so spoľahlivosťou určiť hodnotu EC_{50} . Predpokladáme, že sa bude pohybovať okolo najvyššie dosiahnutej koncentracie 300 μM .

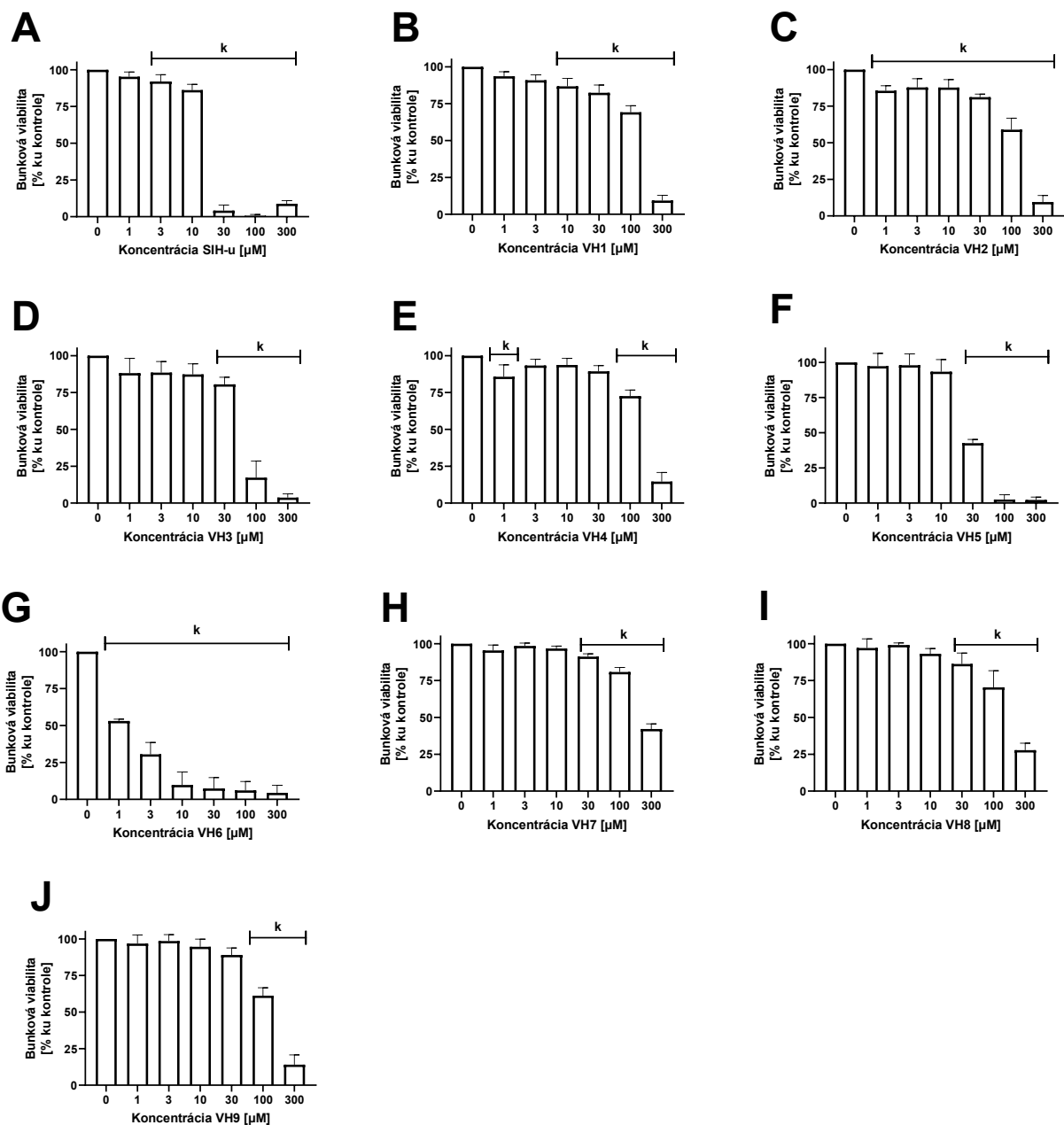
VH8 (I): Hladinu štatistickej významnosti pre zvýšenie viability buniek sme dosiahli pri najvyššej testovanej koncentrácii 300 μM , kedy došlo k protekcii 13 % v porovnaní ku kontrole (100 %). Táto látka vykazuje po VH1 (B) najnižšie protektívne vlastnosti. Hodnota EC_{50} nebola zistená.

VH9 (J): Prvé signifikantné zvýšenie viability buniek sme zaznamenali pri koncentrácii 30 μM , kedy došlo k protekcii 48 % buniek proti kontrole (100 %). Pri najvyššej koncentrácii 300 μM sme zistili protekciu 72 % buniek voči kontrolnej skupine (100 %). Medzi koncentraciami 100 a 300 μM sme nezistili štatisticky významný rozdiel. Protekcia 72 % buniek je najvyššia hodnota, ktorú sme v našich experimentoch dosiahli. Vypočítaná hodnota EC_{50} je 26,7 μM (tab. 1).

5.3 Stanovenie vlastnej toxicity testovaných látok



Obrázok 8 Graf zobrazuje vlastnú toxicitu SIH a jeho derivátov VH1, VH2, VH3. VH4, VH5, VH6, VH7, VH8 a VH9 na bunečnú líniu H9c2 po 24 hodinách inkubácie. Testovaná koncentrácia pre všetky látky bola 300 µM. Bunková životaschopnosť bola zistená pomocou testu vychytávania neutrálnej červene a výsledky sú vyjadrené ako percentá vztiahnuté ku viabilite kontrolnej skupiny (100 %). Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka, počet nezávislých meraní je $n = 3$. Štatistická významnosť bola určená pomocou one-way ANOVA s post hoc Holm-Sidak testom s hladinou významnosti: $p \leq 0,05$ v porovnaní ku kontrole (k).



Obrázok 9 Grafy zaznamenávajú vlastnú toxicitu SIH (A) a jeho derivátov VH1 (B), VH2 (C), VH3 (D), VH4 (E), VH5 (F), VH6 (G), VH7 (H), VH8 (I), VH9 (J) na bunečnú líniu H9c2 po 72 hodinách inkubácie. Bunková životaschopnosť bola zistená pomocou testu vychytávania neutrálnej červenej a výsledky sú vyjadrené ako percentá vztiahnuté ku viabilite kontrolnej skupiny (100 %). Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka, počet nezávislých meraní je $n = 3 - 4$. Štatistická významnosť bola určená pomocou one-way ANOVA s post hoc Holm-Sidak testom s hladinou významnosti: $p \leq 0,05$ v porovnaní ku kontrole (k).

Vlastnú toxicitu testovaných látok sme hodnotili ako stratu viability H9c2 buniek po 24 a 72 hodinách inkubácie. Pre experimenty po 24 hodinách sme pre všetky látky zvolili jednotnú koncentráciu 300 μM , čo bola najvyššia koncentrácia, s ktorou sme pracovali. Namerané hodnoty sme vyjadrili ako aritmetický priemer 3 nezávislých meraní voči kontrole (100 %). Dobu trvania experimentu 24 hodín sme zvolili pre lepšie porovnanie vlastnej toxicity látok a ich protektívnej kapacity proti indukovanému oxidačnému stresu, ktorú sme rovnako vyhodnocovali po 24 hodinách (obr. 7). Pre zistenie vlastnej toxicity po 72 hodinách sme všetky látky pridávali vo vzrastajúcej koncentrácii a ich toxicitu sme vyjadrili ako aritmetický priemer 3 – 4 nezávislých meraní voči kontrole (100 %). Pre každú látku sme vyrátali IC_{50} - koncentráciu testovanej látky, ktorá spôsobí 50 % stratu viability po 72 hodinovej inkubácii (po 24 hodinovej inkubácii toxicita žiadnej z testovaných látok nedosiahla 50 % pokles viability) (tab. 1).

SIH: Po 24 hodinovej inkubácii sme pri koncentrácii 300 μM pozorovali štatisticky významný pokles viability na 81 % ku kontrole (100 %) (obr. 8). Po 72 hodinovej inkubácii došlo pri koncentrácii 3 μM SIH k miernemu ale štatisticky významnému zníženiu viability, výraznejšie zníženie sme zaznamenali pri koncentrácii 30 μM (obr. 9, A). Vypočítaná hodnota IC_{50} je 14,3 μM (tab. 1).

VH1: Po 24 hodinovej inkubácii sme pri koncentrácii 300 μM pozorovali štatisticky významný pokles viability na 54 % ku kontrole (100 %) (obr. 8). Po 72 hodinovej expozícii sme hodnotili pokles viability so štatistickou významnosťou od koncentrácie 10 μM , pričom výrazný pokles bol pri koncentrácii 300 μM (obr. 9, B). Hodnota IC_{50} je 152,7 μM (tab. 1).

VH2: Pokles viability po 24 hodinovej inkubácii bol pri koncentrácii 300 μM štatisticky významný a to na 55 % v porovnaní s kontrolou (100 %) (obr. 8). Po 72 hodinovej inkubácii sme zaznamenali stratu viability so štatistickou významnosťou pri všetkých testovaných koncentráciách, ale najvýraznejšia toxicita bola pri koncentrácii 300 μM (obr. 9, C). Vypočítaná hodnota IC_{50} je 137,3 μM (tab. 1).

VH3: Po 24 hodinovej inkubácii došlo pri koncentrácii 300 μM k štatisticky významnému poklesu životaschopnosti buniek na 62 % ku kontrolnej skupine (100 %) (obr. 8). Po 72 hodinách inkubácie sme zistili miernu ale signifikantnú stratu buniek pri koncentrácii 30 μM , výraznejšie prejavenie toxicity bolo pri koncentrácii 100 μM (obr. 9, D). Stanovená hodnota IC_{50} je 65,7 μM (tab. 1).

VH4: Derivát VH4 je pri koncentrácii 300 μM a 24 hodinovom pôsobení štatisticky významne toxický, kedy redukuje počet buniek na 61 % voči hodnotám kontrolnej skupiny (100 %) (obr. 8). Po 72 hodinovej inkubácii sme pozorovali výrazné zníženie viability pri koncentrácii 300 μM (obr. 9, E). Vypočítaná hodnota IC_{50} je 168,2 μM (tab. 1).

VH5: Po 24 hodinách pôsobenia 300 μM koncentrácie na bunky H9c2 sme zistili štatisticky významné zníženie bunečnej viability na 58 % ku kontrole (100 %) (obr. 8). Po 72 hodinách inkubácie sme zaznamenali prvé signifikantné zníženie viability pri koncentrácii 30 μM , takmer 100 % pokles bol po inkubácii s koncentráciami 100 a 300 μM (obr. 9, F). Hodnota IC_{50} je 27,4 μM (tab. 1).

VH6: Po 24 hodinách inkubácie sme pri koncentrácii 300 μM pozorovali štatisticky významný pokles viability na 56 % ku kontrole (100 %) (obr. 8). Po 72 hodinách expozície sme zistili, že všetky testované koncentrácie VH6 sú signifikantne toxické. Už pri najnižšej koncentrácii 1 μM je pokles viability na 53 % (obr. 9, G). Vypočítaná hodnota IC_{50} je 1,1 μM (tab. 1).

VH7: Po 24 hodinovej inkubácii buniek s derivátom VH7 v koncentrácii 300 μM , sme zaznamenali štatistický významný pokles viability na 69 % ku kontrole (100%) (obr. 8). Pri 72 hodinových testoch toxicity bolo prvé signifikantné zníženie životaschopnosti buniek pri koncentrácii 30 μM . Najvyššia testovaná koncentrácia 300 μM spôsobila najvýraznejší pokles viability na 42 % ku kontrole (100 %) (obr. 9, H). Hodnota IC_{50} je 262,1 μM (tab. 1).

VH8: V 24 hodinových testoch toxicity sme pri koncentrácii 300 μM zaznamenali signifikantné zníženie viability na 68 % ku kontrolnej skupine (100 %) (obr. 8). Pri 72 hodinových testoch bola vlastná toxicita látky štatisticky významná pri koncentrácii 30 μM . K výraznému zvýšeniu toxicity došlo pri koncentrácii 300 μM , kedy viabilita bola 28 % ku kontrole (100 %) (obr. 9, I). Vypočítaná hodnota IC_{50} je 175,8 (tab. 1).

VH9: Po 24 hodinách inkubácie s koncentráciou 300 μM dochádza k štatisticky významnému zníženiu viability na 59 % voči kontrolnej skupine (100 %) (obr. 8). Pri testoch 72 hodinovej toxicity bolo prvé signifikantné zníženie viability pri koncentrácii 100 μM na 61 % ku kontrole (100 %), avšak k najväčšiemu poklesu došlo pri 300 μM na 14 % (obr. 9, J). Vypočítaná hodnota IC_{50} je 137,8 μM (tab. 1).

Tabuľka 1: Súhrn hodnôt získaných pri experimentoch.

	CLogP*	EC ₅₀ [μM] 24h	IC ₅₀ [μM] 72h	IC ₅₀ /EC ₅₀ [μM]	Viabilita P 24h [300 μM] %	Viabilita T 24h [300 μM] %
SIH	2,07	5,4 ± 1,5	14,3 ± 1,8	2,6	67 ± 5	81 ± 3
VH1	1,56	nezistená	152,7 ± 6,9	—	5 ± 1	54 ± 3
VH2	2,73	49,2 ± 11,0	137,3 ± 17,3	2,8	56 ± 4	55 ± 4
VH3	3,54	25,0 ± 6,5	65,7 ± 8,8	2,6	62 ± 4	62 ± 1
VH4	2,72	67,9 ± 7,6	168,2 ± 22,3	2,5	65 ± 3	61 ± 0,5
VH5	4,17	nezistená	27,4 ± 0,4	—	55 ± 7	58 ± 2
VH6	1,64	6,0 ± 1,4	1,1 ± 0,3	0,2	64 ± 7	56 ± 1
VH7	3,35	nezistená	262,1 ± 15,3	—	56 ± 10	69 ± 6
VH8	1,56	nezistená	175,8 ± 34,7	—	13 ± 6	68 ± 2
VH9	3,23	26,7 ± 7,7	137,8 ± 22,4	5.2	72 ± 5	59 ± 4

Hodnota CLogP bola vypočítaná pomocou programu ChemDraw Professional 16.*

Tabuľka 1 sumarizuje hodnoty CLogP, koncentrácie testovaných látok, ktoré sú schopné ochrániť 50 % buniek proti indukovanému oxidačnému stresu H₂O₂ po 24 hodinách inkubácie (EC₅₀), koncentrácie látok spôsobujúcich 50 % zníženie viability po 72 hodinovej inkubácii (IC₅₀) a vzájomný pomer IC₅₀ a EC₅₀. Nasleduje viabilita buniek po 24 hodinách inkubácie buniek spolu s 200 μM H₂O₂ a 300 μM testovaného chelátoru, kedy sme skúmali protektívne vlastnosti látok (P) a ďalej je zhrnutá viabilita buniek po 24 hodinovom pôsobení 300 μM testovanej látky, kedy sme chceli zistiť vlastnú toxicitu chelátora (T).

6 Diskusia

Železo vďaka tomu, že ľahko prijíma i dáva elektróny, patrí medzi esenciálne mikronutrienty nevyhnutné pre rozličné metabolické procesy. Na druhej strane, kvôli tejto vlastnosti je zároveň aj škodlivé, môže poškodzovať bunčné komponenty alebo generovať reaktívne formy kyslíka, ktoré sú samé o sebe toxické (Eid et al., 2017).

Jednou z najčastejších príčin smrti vo vyspelých štátoch je akútny infarkt myokardu (IM) (Nascimento et al., 2019). Liečbou voľby pre pacientov s IM pre zníženie akútneho ischemického poškodenia srdcovej svaloviny je včasná a účinná reperfúzia pomocou trombolytickej terapie alebo primárnej perkutánnej koronárnej intervencie. Pri hypoxii metabolizmus kardiomyocytu prechádza na anaeróbne dýchanie, kedy produkuje laktát a dochádza k poklesu intracelulárneho pH. Reperfúzia je nevyhnutná. Avšak, tento proces môže indukovať smrť kardiomyocytov, pretože dochádza ku generovaniu ROS, obnovenou funkciou elektrónového reťazca mitochondrií, xantinoxidázou endoteliálnych buniek a NADPH oxidázou neutrofilov (Hausenloy & Yellon, 2013). Predpokladá sa, že práve kvôli acidóze a akumulácii redukujúcich látok, hladina intracelulárneho železa v čase ischemie stúpa (Voogd et al., 1992). Ako bolo vyššie zmienené, železo katalyzuje ďalšiu produkciu ROS a indukuje poškodenie buniek oxidačným stresom. Bolo zistené, že železo je rizikovým faktorom pre ischemickú chorobu srdca. Objavil sa pojem ferroptóza, čo je od železa závislá forma regulovanej bunkovej smrti, líši sa od apoptózy, nekrózy a ďalších typov bunkovej smrti. Je spojená s ischemicko-reperfúznym poškodením a je signifikantnou formou bunkovej smrti kardiomyocytov (Kobayashi et al., 2018). Jednou z terapeutických možností je chelatovať toxické železo. V klinickej praxi používané chelátory železa DFO, deferasirox a deferipron, preukázali schopnosť eliminácie železa v srdcovom tkanive (Wax, 2013). Z tohto dôvodu sa v našej štúdií venujeme chelátorom železa odvodených od SIH. Chelátor SIH v predchádzajúcich experimentoch preukázal vysokú schopnosť ochrany rôznych typov buniek pred indukovaným oxidačným stresom H₂O₂, *tert*-butyl hydroperoxidom a katecholamínmi. Rovnako mal protektívny efekt pred kardiotoxickým účinkom antracyklínu daunorubicínu, ako pri *in vitro* experimente, použitím izolovaných neonatálnych potkaních kardiomyocytov (NVCN), tak aj pri *in vivo* králičom modeli. Jeho prednosťou je pomerne nízka toxicita a možnosť perorálneho podania (Jansová et al., 2014).

Cieľom tejto práce bolo potvrdiť protektívne vlastnosti aroylhydrazónu SIH *in vitro* a porovnať ich s vlastnosťami jeho novo nasynthesized derivátov. Štruktúrnou obmenou

molekuly SIH bola predpokladaná zmena vo vlastnostiach látky, čo sme hodnotili na bunečnej kultúre kardiomyoblastov H9c2. Napriek tomu, že táto bunková línia je s obľubou používaná pri výskume kardiovaskulárnej sústavy, Lenčo et al. (2015) zistili, že nediferencované H9c2 sa fenotypovo značne líšia od primárnych novorodeneckých kardiomyocytov i myokardu dospelých. Podobajú sa skôr na veľmi nezrelé myogénne bunky. Rovnako nie sú prítomné proteíny nutné pre tvorbu myofibríl pruhovaného svalu a metabolizmus svalových buniek. Pri experimente s kardiotoxickým cytostatikom doxorubicínom ich odpoveď nebola zhodná s odpoveďou primárnych novorodeneckých kardiomyocytov a myokardu dospelých. Hodnotenie výsledkov a ich prenositeľnosť preto treba robiť s opatrnosťou.

Prvou dôležitou podmienkou, ktorú musí chelátor spĺňať, aby dokázal bunku chrániť pred toxickým účinkom voľného železa, je jeho prestup bunečnou membránou a vytvorenie netoxického komplexu Fe–chelátor vo vnútri bunky. Túto schopnosť sme hodnotili testom kalcein–AM, kde sme jednotlivé deriváty porovnali s chelátorom SIH (obr. 5 a 6). Ďalším dôležitým aspektom pre klinické využitie je vlastná toxicita látky, ktorú sme hodnotili ako akútnu (po 24 hodinách inkubácie) a dlhodobú (po 72 hodinách inkubácie) (obr. 8 a 9). Pre porovnanie protektívnych a toxických vlastností látok (stanovenie obdoby terapeutického indexu) je vhodné porovnávať IC_{50} a EC_{50} získaných pri rovnako dlho trvajúcich experimentoch. Avšak pri akútnych 24 hodinových testoch toxicity sme nezistili ani pri najvyššej testovanej koncentrácii 300 μM u žiadnej látky pokles viability na 50 % (obr. 8), preto sme hodnotu IC_{50} určili po 72 hodinách inkubácie.

Deriváty VH1 a VH8 preukázali najnižšie protektívne vlastnosti, ktoré ani pri jednej z testovaných koncentrácií nedosiahli 50 % viabilitu (obr. 7, B, I). Z výsledkov testu chelatacie (obr. 5 a 6) predpokladáme, že nespĺňajú vyššie spomenutú podmienku a to prestup bunečnou membránou a schopnosť chelatovať železo vo vnútri bunky. Schopnosť látok prechádzať membránami je daná aj ich lipofilitou a tieto vzájomne izoméne hydroxyderiváty SIH majú najnižšiu hodnotu $CLogP$ spomedzi všetkých testovaných látok (tab. 1). Vo výsledku, pravdepodobne, nie sú dostatočne lipofilné pre nutný prechod membránou.

Lipofilita látky však nie je jediným kritériom, pretože ani lipofilnejšie deriváty nepreukázali výraznejšie protektívne vlastnosti, než pôvodná molekula SIH. Hodnota EC_{50} nebola pri žiadnom deriváte nižšia než u SIH, ktorý má EC_{50} pri 5,4 μM (tab. 1). Naproti tomu, po chelátore SIH, sme najvýraznejšiu protekciu zistili pri metoxyderiváte VH6, ktorý má po VH1 a VH8, najnižšiu hodnotu $CLogP$. Jeho EC_{50} je 6,0 μM . Avšak táto látka je vysoko toxická, jej hodnota IC_{50} je už pri 1,1 μM , a zároveň má najnižší pomer IC_{50} a EC_{50} zo všetkých testovaných látok (tab. 1). Ako bolo vyššie zmienené, hodnoty EC_{50} pre deriváty VH5 a VH7

sme nevedeli s presnosťou vypočítať, predpokladáme, že sa budú pohybovať okolo 300 μM . Hoci inhibičná koncentrácia IC_{50} látok VH2, VH3, VH4 a VH7 je relatívne vysoká, ich protekcia sa pri molekule SIH nejaví ako výhodnejšia (tab. 1). Rovnako aj krátkodobá toxicita pri 300 μM je vyššia než toxicita SIH, aj keď pomer $\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}$ je u VH2, VH3, VH4 porovnateľný s pomerom SIH. Najvyššiu hodnotu tohto pomeru má látka VH9 a to 5,2 (tab. 1). Protekcia VH9 pri najvyššej testovanej koncentrácii 300 μM dosiahla 72 %, čo je maximálna hodnota protekcie, ktorú sme v našich experimentoch namerali. Naproti tomu jej hodnota EC_{50} 26,7 μM je 5x vyššia než EC_{50} SIH (tab. 1). Každopádne, z pohľadu najnižšej EC_{50} (5,4 μM) je najvýhodnejšia parentná látka SIH, rovnako pri krátkodobých testoch toxicity v koncentrácii 300 μM bola viabilita buniek pri SIH najvyššia - 81 % ku kontrole (tab. 1).

Z pohľadu chemickej substitúcie sa alkylová substitúcia hydrazidu javí ako nevýhodná (VH7), naopak aromatická (arylová) je vhodná, pričom ako výhodná sa zdá substitúcia aromatického jadra v para polohe (VH3, VH4, VH9), iná je nevýhodná (VH5). Prekvapením je neúčinnosť derivátov kyseliny nikotínovej a izonikotínovej (VH8 a VH1), ale tá môže byť daná spomínanou zvýšenou polaritou, na základe ktorej je zhoršený prechod cez bunecné membrány a teda internalizácia do buniek. Zaujímavá je účinnosť látky VH6, ktorú pre potencionálne využitie diskvalifikuje jej vlastná toxicita. Tento derivát mal ako jediný zo série dve z troch fenolických skupín chránené, a tak je zabránené ionizácii týchto funkčných skupín, ale pre komplexnejšie posúdenie vzťahu medzi štruktúrou a účinkom podklady chýbajú. Táto látka by potenciálne mohla slúžiť ako základ ďalšej série derivátov, kde by bola snaha o zníženie toxicity pri zachovaní protektívnych účinkov (predovšetkým asi opäť obmenami hydrazidovej časti molekuly).

Katedra biochemických vied FAF UK sa dlhodobo zaoberá výskumom chelátoru železa SIH a jeho derivátmi. Vychádzajúc z predpokladu, že voľná rotácia medzi hydrazónovým a fenolickým fragmentom v molekule SIH môže viesť k zníženiu chelatačnej aktivity tvorbou neefektívnych konformérov, boli v predchádzajúcich experimentoch pripravené a testované 2,6-dihydroxybenzaldehyd analógy SIH. V týchto pokusoch ukázala, v porovnaní so SIH, lepšie protektívne vlastnosti s porovnateľnou toxicitou látka JK-31 (2,6-dihydroxybenzaldehyd 4-chlorobenzohydrazón) (Jansová et al., 2018). Štruktúrne podobným JK-31 je náš testovaný derivát VH3 (obr. 4), ktorý však nevykazuje výraznejšie protektívne vlastnosti.

Ďalším zaujímavým experimentom s testovanými látkami by mohlo byť ich štúdium s nádorovou bunecnou líniou, keďže je známe, že nádorové bunky si pre svoj rast a funkciu enzýmu ribonukleodit reductázy, vyžadujú zvýšené množstvo železa (Stevens, 2018). Chelátory železa sa javia ako potenciálne látky terapie nádorových ochorení a tiež v predošlých štúdiách

naša základná štruktúrna látka SIH preukázala cytotoxickú aktivitu (Kalinowski & Richardson, 2005; Šimůnek et al., 2008; Potuckova et al., 2014; Jansová et al., 2018).

7 Záver

Cieľom tejto práce bolo *in vitro* hodnotenie protektívneho potenciálu nových derivátov chelátoru železa SIH na bunecnej línii H9c2 proti indukovanému oxidačnému stresu H₂O₂. Zároveň sme určili toxicitu látok pri 24 a 72 hodinovej inkubácii. Výsledné hodnoty sme porovnali s parentnou látkou SIH.

Väčšina látok v rozmedzí testovaných koncentrácií (1 - 300 µM) prejavila signifikantne výrazné zvýšenie životaschopnosti buniek v porovnaní s neliečenou skupinou proti oxidačnému poškodeniu. Najzaujímavejšou látkou z pohľadu protekcie je VH6. Tento derivát preukázal porovnateľnú ochranu ako SIH (EC₅₀ SIH = 5,4 µM; EC₅₀ VH6 = 6,0 µM), avšak jeho toxicita je výrazne vyššia a pomer IC₅₀/EC₅₀ sa rovná 0,2, čo je 13x nižšia hodnota než u SIH (2,6). Deriváty VH2, VH3 a VH4 majú pomer IC₅₀/EC₅₀ porovnateľný (VH2 = 2,8; VH3 = 2,6; VH4 = 2,5), v prípade VH9 (5,2) vyšší než SIH. No ich hodnoty EC₅₀ sú oproti SIH vyššie (tab. 1). Schopnosť chrániť bunky pred oxidačným poškodením pri najvyššej testovanej koncentrácii 300 µM bola u látok VH3 a VH4 len mierne nižšia oproti SIH, u derivátu VH9 naopak mierne vyššia. Avšak krátkodobá toxicita po 24 hodinách bola výrazne najnižšia pri chelátore SIH (tab. 1).

Nové chelátory preukázali protekčnú aktivitu, ale ich potenciál v porovnaní s východnou štruktúrou SIH, nie je dostačujúci. Prínos tejto práce spočíva v potvrdení poznatkov o vzťahoch medzi štruktúrou a účinkom získaných v predchádzajúcich experimentoch (Jansová et al., 2018), čo môže pomôcť v ďalšom hľadaní štruktúry s výhodnými vlastnosťami, ktorá by mohla mať potenciál pre klinické využitie.

8 Zoznam skratiek

AIDS	Syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti (Acquired Immunodeficiency Syndrome)
COVID-19	Ochorenie spôsobené koronavírusom z roku 2019 (Corona Virus Disease 2019)
DCT-1	Divalent cation transporter 1
Dcytb	Duodenálny cytochróm b
DFO	Deferoxamin
DMEM	Dulbecco Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Koncentrácia, ktorá ochráni 50 % buniek v porovnaní s kontrolou, proti toxickému pôsobeniu H ₂ O ₂
EV71	Enterovírus 71
FAC	Roztok citrátu amónno-železitého (ferric ammonium citrate)
FBS	Fetálne bovinné sérum
FDA	Americká agentúra pre schvaľovanie liečiv ku klinickému použitiu (Food and Drug Administration)
Fe	Železo
GPX	Glutathion peroxidáza
H ₂ O ₂	Peroxid vodíka
HH	Hereditárna hemochromatóza
HIV	Vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (Human Immunodeficiency Virus)
CHSZ	Chronické srdcové zlyhávanie

IC ₅₀	Koncentrácia testovanej látky, pri ktorej dochádza k 50 % poklesu viability buniek oproti kontrole
IM	Infarkt myokardu
Kalcein-AM	Kalcein-acetoxymethylester
L1	Deferipron (CP20)
LIP	Rezervoár voľného železa (labile iron pool)
P/S	Penicilín/Streptomycín
PBS	Fosfátový pufor (phosphate buffered saline)
PIH	Pyridoxalizonikotinoylhydrazón
ROS	Reaktívne formy kyslíka (reactive oxygen species)
SCM	Médium so sérom (serum containing medium)
SFM	Médium bez séra (serum free medium)
SIH	Salicylaldehydizonikotinoylhydrazón
SOD	Superoxid dismutáza

9 Literatúra

- Aydinok, Y. (2018). Iron Chelation Therapy as a Modality of Management. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 32(2), 261–275. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.12.002>
- Barton, J. C., Edwards, C. Q. *Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. ISBN 9780521593809
- Bendova, P., Mackova, E., Haskova, P. et al. (2010). Comparison of clinically used and experimental iron chelators for protection against oxidative stress-induced cellular injury. *Chemical Research in Toxicology*, 23(6), 1105–1114. <https://doi.org/10.1021/tx100125t>
- Bresgen, N., & Eckl, P. M. (2015). Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. *Biomolecules*, 5(2), 808–847. <https://doi.org/10.3390/biom5020808>
- Brissot, P., Pietrangelo, A., Adams, P. C., Graaff, B. De, McLaren, C. E., & Loreál, O. (2018). Haemochromatosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.16>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 25(3), 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
- Buss, J., Torti, F., & Torti, S. (2003). The Role of Iron Chelation in Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 10(12), 1021–1034. <https://doi.org/10.2174/0929867033457638>
- Carver, P. L. (2017). The Battle for Iron between Humans and Microbes. *Current Medicinal Chemistry*, 25(1), 85–96. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170720110049>
- Codd, R., Richardson-Sanchez, T., Telfer, T. J., & Gotsbacher, M. P. (2018). Advances in the Chemical Biology of Desferrioxamine B. *ACS Chemical Biology*, 13(1), 11–25. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00851>
- Crichton R, Boelaert JR, Braun V, Hantke K, Marx JJM, Santos M and Ward R (2001) *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, John Wiley & Sons.
- Cvetković RS, Scott LJ. (2005). Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs*, 65(7), 1005-1024. doi:10.2165/00003495-200565070-00008

- Dalamaga, M., Karampela, I., & Mantzoros, C. S. (2020). Commentary: Could iron chelators prove to be useful as an adjunct to COVID-19 Treatment Regimens?. *Metabolism: clinical and experimental*, *108*, 154260. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154260>
- Dev, S., & Babitt, J. L. (2017). Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*, *21*, S6–S20. <https://doi.org/10.1111/hdi.12542>
- Eid, R., Arab, N. T. T., & Greenwood, M. T. (2017). Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(2), 399–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.002>
- Ems, T., & Huecker, M.R. (2019). Biochemistry, Iron Absorption.
- Fang, X., Wang, H., Han, D. et al. (2019). Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(7), 2672–2680. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821022116>
- Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines [Oxidative stress in human diseases]. *Annales pharmaceutiques francaises*, *64*(6), 390–396. [https://doi.org/10.1016/s0003-4509\(06\)75334-2](https://doi.org/10.1016/s0003-4509(06)75334-2)
- Formigari, A., Irato, P., & Santon, A. (2007). Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *146*(4), 443–459. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.07.010>
- Glickstein, H., El, R. Ben, Link, G. et al. (2006). Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: Accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood*, *108*(9), 3195–3203. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-020867>
- Han, O. (2011). Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Metallomics*, *3*(2), 103–109. <https://doi.org/10.1039/c0mt00043d>
- Hašková, P., Kovaříková, P., Koubková, L., Vávrová, A., MacKová, E., & Šimůnek, T. (2011). Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, *50*(4), 537–549. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.004>
- Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2008). Curcumin: From ancient

- medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(11), 1631–1652. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7452-4>
- Hatcher, H. C., Singh, R. N., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2009). Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use. *Future medicinal chemistry*, 1(9), 1643–1670. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.121>
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation*, 123(1), 92–100. <https://doi.org/10.1172/JCI62874>
- Hider, R. C., & Hoffbrand, A. V. (2018). The role of deferiprone in iron chelation. *New England Journal of Medicine*, 379(22), 2140–2150. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1800219>
- Hořejší, J., et al. *Základy klinické biochemie ve vnitřním lékařství*. Praha: Avicenum, 1979.
- Horwitz, L. D., & Horwitz, M. A. (2014). The exochelins of pathogenic mycobacteria: Unique, highly potent, lipid- and water-soluble hexadentate iron chelators with multiple potential therapeutic uses. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(16), 2246–2261. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5789>
- Jansová, H., Macháček, M., Wang, Q. et al. (2014). Comparison of various iron chelators and prochelators as protective agents against cardiomyocyte oxidative injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 74, 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.019>
- Jansová, H., Kubeš, J., Reimerová, P., Štěrbová-Kovaříková, P., Roh, J., & Šimunek, T. (2018). 2,6-Dihydroxybenzaldehyde Analogues of the Iron Chelator Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone: Increased Hydrolytic Stability and Cytoprotective Activity against Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology*, 31(11), 1151–1163. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00165>
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., & Johnson, M. K. (2005). Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 247–281. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518>
- Kalinowski, D. S., & Richardson, D. E. S. R. (2005). The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 547–583. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.2.547>
- Kang, C. K., Pope, M., Lang, C. C., & Kalra, P. R. (2017). Iron deficiency in heart failure:

- Efficacy and safety of intravenous iron therapy. *Cardiovascular Therapeutics*, 35(6), 1–8. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12301>
- Kobayashi, M., Suhara, T., Baba, Y., Kawasaki, N. K., Higa, J. K., & Matsui, T. (2018). Pathological Roles of Iron in Cardiovascular Disease. *Current Drug Targets*, 19(9), 1068–1076. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180605112235>
- Koppenol, W. H., Hider, R. H. (2019). Iron and redox cycling. Do's and don'ts. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.022>
- Kunos, C. A., Andrews, S. J., Moore, K. N., Chon, H. S., & Ivy, S. P. (2019). Randomized Phase II Trial of Triapine-Cisplatin-Radiotherapy for Locally Advanced Stage Uterine Cervix or Vaginal Cancers. *Frontiers in Oncology*, 9(October), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01067>
- Lenčo, J., Lenčová-Popelová, O., Link, M. et al. (2015). Proteomic investigation of embryonic rat heart-derived H9c2 cell line sheds new light on the molecular phenotype of the popular cell model. *Experimental Cell Research*, 339(2), 174–186. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.020>
- Li, J., Cao, F., Yin, H. liang et al. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease*, 11(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>
- Lovejoy, D., & Richardson, D. (2005). Iron Chelators as Anti-Neoplastic Agents: Current Developments and Promise of the PIH Class of Chelators. *Current Medicinal Chemistry*, 10(12), 1035–1049. <https://doi.org/10.2174/0929867033457557>
- Martins, A. C., Almeida, J. I., Lima, I. S., Kapitação, A. S., & Gozzelino, R. (2017). Iron Metabolism and the Inflammatory Response. *IUBMB Life*, 69(6), 442–450. <https://doi.org/10.1002/iub.1635>
- Masopust, J., Průša, R. *Patobiochemie metabolických drah*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 1999. 182 s. ISBN 80-238-4589-6.
- Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwell, V. *Harperova biochemie*. 2. vyd.. Jinočany: Nakladatelství H & H, 1998. 872 s. ISBN 80-85787-38-5
- Nakamura, T., Naguro, I., & Ichijo, H. (2019). Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1863(9), 1398–1409. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.010>

- Nascimento, B. R., Brant, L. C. C., Marino, B. C. A., Passaglia, L. G., & Ribeiro, A. L. P. (2019). Implementing myocardial infarction systems of care in low/middle-income countries. *Heart*, *105*(1), 20–26. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2018-313398>
- Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*(5), 1620–1637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>
- Petronek, M. S., Spitz, D. R., Buettner, G. R., & Allen, B. G. (2019). Linking cancer metabolic dysfunction and genetic instability through the lens of iron metabolism. *Cancers*, *11*(8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers11081077>
- Phillips, J. D. (2019). Heme biosynthesis and the porphyrias John. *Physiology & Behavior*, *128*(3), 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Potuckova, E., Hruskova, K., Bures et al. (2014). Structure-activity relationships of novel salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) analogs: Iron chelation, anti-oxidant and cytotoxic properties. *PLoS ONE*, *9*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112059>
- Racek, J. et al. *Klinická Biochemie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*, *3*(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Richardson, D. R., Kalinowski, D. S., Lau, S., Jansson, P. J., & Lovejoy, D. B. (2009). Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1790*(7), 702–717. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.04.003>
- Shimizu, T., Lengalova, A., Martínek, V., & Martíňková, M. (2019). Heme: Emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chemical Society Reviews*, *48*(24), 5624–5657. <https://doi.org/10.1039/c9cs00268e>
- Šimůnek, T., Boer, C., Bouwman, R. A. et al. (2005). SIH - A novel lipophilic iron chelator - Protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *39*(2), 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.05.008>
- Šimůnek, T., Štěřba, M., Popelová, O. et al. (2008). Anthracycline toxicity to cardiomyocytes

- or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *British Journal of Pharmacology*, 155(1), 138–148. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.236>
- Stevens, R. G. (2018). Iron and cancer. *Iron and Human Disease*, 333–348. <https://doi.org/10.1201/9781351073899>
- Stumpf, J. L., & Bonk, M. E. (2007). Deferasirox. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 64(6), 606–616. <https://doi.org/10.2146/ajhp060405>
- Sun, M. S., Jin, H., Sun, X., Huang, S., Zhang, F. L., Guo, Z. N., & Yang, Y. (2018). Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3804979>
- Uggeri, J., Gatti, R., Belletti, S., Scandroglio, R., Corradini, R., Rotoli, B. M., & Orlandini, G. (2000). Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(5), 499–505. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0712-y>
- Unlu, A., Nayir, E., Kalenderoglu, M. D., Kirca, O., & Ozdogan, M. (2016). Curcumin (Turmeric) and cancer. *Journal of B.U.ON.*, 21(5), 1050–1060.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Voogd, A., Sluiter, W., Van Eijk, H. G., & Koster, J. F. (1992). Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. *Journal of Clinical Investigation*, 90(5), 2050–2055. <https://doi.org/10.1172/JCI116086>
- Wax, P. M. (2013). Current Use of Chelation in American Health Care. *Journal of Medical Toxicology*, 9(4), 303–307. <https://doi.org/10.1007/s13181-013-0347-2>
- Williams A, Meyer D (2009). Desferrioxamine as immunomodulatory agent during microorganism infection. *Curr Pharm Des*, 15(11), 1261-1268. [doi:10.2174/138161209787846801](https://doi.org/10.2174/138161209787846801)
- Wills, E. D., Gillham, B., Papachristodoulou, D. K., Thomas, J. H. *Wills' biochemical basis of medicine*. 3rd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997. ISBN 978-0750620130.

Yadav, D., & Chandra, J. (2011). Iron deficiency: Beyond anemia. *Indian Journal of Pediatrics*, 78(1), 65–72. <https://doi.org/10.1007/s12098-010-0129-7>

Yang, Y., Ma, J., Xiu, J. et al. (2014). Deferoxamine compensates for decreases in B cell counts and reduces mortality in enterovirus 71-infected mice. *Marine Drugs*, 12(7), 4086–4095. <https://doi.org/10.3390/md12074086>