

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



Příprava metodiky pro zjištění míry chelatace iontů vápníku a hořčíku

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové, 2021

Lukáš Konečný

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. “

V Hradci Králové dne

.....

Poděkování

Rád bych poděkoval mému školiteli panu prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D. za jeho cenné rady a vstřícnou pomoc při vypracování této diplomové práce, dále mé rodině za podporu během celého studia.

Práce vznikla za podpory grantu START/MED/078

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Lukáš Konečný

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

Název diplomové práce: Příprava metodiky pro zjištění míry chelatace iontů vápníku a hořčíku

Vápník a hořčík jsou biogenní prvky patřící do druhé skupiny periodické tabulky prvků. Vápník je pátým nejzastoupenějším prvkem v lidském těle. Kromě své důležité role v homeostáze kostí se podílí na řadě procesů jako srážení krve, svalové kontrakci a regulaci nervové excitability. Hořčík je kofaktorem mnoha enzymatických reakcí nezbytných pro řadu fyziologických funkcí.

Cílem této práce bylo navrhnout novou screeningovou metodu pro stanovení míry chelatace iontů vápníku a hořčíku. V prvním kroku byla změřena UV-VIS spektra vybraného indikátoru o-kresolftalein komplexonu a jeho komplexů s vápníkem a hořčíkem. Následovalo ověření linearity a stanovení citlivosti metody. Současně byla měřena stabilita indikátoru a jeho komplexu s oběma ionty. V posledním kroku byla ověřena vhodnost metody na standardním chelátoru kyselině ethylendiamintetraoctové, (EDTA).

Optimální vlnová délka pro komplex s vápníkem byla 572,5 nm a pro komplex s hořčíkem 568 nm. U těchto vlnových délek byla za použití indikátoru rozpuštěného v pufru o pH 7,5 linearita mezi absorbancí a koncentrací nejvyšší. Citlivost (nejnižší koncentrace kovu, kterou lze detekovat za statistické významnosti $p < 0,05$) byla 2,5 μM pro vápník a 2 μM pro hořčík. Stabilita indikátoru v pufru o pH 7,5 s oběma ionty je nejméně 24 dní a indikátoru v methanolu s oběma ionty nejméně 39 dní. Metoda byla ověřena s EDTA, kdy byl prokázán z literatury popsáný komplex s vápníkem i s hořčíkem se stechiometrií 1:1.

V závěru lze tvrdit, že byla připravena metodika k detekci schopnosti chelatace iontů vápníku a hořčíku. Využívání těchto kovů léčivými může být spojeno s nežádoucími účinky a tato metodika tak může být využita k jejich predikci.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Lukáš Konečný

Supervisor: prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

Title of Thesis: Preparation of a method for detection of the extent of chelation of calcium and magnesium ions

Calcium and magnesium are biogenic elements belonging to the second group of the periodic table. Calcium is the fifth most abundant element in the human body. In addition to its important role in bone homeostasis, calcium is involved in other processes such as blood clotting, muscle contraction and regulation of nerve excitability. Magnesium is the cofactor of many enzymatic reactions essential for a row of physiological functions.

The aim of this work was to propose a novel screening method for determination of the degree of calcium and magnesium chelation. In the first step the UV-vis spectra of the selected indicator o-cresolphthalein complexone and its complexes with calcium and magnesium were measured. This was followed by verification of the linearity and the determination of the sensitivity of the method. Concurrently the stability of the indicator and its complexes with both ions was measured. In the last step, the suitability of the method was verified on a standard chelator ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

The optimal wavelength for the calcium complex was 572,5 nm and for the magnesium complex 568 nm. At these wavelengths, the linearity between absorption and concentration was highest using the indicator dissolved in pH 7.5 buffer. The sensitivity (the lowest concentration of a metal which can be detected with significance at $p < 0.05$) was 2.5 μM for calcium and 2 μM for magnesium. The stability of the indicator in buffer 7.5 with both ions is at least 24 days and stability of the indicator in methanol with both ions is at least 39 days. The method was verified with EDTA where complexes with stoichiometry 1:1 were documented in harmony with known data.

In conclusion, it can be claimed that a methodology for determination of the degree of chelation of calcium and magnesium ions has been prepared. This method can be used for detection of interferences of different drugs with these ions which can be associated with side effects.

Obsah

1	Seznam zkratek	7
2	Úvod.....	8
3	Teoretická část	9
3.1	Fyziologie vápníku.....	9
3.2	Fyziologie hořčíku	10
3.3	Role vápníku a hořčíku v organismu.....	11
3.4	Gastrointestinální vstřebávání vápníku a hořčíku	12
3.5	Renální exkrece vápníku a hořčíku.....	13
3.6	Chelatace a chelatační terapie	15
3.6.1	Chelátory vápníku a hořčíku	16
3.7	Deplece vápníku a hořčíku.....	19
3.8	Metodiky pro detekci vápníku a hořčíku.....	20
4	Cíl práce	21
5	Experimentální část.....	22
5.1	Chemikálie	22
5.2	Přístroje	22
5.3	Spotřební materiál	22
5.4	Roztoky	23
5.5	Změření spektra indikátoru a jeho komplexu.....	24
5.6	Matematické stanovení optimální vlnové délky pro stanovení koncentrace Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů	25
5.7	Zjištění citlivosti metodiky	26
5.8	Stanovení stability reagensů	27
5.9	Potvrzení metodiky pomocí známého chelátoru	28
5.10	Matematicko-statistické zpracování výsledků	29
6	Výsledky	30
6.1	Krok I.....	30
6.2	Krok II.....	35
6.3	Krok III	38
6.4	Krok IV	40
6.5	Krok V.....	43
7	Diskuse.....	44
8	Závěr	46
9	Reference	47

1 Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát (ATP, z angl. adenosin triphosphate)
BAPTA	kyselina 1,2-bis[o-aminophenoxy]ethan-N,N,N',N'-tetraocová (z angl. 1,2-bis[o-aminophenoxy]ethane-N,N,N',N'- tetraacetic acid)
CASR	receptor pro vápník (z angl. calcium-sensing receptor)
CC	o-kresolphtalein komplexon (CC, z angl. cresolphtalein complexone)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraocová (z angl. ethylen diaminotetraacetic acid)
Na₂EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraocové
EGTA	kyselina ethylen glycol bis(β-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraocová (z angl. ethylene glycol bis(β-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina (z angl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
IsnP6	myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát
NKCC2	kotransportér iontů Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻
PTH	parathormon (z angl. parathyroid hormone)
PTHrP	receptor pro parathormon (z angl. parathyroid hormone-related peptide receptor)
ROMK	vnější ledvinový kanál pro K ⁺
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)ethylendiamin (z angl. N,N,N',N'- tetrakis-(2-pyridylmethyl)ethylen diamine)
VDBP	transportní protein vitaminu D (z angl. vitamin D-binding protein)

2 Úvod

Vápník a hořčík jsou kovy alkalických zemin a jsou důležitou součástí lidského organismu. I přes to, že většina je situována v kostech, plní řadu funkcí i mimo ně. Vápník se podílí v procesu koagulace, svalové excitaci a kontrakci, hořčík je kofaktorem mnoha enzymatických reakcí nezbytných pro fungování organismu. Ačkoliv není nedostatek vápníku tak častý jako jeho nadbytek, často se jedná o nebezpečný a život ohrožující stav. Naopak s nedostatkem hořčíku se setkáváme častěji. Klinicky se ale projeví až při překročení kritických hodnot. Na depleci těchto iontů se mimo jiné může podílet i neselektivita některých chelátorů, tedy látek, které spolu s kationty kovů vytvářejí komplex.

V této práci jsme se zaměřili na přípravu metodiky pro zjištění míry chelatace iontů vápníku a hořčíku, protože schopnost chelatovat tyto ionty může být z fyziologického hlediska spojena s nežádoucími účinky. Komplexy vybraného indikátoru a kovů jsou barevné, a proto můžou být detekované spektrofotometricky. Postup byl rozdělen do několika kroků, které ve výsledku standardizují použití této metodiky. Závěrem byla metodika ověřena na známém chelátoru.

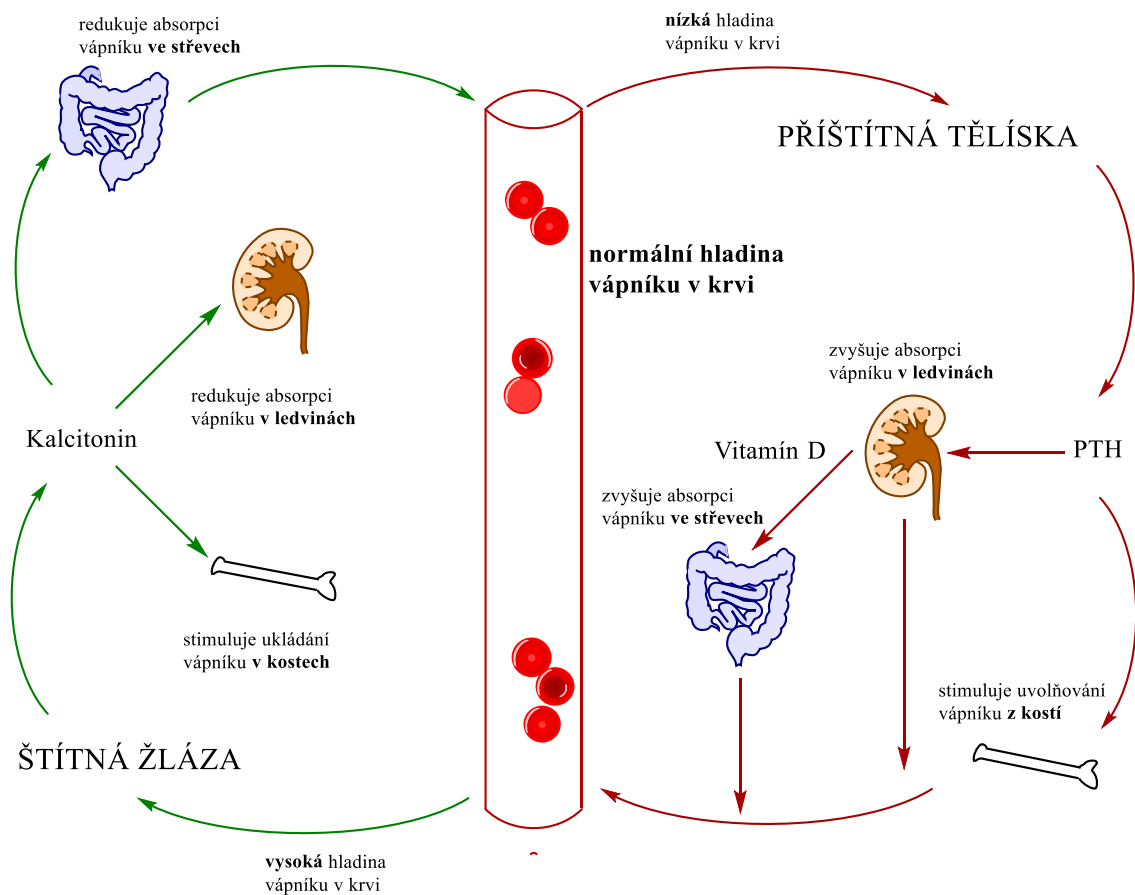
3 Teoretická část

3.1 Fyziologie vápníku

Vápník patří mezi kovy alkalických zemin, je situován ve 2. skupině periodické tabulky prvků a je pátým nejzastoupenějším prvkem v lidském těle. Celkové množství vápníku v organismu se pohybuje v rozmezí 1000 g až 1200 g (*Blaine et al. 2015*), přičemž více než 99 % vápníku je lokalizováno spolu s fosforem v kostech ve formě hydroxyapatitu. Tato komplexní molekula fosforečnanu vápenatého slouží kromě jiného také jako rezervoár k udržení koncentrace vápníku v séru (*Weaver a Peacock 2019, Yu a Sharma 2020*). Fyziologická koncentrace sérového vápníku se pohybuje v referenčním rozmezí 2,25 až 2,61 mmol/L (*Fuszek et al. 2004*).

Podle studie *Walser (1961)* je 47,5 % sérového vápníku ve formě volného iontu zatímco 46 % sérového vápníku se váže na proteiny, zejména na albumin (*Goltzman 2019*). Zbytek tvoří vápník ve formě solí jako je citrát a fosfát.

Homeostáza vápníku je regulována souhrou mezi parathormonem (PTH), 1,25-dihydroxyvitaminem D (kalcitriol) a kalcitoninem (Obr. 1). Při poklesu vápníku v séru dojde k nižší stimulaci vápníkových receptorů v paratyroidních buňkách (CaSR) a zvýší se sekrece PTH, který působí prostřednictvím svých receptorů (PTHrP) v ledvinách a kostech. V ledvinách stimuluje distální tubulární resorpci vápníku a v kostech zvyšuje osteoklastickou aktivitu a díky tomu se koncentrace vápníku v séru zvýší. PTH stimuluje také renální produkci kalcitriolu z 25-hydroxyvitaminu D, který ve střevech zvyšuje vstřebávání vápníku z potravy. Kalcitonin na druhé straně plazmatické hladiny vápníku snižuje (*Cooper a Gittoes 2008, Goyal a Singh 2020, Peacock 2010*).



Obrázek 1. Fyziologie vápníku. Vlastní zpracování za pomoci ChemDraw 20.0

3.2 Fyziologie hořčíku

Hořčík je rovněž kov alkalických zemin, a tudíž je i součástí druhé skupiny periodické tabulky. Obdobně jako vápník, tak i hořčík je převážně vázaný v kostech. Asi 99 % celkového množství se nachází v kostech, svalech nebo tkáních a pouze 1 % v extracelulárním prostoru (Blaine et al. 2015), kde se pohybuje v referenčním intervalu 0,75 – 0,95 mmol/L (Costello et al. 2016b). 55 % sérového hořčíku existuje ve formě volného iontu, 32 % hořčíku je vázáno na plazmatické proteiny a zbytek hořčíku je ve formě solí jako je citrát a fosfát (Walser 1961). Ionizovaný hořčík je fyziologicky aktivní forma, která je důležitá pro fyziologické funkce (Blaine et al. 2015).

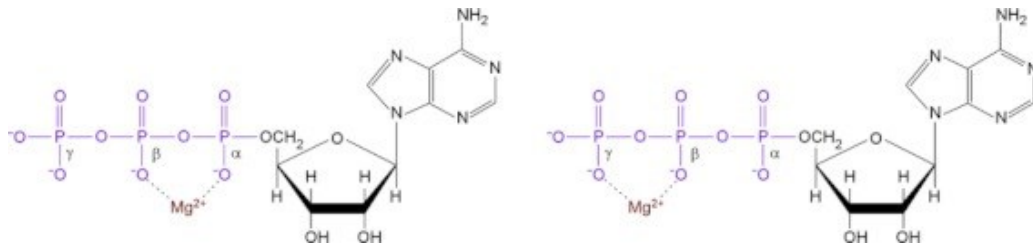
Regulace homeostázy hořčíku v organismu je dána souhrou střevní absorpce, renálního vylučování a výměnou z rezervoáru hořčíku v kostech (Costello et al. 2016a). Vstřebávání a vylučování hořčíku je ovlivňováno kalcitriolem, estrogeny nebo PTH. Kalcitriol prokazatelně stimuluje vstřebávání, na druhou stranu je hořčík důležitým

kofaktorem, který je nezbytný pro navázání vitamínu D na transportér (VDBP). Rovněž se podílí při konverzi tohoto vitamínu na jeho aktivní formu. Na vylučování se podílí estrogeny a PTH. Absorpce vápníku i hořčíku je vzájemně provázaná. Jak bylo uvedeno výše, hypokalcémie stimuluje sekreci PTH, což následně vede k normalizaci sérové koncentrace vápníku. Hypomagnesémie působí nepříznivě při hypokalcemicky indukovaném uvolnění PTH, protože hořčík je důležitý pro citlivost tkání k PTH. Uvolňování PTH zvyšuje resorpci hořčíku v ledvinách i absorpci ve střevě (*Gröber et al. 2015*).

3.3 Role vápníku a hořčíku v organismu

Vápník je esenciálním prvkem, který je nezbytný pro řadu funkcí v organismu. Je součástí mnoha fyziologických a biochemických procesů z nichž nejdůležitější jsou kostní výstavba a homeostáza (*Robertson et al. 2008*). Jako koagulační faktor (původně známý také jako koagulační faktor IV) je zapojen v procesu krevní koagulace, kdy má vliv na přeměnu fibrinogenu na nerozpustný fibrin, a zvyšuje také agregaci trombocytů (*Yu et al. 2018*). Dále se podílí na zachování integrity a propustnosti buněčných membrán, svou úlohu má i při svalové excitaci a kontrakci a regulaci nervové excitability. Z hlediska přesného mechanismu se účastní řady enzymatických reakcí a funguje jako druhý posel v mnoha signalizačních kaskádách (*Robertson et al. 2008*).

Hořčík se podílí na více jak 300 esenciálních metabolických reakcích. Je důležitý tam, kde reakce závisí na adenosintrifosfátu (ATP), protože ATP primárně existuje v komplexu s hořčíkem (Obr. 2). Tento komplex vzniká díky schopnosti hořečnatých iontů tvořit cheláty s intracelulárními aniontovými ligandy, zejména s ATP. Vznik komplexu ATP-Mg je jednou z možností aktivace enzymu. Další způsoby aktivace jsou přímé navázání hořčíku na aktivační místo enzymu nebo konformační změna enzymu v průběhu katalytického procesu. Enzymatická aktivace hořčíkem je nutná například pro enzymy hexokinázy, kreatinkinázy a adenylátcyklázy. Hořčík se významně podílí i na homeostáze kardiovaskulárního systému. Redukuje agregaci trombocytů a reguluje pohyb draslíku v kardiomyocytech. Nezbytný je i pro syntézu proteinů a nukleových kyselin (*Gröber et al. 2015, Swaminathan 2003*).



Obrázek 2. Komplex ATP s hořečnatým iontem. Převzato z Holm, 2012

3.4 Gastrointestinální vstřebávání vápníku a hořčíku

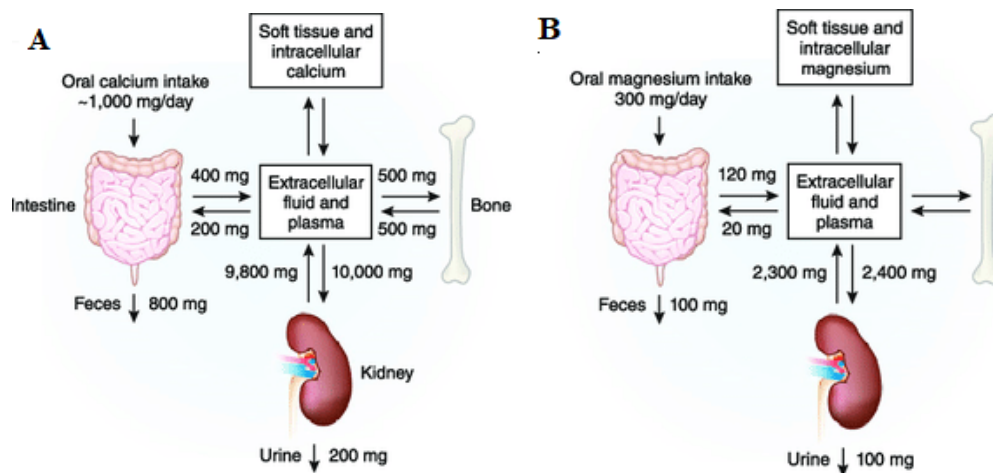
U zdravého dospělého člověka by denní příjem vápníku měl činit přibližně 800-1000 mg (*Blaine et al. 2015*). Avšak podle přehledové studie *Wang et al. (2014)* je optimální příjem vápníku ve stravě 800 mg, protože nižší i vyšší příjmy jsou spojovány s výskytem vyššího rizika úmrtí z kardiovaskulárních příčin. Nízký příjem vápníku může způsobit riziko kardiovaskulárního onemocnění ovlivněním krevního tlaku, sekrecí a citlivostí tkání na inzulin a koncentrací cholesterolu v krvi. Příliš vysoké množství vápníku má nepříznivý účinek na kardiovaskulární systém navozením hyperkoagulačního stavu.

Při konzumaci 1 g vápníku obsaženého ve stravě je přes střevní epitel absorbováno přibližně 400 mg vápníku skrze buňky nebo paracelulárně. Na paracelulárním transportu se nepřímo podílí kalcitriol, který ovlivňuje strukturu těsných spojů a ty se stávají více propustné pro vápník. Ze 400 mg je polovina vyloučena prostřednictvím střevní sekrece a čistá absorpce za fyziologických podmínek činí asi 200 mg vápníku. Celkem se tedy denně za těchto podmínek vyloučí 800 mg stolicí a následně 200 mg močí (*Blaine et al. 2015*).

Hořčík je z potravy přijímán v daleko menší míře. Z metaanalýzy *Dibaba et al. (2014)* vyplývá, že příjem hořčíku ze stravy se pohybuje v rozmezí 117 až 423 mg za den, přičemž vyšší příjem hořčíku je spojený s nižším výskytem metabolického syndromu. Naopak metabolický syndrom zahrnující diabetes mellitus typu 2 s inzulinovou rezistencí, hypertenze a dyslipidemii, stejně jako jeho kardiovaskulární následky mohou být důsledkem nízkého příjmu hořčíku v potravě (*Bo et al. 2006, Dibaba et al. 2014*). Ze stravy je hořčík vstřebáván především v tenkém střevě skrze buňky nebo paracelulárně a v menší míře i v tlustém střevě (*Blaine et al. 2015*).

Dle studie *Fine et al. (1991)* bylo vstřebávání negativně ovlivněno zvyšujícím se příjmem hořčíku. Frakční absorpce klesala z 65 % na 11 % s rostoucím příjmem hořčíku v potravě.

Osud hořčíku a vápníku v organismus je shrnut v Obr. 3.



Obrázek 3. (A) Tok vápníku a (B) hořčíku mezi tělesnými kompartmenty. Převzato a upraveno podle Blaine et al. 2015

3.5 Renální exkrece vápníku a hořčíku

Ledviny jsou zásadní pro hospodaření a vylučování vápníku i hořčíku, i když to není jediný způsob jejich exkrece. Při normálním fungování ledvin se glomerulární filtrací z krve prefiltruje až 10 g vápníku a 2,4 g hořčíku, ale díky zpětné reabsorpci se většina množství znovu dostane zpět do systémového řečiště a jen nepatrné množství je vyloučeno v moči (*Blaine et al. 2015*). Dle metaanalýzy *Pak et al. (2015)* se denně vyloučí 100-169 mg vápníku a podle studie *Palacios et al. (2013)* přibližně 95 mg hořčíku. U dětí je množství stanoveno na hmotnost, přičemž vyloučený obsah vápníku v průměru činí přibližně 2,4 mg na kg váhy a hořčíku asi 2,8 mg na kg za 24 hodin (*Ghazali a Barratt 1974*).

Renální exkrece obou iontů je také znázorněna v Obr. 3.

V proximálním tubulu a vzestupné části Henleovy kličky se reabsorbuje největší množství vápníku a hořčíku (Tab. 1). V těchto segmentech se na reabsorpci z největší

části podílí paracelulární transport, který je zprostředkovaný proteiny kladinem-16 a kladinem-19, které vytvářejí kanál propustný pro kationty. V Henleově kličce je proces paracelulárního transportu navíc ovlivněn gradientem, který vzniká díky kotransportéru pro ionty Na^+ - K^+ - 2Cl^- (NKCC2) a kanálu pro K^+ (ROMK) na apikální straně. Vylučování iontů je regulováno receptorem CaSR. V proximálním tubulu je tento receptor situovaný na apikální straně a v Henleově kličce na basolaterální straně. Při navázání vápníku nebo hořčíku na receptor se spouští proces lysosomální degradace kladinu-16. Snížením počtu proteinů dochází k ovlivnění paracelulární reabsorpce a ionty jsou ve větším množství vyloučeny močí. V Henleově kličce má CaSR navíc význam například při hyperkalcémii, protože aktivací CaSR na basolaterální straně dojde k inhibici NKCC2 i ROMK. Nevznikne žádná hnací síla pro paracelulární transport iontů a dojde k jejich vyloučení močí. V distálním tubulu probíhá resorpce výhradně aktivně, protože ionty postupují proti chemickému a elektrickému gradientu. Ionty prochází skrze transportní proteiny na apikální straně a do krve se dostanou přes basolaterální membránu. Vápník skrze výměník iontů $\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$ nebo Ca-ATPasu, hořčík skrze výměník $\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+$ (Blaine et al. 2015, Ferrè et al. 2012).

Tabulka 1. Množství reabsorbovaného vápníku a hořčíku v různých segmentech nefronu.

Segment nefronu	Reabsorpce vápníku	Reabsorpce hořčíku
Proximální tubulus	60-70 %	10-20 %
Vzestupná část Henleovy kličky	20 %	70 %
Distální tubulus	10 %	10 %
Sběrací kanálek	5 %	

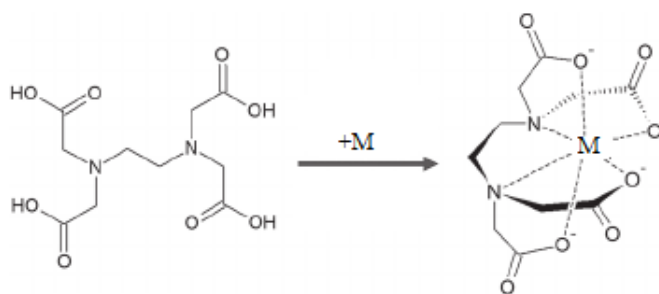
Převzato z Blaine et al. 2015

3.6 Chelatace a chelatační terapie

Chelatační látky se běžně používají k chelataci těžkých kovů a tím snižují jejich koncentrace v organismu. Některá tato činidla mají relativně vysoký stupeň selektivity, jiná však mohou neselektivně chelatovat více kovů. Nejen selektivita ale i správná dávka těchto léčiv jsou při chelatační terapii důležité (*National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases 2017*). Nеспецифичnost i vysoké dávky mohou při delším použití snížit hladiny esenciálních kovů a v průběhu terapie se může vyskytnout řada nežádoucích účinků včetně deplece vápníku (*Kim et al. 2019, National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases 2017*). Cílem terapie je tedy odstranění toxických kovových iontů z citlivých míst v organismu, proto afinita léčiv-chelátorů k těmto toxickým iontům musí být vyšší, než afinita iontů k fyziologickým kovům (*Aaseth et al. 2015*).

Jak již bylo zmíněno, selektivita chelátoru je klíčová a je důležité brát v potaz, že většina chelatačních činidel netvoří komplex jen s jedním kovem. Vzhledem k jejich nejdelšímu používání, se diskutuje vliv chelátorů železa na hladiny zinku v organismu. Studie *Maclean et al. (2001)* poukazuje vliv deferoxaminu a deferipronu (známé chelátory železa) na zinek. Po 2 hodinách expozice oběma chelátory došlo ke snížení koncentrace zinku nejméně o 30 %. Koncentraci zinku ovlivňuje i chelatační činidlo D-penicilamin, používaný při nadbytku mědi. (*Catapano et al. 2018*)

Jiným příkladem je kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), která se dnes ale terapeuticky používá spíše výjimečně. Princip chelatace EDTA a kovu je znázorněn v Obr. 4.



Obrázek 4. Struktura EDTA a jejího komplexu s iontem kovu M 1:1. Převzato a upraveno podle Hafer et al. 2020

3.6.1 Chelátory vápníku a hořčíku

3.6.1.1 Ethylendiamintetraoctová kyselina, EDTA

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Obr. 5) je dobře známé chelatační činidlo s vysokou afinitou k dvojmocným a trojmocným iontům kovů s nízkou elektronegativitou jako je vápník, hořčík, železo, mangan nebo zinek. Používá se při intoxikacích těžkými kovy (olovo nebo měď) a její soli se v minulosti požívaly při hyperkalcémii. V průběhu chelatační terapie však může způsobit depleci jiných esenciálních iontů (*Aaseth et al. 2015, Finnegan a Percival 2015*). Dle studie *Waters et al. (2001)* se během chelatační terapie pomocí EDTA zdvojnásobilo množství vápníku i hořčíku vyloučeného močí.

Vedle chelatační terapie existuje také myšlenka, že by EDTA vychytávala vápník z aterosklerotického plátu a dokázala tak vyvolat jeho rozpad, ale důkazy na podporu této terapie jsou nedostačující (*Aaseth et al. 2015*).

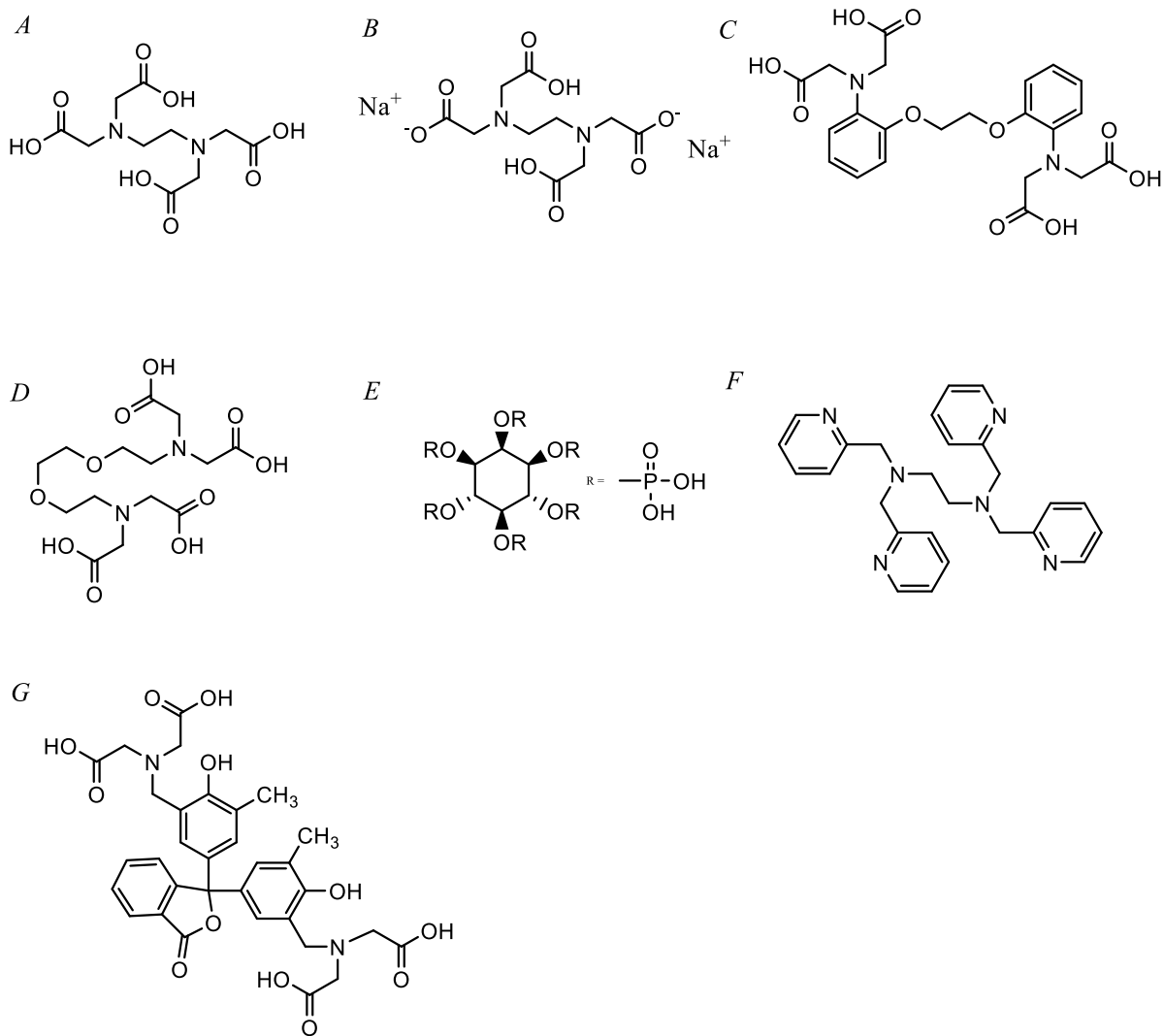
3.6.1.2 Další chelátory

Dalšími činidly jsou BAPTA (1,2-bis[o-aminophenoxy]ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina), EGTA (ethylen glycol bis(β-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina), TPEN (N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)ethylendiamin) a InsP6 (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát) (Obr. 5). BAPTA váže vápenaté ionty rychleji než EGTA, protože EGTA musí disociovat proton před navázáním iontu. To zpomaluje navázání vápníku, i když afinita těchto dvou chelátorů je podobná (*Wang a Augustine 2015*). TPEN je strukturální analog EDTA, ve kterém byly čtyři karboxylové skupiny za pyridiny. Vyznačuje velkou afinitou k těžkým kovům (zinek, mangan nebo železo), ale ionty vápníku a hořčíku ovlivňuje jen nepatrně (*Arslan et al. 1985*). TPEN se k vápníku vyznačuje 400krát menší afinitou s porovnáním s BAPTA (*Shumaker et al. 1998*). Dalším chelátorem je IsnP6, který je přírodního původu a vyznačuje se vysokou afinitou k hořčíku, vápníku, železa a zinku (*Sparvoli a Cominelli 2015*).

3.6.1.3 *O-cresolphthalein complexon, CC*

Sloučeninu CC (Obr. 5) představila v 50. letech studie *Anderegg et al. (1954)*, jako vynikající indikátor pro komplexometrickou titraci kovů alkalických zemin (včetně v této diplomové práci zkoumaného vápníku a hořčíku) (*Corns a Ludman 1987, Lorentz 1982, Sarkar a Chauhan 1967*). V alkalickém prostředí tvoří fialově červený komplex, který vzniká podobně jako s molekulou EDTA díky patrné podobnosti s touto sloučeninou (*Corns a Ludman 1987*).

Konstanty tvorby komplexů tohoto indikátoru s vápníkem i hořčíkem jsou podobné ($K = 2.5 \times 10^6$ a 3.2×10^7 pro vápník a hořčík, respektive). Proto je v přítomnosti obou iontů nutné použití maskovacího činidla. Například sůl EGTA slouží jako maskovací činidlo k eliminaci interference vápníku (*Tesfaldet et al. 2004*) a 8-hydroxychinolin k zamezení interference hořčíku (*Lorentz 1982*).



Obrázek 5. (*A*) Molekula EDTA a (*B*) její disodná sůl, (*C*) BAPTA, (*D*) EGTA, (*E*) InsP6, (*F*) TPEN, (*G*) CC. Vytvořeno za pomoci ChemDraw 20.0

3.7 Deplece vápníku a hořčíku

Hypokalcémie a hypomagnesémie jsou stavy označující depleci iontů vápníku a hořčíku. Koncentrace iontů klesají pod referenční rozmezí, které je u vápníku stanoveno od 2,1 mmol/l až po 2,7 mmol/l a u hořčíku od 0,67 mmol/l – 1,04 mmol/l (*Luo et al. 2017*).

Nedostatek vápníku v organismu není tak častý jako jeho intoxikace, ale často se jedná o život ohrožující stav (*Goyal a Singh 2020*). Naopak hypomagnesémie je poměrně častá, ale klinické symptomy se projevují až při překročení kritických hodnot (pod 0,5 mmol/l). Malé změny v referenčním rozmezí nebývají klinicky významné. Naproti tomu hypermagnesémie je vzácnější, ale závažnější (*Cascella a Vaqar 2021*).

Extracelulární vápník je nezbytný pro normální funkci nervů a svalů, proto mezi hlavní projevy jeho nedostatku patří záškuby svalů a křeče, brnění, epileptické záchvaty, bronchospasmus a jiné neuromuskulární projevy (*Cooper a Gittoes 2008, Schafer a Shoback 2016*). Mezi další symptomy patří neurologické příznaky (extrapyramidové příznaky, poruchy osobnosti, zhoršení intelektu, parkinsonismus), ektodermální změny (alopecie, psoriáza, atopický ekzém), nebo srdeční změny (prodloužení QT intervalu, kardiomyopatie, městnavé srdeční selhání) (*Schafer a Shoback 2016*).

Hořčík je důležitý v mnoha funkcích organismu, a proto se jeho nedostatek projevuje různými symptomy například neuromuskulární hyperexcitabilitou (projevující se třesem nebo tetanií), neuropsychiatrickými poruchami (od apatie, deliria až ke komatu) a stejně jako deplece vápníku ovlivňuje srdeční funkce a jeho nedostatek se projeví například arytmií typu torsades de pointes, a náhlou smrtí (*Pham et al. 2014*).

3.8 Metodiky pro detekci vápníku a hořčíku

Existuje několik metodik, které jsou schopny detekovat celkové koncentrace vápníku a hořčíku v tělesných tekutinách jako je například krev nebo moč (*Benamor a Aguerssif 2008*). Některé metodiky zahrnují spektrofotometrické nebo komplexometrické stanovení založené na formování barevných komplexů s vápníkem a hořčíkem. Nejběžněji se jako komplexotvorné látky využívají ortho-cresolphtalein, thymolphthalein nebo arsenazo III. Dále se ke stanovení koncentrace používá plamenová fotometrie nebo atomová absorpční spektroskopie, iontově selektivní elektrody, iontová chromatografie nebo průtokové metodiky jako je fluorimetrická sekvenční injekční analýza (*de Armas et al. 2000, Benamor a Aguerssif 2008, Saurina et al. 2002, Tesfaldet et al. 2004*).

Některé metodiky vyžadují však nákladná analytická zařízení, a proto je nelze použít pro rutinní analýzu v malých laboratořích. UV – VIS spektrofotometrie je nejpohodlnější metodikou, díky její jednoduchosti, rychlosti a nízkým nákladům. Tato analytická metoda může být použita pro analýzu různých vzorků (*Tesfaldet et al. 2004*) a v našem případě, kdy se bude jednat o směsi obsahující jen jeden kov také optimální.

4 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout novou screeningovou metodu pro stanovení míry chelatace vápenatých a hořečnatých iontů. Tato nová metodika může být využita pro zjišťování interakce xenobiotik s vápenatými nebo hořečnatými ionty v lidském organismu. Taková interakce může negativně ovlivnit hospodaření s těmito kationty a může být spojena se vznikem nežádoucích účinků.

- **Krok I**
Charakterizace spekter indikátoru samotného a jeho komplexů s Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty.
- **Krok II**
Nalezení optimální vlnové délky pro stanovení koncentrace Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů.
- **Krok III**
Zjištění citlivosti metodiky.
- **Krok IV**
Stabilita reagensů.
- **Krok V**
Potvrzení metodiky na známém účinném chelátoru EDTA.

5 Experimentální část

5.1 Chemikálie

Dihydrát chloridu vápenatého, heptahydrát síranu hořečnatého, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina (HEPES), její sodná sůl, disodná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové (Na_2EDTA) a o-kresolphtalein komplexon (CC) byly zakoupeny ze Sigma-Aldrich (USA).

Superčistá voda (připravena pomocí přístroje Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, U.S.A.)

Methanol byl zakoupen od firmy Penta (ČR).

Pufr o pH 7.5 byl připraven jako 15 mM roztok HEPES sodné soli a 14.3 mM HEPES v ultračisté vodě.

5.2 Přístroje

analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern, Německo)

spektrofotometr Helios Gamma (Spectronic Unicam, Spojené Království)

5.3 Spotřební materiál

Mikrozkumavky 1500 μl (VWR International, USA).

5.4 Roztoky

Zásobní roztok vápenatých iontů – dihydrát chloridu vápenatého ($M_w = 147,014 \text{ g/mol}$) byl navážen na analytických vahách a následně rozpuštěn ve vypočteném množství superčisté vody na koncentraci 10 mM.

Pracovní roztoky vápenatých iontů – roztoky s nižší koncentrací se získávaly ze zásobního roztoku dihydrátu chloridu vápenatého 10 mM zředěného superčistou vodou.

Zásobní roztok hořečnatých iontů – heptahydrát síranu hořečnatého ($M_w = 246,475 \text{ g/mol}$) byl navážen na analytických vahách a následně rozpuštěn ve vypočteném množství superčisté vody na koncentraci 10 mM.

Pracovní roztoky hořečnatých iontů – roztoky s nižší koncentrací se získávaly ze zásobního roztoku heptahydrátu síranu hořečnatého 10 mM zředěného superčistou vodou.

O-kresolphtalein komplexon (CC, $M_w = 636,6 \text{ g/mol}$) byl navážen na analytických vahách a následně rozpuštěn ve vypočteném množství pufru o pH 7,5 na koncentraci 3 mM. V některých experimentech byl také připraven jeho metanolický roztok o stejné koncentraci. Pro snadnější rozpuštění byla použita ultrazvuková lázeň.

Na_2EDTA 15 mM – disodná sůl EDTA ($M_w = 372,24 \text{ g/mol}$) byla navážena na analytických vahách a následně rozpuštěna ve vypočteném množství superčisté vody v koncentraci 15 mM. Pro snadnější rozpuštění byla použita ultrazvuková lázeň. Roztok byl použit k měření, ale i jako zásobní roztok pro přípravu roztoků s nižšími koncentracemi.

Všechny připravované roztoky byly uchovávány v lednici.

5.5 Změření spektra indikátoru a jeho komplexu

V prvním kroku byla změřena spektra vybraného indikátoru CC připraveného v pufru o pH 7,5 a CC připraveného v methanolu a jejich komplexů s vápenatými a poté s hořečnatými ionty v UV-VIS oblasti spektra (200-800 nm). Následovalo měření spekter těchto komplexů v různých poměrech již v užší oblasti, protože k absorpci došlo v rozmezí vlnových délek 350-650 nm. Data byla využita pro nalezení optimální vlnové délky.

Byly připraveny pracovní roztoky o různých koncentracích vápenatých a hořečnatých iontů z 10 mM zásobních roztoků. Tyto koncentrace byly 1,3; 0,8; 0,52; 0,26 a 0,13 mM. Odpovídají finálním koncentracím 20-195 μ M.

- 1) Do šesti mikrozkuvek bylo napipetováno 700 μ l pufru o pH 7,5 a 150 μ l 3 mM CC připraveného v pufru s pH 7,5.
- 2) K pěti mikrozkuvkám bylo přidáno 150 μ l roztoku vápenatých nebo hořečnatých iontů o rozdílných koncentracích. Tyto koncentrace byly 1,3; 0,8; 0,52; 0,26; 0,13 mM. Do poslední šesté mikrozkuvky s nulovou koncentrací vápenatých iontů bylo přidáno 150 μ l superčisté vody.
- 3) Následovalo 10 sekund třepání v třepačce.
- 4) Cca 1 ml obsahu mikrozkuvek bylo opatrně přepipetováno do kyvet a byla změřena spektra absorbancí nejdříve v rozmezí vlnových délek 350-650 nm.
- 5) Měření bylo zopakováno po 20 minutách.
- 6) Zcela analogicky byla změřena spektra s 3 mM roztokem CC rozpuštěném v methanolu.

5.6 Matematické stanovení optimální vlnové délky pro stanovení koncentrace Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů

Výsledky z přechozího kroku byly matematicky zanalyzovány. U každé z měřených vlnových délek byl prověřen vztah mezi absorbancí a přidanou koncentrací iontů. Pro každou vlnovou délku byl tak stanoven koeficient lineární regrese R^2 a sklon přímky k podle vztahu:

$$A = c \times k + b,$$

Kde A je absorbance při dané vlnové délce, k je konstanta, která je v našich experimentech používána pro zjednodušení (jde o násobek šířky kyvety a molárního extinkčního koeficientu ϵ). c je finální koncentrace testovaných iontů a b je absorbance pozadí.

5.7 Zjištění citlivosti metodiky

Ke stanovení citlivosti byly opět připraveny roztoky o různých koncentracích vápenatých a hořečnatých iontů. V tomto případě šlo o roztoky s nižšími koncentracemi, než v přechodím případě. Jejich koncentrace byly 0,13; 0,1; 0,07 a 0,03 mM, což odpovídá finálním koncentracím 19,5; 15; 10,5; a 4,5 μM ve směsi s indikátorem. Za pomoci T-testu byla porovnána citlivost s negativním slepým vzorkem (neobsahoval ionty testovaných kovů). Jelikož i absorbance nejnižší finální koncentrace 4,5 μM byla u obou iontů vyšší než u negativního slepého vzorku, byly připraveny roztoky s ještě nižšími koncentracemi. Pro vápník to byly koncentrace 0,0182; 0,0166; 0,015 a 0,0132 mM, což odpovídá finálním koncentracím 2,7; 2,5; 2,25 a 2,0 μM ve směsi s indikátorem. Pro hořečík to byly koncentrace 0,0332; 0,0266; 0,02; 0,0132 a 0,0066 mM, což odpovídá finálním koncentracím 5; 4; 3; 2 a 1 μM ve směsi s indikátorem.

- 1) Do pěti mikrozkuvek bylo přidáno 700 μl pufru o pH 7,5 a 150 μl CC rozpuštěném ve stejném pufru o pH 7,5.
- 2) Do čtyř mikrozkuvek bylo napipetováno 150 μl roztoku vápenatých iontů o různých koncentracích. Do poslední páté bylo napipetováno 150 μl superčisté vody.
- 3) Celkový objem se 10 sekund promíchával v třepačce.
- 4) Cca 1 ml obsahu mikrozkuvek bylo opatrně přepipetováno do kyvet a byla změřena spektra absorbancí v rozmezí vlnových délek 350-650 nm.
- 5) Měření bylo zopakováno po 15 minutách.
- 6) Celý postup byl zopakován s roztoky hořečnatých iontů.

5.8 Stanovení stability reagensů

Aby nebylo případně nutné vždy znovu ředit roztoky reagensů, byly provedeny stabilitní testy. Byly připraveny čtyři roztoky. Dva 3 mM roztoky CC v pufru s pH 7,5 byly označeny jako CC-A a CC-B. Dva 3 mM roztoky stejného indikátoru v methanolu byly označeny jako CC-C a CC-D. Všechny čtyři roztoky byly porovnávány s roztoky, které se připravovaly každý týden znovu a byla mezi nimi sledována závislost.

- 1) Do šesti mikrokumavek bylo napipetováno 700 μ l pufru s pH 7,5.
- 2) Do prvních třech mikrokumavek bylo přidáno 150 μ l CC v pufru s pH 7,5 (CC-A) a do dalších třech mikrokumavek bylo přidáno 150 μ l CC v pufru s pH 7,5 (CC-B).
- 3) Do první a čtvrté mikrokumavky bylo přidáno 150 μ l superčisté vody, do druhé a páté 150 μ l roztoku vápenatých iontů a do třetí a šesté 150 μ l roztoku hořečnatých iontů.
- 4) Objem se 10 sekund homogenizoval v třepačce.
- 5) Cca 1 ml obsahu mikrokumavek bylo opatrně přepipetováno do kyvet a byla změřena spektra absorbancí v rozmezí vlnových délek 350-650 nm.
- 6) Celý postup byl zopakován s dalšími šesti mikrokumavkami, do kterých byly přidány roztoky CC-C a CC-D.

5.9 Potvrzení metodiky pomocí známého chelátoru

V posledním kroku byla potvrzena metodika na účinném chelátoru, tedy látce vytvářející s vápenatými a hořečnatými ionty komplexy. Byla vybrána EDTA. Z důvodu horší rozpustnosti kyseliny, bylo z technických důvodů pracováno s její sodnou solí. Roztoky s různými koncentracemi EDTA byly připraveny tak, aby bylo možné stanovit chelatační křivku v plném rozsahu (tj. od nulové až ke kompletní chelataci).

- 1) Do deseti mikrokumavek bylo napipetováno 700 μl pufru s pH 7,5.
- 2) Do prvních osmi mikrokumavek bylo přidáno 100 μl roztoku EDTA o rozdílných koncentracích. Tyto koncentrace byly 15; 7,5; 3,75; 1,875; 1,25; 0,75; 0,375 a 0,0375 mM a připraveny byly z 15 mM roztoku EDTA. Do deváté a desáté mikrokumavky bylo přidáno 100 μl superčisté vody.
- 3) Do prvních devíti mikrokumavek bylo přidáno 50 μl 7,5 mM roztoku vápenatých iontů, což odpovídá finální koncentraci 375 μM . Do poslední mikrokumavky bylo přidáno 50 μl superčisté vody.
- 4) Objem se 2 minuty míchal v třepačce.
- 5) Nakonec bylo přidáno do všech deseti mikrokumavek 150 μl 3 mM roztoku CC připraveného v pufru s pH 7,5.
- 6) Cca 1 ml obsahu mikrokumavek bylo opatrně přepipetováno do kyvet a byla změřena spektra absorbancí v rozmezí vlnových délek 350-650 nm.
- 7) Celý postup byl zopakován s 7,5 mM roztokem hořečnatých iontů, který se přidával do prvních devíti mikrokumavek namísto roztoku s vápenatými ionty.

5.10 Matematicko-statistické zpracování výsledků

Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka vypočítaná

podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$. Koeficienty lineární regrese a chelatační křivky podle vzorce chelatace $[v \text{ \%}] = 100 / (1 + 10^{(\log IC_{50} - \log \text{ poměru chelátor:kov}) * \text{směrnice křivky}})$ byly vypočítány/sestrojeny pomocí programu GraphPad 9.1.0 (Graph GraphPad Software, USA). IC_{50} představuje poměr, kdy došlo k chelataci 50 % kovu. Při statistickém porovnání byl použit Studentův t-test. Následující rovnicí bylo vypočteno procento chelatovaného vápníku a hořčíku (5.9)

$$x [\text{\%}] = \left(1 - \frac{A_x - A_{cc}}{A_{kompl.} - A_{cc}} \right) \times 100$$

x - % chelatovaných vápenatých nebo hořečnatých iontů

A_x – absorbance vzorku, tj. chelátor + vápenaté nebo hořečnaté ionty + indikátor (CC)

A_{cc} – absorbance samotného indikátoru (CC)

$A_{kompl.}$ – absorbance komplexu vápenatých nebo hořečnatých iontů s indikátorem (CC)

U ostatních experimentů vždy byla absorbance slepého roztoku (roztok bez indikátoru CC) odečtena od absorbance roztoku s indikátorem. Pro roztok indikátoru připraveného v pufru o pH 7,5 byl připraven slepý roztok s pufrům o pH 7,5 850 μl a superčistou vodou 150 μl . Pro roztok indikátoru připraveného v methanolu byl připraven slepý roztok s pufrům o pH 7,5 700 μl , methanolem 150 μl a superčistou vodou 150 μl .

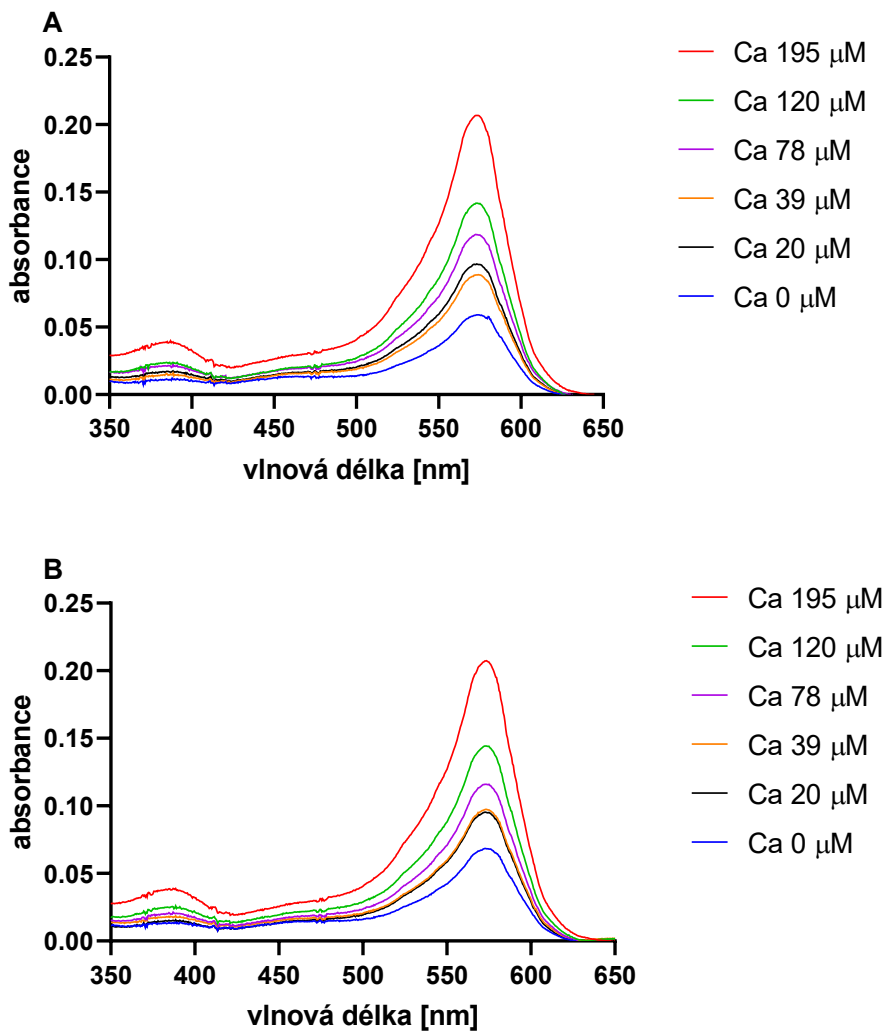
6 Výsledky

6.1 Krok I

Změny spektra indikátoru po přidavku Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů

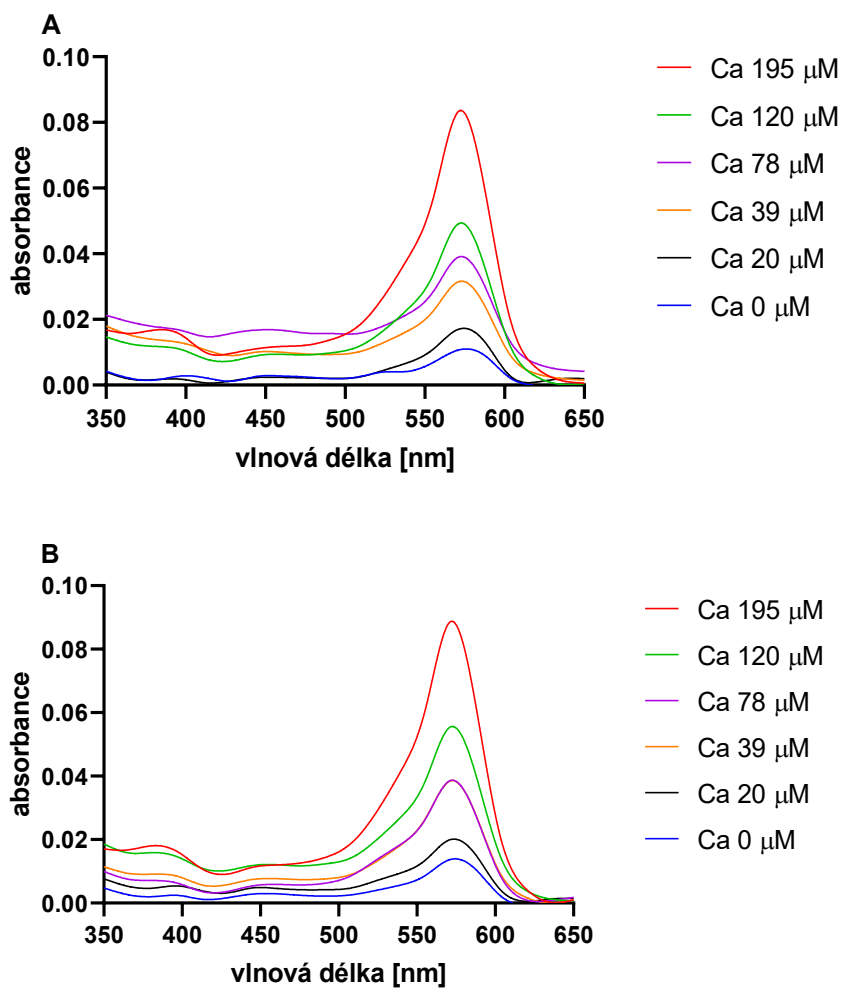
Nejdříve byla změřena spektra CC připraveného v pufru s pH 7,5 a jeho komplexů s vápenatými ionty v různých koncentracích (Obr. 6A) dle postupu v bodě 5.5. Měření bylo zopakováno po 20 minutách od prvního měření (Obr. 6B). Poté byla změřena spektra CC připraveného v methanolu s vápenatými ionty (Obr. 7A, B) a spektra CC s hořečnatými ionty (Obr. 8A, B; 9A, B). Naměřená data byla použita v následujícím kroku (6.2 Krok II).

Z naměřených výsledků je patrné, že s narůstající koncentrací iontů vápníku nebo hořčíku stoupá absorbance daného komplexu. V porovnání mezi roztoky připravenými přímo v pufru a methanolu je také vidět, že roztok indikátoru v pufru je výhodnější než roztok v methanolu, protože je absorbance komplexu s vápníkem zhruba 2x vyšší (Obr. 6 vs. Obr. 7). U hořčíku je ten rozdíl absorbancí dokonce cca 3x vyšší (Obr. 8 vs. Obr. 9). Při porovnání jednotlivých kationtů je vidět, že metodika bude mít za použití roztoku indikátoru v pufru cca o 50% vyšší citlivost u hořčíku v porovnání s vápníkem (Obr. 6 vs. Obr. 8). Při použití indikátoru rozpuštěného v metanolu nebyly rozdíly mezi oběma kationy patrné (Obr. 7 a 9). Navíc v tomto případě dokonce u hořčíku nebyla absorbance stabilní vzhledem k tomu, že byl pozorován pokles po 20 minutách (Obr. 9A vs. 9B).



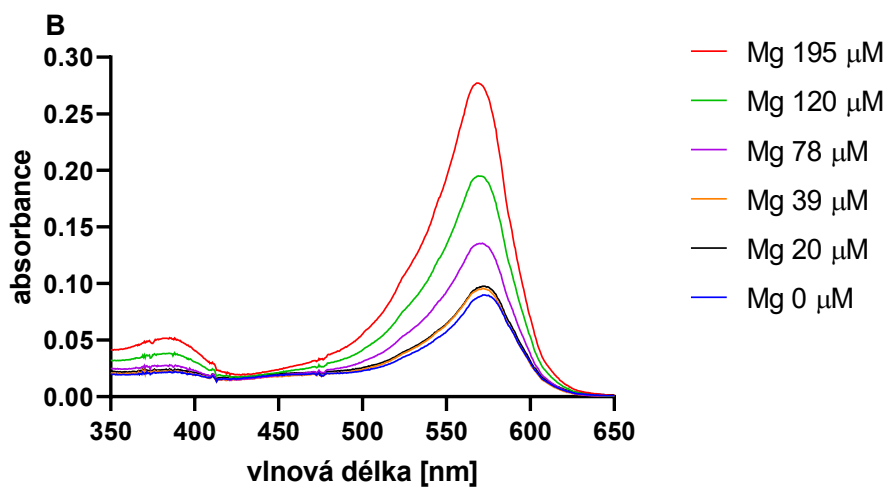
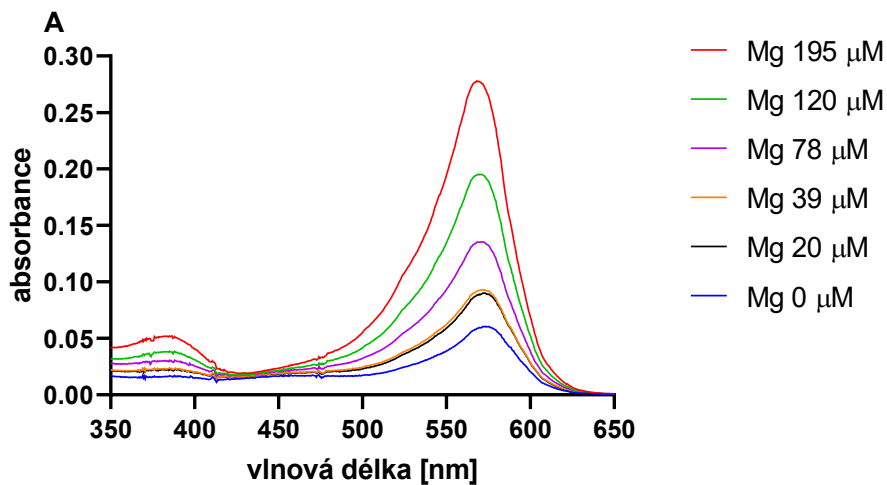
Obrázek 6. Okamžité spektrum samotného indikátoru CC rozpuštěného v pufru o pH 7,5 a jeho komplexu s vápenatými ionty (A) a spektrum po 20 minutách (B).

Barevně jsou znázorněny finální koncentrace vápenatých iontů od 20 do 195 μM . Finální koncentrace CC připraveného v pufru s pH 7,5 byla vždy 450 μM .

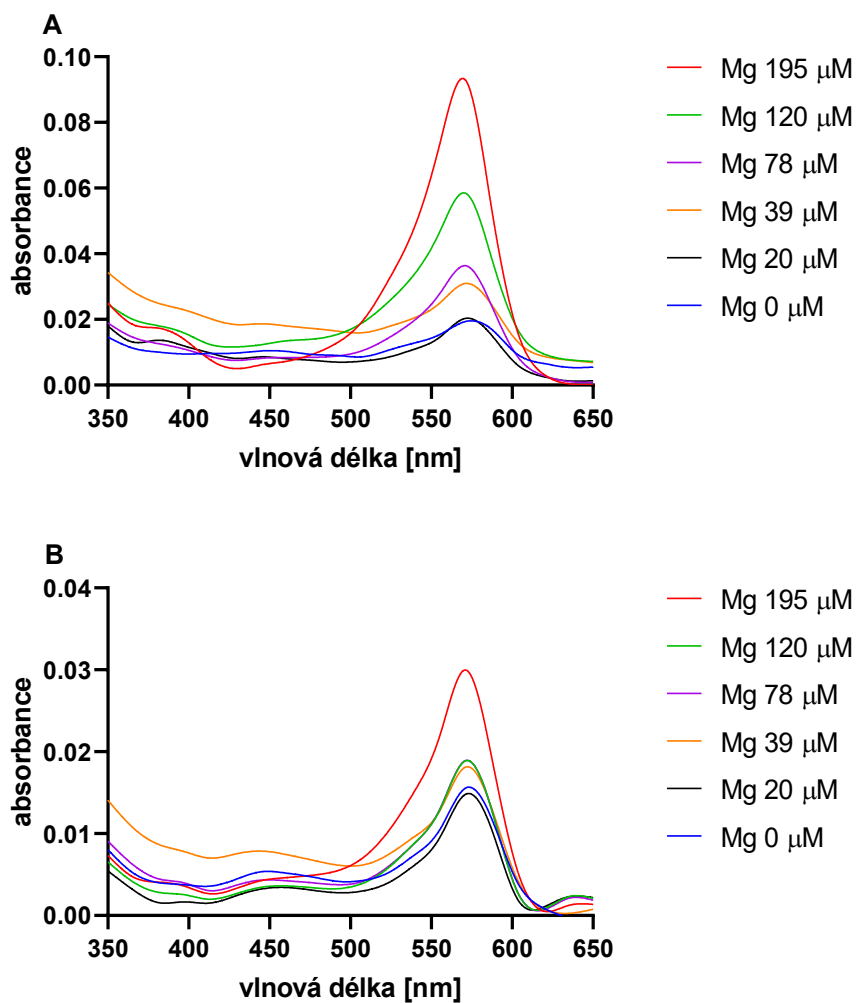


Obrázek 7. Okamžité spektrum samotného indikátoru CC rozpuštěného v methanolu a jeho komplexu s vápenatými ionty (A) a spektrum po 20 minutách (B).

Barevně jsou znázorněny finální koncentrace vápenatých iontů od 20 do 195 μM . Finální koncentrace CC připraveného v methanolu byla vždy 450 μM .



Obrázek 8. Okamžité spektrum samotného indikátoru CC rozpuštěného v pufru o pH 7,5 a jeho komplexu s hořečnatými ionty (A) a spektrum po 20 minutách (B). Barevně jsou znázorněny finální koncentrace hořečnatých iontů od 20 do 195 μM . Finální koncentrace CC připraveného v pufru s pH 7.5 byla vždy 450 μM .



Obrázek 9. Okamžité spektrum samotného indikátoru CC rozpuštěného v methanolu a jeho komplexu s hořečnatými ionty (A) a spektrum po 20 minutách (B).

Barevně jsou znázorněny finální koncentrace hořečnatých iontů od 20 do 195 μM . Finální koncentrace CC připraveného v methanolu byla vždy 450 μM .

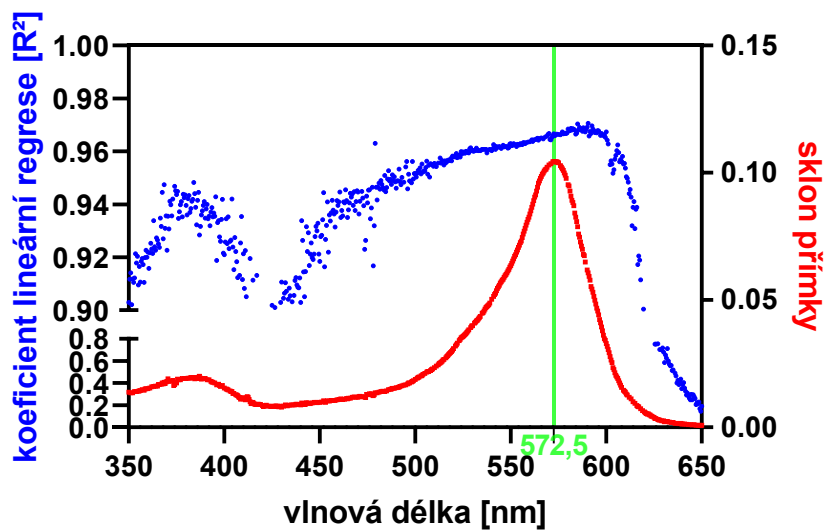
6.2 Krok II

Nalezení optimální vlnové délky pro stanovení koncentrace Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů

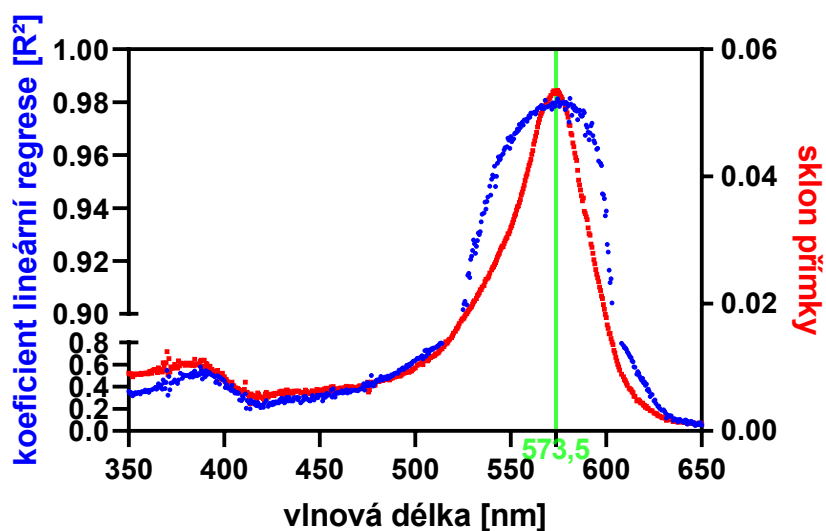
Dle postupu 5.5 byla ověřena lineární závislost mezi koncentrací vápenatých i hořečnatých iontů a absorbancí pro všechny vlnové délky. V závislosti na koeficientu lineární regrese R^2 (Tab. 2) byly zaznamenány optimální vlnové délky, při kterých je závislost koncentrace vápenatých a hořečnatých iontů na absorbanci neoptimálnější. Nalezené optimální vlnové délky jsou zaznamenány a barevně vyznačeny i v grafech (Obr. 10-13), kde jsou znázorněny koeficienty lineární regrese (levá osa y) a sklony přímků (pravá osa y) při vlnových délkách od 350 do 650 nm.

Tabulka 2. Shrnutí optimálních vlnových délek dle koeficientu lineární regrese R^2

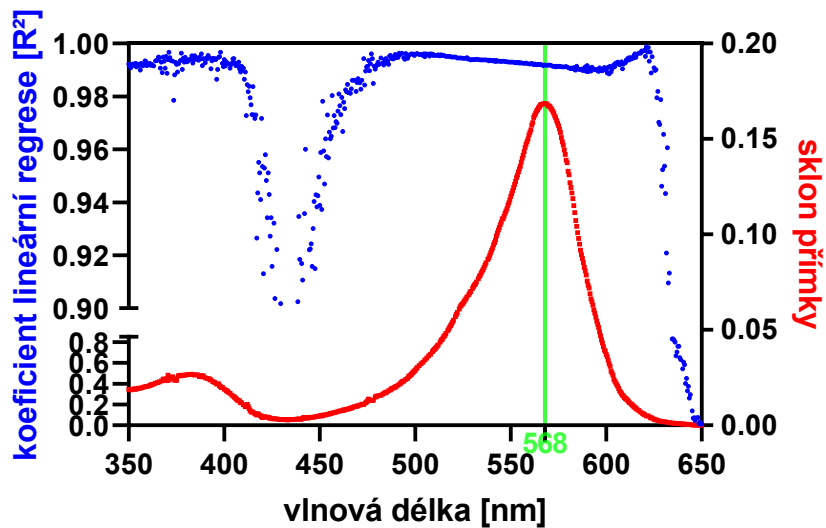
Komplex (indikátor a iont)	Optimální vlnová délka
CC v pufru s pH 7.5 + Ca^{2+}	572,5 nm
CC v methanolu + Ca^{2+}	573,5 nm
CC v pufru s pH 7.5 + Mg^{2+}	568 nm
CC v methanolu + Mg^{2+}	566,5 nm



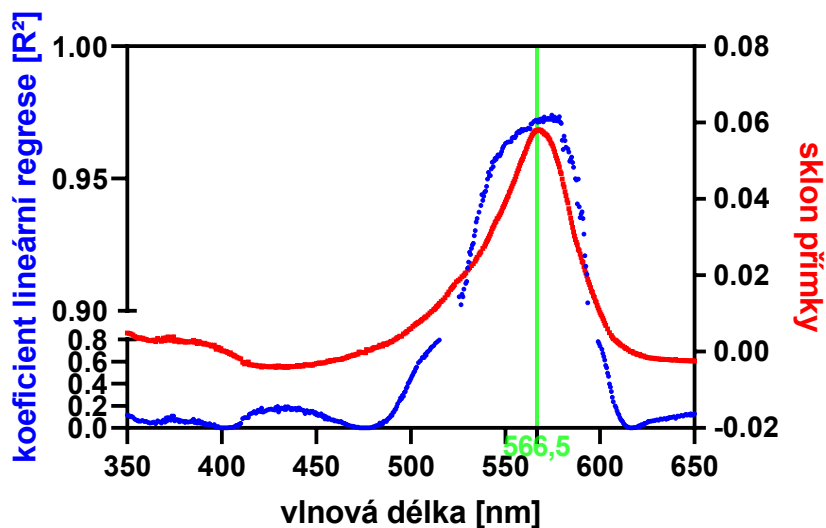
Obrázek 10. Závislost koeficientu lineární regrese a sklonu přímky na vlnové délce pro komplex CC v pufru s pH 7,5 s vápenatými ionty.



Obrázek 11. Závislost koeficientu lineární regrese a sklonu přímky na vlnové délce pro komplex CC v methanolu s vápenatými ionty.



Obrázek 12. Závislost koeficientu lineární regrese a sklonu přímky na vlnové délce pro komplex CC v pufru s pH 7,5 s hořečnatými ionty.

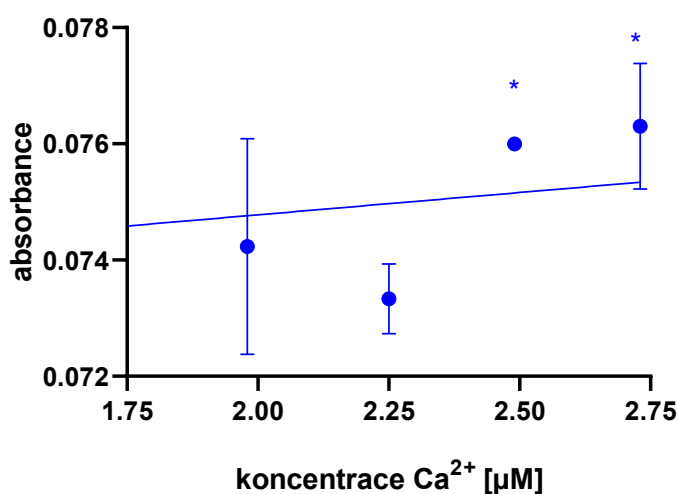


Obrázek 13. Závislost koeficientu lineární regrese a sklonu přímky na vlnové délce pro komplex CC v methanolu s hořečnatými ionty.

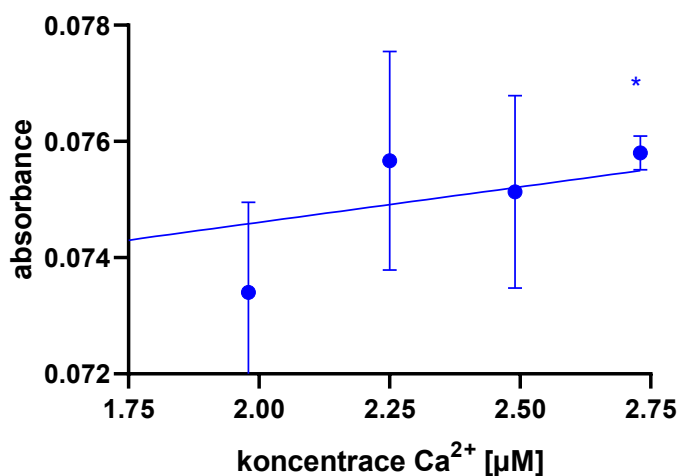
6.3 Krok III

Zjištění citlivosti metodiky

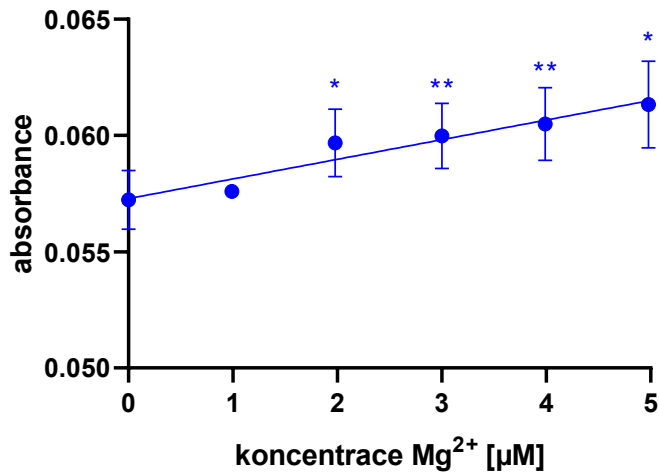
Citlivost metodiky byla stanovena dle postupu v bodě 5.7. Nejnižší koncentrace vápenatých iontů, která byla detekovatelná CC byla 2,5 μM (Obr. 14). V měření provedeném po 20 minutách tato citlivost klesla na 2,7 μM (Obr. 15). U hořečnatých iontů byla stanovena citlivost již u koncentrace 2,0 μM (Obr. 16). Citlivost měření se ale po 20 minutách opět snížila a byla 3 μM (Obr. 17).



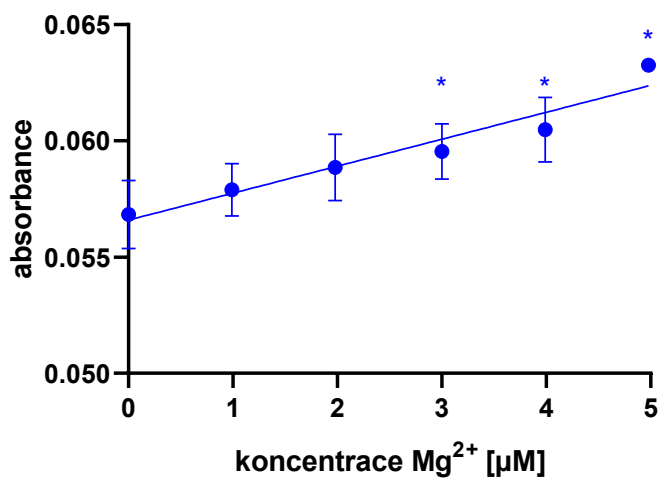
Obrázek 14. Závislost absorbance na koncentraci vápenatých iontů při 572,5 nm. * $p < 0,05$ vs. negativní slepý vzorek bez přítomnosti iontů vápníku.



Obrázek 15. Závislost absorbance na koncentraci vápenatých iontů při 572,5 nm po 20 minutách. * $p < 0,05$ vs. negativní slepý vzorek bez přítomnosti iontů vápníku.



Obrázek 16. Závislost absorbance na koncentraci hořečnatých iontů při 567 nm. ** p < 0,01 a * p < 0,05 vs. negativní slepý vzorek bez přítomnosti iontů hořčíku.

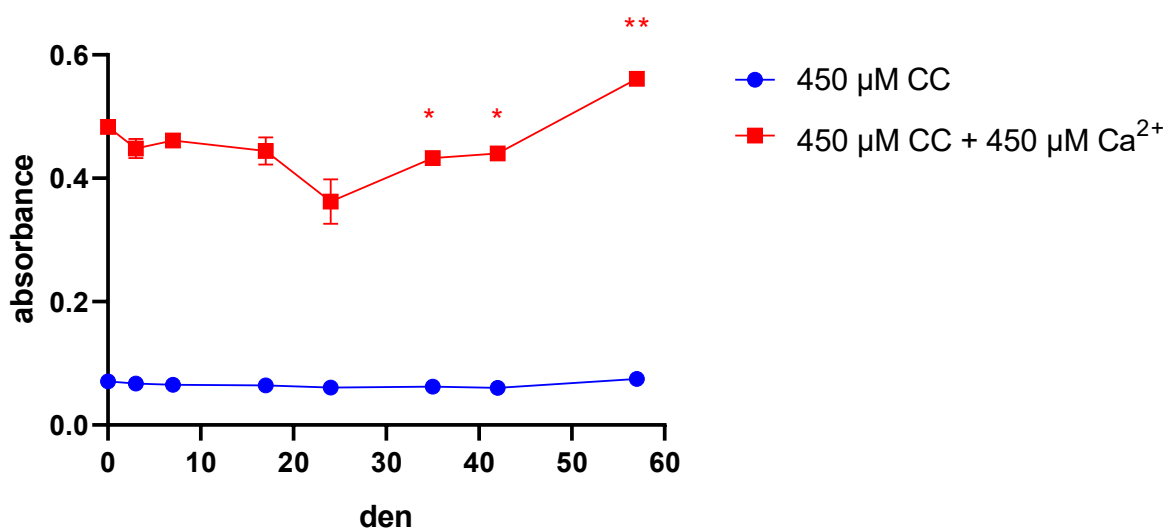


Obrázek 17. Závislost absorbance na koncentraci hořečnatých iontů při 567 nm po 20 minutách. * p < 0,05 vs. negativní slepý vzorek bez přítomnosti iontů hořčíku.

6.4 Krok IV

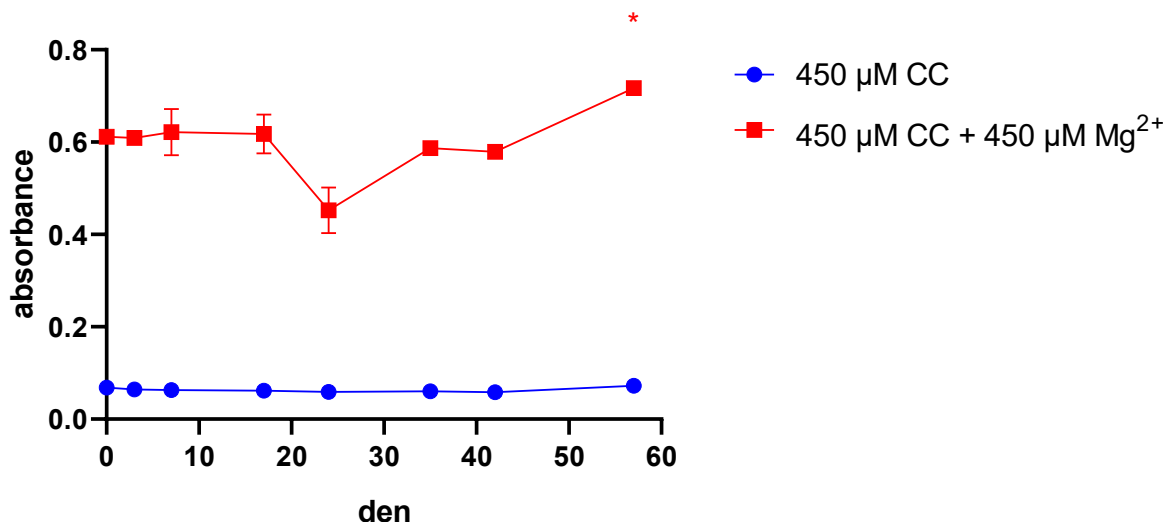
Stabilita reagensů

Stabilita indikátoru CC a jeho schopnosti tvořit komplex s vápenatými i hořečnatými ionty byla ověřena dle postupu v bodě 5.8. Komplex CC připravený v pufru s pH 7,5 s oběma ionty je stabilní nejméně 24 dní a komplex CC připravený v methanolu s oběma ionty je stabilní nejméně 39 dní (Obr. 18-21).



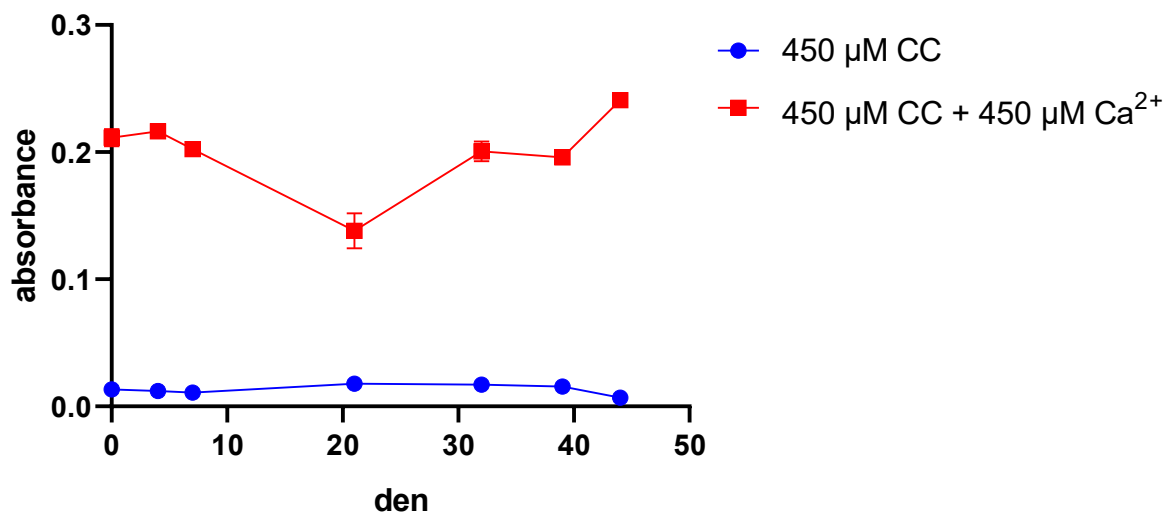
Obrázek 18. Stabilita indikátoru a jeho komplexu s vápníkem měřená pomocí absorbance v čase.

CC rozpuštěný v pufru o pH 7,5 a jeho komplex měly finální koncentrace: CC 450 μM a vápenaté ionty 450 μM. Měření proběhlo při vlnové délce 572,5 nm. ** p < 0,01 a * p < 0,05 proti měření v čase 0.



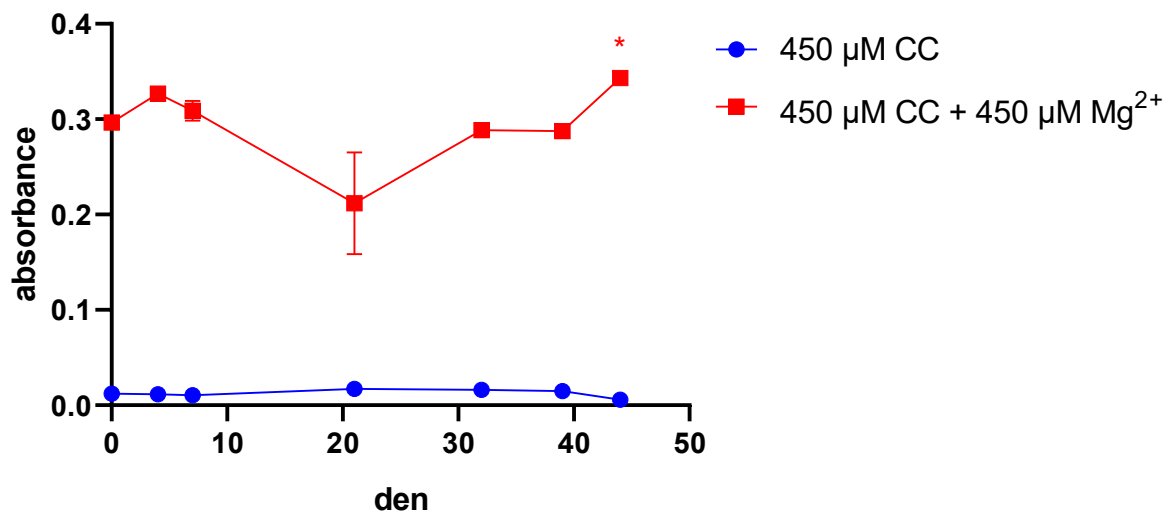
Obrázek 19. Stabilita indikátoru a jeho komplexu s hořčíkem měřená pomocí absorbance v čase.

CC rozpuštěný v pufru o pH 7,5 a jeho komplex měly finální koncentrace: CC 450 μM a hořečnaté ionty 450 μM. Měření proběhlo při vlnové délce 568 nm. * p < 0,05 proti měření v čase 0.



Obrázek 20. Stabilita indikátoru a jeho komplexu s vápníkem měřená pomocí absorbance v čase.

CC rozpuštěný v methanolu a jeho komplex měly finální koncentrace: CC 450 μM a vápenaté ionty 450 μM. Měření proběhlo při vlnové délce 573,5 nm.



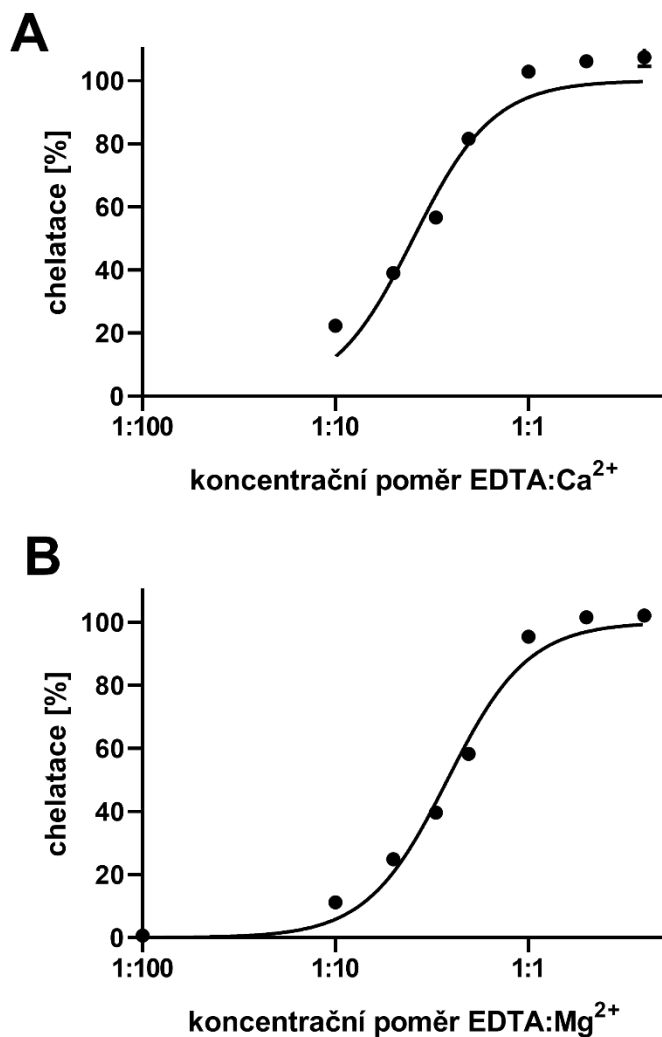
Obrázek 21. Stabilita indikátoru a jeho komplexu s hořčíkem měřená pomocí absorbance v čase.

CC rozpuštěný v methanolu a jeho komplex měly finální koncentrace: CC 450 μM a hořečnaté ionty 450 μM. Měření proběhlo při vlnové délce 566,5 nm. * p <0,05 proti měření v čase 0

6.5 Krok V

Potvrzení metodiky na účinném chelátoru EDTA

Metodika byla ověřena dle postupu v bodě 5.9. U sloučeniny EDTA s oběma ionty je patrná tvorba komplexů v poměru 1:1. Vyplývá to z grafů, kde při poměru 1:1 byly prakticky všechny vápenaté i hořečnaté ionty (Obr. 22).



Obrázek 22. Chelatace vápenatých (A) a hořečnatých (B) iontů EDTA při vlnové délce 573 a 566,5 nm, respektive. Finální koncentrace dvojmocných iontů byla 375 μM .

7 Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout novou screeningovou metodu pro stanovení míry chelatace vápenatých a hořečnatých iontů. Tato nová metodika může být využita pro zjišťování interakce xenobiotik s vápenatými nebo hořečnatými ionty v lidském organismu. Taková interakce může negativně ovlivnit hospodaření s těmito kationty a může být spojena se vznikem nežádoucích účinků.

Nejdříve byl zvolen vhodný indikátor pro stanovení sérové koncentrace iontů kovů alkalických zemin. Byl vybrán CC, který je široce používán pro kolorimetrická měření (*Corns a Ludman 1987*). Mezi další používané indikátory patří i arzenaso III nebo thymolphtalein (*Benamor a Aguerssif 2008*). Při práci se indikátor osvědčil, protože při měření došlo k jasné změně absorbance komplexu indikátoru s oběma ionty. Měření proběhlo v rozsahu vlnových délek od 200 nm po 800 nm. Bylo zjištěno, že k absorpci dochází v oblasti 350-650 nm, a proto se dále pokračovalo v měření v tomto rozsahu. Matematickým stanovením došlo k upřesnění vlnových délek, které byly optimální pro naše měření. Absorpční maxima byla při 572,5 a 573,5 nm pro vápník v případě roztoku indikátoru v pufru o pH 7,5 a methanolu. Analogické výsledky pro hořčík byly 568 a 566,5 nm. Zajímavé bylo, že nedošlo ke změně spektra, tj. posunu maxima vlnových délek, jen přidavek testovaného dvojmocného kovu vedl k lineárně závislému zvýšení absorbance ve výše zmíněných maximech. Je možné, že nelze plně odstranit dvojmocné kationy z materiálu používaného k měření a tyto zbylé kovové ionty vedou k malé měřitelné absorbanci testovaného indikátoru (0,01-0,05). Z důvodu COVIDu nebylo možné toto ověřit, například změřením spektra samotného indikátoru v přítomnosti silného chelátoru jako EDTA. V každém případě nešlo o limitaci metodiky a bylo možné pokračovat dalšími kroky podobně jako u standardizace jiných metodik vyvinutých skupinou založených na stanovení nezchelatovaných iontů pomocí vhodného indikátoru (*Catapano et al. 2018*).

Pokračovalo se stanovením citlivosti, tedy zjištění nejnižší koncentrace kovu, která lze ze statistického hlediska detekovat. Původně se začínalo s vyššími koncentracemi vápníku. Protože se citlivost projevila u nejnižší koncentrace, byly koncentrace vápníku ještě sníženy. Na základě získaných poznatků z předchozího měření jsme začali měření s nižšími koncentracemi hořčíku. Citlivost se měřila i po 15 minutách, což bylo použito k ověření stability. Pro hořčík byla v důsledku vyšší absorbance jeho

komplexu s indikátorem očekávaná lepší citlivost, měření ale ukázala, že citlivost pro vápník je podobná jako u hořčíku.

Cílem práce bylo také zjistit také stabilitu reagensů. Stabilita reagensů je výhodná z ekonomických i časových důvodů, protože není nutné neustále připravovat nové roztoky reagensů. Porovnáním a sledováním závislosti mezi staršími roztoky reagensů s roztoky připravených v den experimentu bylo zjištěno, že nedošlo ke změnám absorbancí, a tím ani ke změně chelatačních vlastností, a tudíž je možné říct, že roztoky reagensů jsou stabilní po dobu nejméně 24 dní pro indikátor v pufru o pH 7,5 a nejméně 39 dní pro indikátor v methanolu. Měření stability probíhalo kontinuálně, alespoň jednou týdně po dobu experimentu. Komplex CC připravený v pufru s pH 7,5 s oběma ionty je stabilní nejméně 24 dní a komplex CC připravený v methanolu s oběma ionty je stabilní nejméně 39 dní.

V posledním kroku byla metoda ověřena na známém chelátoru, EDTA, respektive na její disodné soli. EDTA je známý neselektivní chelátor tvořící spolu s kovy komplexy se stechiometrií 1:1 (*Catapano et al. 2018, Hafer et al. 2020, Říha et al. 2013*). Z výsledků (Obr. 22) je patrné, že se skutečně podařilo tuto stechiometrii potvrdit. V tomto poměru bylo chelatováno přibližně 100 % iontů vápníku i hořčíku. Do budoucna by bylo vhodné ověřit metodiku i na jiných známých chelátorech. Například dexrazoxan a jeho metabolit ADR-925 (*Hasinoff et al. 2003*). Dexrazoxan se *in vivo* konvertuje na chelátor typu EDTA (*Kontoghiorghes a Kontoghiorghe 2020*) a velmi podobnou afinitou jakou má k iontům železa, může chelatovat i vápník (*Zatloukalová et al. 2012*). ADR-925 váže vápník a hořčík s formační konstantou $10^{6.9}$ a $10^{5.1} \text{ M}^{-1}$ *in vivo* (*Hasinoff et al. 2003*).

Existuje více metod pro detekci kovů a tyto metody byly popsány v kapitole (3.7). Některé metodiky jako atomová absorpční spektrofotometrie a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem jsou sice velmi citlivé, ale jsou také finančně náročné z hlediska přístrojového vybavení, a navíc detekují celkové množství kovu. Jsou tedy pro naše účely nepoužitelné. V naší práci bylo důležité detekovat volné ionty a to přesnou, rychlou a levnou metodikou. Spektrofotometrické metody tyto požadavky splňují a jsou široce využívány (*Říha et al. 2013*).

8 Závěr

Závěrem lze konstatovat, že stanovený cíl této diplomové práce byl splněn. Díky jednotlivým krokům se podařilo připravit metodiku pro zjištění míry chelatace iontů vápníku a hořčíku. Metodika je rychlá, levná a přesná.

Dle koeficientu lineární regrese byly nalezeny optimální vlnové délky 572,5; 573,5 nm pro vápník a 568; 566,5 nm pro hořčík podle použitého rozpouštědla. Citlivost indikátoru je nepatrně lepší pro hořčík, ale nejnižší detekovatelné množství je u obou dvojmocných iontů víceméně stejné. Stabilita indikátoru v methanolu je minimálně 39 dní naproti jeho stabilitě v pufru o pH 7,5. Metodika byla také ověřena na účinném známém chelátoru EDTA. Oba kationty s ním tvořily komplexy v poměru 1:1, jak odpovídá i dostupné literatuře.

9 Reference

- 1) Aaseth J, Skaug MA, Cao Y, Andersen O. Chelation in metal intoxication— Principles and paradigms. *J Trace Elem Med Biol* 2015;31:260-266.
- 2) Anderegg G, Flaschka H, Sallmann R, Schwarzenbach G. Metallindikatoren VII. Ein auf Erdalkaliionen ansprechendes Phtalein und seine analytische Verwendung. *HCA* 1954;37(1):113-120.
- 3) de Armas G, Cladera A, Becerra E, Estela JM, Cerdà V. Fluorimetric sequential injection determination of magnesium using 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid in a micellar medium. *Talanta* 2000;52(1):77-82.
- 4) Arslan P, Di Virgilio F, Beltrame M, Tsien RY, Pozzan T. Cytosolic Ca²⁺ homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca²⁺. *J Biol Chem* 1985;260(5):2719-2727.
- 5) Benamor M, Aguerssif N. Simultaneous determination of calcium and magnesium by derivative spectrophotometry in pharmaceutical products. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2008;69(2):676-681.
- 6) Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10(7):1257-1272.
- 7) Bo S. et al. Dietary magnesium and fiber intakes and inflammatory and metabolic indicators in middle-aged subjects from a population-based cohort. *Am J Clin Nutr* 2006;84(5):1062-1069.
- 8) Cascella M, Vaqar S. Hypermagnesemia. StatPearls Publishing: Treasure Island (Florida), ebook, přístup k datům z 16.1.2021
- 9) Catapano MC, Tvrdý V, Karlíčková J, Mercolini L, Mladěnka P. A simple, cheap but reliable method for evaluation of zinc chelating properties. *Bioorg Chem* 2018;77:287-292.
- 10) Cooper MS, Gittoes NJ. Diagnosis and management of hypocalcaemia. *BMJ* 2008;336(7656):1298-1302.
- 11) Corns CM, Ludman CJ. Some observations on the nature of the calcium-cresolphthalein complexone reaction and its relevance to the clinical laboratory. *Ann Clin Biochem* 1987;24:345-351.
- 12) Costello R, Wallace TC, Rosanoff A. Magnesium. *Adv Nutr* 2016a;7(1):199-201.

- 13) Costello RB. et al. Perspective: The Case for an Evidence-Based Reference Interval for Serum Magnesium: The Time Has Come. *Adv Nutr* 2016b;7(6):977-993.
- 14) Dibaba DT, Xun P, Fly AD, Yokota K, He K. Dietary magnesium intake and risk of metabolic syndrome: a meta-analysis. *Diabet Med* 2014;31(11):1301-1309.
- 15) Ferrè S, Hoenderop JG, Bindels RJ. Sensing mechanisms involved in Ca²⁺ and Mg²⁺ homeostasis. *Kidney Int* 2012;82(11):1157-1166.
- 16) Fine KD, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J Clin Invest* 1991;88(2):396-402.
- 17) Finnegan S, Percival SL. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015;4(7):415-421
- 18) Fuszek P. et al. Relationship between serum calcium and CA 19-9 levels in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10(13):1890-1892.
- 19) Ghazali S, Barratt TM. Urinary excretion of calcium and magnesium in children. *Arch Dis Child* 1974;49(2):97-101.
- 20) Goltzman D. Approach to Hypercalcemia. MDText.com: South Dartmouth (, Massachusetts): ebook, přístup k datům z 19.10.2019
- 21) Goyal A, Singh S. Hypocalcemia. StatPearls Publishing; Treasure Island (Florida), ebook, přístup k datům z 22.6.2020
- 22) Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients* 2015;7(9):8199-8226.
- 23) Hafer E, Holzgrabe U, Kraus K, Adams K, Hook JM, Diehl B. Qualitative and quantitative ¹H NMR spectroscopy for determination of divalent metal cation concentration in model salt solutions, food supplements, and pharmaceutical products by using EDTA as chelating agent. *Magn Reson Chem* 2020;58(7):653-665.
- 24) Hasinoff BB, Schroeder PE, Patel D. The metabolites of the cardioprotective drug dexrazoxane do not protect myocytes from doxorubicin-induced cytotoxicity. *Mol Pharmacol* 2003;64(3):670-678.
- 25) Holm NG. The significance of Mg in prebiotic geochemistry. *Geobiology* 2012;10(4):269-279.
- 26) Kim JJ, Kim YS, Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *J Trace Elem Med Biol* 2019;54:226-231.

- 27) Kontoghiorghes GJ, Kontoghiorghes CN. Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases. *Cells* 2020;9(6):1456.
- 28) Lorentz K. Improved determination of serum calcium with 2-cresolphthalein complexone. *Clin Chim Acta* 1982;126(3):327-334.
- 29) Luo H. et al. Hypomagnesemia predicts postoperative biochemical hypocalcemia after thyroidectomy. *BMC Surg* 2017;17(1):62.
- 30) National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. LiverToxChelating Agents. Přístup k datům z 23.1.2017
- 31) Maclean KH, Cleveland JL, Porter JB. Cellular zinc content is a major determinant of iron chelator-induced apoptosis of thymocytes. *Blood* 2001;98(13):3831-3839.
- 32) Pak CY. et al. Defining hypercalciuria in nephrolithiasis. *Kidney Int* 2011;80(7):777-782.
- 33) Palacios C. et al. Magnesium retention from metabolic-balance studies in female adolescents: impact of race, dietary salt, and calcium. *Am J Clin Nutr* 2013;97(5):1014-1019.
- 34) Peacock M. Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5(1):23-30.
- 35) Pham PC, Pham PA, Pham SV, Pham PT, Pham PM, Pham PT. Hypomagnesemia: a clinical perspective. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2014;7:219-230.
- 36) Robertson WG, Marshall RW, Bowers GN. Ionized Calcium in body fluids. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 2008;15(2):85-125.
- 37) Říha M, Karličková J, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *J Inorg Biochem* 2013;123:80-87.
- 38) Sarkar BC, Chauhan UP. A new method for determining micro quantities of calcium in biological materials. *Anal Biochem* 1967;20(1):155-166.
- 39) Saurina J, López-Aviles E, Le Moal A, Hernández-Cassou S. Determination of calcium and total hardness in natural waters using a potentiometric sensor array. *Anal Chim Acta* 2002;464(1):89-98.

- 40) Shumaker DK, Vann LR, Goldberg MW, Allen TD, Wilson KL. TPEN, a Zn²⁺/Fe²⁺ chelator with low affinity for Ca²⁺, inhibits lamin assembly, destabilizes nuclear architecture and may independently protect nuclei from apoptosis in vitro. *Cell Calcium* 1998;23(2-3):151-164
- 41) Schafer AL, Shoback DM. Hypocalcemia: Diagnosis and Treatment. MDText.com: South Dartmouth (Massachusetts): ebook, přístup k datům z 3.1.2016
- 42) Sparvoli F, Cominelli E. Seed Biofortification and Phytic Acid Reduction: A Conflict of Interest for the Plant? *Plants (Basel)* 2015;4(4):728-755.
- 43) Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev* 2003;24(2):47-66.
- 44) Tesfaldet ZO, van Staden JF, Stefan RI. Spectrophotometric determination of magnesium in pharmaceutical preparations by cost-effective sequential injection analysis. *Talanta* 2004;64(4):981-988
- 45) Walser M. Ion association. VI. Interactions between calcium, magnesium, inorganic phosphate, citrate and protein in normal human plasma. *J Clin Invest* 1961;40(4):723-730.
- 46) Wang LY, Augustine GJ. Presynaptic nanodomains: a tale of two synapses. *Front Cell Neurosci* 2015;8:455.
- 47) Wang X. et al. Dietary calcium intake and mortality risk from cardiovascular disease and all causes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC Med* 2014;12:158.
- 48) Waters RS, Bryden NA, Patterson KY, Veillon C, Anderson RA. EDTA chelation effects on urinary losses of cadmium, calcium, chromium, cobalt, copper, lead, magnesium, and zinc. *Biol Trace Elem Res* 2001;83(3):207-221.
- 49) Weaver CM, Peacock M. Calcium. *Adv Nutr* 2019;10(3):546-548.
- 50) Yu E, Sharma S. Physiology, Calcium. StatPearls Publishing; Treasure Island (Florida), ebook, přístup k datům z 20.2.2021
- 51) Yu J, Su H, Wei S, Chen F, Liu C. Calcium content mediated hemostasis of calcium-modified oxidized microporous starch. *J Biomater Sci Polym Ed* 2018;29(14):1716-1728.
- 52) Zatloukalová L. et al. Dexrazoxane provided moderate protection in a catecholamine model of severe cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90(4):473-484.