

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



HLEDÁNÍ ÚČINNÉHO CHELÁTORU KOBALTU

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2022

Karolína Nosková

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

V Hradci Králové dne

Karolína Nosková

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za laskavou a odbornou pomoc a cenné rady při tvorbě této diplomové práce. Dík patří také Mgr. Monice Moravcové za trpělivost a ochotu poradit a pomoci při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji také své rodině a přátelům za to, že mi po celou dobu studia byli oporou.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Karolína Nosková

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

Konzultantka: Mgr. Monika Moravcová

Název diplomové práce: Hledání účinného chelátoru kobaltu

Kobalt je jako součást vitamínu B₁₂ esenciálním prvkem pro lidský organismus. Dlouhodobá expozice vysokým dávkám však vede k toxicitě. Chronická intoxikace kobaltem je v současné době pozorována nejčastěji po implantaci umělých kloubních náhrad s obsahem kobaltu, které v některých případech neplní svou funkci a kobalt se z nich vylučuje mechanickým třením nebo korozí. To vede nejen k lokální reakci, ale ionty kobaltu pronikají také do krevní a lymfatické cirkulace, a tím způsobují reakci systémovou. Intoxikace se pak projevuje neurologickými, kardiovaskulárními a endokrinními symptomy, které mohou vést k ireverzibilním změnám nebo až ke smrti. Chelátor, který by byl schopen kobalt účinně a selektivně vychytat a intoxikaci tak efektivně léčit, však není v klinické praxi dostupný.

Cílem této diplomové práce bylo hledání účinného chelátoru kobaltu mezi známými chelátory jiných kovů. Chelatace byla měřena *in vitro* metodou založenou na spektrofotometrické detekci nezchelatovaných iontů kobaltu při různých pH od 4,5 do 7,5.

Celkem bylo hodnoceno 14 potencionálních chelátorů: ammonium tetrathiomolybdát (ATTM), bathokuproin, ciklopirox, deferipron, deferoxamin, dexrazoxan a jeho aktivní metabolit ADR-925, dithizon, kyselina diethylenetriaminpentaoctová (DTPA), kyselina egtazová (EGTA), ferrozín, *o*-kresolftalein komplexon (CPC), pyridoxal isonikotinoyl hydrázon (PIH) a salicylaldehyd isonikotinoyl hydrázon (SIH). Všechny látky prokázaly alespoň v některých prostředích určitou míru chelatace. Nejvíce účinnými látkami v celém rozmezí pH byly DTPA a ADR-925, vysokou účinnost měly také ATTM, SIH, PIH a mimo pH 4,5 dithizon. Středně účinné byly dále ferrozín a CPC. Při pH 4,5 měla dobrou účinnost také EGTA.

Závěrem lze říci, že byly objeveny látky schopné účinně vychytávat kobaltnaté ionty, a tedy i potencionální klinicky použitelné chelátory kobaltu. Nejvyšší potenciál mají pravděpodobně DTPA a ADR-925. V dalším kroku bude potřeba ověřit jejich selektivitu a bezpečnost.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Karolína Nosková

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

Consultant: Monika Moravcová, MSc.

Title of diploma thesis: Search for an efficient cobalt chelator

Cobalt, as part of vitamin B₁₂, is an essential trace element for human organism. However, long-term exposure to high doses leads to toxicity. Chronic cobalt intoxication is currently most commonly observed after the implantation of cobalt-containing prostheses, which in some cases do not work properly and cobalt is released from them by mechanical friction or corrosion. That not only leads to a local reaction, but cobalt ions also enter the blood and lymphatic circulation and thus cause a systemic reaction. The intoxication is then manifested by neurological, cardiovascular and endocrine symptoms, which can lead to irreversible changes or even to the death. However, a chelator that would be able to effectively and selectively bind cobalt and thus effectively treat intoxication is not available in clinical practice.

The aim of this thesis was a search for an efficient cobalt chelator among known metal chelators. Chelation was measured *in vitro* by a method based on spectrophotometric detection of unchelated cobalt ions at different pH levels ranging from 4.5 to 7.5.

A total of 14 potential chelators were determined: ammonium tetrathiomolybdate (ATTM), bathocuproine, ciclopirox, deferiprone, deferoxamine, dexrazoxane and its metabolite ADR-925, dithizone, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), egtazic acid (EGTA), ferrozine, *o*-cresolphthalein complexone (CPC), pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). All substances have shown some level of chelation at least under some conditions. The most active substances in the whole pH range were DTPA and ADR-925, highly effective were also ATTM, SIH, PIH and except for pH 4.5 dithizone, as well. Moderately effective were ferrozine and CPC. At pH 4.5, EGTA was also well effective.

In conclusion, substances capable of efficiently binding cobalt ions and therefore potentially clinically administrable cobalt chelators have been discovered. DTPA and ADR-925 are most likely to have the highest potential for clinical use. It will be, however, necessary to verify their selectivity and safety in future experiments.

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK	1
2	ÚVOD	3
3	TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1	KOBALT	4
3.1.1	ÚLOHA KOBALTU V ORGANISMU	4
3.1.2	FARMAKOKINETIKA KOBALTU	5
3.2	PATOFYZIOLOGIE KOBALTU	6
3.2.1	ZDROJE EXPOZICE	7
3.2.2	PŘÍZNAKY INTOXIKACE	8
3.3	CHELATACE	11
3.3.1	ATTM	12
3.3.2	CIKLOPIROX	13
3.3.3	DEFERIPRON	14
3.3.4	DEFEROXAMIN	16
3.3.5	DEXRAZOXAN	18
3.3.6	ADR-925	19
3.3.7	DTPA	20
3.3.8	EGTA	21
3.3.9	PIH	21
3.3.10	SIH	22
3.3.11	BATHOKUPROIN	23
3.3.12	DITHIZON	24
3.3.13	FERROZIN	25
3.3.14	O-KRESOLFTALEIN KOMPLEXON	25
4	CÍL PRÁCE	27

5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
5.1	MATERIÁL.....	28
5.1.1	CHEMIKÁLIE.....	28
5.1.2	PŘÍSTROJE	29
5.1.3	DALŠÍ POMŮCKY	29
5.2	METODIKA PRO TESTOVÁNÍ CHELÁTORŮ KOBALTU	29
5.2.1	PŘÍPRAVA PUFŘŮ	29
5.2.2	PŘÍPRAVA ZÁKLADNÍCH ROZTOKŮ	30
5.2.3	PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ.....	31
5.2.4	EXPERIMENTÁLNÍ STANOVENÍ CHELATACE KOBALTU.....	31
5.3	MATEMATICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	33
6	VÝSLEDKY	35
7	DISKUZE	60
8	ZÁVĚR	63
9	LITERATURA	64
9.1	ODBORNÉ ČLÁNKY	64
9.2	KNIHY	69
9.3	DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	69
9.4	INTERNETOVÉ ZDROJE.....	69

1 SEZNAM ZKRATEK

ATTM	ammonium tetrathiomolybdát
BCS	bathokuproin disulfonát (z angl. bathocuproine disulfonate)
CPC	<i>o</i> -kresolftalein komplexon (z angl. <i>o</i> -cresolphthalein complexone)
DMPS	2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonová kyselina, unithiol
DMSA	kyselina dimerkaptojantarová (z angl. dimercaptosuccinic acid)
DMSO	dimethylsulfoxid
DTPA	kyselina diethylentriaminpentaoctová, kys. pentetová (z angl. diethylenetriaminepentaacetic acid)
EDDS	ethylendiamindijantarová kyselina (z angl. ethylenediaminedisuccinic acid)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EF	ejekční frakce
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)tetraoctová, kys. egtazová (z angl. ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)tetraacetic acid)
EMA	Evropská léková agentura (z angl. European Medicines Agency)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová
ICRP	mezinárodní komise pro radiační ochranu (z angl. international commission on radiological protection)
LD ₅₀	střední smrtelná dávka (z angl. lethal dose)
MoM	implantát kov na kov (z angl. metal-on-metal)
MoP	implantát kov na polyethylen (z angl. metal-on-polyethylene)
NaHEPES	sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonové

Na ₂ NFDSA	disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové (z angl. 1- n itroso-2-naphtol-3,6- d isulfonic acid disodium salt)
PIH	p yridoxal i sonikotinoyl h ydrazon
SIH	s alicylaldehyd i sonikotinoyl h ydrazon
t _{1/2}	biologický poločas
WADA	Světová antidopingová agentura (z angl. W orld A nti- d oping A gency)

2 ÚVOD

Kobalt je chemický prvek široce zastoupený v přírodě, ale také esenciální pro správnou funkci lidského organismu. Je součástí organometalického komplexu vitamínu B₁₂, při jehož nedostatku dochází ke vzniku perniciózní anemie. Ve vyšších dávkách a při dlouhodobé expozici však působí toxicky (*Leyssens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013, Barceloux 1999*).

Kobalt přijímáme v malém množství běžně ve stravě. Ve větší míře jsou mu ale vystaveni pracovníci ve strojírenském, elektrotechnickém nebo stavebním průmyslu. V minulém století se chlorid kobaltnatý využíval v terapii anémie. Pro své erythropoézu-stimulující účinky byl v minulosti zneužíván pro doping a dnes je na seznamu zakázaných látek. S jeho použitím se můžeme setkat také v homeopatii (*Leyssens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013, Finley et al. 2013*).

Momentálně se kobalt v medicíně využívá jako hlavní složka kovových kloubních náhrad kyčle. V některých případech však může dojít po implantaci náhrady k jejímu obrousování nebo korozi. Mikročástice a ionty kobaltu se tak následně uvolňují do organismu, kde působí toxicky, a to převážně interakcí s biomolekulami nebo tvorbou reaktivních forem kyslíku. Intoxikace kobaltem se projevuje neurologickými, kardiovaskulárními a endokrinními obtížemi, které mohou mít trvalé následky, případně až zapříčinit smrt pacienta (*Leyssens et al. 2017, Finley et al. 2013, Paustenbach et al. 2013*).

Terapie intoxikace spočívá především v přerušení expozice, v případě kloubní náhrady je tedy nutné její chirurgické vyjmutí. Dalším postupem může být využití chelátorů, tedy látek, které kobalt v organismu navážou a bezpečně ho z něj vyloučí. V dnešní době bohužel neexistuje oficiální doporučený postup při intoxikaci kobaltem a nemáme dostatek informací o látkách, které by účinně a selektivně kobalt vázaly. Často se tak intoxikace léčí pouze symptomaticky nebo pomocí neselektivních chelátorů (*Flora a Pachauri 2010, Smith 2013*).

Cílem této diplomové práce je najít takové látky, které by účinně a selektivně kobalt navázaly a mohly se tak stát potenciálně klinicky využitelnými léčivými v terapii intoxikace tímto kovem.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 KOBALT

Kobalt je tvrdý, šedý, kujný, paramagnetický kov s chemickou značkou Co a elektronovou konfigurací $4s^2 3d^6$ ve valenční sféře. Patří společně s chemicky podobnými železem a niklem mezi přechodné kovy. Ve sloučeninách může kobalt dosahovat oxidačních čísel V až -I, avšak nejběžnějšími a nejstabilnějšími jsou oxidační stavy II a III. Oxidační stav II je zastoupen hlavně v nekomplexních sloučeninách, zatímco oxidační stav III je častější ve sloučeninách koordinačních. Přestože se jedná o relativně vzácný prvek, jeho zastoupení v přírodě je vcelku časté, především ve formě arsenidů, oxidů nebo sulfidů, vyskytujících se v minerálech jako je například kobaltin, safflorit, smaltit nebo erytrín (*Klikorka et al. 1989, Paustenbach et al. 2013, Leyssens et al. 2017, Barceloux 1999*).

Historicky se sloučeniny kobaltu využívaly již ve starověkém Egyptě a Persii jako modré barvivo na porcelán, sklo nebo šperky. První izolaci kobaltu provedl v 18. století švédský chemik George Brandt a jako chemický prvek ho poprvé popsal v roce 1780 Torbern Olaf Bergman. Ve 20. století se začal kobalt využívat v průmyslu. Kobalt je feromagnetický, stal se tak složkou první permanentně magnetické slitiny a na konci 20. století se začal využívat do elektrických a elektronických zařízení. Na medicínském poli byl využíván ve 40. letech 20. století pro léčbu anémie a později také jako materiál kloubních náhrad. V dnešní době se kobalt využívá především jako příměs do slitin pro počítačový a strojní průmysl (*Barceloux 1999, Paustenbach et al. 2013*).

3.1.1 ÚLOHA KOBALTU V ORGANISMU

Kobalt je stopový prvek nezbytný pro správnou funkci živých organismů jako součást organometalického komplexu vitamínu B₁₂ neboli kyanokobalaminu. Vitamin B₁₂ katalyzuje některé biologické reakce. Klíčové je jeho propojení s kyselinou listovou, kdy se podílí na syntéze methioninu, ale také tymidylátu a purinů. Je tedy důležitý, mimo jiné, pro správnou funkci a tvorbu červených krvinek, stimuluje tvorbu hemoglobinu a jeho nedostatek vede ke vzniku perniciozní anémie. Kromě toho je také nutný pro správnou funkci methylmalonyl-koenzym A-mutázy (*Leyssens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013, Barceloux 1999*).

Nejsou známy další lidské molekuly vyžadující kobalt. Kobalt je tedy esenciální v malých dávkách, ale vysoké dávky jsou považovány za toxické pro člověka a životní prostředí, především při dlouhodobé expozici (*Leyssens et al. 2017*).

3.1.2 FARMAKOKINETIKA KOBALTU

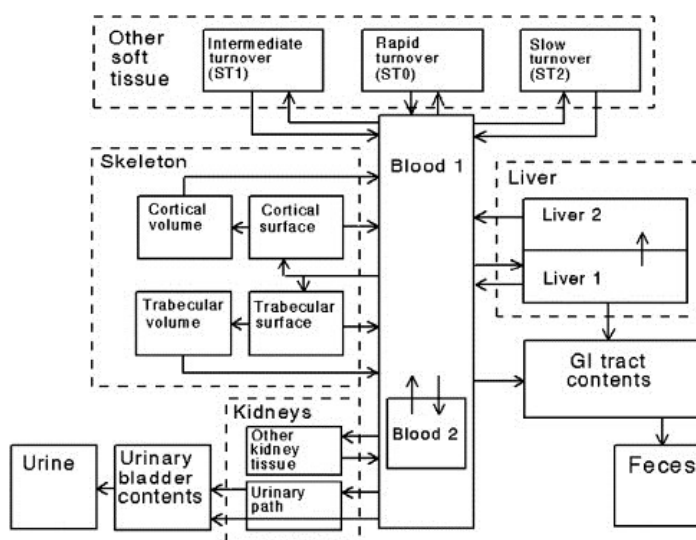
Biologická dostupnost kobaltu a jeho sloučenin po perorálním podání je průměrně 25 % s velmi výraznou inter-individuální variabilitou dosahující 5 až 97 %. Ke vstřebávání dochází v proximálním jejunu, nezávisle na oxidačním stavu kobaltu. Rozsah absorpce je ovlivněn několika faktory: velikostí dávky, rozpustností a individualitou jedince. Zatímco s vyšší dávkou se přenašeč saturuje a absorpce klesá, vyšší rozpustnost sloučeniny ve vodě absorpci zvyšuje. Vliv má také výživa jedince: aminokyseliny a proteiny tvoří s kobaltem nevstřebatelné komplexy. Naopak hladovění, anemické stavy nebo nedostatek železa absorpci zvyšují, pravděpodobně vlivem podobnosti přenašečů železa a kobaltu. Ke vstřebání celého komplexu vitamínu B₁₂ je nutná přítomnost tzv. intrinsic faktoru (česky překládáno jako vnitřní faktor) v žaludku. Jedná se o odlišnou cestu absorpce, než podstupuje anorganická forma kobaltu (*Paustenbach et al. 2013, Leyssens et al. 2017, Barceloux 1999*).

Kobalt je v organismu distribuován především do plné krve (respektive hlavně séra), srdce, ledvin, jater a sleziny. Nižší koncentrace najdeme také ve vlasech, lymfě, kostech, slinivce a v mozku. S vyšším věkem nedochází ke kumulaci. Celkový obsah kobaltu v lidském organismu je běžně kolem 1,1 mg, z toho asi 85 % je součástí vitamínu B₁₂ (*Paustenbach et al. 2013, Leyssens et al. 2017*).

Absorbovaný kobalt je vylučován z organismu především ledvinami, naopak neabsorbovaná část perorálně podané dávky je vyloučena stolicí. Dle studie od *Smith et al. (1972)* bylo po perorálním podání značeného ⁶⁰Co 44 % podané dávky vyloučeno s biologickým poločasem ($t_{1/2}$) 12 hodin, 32 % s $t_{1/2}$ 6 dní, 13 % s $t_{1/2}$ 60 dní a posledních 11 % s $t_{1/2}$ až 800 dní. K podobným výsledkům došli také *Letourneau et al. (1972)*, kteří vypočítali nejdelší $t_{1/2}$ na 600 dní. Z obou studií vyplývá, že většina podané dávky je vyloučena během jednoho týdne, z toho asi třetina již během 6–12 hodin, avšak malé množství může v těle zůstat až několik let (*Paustenbach et al. 2013*).

Pro lepší odhad chování kobaltu v organismu bylo navrženo několik farmakokinetických modelů. Patří mezi ně například tří-kompartmentový biokinetický model mezinárodní komise pro radiační ochranu (ICRP), který počítá s rozdělením kobaltu mezi játra (5 %), ostatní orgány a tkáně (45 %) a vyloučením močí a stolicí (50 %). Při eliminaci potom

rozlišuje tři eliminační poločasy: 6 dní, 60 dní a 800 dní. Další biokinetický model pro anorganický kobalt popsal *Leggett (2008)*. Ten se skládá z pěti kompartmentů – plná krev, kostra, játra, ledviny a další měkké tkáně, a popisuje transport kobaltu mezi těmito kompartmenty kinetikou prvního řádu (viz Obr. 1). Z tohoto modelu poté vychází další model od *Unice et al. (2012)*. Ten je dnes považován za nejlepší a je skutečně nejpoužívanějším modelem pro anorganický kobalt. Lze ho dobře využít především u dospělých mužů k výpočtu koncentrace kobaltu v krvi a také ke sledování vztahu mezi hladinou kobaltu a výskytem nežádoucích účinků (*Paustenbach et al. 2013*).



Obr. 1: Schéma biokinetického modelu pro anorganický kobalt rozlišuje pět kompartmentů – plnou krev, kostru, ledviny, játra a další měkké tkáně. Mezi jednotlivými kompartmenty probíhá transport kinetikou prvního řádu. Převzato z *Leggett (2008)*.

3.2 PATOFYZIOLOGIE KOBALTU

Běžná hladina kobaltu v krvi se průměrně pohybuje okolo 0,39 $\mu\text{g/l}$ (6,6 nM), respektive pod 0,50 $\mu\text{g/l}$ (8,5 nM). Vyšší hladiny do 18 $\mu\text{g/l}$ (305 nM) jsou spojené s dlouhodobým užíváním doplňků stravy s obsahem kobaltu a většinou nevedou k nežádoucím účinkům. Samotné toxické hladiny v krvi nebo moči nejsou přesně definované. Lze však obecně zhodnotit, že se toxicita kobaltu projevuje až při hladinách v krvi nad 300 $\mu\text{g/l}$ (5,1 μM). V těchto koncentracích dochází k významné interakci s receptory, iontovými kanály a biomolekulami. Nejvíce toxickou formou jsou volné kobaťnaté ionty (Co^{2+}). Na organismus negativně působí více mechanismy, především tvorbou reaktivních forem kyslíku a lipidovou peroxidací. Dále je ovlivněna mitochondriální funkce, homeostáza vápníku a železa,

erythropoéza a přísun jodu do štítné žlázy (*Paustenbach et al. 2013, Tvermoes et al. 2012, Leyssens et al. 2017, Smith 2013*).

3.2.1 ZDROJE EXPOZICE

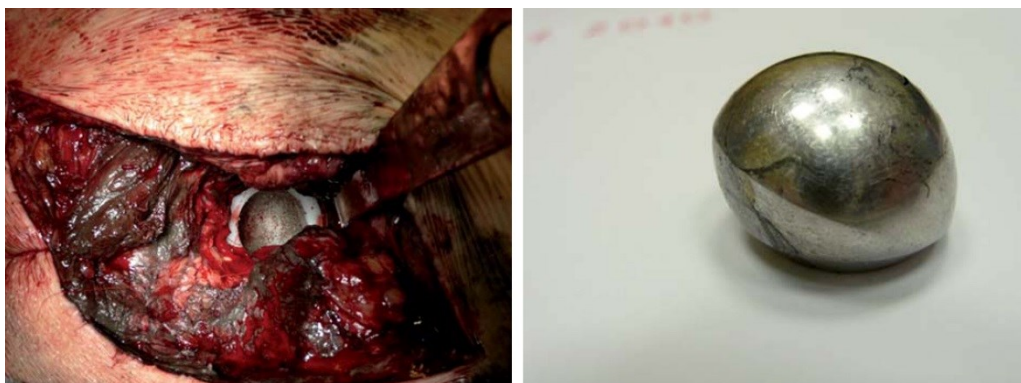
Nejčastějším zdrojem expozice kobaltu v populaci je jeho příjem v potravě. Nejvyšší hladiny kobaltu se nachází v čokoládě, másle, kávě, rybách, oříšcích nebo v listové zelenině a obilninách. Vitamin B₁₂ se nachází především v mase a mléčných výrobcích. Vysoký obsah kobaltu, případně vitaminu B₁₂, mají také některé doplňky stravy a energetické nápoje (*Paustenbach et al. 2013, Barceloux 1999, Leyssens et al. 2017*). Průměrný denní příjem kobaltu je běžně kolem 5 až 40 µg (*Finley et al. 2013*).

Kobalt se nejvíce využívá ve strojírenském, elektrotechnickém nebo stavebním průmyslu. Pracovníci v těchto odvětvích mohou být intenzivně vystavováni kobaltu jak inhalací zplodin a kovového prachu, tak také přímým kontaktem s kůží, případně i požitím kovových částic například z kontaminovaných rukou. K pracovní expozici může docházet také při recyklaci elektroodpadu nebo při práci s barvami. V blízkosti továren a v silně industrializovaných oblastech se poté kobalt dostává do půdy, vzduchu, vody i potravin. Dále je kobalt uvolňován do okolí z elektronických zařízení, jako jsou televizní LCD displeje, počítačové monitory nebo baterie v mobilních telefonech. Může se uvolňovat i z bižuterie, šperků nebo kosmetiky (*Leyssens et al. 2017*).

Dalším zdrojem expozice je využití medicínské. Historicky byl podáván chlorid kobaltnatý (CoCl₂) jako léčivo proti anemii pro své erythropoézu stimulující účinky v dávce 25–300 mg denně. V oblasti homeopatie se i v dnešní době podává 0,5–1,12 mg CoCl₂ denně pro léčbu hypersekrece estrogenu u žen léčených hormonální substituční terapií. Běžně se můžeme setkat s doplňky stravy obsahujícími kobalt v doporučeném denním množství od 0,2 do 1 mg. Tyto doplňky stravy mají podporovat správnou funkci metabolismu tuků a sacharidů, syntézu proteinů a také tvorbu již zmiňovaných červených krvinek. Přípravky obsahující kobalt byly v minulosti zneužívány jako doping, od roku 2015 je kobalt na seznamu zakázaných látek světové antidopingové agentury (WADA) (*Leyssens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013, Finley et al. 2013, Schmidt et al. 2019*).

Od roku 1990 je kobalt využíván jako hlavní složka tzv. MoM (metal-on-metal, kov na kov) kloubních náhrad kyčle. Tyto kloubní náhrady obsahují 64 % kobaltu, 28 % chromu a stopová množství dalších kovů jako je nikl, molybden, železo nebo hliník. Kobalt se z těchto náhrad může uvolňovat, a to dvěma způsoby – třením kloubních ploch mezi sebou, kterým se

vytváří velké množství nanočástic, nebo koroze kovových povrchů. Na míře uvolňování, a tedy případném toxickém působení kobaltu, se podílí velké množství faktorů. Patří mezi ně chirurgické umístění kloubní náhrady, typ a výrobce náhrady, bilaterální umístění MoM náhrad nebo funkce ledvin. V případě nesprávně fungující náhrady může docházet k silné metalóze (viz Obr. 2) a závažné intoxikaci (Leyssens et al. 2017). Nejtěžší případy intoxikace byly pozorovány u pacientů s původně keramickou náhradou kyčle, která byla následně vyměněna za náhradu kovovou. Důvodem bylo obrušování MoM náhrady reziduálními mikroskopickými částicemi keramiky (viz Obr. 2). MoM náhrada sama o sobě také uvolňuje určité množství kobaltu, avšak obrušováním a třením se toto množství výrazně zvyšuje. Pro porovnání, u správně fungující MoM náhrady je průměrná hladina kobaltu v plné krvi po 1 roce od implantace 0,67 µg/l (11,4 nM), po 4 letech je tato hladina až 50x vyšší než u běžné populace. U pacienta s historií keramické protézy s následnou výměnou za MoM náhradu byla hladina kobaltu v séru až 506 µg/l (8 600 nM) (Pelclova et al. 2012, Tvermoes et al. 2012).



Obr. 2: Viditelná metalóza okolní tkáně u pacienta po nahrazení keramické hlavice hlavici kovovou (vlevo). Hlavice MoM náhrady po vyjmutí z těla pacienta ze 40 % obroušená keramickými reziduálními částicemi (vpravo). Převzato z Pelclova et al. (2012).

3.2.2 PŘÍZNAKY INTOXIKACE

Reakce organismu na kobalt se liší v závislosti na jeho chemické formě a cestě expozice. Z prostředí se do organismu dostávají nejčastěji kovové částice, na které organismus reaguje imunitní odpovědí a lokální reakcí. Po inhalaci kovového prachu může dojít k respiračním obtížím, po kontaktu s kůží ke kontaktní dermatitidě, u MoM náhrad s kobaltem k hromadění zánětlivé tekutiny v kloubu až k osteolýze. Z MoM náhrad se mimo nanočástic kobaltu uvolňují do krevní a lymfatické cirkulace také jeho ionty. V tomto případě dochází k systémové toxické reakci, o které bude pojednáno níže (Leyssens et al. 2017).

Akutní toxicita nebývá běžná, bylo však popsáno několik případů perorální ingesce výrazného množství roztoku chloridu kobaltnatého zejména malými dětmi. Šlo o závažné stavy. Popsáno bylo i úmrtí u jednoho dítěte z důvodu koagulativní nekrózy sliznice žaludku a edému mozku (*Paustenbach et al. 2013*).

Systémová, především chronická nebo subchronická toxicita, se projevuje neurologickými, kardiovaskulárními a endokrinními symptomy a je závislá na hladině kobaltu v krvi. První příznaky intoxikace se projevují při hladinách kolem 300 µg/l (5,1 µM) a jedná se o hematologické a endokrinní obtíže reverzibilního charakteru. Vysoké hladiny nad 700 µg/l (11,9 µM) jsou spojené se závažnými stavy, jako jsou až ireverzibilní neurologické a kardiovaskulární projevy. Nejvyšší dosud naměřené hladiny kobaltu v krvi byly 6 500 µg/l (110,3 µM) a 2 100 µg/l (35,6 µM) (*Leysens et al. 2017, Finley et al. 2013, Paustenbach et al. 2013*).

Kobalt se kumuluje v myokardu. Výrazně redukuje systolickou funkci levé komory a vede k srdeční hypertrofii a kardiomyopatii. Byly také pozorovány změny na EKG, zvýšení srdeční frekvence a rozvoj hypertenze. Kardiomyopatie se projevuje převážně při chronické intoxikaci u pacientů s predispozicí, jako je podvýživa. Jinak se jedná spíše o vzácný jev (*Leysens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013*).

Dále kobalt přechází přes hematoencefalickou bariéru a ukládá se v mozkové tkáni. Může dojít jak k centrální, tak i periferní neurotoxicitě. Tato toxicita se může projevovat šumem v uších až oboustrannou progresivní ztrátou sluchu a nevolností. Také je postižen zrakový nerv, dochází ke sníženému vnímání barev, zamlženému vidění, dysfunkci sítnice až k úplné slepotě. Dalším příznakem intoxikace je kognitivní dysfunkce spojená se ztrátou paměti, sníženou schopností koncentrace a dezorientací. Může se objevit také tremor, bolesti hlavy, slabost svalů nebo parestezie. Výhodou je, že po ukončení expozice je většina těchto symptomů částečně nebo plně reverzibilních a brzy dochází ke zlepšení stavu pacienta. Objevují se také psychologické obtíže, jako je deprese, extrémní únava, úzkosti nebo podrážděnost (*Leysens et al. 2017*).

Endokrinní toxicita zahrnuje vliv kobaltu na štítnou žlázu. Jak bylo uvedeno výše, je snížen příjem jodu do štítné žlázy. To vede k hypotyreóze, strumě a chronické tyreoiditidě. Po odstranění expozice většina těchto příznaků mizí (*Leysens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013*).

Jak bylo také popsáno výše, kobalt stimuluje tvorbu červených krvinek, a proto se při intoxikaci může vyskytnout polycytemie, zvyšuje se hematokrit a hladina hemoglobinu. Po vysazení dochází k úpravě do 14 dnů (*Leyssens et al. 2017*).

Při inhalaci částic kobaltu může v plicích dojít k rozvoji astmatu nebo pneumonii, dlouhodobě až k chronické fibróze plic. Při kontaktu s kůží se nejčastěji vyskytuje kontaktní dermatitida. Často se jedná zároveň o alergii zkříženou s dalšími kovy, jako je nikl nebo chrom. I po perorálním podání může být pozorována vyrážka, akné nebo dermatitida. K úpravě těchto potíží dochází samovolně po ukončení expozice do několika týdnů (*Leyssens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013*).

Nebyly provedeny žádné studie sledující účinky na lidský plod, teratogenitu ani vliv na plodnost. Ze studií na myších však plyne, že kobalt je schopen procházet placentou. Expozice myši vyššími dávkami vedla k retardaci růstu plodu (*Paustenbach et al. 2013*).

U pacienta po implantaci MoM kloubní náhrady nahrazující předchozí keramický implantát došlo po 14 měsících k rozvoji neuropatie končetin, ztrátě tělesné hmotnosti a závažné oboustranné ztrátě sluchu. Došlo k abrazi kovové hlavice náhrady, a to až o 40 %, se silnou metalózou a systémovou intoxikací (viz Obr 2). U pacienta byla dále pozorována hypertrofie levé komory a subklinická hypotyreóza. Hladina kobaltu v krvi byla 506 µg/l (8,6 µM). V perikardiální tekutině hladina dosahovala 930 µg/l (15,8 µM), v cerebrospinální tekutině 8,5 µg/l (0,14 µM). Po vynětí kovové náhrady se výrazně zmenšila velikost srdce. Naopak u poruchy sluchu nedošlo ke zlepšení ani po 16 měsících chelatační terapie unithiolem (DMPS) (*Pelclova et al. 2012*).

Další kazuistika uvádí 71-letého pacienta, kterému byla vyměněna prasklá keramická kloubní náhrada za náhradu typu MoP (metal-on-polyethylene, kov na polyethylen). Hlavice této náhrady byla složena převážně z kobaltu a chromu. I přes důkladné vyčištění kloubních prostor od všech viditelných částic keramiky došlo po 6 měsících k obroušení kovové hlavice. Pacient si nejprve stěžoval na bolesti v kloubu a byla mu zjištěna hypotyreóza. O dva týdny později byl hospitalizován pro zvracení, průjem a bolesti břicha. Dále vykazoval asymetrickou ztrátu sluchu, zhoršení zraku, závratě a ztrátu hmotnosti. Jeho stav se zhoršoval a po dvou dnech došlo k úmrtí. Pitva zaznamenala výraznou hypertrofii srdce bez patologie na koronárních arteriích. Hladiny kobaltu pár dní před smrtí dosahovaly 596,5 µg/l (10,1 µM). Laboratorní výsledky nebyly dostupné včas a intoxikace kobaltem nebyla uvažována, nebyla tedy zahájena odpovídající léčba (*Peters et al. 2017*).

53-letý pacient přijel na pohotovost pro potíže s dýcháním. Vyšetřením bylo zjištěno srdeční selhání se sníženou ejekční frakcí (EF) pod 40 %. O měsíc později byla EF 31 % a dále se snižovala až na 25 %. Dalšími příznaky byly pouze nespecifická únava a slabost. Po prozkoumání pacientovy historie se ukázalo, že je po výměně keramické kloubní náhrady za MoP náhradu s hlavicí z kobaltu a chromu. Laboratorním vyšetřením byly zjištěny zvýšené hladiny kobaltu (397,8 µg/l; 6,75 µM) i chromu. Okamžitě byla nasazena chelatační terapie kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Následně byla vyjmuta MoP náhrada. 79 dní po operaci klesla hladina kobaltu na 27,8 µg/l (0,47 µM) (*Kim et al. 2016*).

3.3 CHELATAČE

Kobalt tvoří koordinační neboli komplexní sloučeniny s ligandy anorganického i organického původu. Nejvíce stabilní je oktaedricky koordinovaný kobaltitý iont. Kobaltnaté ionty mají častěji tetraedrické uspořádání, jejich oktaedrické útvary jsou málo stabilní a náchylné k redoxním reakcím. V rámci této diplomové práce jsou důležité především cheláty, tedy komplexní částice tvořené jedním středovým atomem kobaltu, ke kterému jsou poutány donor-akceptorovými vazbami dvou- nebo více-donorové ligandy (*Klikorka et al. 1989*).

V terapii intoxikace těžkými kovy se využívá právě schopnosti kovů tvořit cheláty s různorodými ligandy. Takový ligand neboli chelátor má v organismu několik úkolů: zaprvé projít přes biologické bariéry a dostat se do místa s vysokou koncentrací daného kovu; zadruhé s tímto kovem interagovat, případně ho vyvézt z biologických struktur; a zatřetí vytvořit s kovem netoxický komplex schopný jeho bezpečné exkrece nejen z místa depozice, ale i z celého organismu. Ideální chelátor by měl mít vysokou afinitu pro daný kov a zároveň by neměl interferovat s esenciálními kovy v organismu. Dále by měl být dobře rozpustný ve vodě, aby nedocházelo k jeho kumulaci v organismu, ale zároveň také dostatečně lipofilní, aby prošel přes biologické bariéry. Měl by být také rezistentní k nežádoucí metabolické transformaci, která by vedla k jeho inaktivaci. V případě tzv. proléčiv, kdy až metabolizací získáváme účinnou látku, je naopak taková metabolická přeměna žádoucí. A nakonec by měl dobře chelatovat v rozmezí fyziologického i patofyziologického pH. V některých případech je dokonce vhodnější, aby chelatace probíhala pouze za podmínek patofyziologických. Je tedy pochopitelné, že najít vhodný chelátor je velmi obtížné (*Flora a Pachauri 2010*).

V terapii intoxikace je nejprve nutné zamezit další absorpci kovu do organismu. V případě kobaltu se tedy nejprve snažíme o přerušení expozice, v případě MoM náhrady je

nutné její vyjmutí. Následně se snažíme již absorbovaný kov z organismu eliminovat chelatační terapií. Moderní je také využití tzv. kombinované terapie, kdy se kombinují různé chelatační látky s odlišnými vlastnostmi. Jako prospěšná se ukázala kombinace s antioxidanty, jako je N-acetylcystein, melatonin, kyselina lipoová nebo vitaminy C a E. S látkami figurujícími jako chelátory kobaltu nemáme v dnešní době bohužel příliš zkušeností. Kontrolované studie chybí, a tak vycházíme často ze zkušeností s terapií nadbytku ostatních kovů, jako je železo nebo měď (*Smith 2013, Flora a Pachauri 2010*).

Jako chelátory kobaltu jsou nejčastěji používány následující látky: kyselina 2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonová (DMPS, unithiol), kyselina diethylentriaminpentaoctová (DTPA), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), kyselina dimerkaptojantarová (DMSA), sukcinát DMSA nebo N-acetylcystein (*Smith 2013, Pelclova et al. 2012, Devlin et al. 2013*).

Látky představené v této diplomové práci jsou chelátory, u nichž byla experimentálně testována schopnost tvořit stabilní komplexy s kobaltem pro následné potencionální využití v terapii kobaltové intoxikace. Tyto látky lze rozdělit do tří hlavních skupin, a to na látky klinicky používané, látky využívané experimentálně a indikátory pro stanovení některých kovů. Mezi klinicky používané chelátory patří ATTM (tetrathiomolybdenan amonný), ciklopirox, deferipron, deferoxamin, dexrazoxan, DTPA (kyselina diethylentriaminpentaoctová) a EGTA /kys. ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)tetraoctová/. Mezi látky experimentálně využívané jako chelátory patří hlavní metabolit dexrazoxanu ADR-925, PIH (pyridoxal isonikotinoyl hydrazon) a SIH (salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon). Mezi indikátory potom patří bathokuproin, dithizon, ferrozín a *o*-kresolftalein komplexon.

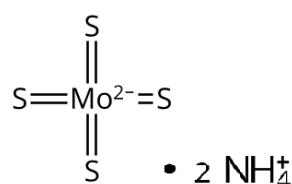
3.3.1 ATTM

Tetrathiomolybdenan amonný (ATTM) s chemickým vzorcem $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ je silným chelátorem mědi. Klinicky se jeho chelatační schopnosti využívají v terapii Wilsonovy choroby, způsobené nadměrným hromaděním mědi v játrech, mozku i dalších orgánech. ATTM tvoří inertní komplex z mědi (kovu) a proteinu (nejčastěji albuminu), který je následně žlučí vyloučen z organismu (*Li et al. 2020, Członkowska et al. 2018*). Mnohaleté zkoušení této látky zatím ukazuje na její dobrý bezpečnostní profil, prozatím ale není schválena americkým Úřadem pro potraviny a léčiva (FDA). Od roku 2008 má Evropskou lékovou agenturou (EMA) udělen status sirotčího léčiva (*Mendonça et al. 2020, ema.europa.eu 5. 1. 2022*).

Protože bylo zjištěno, že zvýšená hladina mědi potencuje růst nádoru, stejně jako angiogenezi v novotvaru, je tato látka experimentálně zkoušena také v terapii některých

nádorových onemocnění. Prověřuje se u karcinomu prsu, jater nebo štítné žlázy (*Durham et al. 2020, Li et al. 2020*).

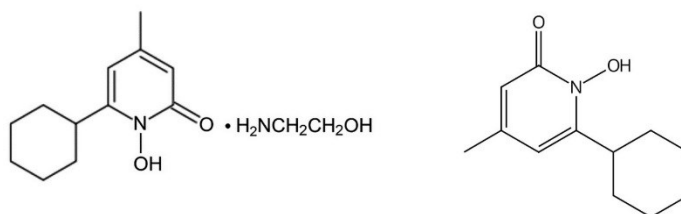
Ze struktury ATTM (viz Obr. 3) vyplývá, že může být donorem sulfanu (H_2S). Při štěpení vazeb mezi molybdenovým jádrem a kovalentně navázanou sírou dochází k pomalému uvolňování tohoto plynu, který v organismu slouží jako důležitá signální molekula, podobně jako oxid dusnatý nebo oxid uhelnatý – jedná se o takzvané gasotransmitery. Díky této vlastnosti působí ATTM protektivně vůči neurodegenerativním a artritickým onemocněním nebo diabetu. Zároveň také blokuje enzym superoxiddismutázu a snižuje tak oxidační poškození lipidů i proteinů (*Li et al. 2020, Mendonça et al. 2020, Durham et al. 2020*).



Obr. 3: Strukturální vzorec ATTM. Štěpením vazby mezi molybdenem a sírou dochází ke vzniku H_2S , který v organismu slouží jako důležitá signální molekula. Převzato a upraveno dle *SciFinder (19. 10. 2021)*.

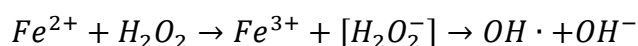
3.3.2 CIKLOPIROX

Ciklopirox je látka klinicky využívaná pro svou antifungální aktivitu jako širokospektré lokální antimykotikum. Často je také využíván ve formě olaminové soli jako ciklopiroxolamin (viz Obr. 4). Ciklopirox i jeho sůl mohou také cheltovat kovy, především potom trojmocné ionty železa nebo hliníku. Některé zdroje ale uvádí, že chelatuje i ionty železnaté (*Shen a Huang 2016, Regdon et al. 2021*). Jako chelatační agens se ciklopirox využívá pouze experimentálně, a to hlavně pro chelataci železa (*Pokorski et al. 2009*).



Obr. 4: Chemická struktura ciklopiroxolaminu (vlevo) a ciklopiroxu (vpravo). Převzato a upraveno dle *Shen a Huang (2016) a SciFinder (20. 10. 2021)*, respektive.

V poslední době je ciklopirox hlouběji zkoumán pro svou protinádorovou aktivitu. Bylo zjištěno, že zpomaluje růst nádorových buněk. Cytotoxicky působí především na buňky leukemické, buňky myelomu a buněčné linie solidních nádorů. Tato cytotoxicita je připisována právě schopnosti ciklopiroxu chelatovat ionty železa a také inhibovat železo-dependentní enzym ribonukleotidreduktázu (*Eberhard et al. 2009*). Také byla zjištěna antioxidační a protizánětlivá aktivita ciklopiroxu spojená se snížením produkce hydroxylového radikálu, který vzniká reakcí peroxidu vodíku se železnatými ionty (tzv. Fentonova reakce – viz rovnice 1) (*Regdon et al. 2021, Winterbourn 1995*).

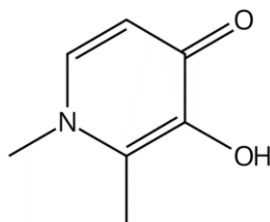


Rovnice 1: Fentonova reakce, při které působením železnatých iontů vzniká hydroxylový radikál, hlavní zdroj oxidačního poškození DNA a dalších struktur. Převzato z *Winterbourn (1995)*.

Přestože se jedná o topicky působící antimykotikum, jeho systémové působení na organismus bylo pozorováno v několika studiích jak na zvířatech, tak i na lidských dobrovolnících. Tyto studie prokázaly, že ciklopirox je systémově dobře tolerován a v běžných dávkách (10 mg/kg perorálně podávané látky, sérové koncentrace 3 µg/ml; 0,014 nM) nepůsobí v lidském ani zvířecím organismu toxicky. Střední smrtelná dávka (LD₅₀) u zvířat je až 3290 mg/kg po perorálním podání (*Eberhard et al. 2009*).

3.3.3 DEFERIPRON

Deferipron, také známý pod zkratkou L1, CP20 nebo dle IUPAC názvosloví 3-hydroxy-1,2-dimethylpyridin-4-on (viz Obr. 5), je chemická látka využívaná pro své železo-chelatuující vlastnosti. Se železem tvoří komplexy v poměru 3 : 1 (viz Obr. 6) (*Hider a Hoffbrand 2018*).



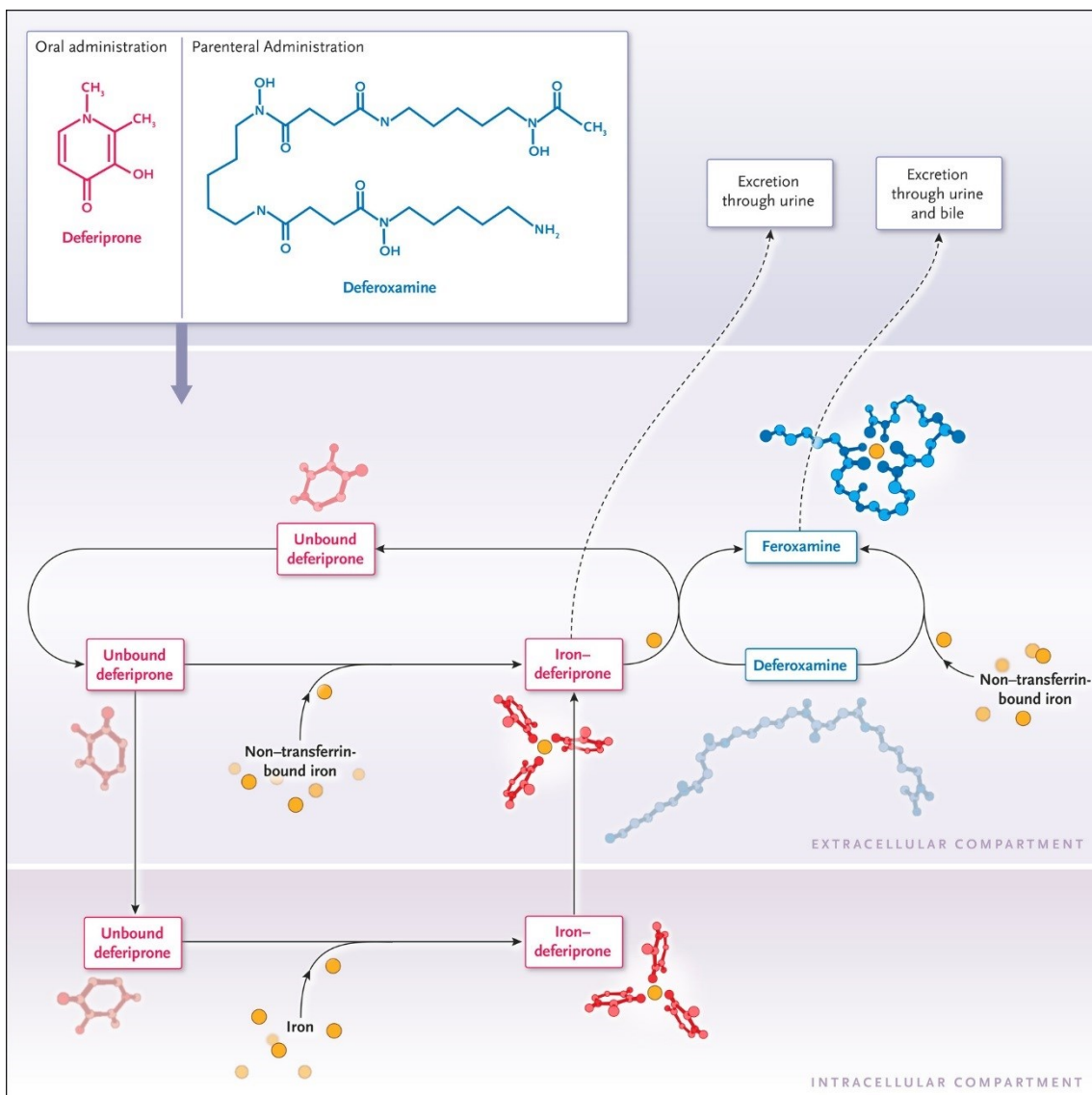
Obr. 5: Strukturální vzorec deferipronu. Převzato ze *SciFinder (25. 10. 2021)*.

Deferipron je indikován při nahromadění železa v těle po opakovaném podání krevních transfuzí pacientům s talasémií major. Off-label se využívá i u dalších chronických anemických stavů závislých na transfuzích, jako je srpkovitá anémie, deficit pyruvátkinázy nebo deficit

glukózo-6-fosfát dehydrogenázy. V České republice je registrován pod obchodními názvy FERRIPROX[®] a DEFERIPRON LIPOMED[®] (*Hider a Hoffbrand 2018, sukl.cz 25. 10. 2021*).

Opakované podávání krevních transfuzí vede ke kumulaci železa v organismu. To následně může způsobit poškození jater, endokrinního systému nebo srdce. Této kumulaci můžeme zabránit právě podáním chelátoru železa, který zvýší jeho vylučování z organismu. Chelátorem první volby je u talasémie major, případně dalších anémií, deferoxamin (viz níže) ve formě subkutánní injekce. Jako druhá volba se využívá právě deferipron, který je podáván perorálně. Výhodná je také kombinace deferipronu s dalším chelátorem, jako je deferoxamin nebo defasirox. Tato kombinace umožňuje snížení dávky obou chelátorů a tím pádem také snížení rizika nežádoucích účinků. Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky terapie deferipronem patří agranulocytóza a neutropenie, je tedy nutné sledovat pravidelně krevní obraz pacienta (*Hider a Hoffbrand 2018, Fisher et al. 2013, ema.europa.eu – Deferipron Lipomed, Ferriprox 25. 10. 2021*).

Při kombinovaném podávání deferipronu a deferoxaminu dochází k aditivnímu až synergickému efektu. Deferipron, schopný přestupu přes buněčnou membránu, předává část navázaného železa deferoxaminu a je schopen další intracelulární železo znovu navázat (viz Obr. 6) (*Hider a Hoffbrand 2018*).

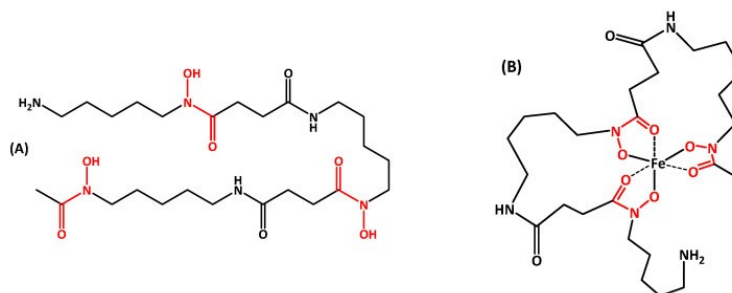


Obr. 6: Synergický efekt kombinace deferipronu a deferoxaminu. Deferipron je schopen, na rozdíl od deferoxaminu, prostupovat přes buněčnou membránu a může tak vázat intracelulární železo. Následně dokáže část navázaného železa předat deferoxaminu, čímž dojde k jeho reaktivaci. Na obrázku je patrné, že deferipron tvoří se železem komplex v poměru 3 : 1. Převzato z *Hider a Hoffbrand (2018)*.

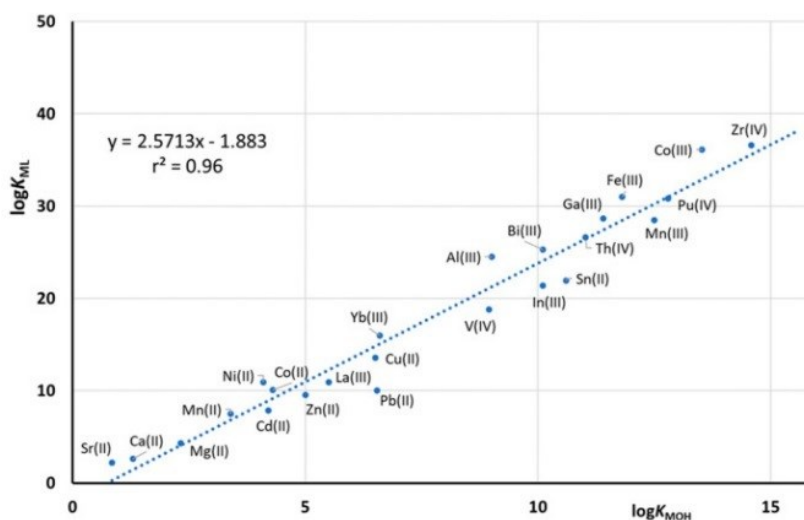
3.3.4 DEFEROXAMIN

Další látkou, která se klinicky využívá jako chelátor železa a také hliníku, je deferoxamin. Je známý také jako desferrioxamin nebo deferoxamin B. Jedná se o přírodní látku izolovanou z půdní bakterie *Streptomyces pilosus*. Díky své lineární struktuře se třemi hydroxamovými skupinami (viz Obr. 7) tvoří stabilní komplexy s dvojmocnými, trojmocnými až čtyřmocnými ionty v poměru 1 : 1. Mimo jiné tvoří velmi stabilní cheláty s kobaltitými ionty,

kteří jsou dokonce stálejší než ty se železem. Naopak s dvojmocnými ionty jsou komplexy obecně méně stálé (viz Obr. 8) (Bellotti a Remelli 2021).



Obr. 7: Struktura deferoxaminu (vlevo), červeně jsou vyznačeny hydroxamové skupiny umožňující tvorbu komplexu s dvojmocnými až čtyřmocnými kovy (vpravo). Převzato z Bellotti a Remelli (2021).



Obr. 8: Porovnání stability komplexů deferoxaminu s jednotlivými ionty kovů. Na ose y logaritmus rovnovážné konstanty komplexu kov-ligand ($\log K_{ML}$), na ose x konstanta hydrolýzy komplexu ($\log K_{MOH}$). Z obrázku vyplývá, že nejstabilnější komplexy tvoří deferoxamin se zirkoničitými a kobaltitými ionty. Převzato z Bellotti a Remelli (2021).

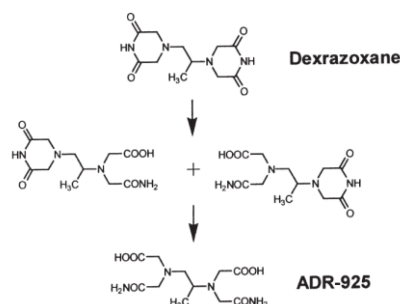
Deferoxamin váže volné železo, dokáže také vyvézt železo z feritinu nebo hemosiderinu. Naopak neváže železo uložené v hemoglobinu ani transferinu. Z transferinu dokáže železo vázat dříve zmiňovaný deferipron, výhodná je tedy jejich vzájemně se doplňující kombinace (viz Obr. 6) (Kontoghiorghes et al. 2000, Hider a Hoffbrand 2018).

V České republice je deferoxamin registrován pod obchodním názvem DESFERAL[®]. Využívá se jako chelátor železa první volby při chronickém přetížení organismu železem při častých transfuzích, hemochromatóze, nebo při akutní otravě železem. Indikací je zároveň

chronické přetížení a otrava způsobená hlinitými ionty. Deferoxamin je lékem první volby, avšak jedná se o subkutánně podávaný léčivý přípravek. Nejvhodnější je dlouhodobé podávání do podkoží po dobu 8 až 12 hodin denně alespoň 5 dní v týdnu pomocí elektronické pumpy. Adherence je zde seriózním problémem, a to nejen z důvodu cesty podání. Hlavními nežádoucími účinky je otok a bolestivost v místě vpichu, může se také vyskytnout zvýšené riziko potencionálně fatálních infekcí, jako je mukormykóza a yersinióza. Také může dojít k rozvoji deficitu zinku, mědi, případně dalších esenciálních kovů. Toto vychází z podstaty relativně neselektivních chelatačních schopností deferoxaminu. Mezi další nežádoucí účinky patří retardace růstu nebo neurologické abnormality. Z důvodu nesnášenlivosti nebo non-adherence může být deferoxamin nahrazen novějším, perorálně podávaným deferipronem (*Kontoghiorghes et al. 2000, Bellotti a Remelli 2021, sukl.cz – Desferal 27. 10. 2021*).

3.3.5 DEXRAZOXAN

Dexrazoxan, také označován jako ICRF-187, je S-(+)-enantiomer razoxanu, chelátoru železa. Hydrolýzou obou kruhů dexrazoxanu vzniká ADR-925 (viz Obr. 9), látka s vystupňovanými chelatačními schopnostmi, o které bude pojednáno v samostatné kapitole. Dexrazoxan byl původně vytvořen jako protinádorové léčivo pro svou schopnost inhibovat mitózu (*Sharpe et al. 1970*), nyní je ale využíván jako jediné registrované léčivo pro prevenci kardiotoxicity vyvolané doxorubicinem, epirubicinem nebo daunorubicinem. V mechanismu kardiotoxicity těchto antracyklinů hraje roli tvorba komplexů se železem, které podporují vznik reaktivních forem kyslíku a zasahují tak negativně do metabolismu kardiomyocytů. Dříve se předpokládalo, že je dexrazoxan proléčivo, ze kterého metabolizací vzniká aktivní látka ADR-925, která jako chelátor s těmito komplexy interaguje, železo z nich vyváže a této toxicitě tak zabrání. V poslední době je tento názor přehodnocován a ukazuje se, že kardioprotektivní účinek má samotný dexrazoxan a je závislý hlavně na inhibici topoisomerázy II, nikoli na chelataci (*Kwok a Richardson 2000, Weiss et al. 1999, Jirkovský et al. 2021*).



Obr. 9: Metabolismus dexrazoxanu. Hydrolýzou jednoho a následně obou kruhů dexrazoxanu vznikají více potentní chelátory kovů, respektive hlavně aktivní metabolit ADR-925. Převzato ze *Kwok a Richardson (2000)*.

Dexrazoxan je v České republice registrován pod obchodními názvy CARDIOXANE[®], CYRDANAX[®] a SAVENE[®]. Podává se ve formě krátkodobé infuze asi 30 minut před aplikací antracyklinu, v poměru 10 : 1 (dexrazoxan : antracyklin). Tyto léčivé přípravky se využívají především u pacientek s nádorem prsu po předchozí léčbě antracykliny, během které již bylo dosaženo maximální kumulativní dávky. Po podání kardioprotektiva je více než dvojnásobně sníženo riziko srdečních komplikací, avšak absolutní kardioprotekce není zajištěna. Tyto komplikace se i přes podání dexrazoxanu projeví asi u 14 % pacientů, což je ale výrazně méně než bez jeho použití. Mezi hlavní nežádoucí účinek dexrazoxanu patří neutropenie, související zřejmě s inhibicí topoisomerázy II (*Kwok a Richardson 2000, sukl.cz 2. 11. 2021*).

3.3.6 ADR-925

ADR-925 je silný chelátor kovových iontů, který je svou chemickou strukturou analogický k EDTA. Tvoří komplexy převážně s železnatými, železitými, vápenatými nebo hořečnatými ionty. Jedná se o polární látku, která aktivním transportem penetruje do buněk pomocí prozatím neznámého přenašeče a vycytává kovové ionty i intracelulárně (*Schroeder a Hasinoff 2002, Jirkovský et al. 2018*).

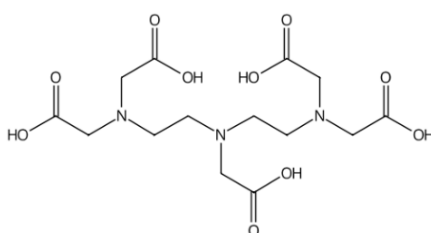
Hydrolýza dexrazoxanu na ADR-925 (viz Obr. 9) probíhá ve dvou krocích katalyzovaných enzymy dihydropyrimidázou, za otevření prvního kruhu, a následně dihydroorotázou. Hydrolýza je dále podpořena přítomností kovových iontů, a to i bez účasti enzymů. Dochází k ní intenzivně v plazmě a také v játrech a ledvinách (*Jirkovský et al. 2018, Schroeder a Hasinoff 2002*).

Mimo jiné tvoří ADR-925 stabilní komplexy také s kobaltnatými ionty. Toho se využívá při analytickém hodnocení této látky zpětnou chelatometrickou titrací za využití fluorescenčního chelátoru/indikátoru kalceinu. Nadbytečné množství kobaltu (po navázání

veškerého ADR-925) se váže na kalcein a výsledná koncentrace ADR-925 je vypočtena z míry fluorescence volného kalceinu (*Schroeder a Hasinoff 2002*).

3.3.7 DTPA

Kyselina diethylenetriaminpentaoctová (DTPA), nebo také kyselina pentetová, je látka patřící do skupiny aminopolykarboxylových kyselin (viz Obr. 10), které jsou velmi potentními chelátory. Díky svým pěti karboxylovým skupinám tvoří komplexy s vícemocnými ionty kovů, především váže dvoj- a trojmocné ionty zinku, železa, vápníku a manganu. Nejsilnější vazbu má potom k zinečnatým iontům, selektivita k nim je v porovnání s EDTA až dvacetinásobná (*Arts et al. 2018*).



Obr. 10: Chemická struktura aminopolykarboxylové kyseliny DTPA. Díky pěti karboxylům chelatuje vícemocné ionty kovů. Převzato ze *SciFinder* (12. 11. 2021).

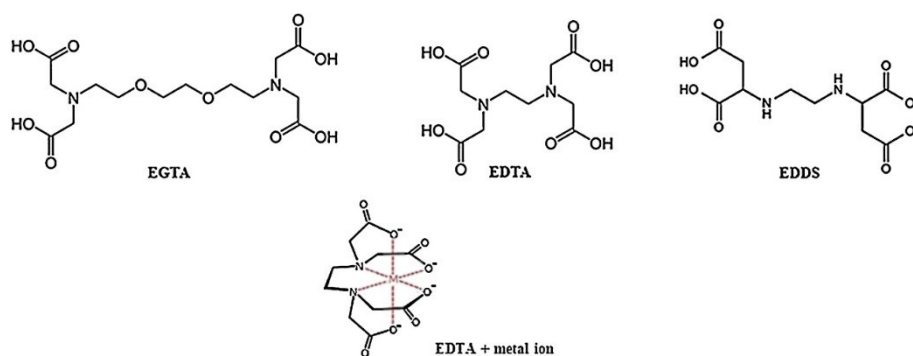
Využití DTPA je široké, využívá se jak v různých průmyslových odvětvích, tak i v medicíně jako nosič kontrastních radioaktivních látek nebo jako chelátor při intoxikaci těžkými kovy. V České republice je registrován léčivý přípravek TECHNESCAN DTPA[®], který je určen k diagnostickým účelům. Jedná se o kit, do kterého je v době potřeby vpraveno radiofarmakum, v tomto případě technecium (^{99m}Tc). Podobně se využívá také indium (¹¹¹In) v přípravku INDIUM DTPA[®]. V rámci specifického léčebného programu se dále využívají přípravky DITRIPENTAT-HEYL[®] nebo ZINK-TRINATRIUM-PENTETAT[®] pro dlouhodobou léčbu intoxikací radionuklidy transuranů jako je americium, plutonium, curium, kalifornium nebo berkelium. Jedná se o trisodnou vápenatou nebo zinečnatou sůl DTPA. Při intoxikaci americiem (Am) dochází k jeho eliminaci z plazmy velmi rychle: 90 % Am je během 60 minut po injekci DTPA vyloučeno z těla. Včasným podáním lze zabránit ukládání transuranů do kostí a jater (*Arts et al. 2018, Huckle et al. 2015, Sueda et al. 2013, sukl.cz – Technescan DTPA 12. 11. 2021*). Experimentálně je testován krém s DTPA pro léčbu alergické kontaktní dermatitidy způsobené těžkými kovy (*Wöhrl et al. 2001*).

Protože je absorpce DTPA po perorálním podání pouze 3–5 %, musí se podávat ve formě intravenózní injekce. Exkrece vytvořených chelátů je potom převážně biliární a látka je

vyloučena během 5 dnů od podání. Díky výrazné selektivitě vůči zinečnatým iontům může docházet k deficitu zinku v organismu. Tomuto nežádoucímu účinku lze však dobře předcházet suplementací zinku (*Arts et al. 2018*).

3.3.8 EGTA

Kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)tetraoctová (EGTA), někdy také označovaná jako kyselina egtazová, je látka chemicky podobná kyselině edetové (EDTA) (viz Obr. 11), která je známá svými širokými chelatačními schopnostmi. EGTA je chelátor s vyšší specifitou, a to především pro vápenaté a hořečnaté ionty. Komplexy ale tvoří také se zinečnatými, měďnatými, kobaltnatými nebo kobaltitými ionty (*Stockbridge 1987, Dominguez a Ward 2009, Hafez et al. 1978*).



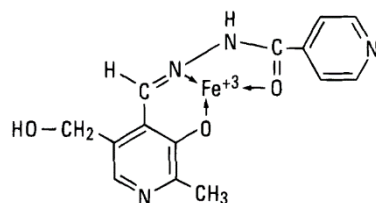
Obr. 11: Chemické struktury aminopolykarboxylových kyselin (EDDS = kyselina ethylendiamindijantarová) (nahore) a znázornění tvorby komplexu EDTA s kovovým iontem (dole). Převzato a upraveno dle *Morrison a Khutoryanskiy (2014)*.

EGTA se klinicky využívá k demineralizaci dentinu ve stomatologii při přípravě zubního kanálku k ošetření. Vznikem komplexu EGTA s vápenatými ionty dochází k narušení dentinu a tím je umožněn zákrok na zubním kanálku. Zároveň EGTA odstraňuje bez další eroze takzvanou sprašnou vrstvu, což je mikroskopická drť zubní hmoty usazující se v zubním kanálku při vrtání zubu (*Calt a Serper 2000, Tripodi et al. 2007*). Experimentálně se sleduje vliv EGTA na různé biologické pochody závislé na iontech vápníku. Příkladem může být zkoumání jejího vlivu na aktivitu sodno-draselné pumpy, na míru adheze makrofágů nebo aktivitu DNA-nukleáz (*Dominguez a Ward 2009, Abashidze et al. 2001, Segura-Egea et al. 2003*).

3.3.9 PIH

Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) je chelátor železa. Díky své chemické struktuře dokáže navázat kovové ionty, převážně železnaté a železité, pomocí dvou atomů kyslíku

a jednoho atomu dusíku (viz Obr. 12). Jak samotná látka, tak i její komplexy, mají relativně nízkou molekulární hmotnost, vhodnou lipofilitu a při neutrálním pH nemají náboj, takže dobře přechází přes buněčnou membránu (*Chen et al. 2018, Richardson 1998*).



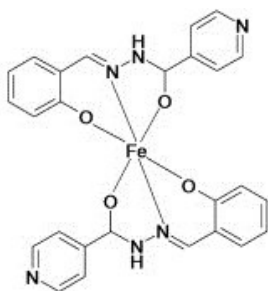
Obr. 12: Schematický diagram znázorňující funkční skupiny podílející se na chelataci trojmocného železa. Jedná se o fenolický kyslík, aldiminový dusík a karbonylový kyslík. Převzato z *Richardson (1998)*.

Železo se účastní oxidačních pochodů v organismu, při kterých se tvoří reaktivní formy kyslíku. PIH dokáže vyvázat ionty železa z komplexu s feritinem nebo citrátem, díky čemuž nedochází k lipidové peroxidaci (*Chen et al. 2018, Buss et al. 2002, Hermes-Lima et al. 2000*).

PIH má pro ionty železa vysokou afinitu, velmi dobře účinkuje v podmínkách organismu a je dobře vstřebatelný po perorálním podání. Naopak pro biologicky důležité vápenaté a hořečnaté ionty je jeho afinita nízká, je tedy dalším vhodným kandidátem na perorálně podávaný chelátor železa pro pacienty závislé na častých krevních transfuzích, kteří následně trpí přebytkem železa. Prozatím však nebyl registrován žádný léčivý přípravek s touto chemickou látkou. Jeho využití je prozatím spíše experimentální, zkoumají se také halogenované a další deriváty PIHu, které vykazují vyšší chelatační aktivitu než samotná parentní látka (*Chen et al. 2018, Buss et al. 2002*).

3.3.10 SIH

Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) je látka ze skupiny arylhydrazonových derivátů pyridoxalu, stejně jako PIH. Jedná se opět o chelátor železa, který tvoří komplexy 2 : 1 jak s železitými, tak železnatými ionty (viz Obr. 13). Nositelem chelatační aktivity je stejně jako u PIHu hydrazonová skupina (respektive aldiminový dusík), společně s karbonylem a fenolickým kyslíkem (*Potůčková et al. 2014, Štěrba et al. 2007, Hašková et al. 2011*).

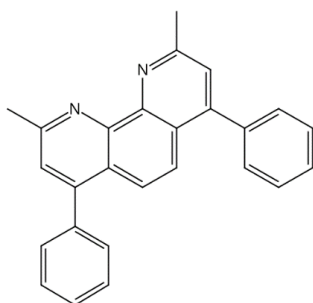


Obr. 13: Komplex SIHu se železem v poměru 2 : 1. Převzato a upraveno dle *Hašková et al. (2011)*.

Tato látka je experimentálně sledována především pro své silné antioxidační účinky a kardioprotektivní aktivitu při terapii antracykliny, podobně jako dexrazoxan. Díky lipofilnímu charakteru a malé molekule ho lze podávat perorálně. SIH je dobře tolerován a má nízkou toxicitu, avšak jeho stabilita ve vodném prostředí je nízká, brzy dochází k jeho hydrolyze (*Potůčková et al. 2014, Štěrbá et al. 2007, Hašková et al. 2011*).

3.3.11 BATHOKUPROIN

Bathokuproin, chemicky 2,9-dimethyl-4,7-difenyl-1,10-fenanthrolin (viz Obr. 14), je chelatační látka obsahující v molekule konjugovaný systém dvojných vazeb, takzvaný chromofor, díky kterému se jeho komplexy jeví jako barevné. Využívá se tak především jako indikátor (*Chen et al. 2016*).



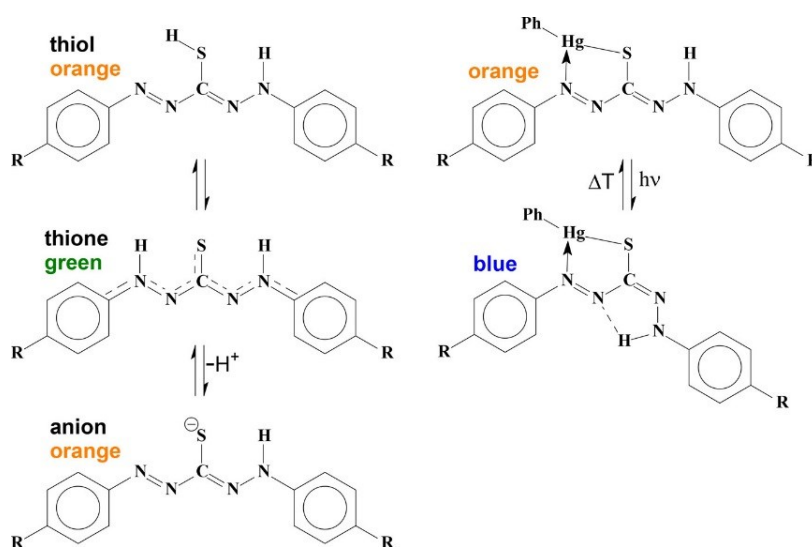
Obr. 14: Chemická struktura bathokuproinu. Díky konjugovanému systému dvojných vazeb se komplexy bathokuproinu jeví jako barevné. Převzato ze *SciFinder (29. 11. 2021)*.

Bathokuproin, případně jeho ve vodě rozpustný analog bathokuproin disulfonát (BCS), preferenčně vážou ionty mědi. Vynikají především atypicky vysokou stabilitou komplexu s ionty měďnými (Cu^+). Jsou proto široce využívány pro detekci a kvantifikaci Cu^+ . Toto využití má bathokuproin a BCS hlavně na experimentálním poli, kde je sledován například vliv Cu^+ na tvorbu reaktivních radikálů nebo schopnost lidského albuminu redukovat Cu^{2+} na Cu^+ (*Chen et al. 2016, Laggner et al. 2006, Ivanov et al. 2000*).

Problémem při stanovení Cu^+ ve vzorku může být obsah Cu^{2+} , který bathokuproin váže také. Tento problém lze vyřešit přidáním dalšího chelátoru. Využívá se například EDTA, která má silnou afinitu k měďnatým iontům, naopak ionty měďné váže jen velmi slabě (*Chen et al. 2016*).

3.3.12 DITHIZON

Dithizon, nebo také difenylthiokarbazon, je tmavě zelená látka schopná vytvářet barevné komplexy s mnoha kovy. Opět se jedná o látku s chromoforem, která je považována za pravděpodobně nejvíce barevnou, respektive barvu-měnicí látku vůbec. Dithizon mění barvu na základě sedmi různých stimulů, kterými je náboj (tzv. elektrochromismus), typ rozpouštědla (solvatochromismus), koncentrace (koncentratochromismus), pH (halochromismus), teplota (termochromismus), UV/VIS záření (fotochromismus) a čas (chronochromismus). Změna barvy je vždy spojena s transferem nebo ztrátou protonu z nestabilní imino- skupiny nebo izomerizací, kterou umožňuje systém delokalizovaných π -elektronů (viz Obr. 15) (*Ntoi et al. 2017*).



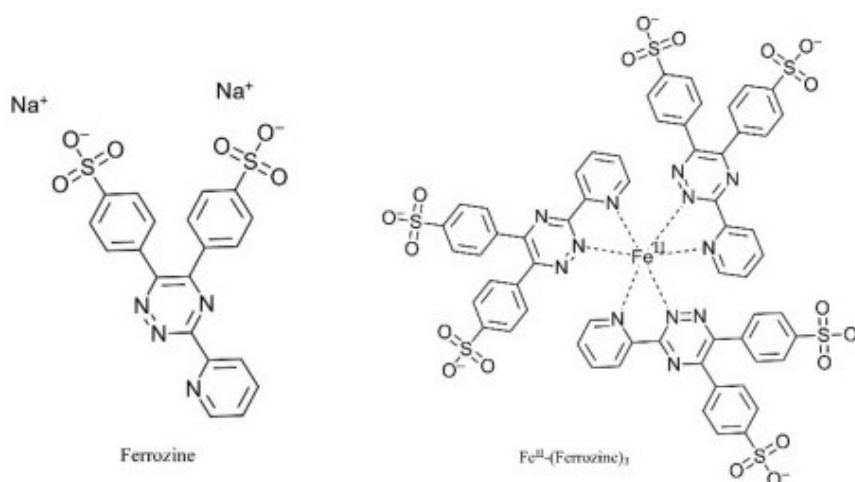
Obr. 15: Na levé straně schématu je znázorněn intramolekulární přesun protonů spojený se změnou barvy (nahore) a změna barvy způsobená ztrátou protonu (dole). Na pravé straně schématu je znázorněna změna barvy způsobená izomerizací komplexu dithizonu s kovem po absorpci elektromagnetického záření nebo po změně teploty. Převzato z *Ntoi et al. (2017)*.

Dithizon chelatuje mnohé kovy, nejčastěji kadmium, měď, rtuť, olovo, stříbro nebo zinek. Využívá se pro extrakci a kolorimetrickou analýzu těchto kovů. Nejvíce stálé komplexy tvoří se rtuť. Membrány s dithizonem se využívají pro citlivé a selektivní stanovení obsahu rtuti v pitné nebo užitkové vodě. Tato metoda je velmi rychlá a její výsledek lze zjistit pouhým

okem, případně spektrofotometricky. V přítomnosti rtuti dochází ke zbarvení intenzitou přímo úměrnou koncentraci rtuti ve vzorku. Aby nedocházelo k interferenci s dalšími kovy, je v membráně zároveň EDTA, která s ostatními kovy vytváří ve vodě rozpustné komplexy procházející póry membrány. Podobně se dithizon využívá také při sledování kontaminace vody stříbrem, případně dalšími kovy (*Takahashi et al. 2009, Wasukan et al. 2015*).

3.3.13 FERROZIN

Ferrozin je chromogenický chelátor syntetizovaný v roce 1970. Jedná se o nejčastější a nejpoužívanější indikátor železnatých iontů. Jeho výhodou je rozpustnost ve vodě, vysoká senzitivita, stabilita v širokém rozmezí pH a možnost vizuální, případně spektrofotometrické detekce. S železnatými ionty tvoří fialové komplexy v poměru 3 : 1, silně absorbující při 562 nm, zatímco se železitými ionty nereaguje. Tvorba komplexů byla dále zaznamenána také s ionty kobaltu, ruthenia nebo osmia. Vazba kovových iontů je umožněna díky konfiguraci skupiny $-N=C-C=N-$ (viz Obr. 16) (*Gibbs 1976, Smith et al. 2021*).



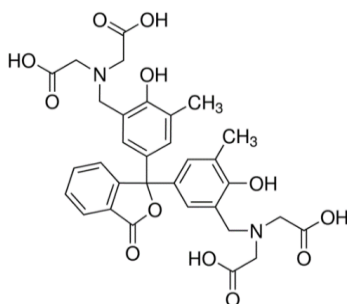
Obr. 16: Chemická struktura ferrozinu (vlevo) a tvorba komplexu s železnatými ionty ve stechiometrickém poměru 3 : 1 (vpravo). Převzato a upraveno dle *Smith et al. (2021)*.

Přestože ferrozin není biologicky aktivní látkou, široce se využívá k detekci i kvantifikaci železnatých iontů v biologických i nebiologických vzorcích. Ferrozin se také využívá ke sledování a měření míry redukce železa v biologických systémech (*Riemer et al. 2004, Cowart et al. 1993, Smith et al. 2021*).

3.3.14 O-KRESOLFTALEIN KOMPLEXON

O-kresolftalein komplexon (CPC) neboli o-kresolftalexon (Obr. 17) je posledním ze skupiny v této práci testovaných chromogenních chelátorů, tedy látek, které

navázáním kovového iontu mění barvu. Zároveň se jedná o metalochromní indikátor, který barevně reaguje také na změnu pH. Konkrétně je při hodnotě pH pod 6,5 bezbarvý, mezi 7 až 8 mírně narůžovělý a nad pH 11 je barva silně fialová až červená. CPC váže především ionty hořečnaté, vápenaté, barnaté a zinečnaté (*Anderegg et al. 1954, Manoranjitham a Narayanan 2019, Pollard a Martin 1956*).



Obr. 17: Chemický vzorec *o*-kresolftalein komplexonu. Převzato ze *SigmaAldrich.com* (10. 12. 2021).

Dříve se CPC využíval jako indikátor při komplexometrických titracích, v dnešní době se používá především jako činidlo pro detekci a stanovení kovů alkalických zemin, a to hlavně vápníku. Také je využíván jako adsorbent těžkých kovů při extrakci na pevné fázi. Moderní je jeho využití ve formě polymerizovaného CPC jako filmu, který pokrývá karbonové nanotrubic. Ty fungují jako elektrochemické senzory při experimentálním stanovení různých analytů (*Manoranjitham a Narayanan 2019, Manoranjitham a Narayanan 2021*).

Na trhu se CPC prodává jako souprava pod názvem VÁPŇÍK 600[®] firmou SKALAB s.r.o. jako kit pro kvantitativní spektrofotometrické stanovení vápenatých iontů v moči i v séru. V tomto kitu se zároveň nachází 8-hydroxychinolin, který zabraňuje případné interferenci s hořečnatými ionty. Vápenaté ionty reagují s CPC v alkalickém prostředí za vzniku fialového produktu, který absorbuje při maximu 578 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci vápníku ve vzorku (*skalab.cz 10. 12. 2021*).

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je nalezení potencionálního chelátoru kobaltu, který by mohl doplnit již klinicky užívané, ale málo účinné a málo selektivní látky v terapii intoxikace kobaltem. Jako zkoušené látky byly vybrány chelátory s již známou schopností vychytávat některé jiné kovy.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MATERIÁL

5.1.1 CHEMIKÁLIE

- chlorid kobaltnatý (CoCl₂)
- spektrofotometrický indikátor kobaltu: disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové (Na₂NFDSA)
- testované látky: klinicky, experimentálně nebo analyticky využívané chelátory kovů
 - ADR-925 (*nasyntetizováno na Katedře organické a bioorganické chemie FaF UK, doc. Roh a prof. Vávrová*)
 - ATTM
 - bathokuproin
 - ciklopirox
 - deferipron (*poskytnuto jak dar firmou Apotex*)
 - deferoxamin (*preparát Desferal[®]; Novartis s.r.o.*)
 - dexrazoxan
 - dithizon
 - DTPA
 - EGTA
 - ferrozin
 - *o*-kresolftalein komplexon
 - PIH (*dar prof. Richardsona, University of Sydney, Austrálie*)
 - SIH (*dar prof. Richardsona, University of Sydney, Austrálie*)
- chemikálie pro přípravu pufrů:
 - kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová (HEPES) a její sodná sůl (NaHEPES) pro přípravu HEPES pufrů o pH 7,5 a 6,8
 - kyselina octová a octan sodný pro přípravu acetátových pufrů o pH 4,5 a 5,5

Pokud není uvedeno v závorce jinak, výše zmíněné látky byly zakoupeny od *Sigma-Aldrich, Německo*.

- rozpouštědla:
 - dimethylsulfoxid (DMSO) zakoupen od *Lach-Ner, Česká republika*
 - superčistá voda připravena přístrojem Mili-Q RG od *Merck Millipore, Massachusetts, USA*. Všude, kde bude v dalším textu uvedena voda, je myšlena tato.

5.1.2 PŘÍSTROJE

- spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Hidex Sense Multimodal Microplate Reader (*Hidex, Turku, Finsko*)
- analytické váhy Kern ALT 220-4NM (*Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo*)
- vortex mixér IKA[®] Vortex Genius 3 (*IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo*)
- třepačka pro mikrotitrační destičky IKA[®] MS 3 digital (*IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo*)

5.1.3 DALŠÍ POMŮCKY

- automatické jednakanálové pipety: 10–100 μ l, 20–200 μ l, 100–1000 μ l, 0,5–5 ml (*Brand, Německo; Eppendorf, Německo*)
- multikanálová pipeta: 30–300 μ l (*Eppendorf, Německo*)
- mikrotitrační destičky: 96 jamek (*Brand, Německo*)
- mikrozkušavky a zkumavky: 1,5 ml, 2 ml, 5 ml, 15 ml (*Eppendorf, Německo*)
- špičky k pipetám: maximální objem 20 μ l, 200 μ l, 500 μ l, 5ml (*Eppendorf, Německo*)

5.2 METODIKA PRO TESTOVÁNÍ CHELÁTORŮ KOBALTU

5.2.1 PŘÍPRAVA PUFŘŮ

Pufry o pH 7,5 a 6,8 byly připraveny jako vodné roztoky HEPES a její sodné soli. Pufry obsahovaly vždy 15 mM soli. Pufř o pH 7,5 potom ještě 14,3 mM HEPES a pufř o pH 6,8 71,7 mM HEPES.

Pufry o pH 5,5 a 4,5 byly připraveny jako vodné roztoky kyseliny octové a octanu sodného. Pufry obsahovaly vždy 15 mM octanu sodného. Pufř o pH 5,5 potom ještě 2,7 mM kyseliny octové a pufř o pH 4,5 27,3 mM kyseliny octové.

5.2.2 PŘÍPRAVA ZÁKLADNÍCH ROZTOKŮ

Základní roztok chloridu kobaltnatého (CoCl_2) o koncentraci 5 mM byl připraven rozpuštěním navážky CoCl_2 (M_w 129,84 g/mol) v odpovídajícím objemu vody.

Základní roztok indikátoru – disodné soli kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové (Na_2NFDSA) o koncentraci 5 mM byl připraven rozpuštěním navážky Na_2NFDSA (M_w 377,25 g/mol) v odpovídajícím objemu vody.

Moravcová (2020) provedla u těchto činidel zkoušky stability, které potvrdily, že roztoky jsou dostatečně stabilní. Základní roztoky byly tedy z ekonomického hlediska připravovány pro potřeby experimentu ve větším množství a skladovány po dobu 1–2 měsíců.

Základní roztoky testovaných látek byly připraveny vždy v případě potřeby, a to rozpuštěním navážky dané látky v rozpouštědle dle charakteru látky.

- 5 mM roztok ADR-925 (M_w 304,30 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky ve vodě
- 5 mM roztok ATTM (M_w 260,28 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky ve vodě, 30 mM roztok ATTM byl z důvodu nízké rozpustnosti připraven rozpuštěním v DMSO
- 30 mM roztok bathokuproinu (M_w 360,45 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky v DMSO
- 30 mM roztok ciklopiroxu (M_w 207,27 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky v DMSO
- 10 mM roztok deferipronu (M_w 139,15 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky ve vodě, 30 mM roztok byl z důvodu nízké rozpustnosti připraven rozpuštěním v DMSO
- 30 mM roztok deferoxaminu (M_w 560,69 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky ve vodě
- 30 mM roztok dexrazoxanu (M_w 268,27 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky v DMSO
- 10 mM roztok dithizonu (M_w 256,33 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky v DMSO
- 5 mM roztok DTPA (M_w 393,35 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky ve vodě

- 30 mM roztok EGTA (M_w 380,35 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky v DMSO
- 30 mM roztok ferrozinu (M_w 514,40 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky ve vodě
- 30 mM roztok *o*-kresolftalein komplexonu (M_w 636,60 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky v DMSO
- 30 mM roztok PIHu (M_w 286,29 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky v DMSO
- 10 mM roztok SIHu (M_w 241,24 g/mol) byl připraven rozpuštěním navážky v DMSO

5.2.3 PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ

Ze základního roztoku CoCl_2 byl zředěním vodou připraven pracovní roztok o koncentraci 300 μM .

Ze základního roztoku Na_2NFDSA byl zředěním vodou připraven roztok o koncentraci 1,8 mM.

Pracovní roztoky testovaných látek byly připraveny naředěním základních roztoků do požadovaných koncentrací.

5.2.4 EXPERIMENTÁLNÍ STANOVENÍ CHELATACE KOBALTU

Před samotným experimentálním stanovením byly připraveny zásobní roztoky CoCl_2 , Na_2NFDSA a jednotlivých testovaných látek dle kapitoly 5.2.2, které byly následně rozředěny na potřebné množství pracovních roztoků dle kapitoly 5.2.3.

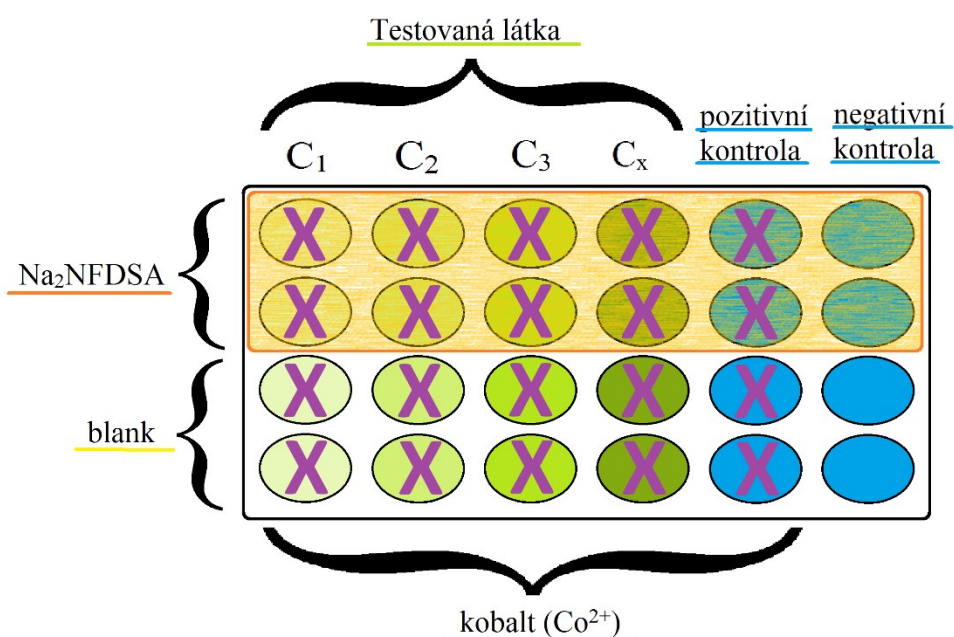
Příprava mikrotitrační destičky byla prováděna vždy čtyřikrát, a to při čtyřech různých pH: 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5. Kromě pufru byl obsah těchto destiček totožný.

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo postupně pipetováno: (viz Obr. 18)

- 150 μl odpovídajícího pufru (pH 7,5; 6,8; 5,5 nebo 4,5)
- 50 μl testované látky v různých koncentracích (c_1 – c_x), do každého sloupce jiná hodnota koncentrace, a do posledních dvou sloupců (pozitivní a negativní kontrola) 50 μl rozpouštědla (DMSO nebo vody v závislosti na rozpustnosti testované látky)
- 50 μl roztoku CoCl_2 do všech jamek mimo posledního sloupce (negativní kontrola), do posledního sloupce byl napipetován stejný objem vody

Destička byla následně vložena do třepačky, kde se nechala třepat při nízkých otáčkách po dobu 1 minuty. Po protřepání bylo nejprve přidáno do posledních dvou řádků (slepé vzorky) 50 μl vody a jako poslední byl do horních dvou řádků ve stejném objemu přidán indikátor Na_2NFDSA . Výsledná koncentrace indikátoru v jamce byla 300 μM . Výsledný objem každé jamky byl 300 μl .

Po přidání indikátoru byla ihned měřena absorbance při vlnových délkách 490 a 540 nm v čase 0 a v čase 5 minut. U pH 4,5 byla pro pomalejší tvorbu komplexů měřena absorbance ještě v čase 10 minut.



Obr. 18: Schematické znázornění mikrotitrační destičky po napipetování všech reagensů. Ve všech jamkách se nachází pufr, dále v příslušných sloupcích testovaná látka v různých koncentracích (na obrázku znázorněna odstíny zelené barvy) a rozpouštědlo testované látky ve sloupcích pozitivní a negativní kontroly (znázorněno modrou barvou). Kobaltnaté ionty (znázorněny fialovým křížkem) ve formě CoCl_2 jsou přidány do všech jamek mimo sloupec negativní kontroly, kde je místo kobaltu jeho rozpouštědlo – voda. Po protřepání je do spodních dvou řádků přidána voda – slepé vzorky (blank), a do horních dvou řádků indikátor Na_2NFDSA (znázorněn oranžovým obdélníkem).

Při každém měření je nastavena jedna ze 4 hodnot pH, které odpovídají pH v různých částech organismu za fyziologických nebo patofyziologických podmínek. Následně je nejprve k testované látce (chelátoru) přidán kobalt. Ve třepačce se chelátor s kobaltem mísí a reaguje.

Testovaná látka, v případě, že je schopna kobalt chelátovat, vychytává a váže ionty kobaltu. Samotný indikátor s kobaltnatými ionty reaguje za vizuální změny zbarvení ze žlutého na oranžové. Po přidání indikátoru k již vzniklým komplexům reaguje indikátor pouze s volným (tedy nevázaným) kobaltem, a to za předpokladu, že jsou vzniklé cheláty testované látky dostatečně stabilní a indikátor je z komplexu nedokáže zpětně vyvázat.

Podle míry zbarvení můžeme pak pouhým okem odhadnout, nebo přesně pomocí spektrofotometru změřit, jakou mírou je kobalt testovanou látkou vychytáván a kolik volných iontů kobaltu v roztoku zůstalo. Žluté zbarvení volného indikátoru ukazuje na to, že již nejsou k dispozici kobaltnaté ionty a jedná se tedy o silný chelátor v dostatečné koncentraci. Naopak oranžové zbarvení komplexu indikátor-kobalt dokazuje nedostatečně silný chelátor, příliš nízkou koncentraci nebo dokonce látku, která s kobaltem vůbec komplexy netvoří.

5.3 MATEMATICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Po změření absorbance bylo provedeno matematické a statistické vyhodnocení. Každý sloupec mikrotitrační destičky obsahoval 4 jamky, z toho vždy dvě jamky byly svým složením totožné a naměřené hodnoty tak bylo možné zprůměrovat.

Množství nevychyteného kobaltu bylo vypočítáno jako poměr rozdílu absorbancí jednotlivých testovaných vzorků s indikátorem (A_x) a bez indikátoru (A_{blank}) a rozdílu absorbancí ve vzorcích pozitivních kontrol ($A_{poz. kontrola}$). Byla provedena také korekce absorbance indikátoru odečtením rozdílu absorbancí negativních kontrol ($A_{neg. kontrola}$), kdy v obou případech jak pozitivní, tak negativní kontroly rozdíl absorbancí znamená, že od kontroly s indikátorem je odečten její odpovídající slepý vzorek bez indikátoru.

Množství nevychyteného kobaltu bylo následně převedeno na procentuální míru chelatace dané látky. Celý výpočet je znázorněn v následující rovnici 2.

$$\% \text{ chelatace} = 1 - \frac{A_x - \bar{x} A_{blank} - \text{korekce indikátoru}}{\bar{x} (A_{poz.kontrola} - \bar{x} A_{poz.kontrola,blank} - \text{korekce indikátoru})} \times 100$$

$$\text{korekce indikátoru} = \bar{x} (A_{neg.kontrola} - \bar{x} A_{neg.kontrola,blank})$$

Rovnice 2: Rovnice pro výpočet procentuální míry chelatace testované látky. A_x = absorbance testované látky v dané koncentraci s indikátorem, A_{blank} = absorbance slepého vzorku (testovaná látka bez indikátoru), $A_{poz.kontrola}$ = absorbance pozitivní kontroly

s indikátorem (vzorek s kobaltem), $A_{\text{poz.kontrola,blank}}$ = absorbance pozitivní kontroly bez indikátoru, $A_{\text{neg.kontrola}}$ = absorbance negativní kontroly s indikátorem (vzorek bez kobaltu) $A_{\text{neg.kontrola,blank}}$ = absorbance negativní kontroly bez indikátoru, \bar{x} = aritmetický průměr.

Procentuální míra chelatace byla vypočtena pro vlnové délky 490 a 540 nm a pro časy 0 a 5 minut (v případě pH 4,5 také v čase 10 minut). Z těchto údajů byly dále vypočteny rozdíly v chelataci u jednotlivých vlnových délek a rozdíly v čase, tedy stabilita komplexů v čase.

Výsledky jsou dále prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka. Výpočet směrodatné odchylky v rovnici 3.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Rovnice 3: Výpočet směrodatné odchylky (s). x = naměřené hodnoty, \bar{x} = aritmetický průměr naměřených hodnot, n = počet měření.

Rozdíly v chelataci jednotlivých zkoušených látek byly hodnoceny pomocí 95% konfidenčních intervalů. Konfidenční intervaly, stejně jako další grafy, byly připraveny pomocí programu GraphPad Prism, verze 9.1.0 pro Windows (*GraphPad Software, San Diego California, USA*).

6 VÝSLEDKY

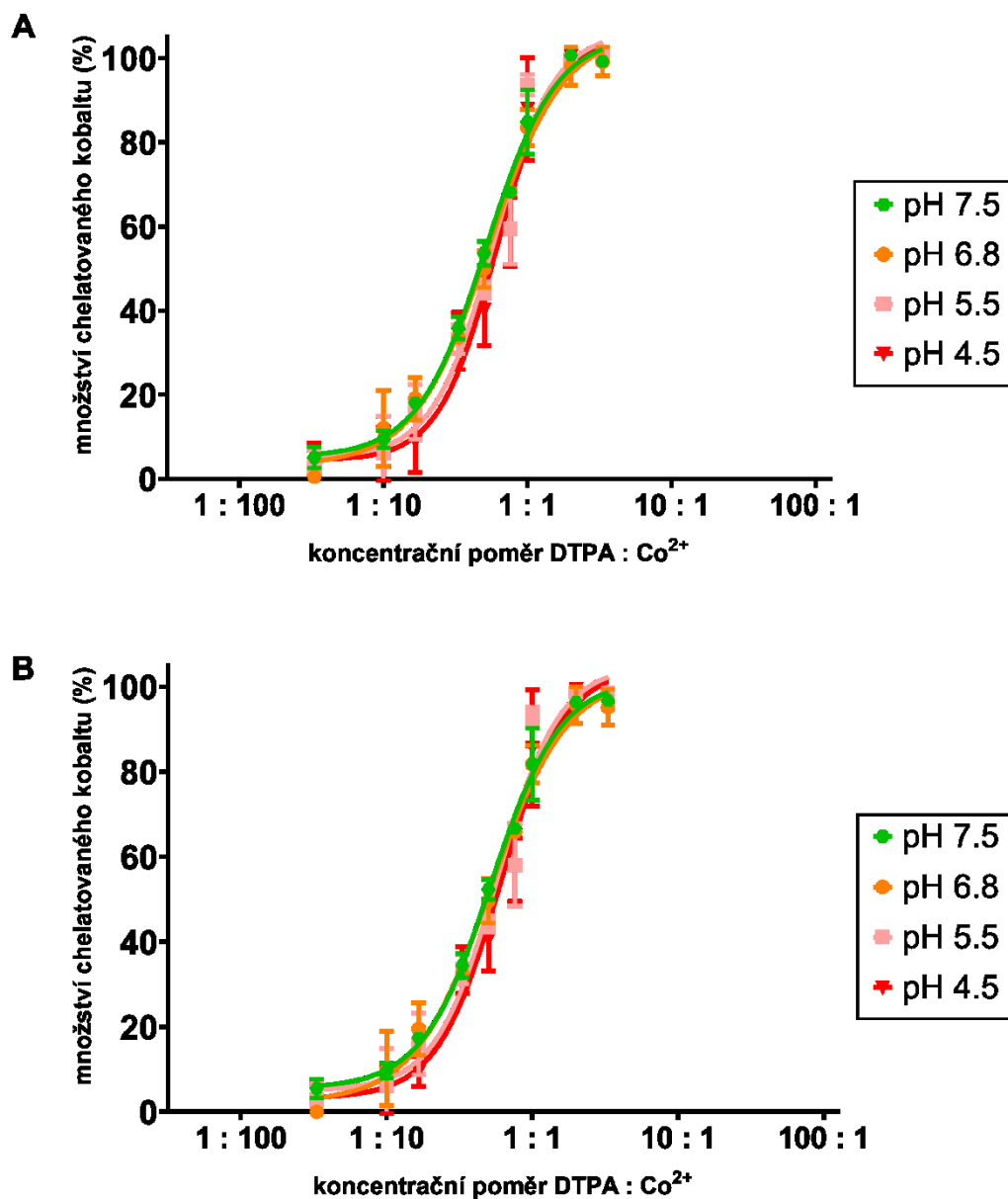
Metodou popsanou v kapitole 5.2.5 bylo testováno celkem 14 již známých chelátorů kovů: ADR-925, ATTM, bathokuproin, ciklopirox, deferipron, deferoxamin, dexrazoxan, dithizon, DTPA, EGTA, ferrozin, *o*-kresolftalein komplexon, PIH a SIH. Byla hodnocena míra chelatace látek v závislosti na koncentračním poměru chelátor : kobalt při jednotlivých hodnotách pH. Dále byla hodnocena stabilita komplexů v čase a také byly porovnány testované látky mezi sebou.

Všechny testované látky byly do jisté míry, alespoň při některých hodnotách pH, schopné chelatovat kobalt. Mezi nejlépe a nejvýrazněji chelatující látky patřily DTPA, ADR-925, PIH, SIH a ATTM (viz Obr. 32–38). DTPA (Obr. 19) vychytala při koncentračním poměru 1 : 1 (chelátor : kobalt) až 80 % volného kobaltu, 100% chelatace bylo dosaženo již při koncentračním poměru cca 2 : 1. Z těchto výsledků nelze odhadnout stechiometrii, chelatace cca 2/3 iontů v poměru 1 : 1 by znamenala poměr 3 : 2 (DTPA : kobalt), ale nalezená chelatace byla při tomto poměru nižší, což spíše naznačuje nižší afinitu. Ve vyšších poměrech je ale evidentně tento chelátor schopen plně chelatovat všechny přítomné ionty kobaltu. Podobné účinnosti dosahoval také ADR-925 (Obr. 20), u kterého bylo při poměru 1 : 1 vychytáno asi 60 % kobaltu. Tady je tedy poměr 3 : 2 pravděpodobnější. PIH (Obr. 21) při koncentračním poměru 1 : 1 chelatoval asi 30 % kobaltu, tedy stechiometrický poměr jeho komplexů bude pravděpodobně 3 : 1 (PIH : kobalt). PIH má ale evidentně nižší afinitu ke kobaltnatým iontům, protože 100% chelatace dosahoval až při vysokém koncentračním poměru 100 : 1. DTPA, ADR-925 a PIH nejeví žádné výrazné rozdíly mezi jednotlivými hodnotami pH. Naopak u SIHu (Obr. 22) jsou v chelataci při různých pH výrazné rozdíly. Zatímco při pH 7,5 a 6,8 je při poměru 1 : 1 zchelatováno asi 50 % kobaltu, při pH 5,5 je to 30 % a při pH 4,5 už jen asi 5 %. 100% chelatace u SIHu nebylo dosaženo. Maximální dosažená chelatace byla asi 80 % kobaltu, při pH 4,5 cca 70 %. U ATTM (Obr. 23) byla pozorována významnější chelatace až při vyšších koncentracích než u již zmíněných látek, při poměru 1 : 1 bylo vychytáno pouze 10–20 % kobaltu, 100% chelatace bylo ale dosaženo dříve než u PIHu, a to při poměru cca 10 : 1.

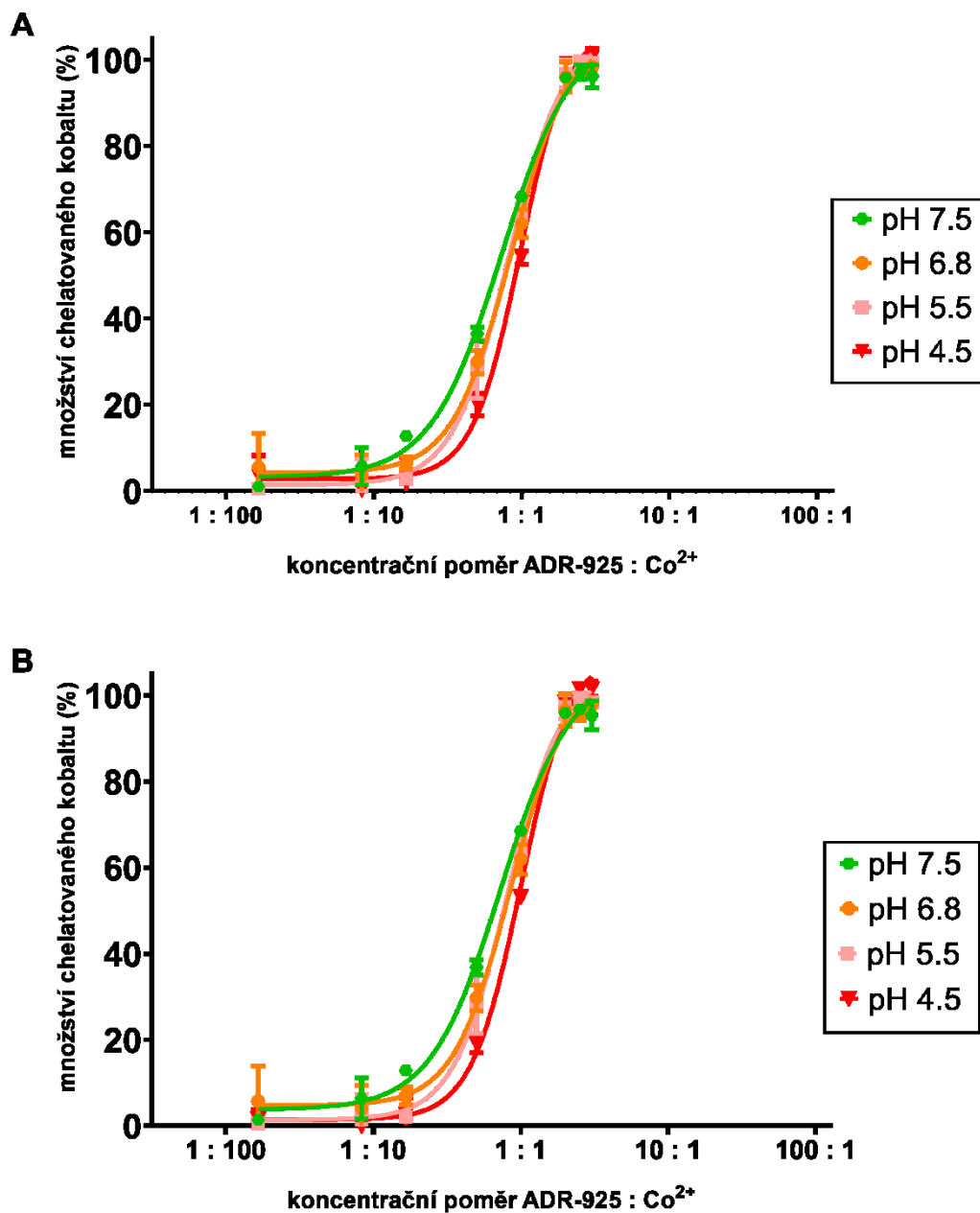
Další látky, které vykazovaly významnější míru chelatace jsou ferrozin, CPC a dithizon (viz Obr. 32–38). Ferrozin (Obr. 24) chelatoval při poměru 1 : 1 asi 20 % kobaltu a při poměru 100 : 1 dosahoval maximálně asi 80 %. Rozdílná byla chelatace při pH 4,5, která se projevila až při poměru nad 10 : 1. Maxima bylo ale dosaženo stejně jako u ostatních pH. CPC (Obr. 25) výrazněji chelatoval až při vyšších koncentračních poměrech, při poměru 1 : 1 byla chelatace

pouze kolem 10 %, avšak při poměru 100 : 1 dosahovala až 80 %. Specifická pro CPC byla vyšší míra chelatace v kyselějším prostředí, u ostatních látek tomu bylo spíše naopak. Dithizon (Obr. 26) při poměru 1 : 1 a při pH 7,5 a 6,8 chelatoval asi 30 % kobaltu. Při pH 4,5 byla chelatace nulová. Maximální naměřená chelatace byla kolem 40 %, a to při koncentračním poměru 2,5 : 1. Vyšší koncentrace nebyly měřeny z důvodu vysoké absorpce samotného dithizonu, která už interferovala s měřením.

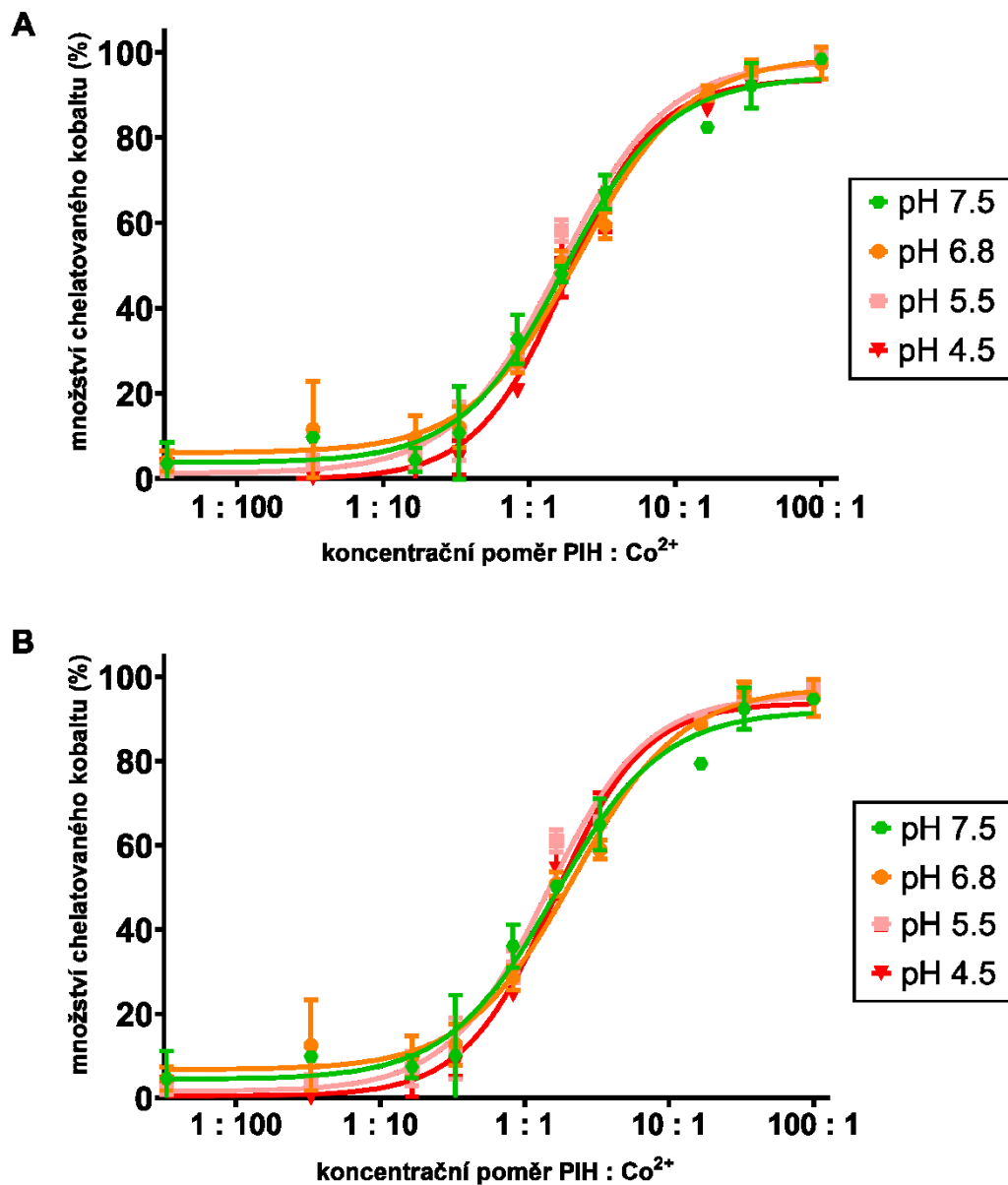
Nevýznamnou nebo jen málo významnou chelataci vykazovaly bathokuproin, ciklopirox, deferipron, deferoxamin, dexrazoxan a EGTA (viz Obr. 32–38). Bathokuproin, ciklopirox, deferipron a deferoxamin (Obr. 27–30) chelatovaly při poměru 100 : 1 maximálně kolem 20–30 % kobaltu. U deferoxaminu byla navíc chelatace při pH 4,5 nulová. Dexrazoxan (Obr. 30) chelatoval pouze při pH 7,5 a to až ve vysokém koncentračním poměru 100 : 1 asi 40 % kobaltu. U EGTA (Obr. 31) byla při poměru 1 : 1 chelatace téměř nulová, ke zvýšení došlo pouze při pH 4,5.



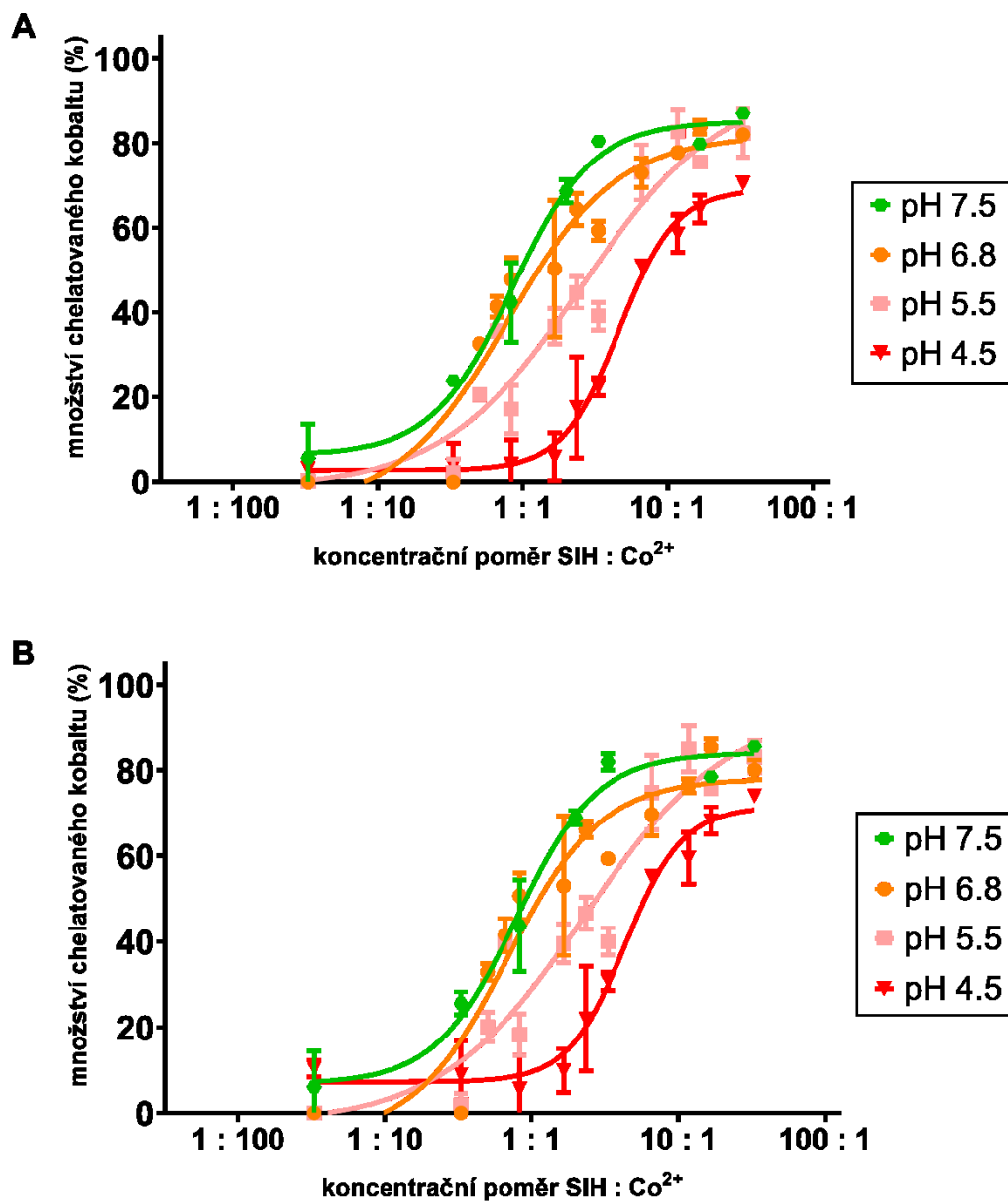
Obr. 19: Graf chelatační aktivity jedné z nejlépe chelatujících testovaných látek, DTPA. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



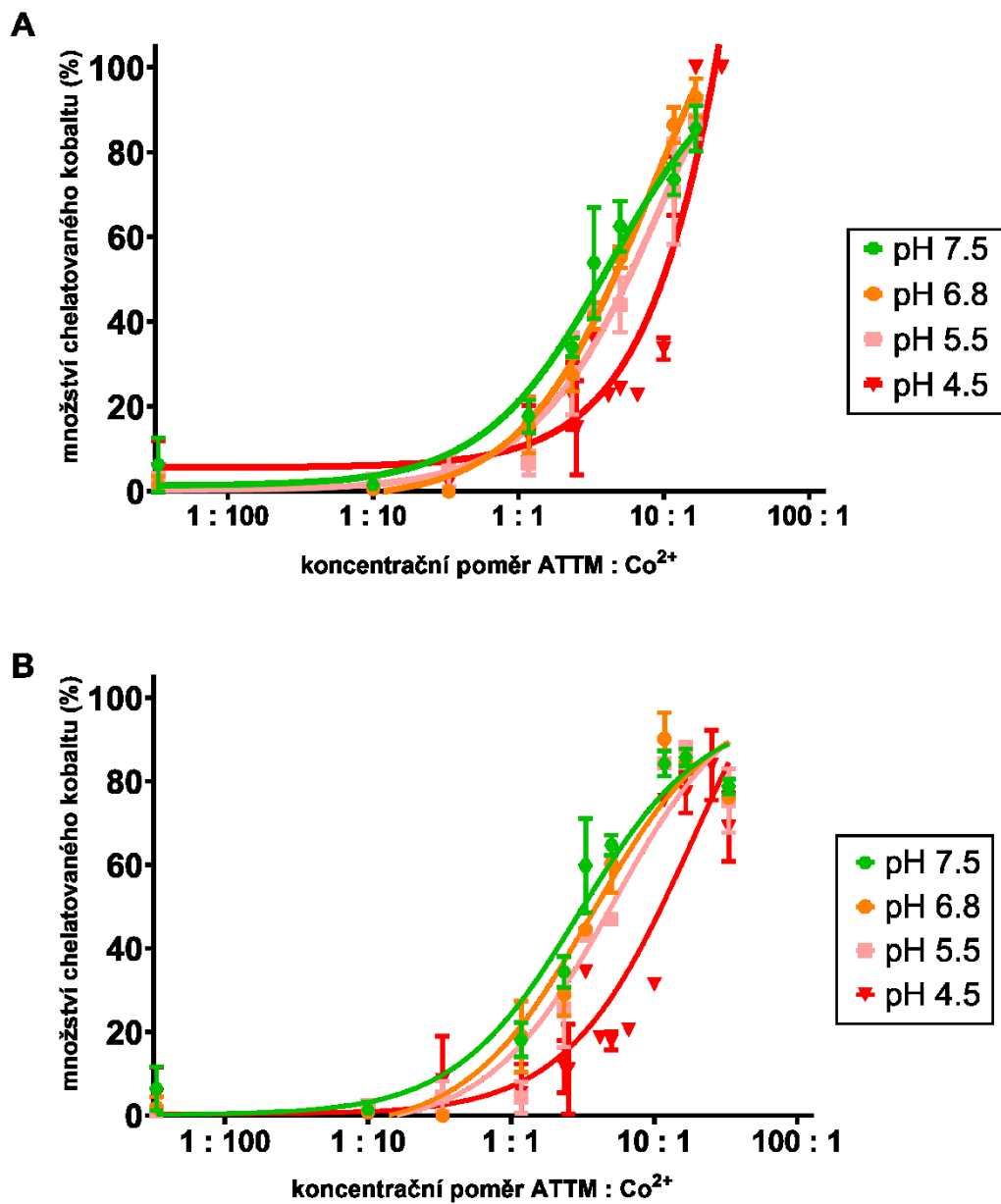
Obr. 20: Graf chelatační aktivity ADR-925. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



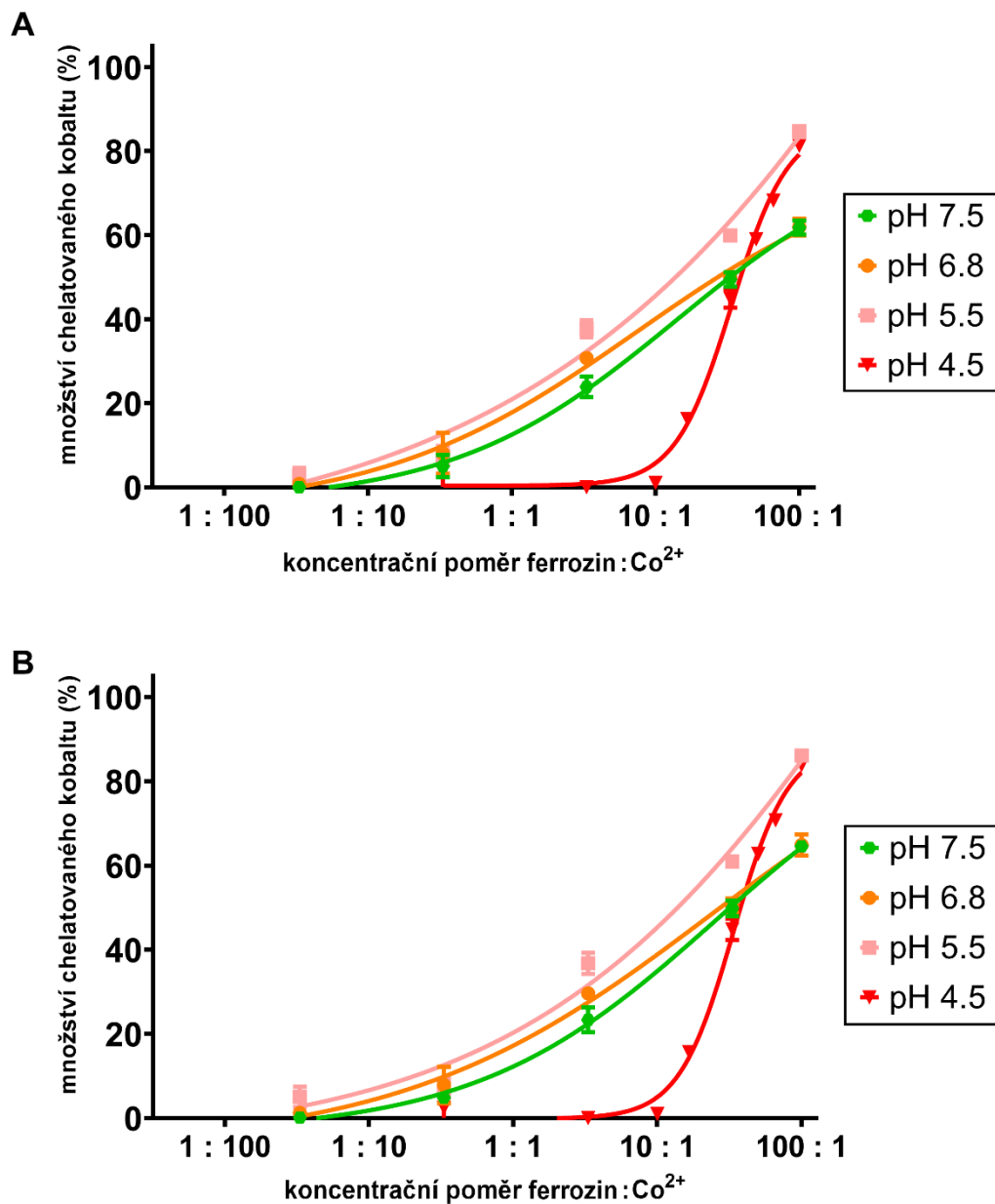
Obr. 21: Graf chelatační aktivity PIHu. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



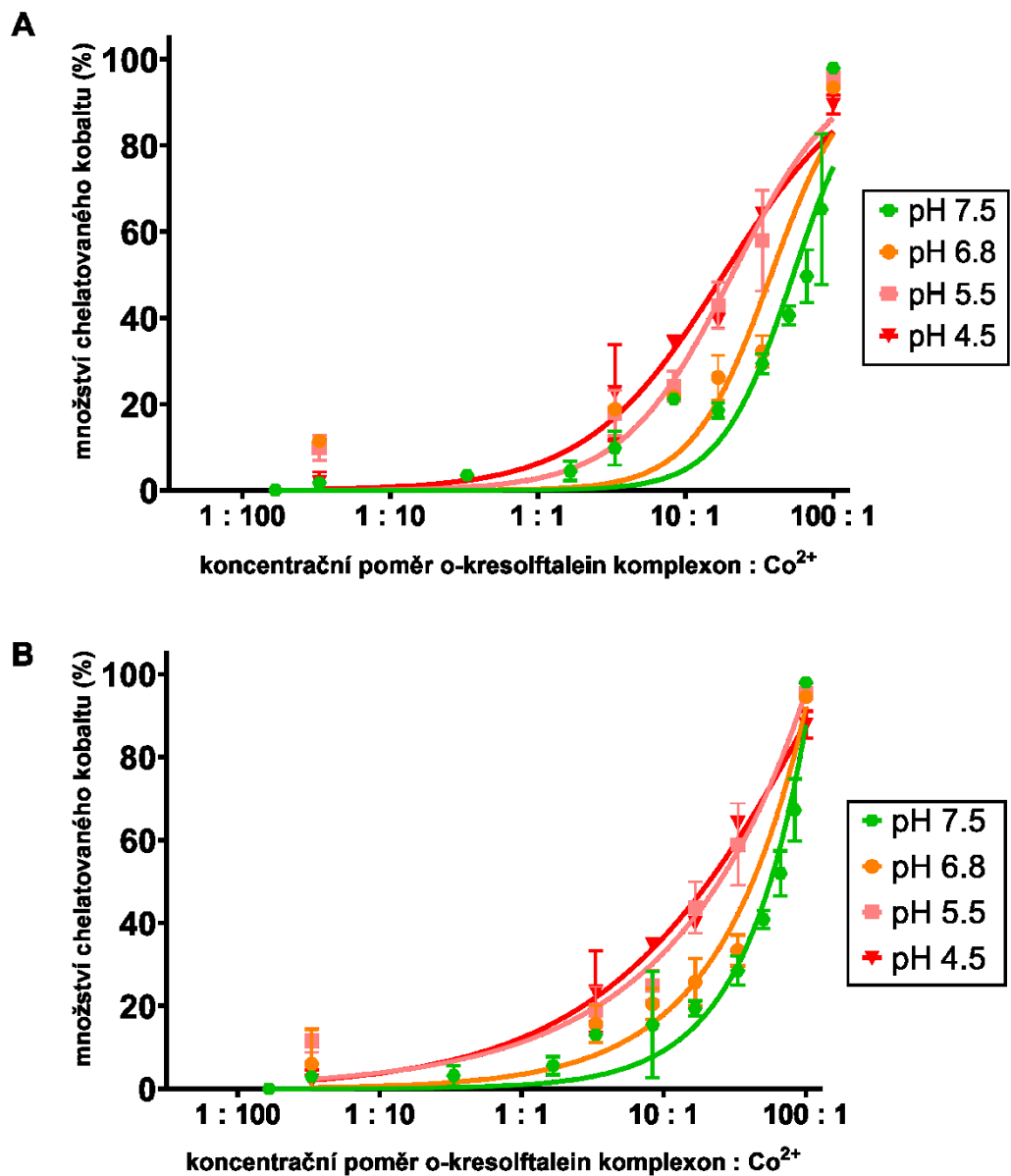
Obr. 22: Graf chelatační aktivity SIHu. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



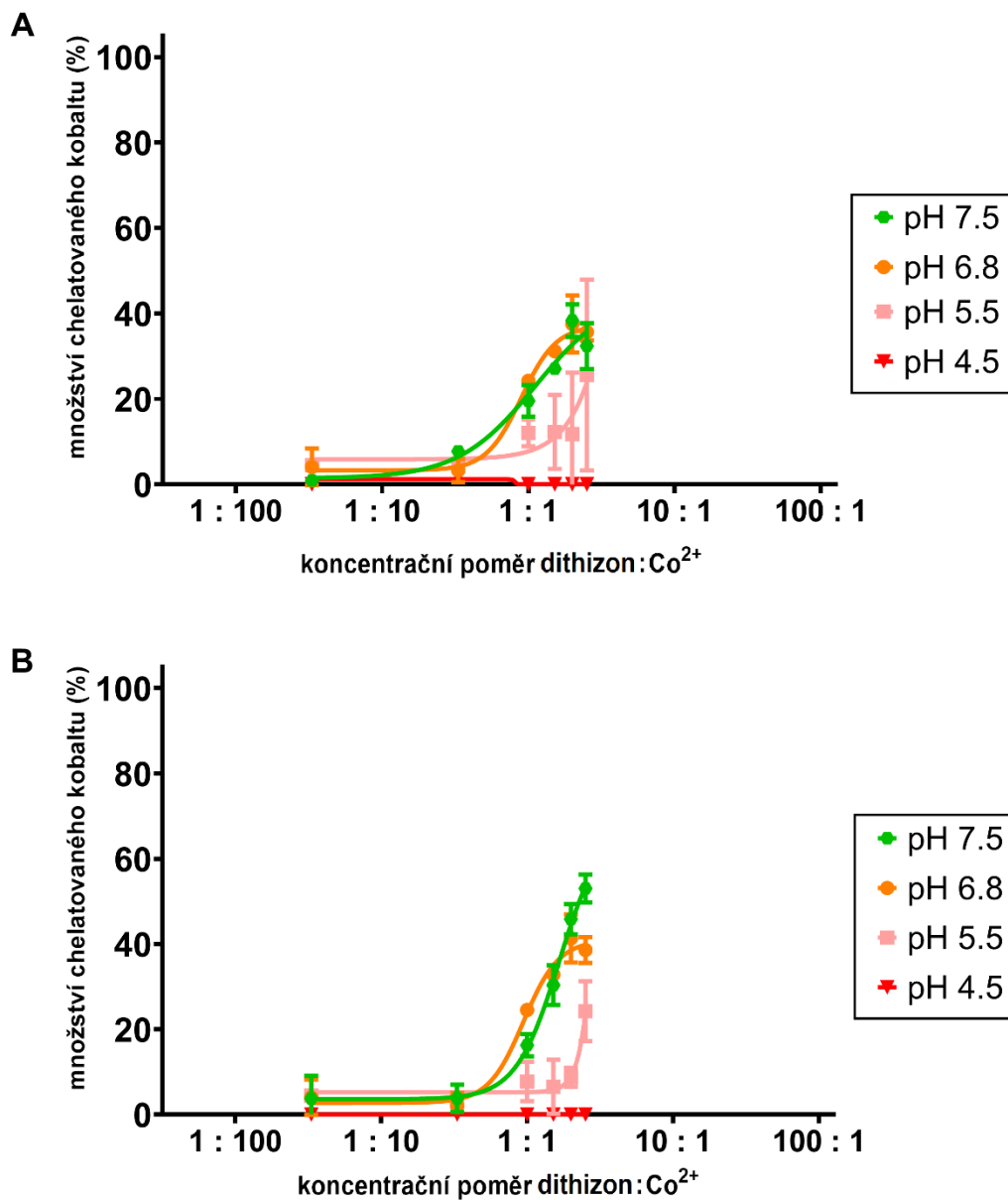
Obr. 23: Graf chelatační aktivity ATTM. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



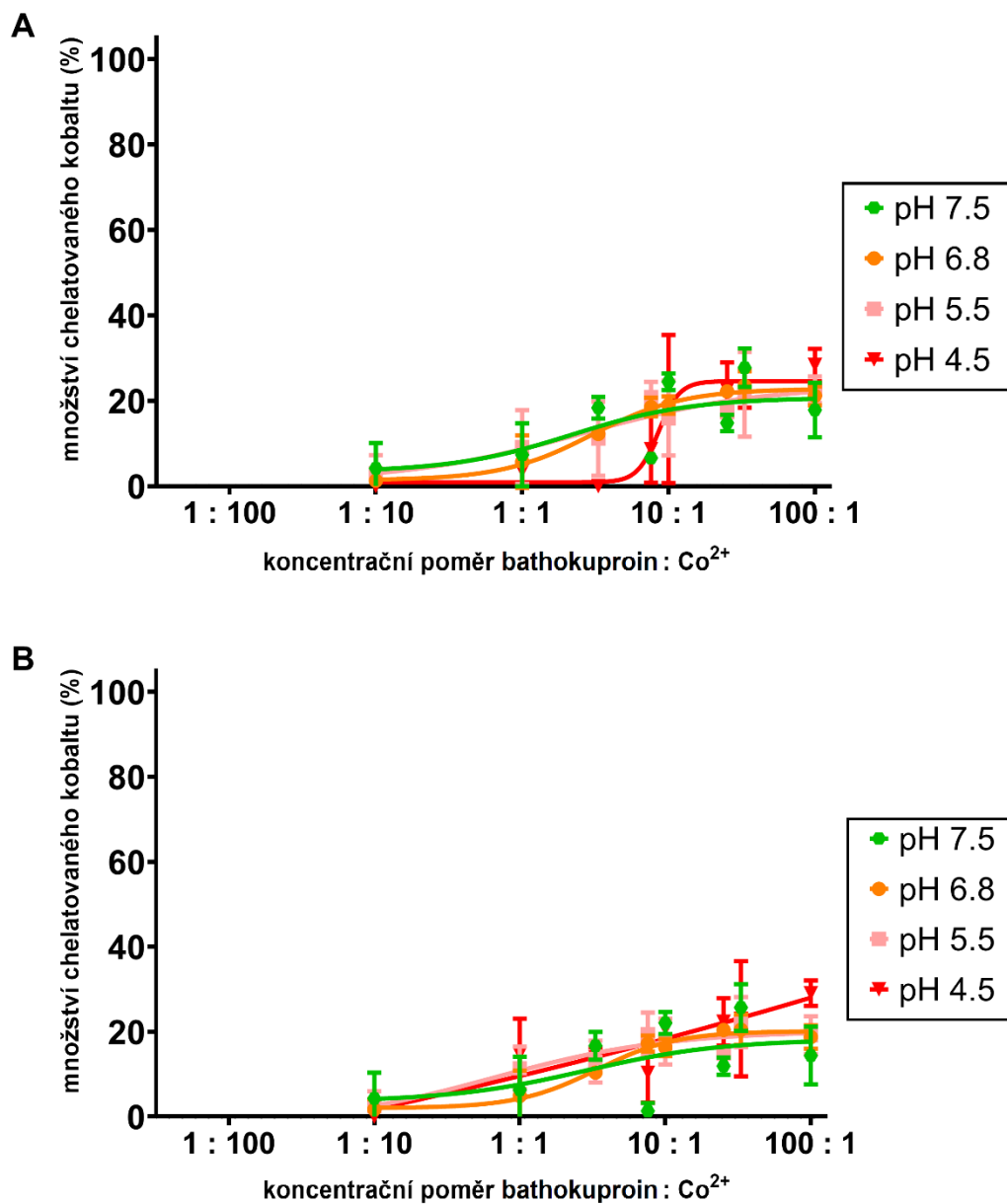
Obr. 24: Graf chelatační aktivity ferrozínu. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



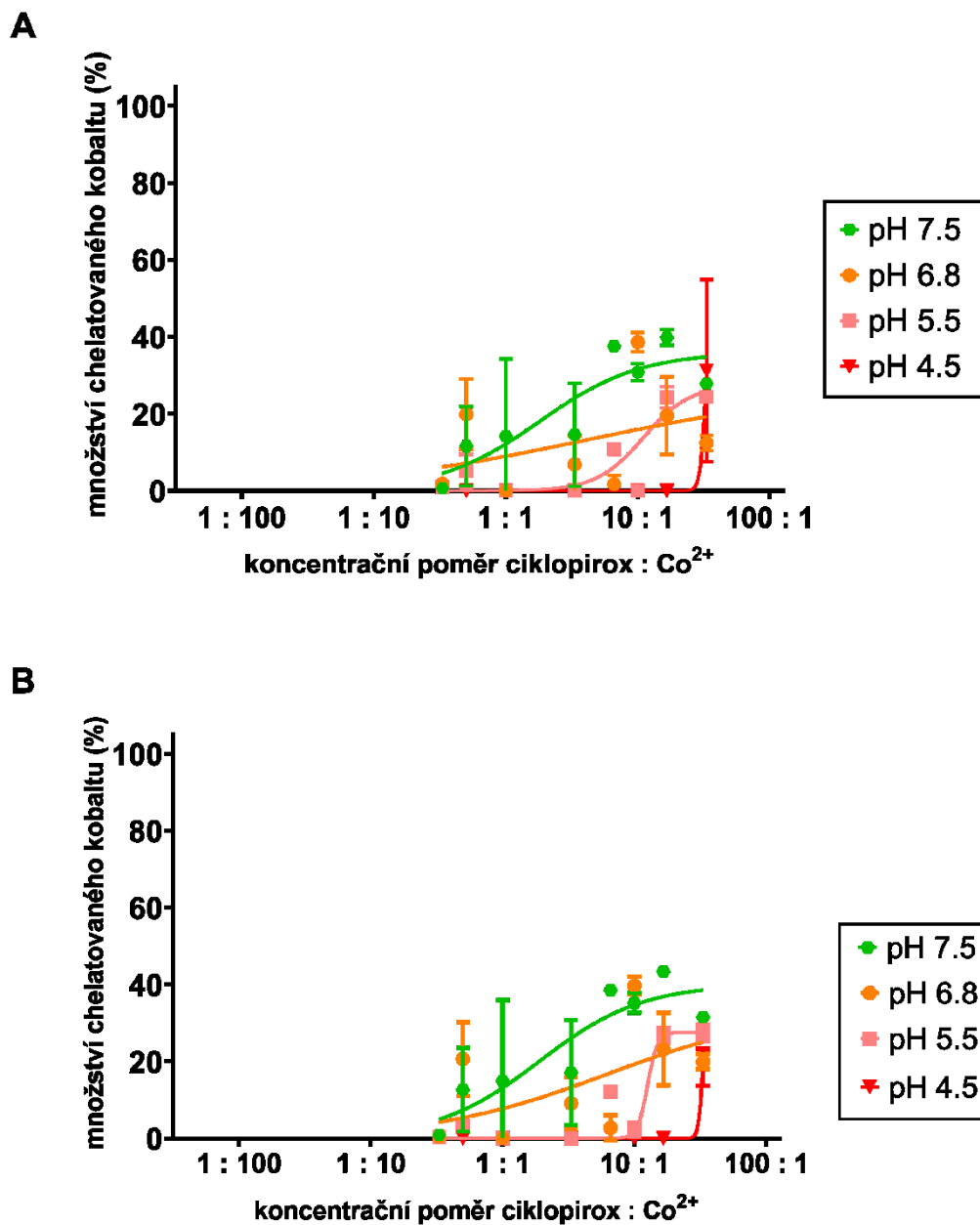
Obr. 25: Graf chelatační aktivity *o*-kresolftalein komplexonu. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



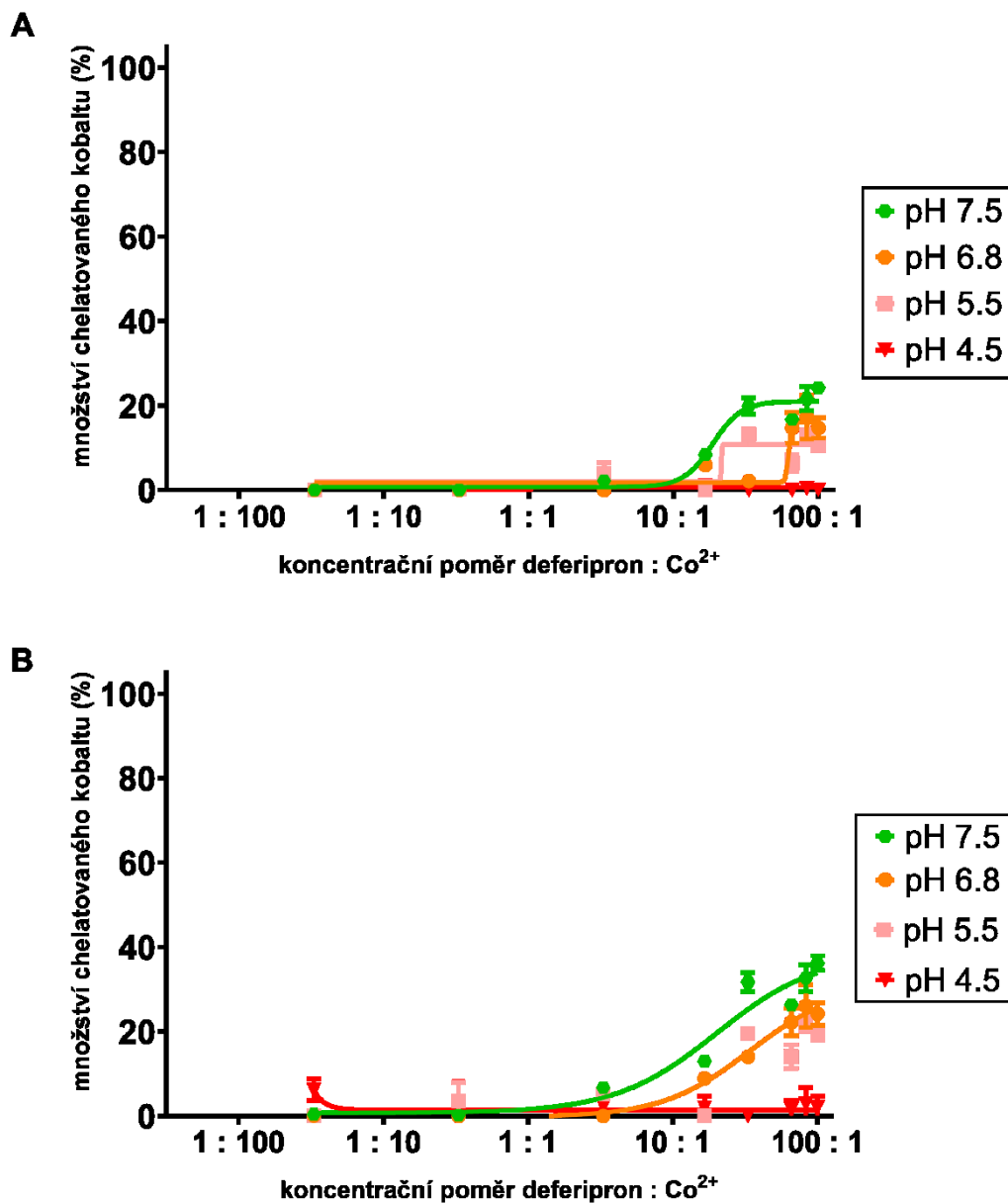
Obr. 26: Graf chelatační aktivity dithizonu. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



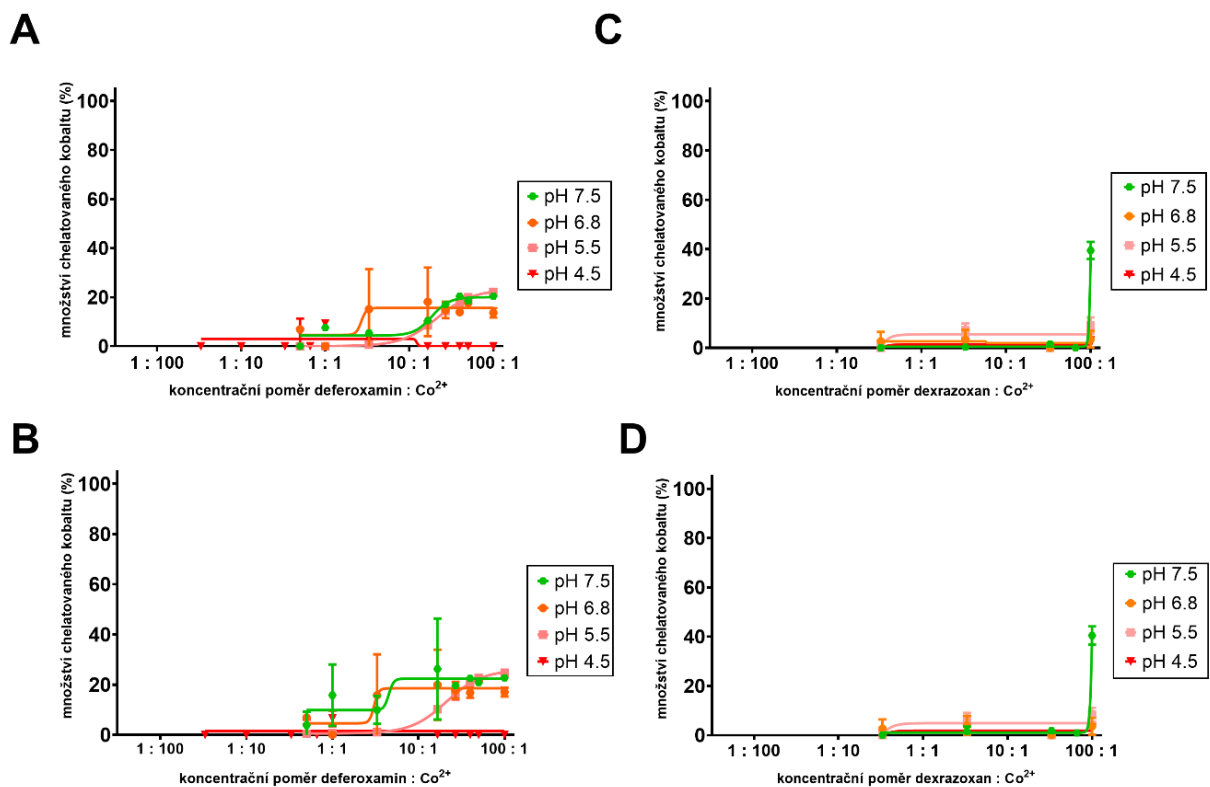
Obr. 27: Graf chelatační aktivity bathokuproinu. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



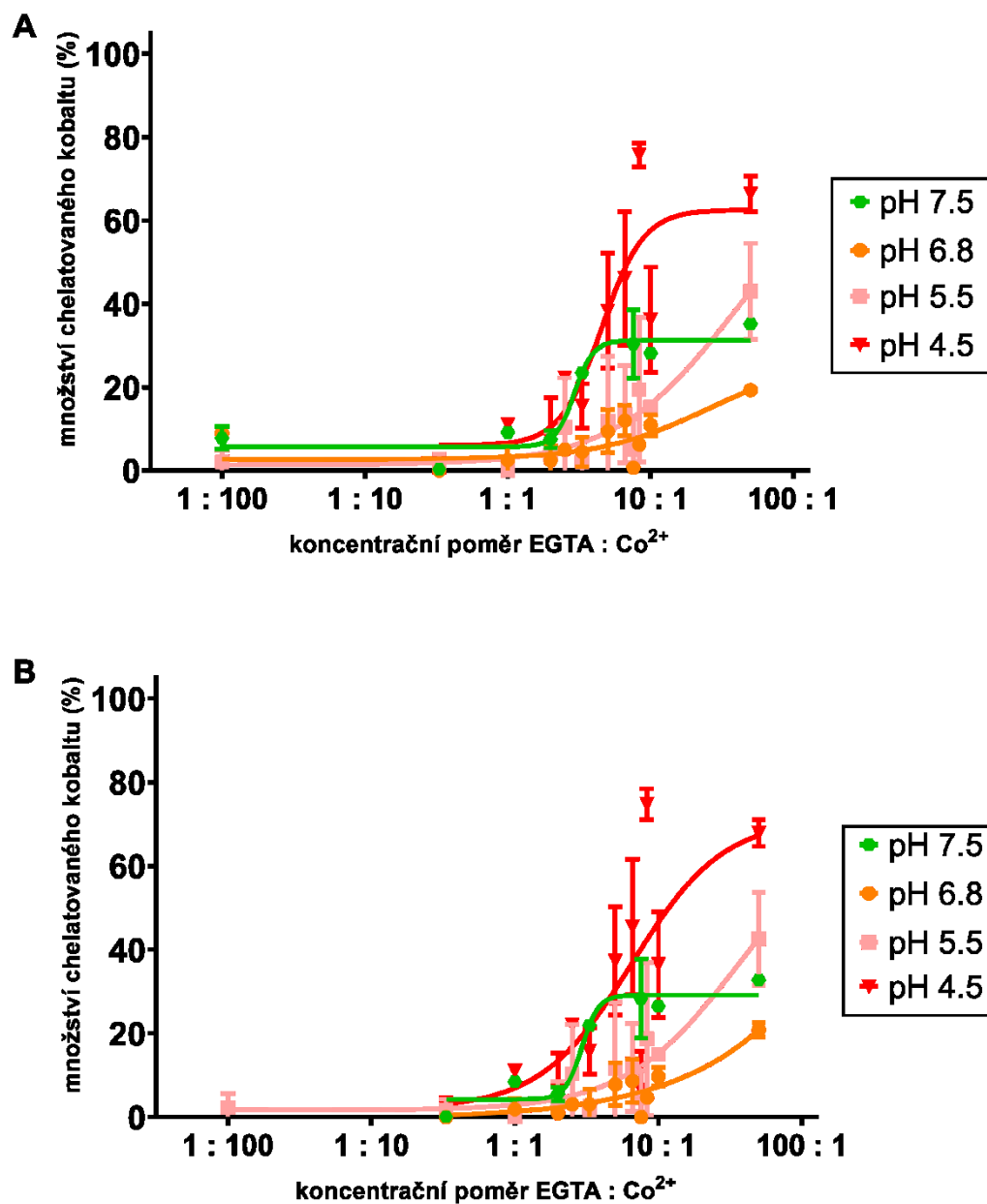
Obr. 28: Graf chelatační aktivity ciklopiroxu. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



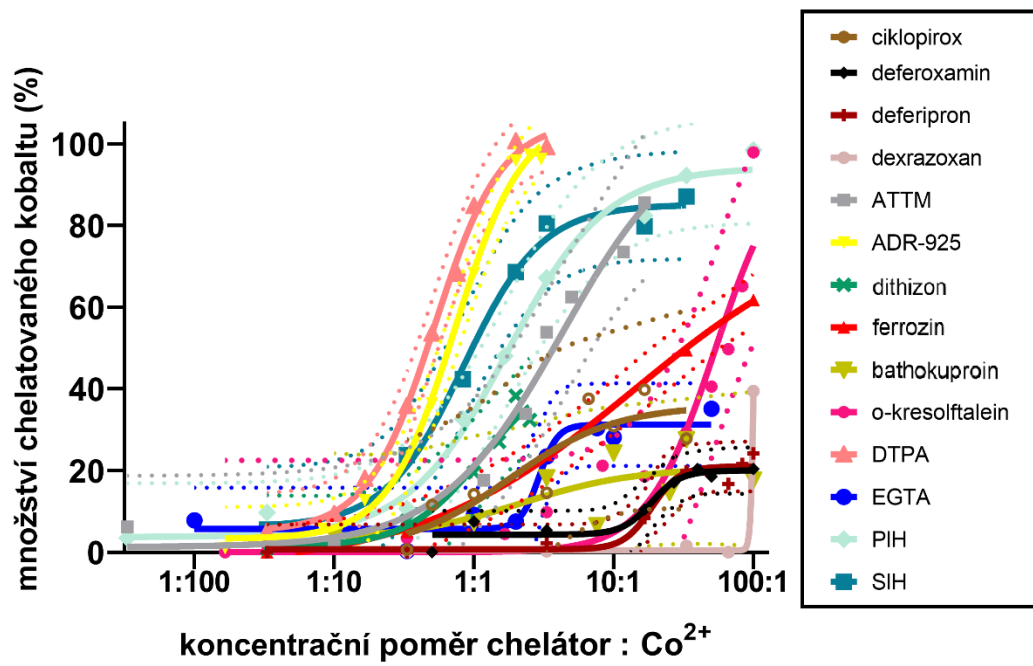
Obr. 29: Graf chelatační aktivity deferoxaminu. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



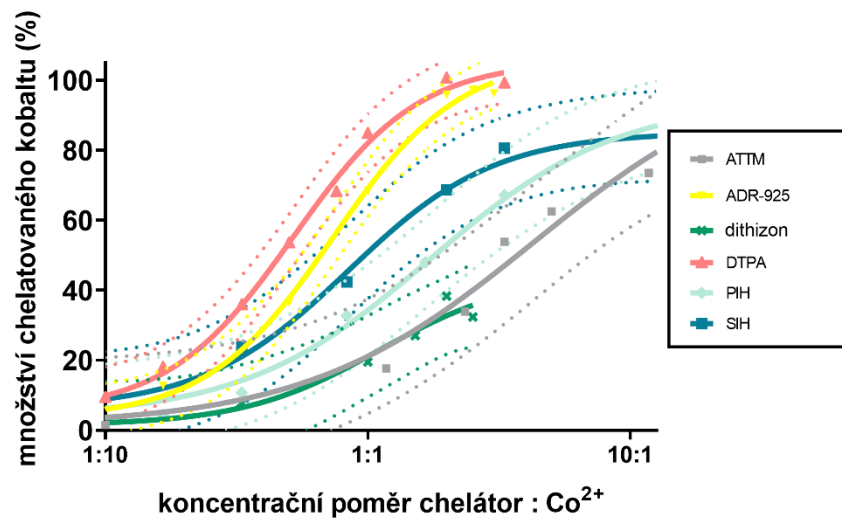
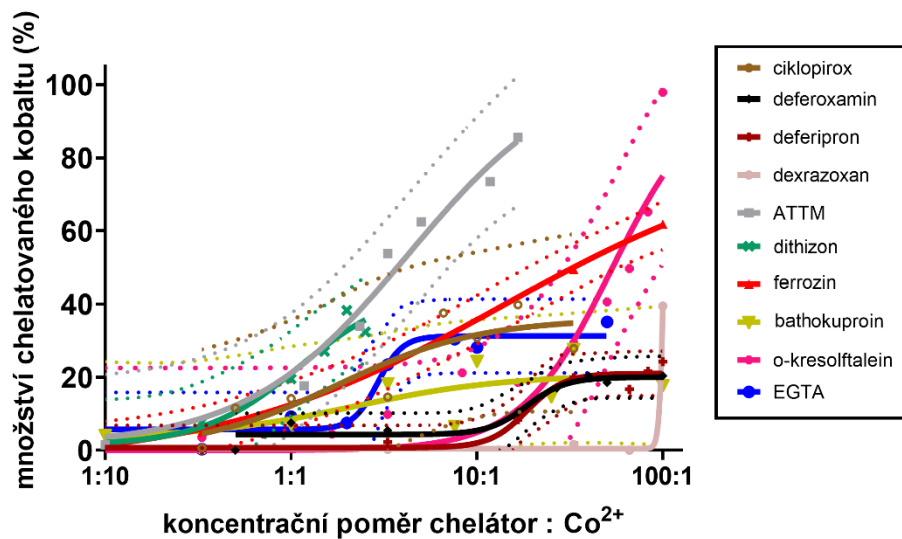
Obr. 30: Graf chelatační aktivity málo chelatujících látek deferoxaminu (**A**, **B**) a dexrazoxanu (**C**, **D**). Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**, **C**: 490 nm a **B**, **D**: 540 nm, v čase 5 minut.



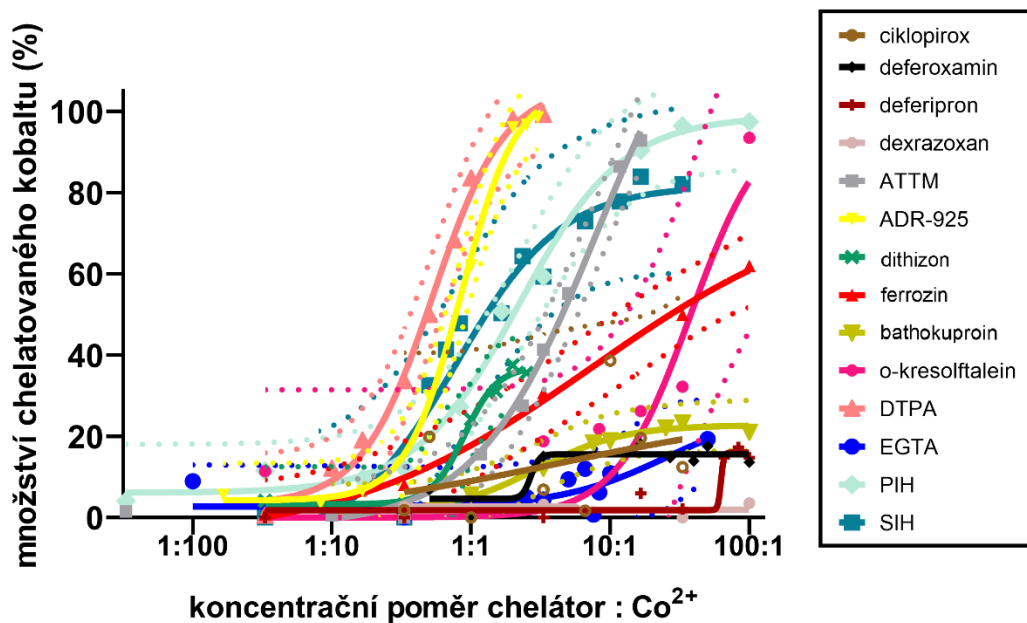
Obr. 31: Graf chelatační aktivity EGTA. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé hodnoty pH. Měřeno při vlnových délkách **A**: 490 nm a **B**: 540 nm, v čase 5 minut.



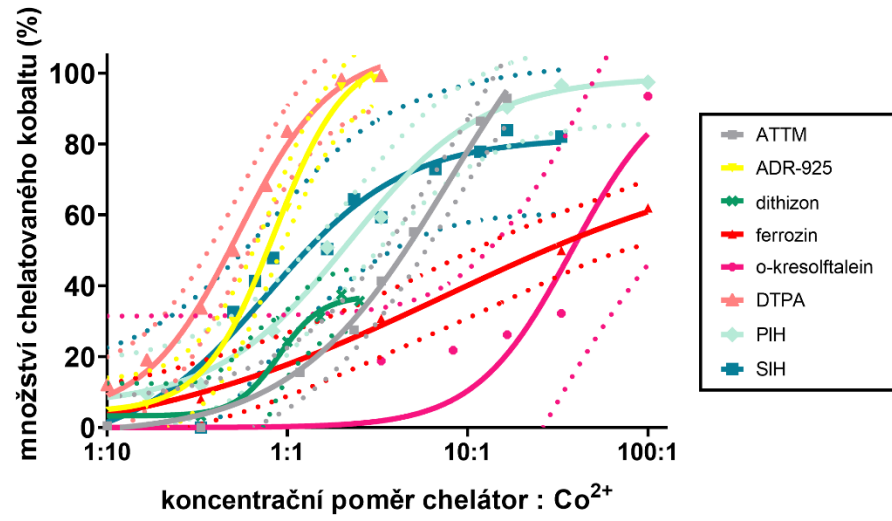
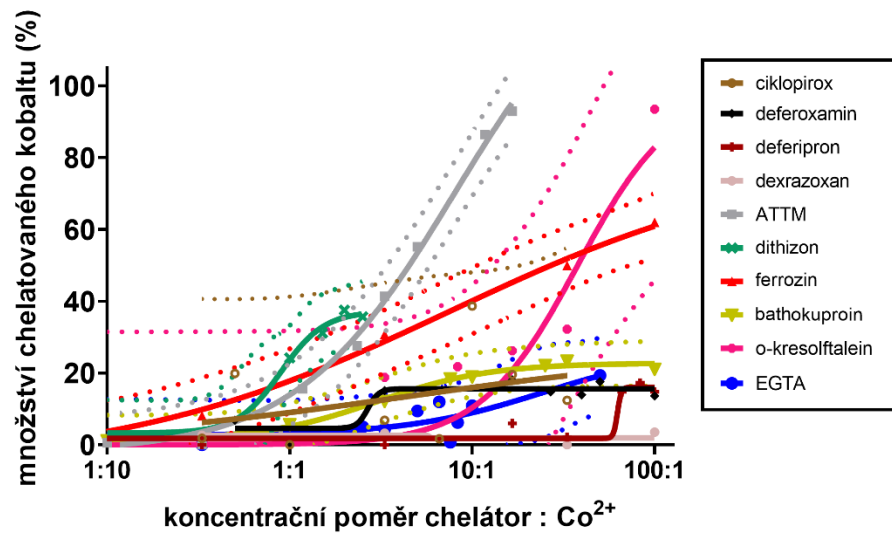
Obr. 32: Porovnání zkoušených chelátorů kobaltu pomocí 95% konfidenčních intervalů při **pH 7,5**. Měřeno při vlnové délce 490 nm, v čase 5 minut. 95% konfidenční intervaly znázorněny tečkovanou čarou.

A**B**

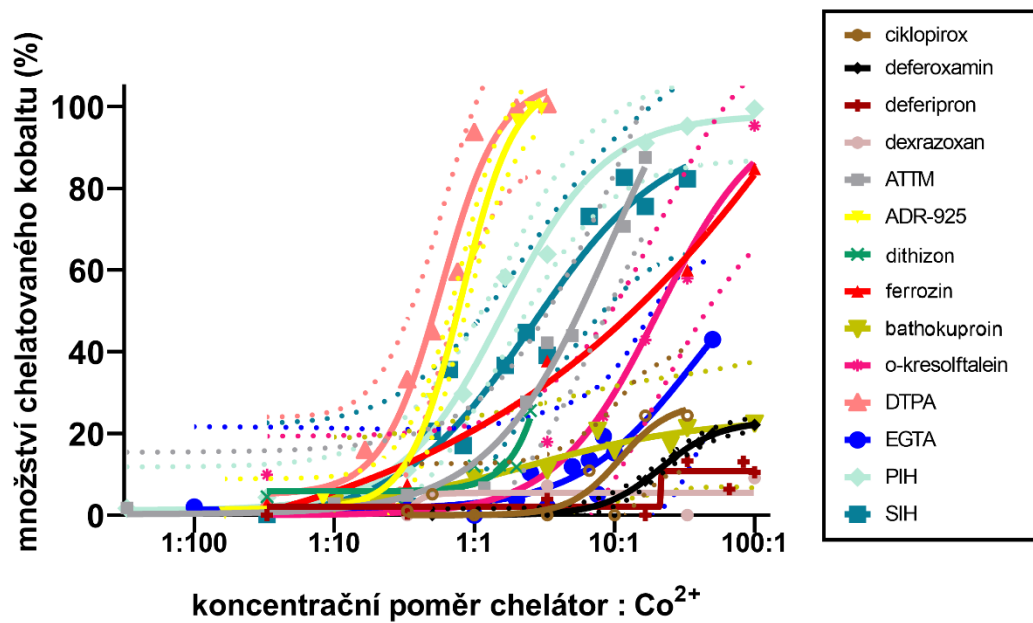
Obr. 33: Celé spektrum látek z Obr. 32 (**pH 7,5**) bylo dále pro větší přehlednost rozděleno do grafu **A** (více účinné chelátory) a **B** (méně účinné chelátory). Měřeno při vlnové délce 490 nm, v čase 5 minut. 95% konfidenční intervaly znázorněny tečkovanou čarou.



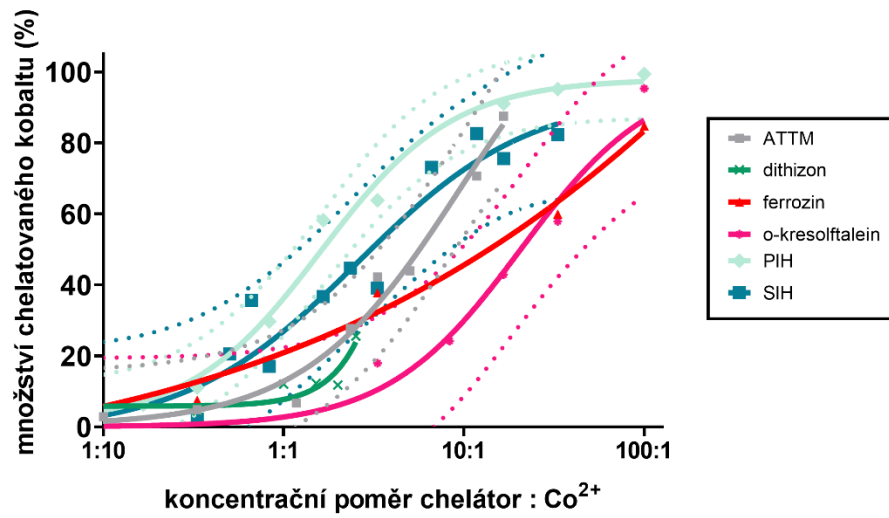
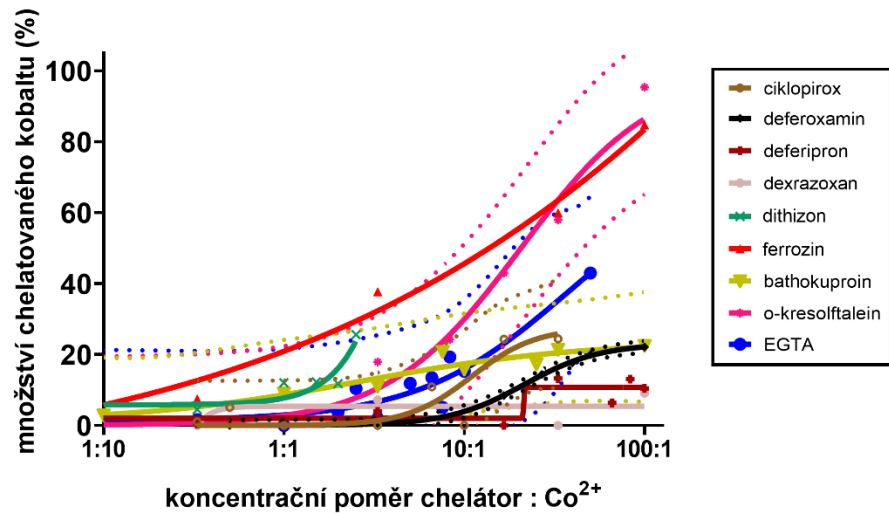
Obr. 34: Porovnání zkoušených chelátorů kobaltu pomocí 95% konfidenčních intervalů při **pH 6,8**. Měřeno při vlnové délce 490 nm, v čase 5 minut. 95% konfidenční intervaly znázorněny tečkovanou čarou.

A**B**

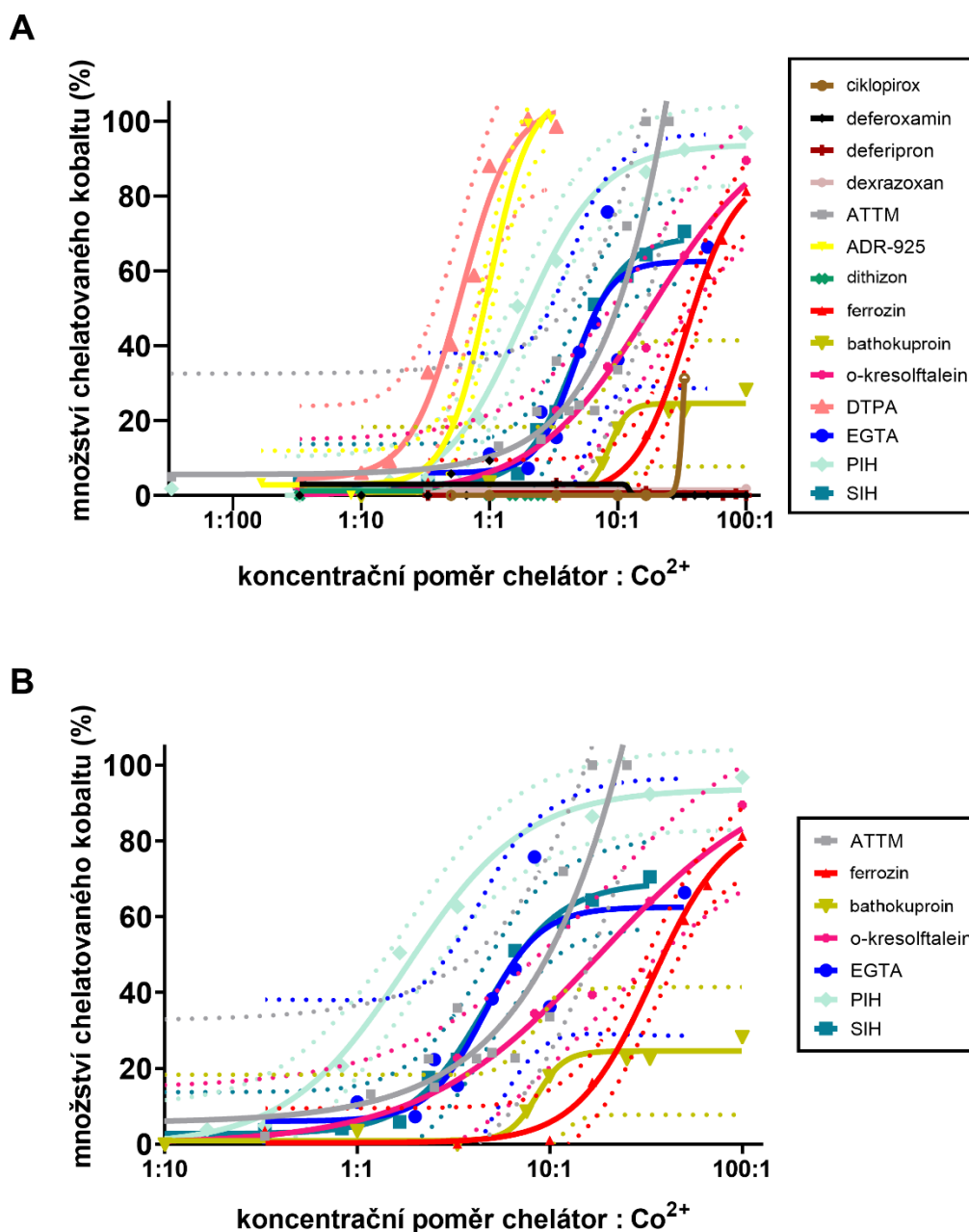
Obr. 35: Celé spektrum látek z Obr. 34 (**pH 6,8**) bylo dále pro větší přehlednost rozděleno do grafu **A** (více účinné chelátory) a **B** (méně účinné chelátory). Měřeno při vlnové délce 490 nm, v čase 5 minut. 95% konfidenční intervaly znázorněny tečkovanou čarou.



Obr. 36: Porovnání zkoušených chelátorů kobaltu pomocí 95% konfidenčních intervalů při **pH 5,5**. Měřeno při vlnové délce 490 nm, v čase 5 minut. 95% konfidenční intervaly znázorněny tečkovanou čarou.

A**B**

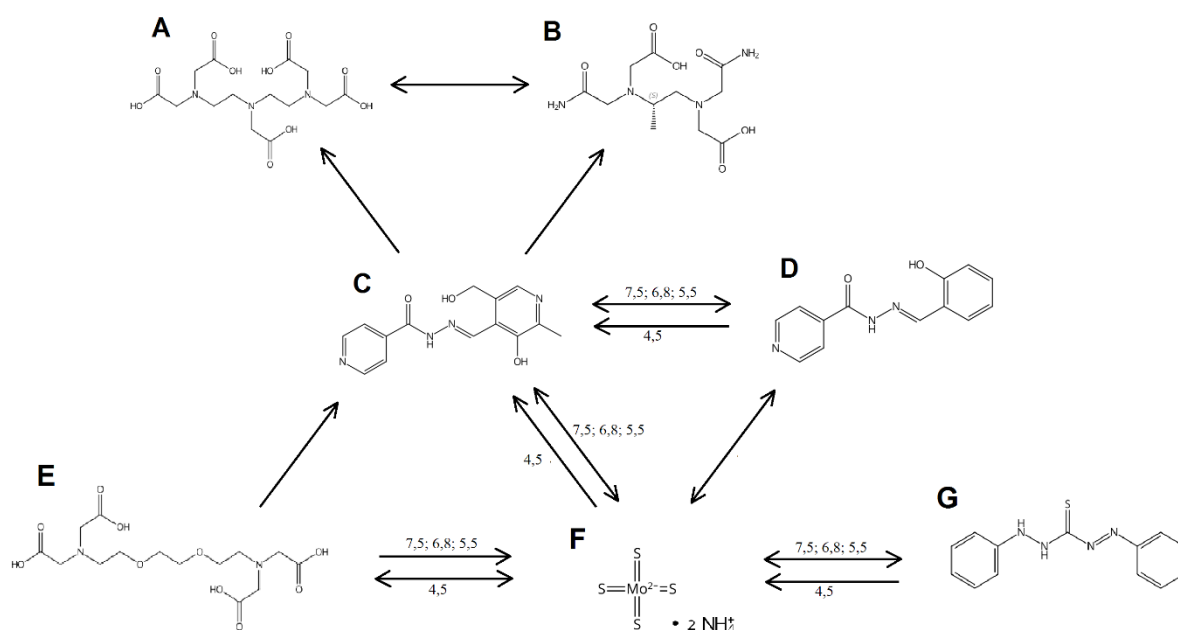
Obr. 37: Celé spektrum látek z Obr. 36 (pH 5,5) bylo dále pro větší přehlednost rozděleno do grafu **A** (více účinné chelátory) a **B** (méně účinné chelátory). Měřeno při vlnové délce 490 nm, v čase 5 minut. 95% konfidenční intervaly znázorněny tečkovanou čarou.



Obr. 38: Porovnání zkoušených chelátorů kobaltu pomocí 95% konfidenčních intervalů při **pH 4,5** a vlnové délce 490 nm. Graf **A** znázorňuje všechny testované látky, graf **B** je pro větší přehlednost dále přiblížen. 95% konfidenční intervaly znázorněny tečkovanou čarou.

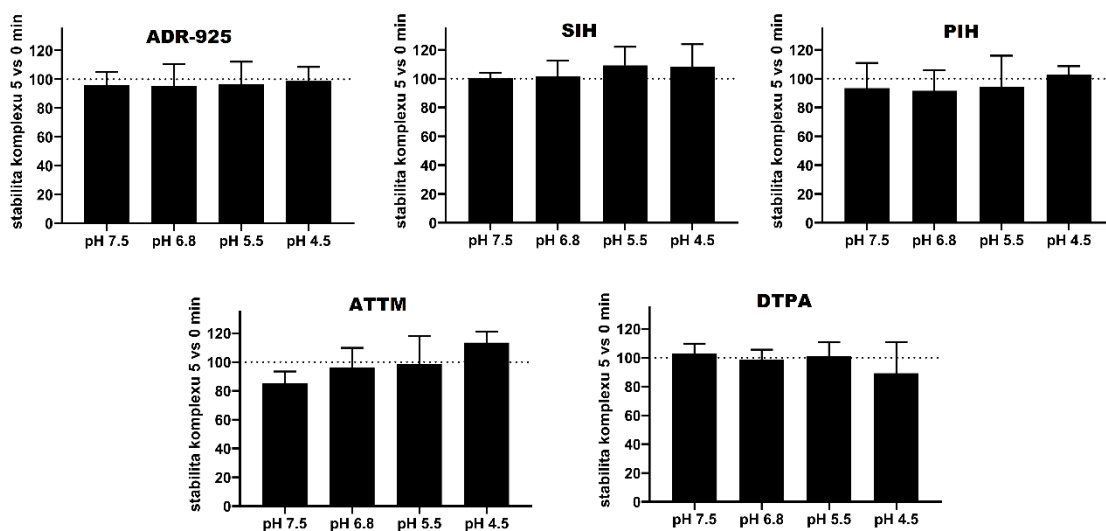
Při exaktním porovnání chelatační účinnosti pomocí 95% konfidenčních intervalů chelatačních křivek bylo stanoveno pořadí chelatační účinnosti jednotlivých látek. Při pH 7,5 byly neúčinnějšími látkami DTPA a ADR-925, následovány skupinou SIH, PIH, ATTM a dithizon, mezi kterou nebyly nalezeny ze statistického hlediska rozdíly. Menší účinnost měly ferrozin, EGTA a ciklopirox. Další látky již měly jen minimální účinek. Při pH 6,8 byly opět

nejúčinnější DTPA a ADR-925, následovala skupina SIH, PIH, dithizon a ATTM. Méně účinné byly dále ferrozín a CPC. K poklesu účinnosti došlo u EGTA a ciklopiroxu, které se zařadily mezi ostatní látky s minimálním účinkem, naopak oproti pH 7,5 došlo k mírnému zvýšení účinku dithizonu. Při pH 5,5 byly opět na prvním místě DTPA a ADR-925, za nimi poté skupina PIH, SIH, ferrozín, ATTM a dithizon. Méně účinné byly potom CPC, bathokuproin, EGTA a ciklopirox. Ostatní látky jevíly minimální účinnost. Při porovnání s již zmíněnými hodnotami došlo při pH 5,5 k mírnému snížení účinnosti SIHu a také ke zvýšení účinku ferrozínu a CPC. Při pH 4,5 byly stále nejúčinnějšími látkami DTPA a ADR-925, následovány PIHem. Následovala skupina EGTA, SIH, ATTM a CPC. Nízkou účinností poté jevíly bathokuproin, ferrozín a ciklopirox. Ostatní látky měly téměř nulovou účinnost. V porovnání s ostatními pH pozorujeme dále se snižující účinek SIHu a také ATTM a ferrozínu, a naopak zvýšení účinku EGTA. Schematicky byly porovnány chemické struktury nejúčinnějších chelátorů (viz Obr. 39). Do schématu byla zahrnuta také EGTA, která přestože nepatří mezi nejúčinnější látky, při pH 4,5 se některým z nich může rovnat.

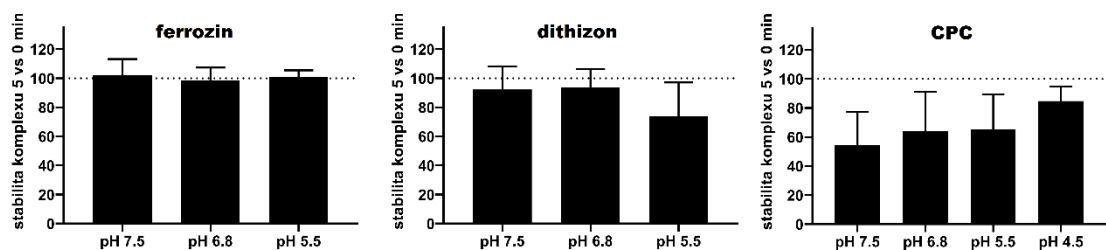


Obr. 39: Schematické porovnání nejúčinnějších chelátorů a jejich chemických struktur. **A:** DTPA, **B:** ADR-925, **C:** PIH, **D:** SIH, **E:** EGTA, **F:** ATTM, **G:** dithizon. Oboustranné šipky znázorňují srovnatelnou účinnost látek, jednostranná šipka míří vždy od méně účinného k více účinnému chelátoru. Čísla u šipek značí hodnotu pH, pro kterou daný vztah platí. Pokud není hodnota uvedena, platí daný vztah pro všechna měřená pH.

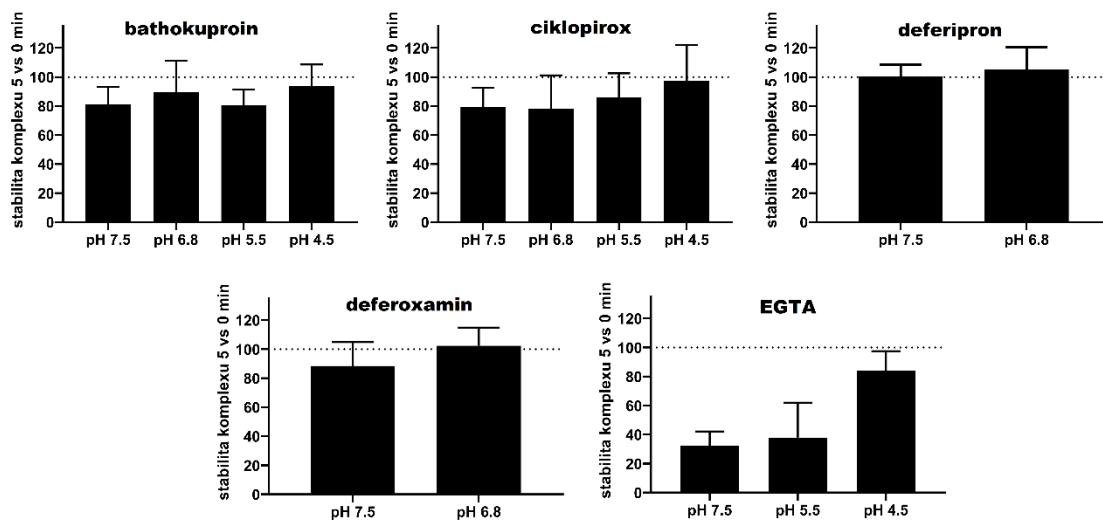
Dále byla sledována stabilita vzniklých komplexů v čase jako rozdíl absorbance měřené po 5 minutách a při prvním měření (čas 0). Látky s nejlepšími chelatačními vlastnostmi vykazovaly dobrou stabilitu v širokém rozmezí pH (Obr. 40). ADR-925, PIH a SIH vykazovaly 100% nebo téměř 100% stabilitu v rozmezí všech měřených pH. U DTPA byla pouze numericky, ale ne statisticky, snížena stabilita při pH 4,5. Středně aktivní chelátory (Obr. 41) byly, co se týče stability, rozdílné. Ferrozin byl stabilní v celém rozmezí pH hodnot, ve kterých zaznamenal určitou chelatační účinnost. Dithizon měl nižší stabilitu v kyselějším pH 5,5 a CPC byl naopak velmi málo stabilní a jeho stabilita se jen mírně zvyšovala s kyselějším pH. U látek málo chelatuujících kobalt byla paradoxně zjištěna celkem dobrá stabilita při relevantních hodnotách pH (Obr. 42). Výjimkou zde byla málo stabilní EGTA a dexrazoxan, u kterého nebyla stabilita stanovována, protože v podstatě nechelatoval (Obr. 30).



Obr. 40: Stabilita nejlépe chelatuujících látek v jednotlivých prostředích.



Obr. 41: Stabilita středně aktivních chelátorů při relevantních pH, ve kterých docházelo k dostatečné chelataci. Dithizon a ferrozin nechelatovaly ionty kobaltu významně při pH 4,5, a tak nebylo možné vypočítat stabilitu komplexu.



Obr. 42: Stabilita látek málo aktivních při relevantních pH. U pH, ve kterých nebyla nalezena oproti kontrole (rozpuštědлу) významná chelatace, nebylo možné stabilitu komplexu vypočítat.

7 DISKUZE

Cílem této práce bylo nalezení vhodného chelátoru kobaltu, který by racionálně doplnil velmi omezenou nabídku látek použitelných při intoxikaci kobaltem v klinické praxi. Testovány byly různé, chemicky odlišné látky s již známou schopností chelatovat jiné kovy, jako je například železo, měď, zinek nebo vápník.

Momentálně neexistuje jednotný doporučený postup pro terapii intoxikace kobaltem. Zkušenosti s léčbou jsou velmi omezené a spoléhají se na již popsané kazuistiky a off-label použití klinicky dostupných neselektivních chelátorů (*Pelclova et al. 2012, Smith 2013*). *Devlin et al. (2013)* ve svém přehledovém článku porovnali deset případů chronické intoxikace kobaltem po implantaci kloubní náhrady. Ve většině případů byli pacienti léčeni pouze symptomaticky, za současného chirurgického vyjmutí vadné protézy, případně za pomoci hemofiltrace. Pouze v jednom případě byl v terapii využit chelátor DMPS (unithiol) a u jednoho pacienta byla nasazena EDTA. Klinická účinnost těchto chelátorů zůstává však nejasná. *Smith (2013)* v souladu s Národní radou pro radiační ochranu a měření (USA) dále doporučuje pro chelataci kobaltu DTPA, DMSA, EDTA nebo N-acetylcystein.

V této práci byla experimentálně stanovena chelatace kobaltu u celkem 14 látek, z toho u 7 látek klinicky používaných: ATTM, ciklopirox, deferipron, deferoxamin, dexrazoxan, DTPA, EGTA; u 3 látek experimentálně zkoumaných: ADR-925, PIH, SIH a u 4 indikátorů: bathokuproin, dithizon, ferrozín, *o*-kresolftalein komplexon.

Pro detekci chelatace byla využita metoda pro screening potencionálních chelátorů kobaltu dle *Moravcové (2020)*, která byla inspirována studií *Catapano et al. (2018)*. Metoda je založena na spektrofotometrické detekci nezchelatovaných iontů kobaltu pomocí indikátoru Na₂NFDSA.

Z námi testovaných látek byly nejúčinnější při všech hodnotách pH DTPA a ADR-925. Velmi dobře chelatovaly také PIH, SIH a ATTM. DTPA chelatovala již při poměru 1 : 1 (chelátor : kobalt) až 80 % dostupného kobaltu, ke 100% chelataci došlo při poměru 2 : 1. Jelikož je DTPA klinicky využívaná látka, známe její farmakokinetiku a chování v organismu, což je výhodné pro potencionální využití při kobaltové intoxikaci. Vhodný by byl také další výzkum v této oblasti, především sledování selektivity vůči kobaltu v přítomnosti dalších kovů jako je zinek, u kterého je udávána silná vazba s DTPA (*Arts et al. 2018*). Na rozdíl od DTPA je ADR-925 prozatím jen experimentálně zkoušená látka s velkým chelatačním potenciálem.

Tento metabolit dexrazoxanu chelatoval při poměru 1 : 1 60 % dostupného kobaltu a 100% chelatace dosáhl při poměru 2 : 1. Porovnatelná síla účinku ADR-925 s DTPA koreluje také s jejich chemickou podobností. Protože se jedná o metabolit dexrazoxanu, bylo by vhodné dále zkoumat, zda by se dexrazoxan dal využít jako proléčivo ADR-925, nebo zda by bylo vhodnější použít ADR-925 samotný. Dále jsou stejně jako u DTPA nutné další testy specifity a selektivity.

PIH a SIH, arylhydrazonové deriváty pyridoxalu, vykazovaly také dobré chelatační schopnosti. Protože se zároveň intenzivně zkoumají halogenové deriváty PIHu, které jak se ukazuje mají ještě výraznější chelatační schopnosti, bylo by vhodné prozkoumat i interakci těchto derivátů s kobaltem (*Buss et al. 2002*). Zajímavé může být porovnání stechiometrie komplexů PIHu a SIHu se železem a s kobaltem. Nositel aktivity těchto látek je dusík hydrazonové skupiny společně s fenolickým a karbonylovým kyslíkem, které vážou ionty železa za vzniku komplexu se stechiometrickým poměrem 2 : 1 (chelátor : železo) (*Chen et al. 2018*). Naše výsledky, které hodnotí komplex PIHu s kobaltem, ukazují při všech pH spíše na poměr 3 : 1. U SIHu při pH 7,5 by stechiometrie odpovídala poměru 2 : 1, ale je nutné zmínit, že tento chelátor nebyl schopen chelatovat všechny volné ionty kobaltu ani při vysokém nadbytku. Navíc s klesajícím pH klesá také jeho účinnost. ATTM vykazoval dostatečný účinek až při vyšším koncentračním poměru chelátor : kobalt. Přesto by mohl být vhodnou látkou pro klinické využití, protože je podmíněčně schválen EMA jako sirotčí léčivo pro terapii Wilsonovy choroby a jeho farmakokinetika je tedy dobře známa (*ema.europa.eu 29. 1. 2022*).

Naopak klinicky hojně využívané chelátory železa deferipron a deferoxamin byly v chelataci kobaltu jen velmi málo účinné. Ač by se tedy mohly jevit jako potenciálně použitelné a dostupné, pro léčbu intoxikace kobaltem jsou nevhodné.

Zvláštní místo v terapii by mohla mít EGTA, u níž naše výsledky prokázaly vyšší chelatační schopnost a stabilitu v kyselejších prostředí při pH 4,5. Při některých patologických stavech může dojít k poklesu pH v organismu nebo v některých jeho částech, a tím pádem také k vyšší účinnosti látky za těchto patofyziologických podmínek. Této skutečnosti by se dalo v některých případech využít.

Jak se ukázalo na příkladu dithizonu, limitující může být vysoká absorbance látky, která interferuje s použitou metodou. V tomto případě by bylo vhodné zvolit jinou metodu pro kvantifikaci chelatace, než je spektrofotometrické stanovení. Výsledky dithizonu ukazují dobrou chelatační schopnost při poměru 1 : 1 a pH 7,5 nebo 6,8, nevíme však, jak by se látka chovala ve vyšších koncentracích a nelze tak odhadnout její plný potenciál.

Naše práce přinesla cenné poznatky, které by mohly nastínit směr dalšího hledání účinného chelátoru kobaltu. DTPA a ADR-925 mají potenciál stát se klinicky využitelnými účinnými látkami, stejně tak i PIH nebo ATTM, ve specifických podmínkách také EGTA. Je však nutné provést další experimenty, vyhodnotit specifitu a selektivitu těchto látek, účinnost *in vivo*, a především jejich bezpečnost v lidském organismu.

8 ZÁVĚR

Na závěr lze konstatovat, že byly pomocí spektrofotometrického hodnocení nalezeny látky schopné účinně chelátovat kobalt v poměrně širokém rozmezí pH. Mezi nejúčinnější chelátory patřily DTPA a ADR-925, které dosáhly 100% chelatace již při koncentračním poměru 2 : 1 (chelátor : kobalt). Mezi další velmi účinné látky patřily ATTM a PIH. SIH prokázal dobrou účinnost, nedosáhl však 100% chelatace a při nižším pH byl patrný pokles účinku. Určitou účinnost prokázaly také ferrozín, CPC a dithizon, u kterých byla při poměru 1 : 1 chelatace 10-20 %, nedosáhla však ve vyšších koncentracích 100 %. Absorbance vyšších koncentrací dithizonu interferovala s použitou metodou, výsledky této látky tedy nejsou úplné. Účinnost EGTA byla významná pouze při pH 4,5. Ostatní testované látky prokázaly pouze nevýznamnou chelataci kobaltu.

9 LITERATURA

9.1 ODBORNÉ ČLÁNKY

1. Abashidze S, Jariashvili T, Kometiani Z. The effect of EGTA and Ca^{++} in regulation of the brain Na/K-ATPase by noradrenaline. *BMC Biochem.* 2001;2:8.
2. Anderegg G, Flaschka H, Sallmann R, Schwarzenbach G. Metallindikatoren VII. Ein auf Erdalkaliionen ansprechendes Phtalein und seine analytische Verwendung. *Helv Chim Acta.* 1954;37:113-120.
3. Arts J, Bade S, Badrinas M, Ball N, Hindle S. Should DTPA, an Aminocarboxylic acid (ethylenediamine-based) chelating agent, be considered a developmental toxicant? *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018;97:197-208.
4. Barceloux DG. Cobalt. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999;37(2):201-6.
5. Bellotti D, Remelli M. Deferoxamine B: A Natural, Excellent and Versatile Metal Chelator. *Molecules.* 2021;26(11):3255.
6. Buss JL, Arduini E, Ponka P. Mobilization of intracellular iron by analogs of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) is determined by the membrane permeability of the iron-chelator complexes. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(12):1689-701.
7. Calt S, Serper A. Smear layer removal by EGTA. *J Endod.* 2000;26(8):459-61.
8. Catapano MC, Tvrđý 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.
9. Cowart RE, Singleton FL, Hind JS. A comparison of bathophenanthrolinedisulfonic acid and ferrozine as chelators of iron(II) in reduction reactions. *Anal Biochem.* 1993;211(1):151-5.
10. Członkowska A et al. Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):21.
11. Devlin JJ, Pomerleau AC, Brent J, Morgan BW, Deitchman S, Schwartz M. Clinical features, testing, and management of patients with suspected prosthetic hip-associated cobalt toxicity: a systematic review of cases. *J Med Toxicol.* 2013;9(4):405-15.
12. Dominguez K, Ward WS. A novel nuclease activity that is activated by Ca^{2+} chelated to EGTA. *Syst Biol Reprod Med.* 2009;55(5-6):193-9.
13. Durham T et al. Chemistry, pharmacology, and cellular uptake mechanisms of thiometallate sulfide donors. *Br J Pharmacol.* 2020;177(4):745-756.

14. Eberhard Y et al. Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopirox olamine induces cell death in leukemia and myeloma cells. *Blood*. 2009;114(14):3064-73.
15. Finley BL et al. 31-day study of cobalt(II) chloride ingestion in humans: pharmacokinetics and clinical effects. *J Toxicol Environ Health A*. 2013;76(21):1210-24.
16. Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Chowdhury O, Gooding S, Roberts DJ. Oral deferiprone for iron chelation in people with thalassaemia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(8):CD004839.
17. Flora SJ, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(7):2745-88.
18. Gibbs CR. Characterization and application of ferrozine iron reagents as a ferrous iron indicator. *Anal Chem*. 1976;48(8):1197-1201.
19. Hafez MB, Roushdy HM, Hafez N. Radiolysis of aqueous solutions of cobalt(II) and cobalt(III). *J Radioanal Chem*. 1978;45:277-283.
20. Hašková P, Kovaříková P, Koubková L, Vávrová A, Macková E, Šimůnek T. Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(4):537-49.
21. Hermes-Lima M, Ponka P, Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1523(2-3):154-60.
22. Hider RC, Hoffbrand AV. The Role of Deferiprone in Iron Chelation. *N Engl J Med*. 2018;379(22):2140-2150.
23. Huckle JE, Sadgrove MP, Mumper RJ, Jay M. Species-dependent chelation of (241)Am by DTPA Di-ethyl ester. *Health Phys*. 2015;108(4):443-50.
24. Chen D, Darabedian N, Li Z, Kai T, Jiang D, Zhou F. An improved Bathocuproine assay for accurate valence identification and quantification of copper bound by biomolecules. *Anal Biochem*. 2016;497:27-35.
25. Chen YL, Kong X, Xie Y, Hider RC. The interaction of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) with iron. *J Inorg Biochem*. 2018;180:194-203.
26. Ivanov AI, Parkinson JA, Cossins E, Woodrow J, Sadler PJ. Bathocuproine-assisted reduction of copper(II) by human albumin. *J Biol Inorg Chem*. 2000;5(1):102-9.

27. Jirkovský E et al. Clinically Translatable Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity by Dexrazoxane Is Mediated by Topoisomerase II Beta and Not Metal Chelation. *Circ Heart Fail.* 2021;14(11):e008209.
28. Jirkovský E et al. Pharmacokinetics of the Cardioprotective Drug Dexrazoxane and Its Active Metabolite ADR-925 with Focus on Cardiomyocytes and the Heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018;364(3):433-446.
29. Kim CH, Choi YH, Jeong MY, Chang JS, Yoon PW. Cobalt Intoxication Heart Failure after Revision Total Hip Replacement for Ceramic Head Fracture: A Case Report. *Hip Pelvis.* 2016;28(4):259-263.
30. Kontoghiorghes GJ, Pattichi K, Hadjigavriel M, Kolnagou A. Transfusional iron overload and chelation therapy with deferoxamine and deferiprone (L1). *Transfus Sci.* 2000;23(3):211-23.
31. Kwok JC, Richardson DR. The cardioprotective effect of the iron chelator dexrazoxane (ICRF-187) on anthracycline-mediated cardiotoxicity. *Redox Rep.* 2000;5(6):317-24.
32. Laggner H, Hermann M, Gmeiner BM, Kapiotis S. Cu²⁺ and Cu⁺ bathocuproine disulfonate complexes promote the oxidation of the ROS-detecting compound dichlorofluorescein (DCFH). *Anal Bioanal Chem.* 2006;385(5):959-61.
33. Leggett RW. The biokinetics of inorganic cobalt in the human body. *Sci Total Environ.* 2008;389(2-3):259-69.
34. Letourneau EG, Jack GC, McCullough RS, Hollins JG. The metabolism of cobalt by the normal human male: whole body retention and radiation dosimetry. *Health Phys.* 1972;22(5):451-9.
35. Leyssens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. Cobalt toxicity in humans- A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology.* 2017;387:43-56.
36. Li X et al. Is Hydrogen Sulfide a Concern During Treatment of Lung Adenocarcinoma With Ammonium Tetrathiomolybdate? *Front Oncol.* 2020;10:234.
37. Manoranjitham JJ, Narayanan SS. A mercury free electrode based on poly O-cresolphthalein complexone film matrixed MWCNTs modified electrode for simultaneous detection of Pb (II) and Cd (II). *Microchem J.* 2019;148:92-101.
38. Manoranjitham JJ, Narayanan SS. Electrochemical sensor for determination of butylated hydroxyanisole (BHA) in food products using poly O-cresolphthalein complexone coated multiwalled carbon nanotubes electrode. *Food Chem.* 2021;342:128246.

39. Mendonça BP et al. Neuroprotective effects of ammonium tetrathiomolybdate, a slow-release sulfide donor, in a rodent model of regional stroke. *Intensive Care Med Exp.* 2020;8(1):13.
40. Morrison PW, Khutoryanskiy VV. Enhancement in corneal permeability of riboflavin using calcium sequestering compounds. *Int J Pharm.* 2014;472(1-2):56-64.
41. Ntoi LLA, Buitendach BE, von Eschwege KG. Seven Chromisms Associated with Dithizone. *J Phys Chem A.* 2017;121(48):9243-9251.
42. Paustenbach DJ, Tvermoes BE, Unice KM, Finley BL, Kerger BD. A review of the health hazards posed by cobalt. *Crit Rev Toxicol.* 2013;43(4):316-62.
43. Pelclova D, Sklensky M, Janicek P, Lach K. Severe cobalt intoxication following hip replacement revision: clinical features and outcome. *Clin Toxicol (Phila).* 2012;50(4):262-5.
44. Peters RM, Willemse P, Rijk PC, Hoogendoorn M, Zijlstra WP. Fatal Cobalt Toxicity after a Non-Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty. *Case Rep Orthop.* 2017;2017:9123684.
45. Pokorski M, Antosiewicz J, Di Giulio C, Lahiri S. Iron chelation and the ventilatory response to hypoxia. *Adv Exp Med Biol.* 2009;648:215-21.
46. Pollard FH, Martin JV. The spectrophotometric determination of the alkaline-earth metals with murexide, eriochrome black T and with o-cresolphthalein complexone. *Analyst.* 1956;81(963):348-353.
47. Potůčková E et al. Structure-activity relationships of novel salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) analogs: iron chelation, anti-oxidant and cytotoxic properties. *PLoS One.* 2014;9(11):e112059.
48. Regdon Z et al. High-content screening identifies inhibitors of oxidative stress-induced parthanatos: cytoprotective and anti-inflammatory effects of ciclopirox. *Br J Pharmacol.* 2021;178(5):1095-1113.
49. Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem.* 2004;331(2):370-5.
50. Richardson DR. Analogues of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) as potential iron chelators for the treatment of neoplasia. *Leuk Lymphoma.* 1998;31(1-2):47-60.
51. Segura-Egea JJ, Jiménez-Rubio A, Rios-Santos JV, Velasco-Ortega E, Calvo-Gutierrez JR. In vitro inhibitory effect of EGTA on macrophage adhesion: endodontic implications. *J Endod.* 2003;29(3):211-3.

52. Sharpe HB, Field EO, Hellmann K. Mode of action of the cytostatic agent "ICRF 159". *Nature*. 1970;226(5245):524-6.
53. Shen T, Huang S. Repositioning the Old Fungicide Ciclopirox for New Medical Uses. *Curr Pharm Des*. 2016;22(28):4443-50.
54. Schmidt WFJ, Hoffmeister T, Wachsmuth N, Byrnes WC. Cobalt misuse in sports. *Dtsch Z Sportmed*. 2019;70: 129-134.
55. Schroeder PE, Hasinoff BB. The doxorubicin-cardioprotective drug dexrazoxane undergoes metabolism in the rat to its metal ion-chelating form ADR-925. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;50(6):509-13.
56. Smith GL et al. Complexation of ferrous ions by ferrozine, 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline: Implication for the quantification of iron in biological systems. *J Inorg Biochem*. 2021;220:111460.
57. Smith SW. The role of chelation in the treatment of other metal poisonings. *J Med Toxicol*. 2013;9(4):355-69.
58. Smith T, Edmonds CJ, Barnaby CF. Absorption and retention of cobalt in man by whole-body counting. *Health Phys*. 1972;22(4):359-67.
59. Stockbridge N. EGTA. *Comput Biol Med*. 1987;17(5):299-304.
60. Sueda K, Sadgrove MP, Jay M, Di Pasqua AJ. Species-dependent effective concentration of DTPA in plasma for chelation of ²⁴¹Am. *Health Phys*. 2013;105(2):208-14.
61. Štěrba M et al. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology*. 2007;235(3):150-66.
62. Takahashi Y, Danwittayakul S, Suzuki TM. Dithizone nanofiber-coated membrane for filtration-enrichment and colorimetric detection of trace Hg(II) ion. *Analyst*. 2009;134(7):1380-5.
63. Tripodi D, D'Ercole S, De Fazio P, Spoto G. Demineralizing action of EGTA in endodontics. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007;20(1 Suppl 1):93-6.
64. Tvermoes BE, Finley BL, Unice KM, Otani JM, Paustenbach DJ, Galbraith DA. Cobalt whole blood concentrations in healthy adult male volunteers following two-weeks of ingesting a cobalt supplement. *Food Chem Toxicol*. 2013;53:432-9.
65. Unice KM et al. Inorganic cobalt supplementation: prediction of cobalt levels in whole blood and urine using a biokinetic model. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(7):2456-61.

66. Wasukan N, Srisung S, Kuno M, Kulthong K, Maniratanachote R. Interaction evaluation of silver and dithizone complexes using DFT calculations and NMR analysis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015;149:830-8.
67. Weiss G, Loyevsky M, Gordeuk VR. Dexrazoxane (ICRF-187). *Gen Pharmacol.* 1999;32(1):155-8.
68. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.* 1995;82-83:969-74.
69. Wöhrl S et al. A cream containing the chelator DTPA (diethylenetriaminepenta-acetic acid) can prevent contact allergic reactions to metals. *Contact Dermatitis.* 2001;44(4):224-8.

9.2 KNIHY

1. Klikorka J, Hájek B, Votínský J. *Obecná a anorganická chemie.* Praha: SNTL, 1989:505-61.

9.3 DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Moravcová M. Příprava nové metodiky pro screening chelátorů kobaltu. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2020.

9.4 INTERNETOVÉ ZDROJE

1. American Chemical Society. Substances. In: *SciFinder.* 2021. Dostupné na URL: <https://scifinder-n.cas.org/>. Přístup 19. 10., 20. 10., 25. 10., 12. 11., 29. 11. 2021.
2. Evropská léková agentura. Ferriprox SPC. In: *ema.europa.eu.* 2021. Dostupné na URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ferriprox-epar-product-information_cs.pdf. Přístup 25. 10. 2021.
3. Evropská léková agentura. Deferiprone lipomed SPC. In: *ema.europa.eu.* 2021. Dostupné na URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/deferiprone-lipomed-epar-product-information_cs.pdf. Přístup 25. 10. 2021.

4. Evropská léková agentura. EU/3/08/539: Orphan designation for the treatment of Wilson's disease. In: *ema.europa.eu*. 2008. Dostupné na URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu308539>.
Přístup 5. 1., 29. 1. 2022.
5. Merck. o-Cresolphthalein Comlexone. In: *sigmaaldrich.com*. 2021. Dostupné na URL: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sial/p5631>. Přístup 10. 12. 2021.
6. National Institutes of Health. Deferiprone. In: *PubChem*. 2021. Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2972>. Přístup 25. 10. 2021.
7. Skalab s.r.o. Návod k použití: Vápník 600, katalogové číslo 207. In: *skalab.cz*. 2015. Dostupné na URL: http://www.skalab.cz/files/navody/navod_k_pouziti_ca600-2015_web.pdf. Přístup 10. 12. 2021.
8. Státní ústav pro kontrolu léčiv. In: *Databáze léků*. 2021. Dostupné na URL: <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>. Přístup 25. 10., 2. 11., 12. 11. 2021.
9. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Desferal SPC. In: *sukl.cz*. 2017. Dostupné na URL: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0016470&tab=texts>. Přístup 27. 10. 2021.
10. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Technescan DTPA SPC. In: *sukl.cz*. 2021. Dostupné na URL: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0066427&tab=texts>.
Přístup 12. 11. 2021.