

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**JSOU SOUČASNĚ POUŽÍVANÉ CHELÁTORY TĚŽKÝCH KOVŮ
TAKÉ CHELÁTORY VÁPŇÍKU A HOŘČÍKU?**

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Lukáš Konečný

Hradec Králové, 2023

Karolína Skoupilová

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

Ráda bych poděkovala panu prof. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady a Mgr. Lukáši Konečnému za pomoc při měření a zpracování výsledků. Poděkování patří také mé rodině za podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Karolína Skoupilová

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

Název diplomové práce: Jsou současně používané chelátory těžkých kovů také chelátory vápníku a hořčíku?

Vápník a hořčík jsou důležitými prvky pro lidské tělo. Vápník hraje důležitou roli při srážení krve a vnitrobuněčné signalizaci, podílí se tak mimo jiné na svalové kontrakci ale i na agregaci krevních destiček. Hořčík je kofaktorem mnoha enzymů. Výrazný nedostatek obou iontů se může projevat poruchami srdečního rytmu a zvýšenou nervosvalovou dráždivostí.

Cílem této práce bylo stanovení chelatační aktivity u současně používaných chelátorů těžkých kovů a stanovit stabilitu indikátoru. Nejdříve bylo zjištěno ideální pH pro experiment. V dalším kroku byla změřena míra chelatace u 21 známých chelátorů kovů pomocí spektrofotometrické metody *in vitro*. Nakonec byla chelatace u nejvíce aktivních chelátorů vápníku ověřena na agregaci krevních destiček ve vzorku lidské krve. Zároveň byla stanovena dlouhodobá stabilita indikátoru *o*-kresolftalein komplexonu (CC).

V prvním kroku bylo zvoleno pH 7,5, které jako jediné bylo z důvodu dobré citlivosti použitelné pro naše měření. Nejvíce účinnými látkami chelatujícími vápník byly ADR-925, tetrasodná sůl kyseliny ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)tetraoctové (Na₄EGTA), edetát disodný (Na₂EDTA) a kyselina diethylentriaminpentaoctová (DTPA). Chelátory výrazně vázající hořčík byly ADR-925, Na₂EDTA, DTPA, jodochinol, kliočinol, chloroxin, 5,7-dibromochinolin-8-ol a kyselina 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonová. Vytvořené komplexy s oběma kovy byly stabilní. U vyšších koncentrací některých halogenovaných derivátů 8-hydroxychinolinu byly pozorovány sraženiny, takže jejich chelatační schopnosti nebylo možné plně zhodnotit. Stabilita indikátoru byla minimálně 105 dní při uchovávání v lednici. Na₂EDTA, ADR-925 a Na₄EGTA byly schopné díky chelataci vápníku úplně inhibovat agregaci krevních destiček, Na₂EDTA byla nejúčinnější.

Závěrem lze uvést, že řada klinicky používaných chelátorů je schopna silně vázat jak ionty vápníku, tak hořčíku a že indikátor CC je stabilní minimálně po dobu 105 dní.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Karolína Skoupilová

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

Title of diploma thesis: Are currently used chelators of heavy metals also chelators of calcium and magnesium?

Calcium and magnesium are important elements for the human body. Calcium plays an important role in blood clotting and intracellular signalling, thus participating in muscle contraction and platelet aggregation, among other processes. Magnesium is a cofactor for many enzymes. A significant deficiency of both ions can manifest as disorders of heart rhythm and increased neuromuscular excitability.

The aim of this study was to determine the chelating activity of currently used heavy metal chelators and to determine the stability of the indicator. First, the ideal pH for the experiment was determined. In the next step, the chelation rate of 21 known metal chelators was measured using an *in vitro* spectrophotometric method. Finally, the chelation of the most active calcium chelators was verified on platelet aggregation in a human blood sample. At the same time, the long-term stability of the indicator o-cresolphthalein complexone (CC) was determined.

In the first step, pH 7.5 was chosen, which was the only one suitable for our measurements due to its good sensitivity. The most effective calcium-chelating substances were ADR-925, ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)tetraacetic acid tetrasodium salt (Na_4EGTA), disodium edetate (Na_2EDTA), and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). Chelators significantly binding magnesium were ADR-925, Na_2EDTA , DTPA, iodoquinol, clioquinol, chloroxine, 5,7-dibromoquinoline-8-ol and 8-hydroxy-7-iodoquinoline-5-sulfonic acid. The formed complexes with both metal ions were stable. At higher concentrations of certain halogenated derivatives of 8-hydroxyquinoline, precipitates were observed, making it impossible to fully evaluate their chelating abilities. The stability of the indicator was at least 105 days when stored in the refrigerator. Na_2EDTA , ADR-925, and Na_4EGTA were

able to completely inhibit platelet aggregation due to calcium chelation, with Na_2EDTA being the most effective.

In conclusion, a number of clinically used chelators are capable of strongly binding both calcium and magnesium ions, and the CC indicator is stable for at least 105 days.

Obsah

1.	Seznam zkratk.....	10
2.	Úvod.....	12
3.	Teoretická část.....	13
3.1.	Fyziologie vápníku.....	13
3.1.1.	Vstřebávání vápníku ve střevě.....	14
3.1.2.	Vylučování vápníku ledvinami.....	14
3.2.	Patofyziologie vápníku.....	15
3.2.1.	Hyperkalcémie.....	15
3.2.2.	Hypokalcémie.....	15
3.3.	Fyziologie hořčíku.....	16
3.3.1.	Vstřebávání hořčíku ve střevě.....	16
3.3.2.	Vylučování hořčíku ledvinami.....	17
3.4.	Patofyziologie hořčíku.....	17
3.4.1.	Hypermagnezémie.....	17
3.4.2.	Hypomagnezémie.....	18
3.5.	Chelatační terapie.....	18
3.5.1.	Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA).....	18
3.5.2.	Kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)tetraoctová (EGTA).....	19
3.5.3.	Kyselina diethylentriaminpentaoctová (DTPA).....	20
3.5.4.	Dithizon.....	20
3.5.5.	Disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové (Na ₂ NNDSA).....	21
3.5.6.	Deferoxamin.....	21
3.5.7.	Deferipron.....	22
3.5.8.	Ferrozín.....	22
3.5.9.	ADR-925.....	23
3.5.10.	D-penicilamin.....	24
3.5.11.	Tetrathiomolybdenan amonný (ATTM).....	24
3.5.12.	Kyselina bathocuproindisulfonová (BCS).....	25
3.5.13.	Ninhydrin.....	25
3.5.14.	8-hydroxychinoliny.....	26
4.	Cíle práce.....	27
5.	Experimentální část.....	28
5.1.	Chemikálie.....	28
5.2.	Přístroje.....	29
5.3.	Roztoky.....	29

5.4.	Měření kalibrační křivky vápenatých a hořečnatých iontů	31
5.5.	Měření chelatace vápenatých a hořečnatých iontů.....	32
5.6.	Ověření metodiky na biologickém vzorku	33
5.7.	Stanovení stability reagensů	34
5.8.	Matematicko-statistické zpracování výsledků	36
6.	Výsledky.....	37
6.1.	Změření kalibrační křivky.....	37
6.2.	Chelatace vápenatých a hořečnatých iontů	39
6.3.	Stabilita komplexů	48
6.4.	Ověření metodiky na biologickém vzorku	49
6.5.	Stabilita reagensů.....	50
7.	Diskuse	55
8.	Závěr.....	58
9.	Literatura	59

1. Seznam zkratek

AA	kyselina arachidonová (z angl. arachidonic acid)
ATTM	tetrathiomolybdenan amonný (z angl. ammonium tetrathiomolybdate)
BCS	kyselina bathocuproindisulfonová (z angl. bathocuproinedisulfonic acid)
CaSR	receptor citlivý na vápník (z angl. calcium-sensing receptor)
Ca-DTPA	vápenatá sůl kyseliny diethylentriaminpentaoctové
CaNa ₂ EDTA	edetát vápenatý disodný
CC	o-kresolftalein komplexon (z angl. cresolphthalein complexone)
DMSO	dimethylsulfoxid
DTPA	kyselina diethylentriaminpentaoctová (z angl. diethylenetriaminepentaacetic acid)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)tetraoctová (z angl. ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)tetraacetic acid)
HEPES	4-(2- hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonová kyselina
Na ₂ BCS	disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové
Na ₂ EDTA	edetát disodný
Na ₄ EGTA	tetrasodná sůl kyseliny ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)tetraoctové
NaHEPES	sodná sůl kyseliny 4-(2- hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonové
Na ₂ NNDSA	disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové (z angl. 1- nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid disodium salt)
PTHr	receptor pro parathormon (z angl. parathyroid hormon receptor)
TRPM	melastatinový transientní receptorový napěťový kanál (z angl. transient receptor potential melastatin)

TRPV	vaniloidní transientní receptorový napěťový kanál (z angl. t ransient receptor p otential vanilloid)
VDR	receptor vitamínu D (z angl. vitamin D receptor)
Zn-DTPA	zinečnatá sůl kyseliny diethylentriaminpentaoctové

2. Úvod

Vápník a hořčík jsou dvojmocné kovy, které se přirozeně vyskytují v lidském těle. Oba mají v organismu důležitou roli a plní mnoho funkcí. Vápník se podílí na vnitrobuněčné signalizaci, mineralizaci kostí, koagulaci krve a svalové kontrakci. Hořčík je významný pro správnou funkci kardiovaskulárního a neuromuskulárního systému. Jejich lehký nedostatek se projevuje mírnými příznaky, ale při velmi nízké hladině může dojít až ke smrti.

Koncentraci vápníku a hořčíku v séru mohou snižovat také chelátory těžkých kovů, které jsou často neselektivní. Jsou to látky, jenž váží kovové ionty a vytváří s nimi komplexy, které jsou následně vylučovány z těla ven. Chelátory se využívají při přetížení organismu těžkými kovy, ať už při otravě nebo léčbě onemocnění (např. Wilsonovy choroby). Tato práce je zaměřena na zjištění míry chelatace vápníku a hořčíku používanými chelátory těžkých kovů.

3. Teoretická část

3.1. Fyziologie vápníku

Vápník je nejzastoupenějším minerálem v lidském organismu. Tělo průměrného dospělého člověka obvykle obsahuje asi 1-1,5 kg vápníku. (Wang *et al.* 2012). Vápník je nezbytný pro kontrakci svalů, a to jak příčně pruhovaných, tak hladkých i srdečních vláken. Podílí se významně na intracelulární signalizaci, včetně té v neuronální a srdeční tkáni, na stavbě kostí a zubů, srážení krve, uvolňování hormonů a funkci enzymů. Přibližně 99 % vápníku se nachází v kostech a zubech ve formě hydroxyapatitu, zbylé 1 % je přítomno v extracelulárním prostoru a v buňkách (Hanna *et al.* 2022).

Koncentrace vápníku v séru se u zdravých jedinců pohybuje v rozmezí 2,2-2,6 mmol/l. Sérový vápník se vykytuje ve třech formách: ionizovaný (~ 50 %), vázaný na proteiny (např. albumin, globulin, kalmodulin, ~ 40 %) a v komplexu s anionty, jako je fosfát, citrát, uhličitan (~ 10 %) (Jeon 2008, Peacock 2010, Tinawi 2021).

Homeostáza vápníku je regulována složkami hormonálního systému, které řídí jeho absorpci ve střevě, reabsorpci v ledvinách a kostní obrat. Mezi hlavní regulátory patří parathormon, kalcitonin a 1,25-dihydroxyvitamin D (kalcitriol), což je nejaktivnější forma vitamínu D. Při snížení hladiny vápníku v séru dochází k menší aktivaci vápníkových receptorů (CaSR), které se nachází na povrchu buněk příštítných tělísek. V důsledku toho dojde ke zvýšení sekrece parathormonu a ke snížení renální exkrece vápníku. Parathormon působí na své receptory (PTHrP) v kostech, čímž stimuluje kostní resorpci, a v ledvinách, kde zvyšuje tubulární reabsorpci vápníku a podporuje tvorbu kalcitriolu. Kalcitriol vzniká v ledvinách z 25-dihydroxyvitamínu D, který se tvoří v játrech. Působením na receptory vitamínu D (VDR) kalcitriol zvyšuje absorpci vápníku ve střevě, snižuje sekreci PTH v příštítných tělískách a zvyšuje kostní resorpci, což má za následek zvýšené uvolňování vápníku z kostí. Se vzestupem hladiny sérového vápníku se tyto účinky otočí a povedou ke snížení jeho koncentrace. CaSR se také nachází ve štítné žláze, kde regulují uvolňování kalcitoninu z C-buněk. Kalcitonin blokuje kostní resorpci při zvýšené hladině vápníku a tím jeho uvolňování z kostí do krevního oběhu (Blaine *et al.* 2015, Peacock 2010, Taylor a Bushinsky 2009, Tinawi 2021).

3.1.1. Vstřebávání vápníku ve střevě

Denní příjem vápníku u průměrného dospělého člověka je asi 1000 mg. Ze střeva je absorbováno přibližně 40 % podaného vápníku, z toho 90 % v tenkém a 10 % v tlustém střevě. Do střevního lumen se navíc zpětně vylučuje 20 %, což vede k čisté absorpci asi 200 mg denně. Tedy 80 % vápníku z denního příjmu je vyloučeno stolicí a 20 % močí (*Blaine et al. 2015, Taylor a Bushinsky 2009*).

Absorpce ve střevě je zprostředkována dvěma cestami. Transcelulární cesta je aktivní proces, který zahrnuje přestup vápenatých iontů přes membránu kartáčového lemu enterocytů, intracelulární difúzi a jejich výstup přes bazolaterální membránu. Hlavním regulátorem této dráhy je kalcitriol. Paracelulární cesta (mezi buňkami) je pasivní proces a převažuje, pokud je koncentrace vápníku v lumen střeva vysoká (*Blaine et al. 2015, Bronner 2001, Diaz et al. 2017*).

3.1.2. Vylučování vápníku ledvinami

Asi 50 % sérového vápníku (ionizovaná a komplexová forma) je volně filtrováno přes ledvinový glomerulus. Při normální glomerulární filtraci se za 24 hodin přefiltruje asi 10 g vápníku. Z toho je přibližně 98 % zpětně reabsorbováno v nefronu a zbylých 100-200 mg se vyloučí močí. V proximálním tubulu se reabsorbuje 60-70 %, ve vzestupné části Henleovy kličky 20 %, v distálním tubulu 10 % a ve sběrném kanálku 5 % přefiltrovaného vápníku (*Hanna et al. 2022, Jeon 2008*).

V proximálním tubulu se 85 % vápníku resorbují pasivním (paracelulárním) transportem. Zbývajících 15 % je transportováno aktivní transcelulární dráhou, která je regulována parathormonem a kalcitoninem (*Tinawi 2021*). Ve vzestupné části Henleovy kličky také převažuje pasivní paracelulární transport, který je ovlivněn elektrochemickým gradientem. Gradient vzniká díky kotransportéru $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ a draslíkovému kanálu na lumenální membráně, kteří vytváří pozitivní membránový potenciál. Proteiny kladin-16 a kladin-19 vytváří komplex, který umožňuje paracelulární transport vápníku. Reabsorpci vápníku v Henleově kličce ovlivňuje také CaSR nacházející se na bazolaterální membráně. Pokud je detekována vysoká hladina, dojde k inhibici exprese kladinů a tím ke snížení reabsorpce vápníku a k jeho zvýšené exkreci močí (*Blaine et al. 2015, Hanna et al. 2022, Tinawi 2021*).

V distálním tubulu a sběracím kanálku se vápník reabsorbuje transcelulárně. Transport je aktivní, protože probíhá proti chemickému a elektrickému gradientu. V lumen je koncentrace vápníku nižší než v plazmě. Reabsorpci v těchto segmentech lze rozdělit do tří kroků. Nejprve vápník vstupuje přes vaniloidní transientní receptorové napěťové kanály 5 a 6 (TRPV5 a TRPV6) nacházející se na luminální membráně do buňky. V buňce se váže na protein vázající vápník (kalbindin-D28k), který ho přeneseme cytosolem k bazolaterální membráně. Z buňky do krevního řečiště se dostává přes sodno-vápenatý výměník nebo Ca-ATPasu (*Blaine et al. 2015, Hanna et al. 2022, Jeon 2008*).

3.2. Patofyziologie vápníku

3.2.1. Hyperkalcémie

Hyperkalcémie je stav, kdy je hladina vápníku v krvi vyšší než 2,6 mmol/l. Může být mírná (2,6-2,9 mmol/l), střední (3-3,5 mmol/l) nebo závažná (>3,5 mmol/l) (*Jomova et al. 2022, Tinawi 2021*). Nejčastějšími příčinami jsou primární hyperparatyreóza (nadbytek parathormonu v důsledku adenomu příštítných tělísek nebo hyperplazie) a nádory. Mezi další příčiny patří např. léčiva (thiazidová a jim podobná diuretika, antacida), intoxikace vitamínem A a D nebo imobilizace. Hyperkalcémie se může projevovat neurologickými a psychickými poruchami (např. zmatenost, poruchy koncentrace, úzkost), gastrointestinálními (např. zvracení, zácpa), renálními (např. polyurie, polydipsie, ledvinové kameny) a kardiovaskulárními (např. hypertenze, zkrácení QT intervalu). Závažná hyperkalcémie může vést až k akutnímu selhání ledvin nebo srdečním dysrytmiím. Pacienti s mírnou hyperkalcémií mohou být asymptomaticí. Léčba může zahrnovat podání kličkových diuretik, bisfosfonátů, kalcitoninu, rehydrataci fyziologickým roztokem a hemodialýzu (*Carroll a Schade 2003, Jomova et al. 2022, Tinawi 2021*).

3.2.2. Hypokalcémie

Hypokalcémie je definovaná jako hladina vápníku v séru nižší než 2,12 mmol/l. Mezi příčiny patří hypoparatyreóza, nedostatek vitamínu D, onemocnění ledvin, hyper/hypomagnezémie, syndrom hladové kosti nebo léky (např. bisfosfonáty). Chronická hypokalcémie je většinou asymptomatická. Příznaky zahrnují svalovou

slabost, zmatenost, únavu, svalové křeče. U akutní může dojít k laryngospasmu, tetanii, prodloužení QT intervalu nebo nervosvalové podrážděnosti. Při chronické hypokalcémii se podává perorálně vápník a vitamin D, léčba akutní je založena na intravenózním podávání vápníku (*Fong a Khan 2012, Jomova et al. 2022, Tinawi 2021*).

3.3. Fyziologie hořčíku

Hořčík je čtvrtým nejhojněji se vyskytujícím minerálem a druhým nejrozšířenějším intracelulárním kationtem v lidském těle (*Gröber et al. 2015, Terry 1991*). Hořčík působí jako kofaktor široké škály enzymů. Je nezbytný pro syntézu nukleových kyselin a proteinů, intracelulární signalizaci, tvorbu kostí, neuromuskulární dráždivost, oxidativní fosforylaci a správnou funkci kardiovaskulárního systému (*Blaine et al. 2015, Seo a Park 2008*).

V těle průměrného dospělého člověka se nachází 22-29 g hořčíku. Kostí obsahují asi 60 %, z toho 30 % je rychle dostupný hořčík, který představuje rezervoár pro případnou potřebu normalizace jeho hladiny v krvi. Přibližně 39 % hořčíku se nachází v kosterním svalstvu a v měkkých tkáních, méně než 1 % je v extracelulární tekutině (*Barbagallo et al. 2021, Seo a Park 2008*). Normální koncentrace hořčíku v séru je v rozmezí 0,76-1,15 mmol/l. Vyskytuje se ve třech formách: ionizovaný (55-70 %), vázaný na proteiny (20-30 %) a v komplexu s anionty, jako je fosfát, síran, citrát nebo hydrogenuhličitan (5-15 %) (*Gröber et al. 2015*).

Koncentrace hořčíku v séru je regulována dynamickou rovnováhou mezi jeho absorpcí ve střevě, exkrecí ledvinami a výměnou ze zásob v kostech (*Blaine et al. 2015*). Vstřebávání a vylučování hořčíku je ovlivňováno kalcitriolem, parathormonem a estrogeny. Uvolňování parathormonu zvyšuje reabsorpci hořčíku v ledvinách, absorpci ve střevě a jeho uvolňování z kostí (*Gröber et al. 2015*).

3.3.1. Vstřebávání hořčíku ve střevě

Míra střevní absorpce hořčíku je závislá na jeho obsahu ve stravě. Při jeho nízkém příjmu může být absorpce až 80 % a naopak při vysokém příjmu jen 20 %. Čistá absorpce je přibližně 100 mg/den. Ke vstřebávání dochází převážně v tenkém střevě, v menší míře ve střevě tlustém (*Schuchardt a Hahn 2017*). Absorpce hořčíku probíhá satureovatelnou

transcelulární a nesaturovatelnou paracelulární dráhou. Paracelulární cesta, stejně jako u vápníku, převažuje při vyšším příjmu hořčíku, je řízena elektrochemickým gradientem a závisí na permeabilitě těsných spojů mezi buňkami. Transcelulární cesta je zprostředkována transientními receptorovými napěťovými kanály melastatinového typu 6 a 7 (TRPM6 a TRPM7) (Blaine et al. 2015, Gröber et al. 2015, Schuchardt a Hahn 2017).

3.3.2. Vylučování hořčíku ledvinami

Při normální funkci ledvin se za den přefiltruje asi 2000-2400 mg hořčíku. Volně filtrováno je přibližně 70 % sérového hořčíku (ionizovaná a komplexová forma), z toho se většina reabsorbuje a pouze 3-5 % (100 mg/den) je vyloučeno močí. V proximálním tubulu se vstřebává 10-30 %, ve vzestupné části Henleovy kličky 40-70 % a v distálním tubulu 5-10 % (Blaine et al. 2015, Ellison et al. 2021, Gröber et al. 2015).

Transport hořčíku v proximálním tubulu probíhá pravděpodobně paracelulární cestou, která je závislá na reabsorpci sodík/voda a lumenální koncentraci hořčíku (Seo a Park 2008). Ve vzestupné části Henleovy kličky se hořčík také resorbuje paracelulární dráhou, která je, stejně jako u vápníku, ovlivněna elektrochemickým gradientem (Blaine et al. 2015). V distálním tubulu převažuje aktivní transcelulární transport. Do buňky hořčík vstupuje pomocí kanálu TRPM6 a z buňky vystupuje pravděpodobně přes výměník $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ na bazolaterální membráně (Ellison et al. 2021).

3.4. Patofyziologie hořčíku

3.4.1. Hypermagnezémie

Hypermagnezémie nastává při koncentraci hořčíku v séru vyšší než 1,15 mmol/l a je nejčastěji pozorovaná u pacientů se sníženou funkcí ledvin (Jomova et al. 2022). Mezi další příčiny patří nadměrné užívání laxativ, antacid a klystýrů. Počáteční příznaky zahrnují nauzeu, zvracení, hypotenzi a zčervenání obličeje. Se zvyšující hladinou se mohou objevit neuromuskulární (např. letargie, potlačení šlachových reflexů, útlum dechu, svalová slabost) a kardiovaskulární příznaky (bradykardie až zástava srdce). Při zjištění nadbytku hořčíku by se mělo nejdříve zamezit jeho nadbytečnému příjmu (např.

zmíněná hořčík obsahující antacida). Léčba těžších stavů zahrnuje intravenózní hydrataci, podávání kličkových diuretik, vápníku nebo hemodialýzu (*Seo a Park 2008, Terry 1991*).

3.4.2. Hypomagnezémie

Nedostatek hořčíku je mnohem častější než jeho nadbytek. Hypomagnezémie je definovaná jako koncentrace sérového hořčíku nižší než 0,75 mmol/l (*Gröber et al. 2015*). Příčiny zahrnují alkoholismus, malabsorpci (např. ulcerózní kolitida, Crohnova choroba), onemocnění ledvin, endokrinní poruchy (např. hyperparatyreóza, hyperaldosteronismus) a užívání některých léčiv (např. diuretika, cisplatina, inhibitory protonové pumpy). Znamky nedostatku hořčíku se většinou projeví až když hladina klesne pod 0,5 mmol/l. Mezi příznaky mírné hypomagnezémie patří nevolnost, zvracení, ztráta chuti k jídlu, letargie a únava. Těžší stavy se projevují zvýšenou nervosvalovou dráždivostí (např. záchvaty, svalové křeče, třes, vertigo) a poruchami kardiovaskulárního systému jakou jsou dysrytmie a zvýšená citlivost na digoxin. Léčí se podáváním hořečnatých solí ať už perorálně nebo parenterálně (*Gröber et al. 2015, Seo a Park 2008*).

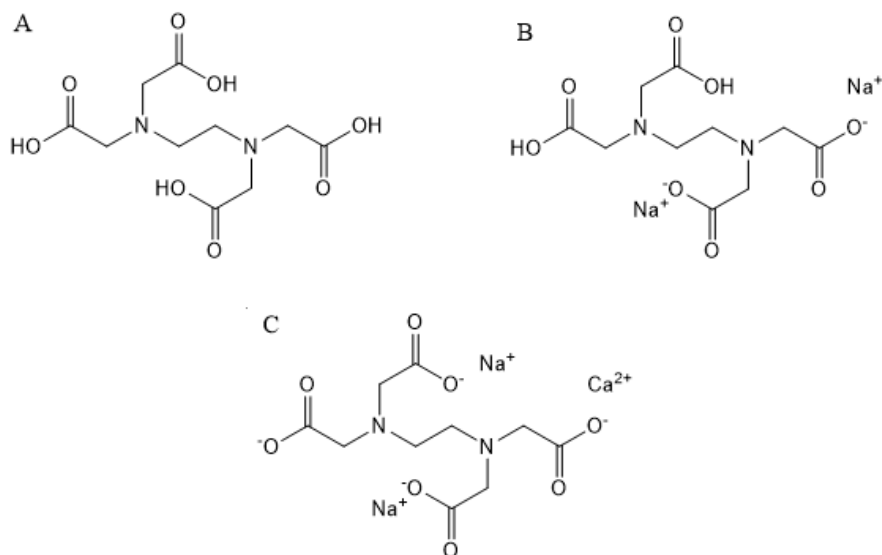
3.5. Chelatační terapie

Chelatační terapie se využívá při intoxikaci těžkými kovy. Chelatace je proces založený na schopnosti chelatačního činidla vázat kovové ionty za vzniku komplexu, tzv. chelátu. Ideální chelatační činidlo by se mělo dobře rozpouštět ve vodě a zároveň být schopné procházet buněčnými membránami, aby odstranilo těžké kovy z buněk. Dále by mělo s kovem tvořit netoxické komplexy a chelatovat při pH tělních tekutin. Důležitá je také vyšší afinita chelatačního činidla k toxickému kovu než k jiným endogenním kovům v organismu. Nízká specifita a podávání vysokých dávek chelátoru může mít za následek snížení hladiny vápníku a jiných esenciálních prvků (*Kalia a Flora 2005, Kim et al. 2019, Flora a Pachauri 2010*).

3.5.1. Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

EDTA (Obr. 1) je chelatační činidlo s vysokou afinitou ke dvojmocným a trojmocným kovům s nízkou elektronegativitou (např. vápník, hořčík, olovo, zinek,

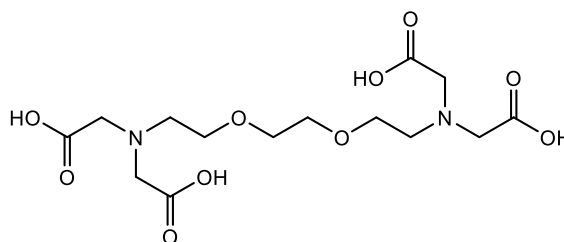
mangan). V klinické praxi se používají při otravách těžkými kovy (např. olovem) a při hyperkalcémii její soli: edetát disodný (Na_2EDTA) a edetát vápenatý disodný (CaNa_2EDTA). V dnešní době se od používání těchto solí opouští kvůli snižování hladiny esenciálních kovů, zejména vápníku a zinku, a nefrotoxicitě. V současnosti probíhají studie na posouzení vlivu EDTA a jejích solí na léčbu kardiovaskulárních onemocnění (*Aaseth et al. 2015, Ferrero 2016, Kalia a Flora 2005*).



Obr. 1: Chemická struktura: A) EDTA, B) edetátu disodného, C) edetátu vápenatého disodného. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.2. Kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)tetraoctová (EGTA)

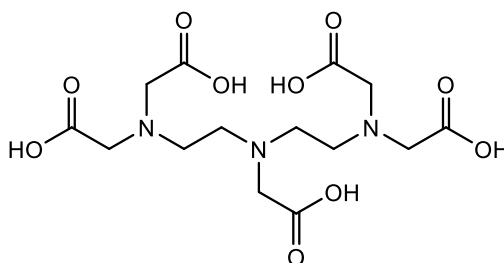
EGTA (Obr. 2) je chelátor s vyšší selektivitou k vápenatým iontům, které chelatuje v poměru 1:1. Dusíky ve struktuře EGTA vážou protony a kvůli tomu je chelatace vápníku závislá na pH. Vyšší je kolem pH 7 (*Dominguez a Ward 2009, Tsien 1980*).



Obr. 2: Chemická struktura EGTA. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.3. Kyselina diethylenetriaminpentaoctová (DTPA)

DTPA (Obr. 3) je schopná vázat dvojmocné a trojmocné kovy, jako je zinek, železo, mangan, vápník. Při fyziologickém pH má DTPA 20krát vyšší afinitu k zinku než EDTA, ale výsledná schopnost vázat zinek v organismu je ovlivněna přítomností ostatních kovů a dostupností zinku. V několika studiích bylo zjištěno, že při podávání vápenaté soli DTPA (Ca-DTPA) se zvýšila koncentrace zinku v moči, zatímco u ostatních kovů zůstala hladina v normě. Při užívání zinečnaté soli DTPA (Zn-DTPA) se nezvýšilo vylučování žádného kovu (*Arts et al. 2018*). Zn- i Ca-DTPA se využívají při intoxikaci aktinoidy, např. plutoniem, americiem a curiem (*Miller et al. 2010*).

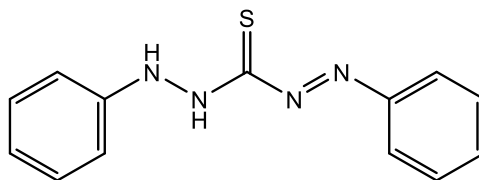


Obr. 3: Chemická struktura DTPA. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.4. Dithizon

Dithizon neboli 1,5-difenylthiokarbazon (Obr. 4) patří mezi nejpoužívanější fotometrická činidla. Tvoří barevné komplexy s mnoha kovy (např. s mědí, olovem, rtuť, zinkem, stříbrem, kadmium, palladium), které jsou nerozpustné ve vodě a rozpustné v chloroformu a tetrachlormethanu. Dithizon se používá pro detekci těchto kovů v oblasti biomedicíny a životního prostředí (*Ahmed a Alam 2003, Khan et al. 2005, Lo 1960,*

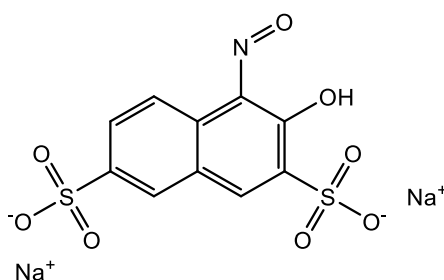
Normaya et al. 2019). Kolegové z mojí pracovní skupiny připravili přesnou, levnou a rychlou metodiku pro screening nových chelátorů zinku s využitím dithizonu (*Catapano et al. 2018*).



Obr. 4: Chemická struktura dithizonu. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.5. Disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové (Na_2NNDSA)

Na_2NNDSA (Obr. 5) neboli nitroso-R sůl je chromogenní činidlo poprvé představené v roce 1921. Tvoří komplexy s mnohými kovy např. s mědí, kobaltem, niklem, železem, paladiem a rutheniem. Selektivity pro jednotlivé ionty je dosaženo vhodnou úpravou pH a měřením absorbance při maximální vlnové délce specifické pro každý kovový komplex (*Kruanetr et al. 2008, Purachat et al. 2001, Samarina et al. 2012*). Toto činidlo bylo nedávno použito k přípravě metodiky pro screening chelátorů kobaltu (*Moravcová et al. 2023*).

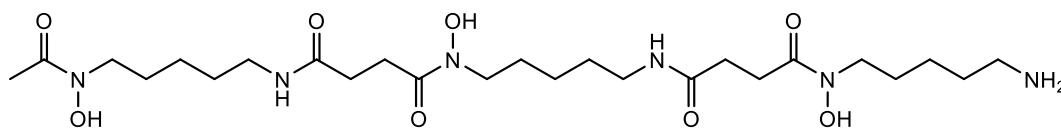


Obr. 5: Chemická struktura Na_2NNDSA . Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.6. Deferoxamin

Deferoxamin (Obr. 6) je látka produkovaná bakterií *Streptomyces pilosus* a několika druhů aktinomycet. Má vysokou afinitu k železu, ale i k jiným kovům jako je např. hliník, zinek, kobalt a měď (*Bellotti a Remelli 2021, National Institute of Diabetes*

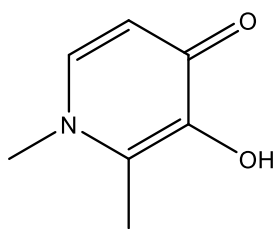
and Digestive and Kidney Diseases 2017b). Deferoxamin se používá při akutní otravě a při přetížení organismu železem u opakovaných transfuzí, které jsou nutné pro léčbu β -thalasémie a srpkovité anémie (Aaseth et al. 2015, Bellotti a Remelli 2021). Dále je indikován při chronickém přetížení organismu hliníkem (Smith 2013).



Obr. 6: Chemická struktura deferoxaminu. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.7. Deferipron

Deferipron (Obr. 7) je alternativou k deferoxaminu v indikaci chronického přetížení organismu železem způsobeného transfuzemi. Jeho výhodou je perorální užívání a nižší riziko nežádoucích účinků. S vysokou afinitou váže železo v poměru 3:1, v menší míře zinek a měď. Mezi nežádoucí účinky deferipronu patří snižování hladiny zinku, které lze vyřešit jeho suplementací (Aaseth et al. 2015, Hoffbrand et al. 2003, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2017a).

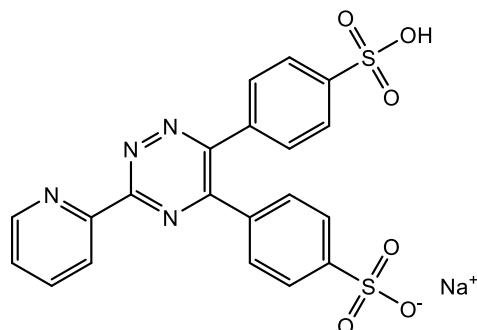


Obr. 7: Chemická struktura deferipronu. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.8. Ferrozin

Ferrozin (Obr. 8) je chromogenní chelátor železa velmi dobře rozpustný ve vodě. Váže ale pouze železnaté ionty a používá se jako jejich indikátor. Od ostatních indikátorů železa se liší vysokou citlivostí a stabilitou v širokém rozmezí pH. Ferrozin s Fe^{2+} tvoří

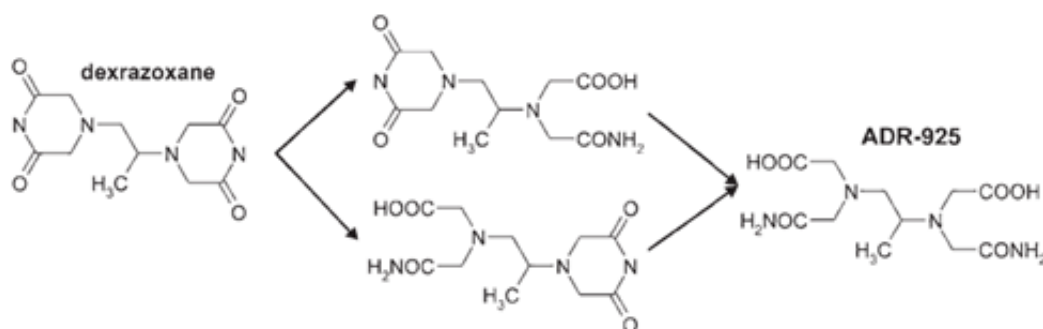
komplex v poměru 3:1, který se dá využít k hledání nových chelátorů železa (*Hirayama a Nagasawa 2017, Mladěnka et al. 2010, Smith et al. 2021, Stookey 1970*). Dále byla zjištěna tvorba komplexů s kobaltem, rutheniem a osmiem (*Gibbs 1976*).



Obr. 8: Chemická struktura ferrozinu. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.9. ADR-925

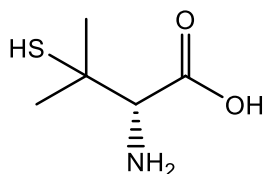
ADR-925 je metabolit hydrolyzy dexrazoxanu (Obr. 9), který je jedinou klinicky schválenou látkou proti kardiotoxicitě navozenou antracyklinovými antibiotiky (doxorubicin, daunorubicin). ADR-925 se svou strukturou podobá EDTA a chelatuje železnaté i železité ionty (*Jirkovský et al. 2018, Šimůnek et al. 2009, Schroeder a Hasinoff 2002*).



Obr. 9: Chemická struktura dexrazoxanu a jeho hydrolyza na ADR-925. Převzato z: Šimůnek et al. (2008).

3.5.10. D-penicilamin

D-penicilamin (Obr. 10) je strukturální analog cysteinu a degradační produkt penicilinu (Puglise et al. 2021). V klinické praxi se používá D-izomer, protože L-izomer způsobuje zánět zrkového nervu (Flora a Pachauri 2010). Traduje se, že má vysokou afinitu k mědi. To ale bylo dříve i nedávno zpochybněno a jeho vliv na exkreci mědi je asi dán spíše její redukcí (Říha et al. 2013). Chelatuje ale jiné těžké kovy např. olovo, rtuť. Vytváří s nimi komplex rozpustný ve vodě, který je následně vylučovaný močí. Využívá se k léčbě Wilsonovy choroby, cystinurie, těžké revmatoidní artritidy a někdy jako chelatační činidlo při intoxikaci těžkými kovy. Velkou nevýhodou jsou jeho nežádoucí účinky, které jsou běžné a postihují řadu orgánů (Aaseth et al. 2015, Flora a Pachauri 2010, Mejias a Ramphul 2022).

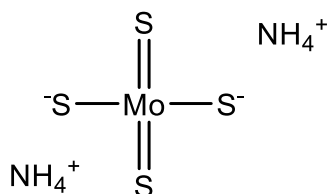


Obr. 10: Chemická struktura D-penicilaminu.

Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.11. Tetrathiomolybdenan amonný (ATTM)

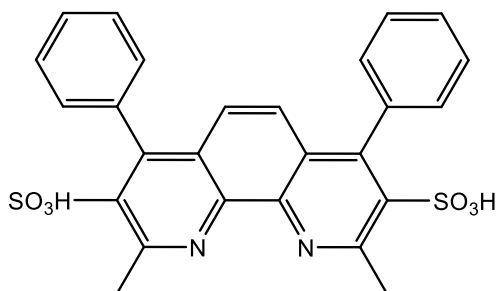
ATTM (Obr. 11) je chelátor mědi, který při podávání mezi jídly váže měď v plazmě. Pokud se podává po jídle, tak inhibuje vstřebávání mědi z potravy. Ve střevě tvoří ATTM s mědí a proteiny trojdílný komplex, který je vylučován do žluči (Lucena-Valera et al. 2021, Roberts et al. 2008). V roce 2008 byl schválen Evropskou lékovou agenturou jako sirotčí léčivo pro léčbu Wilsonovy choroby (EMA 2008).



Obr. 11: Chemická struktura ATTM. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.12. Kyselina bathocuproindisulfonová (BCS)

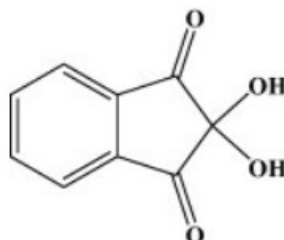
BCS (Obr. 12) je ve vodě rozpustný analog bathocuproinu. Obě látky přednostně vytváří komplexy s měďnatými ionty a používají se pro stanovení oxidačního stavu mědi a ke screeningu nových chelátorů mědi. BCS váže Cu^+ i Cu^{2+} v poměru 2:1. Komplex Cu^+ -BCS₂ má nejvyšší absorpční při vlnové délce 483 nm, ale Cu^{2+} -BCS₂ světlo v této oblasti neabsorbuje (Chen et al. 2016, Laggner et al. 2006, Říha et al. 2013).



Obr. 12: Chemická struktura BCS. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

3.5.13. Ninhydrin

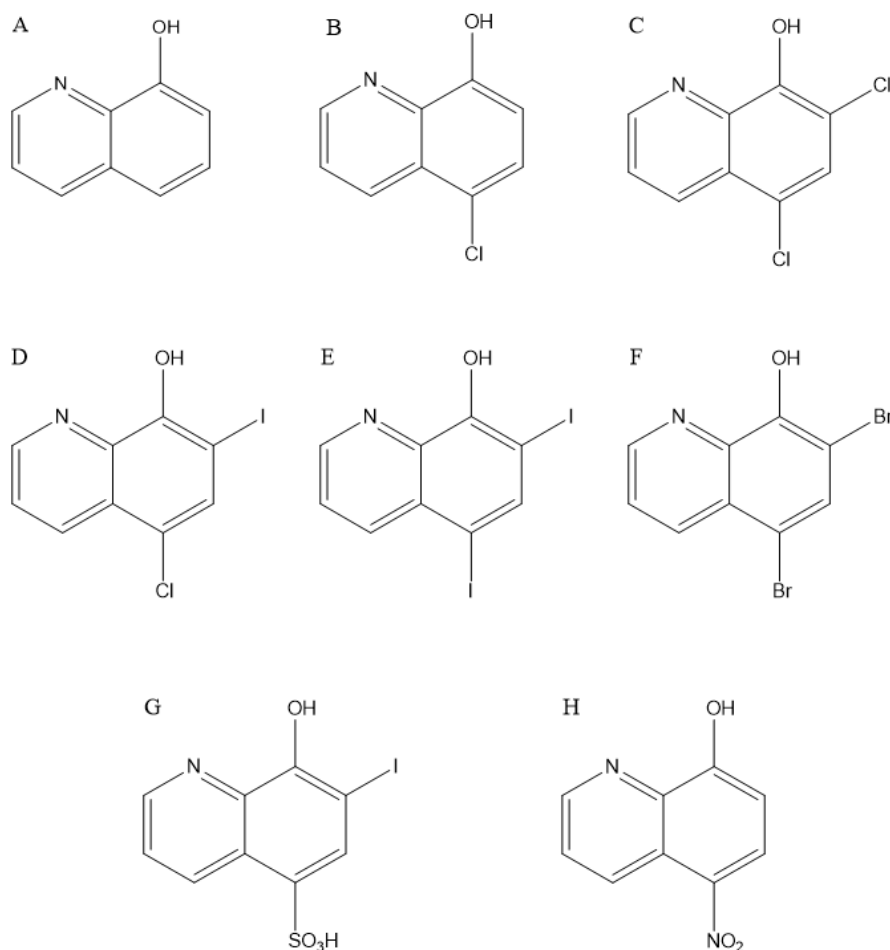
Ninhydrin (Obr. 13) je látka, která vytváří s primárními aminy a α -aminokyselinami vysoce zbarvenou sloučeninu známou jako Ruhemmanova purpur. Využívá se pro stanovení latentních otisků prstů ve forenzní analýze (Das 2022). Ninhydrin vytváří barevné komplexy také s kobaltem, niklem a chromem (Mahmood et al. 2012, Singh 1965). Jeho schopnost tvorby barevných komplexů s kobaltem byla ale nedávno vyvrácena naší skupinou (Moravcová et al. 2023).



Obr. 13: Chemická struktura ninhydrinu. Převzato z: Mahmood et al. (2012).

3.5.14. 8-hydroxychinoliny

8-hydroxychinolin a jeho deriváty (Obr. 14) jsou skupinou látek s různými biologickými aktivitami. Základní strukturou těchto látek je bicyklická sloučenina složená z pyridinového kruhu kondenzovaného k fenolu s hydroxylovou skupinou v poloze 8. Díky krátké vzdálenosti mezi fenolickou skupinou a heterocyklickým dusíkem jsou 8-hydroxychinoliny dobrými chelatačními činidly. S kovovými ionty (např. s Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+}) tvoří čtyř- a šestikovalentní komplexy. Kvůli přítomnosti fenolické skupiny jsou náchylné k četným reakcím a strukturálním modifikacím. 8-hydroxychinoliny mají antineurodegenerativní, antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé, protirakovinné a antidiabetické účinky (*Prachayasittikul et al. 2013, Saadeh et al. 2020*).



Obr. 14: Chemická struktura 8-hydroxychinolinů: A) 8-hydroxychinolin, B) 5-chlorochinolin-8-ol, C) chloroxin, D) kliočinol, E) jodočinol, F) 5,7-dibromochinolin-8-ol, G) 8-hydroxy-7-jodočinolin-5-sulfonová kyselina, H) nitroxolin. Vytvořeno za pomoci programu ChemDraw 20.0.

4. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda a) současně používané chelátory těžkých kovů mají schopnost interagovat s vápníkem a hořčíkem, protože výsledkem této interakce může být pokles hladiny těchto kovů v lidském organismu a vznik nežádoucích účinků, b) ověřit dlouhodobou stabilitu indikátoru o-kresolftalein komplexonu.

5. Experimentální část

5.1. Chemikálie

- Dihydrát chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Spektrofotometrický indikátor vápníku a hořčíku: o-kresolftalein komplexon (CC)
- Kyselina arachidonová (AA) byla získána od Roche (Basilej, Švýcarsko)
- Testované látky:
 - 5-chlorochinolin-8-ol
 - 5,7-dibromochinolin-8-ol
 - 8-hydroxychinolin
 - 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonová kyselina
 - ADR-925 byl izolován na Katedře organické a bioorganické chemie FaF UK skupinou prof. Vávrové.
 - ATTM
 - Deferipron
 - Deferoxamin byl použit v lyofilizované formě (preparát Desferal, Novartis, Švýcarsko)
 - Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (Na_2BCS)
 - Dithizon
 - D-penicilamin
 - DTPA
 - Ferrozín
 - Chloroxin
 - Jodochinol byl zakoupen od Toronto Research Chemicals (Kanada)
 - Kliočinol
 - Na_2EDTA
 - Na_2NNDSA byl zakoupen od Acros Organics (USA)
 - Ninhydrin
 - Nitroxolin
 - Tetrasodná sůl kyseliny ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)tetraoctové (Na_4EGTA)

- Chemikálie pro přípravu pufru:
 - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES)
 - Kyselina octová
 - Octan sodný
 - Sodná sůl HEPES (NaHEPES)
- Rozpouštědla:
 - Dimethylsulfoxid (DMSO) a metanol byly zakoupeny od Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
 - Fyziologický roztok byl zakoupen od B. Braun (Melsungen, Německo)
 - Superčistá voda byla připravená pomocí přístroje Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Pokud není uvedeno jinak, tak všechny chemikálie byly získané od firmy Sigma-Aldrich (Německo).

5.2. Přístroje

- Agregometr Multiplate (Roche Diagnostic, Basilej, Švýcarsko)
- Analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern, Německo)
- Spektrofotometr Hidex Sense Multimodal Microplate Reader (Hidex, Turku, Finsko)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA[®] MS3 digital (IKA[®]-Werke GmgH & Co. KG, Staufen, Německo)

5.3. Rostoky

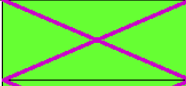
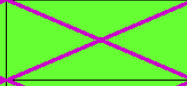
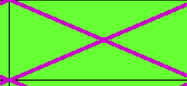
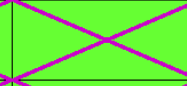
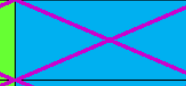
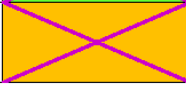
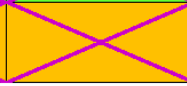
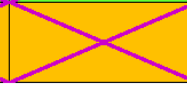
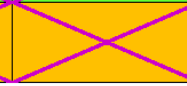
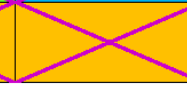
- Pufr o pH 7,5 byl připraven smícháním vodného 15 mM roztoku NaHEPES a 14,3 mM roztoku HEPES.
- Pufr o pH 6,8 byl připraven smícháním vodného 15 mM roztoku NaHEPES a 71,7 mM roztoku HEPES.
- Pufr o pH 5,5 byl připraven smícháním vodného 15 mM roztoku octanu sodného a 2,7 mM roztoku kyseliny octové.
- Pufr o pH 4,5 byl připraven smícháním vodného 15 mM roztoku octanu sodného a 27,3 mM roztoku kyseliny octové.

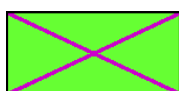
- Zásobní roztok vápenatých iontů o koncentraci 10 mM byl připraven rozpuštěním navážky dihydrátu chloridu vápenatého ($M_w = 147,014 \text{ g/mol}$) ve vypočteném objemu superčisté vody.
- Zásobní roztok hořečnatých iontů o koncentraci 10 mM byl připraven rozpuštěním navážky heptahydrátu síranu hořečnatého ($M_w = 246,475 \text{ g/mol}$) ve vypočteném objemu superčisté vody.
- Pracovní roztoky vápenatých a hořečnatých iontů o koncentraci 3; 2,1; 1,2 a 0,3 mM byly připraveny naředěním příslušných zásobních roztoků v čase potřeby superčistou vodou.
- Zásobní roztok CC ($M_w = 636,6 \text{ g/mol}$) o koncentraci 8 mM byl připraven rozpuštěním jeho navážky ve vypočteném objemu pufru o pH 7,5.
- Pracovní roztok CC o koncentraci 4 mM byl připraven naředěním jeho zásobního roztoku v čase potřeby puftrem o pH 7,5.
- Roztok AA o koncentraci 15 mM byl připraven rozpuštěním zakoupeného kitu superčistou vodou.
- Zásobní roztoky Na_2EDTA ($M_w = 372,24 \text{ g/mol}$), DTPA ($M_w = 393,35 \text{ g/mol}$), ferrozinu ($M_w = 492,46 \text{ g/mol}$), Na_4EGTA ($M_w = 468,28 \text{ g/mol}$), ADR-925 ($M_w = 304,3 \text{ g/mol}$), Na_2BCS ($M_w = 564,54 \text{ g/mol}$), ATTM ($M_w = 260,28 \text{ g/mol}$), deferoxaminu ($M_w = 656,8 \text{ g/mol}$), deferipronu ($M_w = 139,15 \text{ g/mol}$), D-penicilaminu ($M_w = 149,21 \text{ g/mol}$) a Na_2NNDSA ($M_w = 377,25 \text{ g/mol}$) o požadované koncentraci byly připraveny rozpuštěním v superčisté vodě.
- Zásobní roztoky dithizonu ($M_w = 256,33 \text{ g/mol}$), kliočinolu ($M_w = 305,5 \text{ g/mol}$), jodočinolu ($M_w = 396,95 \text{ g/mol}$), chloroxinu ($M_w = 214,05 \text{ g/mol}$), nitroxolinu ($M_w = 190,16 \text{ g/mol}$), 8-hydroxyčinolinu ($M_w = 145,16 \text{ g/mol}$), 5-chlorochinolin-8-olu ($M_w = 179,6 \text{ g/mol}$), 5,7-dibromochinolin-8-olu ($M_w = 303 \text{ g/mol}$) a 8-hydroxy-7-jodočinolin-5-sulfonové kyseliny ($M_w = 351,1 \text{ g/mol}$) o požadované koncentraci byly připraveny rozpuštěním v DMSO.
- Zásobní roztok ninhydrinu ($M_w = 178,14 \text{ g/mol}$) byl připraven rozpuštěním v metanolu.
- Zásobní roztoky Na_2EDTA , Na_4EGTA a ADR-925 o požadované koncentraci pro ověření metodiky na biologickém vzorku byly připraveny rozpuštěním ve fyziologickém roztoku.

- Pracovní roztoky testovaných látek o požadované koncentraci byly připraveny naředěním příslušných zásobních roztoků v čase potřeby ve stejném rozpouštědle jako zásobní roztoky.
- Zásobní roztoky CC, vápenatých a hořečnatých iontů a pufr se uchovávaly v lednici, zásobní roztoky testovaných látek v mrazáku.

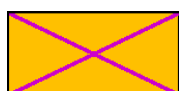
5.4. Měření kalibrační křivky vápenatých a hořečnatých iontů

1. Do určených jamek mikrotitrační destičky bylo přidáno 150 μl pufru o různých pH (7,5; 6,8; 5,5 a 4,5).
2. Následně bylo napipetováno 50 μl superčisté vody do všech jamek.
3. Do zelených jamek (Obr. 15) bylo přidáno 50 μl roztoku vápenatých iontů o koncentraci 3; 2,1; 1,2 nebo 0,3 mM, do modrých 50 μl superčisté vody a do oranžových 50 μl odpovídajícího pufru.
4. Destička se nechala 1 minutu míchat na třepačce.
5. Do všech jamek bylo přidáno 50 μl 4 mM roztoku CC.
6. Změření absorbance při vlnové délce 573 nm hned a po 5 minutách.
7. Celý postup byl zopakován s hořečnatými ionty, absorbance byla měřena při vlnové délce 568 nm.

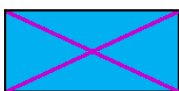
	3 mM roztok Ca ²⁺ /Mg ²⁺	2,1 mM roztok Ca ²⁺ /Mg ²⁺	1,2 mM roztok Ca ²⁺ /Mg ²⁺	0,3 mM roztok Ca ²⁺ /Mg ²⁺	0 mM roztok Ca ²⁺ /Mg ²⁺
vzorky s CC					
slepé vzorky s indikátorem					



Jamky s ionty a CC



Jamky s pufrem a CC, bez iontů

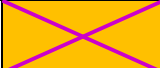
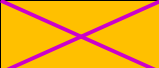
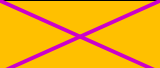
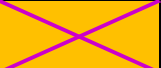
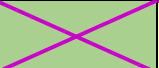
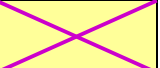
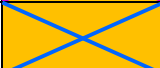
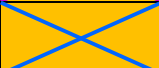
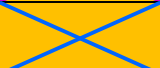
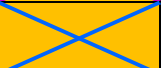
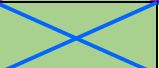
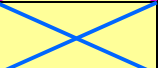


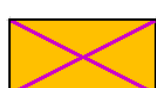
Jamky se super čistou vodou a CC, bez iontů

Obr. 15: Tabulka znázorňující měření kalibrační křivky

5.5. Měření chelatace vápenatých a hořečnatých iontů

1. Do určených jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μ l pufru o pH 7,5.
2. Dále bylo do všech sloupců kromě posledního přidáno 50 μ l 3 mM roztoku vápenatých iontů, do posledního 50 μ l superčisté vody.
3. Přidání 50 μ l roztoku testované látky o požadované koncentraci (c_1 - c_x), do posledních dvou sloupců 50 μ l rozpouštědla podle toho, ve kterém byla látka rozpuštěna (Obr. 16).
4. Destička se nechala 1 minutu míchat na třepačce.
5. Do prvních tří řad bylo přidáno 50 μ l 4 mM roztoku CC, do poslední řady 50 μ l pufru o pH 7,5.
6. Změření absorbance při vlnové délce 573 nm hned a po 5 minutách.
7. Byl zopakovaný celý postup s hořečnatými ionty, absorbance byla měřena při vlnové délce 567 nm.

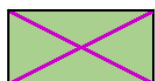
	C ₁	C ₂	C ₃	C _x	pozitivní kontrola	negativní kontrola
vzorky s CC						
slepé vzorky						



Jamky s testovanou látkou, ionty a CC



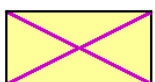
Jamky s testovanou látkou a ionty, bez CC



Jamky s ionty a CC, bez testované látky



Jamky s ionty, bez testované látky a CC



Jamky s CC, bez testované látky a iontů



Jamky bez testované látky, iontů a CC

Obr. 16: Tabulka znázorňující měření chelatace

5.6. Ověření metodiky na biologickém vzorku

1. Do kyvety bylo napipetováno 300 μ l zahřátého fyziologického roztoku.
2. Bylo přidáno 300 μ l lidské krve (odebrané zdravým dobrovolníkům po podepsání informovaného souhlasu; schváleno etickou komisí FaF UK z 13. května 2021).
3. Poté bylo napipetováno 5 μ l testované látky nebo fyziologického roztoku.
4. Inkubace 3 minuty při 37 °C.
5. Dále bylo přidáno 5 μ l 15 mM AA jako induktoru agregace krevních destiček.
6. Po dobu 6 minut byla monitorovaná agregace krevních destiček pomocí agregometru Multiplate[®], jehož výhodou je možnost měření celé krve.

5.7. Stanovení stability reagensů

Pro stanovení stability reagensů byly připraveny tři 3 mM roztoky CC v pufru o pH 7,5 a označeny jako CC-A, CC-B a CC-C. Tyto roztoky byly porovnávány s čerstvými roztoky připravenými před každým měřením a mezi nimi byla sledována závislost.

1. Do všech určených jamek bylo napipetováno 150 μ l pufru s pH 7,5.
2. Poté bylo do všech jamek přidáno 50 μ l superčisté vody.
3. Do zelených jamek bylo přidáno 50 μ l 3 mM roztoku vápenatých iontů, do modrých jamek 50 μ l 3 mM roztoku hořečnatých iontů a do oranžových jamek 50 μ l superčisté vody viz. Obr. 17.
4. Destička se nechala 1 minutu míchat na třepačce.
5. Do 1. a 2. sloupce bylo napipetováno 50 μ l starého 3 mM roztoku CC-A, do 3. a 4. 50 μ l starého 3 mM roztoku CC-B, do 5. a 6. 50 μ l starého 3 mM roztoku CC-C, do 7. a 8. 50 μ l nově připraveného 3 mM roztoku CC-A, do 9. a 10. 50 μ l nově připraveného 3 mM roztoku CC-B, 50 μ l nově připraveného 3 mM roztoku CC-C.
6. Absorbance byla měřena při vlnové délce 570 nm hned a po 5 minutách.

1	2	3	4	5	6
Starý CC-A		Starý CC-B		Starý CC-C	
Ca	Mg	Ca	Mg	Ca	Mg
X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X
7	8	9	10	11	12
Nový CC-A		Nový CC-B		Nový CC-C	
Ca	Mg	Ca	Mg	Ca	Mg
X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X



Jamky s vápenatými ionty a CC



Jamky s hořečnatými ionty a CC



Jamky se super čistou vodou a CC

Obr. 17: Tabulka znázorňující měření stability

5.8. Matematicko-statistické zpracování výsledků

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka vypočítaná podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$. Pro statistické porovnání stability byl použit nepárový Studentův t-test. Míra chelatace vápníku a hořčíku v procentech byla vypočítaná podle následující rovnice:

$$\text{chelatace [\%]} = \left(1 - \frac{A_x - \overline{A_N}}{A_P - \overline{A_N}}\right) \times 100$$

A_x – absorbance vzorku (chelátor + iont + CC)

A_N – absorbance negativní kontroly (CC)

A_P – absorbance pozitivní kontroly (iont + CC)

Grafy s 95 % konfidenčními intervaly byly vytvořeny pomocí programu GraphPad Prism 9.1.0 (GraphPad Software, USA). Agregace krevních destiček byla vypočítaná podle následující rovnice:

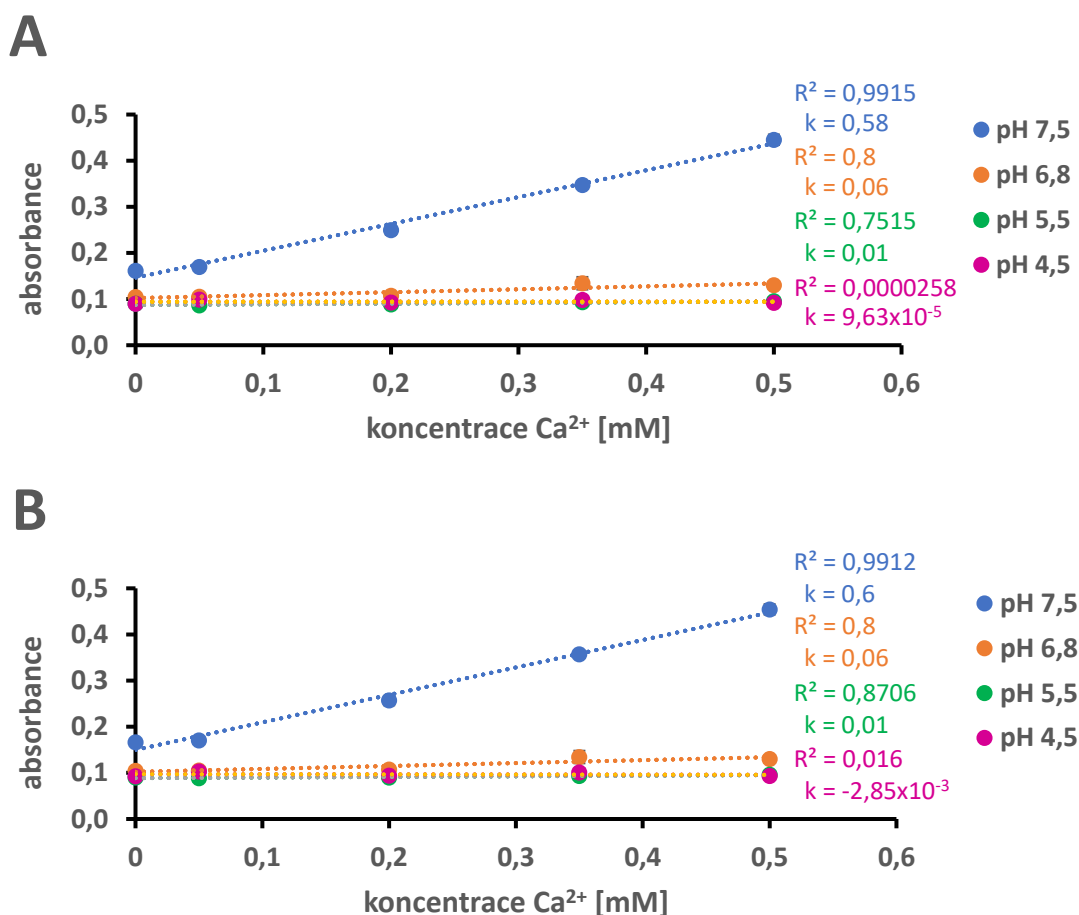
$$\text{Agregace [\%]} = \left(\frac{\text{plocha pod křivkou testované látky}}{\text{plocha pod křivkou slepého vzorku}}\right) \times 100$$

Korelační analýza byla provedena parametrickým (Pearsonovým) i neparametrickým Spearmanovým testem opět v programu GraphPad.

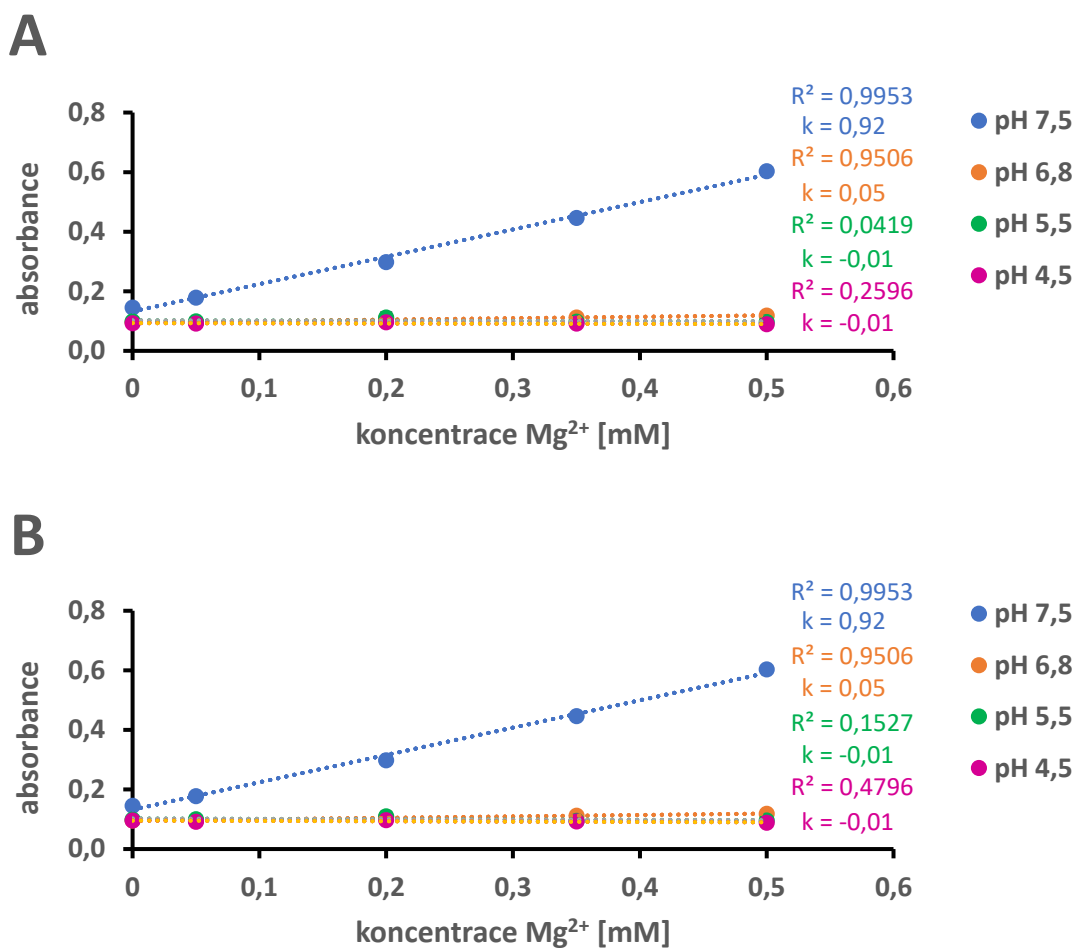
6. Výsledky

6.1. Změření kalibrační křivky

Kalibrační křivka vápenatých a hořečnatých iontů byla měřena při pH 7,5; 6,8; 5,5 a 4,5 podle postupu v kapitole 5.4. Při pH 7,5 vytvořily vápenaté i hořečnaté ionty s CC barevný detekovatelný komplex a absorbance byla úměrně závislá na koncentraci. Při pH 6,8 a 5,5 byla sice také pozorována částečně lineární závislost mezi absorbancí a koncentrací testovaných iontů ($R^2 > 0,75$), ale vzestup absorbance v závislosti na koncentraci vápenatých nebo hořečnatých iontů byl velmi malý, a tudíž nelze tuto metodiku použít při těchto pH z důvodu velmi malé citlivosti. Při pH 4,5 přidavek vápenatých nebo hořečnatých iontů nezpůsobil prakticky vůbec žádný vzestup absorbance (Obr. 18 a 19). Proto bylo pro další měření vybráno pouze pH 7,5.



Obr. 18: Kalibrační křivka vápenatých iontů v čase 0 (A) a po 5 minutách (B). Finální koncentrace CC byla vždy 0,67 mM. V každé koncentraci byla provedena 3 měření u každého pH.



Obr. 19: Kalibrační křivka hořečnatých iontů v čase 0 (A) a po 5 minutách (B). Finální koncentrace CC byla vždy 0,67 mM. V každé koncentraci byla provedena 3 měření u každého pH.

6.2. Chelatace vápenatých a hořečnatých iontů

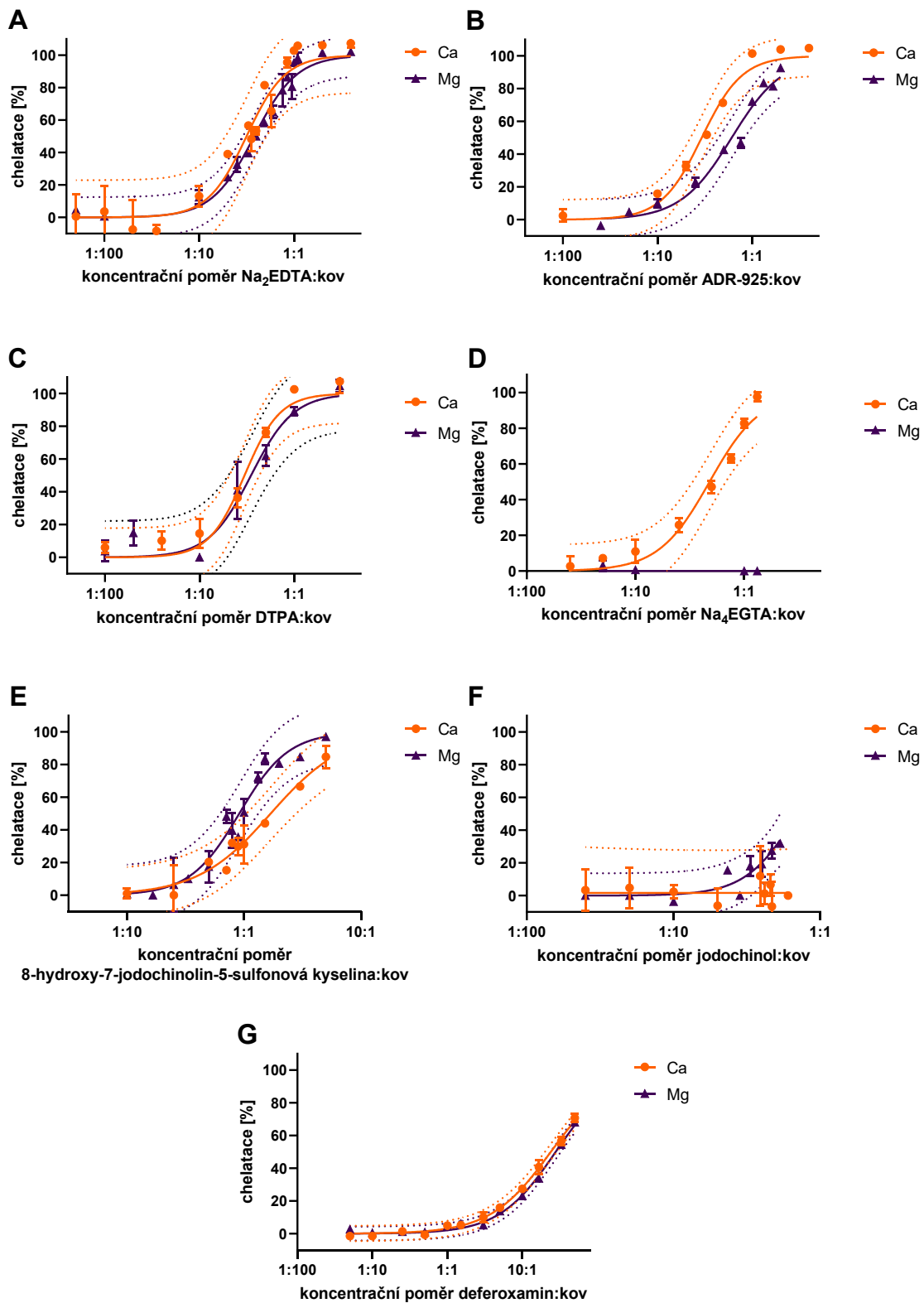
U 21 látek byla zkoumána schopnost chelatovat vápenaté a hořečnaté ionty podle bodu 5.5. Chelatační aktivita byla stanovena odečtením volných nezchelatovaných iontů. U řady látek byla chelatační účinnost nebo neúčinnost vizuálně patrná. Pokud totiž testovaná látka nebyla schopná navázat vápenaté nebo hořečnaté ionty, zbarvil se testovaný vzorek po přidání CC do fialovorůžova, tedy barvy komplexu CC s vápníkem nebo hořčíkem. Pro hlubší porovnání chelatační účinnosti jednotlivých látek byly zkonstruovány 95 % konfidenční intervaly chelatačních křivek. Na Obr. 20-22 jsou zobrazeny všechny látky a u každé lze přímo porovnat rozdíly v chelataci vápenatých i hořečnatých iontů. U řady látek se chelatační křivky těchto iontů překrývaly, ale byly zde pozorovány i významné rozdíly. Nejmarkantnější rozdíl byl pozorován u Na_4EGTA , tato látka vůbec nechelatovala hořčík ale silně vápník (Obr. 20D). Naopak 5,7-dibromochinolin-8-ol nechelatoval, alespoň v testovaných koncentracích, vápník, zatímco měl nezanedbatelnou afinitu k iontům hořčíku (Obr. 21B). Podobně jako posledně jmenovaný se choval i chloroxin (Obr. 21C). U 8-hydroxychinolinů byl ale obecně problém dosáhnout vyšších koncentrací, aby nedošlo k precipitaci. Je tedy možné, že ve vyšších poměrech chelatují i tyto zmíněné látky alespoň částečně oba kovy. Dá se tak usuzovat podle více rozpustných derivátů, jako je 8-hydroxychinolin, nitroxolin a kyselina 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonová. Zřetelně vyšší afinitu k iontům hořčíku měl také deferipron. Mírně vyšší afinitu k vápenatým iontům měly následující chelátory: ADR-925 (Obr. 20B), Na_2NNDSA (Obr. 21D) a ATTM (Obr. 22E).

Orientační shrnutí všech testovaných látek je na Obr. 23-24. Nejúčinnější látky jsou pak pro lepší orientaci zobrazeny na dalším obrázku (Obr. 25), látky ze skupiny 8-hydroxychinolinů na Obr. 26.

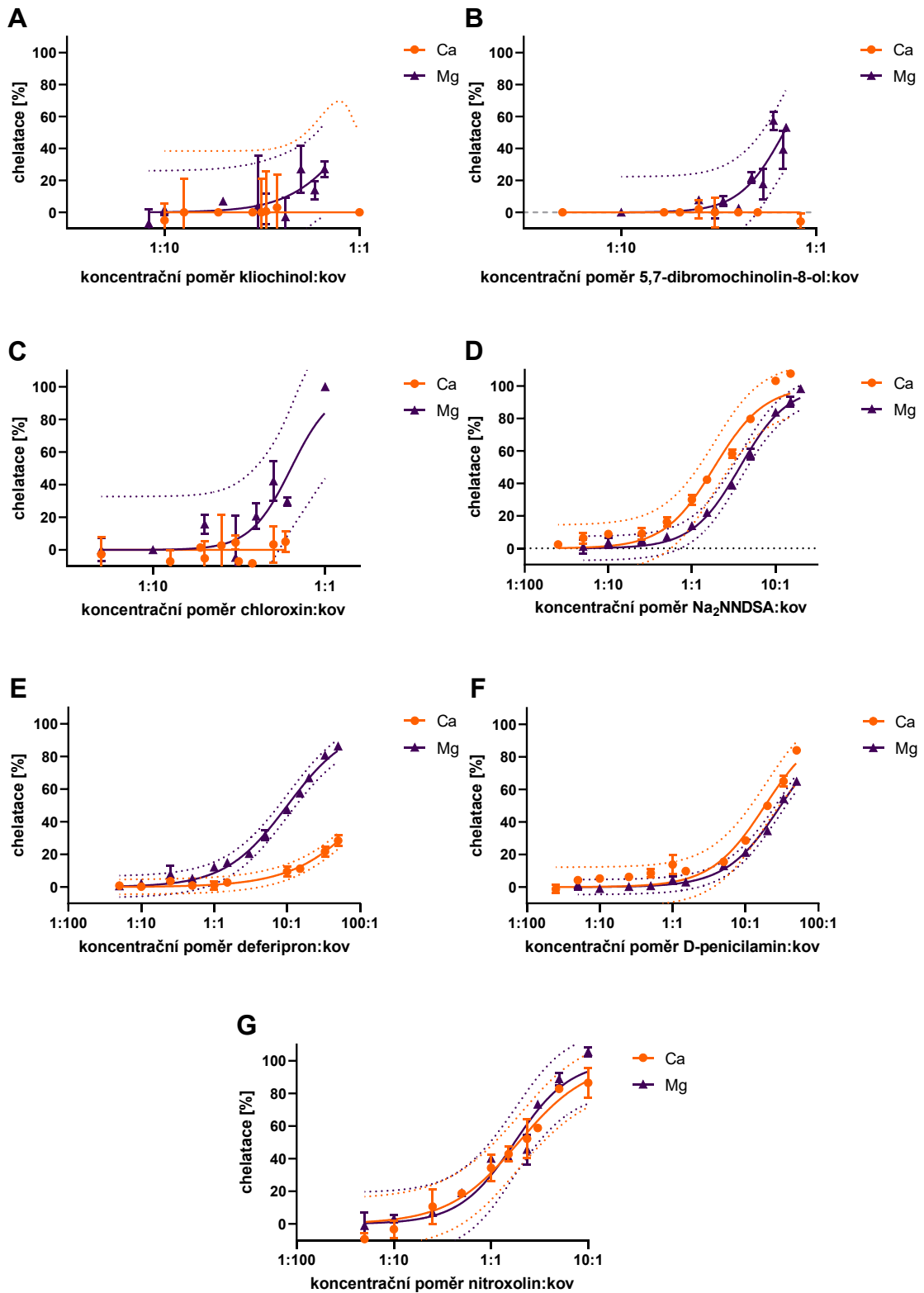
Vápenaté ionty nejvíce chelatovaly látky ADR-925, DTPA, Na_2EDTA a Na_4EGTA (Obr. 25A). Při koncentračním poměru 1:1 vychytaly více než 90 % volného vápníku, lze tedy předpokládat formu komplexu 1:1. Mezi chelátory s nižší chelatační aktivitou můžeme zařadit nitroxolin, kyselinu 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonovou, Na_2NNDSA , ferrozín, Na_2BCS , D-penicilamin a deferoxamin. Nitroxolin, kyselina 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonová, Na_2NNDSA a ferrozín při koncentračním poměru 1:1 chelatovaly přibližně 30 % volného vápníku, což naznačuje komplex 3:1, chelátor: Ca^{2+} . Nicméně téměř 100 % chelatace dosahovala kyselina 8-hydroxy-7-

jodochinolin-5-sulfonová až při poměru 5:1 a nitroxolin, Na₂NNDSA a ferrozín dokonce při poměru 10:1. Přibližně 30 % chelataci vykazovaly Na₂BCS, D-penicilamin a deferoxamin při koncentračním poměru 10:1. Ostatní látky chelatovaly vápník nevýznamně nebo vůbec.

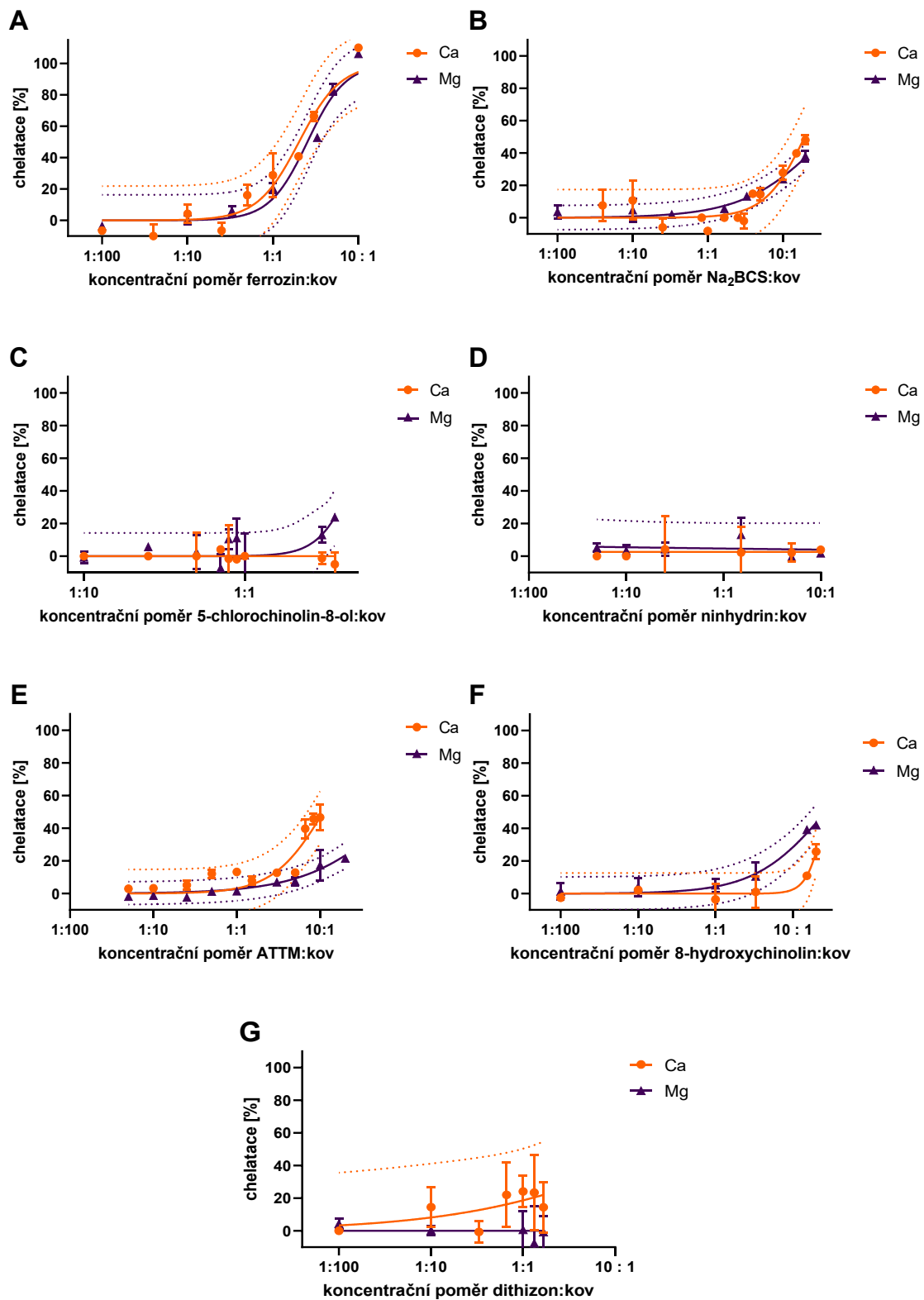
Hořečnaté ionty byly nejvíce chelatovány ADR-925, DTPA, Na₂EDTA, jodochinolem, chloroxinem, kliocholem, 5,7-dibromochinolin-8-olem a kyselinou 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonovou (Obr. 25B). Oproti chelataci vápenatých iontů jsme ale pozorovali významné rozdíly. Při koncentračním poměru 1:1 dosahovala chelatační aktivita zhruba 50 % u kyseliny 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonové. Z tohoto nálezu lze usuzovat na vznik komplexu 2:1, chelátor:Mg²⁺. U chloroxinu, DTPA a Na₂EDTA to bylo téměř 100 % a lze tedy předpokládat komplex 1:1. U ADR-925 byla chelatace cca 75 % a stechiometrie komplexu je tedy nejasná. Další látky již chelatovaly méně: ferrozín, Na₂NNDSA a nitroxolin vážaly při koncentračním poměru 1:1 15-40 % volného hořčíku a při poměru 10:1 dosahovaly ke 100 %, deferipron při poměru 10:1 chelatoval 50 %. Zbylé látky nedokázaly navázat hořčík vůbec nebo jen při vysoké koncentraci.



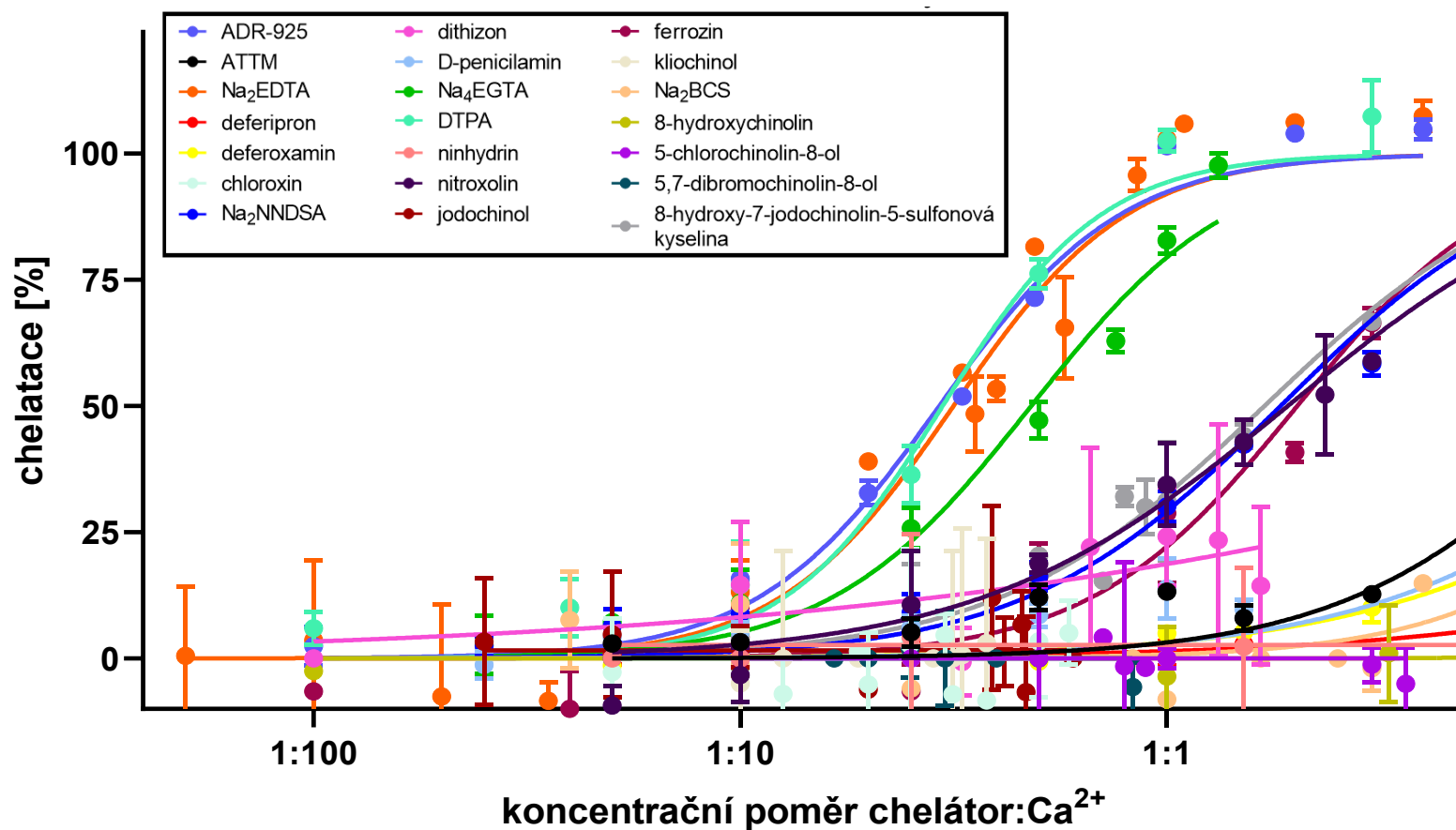
Obr. 20: Chelatační aktivita: A) Na_2EDTA , B) ADR-925, C) DTPA, D) Na_4EGTA , E) kyseliny 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonové, F) jodochinolu, G) deferoxaminu. Finální koncentrace iontů byla vždy 0,5 mM.



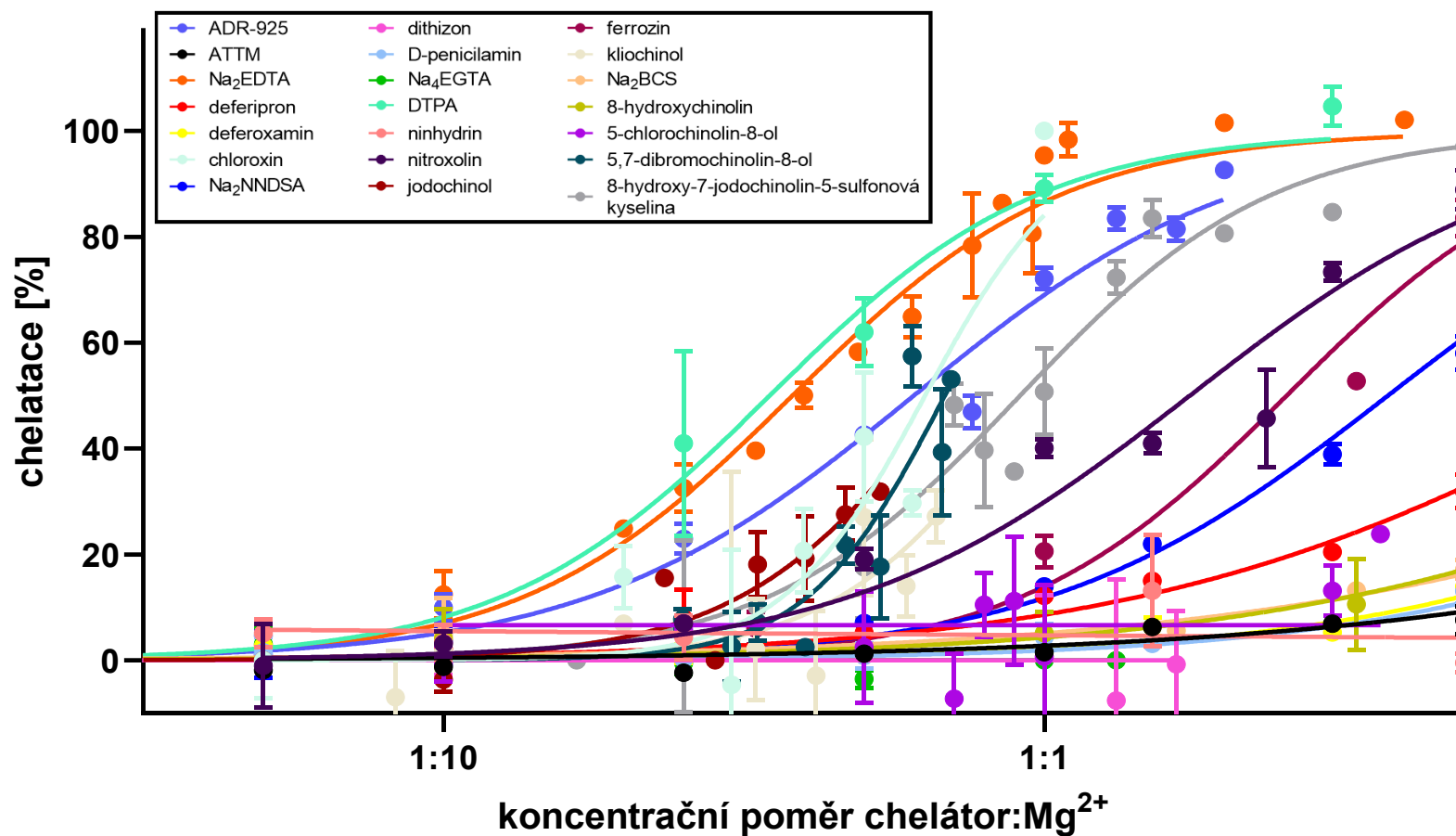
Obr. 21: Chelatační aktivita: A) kliočinolu, B) 5,7-dibromochinolin-8-olu, C) chloroxinu, D) Na₂NNDSA, E) deferipronu, F) D-penicilaminu, G) nitroxolinu. Finální koncentrace iontů byla vždy 0,5 mM.



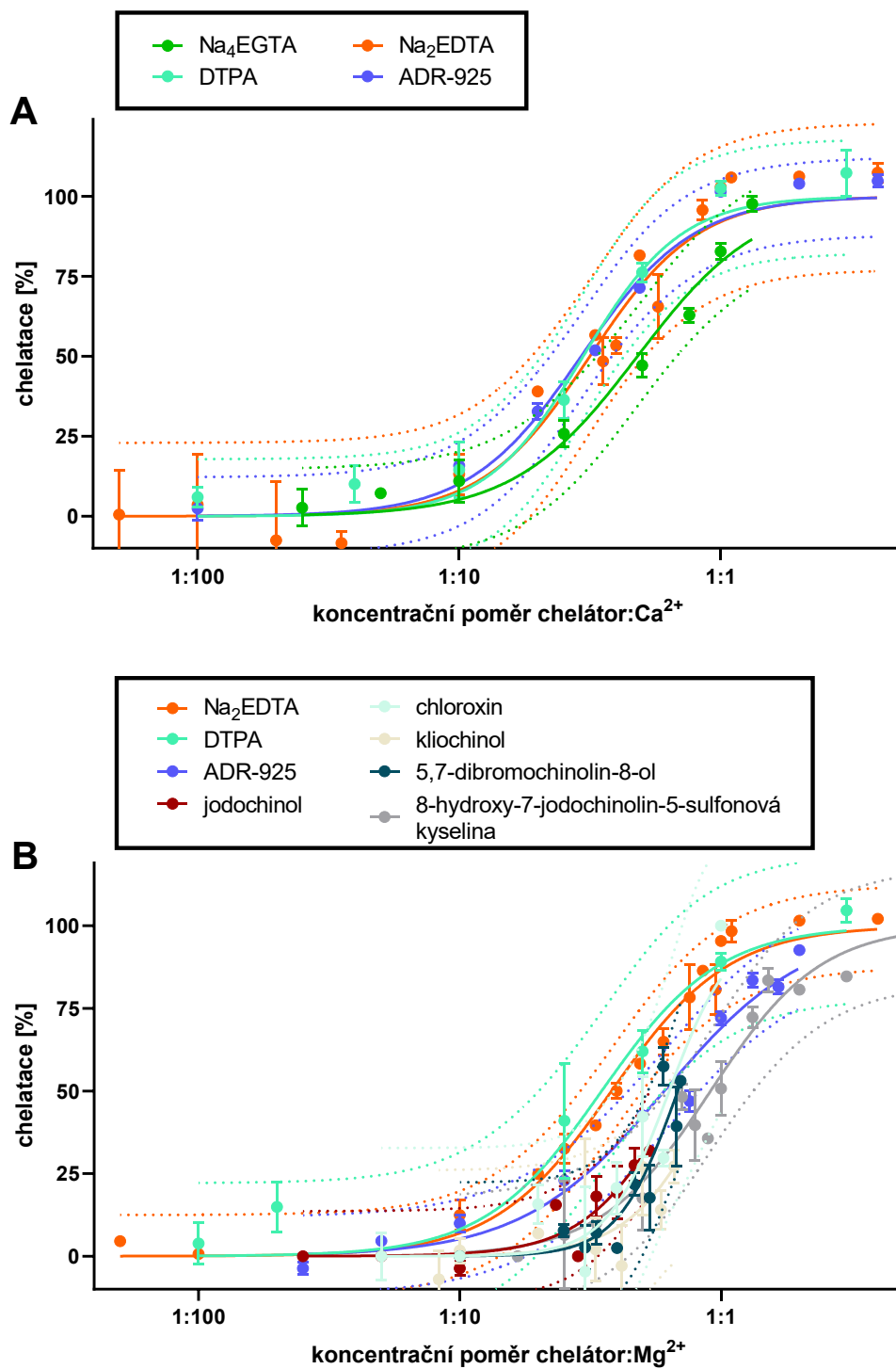
Obr. 22: Chelatační aktivita: A) ferrozinu, B) Na₂BCS, C) 5-chlorochinolin-8-olu, D) ninhydrinu, E) ATTM, F) 8-hydroxychinolinu, G) dithizonu. Finální koncentrace iontů byla vždy 0,5 mM.



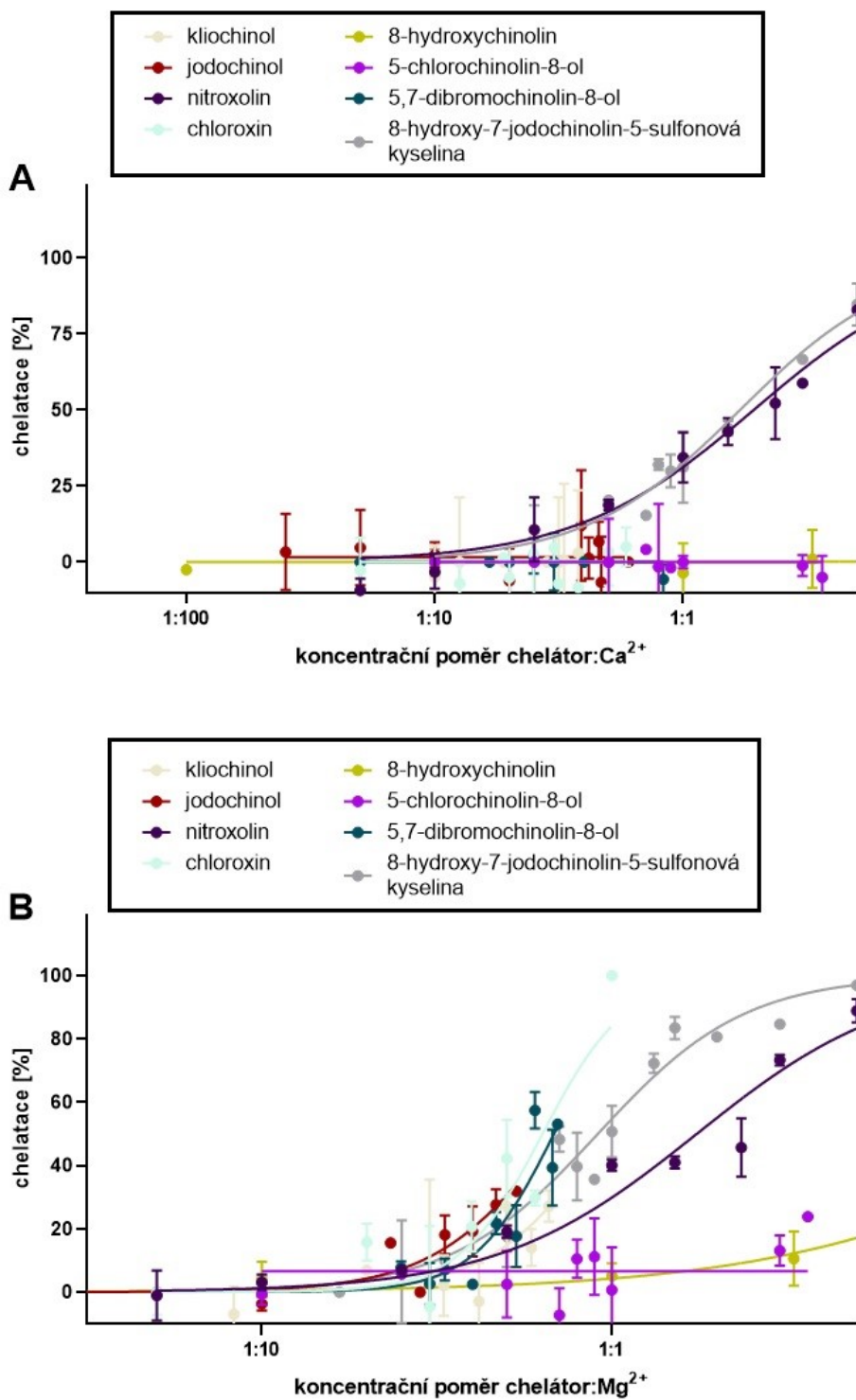
Obr. 23: Porovnání chelatační aktivity testovaných látek pro vápník. Finální koncentrace iontů byla vždy 0,5 mM. Nejvyšší finální koncentrace deferipronu, deferoxaminu a D-penicilaminu byla 25 mM, 8-hydroxychinolinu, Na₂BCS 10 mM, Na₂NNDSA 7,5 mM, ferrozinu, ATTM, ninhydrinu a nitroxolinu 5 mM, kyseliny 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonové 2,5 mM, ADR-925 a Na₂EDTA 2 mM, 5-chlorochinolin-8-olu 1,8 mM, DTPA 1,5 mM, dithizonu 0,83 mM, Na₄EGTA 0,67 mM, kliočinolu 0,5 mM, 5,7-dibromochinolin-8-olu 0,42 mM, jodochinolu a chloroxinu 0,3 mM.



Obr. 24: Porovnání chelatační aktivity testovaných látek pro hořčík. Finální koncentrace iontů byla vždy 0,5 mM. Nejvyšší finální koncentrace deferipronu, deferoxaminu a D-penicilaminu byla 25 mM, ATTM, 8-hydroxychinolinu, Na₂BCS a Na₂NNDSA 10 mM, ferrozinu, ninhydrinu a nitroxolinu 5 mM, kyseliny 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonové 2,5 mM, Na₂EDTA 2 mM, 5-chlorochinolin-8-olu 1,8 mM, DTPA 1,5 mM, ADR-925 1 mM, dithizonu 0,83 mM, Na₄EGTA 0,67 mM, chloroxinu 0,5 mM, 5,7-dibromochinolin-8-olu a kliočinolu 0,35 mM, jodochinolu 0,27 mM.



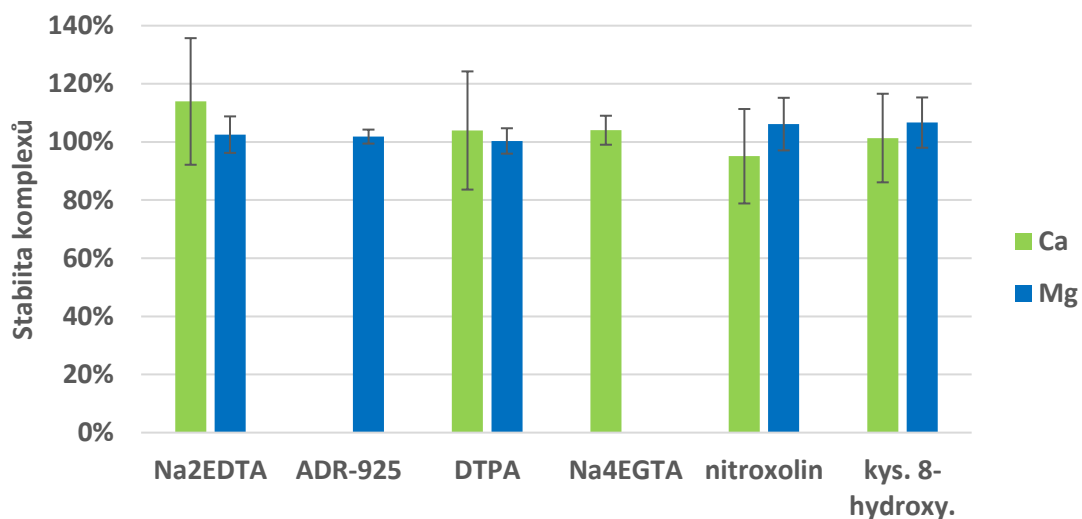
Obr. 25: Látky, které nejvíce chelatovaly vápník (A) a hořčík (B). Srovnání pomocí 95 % konfidenčních intervalů.



Obr. 26: Srovnání chelatační aktivity látek ze skupiny 8-hydroxychinolinů pro vápník (A) a hořčík (B).

6.3. Stabilita komplexů

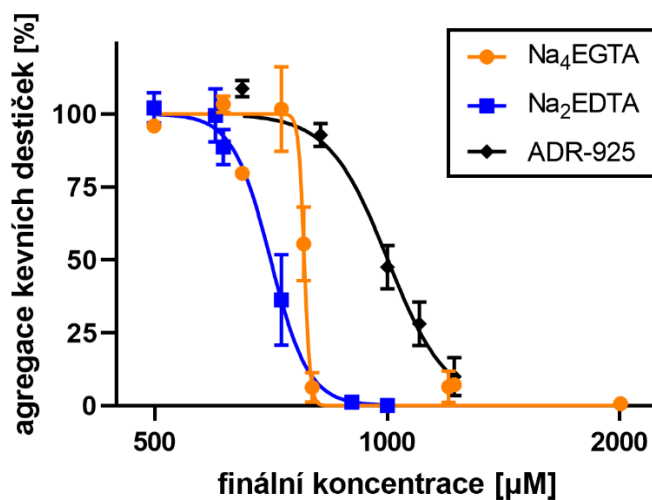
Stabilita komplexů CC s vápenatými a hořečnatými ionty byla vypočítána jako poměr chelatace v čase 5 minut ke chelataci v čase 0. Analýza stability (Obr. 27) byla provedena jen u látek, které chelatovaly více jak 30 % iontů při koncentračním poměru 1:1. Za minimální smysluplnou chelataci bylo považováno 10 %. Nebylo možné také zanalyzovat některé látky ze skupiny 8-hydroxychinolinů (chloroxin, jodochinol, kliochinol, 5,7-dibromochinolin-8-ol). Ty chelatovaly významně až v koncentracích, které nejsou stabilní v našem použitém modelu, a komplexy nebo testované látky během měřeného období precipitovaly. Všechny zahrnuté látky (Na_4EGTA , DTPA, ADR-925, Na_2EDTA , nitroxolin, kyselina 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonová) tvořily stabilní komplexy. U ADR-925 je uvedena pouze stabilita komplexu s hořečkem, protože data u vápníku po 5 minutách nebyla omylem uložena.



Obr. 27: Stabilita komplexů CC-Ca a CC-Mg po 5 minutách.

6.4. Ověření metodiky na biologickém vzorku

Podle postupu v kapitole 5.6. byla ověřena chelatační aktivita nejúčinnějších chelátorů vápníku, které byly rozpustné ve vodném prostředí, na vzorcích lidské krve. Pro agregaci krevních destiček je důležitý vápník. Pokud ho chelátor navázal, tak agregace nemohla probíhat. Všechny zkoumané látky byly schopné při určité koncentraci navázat vápník tak, že neprobíhala žádná agregace (Obr. 28). Jako nejúčinnější vychází Na_2EDTA , naopak ADR-925 bylo potřeba pro dosažení nulové agregace použít ve vyšší koncentraci než zbylé dvě látky.



Obr. 28: Agregace krevních destiček po přidání Na_4EGTA , Na_2EDTA a ADR-925. Jako induktor agregace byla použita kyselina arachidonová ve finální koncentraci 123 µM.

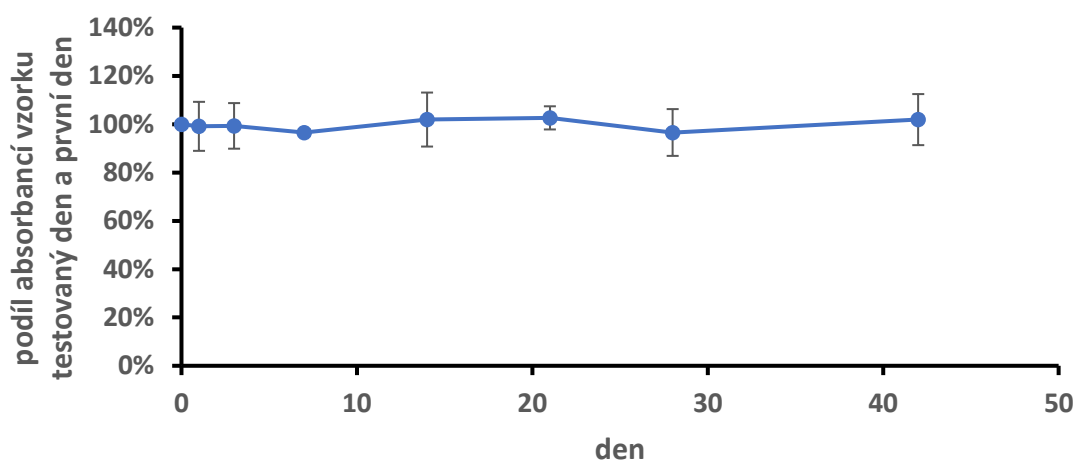
6.5. Stabilita reagensů

Druhým cílem práce bylo ověření stability indikátoru. Stabilita byla měřena podle postupu v bodě 5.7. Byly sledovány rozdíly absorbancí oproti absorbanci změřené první den a také absorbancemi měřenými každý testovaný den se vzorky připravenými první den.

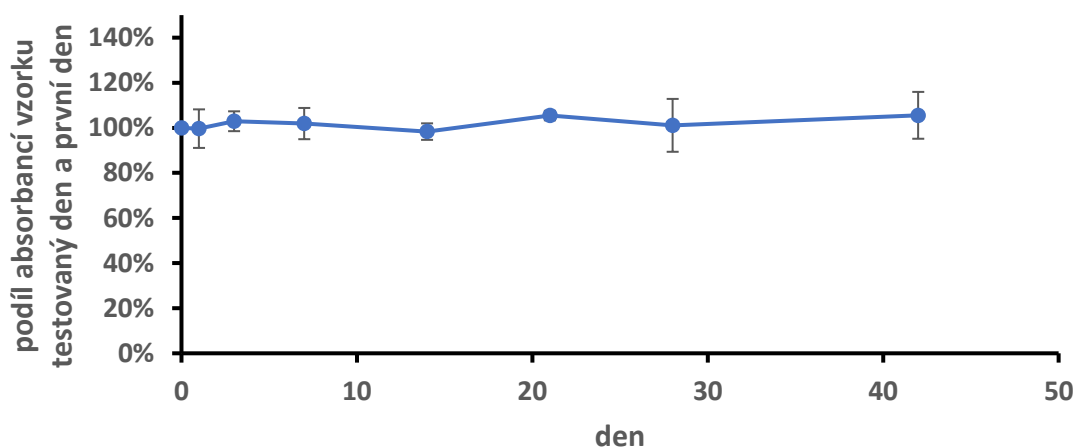
Při porovnání absorbancí měřených první den experimentu s absorbancemi měřenými další dny byly nalezeny významné rozdíly u komplexu indikátoru s hořčíkem už 21. den (Obr. 29-31). Naopak při srovnání absorbancí měřených každý testovaný den u nových vzorků s roztoky připravenými první den nebyly rozdíly nalezeny po dobu nejméně 105 dní (Obr. 32-34). Na Obr. 35 je zobrazena teplota v laboratoři při přípravě reagensů a teplota při vlastním spektrofotometrickém měření. Při korelační analýze předpokládající lineární vztah mezi teplotou a absorbancemi byla nalezena korelace jen mezi teplotou v laboratoři při přípravě a absorbancí komplexu CC-Ca (Tab. 1, Obr. 36). Tato korelace tedy nebyla potvrzena mezi stejnou teplotou a indikátorem a/nebo jeho komplexem s CC-Mg. Stejně nebyla nalezena korelace mezi absorbancí a teplotou při měření. Pro ověření byla provedena i neparametrická korelační analýza (Tab. 1), u ní se paradoxně prokázal vztah mezi teplotou při měření a absorbancí komplexu indikátor-hořčík.

	absorbance vs. teplota v laboratoři		absorbance vs. teplota při měření	
	r_p (p)	r_s (p)	r_p (p)	r_s (p)
Voda	-0,01 (0,96)	0,45 (0,053)	-0,39 (0,09)	-0,14 (0,57)
CC-Ca komplex	-0,7 (0,0008)	-0,18 (0,47)	-0,35 (0,3)	-0,40 (0,09)
CC-Mg komplex	-0,29 (0,23)	-0,32 (0,18)	-0,32(0,18)	-0,59 (0,008)

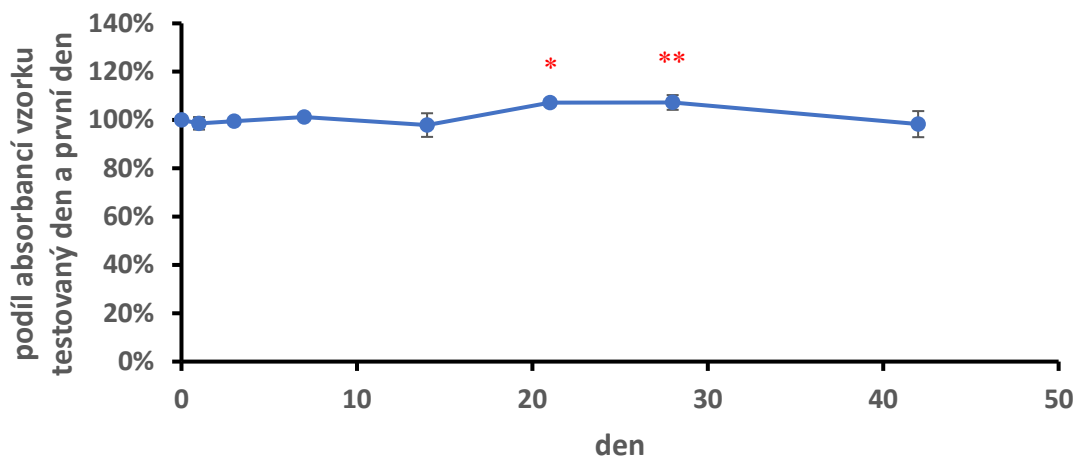
Tab. 1: Korelační analýza mezi teplotou a absorbancemi. r_p – Pearsonův korelační koeficient, r_s – Spearmanův korelační koeficient, p – p-hodnota.



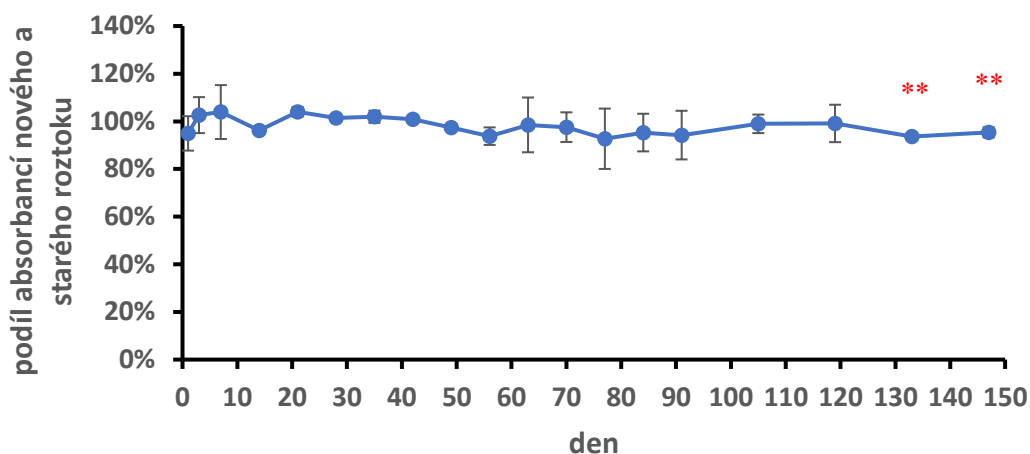
Obr. 29: Stabilita absorbančí roztoku indikátoru CC v porovnání s absorbančí stejného roztoku změřenou 1. den experimentu.



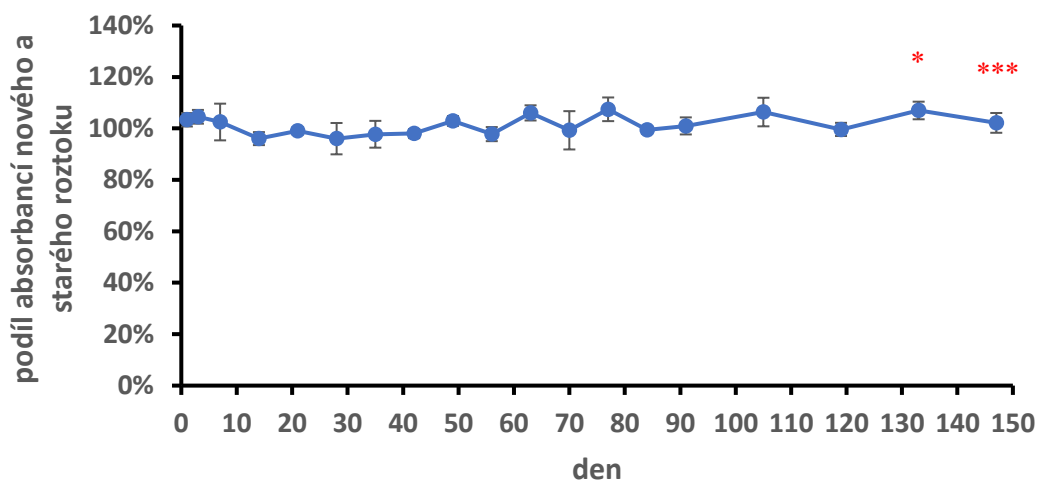
Obr. 30: Stabilita absorbančí komplexu indikátoru CC s vápníkem v porovnání s absorbančí stejného komplexu změřenou 1. den experimentu.



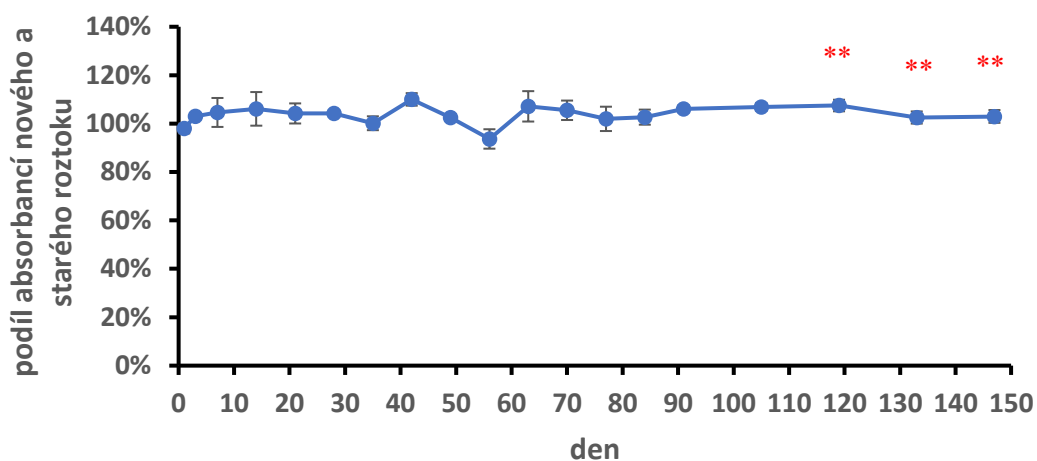
Obr. 31: Stabilita absorbančí komplexu CC s hořčíkem v porovnání s absorbančí stejného komplexu změřenou 1. den experimentu. * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$ proti absorbančí změřené 1. den.



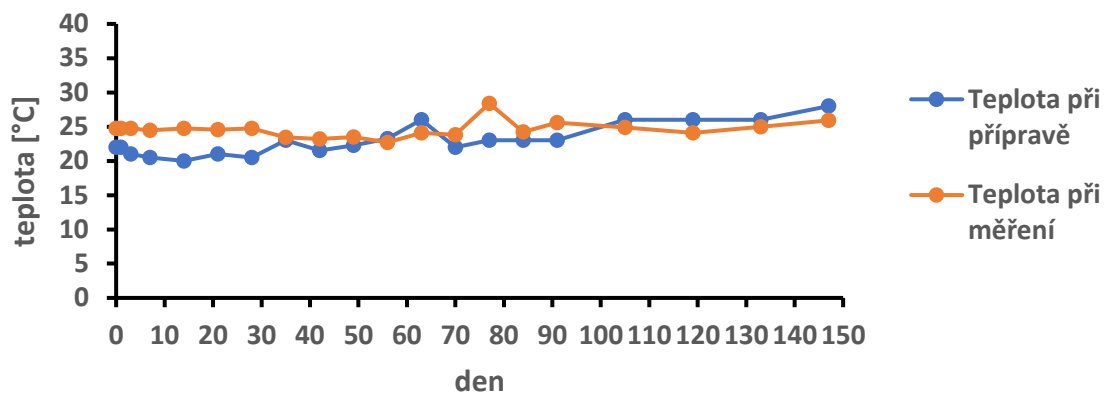
Obr. 32: Stabilita absorbančí roztoku indikátoru CC při porovnání měření ve stejný den – nový roztok vs. roztok připravený 1. den experimentu. ** $p < 0,01$ proti roztoku připravenému 1. den.



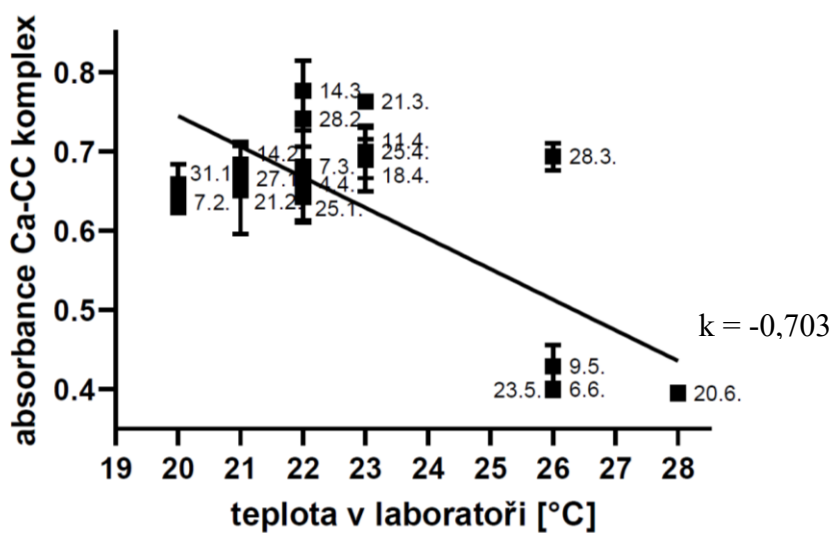
Obr. 33: Stabilita komplexu CC s vápníkem při porovnání měření ve stejný den – nové roztoky vs. roztoky připravené 1. den experimentu. * $p < 0,05$ a *** $p < 0,001$ proti roztoku připravenému 1. den.



Obr. 34: Stabilita komplexu CC s hořčíkem při porovnání měření ve stejný den – nové roztoky vs. roztoky připravené 1. den experimentu. ** $p < 0,01$ proti roztoku připravenému 1. den.



Obr. 35: Teplota v laboratoři při přípravě reagensů a při měření.



Obr. 36: Korelace teploty a absorbance komplexu CC-Ca. $p = 0,001$.

7. Diskuse

Chelátory těžkých kovů se používají ke snížení jejich nadměrné koncentrace v lidském organismu. Je důležité, aby tyto látky byly dostatečně selektivní k určitému kovu a nedocházelo tak k odstraňování jiných tělu potřebných prvků. Je známo, že klinicky využívané chelátory železa, deferoxamin, deferipron a deferasirox, chelatují také zinek (*Crisponi et al. 2015, Erdogan et al. 2013, Flora a Pachauri 2010*). Podobně je také EDTA neselektivní a chelatuje řadu kovů (*Aaseth et al. 2015*). Cílem této diplomové práce bylo určit, jestli jsou současné klinicky používané a vybrané experimentální chelátory těžkých kovů schopné vázat i vápenaté a hořečnaté ionty. Snížení hladiny těchto kovů v lidském organismu může mít za následek vznik nežádoucích účinků. Chelátory, které vápník a hořečík nechelatují, by principiálně měly být terapeuticky výhodnější.

Schopnost vázat vápenaté a hořečnaté ionty byla stanovena u 21 látek. Pro detekci chelatace byla použita spektrofotometrická metoda, která byla zatím publikována pouze formou diplomové práce (*Konečný 2021*). Tato metodika je založena na měření absorbance komplexu indikátoru CC a volných vápenatých nebo hořečnatých iontů. Z důvodu nízké, ale stále měřitelné absorbance (0,01-0,07) samotného indikátoru se dalo předpokládat, že materiály používané k měření obsahují malé množství iontů. Po přidání silného neselektivního chelátoru iontů Na_2EDTA , který by případně skryté ionty navázal, se tahle teorie neprokázala. K měření byl vybrán pufr o pH 7,5, protože citlivost této metodiky u nižších pH byla velmi malá. Novým výsledkem je určení dlouhodobé stability indikátoru. Pokud je indikátor uskladněn v lednici, lze jej použít až po dobu 105 dní. To je z ekonomického i praktického hlediska velmi výhodné, protože není potřeba neustále připravovat nový roztok. V tomto případě je třeba ale upozornit, že nelze brát hodnotu absorbance za absolutní, protože je dobře známo, že je absorbance závislá na teplotě a ta v naší laboratoři nebyla stabilní. Při porovnání absorbancí indikátoru a jeho komplexů s testovanými kovy změřenou první den a následující dny, i když se jednalo o stejné roztoky, byly rozdíly nalezeny hned po 3 týdnech. Pokud se ale absorbance porovnávala ten stejný den u roztoků připravených 1. den a nových, tak rozdíly nebyly nalezeny po dobu zmíněných 105 dní. Korelační analýza ale naši teorii plně neprokázala, vztah, a to navíc inverzní, byl nalezen jen mezi teplotou v laboratoři a absorbancí komplexu indikátoru s vápníkem. Vysvětlení toho jevu není jasné. Je samozřejmě možné, že vztah mezi absorbancí a teplotou není lineární, ale ani nelineární analýza prostřednictvím vypočtení Spearmanova korelačního koeficientu neprokázala vztah u všech měřených

absorbancí. Je zajímavé, že s teplotou se absorbance snižovala. V literatuře ale bylo popsáno, že s teplotou může absorbance u některých vlnových délek stoupat a u jiných klesat (*Sonnessa 1977*).

Na₂EDTA tvoří komplexy s různými kovy se stechiometrií 1:1 (*Hafer et al. 2020, Říha et al. 2013*), což jsme prokázali u vápníku i hořčíku. Ověřili jsme, že Na₄EGTA selektivně váže vápník se stechiometrií 1:1, zatímco hořčík nechelatuje vůbec (*Dominguez a Ward 2009*). Látky, které nechelatovaly vápník ani hořčík vůbec nebo jen velmi málo ve vysokých koncentracích, byly ninhydrin, dithizon, ATTM, 8-hydroxychinolin a 5-chlorochinolin-8-ol.

Testované chelátory byly s výjimkou 8-hydroxychinolinů různé chemické struktury. Pouze u 8-hydroxychinolinů byla otestována řada těchto látek, a tak jsme se mohli pokusit stanovit vztah struktura – účinek. Tento úkol byl ale značně zkomplikován vznikem sraženin při vyšších koncentracích. V každém případě lze předpokládat chelataci iontů vápníku i hořčíku u všech těchto testovaných látek ve vyšších koncentracích, protože i základní látka této skupiny 8-hydroxychinolin chelatovala oba tyto kovy. Je dobře známo, že substituenty (halogeny, nitroskupina) zvyšují chelatační účinek těchto látek u jiných kovů (*Prachayasittikul et al. 2013, Říha et al. 2013*). Studie s kobaltnatými ionty zatím nebyla provedena. V naší studii bylo prokázáno, že minimálně derivát s vyšší hydrofilitou – kyselina 8-hydroxy-7-jodochinolin-5-sulfonová je také účinný chelátor. Podobně bylo docela překvapivě možné zkonstruovat celou chelatační křivku také u nitroxolinu. Nitroxolin s nitroskupinou ale nebyl jednoznačně nejúčinnějším chelátorem vápníku a hořčíku této skupiny. Substituce halogeny se jeví výhodnější, ale detailní vztah struktura – účinek nebylo díky výše zmíněným limitacím možné provést. V každém případě lze ale shrnout, že základní skelet (8-hydroxychinolin) ani substituce jedním halogenem bez další substituce (5-chlorochinolin-8-ol) není spojena s významnou chelatací vápníku a hořčíku.

Ověření chelatace na agregaci krevních destiček bylo provedeno pouze se 3 nejúčinnějšími chelátory vápníku. Úmyslně byly vybrány hydrofilní látky, aby bylo možné výsledky přímo porovnat i z důvodu, že v naší studii vedly vyšší koncentrace řady 8-hydroxychinolinů ke vznikům výše zmíněných sraženin, a tak nebylo možné ověřit jejich chelatační účinky u vyšších koncentrací. Vápník je klíčovým faktorem pro agregaci krevních destiček. Podílí se na jejich kontrakci, tvorbě tromboxanu A₂, sekreci ADP a

serotoninu (*Vermylen et al. 1986*). Hladina vápníku v krvi se pohybuje v rozmezí 2,2-2,6 mM (*Peacock 2010*), tedy při tvorbě komplexů 1:1 s testovanými látkami se dalo předpokládat, že pro úplnou inhibici agregace budou potřeba ve stejné koncentraci jako je vápník. Tento předpoklad byl prokázán. V průběhu experimentu se totiž krev ředí stejným množstvím fyziologického roztoku. Na₂EDTA a Na₄EGTA inhibovaly plně agregaci krevních destiček při koncentracích přibližně 0,9 mM a ADR-925 1,3 mM. Zda tyto látky chelatují pouze volný vápník a už ne ten navázaný na proteiny nebylo zatím ověřeno. Je možné, že se mezi nimi vyskytují rozdíly, protože ADR-925 byl evidentně méně účinný, i když i u něho předpokládáme podle naměřených výsledků tvorbu komplexu s vápníkem v poměru 1:1, tedy stejně jako u druhých dvou testovaných chelátorů. Asi polovina vápníku v krvi je ve volné formě (*Peacock 2010*), to odpovídá 1,1-1,3 mM, takže i tady při ředění 1:1 provedeném v našem pokusu by měla stačit pouze koncentrace ADR-925 cca 0,65 mM. Toto nebylo prokázáno, a tak chelatace volného vápníku není pravděpodobně důvodem pozorovaných rozdílů. Nejsou také známá žádná data o průniku Na₄EGTA do buněk, takže chelatace vápníku by měla být pouze extracelulární. Podle *Jayasena et al. 2007* část EDTA při vysokých koncentracích (>1 mM) prochází buněčnou membránou, chelatace by tedy měla být také převážně extracelulární. O ADR-925 ještě není známo mnoho informací. Je možné, že na rozdíl od předchozích dvou látek chelatoval i hořčík, jehož sérová koncentrace je v rozmezí 0,76-1,15 mM (*Mathew a Panonnummal 2021*), a tím byla tato látka částečně vyčerpána a nemohla tedy plně chelatovat vápník a blokovat agregaci krevních destiček v nižších koncentracích na rozdíl od Na₂EDTA a Na₄EGTA. Jednou z možností, jak ověřit tuto teorii je použití čištěných krevních destiček s přidavkem známého množství vápenatých iontů místo plné krve. Nejpoužívanější metodou pro čištění trombocytů je centrifugace, kdy se destičky nejprve při nízkých otáčkách oddělují od červených krvinek a následně při vyšších otáčkách od dalších složek krve (*Perez et al. 2014*).

DTPA nebyla vyzkoušena, protože se nepovedlo připravit roztok o dostatečně vysoké koncentraci v biologicky relevantním rozpouštědle, která byla k experimentu potřeba. Bylo by vhodné experiment provést se solí DTPA lépe rozpustnou ve vodě, ale tu jsme neměli v době prováděných experimentů k dispozici.

8. Závěr

Závěrem lze říci, že cílů této diplomové práce bylo dosaženo. Bylo zjištěno, že vápenaté ionty bylo schopno chelatovat 15 a hořečnaté 18 zkoušených látek z 21. Při koncentračním poměru 1:1 chelatovaly téměř 100 % volného vápníku a hořčíku DTPA a Na₂EDTA, vápník ADR-925 a Na₄EGTA, zatímco hořčík chloroxin. Naopak jodochinol, kliochinol, chloroxin, 5,7-dibromochinolin-8-ol, 5-chlorochinolin-8-ol a ninhydrin nebyly schopny vůbec ve zkoušených koncentracích vázat vápník, analogicky pak dithizon, Na₄EGTA a ninhydrin hořčík. Vytvořené komplexy byly ale u všech látek, kde to bylo vyzkoušeno, stabilní. Chelatace vápníku Na₂EDTA, ADR-925 a Na₄EGTA byla ověřena na agregaci krevních destiček a nejvíce účinná byla Na₂EDTA. Stabilita roztoku indikátoru CC uchovávaného v lednici je nejméně 105 dnů.

9. Literatura

Aaseth J, Skaug MA, Cao Y, Andersen O. Chelation in metal intoxication--Principles and paradigms. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;31:260-6.

Ahmed MJ, Alam MS. A rapid spectrophotometric method for the determination of mercury in environmental, biological, soil and plant samples using diphenylthiocarbazone. *Spectroscopy.* 2003;17:45-52.

Arts J, Bade S, Badrinan 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.

Barbagallo M, Veronese N, Dominguez LJ. Magnesium in Aging, Health and Diseases. *Nutrients.* 2021;13(2):463.

Bellotti D, Remelli M. Deferoxamine B: A Natural, Excellent and Versatile Metal Chelator. *Molecules.* 2021;26(11):3255.

Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(7):1257-72.

Bronner F. Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *ScientificWorldJournal.* 2001;1:919-25.

Carroll MF, Schade DS. A practical approach to hypercalcemia. *Am Fam Physician.* 2003;67(9):1959-66.

Catapano MC, Tvrdý V, Karlíčková J, Mercolini L, Mladěnka P. A simple, cheap but reliable method for evaluation of zinc chelating properties. *Bioorg Chem.* 2018;77:287-292.

Crisponi G, Nurchi VM, Crespo-Alonso M, Sanna G, Zoroddu MA, Alberti G, Biesuz R. A Speciation Study on the Perturbing Effects of Iron Chelators on the Homeostasis of Essential Metal Ions. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133050.

Das S. Recent applications of ninhydrin in multicomponent reactions. *RSC Adv.* 2020;10(32):18875-18906.

Diaz de Barboza G, Guizzardi S, Moine L, Tolosa de Talamoni N. Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. *World J Gastroenterol*. 2017;23(16):2841-2853.

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.

Ellison DH, Maeoka Y, McCormick JA. Molecular Mechanisms of Renal Magnesium Reabsorption. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(9):2125-2136.

Erdogan E, Canatan D, Ormeci AR, Vural H, Aylak F. The effects of chelators on zinc levels in patients with thalassemia major. *J Trace Elem Med Biol*. 2013;27(2):109-11.

Ferrero ME. Rationale for the Successful Management of EDTA Chelation Therapy in Human Burden by Toxic Metals. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8274504.

Flora SJ, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(7):2745-88.

Fong J, Khan A. Hypocalcemia: updates in diagnosis and management for primary care. *Can Fam Physician*. 2012;58(2):158-62.

Gibbs CR. Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator. *Anal Chem*. 1976;48(8):1197-1201.

Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients*. 2015;7(9):8199-226.

Hafer E, Holzgrabe U, Kraus K, Adams K, Hook JM, Diehl B. Qualitative and quantitative ¹H NMR spectroscopy for determination of divalent metal cation concentration in model salt solutions, food supplements, and pharmaceutical products by using EDTA as chelating agent. *Magn Reson Chem*. 2020;58(7):653-665.

Hanna RM, Ahdoot RS, Kalantar-Zadeh K, Ghobry L, Kurtz I. Calcium Transport in the Kidney and Disease Processes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;12:762130.

Hirayama T, Nagasawa H. Chemical tools for detecting Fe ions. *J Clin Biochem Nutr*. 2017;60(1):39-48.

Hoffbrand AV, Cohen A, Hershko C. Role of deferiprone in chelation therapy for transfusional iron overload. *Blood*. 2003;102(1):17-24.

- 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.
- Jayasena T, Grant RS, Keerthisinghe N, Solaja I, Smythe GA. Membrane permeability of redox active metal chelators: an important element in reducing hydroxyl radical induced NAD⁺ depletion in neuronal cells. *Neurosci Res.* 2007;57(3):454-61.
- Jeon US. Kidney and calcium homeostasis. *Electrolyte Blood Press.* 2008;6(2):68-76.
- Jirkovský E, Jirkovská A, Bureš J, Chládek J, Lenčová O, Stariat J, Pokorná Z, Karabanovich G, Roh J, Brázdová P, Šimůnek T, Kovaříková P, Štěrbá M. 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.
- Jomová K, Maková M, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Rhodes CJ, Valko M. Essential metals in health and disease. *Chem Biol Interact.* 2022;367:110173.
- Kalia K, Flora SJ. Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *J Occup Health.* 2005;47(1):1-21.
- Khan H, Ahmed MJ, Bhangar MI. A simple spectrophotometric determination of trace level mercury using 1,5-diphenylthiocarbazono solubilized in micelle. *Anal Sci.* 2005;21(5):507-12.
- Kim JJ, Kim YS, Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;54:226-231.
- Kruanetr S, Tengjaroenkul U, Liawruangrath B, Liawruangrath S. A cleaner and simple spectrophotometric micro-fluidic procedure for copper determination using nitroso-R salt as chromogenic agent. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2008;70(5):1134-40.
- 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.
- Lo MC. Clinical application of diphenylthiocarbazono (dithizone) in carcinoma of the prostate. *Can Med Assoc J.* 1960;82(24):1203-16.

Lucena-Valera A, Perez-Palacios D, Muñoz-Hernandez R, Romero-Gómez M, Ampuero J. Wilson's disease: Revisiting an old friend. *World J Hepatol.* 2021;13(6):634-649.

Mahmood K, Wattoo FH, Wattoo MH, Imran M, Asad MJ, Tirmizi SA, Wadood A. Spectrophotometric estimation of cobalt with ninhydrin. *Saudi J Biol Sci.* 2012;19(2):247-50.

Mathew AA, Panonnummal R. 'Magnesium'-the master cation-as a drug-possibilities and evidences. *Biometals.* 2021;34(5):955-986.

Miller SC, Wang X, Bowman BM. Pharmacological properties of orally available, amphipathic polyaminocarboxylic acid chelators for actinide decorporation. *Health Phys.* 2010;99(3):408-12.

Mladěnka P, Macáková K, Zatloukalová L, Řeháková Z, Singh BK, Prasad AK, Parmar VS, Jahodář L, Hrdina R, Saso L. In vitro interactions of coumarins with iron. *Biochimie.* 2010;92(9):1108-14.

Moravcová M, Hrubša M, Lomozová Z, Catapano CM, Argento R, Jirkovský E, Kučera R, Mercolini L and Mladěnka P. A Complex Methodological Approach for the Screening of Efficient and Safe Cobalt Chelators, *Med Chem* 2023; 19(5):495-507.

Normaya E, Syuhada R, Ismail H, Ahmad MN, Yarmob MA, Bulatc KHK. Chemosensor Development of Cu²⁺ Recognition Using 1,5-Diphenylthiocarbazon: Optimization, COSMO-RS and DFT Studies. *J Braz Chem Soc.* 2019;30(9):1850-1859.

Peacock M. Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(1):23-30.

Perez AG, Lana JF, Rodrigues AA, Luzo AC, Belangero WD, Santana MH. Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma. *ISRN Hematol.* 2014;2014:176060.

Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:1157-78.

Pugliese M, Biondi V, Gugliandolo E, Licata P, Peritore AF, Crupi R, Passantino A. D-Penicillamine: The State of the Art in Humans and in Dogs from a Pharmacological and Regulatory Perspective. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(6):648.

Purachat B, Liawruangrath S, Sooksamiti P, Rattanaphani S, Buddhasukh D. Univariate and simplex optimization for the flow-injection spectrophotometric determination of copper using nitroso-R salt as a complexing agent. *Anal Sci.* 2001;17(3):443-7.

Roberts EA, Schilsky ML; American Association for Study of Liver Diseases (AASLD). Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology.* 2008;47(6):2089-111.

Říha M, Karličková J, Filipský T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *J Inorg Biochem.* 2013;123:80-7.

Saadeh HA, Sweidan KA, Mubarak MS. Recent Advances in the Synthesis and Biological Activity of 8-Hydroxyquinolines. *Molecules.* 2020;25(18):4321.

Samarina, T.O., Ivanov, V.M. & Figurovskaya, V.N. Optical and chromaticity parameters of transition metal complexes with 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid in the presence of surfactants. *J Anal Chem.* 2012;67, 321–329.

Seo JW, Park TJ. Magnesium metabolism. *Electrolyte Blood Press.* 2008;6(2):86-95.

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.

Schuchardt JP, Hahn A. Intestinal Absorption and Factors Influencing Bioavailability of Magnesium-An Update. *Curr Nutr Food Sci.* 2017;13(4):260-278.

Šimůnek T, Štěrba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 2009;61(1):154-71.

Singh C. The use of ninhydrin in the detection of cationic complexes of cobalt, nickel and chromium. *J Chromatogr.* 1965;18:194-6.

Smith GL, Reutovich AA, Srivastava AK, Reichard RE, Welsh CH, Melman A, Bou-Abdallah F. 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.

Smith SW. The role of chelation in the treatment of other metal poisonings. *J Med Toxicol.* 2013;9(4):355-69.

Sonessa AJ. The effect of temperature on the visible absorption band of iodine in several solvents. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 1977;33(5): 525-528.

Stookey LL. Ferrozine – a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem.* 1970;42(7):779-781.

Taylor JG, Bushinsky DA. Calcium and phosphorus homeostasis. *Blood Purif.* 2009;27(4):387-94.

Terry J. The other electrolytes: magnesium, calcium, and phosphorus. *J Intraven Nurs.* 1991;14(3):167-76.

Tinawi M. Disorders of Calcium Metabolism: Hypocalcemia and Hypercalcemia. *Cureus.* 2021;13(1):e12420.

Tsien RY. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry.* 1980;19(11):2396-404.

Vermlyen J, Verstraete M, Fuster V. Role of platelet activation and fibrin formation in thrombogenesis. *J Am Coll Cardiol.* 1986;8(6 Suppl B):2B-9B.

Wang L, Manson JE, Sesso HD. Calcium intake and risk of cardiovascular disease: a review of prospective studies and randomized clinical trials. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2012;12(2):105-16.

Diplomové práce

Konečný Lukáš. Příprava metodiky pro zjištění míry chelatace iontů vápníku a hořčíku. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2021.

Webové stránky

European medicines agency. EU/3/08/539: Orphan designation for the treatment of Wilson's disease. In: *European medicines agency.* 2008. Dostupné na URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu308539>.

Přístup 19.12.2022. Citace v textu: (EMA 2008).

Mejias SG, Ramphul K. Penicillamine. In: *StatPearls. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing. 2022. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513316/>. Přístup 5.12.2022. Citace v textu: (Mejias a Ramphul 2022).*

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Deferiprone. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. 2017. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548086/>. Přístup 11.12.2022. Citace v textu: (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2017a).*

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Deferoxamine. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. 2017. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547998/>. Přístup 8.12.2022. Citace v textu: (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2017b).*