

**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra farmakologie a toxikologie**



**ÚČINKY KVERCETINU NA CYTOTOXICKÉ PŮSOBNÍ CHLORIDU  
KOBALTNATÉHO VŮČI BUNĚČNÉ LINII H9C2**

Diplomová práce

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Eduard Jirkovský, Ph.D.**

Hradec Králové 2024

Eliška Bobková

### **Prohlášení**

„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. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“

## **Poděkování**

Za vedení diplomové práce, cenné rady a čas, který mi věnoval, děkuji svému školiteli PharmDr. Eduardu Jirkovskému, Ph.D. Dále děkuji celé své rodině, která mě při studiu podporovala, a též děkuji svému příteli, který mi byl během studia velkou psychickou podporou.

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student/ka: Eliška Bobková

Školitel: PharmDr. Eduard Jirkovský, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Účinky kvercetinu na cytotoxické působení chloridu kobaltnatého vůči buněčné linii H9c2

Kobalt je chemický prvek vyskytující se v přírodě a v lidském těle jako součást vitamínu B<sub>12</sub>. V nadměrném množství působí na lidské buňky cytotoxicky. Kvercetin je flavonoid hojně rozšířený v přírodě, který je do lidského těla přijímán potravou. Možné příznivé účinky kvercetinu, například na srdeční tkáň, jsou hojně zkoumány. Cílem práce bylo stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> pro CoCl<sub>2</sub> a kvercetin a následně byla vyhodnocena účinnost pretreatmentu kvercetinem proti toxickému působení CoCl<sub>2</sub>. Výzkum probíhal na buněčné linii H9c2. Pro stanovení cytotoxicity byl použit MTT test. Výsledky ukázaly, že vystavení H9c2 buněk CoCl<sub>2</sub> po dobu 24 hod. vede od koncentrace 1mM k poklesu viability. Prokázala se tak dávková a časová závislost. Cytotoxické působení kvercetinu na buněčnou linii H9c2 po 48hod. vystavení v koncentracích od 1nM do 10 μM nebylo prokázáno. Po 24hod. pretreatmentu kvercetinem v koncentracích 100 nM nebo 1 μM a následně 24hod. koinkubaci s CoCl<sub>2</sub> v koncentracích od 10 nM do 10 mM byl pro obě testované koncentrace kvercetinu prokázán protektivní účinek kvercetinu a potlačení cytotoxických účinků CoCl<sub>2</sub> ve všech jeho testovaných koncentracích.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Eliška Bobková

Supervisor: PharmDr. Eduard Jirkovský, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** The Effects of Quercetin on Cobalt Chloride Cytotoxicity in the H9c2 Cell Line

Cobalt is a chemical element found in nature and in the human body as part of vitamin B<sub>12</sub>. In excessive amounts, it exerts cytotoxic effects on human cells. Quercetin is a flavonoid widely distributed in nature and is ingested by the human body through food. Possible beneficial effects of quercetin, such as on cardiac tissue, have been extensively studied. The aim of this study was to determine the IC<sub>50</sub> value for CoCl<sub>2</sub> and quercetin, followed by evaluating the protective effect of pretreatment with quercetin against CoCl<sub>2</sub>-induced toxicity. The research was conducted on the H9c2 cell line. Cytotoxicity was assessed using the MTT assay. The results showed that exposure of H9c2 cells to CoCl<sub>2</sub> for 24 hours led to decreased viability at a concentration of 1 mM. Both dose and time dependence were demonstrated. However, cytotoxic effects of quercetin on the H9c2 cell line were not observed after 48 hours of exposure to concentrations ranging from 1 nM to 10 μM. After 24 hour pretreatment with quercetin at concentrations of 100 nM or 1 μM, followed by 24 hour co-incubation with CoCl<sub>2</sub> at concentrations ranging from 10 nM to 10 mM, revealed a protective effect of quercetin and suppression of CoCl<sub>2</sub>-induced cytotoxicity across all tested concentrations

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	8
1 Úvod .....	9
2 Teoretická část .....	10
2.1 Kobalt.....	10
2.1.1 Základní informace .....	10
2.1.2 Výskyt kobaltu v životním prostředí .....	10
2.1.3 Expozice.....	11
2.1.4 Využití kobaltu v lékařství .....	11
2.1.5 Farmakokinetika .....	12
2.1.6 Toxicita .....	13
2.1.7 Působení na tkáň .....	14
2.1.8 Chelatační terapie .....	15
2.1.9 Vliv na srdeční tkáň .....	16
2.1.10 Hypoxie a vztah ke kobaltu .....	18
2.2 Kvercetin.....	19
2.2.1 Výskyt.....	19
2.2.2 Fyzikální a chemické vlastnosti .....	20
2.2.3 Metabolismus a biologická dostupnost.....	21
2.2.4 Účinky kvercetinu na lidský organismus .....	21
2.2.5 Působení na srdeční tkáň.....	22
2.2.6 Negativní vliv kvercetinu.....	23
2.2.7 Kvercetin a kobalt .....	23
2.3 Buňky H9c2 .....	24
2.3.1 Buněčná linie H9c2.....	24
2.3.2 Diferenciace buněčné linie H9c2 .....	24
3 Cíl práce.....	26

4	Experimentální část .....	27
4.1	Chemikálie .....	27
4.2	Přístrojové vybavení .....	27
4.3	Pracovní postupy.....	28
4.3.1	Pasážování a kultivace .....	28
4.3.2	Počítání buněk.....	28
4.3.3	Příprava buněk na experimenty .....	29
4.3.4	Stanovení cytotoxicity chloridu kobaltnatého po 24hodinové expozici.....	29
4.3.5	Stanovení cytotoxicity kvercetinů po jeho 48hodinové expozici .....	30
4.3.6	Pretreatment kvercetinem a koinkubace kobaltu s kvercetinem.....	30
4.3.7	Stanovení cytotoxicity MTT testem.....	30
4.3.8	Statistické zpracování dat .....	31
5	Výsledky.....	32
5.1	Stanovení cytotoxicity a $IC_{50}$ kobaltu v buněčné linii H9c2 po 24hod. expozici	32
5.2	Stanovení cytotoxicity a $IC_{50}$ kvercetinů v buněčné linii H9c2 po 48hod. expozici .....	33
5.3	Stanovení cytotoxicity v buněčné linii H9c2 po 24hod. pretreatmentu kvercetinem a následné 24hod. koinkubaci s $CoCl_2$ .....	34
6	Diskuse .....	36
7	Závěr.....	39
8	Literatura .....	40

## Seznam zkratek

<b>ARMD</b>	nežádoucí reakce na kovové úlomky
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>CaMK II</b>	enzym vápník/kalmodium-dependentní proteinkináza
<b>CoA</b>	koenzym A
<b>CoC</b>	implantát keramika na keramiku
<b>DMPS</b>	2,3-dimerkaptopropan-1 sulfonát
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>GSH</b>	glutathion
<b>HIF</b>	faktor indukovaný hypoxií
<b>ICD</b>	implantabilní kardioverter-defibrilátor
<b>MoM</b>	implantáty kov na kov
<b>MoP</b>	implantát kov na polyetylen
<b>MyoD</b>	myogenní regulační faktor 1
<b>RA</b>	retinová kyselina
<b>RNS</b>	reaktivní dusíkové formy
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku
<b>SGLT-1</b>	sodík-glukózový kotransportér
<b>SOD</b>	enzym superoxiddismutáza
<b>VEGF</b>	vaskulární endotelový růstový faktor



# 1 Úvod

Kobalt je chemický prvek vyskytující se v lidském organismu jako součást vitamínu B<sub>12</sub>. Tento vitamin má významnou úlohu v tvorbě červených krvinek a je důležitý pro správnou funkci nervového systému (*Barceloux & Barceloux 1999*). Kromě své biologické funkce se kobalt uplatňuje i v průmyslu pro svou tvrdost. Slitiny kobaltu se využívají pro výrobu ortopedických kloubních implantátů (náhrada kyčelních a kolenních kloubů). Rizikem u těchto implantátů je uvolňování kobaltu do okolních tkání z důvodu jejich poškození a opotřebení, což vede k toxickým následkům (*Packer 2016*).

Zdravotní problémy se mohou vyskytnout, jak při jednorázovém příjmu vyšších dávek kobaltu, tak při dlouhodobé expozici nižších koncentrací (*Simonsen et al. 2012*). Může docházet k ovlivnění řady tkání. Toxické účinky kobaltu se proto mohou projevit například rozvojem strumy, kontaktní dermatitidou nebo arytmií a srdečním selháním (*Leyssens et al. 2017*). Právě proto je důležité zkoumat jak přímé toxické účinky kobaltu, tak možnost ochrany před těmito negativními účinky kobaltu, např. pomocí kvercetinu.

Kvercetin je flavonoid, který lidské tělo není schopno syntetizovat. Je běžnou složkou lidské stravy, kterou je také do těla přijímán (*Ferenczyova et al. 2020*). Kvercetin je známý svými antioxidačními a protizánětlivými účinky a jeví ochranný potenciál proti různým toxickým vlivům na tkáně, včetně srdce (*Ferenczyova et al. 2020, Singh et al. 2021*). V řadě *in vitro* a *in vivo* modelech byly prokázány jeho prospěšné účinky proti civilizačním chorobám a patofyziologickým procesům. Může však v závislosti na koncentraci a redoxním stavu buňky projevit také negativní, prooxidační, účinky.

Cílem této práce bylo na modelové buněčné linii H9c2 otestovat toxické působení kobaltu a ověřit, zda kvercetin není toxický a zda by mohl tuto buněčnou linii ochránit před cytotoxickými účinky kobaltu. Buněčná linie H9c2 zde slouží jako dostačující zjednodušený model srdeční tkáně, ačkoli jde pouze o kardiomyoblasty, které nemají všechny charakteristiky zralých kardiomyocytů (*Campero-Basaldúa et al. 2023*), což tento model sice určitým způsobem limituje, ale pro náš prvotní screening je to dostačující.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Kobalt

#### 2.1.1 Základní informace

Kobalt je stříbrně šedým tvrdým kovem, který je křehký, tažný, poměrně nereaktivní a vykazující magnetické vlastnosti. Je to chemický prvek s podobnými vlastnostmi jako má železo nebo nikl, což je dáno jejich blízkostí v periodické tabulce prvků. Jsou pro něj typické dva valenční stavy, a to kobaltnatý (II) a kobaltitý (III) (*Barceloux & Barceloux 1999*).

V lidském organismu je kobalt kovovou složkou vitamínu B<sub>12</sub>, tzv. kyanokobalaminu. Tento vitamin je kofaktorem enzymů methioninsyntázy a methylmalonyl-CoA mutázy a jeho nedostatkem vzniká onemocnění zvané megaloblastická anémie. Vitamin B<sub>12</sub> je základní mikroživinou lidského těla, která je důležitá pro jeho správnou funkci, konkrétně pro tvorbu červených krvinek (*Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas 2019, Paustenbach et al. 2013*).

Kobalt se využívá jako sytě modré barvivo pro keramiku, sklo a šperky již od roku 2000 př. n. l. Jeho první identifikace jako prvku a následná izolace proběhla v 18. století chemiky Bergmanem (identifikace) a Brandtem (izolace) (*Paustenbach et al. 2013*). Využití kobaltu v průmyslu začalo až ve 20. století a nejvyšší produkce se dočkal v 80. letech 20. století. Kobalt se využívá ve zpracovatelský závodech skla, inkoustu a barev, a dále pak v průmyslu tvrdých kovů, kde se nejčastěji používají jeho soli. V průmyslu tvrdých kovů váže karbid wolframu na tvrdou látku, tohoto se využívá u řezných nástrojů nebo vysokorychlostních vrtaček, také se využívá při leštění diamantů a byl součástí prvního permanentního magnetu (*Barceloux & Barceloux 1999, Packer 2016*).

Z toxikologického hlediska je významné použití kobaltu ve formě slitin při výrobě endoprotéz a z historického hlediska použití kobaltu pro léčbu anémie či jako stabilizátoru pěny v plechovkovém pivu (viz dále).

#### 2.1.2 Výskyt kobaltu v životním prostředí

Kobalt nalezneme v základních složkách životního prostředí jako je vzduch, půda voda, nebo strava. Je zde široce rozšířeným prvkem vyskytujícím se v podobě arsenidů, oxidů a sulfidů. Znečištění vzdušného prostředí kobaltem je velmi malé (1-2 ng Co/m<sup>3</sup>). Závisí

na rozptylu částic a místě, typické je větší znečištění v městských oblastech. Zdroje výskytu kobaltu ve vzduchu můžeme rozdělit na dva typy – přirozené zdroje, kam spadá sopečná erupce nebo lesní požáry, a antropogenní činnost, tj. spalování fosilních paliv nebo emise z motorů. Do životního prostředí se také kobalt dostává coby častá složka hnojiv v zemědělství (*Barceloux & Barceloux 1999*).

V pitné vodě se kobalt vyskytuje ve velmi malých koncentracích (0,1–5 ng/m<sup>3</sup>). Větší hladiny poté nalezneme v oceánech a pobřežních vodách. Strava je největším zdrojem expozice kobaltu u člověka. Denní příjem tedy závisí na typu stravy. Nejvyšší koncentrace nalezneme v rybách, zelenině a čerstvých obilovinách, kde se vyskytuje ve formě vitamínu B<sub>12</sub> (*Paustenbach et al., 2013*).

### 2.1.3 Expozice

Jak bylo zmíněno výše, rozšíření kobaltu je hojné, a proto se lidé nevyhnou kontaktu s jeho různými sloučeninami. Nejčastěji se obyčejná populace setkává s částicemi kovu vdechováním vzduchu nebo příjmem potravy. Další důležité oblasti setkání se odvíjí od jeho využití v průmyslu, tj. průmyslová expozice, a využití v lékařství. V lékařství se nejčastěji objevuje kobalt v podobě nanočástic nebo iontů (*Leyssens et al. 2017*).

### 2.1.4 Využití kobaltu v lékařství

Od konce 20. století se slitiny kobaltu začaly používat při náhradách kyčelních kloubů jako implantáty typu kov na kov (MoM z anglického *metal on metal*), neboť jejich výhodou byla odolnost a stabilita. V dnešní době jsou již známy jejich nevýhody spočívající v uvolňování mikroskopických kovových částic do okolních tkání, což může vést k projevům nežádoucí reakce na kovové úlomky (ARMD). U pacientů s těmito implantáty dochází k projevům lokální metalózy, zánětu, pseudotumorům, objevují se nekrózy a imunotoxicita. Konečným výsledkem může být úplné selhání implantátu, které je doprovázeno bolestí způsobenou úplným poškozením okolní tkáně (*Davis 2023*). Měření hladiny kovů v plné krvi se poté využívá jako důkaz pro intoxikaci a opotřebení implantátu (*Lhotka et al. 2003*).

Dříve se na reimplantaci implantátů keramika na keramiku (CoC, z anglického *ceramic on ceramic*), jejichž vzácnou nevýhodou byla zlomenina keramické komponenty, využívaly implantáty typu kov na polyethylen (MoP, z anglického *metal on polyethylen*). Po reimplantaci zůstávaly v těle keramické fragmenty, které následně porušovaly nový

implantát a docházelo tak k uvolňování kovových iontů a život ohrožujícím stavům (*Artiaco et al. 2019*).

Ve studii *Artiaco et al. (2019)* byl popsán případ 72letého muže, u kterého byla po revizní operaci implantátu CoC za MoP přítomna těžká metalóza a synovitida kyčle. Došlo tak k rozhodnutí o další revizní operaci. Nejdříve byly odstraněny zbytky keramických fragmentů a následně došlo ke znovupoužití implantátu typu CoC. Po této operaci došlo k vymizení bolesti kyčle.

V současné době se od implantátů MoM upouští právě z důvodu obav z uvolňování kovových iontů do těla. Používá se více jejich alternativa, implantáty CoC. Je ovšem důležité zmínit, že benefit MoM implantátů přetrvává u mladých a aktivních pacientů s diagnostikovanou primární osteoartrózou (*Davis 2023, Paustenbach et al. 2013*).

V minulosti se také kobalt používal pro léčbu anémie, a to v denní dávce 25-150 mg  $\text{CoCl}_2$ . Využívalo se zde schopnosti kobaltu stimulovat produkci červených krvinek. Tato léčba měla i řadu nežádoucích účinků – u dětí dysfunkci štítné žlázy – a u dospělých reverzibilní poškození zraku a sluchu, což byl jeden z důvodů, proč se od této léčby v 70. letech 20. století ustoupilo. V nedávné minulosti také panovala obava ze zneužití kobaltu jako alternativy krevního dopingů u sportovců pro zvýšení jejich výkonnosti, a proto je kobalt od roku 2015 na seznamu zakázaných látek (*Knoop et al. 2020, Paustenbach et al. 2013*).

### **2.1.5 Farmakokinetika**

Farmakokinetika kobaltu byla zkoumána jak u člověka, tak u laboratorních zvířat. Bylo dokázáno, že k největší absorpci u člověka dochází prostřednictvím gastrointestinálního traktu a poté pomocí plic. Absorpce kobaltu závisí na požití dávce, rozpustnosti sloučeniny a nutričním stavu jedince, a naopak nezávisí na iontovém stavu kobaltu. Mechanismus gastrointestinálního vstřebávání je navíc společný jak pro ionty kobaltu, tak pro ionty železa. Vysoce rozpustné sloučeniny jako  $\text{CoCl}_2$  se vstřebávají mnohem snadněji než sloučeniny lipofilní. Je zde poměrně velká interindividuální variabilita vstřebání, ale přibližně se do těla vstřebá 25 % podané dávky (*Leyssens et al. 2017, Simonsen et al. 2012*).

Ionty kobaltu jsou krví přenášeny prostřednictvím sérového albuminu a  $\alpha$ 2-makroglobulinu, tzv. proteinových nosičů. Největší koncentrace kobaltu jsou nacházeny v játrech, ledvinách, srdci, slezině a plné krvi. Nižší koncentrace poté můžeme nalézt

v kostře, vlasech, lymfatickém oběhu, mozku a slinivce břišní. Největší podíl kobaltu (85 %) je v těle přítomno jako organokovový komplex vitamínu B<sub>12</sub>.

Eliminace 80-90 % absorbované dávky je z větší části vyloučena ledvinami do několika dní, z menší části poté stolicí. Stolicí je také primárně vyloučen neabsorbovaný kobalt (*Paustenbach et al. 2013*). Pokud se kobalt podá jednorázově, dochází nejdříve ke zvýšení koncentrace v séru a krvi, avšak následně dochází k rychlému vychytávání kobaltu tkáněmi, zejména játry a ledvinami. Tento proces je doprovázen vylučováním močí (a stolicí). Během následujících 24 hodin dosáhnou hladiny kobaltu v krvi nízkých hodnot (*Simonsen et al. 2012*). 24 hodin po intravenózním podání je vyloučeno v průměru 22 % podané dávky CoCl<sub>2</sub> močí a 1,8 % stolicí (*Paustenbach et al. 2013*).

### 2.1.6 Toxicita

V nadměrném množství působí nevázané ionty a nanočástice kobaltu na lidské buňky cytotoxicky. Obecně mohou indukovat apoptózu buněk a při vyšších koncentracích i jejich nekrózu. Podle přijatého množství můžeme intoxikaci kobaltem rozdělit na akutní a chronickou (*Simonsen et al. 2012*). Toxicita kobaltu může být způsobena různými mechanismy účinku. Jeden z nich je následkem vysoké afinity kobaltu k sulfyhydrolyovým skupinám. Dochází tak k přerušení Krebsova cyklu inhibicí přeměny  $\alpha$ -ketoglutarátu a pyruvátu na sukcinyl CoA a acetyl CoA. Kromě toho dochází k inhibici enzymů dýchacího řetězce, což vede k přerušení tvorby adenosintrifosfátu (ATP). Tyto toxické účinky kobaltu jsou reverzibilní (*Barceloux & Barceloux, 1999, Jenkinson et al. 2021*).

Je zde určitá podobnost mezi dvojmocnými ionty vápníku a kobaltu. Této podobnosti využívá další možný mechanismus toxicity kobaltu. Díky této podobnosti mohou Co<sup>2+</sup> ionty využívat transportní cesty pro Ca<sup>2+</sup> a dochází tak k ovlivnění řady důležitých proteinů a enzymů. Jedním z možných cílů je i enzym vápník/kalmodium-dependentní proteinkináza (CaMKII). Následkem je zvýšení intracelulární koncentrace vápníku (*Choi et al. 2019, Jenkinson et al. 2021*).

Další mechanismus je založený na vytváření oxidačního stresu. Kobalt, jako redoxně aktivní kov, má schopnost vytvářet reaktivní radikály kyslíku (ROS). Pokud jejich produkce překoná antioxidační kapacitu organismu, může docházet k různým zdravotním komplikacím v důsledku poškození DNA, peroxidace lipidů nebo modifikace proteinů. (*Valko et al. 2007*). Aktivace hypoxií indukovatelného faktoru (HIF) kobaltem může být

dalším mechanismem toxického působení kobaltu (*Simonsen et al. 2012*). Vztahu kobaltu k hypoxii je věnována samostatná kapitola.

Při jednorázovém příjmu vyšších dávek kobaltu dochází k akutní toxicitě (*Simonsen et al. 2012*). Akutní toxicita byla popsána prostřednictvím několika případů otravy. Prvním z případů bylo 19měsíční dítě, které požilo 30 ml roztoku  $\text{CoCl}_2$ , i přes rychlou pomoc lékařů dítě na intoxikaci zemřelo. Po vyšetření se u něj zjistila koagulační nekróza žaludeční sliznice a edém mozku. Orgány jako játra, ledviny a slezina obsahovaly 89,4 mg Co. Druhým z případů byl šestiletý chlapec, který požil 2 g  $\text{CoCl}_2$ , do několika hodin si začal stěžovat na bolest břicha a zvracel. Následně mu bylo podáno emetikum a byl pozorován. Plazmatická koncentrace a koncentrace v plné krvi byla naměřena ve výši 426 mg/l a 237 mg/l, i přes tyto koncentrace byl kobalt rychle z těla vyloučen (*Paustenbach et al. 2013*).

Při dlouhodobějším působení i nízkých dávek kobaltu na lidské tělo dochází k jeho nepříznivým účinkům na tkáně a orgány. Tato skutečnost bude rozebrána podrobněji dále. (*Paustenbach et al. 2013*).

### **2.1.7 Působení na tkáně**

V následující kapitole budou popsány účinky kobaltu na různé typy tkání. Nejdůležitějším rizikovým faktorem výsledného poškození tkání je koncentrace kobaltu v krvi. Působení kobaltu může navozovat určité hematologické nebo reverzibilní endokrinní účinky při koncentracích nad 300  $\mu\text{g/l}$ . Neurologické a kardiální účinky nastávají při koncentracích okolo 700-800  $\mu\text{g/l}$  (*Finley et al. 2012*).

Kobalt může působit na nervový systém. Toto ovlivnění je možné díky schopnosti kobaltu přecházet přes hematoencefalickou bariéru chránící mozek. Dochází tak k projevu řady příznaků souvisejících se zrakem, sluchem, kognitivní funkcí nebo sensorickou a motorickou výkonností. Je důležité zmínit, že tyto nežádoucí účinky jsou většinou prvními diagnostikovanými projevy předávkování či otravy kobaltem, jsou reverzibilní a přímo úměrné zvýšeným koncentracím kobaltu a po skončení expozice řada příznaků ustoupí nebo vymizí (*Leyssens et al. 2017*).

Dalším možným projevem působení kobaltu je rozvoj strumy a myxedému. I tyto projevy jsou reverzibilní a jsou dány inhibicí tyrozin jodidázy kobaltem (*Simonsen et al. 2012*).

Při výrobě tvrdokovů (produkty práškové metalurgie) může dojít při dlouhodobé expozici k projevům působení na tkáň. Složkou mohoucí za onemocnění je kobalt, popřípadě jeho kombinace s karbidem wolframu. Hlavní roli zde hraje povaha a koncentrace prašnosti v procesech výroby tvrdokovů a také individuální vnímavost. Při kontaktu s tvrdokovem může docházet k plicním projevům nebo kontaktní dermatitidě (*Vejlupková Jana et al. 1995*).

Vdechováním prachu, který obsahuje kobalt, může docházet k projevům astmatu opožděného typu, fibrotizující alveolitis nebo difúzní intersticiální plicní fibrózy. Astma je spojeno s dráždivým kašlem a tísní na hrudi. K projevům dochází po skončení pracovní doby nebo večer a po přerušení expozice dochází k vymizení příznaků. Pro léčbu se kromě omezení expozice používají bronchodilatační látky. Fibrotizující alveolitis je spojená s váhovým úbytkem, krepitacemi nad plicními basemi a neproduktivním kašlem. Pro léčbu se využívá kortikoidů a omezení expozice. Opětná reexpozice by mohla vést až k plicní fibróze, která je neléčitelná. Dochází při ní ke změnám v dolních polovinách plicních polí a její projevy jsou podobné fibrózám způsobeným z jiných příčin. Prevencí těchto onemocnění je zamezení úniků prachu do ovzduší, popřípadě použití respirátorů (*Vejlupková Jana et al. 1995*).

Po kontaktu kůže s kobaltem může dojít k projevu alergické kontaktní dermatitidy na základě alergické reakce. Tato alergie je často spojená i s alergií na ostatní kovy jako nikl nebo chrom. Po perorálním požití kobaltu se na kůži mohou vyskytnout kožní vyrážky, pupínky nebo akné (*Leysens et al. 2017*).

Kobalt působí i na kostní dřeň, kde ovlivňuje tvorbu červených krvinek (erytropoézu). Přítomnost kobaltu vede ke zvýšené produkci erytrocytů. Tento vliv je daný účinkem kobaltu na erythropoetin, hormon stimulující tvorbu červených krvinek. Dochází tak ke zvýšení kapacity krve přenášet kyslík. Této skutečnosti se využívá při stavech ischemie a tkáňové hypoxie. V minulosti se tyto účinky kobaltu používaly pro léčbu anémií, v dnešní době jsou tyto skutečnosti spíše zneužívány sportovci pro zlepšení výkonu (*Simonsen et al. 2012*).

### **2.1.8 Chelatační terapie**

Jak bylo zmíněno výše, zvýšené koncentrace kobaltu v organismu vyvolávají nežádoucí toxické účinky. Řešením toxicity kobaltu je využití chelatační terapie. Princip léčby spočívá ve vyvázání volných iontů kobaltu chelátorem a vytvoření tzv. chelátu, komplexu

chelátoru a daného iontu, který je následně vyloučen z těla. Ideální vlastností chelátoru by měla být vysoká selektivita a afinita vůči danému iontu, rozpustnost ve vodě a schopnost chelatovat i intracelulární ionty. Většina v praxi používaných chelátorů má však pouze část z těchto vlastností. Chelátorem mohou být jak organické, tak anorganické látky, např. kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), 2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonát (DMPS), dimerkaprol nebo N-acetylcystein. (*Flora & Pachauri 2010*). Určitý chelatační potenciál vykazovaly i látky ze skupiny flavonoidů (*Choi et al. 2019, Mladěnka et al. 2010*).

Využití chelatační terapie při intoxikaci kobaltem bylo popsáno v několika kazuistikách. První z nich pojednává o intoxikaci pacienta s kyčelním implantátem MoM, kdy při přijetí byla naměřena hladina kobaltu v séru 489,5 µg/l. Využila se zde kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) jako chelatační činidlo, které bylo podáváno po dobu 7 dní. Výsledkem bylo snížení hladin na 393 µg/l. Toto snížení nebylo dostatečné, a proto jakmile to bylo možné, podstoupil pacient operaci pro odstranění implantátu. Během ní byla objevena metalóza a úlomky kovové hlavičky femuru. Po operaci došlo k dalšímu snížení hladin na 111 µg/l, které také nebylo dostatečné. Nedostatečné snížení vypovídá o reziduální metalóze, která zůstala v těle i po chirurgickém odstranění příčiny. Proto pacient podstoupil ještě další 3měsíční chelatační terapii, jejímž výsledkem byly hladiny 30,17 µg/l (*Choi et al. 2019*).

Další z kazuistik hovoří o využití 2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonátu (DMPS) jako chelatačního činidla u pacienta s intoxikací kobaltem po zavedení MoM implantátu. Po dobu 6 dní bylo pacientovi podáváno 14 mg látky na kg tělesné hmotnosti a následně po dobu 9 dní dávka 4 mg/kg. Po měsíční léčbě klesla hladina kobaltu o 26 %. Po léčbě trvající 10 měsíců došlo ke zlepšení většiny symptomů, ovšem i tak zůstaly hladiny kobaltu přibližně 40x vyšší, než je norma. (*Pelcova et al. 2012*).

### **2.1.9 Vliv na srdeční tkáň**

Zvýšené hladiny kobaltu mají negativní vliv na srdeční tkáň. Je to dáno působením kobaltu na erythropoetin, čímž dochází k ovlivnění adaptace srdeční tkáně na hypoxický stres (*Packer 2016*). Detailněji bude o ovlivnění hypoxie kobaltem pojednáno v samostatné kapitole.

Další možností je ovlivnění srdeční elektrofyzologie. O tomto pojednává studie *Castrillo Bustamante et al. (2021)*, která představuje případ pacienta, který prodělal v letech 2008



a 2010 oboustrannou endoprotézu kyčelního kloubu za použití implantátů typu CoC. V roce 2014 došlo ke zlomení endoprotézy a byla provedena revize implantátu za typ MoP. V roce 2019 byl pacient hospitalizován se srdečním selháním. Byl u něj přítomný nápadný třetí zvuk srdce, zvýšený tlak v jugulárních žilách a těžká ztráta sluchu. U pacienta byla prokázána kardiomyopatie spojená s metalózou se zvýšenými hladinami kobaltu (1661g/l) a chromu (5951g/l). Bylo rozhodnuto o odstranění protézy typu MoP a náhradě za typ CoC. Dva týdny po operaci došlo navzdory odstranění protézy a snížení hladiny kovů k elektrické bouři s několika šoky z ICD (implantabilní kardioverter-defibrilátor). Pacient se rychle zhoršoval a jeho stav vyžadoval nouzovou mechanickou podporu oběhu. Po elektrické stabilizaci a poklesu hladin kobaltu a chromu proběhla transplantace srdce.

Působením kobaltu na srdeční tkáň vzniká specifický typ kardiomyopatie, tzv. dilatační kardiomyopatie. Pro její rozvoj je kromě působení kobaltu potřeba alespoň jeden z dalších kofaktorů – deficit thiaminu, alkoholismus, hypotyreóza nebo nízkoproteinová dieta (*Packer 2016*). První zmínky o kardiomyopatii vyvolané kobaltem se objevily v 60. letech 20. století, kdy pivovary v Québecu a později i v Omaze, Nebrasce, Minneapolis, Minnesotě a Belgii začaly používat pro mytí sklenic syntetické detergenty. Následkem toho byla nepřítomnost pěny v pivu. Pivovary přišly s řešením a začaly do piva přidávat  $\text{CoCl}_2$  nebo  $\text{CoSO}_4$  jako stabilizátory pěny. U těžkých pijáků, u kterých byly přítomny i další rizikové faktory jako nedostatečný příjem bílkovin, vitamínu a zinku, došlo k projevu náhlých srdečních potíží, projevujících se přítomností perikardiálního výpotku, polycytémie a rychlou klinickou progresí vedoucí k selhání levé komory a kardiogennímu šoku (*Alexander 1972*).

Jak již bylo zmíněno výše, v minulém století se kobalt používal pro léčbu anémie v denní dávce 25-150 mg  $\text{CoCl}_2$ . Byly uvedeny případy, kdy tato léčba vedla ke kardiomyopatii. První z nich se odehrál v roce 1958, kdy se u dítěte projevila kardiomyopatie a městnavé srdeční selhání po léčbě železem a kobaltem. Mezi projevující se příznaky patřily potíže s přibíráním na váze, polycytémie, tachykardie, hepatomegalie a masivní struma. Po vysazení léčby příznaky odezněly. Druhý případ se odehrál v roce 1984 u dítěte léčeného kobaltem právě kvůli anémii. Nálezy byly velmi podobné nálezům kardiomyopatie u pijáků piva (*Packer 2016*).

Kardiomyopatie se může vyskytnout i u průmyslových pracovníků vystavených kobaltu. Projevující se příznaky jsou podobné jako u pijáků piva, tedy polycytémie, cyanóza, hypotenze, struma, srdeční selhání, sinusová tachykardie nebo dušnost, která je spíše spojená s účinky kobaltu na plíce než na srdce. Je důležité uvést, že právě alkohol potencuje účinky kobaltu na srdce a mezi další ovlivňující vlivy patří současné vystavení těla wolframu. Výsledky epidemiologických studií uvádí, že není prokázána role kobaltu u kardiomyopatie průmyslových pracovníků (*Packer 2016*). Tyto výsledky potvrdila i studie *Linna et al. (2020)*, která probíhala v letech 1999-2006 a která studovala vliv kobaltu na srdce u pracovníků v továrně na výrobu kobaltu. Hodnoty exponovaných pracovníků byly naměřeny na začátku studie a následně po 6 letech.

V současné době jsou dokumentovány případy, kdy u pacientů s implantátem typu MoM došlo k rozvoji kardiomyopatie. Pokud dojde k opotřebení a korozi implantátu, mohou se uvolnit úlomky kobaltu, které se šíří krevním oběhem a ukládají se do tkání. Při koncentracích nad 300 µg/l v séru nebo krvi dochází k významným kardiotoxickým účinkům projevujícím se jako polycytémie, úbytek hmotnosti, perikardiální výpotek a hypotyreóza (*Packer 2016*).

Ve studii *Choi et al. (2019)* byly studovány dva případy kardiomyopatie způsobené implantátem MoM. Jeden z nich již byl popsán výše v kapitole chelatační terapie. V tomto případě došlo ke včasnému podezření na kardiomyopatii způsobenou kobaltem. Pacient byl následně léčen chelatační terapií (EDTA). Následovala chirurgická revize vadného implantátu a pokračování v chelatační terapii po 3 měsíce, čímž došlo ke snížení hladin. Ve druhém případě nejprve nebylo podezření na kobaltem indukovanou kardiomyopatii. U pacienta došlo k multiorgánovému poškození a nutnosti transplantace srdce a ledvin. Diagnóza poškození byla určena až po transplantaci a následovala výměna implantátu a 3měsíční chelatační terapie, což vedlo ke snížení hladin. Tyto dva případy nám tak poukazují na důležitost včasného rozpoznání a léčby.

#### **2.1.10 Hypoxie a vztah ke kobaltu**

Termín hypoxie označuje situaci, kdy je buňkám k dispozici méně kyslíku nebo kdy je spotřeba kyslíku vyšší než jeho zásoba. Kyslík je nezbytný pro energetický metabolismus aerobních buněk a jeho omezená dodávka vede k poruše oxidačního metabolismu, což má dopad na procesy závislé na ATP. Tento stav je pro buňky toxický a je přirozeným

stimulem pro tvorbu erythropoetinu (*Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas 2019, Rana et al. 2019*).

Hypoxií indukovatelné faktory (HIF) hrají zásadní roli v regulaci homeostázy kyslíku, nejznámějším faktorem je HIF-1 $\alpha$ . Tyto faktory zvyšují expresi genů kódujících proteiny jako je vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a erythropoetin, které jsou zapojené do erythropoézy a angiogeneze, ale mohou ovlivňovat i mitochondriální respirace za účelem ochrany buňky před poškozením ROS. To se děje za hypoxických podmínek, HIF-1 $\alpha$  sníží úroveň mitochondriální respirace, a tím sníží množství mitochondriemi produkovaných ROS vlivem neefektivní respirace (*Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas 2019*).

Přirozený stav hypoxie můžeme simulovat pomocí chemické indukce hypoxie za využití CoCl<sub>2</sub>, což vede k imitaci stabilizace HIF-1 $\alpha$ /2 $\alpha$ . K této stabilizaci dochází většinou v rozmezí koncentrací 100-300  $\mu$ M. Při koncentracích přesahující 200-300  $\mu$ M se projevují toxické účinky, jako jsou apoptotické změny, zmenšení buněk, kondenzace chromatinu, fragmentace jádra nebo narušení mitochondriálního transmembránového potenciálu. Reakce buněk na CoCl<sub>2</sub> ovšem závisí na jejich druhu. (*Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas 2019*). Aktivaci HIF dochází k ovlivnění buněk produkujících erythropoetin. Mechanismus této reakce je pravděpodobně založen na přímé blokaci na kyslíku závislých hydroxyláz (HIF- $\alpha$  prolyl hydroxyláza a HIF- $\alpha$  asparaginyl hydroxyláza), čímž dochází k indukci transkripce genu pro erythropoetin. Při hypoxické odezvě jsou tyto hydrolázy často považovány za buněčné senzory (*Simonsen et al. 2012*).

## **2.2 Kvercetin**

### **2.2.1 Výskyt**

Flavonoidy řadíme do skupiny polyfenolických sloučenin. Můžeme je rozdělit do následujících tříd – flavonoly, flavony, isoflavonoidy, flavanony, isoflavany, katechiny a anthokyanidiny. Kvercetin je přírodní polyfenolická sloučenina ze skupiny flavonoidů, řadí se do podtřídy flavonolů. Tyto sloučeniny jsou běžnou složkou potravy. Jsou to přirozeně se vyskytující sekundární metabolity syntetizované v rostlinách. Zajišťují v nich vůni, chuť a barvu. (*Ferenczyova et al. 2020, Singh et al. 2021*).

Kvercetin je stejně jako ostatní flavonoidy hojně rozšířen v přírodě, kde se vyskytuje převážně ve formě kvercetinového glykosidu. Nejdůležitějším zdrojem kvercetinu

v potravě jsou zelené a černé čaje, jablka, třešně, bobuloviny, papriky nebo cibule. Dále ho můžeme nalézt v léčivých rostlinách jako *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* a *Sambucus canadensis*. Stravování tedy ovlivňuje celkový příjem flavonoidů, který se pohybuje v rozmezí 50-800 mg/den. Kvercetin tvoří 75 % přijatých flavonoidů. V západních zemích je odhadovaný denní příjem kvercetinu v rozmezí 3-40 mg (Andres et al. 2018, Li et al. 2016).

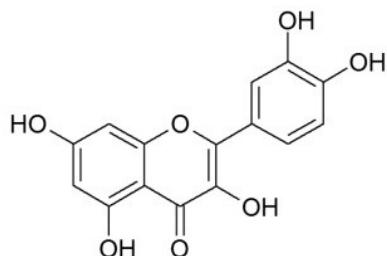
### 2.2.2 Fyzikální a chemické vlastnosti

Albert Szent-Gyögyi byl první vědec, který v roce 1936 rozpoznal a izoloval kvercetin. Kvercetin je jehličkovitý krystal žluté barvy a hořké chuti s molekulovou hmotností 320,2 g/mol. Tato látka je zcela nerozpustná ve studené vodě, špatně rozpustná v horké vodě, ale poměrně snadno rozpustná v alkoholu a lipidech. Díky svému lipofilnímu charakteru snadno přechází přes plazmatickou membránu.

Pro zlepšení rozpustnosti a biologické dostupnosti jsou uměle vytvářeny nanoformulace kvercetinu (Deepika & Maurya 2022, Li et al. 2016, Zhou et al. 2022).

Název kvercetin značí aglykon bez přidaného cukru. Případnou glykosylací tedy následně vzniká glykosid. Tato forma je hojně obsažena v přírodě. Připojení cukerné složky může vést ke změně rozpustnosti, absorpce a účinku (Li et al. 2016).

Kvercetin je chemicky 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon. Tyto hydroxylové skupiny hrají klíčovou roli v reaktivitě, biologické aktivitě a tvorbě derivátů této molekuly. Pro všechny flavonolové sloučeniny je typická hydroxylová skupina v poloze 3. Kvercetin, stejně jako všechny flavonoidy, má strukturu tvořenou 15 uhlíkatým skeletem v podobě dvou fenolových kruhů spojených heterocyklickým kruhem obsahujícím kyslík (sumární vzorec C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>, Obrázek 1) (Deepika & Maurya 2022, Ferenczyova et al. 2020).



**Obrázek 1:** Vzorec kvercetinu (nakresleno v programu Chemdraw)

Kvercetin je významný antioxidant, což bude podrobněji vysvětleno dále v samostatné kapitole. Antioxidační účinky kvercetinu jsou závislé na počtu připojených sacharidových zbytků, s vyšším obsahem se snižují. Kvercetin je také přirozeným inhibítorem transportu auxinu, má schopnost snižovat aktivitu lipoxygenázy, superoxiddismutázy (SOD) a katalázy (Ferencyova et al. 2020, Singh et al. 2021).

### 2.2.3 Metabolismus a biologická dostupnost

Jak bylo zmíněno výše, kvercetin je špatně rozpustný ve vodě, navíc vykazuje chemickou nestabilitu, což omezuje jeho schopnost proniknout membránou. To vede k jeho velmi nízké (~2 %) orální biologické dostupnosti. Tato dostupnost může být ovlivněna připojením cukerných složek. Po hydrolyze glykosidu na aglykon se dosahuje 65-81% absorpce. Biologický poločas v krvi je krátký, v průměru 3,5 hodiny (Deepika & Maurya 2022, Ferencyova et al. 2020, Li et al. 2016).

Důležitý vliv na absorpci kvercetinu má typ připojeného cukru, dále potravinová matrice, ze které je konzumován, a společné podání s vlákninou a tuky. Jak bylo zmíněno, kvercetin je do těla nejčastěji přijímán ve formě glykosidů, ty mohou být ve střevní sliznici hydrolyzovány pomocí  $\beta$ -glukosidáz na aglykony. K absorpci aglykonu dochází ve střevní sliznici pomocí pasivní difúze, zatímco některé glykosidy mohou být absorbovány pomocí SGLT-1 transportéru (sodík-glukózový kotransportér). Následně dochází k tvorbě metabolitů glukuronidací, sulfatací a methylocí. Tyto procesy probíhají v tenkém a tlustém střevě, ledvinách a játrech. Metabolity jsou dále distribuovány do tkání. Eliminace probíhá velmi rychle, primárně pomocí ledvin a částečně pomocí plic (Andres et al. 2018, Li et al. 2016).

### 2.2.4 Účinky kvercetinu na lidský organismus

Kvercetin je dlouhodobě studován a byla již publikována řada prací studujících na *in vitro* a *in vivo* modelech možné prospěšné účinky kvercetinu proti řadě patofyziologických procesů, nemocem a civilizačním chorobám. Tak byly popsány jeho antioxidační, protialergické, protizánětlivé, antikarcinogenní, kardioprotektivní, antivirové, antibakteriální nebo antidiabetické účinky (Ferencyova et al. 2020, Singh et al. 2021). Proto je kvercetin běžně přijímán v potravních doplňcích stravy v dávce až 1 g/den (Deepika & Maurya 2022, Tripathi et al. 2019). Kvercetin byl testován i jako antidotum při otravě těžkými kovy. Působí zde jako chelátor toxických kovů a zhasí volné radikály (Qi et al. 2022).

Lidské tělo je vybaveno sofistikovaným systémem obrany proti oxidaci, který chrání buňky před škodou způsobenou volnými radikály. Volné radikály jsou reaktivní molekuly s jedním nebo více nepárovými elektrony, řadíme sem molekuly ROS a RNS (reaktivní dusíkové formy). Při normální funkci organismu vykazují tyto látky fyziologické funkce, jako je relaxace hladkých svalů nebo se podílí na metabolismu xenobiotik. Pokud dojde k nerovnováze mezi produkcí reaktivních forem a neutralizujícími antioxidačními mechanismy, vzniká oxidační stres. ROS a RNS reagují snadno s proteiny, sacharidy i lipidy a při nerovnováze dochází ke snadnému poškození molekul (*Boots et al. 2008, Deepika & Maurya 2022, Rodrigo et al. 2022*).

Kvercetin má schopnost darovat své atomy vodíku a neutralizovat tím reaktivní radikály. Je tak silným zhášedčem volných radikálů a jeho podání slouží jako prevence oxidačního stresu a stárnutí (*Deepika & Maurya 2022*). Mimo to má kvercetin schopnost ovlivnit antioxidační kapacitu těla prostřednictvím regulace glutathionu (GSH), který slouží jako dárce vodíku, a tedy jako antioxidant. Také reguluje signální dráhy, které jsou indukované ROS, jako MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), NRF2 (*Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*) nebo AMPK (*AMP-Activated Protein Kinase*). Zároveň pomáhá předcházet poškození vychytáváním reaktivních forem. (*Qi et al. 2022*).

### **2.2.5 Působení na srdeční tkáň**

Kardioprotektivní účinky kvercetinu jsou spojeny s inhibicí apoptózy, snížením oxidačního stresu a ovlivněním zánětlivých proteinů v srdci. Kardioprotekce byla prokázána na řadě *in vitro* i *in vivo* modelech. Podle těchto studií kvercetin vykazuje silné ochranné účinky při různých typech srdečního poškození (*Ferencyova et al. 2020*). Příkladem takového poškození je nepříznivá remodelace srdeční tkáně po infarktu myokardu. Ochranný účinek kvercetinu byl dokázán v *in vitro* studii na potkanech trpících infarktem myokardu, kterým byl po dobu 30 dní orálně podáván kvercetin v dávce 50mg/kg (*Papakyriakopoulou et al. 2022*).

Kvercetin vykazuje také antihypertenzní účinky, což potvrzuje studie *Oyagbemi et al. (2018)*. Při této studii byly zkoumány u potkanů účinky kvercetinu na hypertenzi indukovanou flordem sodným. Studie prokázala, že podávání jak 50 mg/kg kvercetinu, tak 100 mg/kg kvercetinu orální sondou společně s 300 ppm floridu sodného snížilo krevní tlak a zlepšilo obranný antioxidační systém.

Ochranný účinek kvercetinů na srdeční tkáň byl zkoumán i v několika klinických studiích, kde byl potvrzen jeho účinek na krevní tlak u pacientů s hypertenzí, diabetem mellitem, obezitou nebo u kuřáků (*Terao 2017*). Ve studii *Edwards et al. (2007)* byl antihypertenzní účinek kvercetinů potvrzen. Do studie byli zařazeni pacienti se zvýšeným krevním tlakem na hranici hypertenze a hypertenzí. Po dobu 28 dní jim byl podáván buď kvercetin v dávce 730 mg nebo placebo. Na konci experimentu došlo ke snížení krevního tlaku u pacientů trpících hypertenzí.

Bylo popsáno, že každodenní podávání kvercetinů může výrazně snížit riziko srdečních a cévních onemocnění, protože kvercetin v krevním oběhu zlepšuje stav cév a snižuje riziko cévních onemocnění jako je trombóza a mrtvice a ovlivňuje srážení krve (*Ullah et al. 2020*).

### **2.2.6 Negativní vliv kvercetinů**

V závislosti na koncentraci kvercetinů a redoxním stavu buňky může kvercetin projevit kromě svých pozitivních antioxidačních účinků i účinky negativní, prooxidační (*Deepika & Maurya 2022*). Ve studii *Daubney et al. (2015)* byl právě tento jev zkoumán na buněčné linii H9c2. Bylo prokázáno, že po 72hod. inkubaci se projevuje kardiotoxicita kvercetinů již při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Při kratší 48hod. inkubaci se kardiotoxicita projevila pouze při koncentracích 30 a 100  $\mu\text{M}$ . Podávání denní dávky až 1 g kvercetinů po dobu několika měsíců však nevedlo k žádným nežádoucím změnám ve funkci jater a ledvin, krevním obrazu, sérových elektrolytech nebo krevních parametrech (*Zhou et al. 2022*).

### **2.2.7 Kvercetin a kobalt**

Studie *Ajibade et al. (2017)* zkoumala účinky kombinace kvercetinů a vitamínu C podávaného potkanům. Kobalt byl podáván v koncentraci 650 ppm v pitné vodě, kvercetin v dávce 50 mg/kg a vitamin C v dávce 100 mg/kg. Látky byly podávány denně gastrickou sondou po dobu 14 dní. Patnáctý den byla zvířata usmrcena, provedena pitva a odebraly se vzorky. Vystavení potkanů chloridu kobaltnatému vedlo k indukci oxidačního stresu a zvýšení hladin ROS, jako je peroxid vodíku, a následnému poškození tkání a k projevům hypertenze. Taktéž docházelo ke snížení aktivity glutathionperoxidázy a hladin glutathionu. Naopak podávání kvercetinů, vitamínu C nebo jejich kombinace vedlo ke snížení hladiny peroxidu vodíku a zvyšování aktivity antioxidačních složek, což vedlo ke zmírnění poškození. Studie tak prokázala, že současné podání kvercetinů a vitamínu C vede ke snížení krevního tlaku a potvrzuje tak protektivní účinky kvercetinů.

## 2.3 Buňky H9c2

### 2.3.1 Buněčná linie H9c2

Buněčná linie H9c2 je embryonální myoblastová linie, která byla původně izolována z ventrikulární části srdce potkana. Díky svým biochemickým, morfologickým a hormonálním vlastnostem se využívá *in vitro* jako napodobenina pro kosterní a srdeční sval, je tedy částečně schopná diferenciaci na tyto dva buněčné fenotypy. Buňky H9c2 jsou tedy nediferencované myoblasty s možností diferenciaci, které ovšem nevykazují spontánní kontraktilní aktivitu ani v diferenciovaném stavu (*Campero-Basaldua et al. 2023, Kuznetsov et al. 2015*). Tyto buňky byly poprvé popsány v roce 1976 vědci Kimesem a Brandtem. Mezi výhody těchto buněk patří rychlá propagace v kultuře a homogenní odezva na podněty, jednoduché kultivační protokoly a nízké náklady na udržování linie (*Onódi et al. 2022*). Díky přítomnosti některých kardiálně specifických markerů se linie podobá dospělým kardiomyocytům a je tak používána ve studiích zaměřených na mechanismy srdeční diferenciaci, toxicitu, poškození oxidačním stresem nebo při modelaci kardiovaskulárních onemocnění (*Branco et al. 2015, Pereira et al. 2011*). Nicméně i v diferenciovaném stavu postrádá některé jasně specifické kardiální markery jako je *heavy myosin* (*Lenčo et al. 2015*).

Většina studií používajících buněčnou linii H9c2 využívá buňky v nediferenciovaném stavu. Výsledky kardiotoxicity ovšem prokázaly rozdílnost výsledků v závislosti na stavu diferenciaci buněk (*Branco et al. 2015*).

### 2.3.2 Diferenciaci buněčné linie H9c2

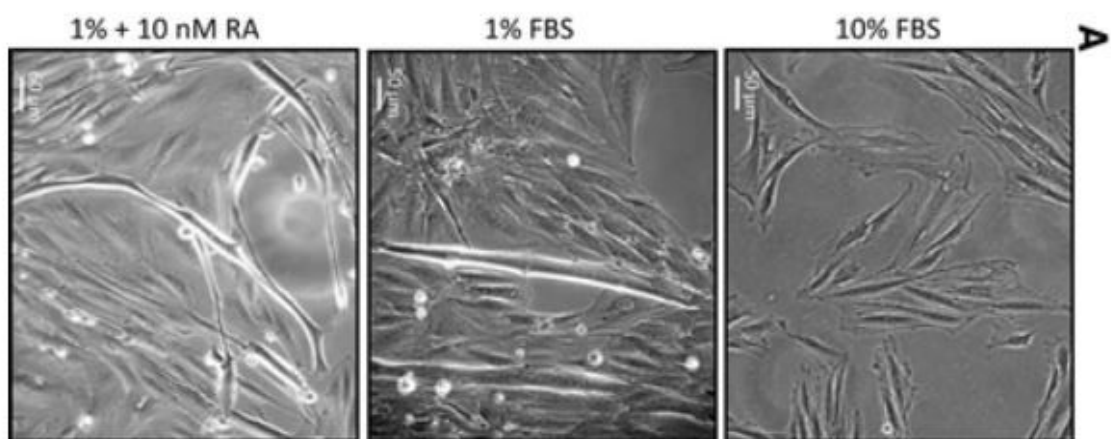
Jak již bylo zmíněno, tato buněčná linie tedy vykazuje schopnost diferencovat se na buňky podobné kosternímu nebo srdečnímu svaly. Proces diferenciaci je velmi složitý a v průběhu dochází k řadě změn jako zástavě buněčného cyklu a přeměně na mnohjaderné buňky. Dochází také ke snížení životaschopnosti buněk a zvýšení citlivosti na hypoxii (*Branco et al. 2015, Onódi et al. 2022*).

Při kultivaci buněk v médiu s vysokým obsahem séra (10% FBS) jsou buňky nediferencované. Mají vřetenovitý tvar a jsou jednojaderné. Zároveň jsou více závislé na glykolýze (*Branco et al. 2015, Branco et al. 2012*). Při kultivaci buněk v médiu s nízkým obsahem séra (1% FBS) dochází k diferenciaci z mononukleovaných myoblastů na dlouhé mnohjaderné myotuby a buňky tak získávají fenotyp kosterního svalstva. Důkazem je přítomnost specifických markerů – myogenu a myogenního regulačního



faktoru 1 (MyoD, z anglického *Myogenic Differentiation 1*) (Branco et al. 2015, Pereira et al. 2011).

Pokud se k médiu s obsahem 1 % séra FBS přidá retinová kyselina (RA), měla by převládat diferenciace na fenotyp podobný srdečním buňkám. Buňky se tak stávají dlouhými, rozvětvenými a mnohояdernými (viz Obrázek 2). Dochází ke zvýšení specifických srdečních markerů jako je troponin T nebo myosinový lehký řetězec 2 (Branco et al. 2015, Pereira et al., 2011). Ovšem studie Campero-Basaldúa et al. (2023) ukazuje, že při diferenciaci na srdeční fenotyp není v použitém protokolu nejdůležitější RA, jak se obecně myslelo, ale doba trvání diferenciace, protože v závislosti na vzrůstajícím čase proběhla diferenciace u více než 50 % buněk na srdeční fenotyp bez ohledu na přítomnost RA.



**Obrázek 2:** Buňky H9c2 (Převzato a upraveno z Pereira et al. 2011)

### **3 Cíl práce**

Cílem práce bylo u buněčné linie H9c2 určit hodnoty  $IC_{50}$  pro toxické působení chloridu kobaltnatého ( $CoCl_2$ ) inkubovaného s buňkami po 24 hodin. Následně stanovit hodnotu  $IC_{50}$  pro kvercetin při expozici 48 hodin a nakonec zjistit, zda pretreatment kvercetinem 24 hodin před samotnou 24hodinovou koinkubací s  $CoCl_2$  bude mít protektivní vliv.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Chemikálie

- Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma-Aldrich, kat. č.: P4417
- Fetal Bovine Serum (FBS), Sigma-Aldrich, kat. č.: F9665
- StableCell Trypsin Solution (Trypsin/EDTA 10X), Sigma-Aldrich, kat. č.: T2610
- Trypanová modř, GE Healthcare, kat. č.: SV30084.01
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bez pyruvátu, Sigma-Aldrich, kat. č.: D5796
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT roztok), Sigma-Aldrich, kat. č.: M5655
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Fischer Chemicals, kat. č.: D4125/PB17
- Chlorid kobaltnatý bezvodý, čistota  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich, kat. č.: 449776
- Kvercetin dihydrát, Sigma-Aldrich, kat. č.: Q4951
- Dodecylsírán sodný 10% (SDS), Sigma-Aldrich, kat. č.: 71736

### 4.2 Přístrojové vybavení

- Buněčný CO<sub>2</sub> inkubátor a laminární box (ESCO)
- Invertovaný mikroskop (Optika, XDS-1R)
- Vortex (ThermoFisher Scientific)
- Automatické pipety s různým rozsahem (Eppendorf)
- Automatické pipety Accu-jet Pro (Brand)
- Pasteurovy pipety
- Bürkerova komůrka (Brand)
- Spektrofotometr (Hidex sense)

## 4.3 Pracovní postupy

### 4.3.1 Pasážování a kultivace

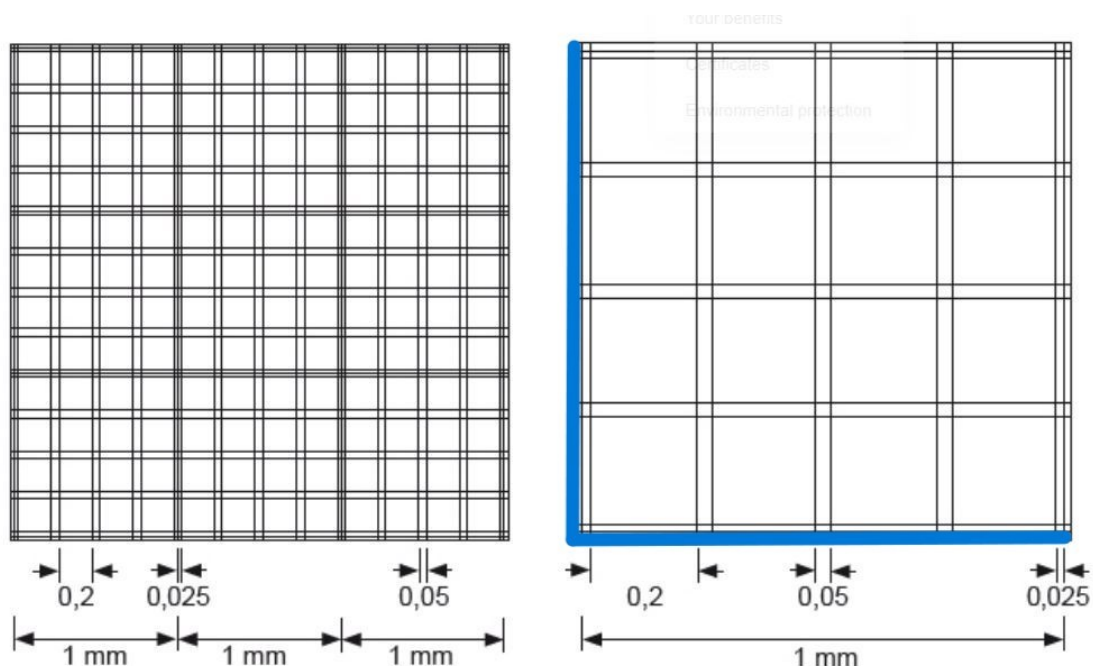
Pro experiment byla použita buněčná linie odvozená od potkaních kardiomyoblastů H9c2. Experiment byl prováděn za aseptických podmínek v laminárním boxu.

Pro kultivaci buněk bylo použito medium DMEM +10 % FBS, + 1 % P/S, 1 % HEPES s 1 mM pyruvátu. Kultivace probíhala při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Pasáž buněk probíhala 2× týdně.

Na začátku práce musela proběhnout kontrola stavu buněk pod mikroskopem. Pro náš experiment musely mít buňky dostatečnou konfluenci. Po této kontrole bylo z lahve pomocí Pasteurovy pipety vysáto staré medium a proběhl 2× oplach pomocí PBS. Dostatečný oplach jsme poznali pomocí nepřítomnosti růžového zbarvení v lahvi. Následně se do lahve přidal 1 ml trypsinu a proběhla 5minutová inkubace. Po inkubaci se pod mikroskopem zkontrolovalo, zda se buňky uvolnily ze dna lahve. Po této kontrole se k buňkám silným proudem, pro rozbití shluků, přidalo medium a vytvořila se suspenze. Část této suspenze se dále použila k experimentům a část se zachovala pro následnou další kultivaci.

### 4.3.2 Počítání buněk

Používala se část předtím vytvořené suspenze, která byla přenesena do kádinky. Následně bylo do mikrozkušavky odebráno 100 µl této suspenze a bylo k ní přidáno 100 µl trypanové modři. Toto barvivo je pro buňky toxické, a proto ho živé buňky aktivně vypuzují, ale mrtvé buňky se obarví namodro. Tyto buňky pak následně počítáme. Z této vytvořené směsi odebereme 10 µl, které dáme do obou počítacích čtverců Bürkerovy komůrky a komůrku vložíme pod mikroskop. Jak již bylo zmíněno, počítají se obarvené buňky, a to v 10 čtvercích (5 čtverců v horní části a 5 čtverců v dolní části) podle tzv. pravidla L (Obrázek 3). Výsledný počet buněk se vynásobí 2× (faktor ředění přidáním trypanové modři) a následně ještě 1000× (pro převod z µl na ml). Výsledkem je tedy počet buněk v 1 ml. Následně se pro výpočet použila směšovací rovnice. Tímto výpočtem jsme zjistili, kolik média je třeba přidat k naší suspenzi, abychom dosáhli požadované koncentrace 100 000 buněk na 1 ml suspenze.



**Obrázek 3:** Schéma Bürkerovy komůrky a ukázané pravidlo L pro počítání buněk (převzato z <https://www.marienfeld-superior.com/counting-grids.html>)

#### 4.3.3 Příprava buněk na experimenty

Po spočítání buněk a přípravě suspenze buněk o požadované koncentraci se pomocí multikanálové pipety napipetovala daná suspenze po 100  $\mu\text{l}$ /jamku (10 000 buněk/jamku) na 96jamkovou kultivační destičku a ta byla vložena do inkubátoru na 24 hod. Následující den byly buňky na destičce zkontrolovány pod mikroskopem a následně bylo kultivační medium DMEM vyměněno za expoziční medium bez 10% FBS (SFM) a následovala další 24hod. inkubace, po které již začaly cytotoxicitní experimenty. Výměna DMEM za SFM byla nutná pro synchronizaci buněčného cyklu a zastavení proliferace buněk.

#### 4.3.4 Stanovení cytotoxicity chloridu kobaltnatého po 24hodinové expozici

Při testování cytotoxicity kobaltu byly použity již připravené zásobní roztoky  $\text{CoCl}_2$ , a to o koncentracích  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-1}$  a 1 M. Pro získání požadovaných testovaných koncentrací  $\text{CoCl}_2$   $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  M byly použity již zmíněné zásobní roztoky, které byly zředěny 1000 $\times$ , popřípadě 100 $\times$  expozičním médiem (SFM).

Pro stanovení cytotoxicity bylo z jamek odsáto SFM a přidáno čerstvé SFM s již rozpuštěnou požadovanou koncentrací  $\text{CoCl}_2$ . Takto byly buňky inkubovány za stejných podmínek následujících 24 hodin.

#### 4.3.5 Stanovení cytotoxicity kvercetinů po jeho 48hodinové expozici

Při experimentu jsme používali kvercetin dihydrát. Nejdříve jsme museli připravit zásobní roztoky, které jsme poté dále používali. Pro přípravu zásobních roztoků jsme použili princip sériového ředění a ředili jsme v poměru 1:9 (Tabulka 1). Pro ředění jsme použili DMSO. Pro získání testovaných koncentrací,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-3}$  M, byly zásobní roztoky zředěny 1000× expozičním médiem. DMSO je zde použito jako pozitivní kontrola, zatímco SDS jako kontrola negativní.

Pro stanovení cytotoxicity bylo z jamek odsáto SFM a přidáno čerstvé SFM s již rozpuštěnou požadovanou koncentrací kvercetinů. Takto byly buňky inkubovány za stejných podmínek následujících 48 hodin.

Koncentrace zásobního roztoku [M]	Způsob přípravy
1	z navážky
$1 \times 10^{-1}$	10× ředěno 1 M
$1 \times 10^{-2}$	10× ředěno $1 \times 10^{-1}$ M
$1 \times 10^{-3}$	10× ředěno $1 \times 10^{-2}$ M
$1 \times 10^{-4}$	10× ředěno $1 \times 10^{-3}$ M
$1 \times 10^{-5}$	10× ředěno $1 \times 10^{-4}$ M
$1 \times 10^{-6}$	10× ředěno $1 \times 10^{-5}$ M

**Tabulka 1:** Příprava zásobních roztoků kvercetinů

#### 4.3.6 Pretreatment kvercetinem a koinkubace kobaltu s kvercetinem

Při pretreatmentu kvercetinem jsme buňky inkubovaly v SFM s vybranými koncentracemi  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-6}$  M kvercetinů, a po 24 hod. bylo médium odsáto a nahrazeno SFM s vybranou koncentrací kvercetinů a vzrůstající koncentrací  $\text{CoCl}_2$   $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  M. Po 24hodinové koinkubaci proběhlo stanovení cytotoxicity MTT testem.

#### 4.3.7 Stanovení cytotoxicity MTT testem

Tento test patří mezi nejčastější testy životaschopnosti a proliferace buněk. Je založen na redukci žlutého 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT roztok) na fialový formazan. Test se skládá ze dvou fází. V první fázi dochází metabolicky aktivními buňkami k přeměně MTT roztoku na formazan, ve druhé fázi poté dochází k rozpuštění krystalů formazanu (Benov 2021).

V našem případě se přidávalo do každé jamky destičky 25  $\mu$ l MTT (3 mg/ml), v čase 3 hodiny před plánovaným koncem expozice. Následovala 3hod. inkubace při teplotě 37°C. Po inkubaci se z jamek odstranil vzniklý tekutý obsah a následně se přidalo 100  $\mu$ l DMSO právě pro rozpuštění formazanu. Po rozpuštění následovalo spektrofotometrické změření při vlnové délce 570 nm na přístroji Hidex sense.

#### **4.3.8 Statistické zpracování dat**

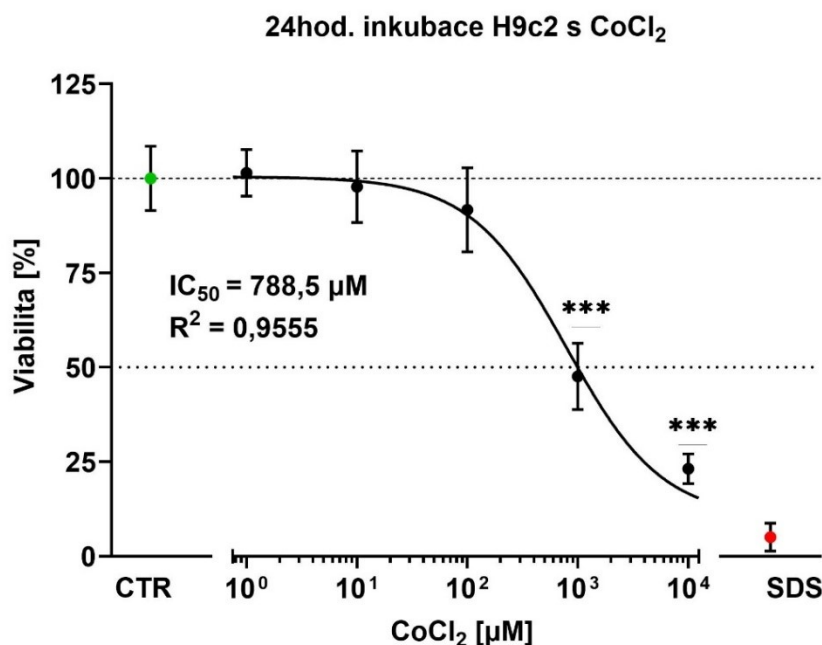
Pro zpracování výsledků buněčné cytotoxicity byl použit program Microsoft Excel. Program GraphPad Prism 10 byl použit pro statistické a grafické zpracování dat a výpočet hodnot  $IC_{50}$ . Pro výpočet hodnot  $IC_{50}$  byla použita funkce nelineární regrese s tříparametrovým modelem. V grafech jsou zobrazeny hodnoty  $R^2$ . Pro stanovení statisticky významných rozdílů byla použita jednocestná ANOVA s Holm-Šidák post-hoc testem.

## 5 Výsledky

### 5.1 Stanovení cytotoxicity a $IC_{50}$ kobaltu v buněčné linii H9c2 po 24hod. expozici

V první části našeho experimentu byla buněčná linie H9c2 vystavena po dobu 24 hod. působení  $CoCl_2$  v koncentracích od 1  $\mu M$  do 10 mM. Experiment byl proveden za využití pozitivních a negativních kontrol. Obě kontroly byly inkubovány po stejně dlouhou dobu jako zkoušený  $CoCl_2$ , tj. 24 hod. Jako pozitivní kontrola, představující 100% viabilitu buněk, bylo použité DMEM bez pyruvátu a séra. Jako negativní kontrola byl použit 10% roztok SDS, který dosahoval přibližně 5 % viability pozitivní kontroly.

Na Obrázku č. 4 je znázorněna již zmíněná 24hod. expozice. Je zde viditelné, že buněčná viabilita klesá se zvyšující se koncentrací  $CoCl_2$ , což značí dávkovou závislost. K prvnímu statisticky významnému poklesu viability na hodnotu 47,6 % došlo při koncentraci 1 mM. Ještě větší pokles viability na hodnotu 23,1 % byl detekován při naší nejvyšší zkoumané koncentraci 10 mM. Hodnota  $IC_{50}$  po 24 hod. byla 788,5  $\mu M$ , hodnota koeficientu determinace  $R^2$  byla 0,9555, ukazující na velmi dobrou shodu modelu s naměřenými daty.



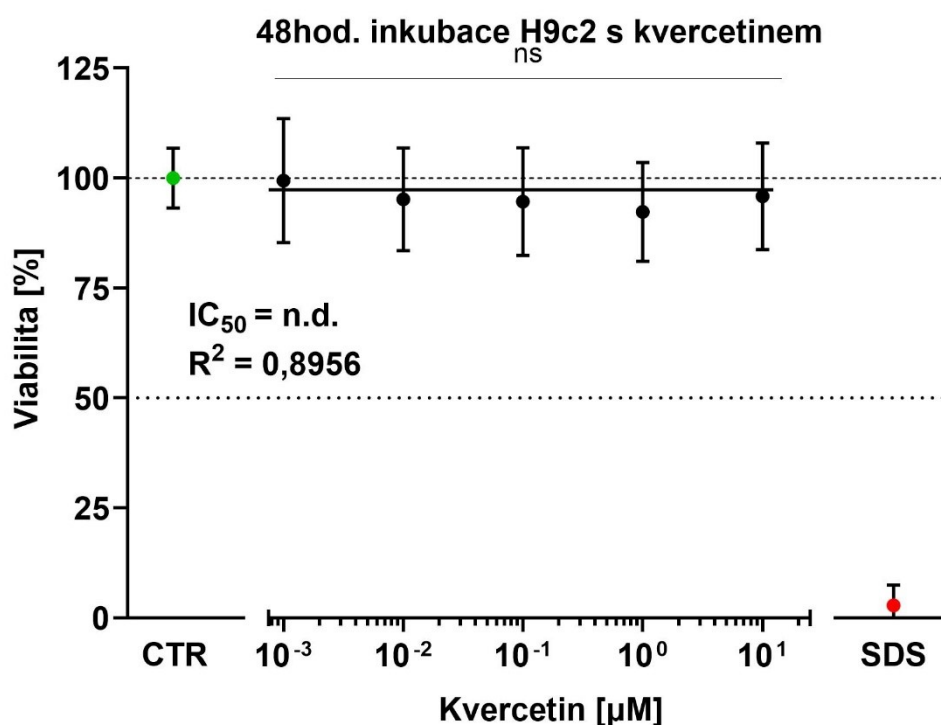
**Obrázek 4:** Graf závislosti viability na koncentraci  $CoCl_2$  po 24hod. expozici. Statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině vypočtený pomocí jednocestné ANOVA s Holm-Šidák post hoc testem: \*\*\* $p < 0,0001$



## 5.2 Stanovení cytotoxicity a $IC_{50}$ kvercetinů v buněčné linii H9c2 po 48hod. expozici

Ve druhé části našeho experimentu byla buněčná linie H9c2 vystavena po dobu 48 hod. působení kvercetin dihydrátu v koncentracích od 1 nM do 10  $\mu$ M. Stejně jako v předchozí části i zde bylo využito DMEM bez pyruvátu a séra jako pozitivní kontrola se svou viabilitou 100 % a 10% roztok SDS jako kontrola negativní, vykazující viabilitu buněk 2,8 %.

Na Obrázku č. 5 je znázorněná již zmíněná 48hod. expozice. Na rozdíl od grafu znázorňujícího kobalt zde nevidíme žádnou dávkovou závislost na viabilitu buněk. Ve všech koncentracích je viabilita buněk nad 90 % a mírný odchyl může být dán lidským faktorem a možnou chybou. Z grafu je tedy patrné, že po 48hod. expozici kvercetinů na buňky nedochází k žádné cytotoxicitě. Hodnoty  $IC_{50}$  nebylo dosaženo (n.d.).

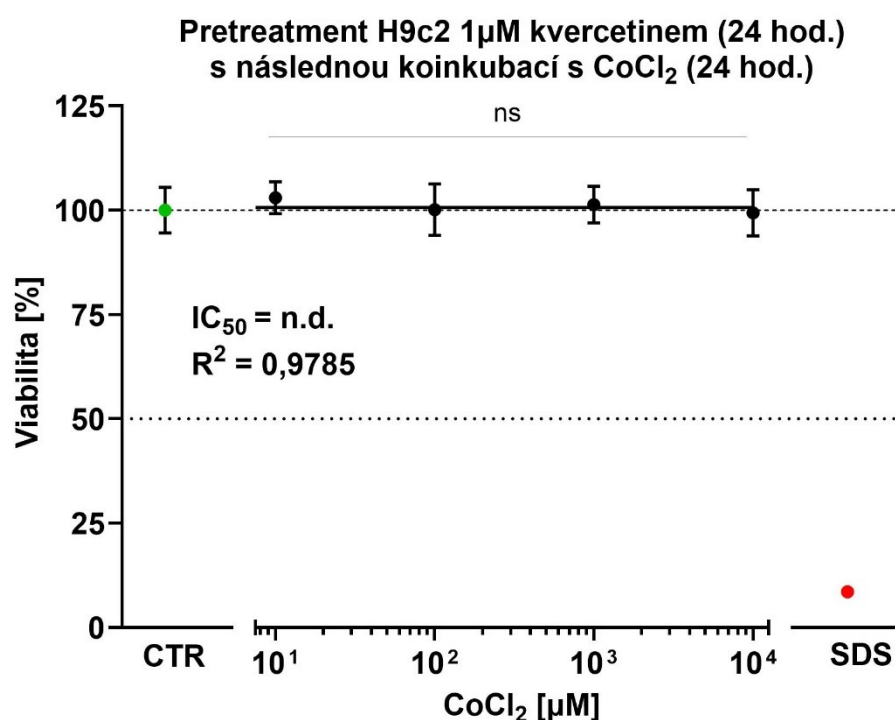


**Obrázek 5:** Graf závislosti viability na koncentraci kvercetin dihydrátu po 48hod. expozici. Statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině vypočtený pomocí jednocestné ANOVA s Holm-Šidák post hoc testem: ns - nesignifikantní

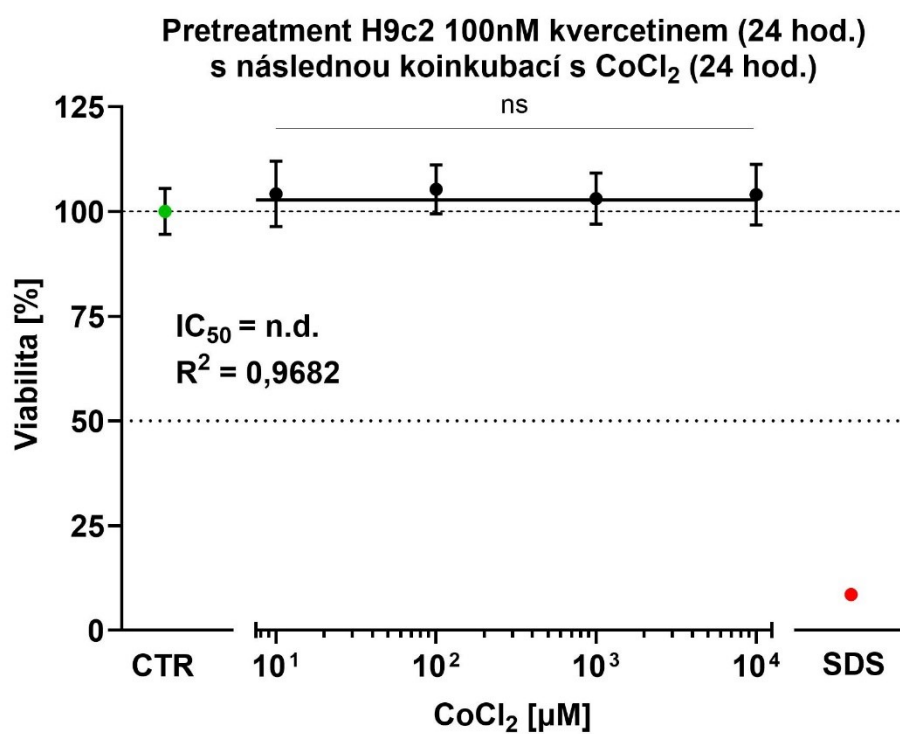
### 5.3 Stanovení cytotoxicity v buněčné linii H9c2 po 24hod. pretreatmentu kvercetinem a následné 24hod. koinkubaci s CoCl<sub>2</sub>

V poslední části našeho experimentu byla buněčná linie H9c2 vystavena po dobu 24 hod. působení dihydrátu kvercetinu v koncentraci buď 100 nM nebo 1 μM (pretreatment) a následně byla vystavena působení chloridu kobaltnatému v koncentracích od 10 nM do 10 mM (koinkubace kvercetinu s kobaltem). I při této části experimentu bylo využito DMEM jako pozitivní kontrola viability (100 %) a 10% roztok SDS jako negativní kontrola (viabilita 8,5 %).

Jak je vidět z grafu na Obrázku č. 6 a 7, pretreatment kvercetinem v obou testovaných koncentracích zcela zabránil cytotoxickému působení chloridu kobaltnatého ve všech testovaných koncentracích, tj. v koncentracích, které samy o sobě vykazovaly cytotoxické působení (viz Obr. 4). Hodnoty IC<sub>50</sub> ani v jednom případě nebylo dosaženo.



**Obrázek 6:** Graf závislosti viability buněk při 24hod. pretreatmentu 1 μM kvercetinem a následné 24hod. koinkubaci s CoCl<sub>2</sub>. Statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině vypočtený pomocí jednocestné ANOVA s Holm-Šidák post hoc testem: ns - nesignifikantní



**Obrázek 7:** Graf závislosti viability buněk při 24hod. pretreatmentu 100 nM kvercetinem a následné 24hod. koinkubaci CoCl<sub>2</sub>. Statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině vypočtený pomocí jednocestné ANOVA s Holm-Šidák post hoc testem: ns - nesignifikantní

## 6 Diskuse

Cílem práce bylo určit hodnoty  $IC_{50}$  u buněčné linie H9c2 po 24hodinové inkubaci s  $CoCl_2$  a po 48hodinové inkubaci s kvercetinem. Následně se zjišťovala schopnost 24hodinové preinkubace kvercetinem ochránit H9c2 buňky před 24hodinovou inkubací s  $CoCl_2$ .

Po 24hodinovém vystavení buněčné linie H9c2 koncentracím od 1  $\mu M$  do 10 mM  $CoCl_2$  jsme prokázali dávkovou závislost a cytotoxické působení kobaltu s hodnotou  $IC_{50} = 788,5 \mu M$ . Signifikantní pokles viability o více než 50 % nastal při koncentraci 1mM, první nesignifikantní pokles viability byl pozorován již při 100  $\mu M$  koncentraci. Tento výsledek je také v souladu s našimi předchozími výsledky zkoumajícími toxicitu chloridu kobaltnatého na téže buněčné linii po 24 a 48hodinové expozici. I zde byla potvrzena cytotoxicita  $CoCl_2$  po 24hodinách, a to od koncentrace 100  $\mu M$  a hodnota  $IC_{50}$  byla 500,5  $\mu M$ . Cytotoxicita po 48 hod. byla zhruba dvojnásobná s  $IC_{50} = 212,2 \mu M$  (Rottenbornová, 2023). Rozdíl v hodnotách  $IC_{50}$  je pravděpodobně způsoben použitím jiné pasáže buněčné kultury.

Z dostupných zdrojů nebyla k dispozici k porovnání hodnota  $IC_{50}$  na téže buněčné linii, ale toxický účinek kobaltu byl potvrzen i na řadě jiných buněčných kultur v jiných studiích. Jednou z nich je studie *Horev-Azaria et al. (2011)*, kde byla použita delší inkubační doba (48 hod. a 72 hod.) a byla použita celá paleta buněčných kultur pro studium toxicity kobaltu v podobě nanočástic a iontů. Buněčné kultury, zastupující tkáň jako plíce (A549 a NCIH441), střeva (Caco-2), játra (HepG2), ledviny (MDCK) a imunitní systém (dendritické buňky), byly vystaveny koncentracím v rozmezí 0,05- 1,0 mM a byl zkoumán jejich cytotoxický efekt. Souhrnně lze říci, že kobaltové nanočástice i samotné ionty vykazovaly podobnou toxicitu projevující se při koncentracích nad 200  $\mu M$ , která se lišila v závislosti na použité buněčné linii a čase, ale trend i hodnoty  $IC_{50}$  byly srovnatelné s našimi výsledky.

Expozice buněk H9c2 kvercetinem po dobu 48 hod. neprokázala v žádné z testovaných koncentrací (od 1 nM do 10  $\mu M$ ) cytotoxicitu. Podobný výsledek byl uveden v *in vitro* studii *Angeloni et al. (2007)*, kde byla buněčná linie H9c2 vystavena koncentracím kvercetinu od 1  $\mu M$  do 30  $\mu M$  po 24 hod., a ani zde nebyla prokázána snížená životaschopnost buněk. Možnost cytotoxického působení kvercetinu je prokázána ve studii *Daubney et al. (2015)*. V této studii je buněčná linie H9c2 vystavena

koncentracím kvercetinů od 1 do 100  $\mu\text{M}$  po dobu 24, 48 a 72 hodin. Po 24hod. inkubaci nebyl zaznamenán u žádné z uvedených koncentrací vliv na životaschopnost buněk. Po 48hod. inkubaci došlo v koncentracích 30 a 100  $\mu\text{M}$  k signifikantnímu snížení životaschopnosti a po 72hod. inkubaci došlo k signifikantní cytotoxicitě již při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Tyto studie tedy potvrzují naše výsledky. Zároveň z nich můžeme vyvodit závěr, že cytotoxicita kvercetinů je závislá na délce vystavení buněčné linie jeho působení a koncentraci.

Možné protektivní působení kvercetinů proti působení kobaltu bylo testováno při 24hodinové preinkubaci H9c2 buněk kvercetinem v koncentracích 100 nM nebo 1  $\mu\text{M}$  a následnou inkubací s  $\text{CoCl}_2$  v koncentracích od 10 nM do 10 mM. Zde byla jednoznačně prokázána schopnost kvercetinů zabránit projevům cytotoxicity  $\text{CoCl}_2$  a životaschopnost buněk zůstala zcela na kontrolních hodnotách.

V literatuře jsme nenašly podobnou studii, která by byla designovaná stejně a zkoumala by čistě protekci kvercetinem proti expozici kobaltem. Existuje ale řada podobných prací, které popisují protektivní působení kvercetinů na námi studovanou buněčnou linii H9c2, nejčastěji proti působení antracyklinového antibiotika doxorubicinu. Například *Chen et al. (2013)* ve své studii zkoumal účinky 4hod. preinkubace pomocí kvercetinů (0 - 200  $\mu\text{M}$ ) a následné vystavení buněk 0,45  $\mu\text{M}$  doxorubicinu po dobu 24 hod. Doxorubicin vyvolal u buněk 50 % snížení viability, které byl kvercetin o koncentraci od 50 do 200  $\mu\text{M}$  schopen zabránit. Podobně *Zhang et al. (2018)* zkoumal účinky 24hod. preinkubace kvercetinem ve formě methanolového extraktu z rostliny *Alternanthera philoxeroides* (10, 20, 40, 80, 160 mg/ml), která obsahuje kvercetin, proti 24hod. toxickému působení 10 $\mu\text{M}$  doxorubicinu. Ačkoliv výsledky nelze přičíst pouze kvercetinů, protože byl použit necharakterizovaný směsný extrakt, i zde byl zaznamenán protektivní účinek. V další ze studií byl zkoumán toxický vliv 4-hydroxynonenalu (25  $\mu\text{M}$ ) na buněčnou linii H9c2. Buňky byly po dobu 24 hod. předlčeny extrakty z olivových listů, které obsahují kvercetin (0,1 - 1  $\mu\text{M}$ ). I zde bylo prokázáno zlepšení oxidačního poškození a ochranné účinky kvercetinů (*Bali et al. 2014*). Ve všech výše zmíněných studiích se protektivní účinky kvercetinů přisuzují jeho antioxidačnímu působení, které následně pozitivně ovlivňuje protektivní buněčné kaskády jako jsou PI3K/Akt či ERK1/2 a které souhrnně vedou např. k potlačení apoptózy buněk. Účinek kvercetinů je zde dávkově i časově závislý, jak popsala již zmíněná práce *Angeloni et al. (2007)*. Dávky kvercetinů 10 až 30  $\mu\text{M}$  vyvinuly ochranu před apoptózou kardiomyoblastů H9c2 již po 1 hod. předlčby,

nižší koncentrace 1 až 3  $\mu\text{M}$  pak prokázaly tuto schopnost po 18 hod. (*Angeloni et al. 2007*).

## 7 Závěr

V této diplomové práci bylo potvrzeno cytotoxické působení  $\text{CoCl}_2$  na buněčnou linii H9c2. Byla zde prokázána dávková závislost, tj. se zvyšující se koncentrací  $\text{CoCl}_2$  se snižuje viabilita buněk. Zároveň zde bylo prokázáno, že působení kvercetin dihydrátu nijak negativně neovlivňuje viabilitu buněk H9c2, i po podání zůstávala viabilita okolo 90 %, což dokazuje nepřítomnost cytotoxického chování ve zkoušených koncentracích. Hlavním zjištěním je ovšem fakt, že působení 100 nM a 1  $\mu\text{M}$  dihydrátu kvercetinu po dobu 48 hod na buněčnou linii H9c2 zajistí ochranu buněk před jinak cytotoxickými koncentracemi  $\text{CoCl}_2$ , aniž by vykazovalo vlastní toxicitu.

## 8 Literatura

1. Ajibade, T. O., Oyagbemi, A. A., Omobowale, T. O., Asenuga, E. R., & Adigun, K. O. (2017). Quercetin and Vitamin C Mitigate Cobalt Chloride-Induced Hypertension through Reduction in Oxidative Stress and Nuclear Factor Kappa Beta (NF-Kb) Expression in Experimental Rat Model. *Biological Trace Element Research*, 175(2), 347–359. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0773-5>
2. Alexander, C. S. (1972). Cobalt-beer cardiomyopathy. *The American Journal of Medicine*, 53(4), 395–417. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(72\)90136-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(72)90136-2)
3. Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schäfer, B., Hirsch-Ernst, K. I., & Lampen, A. (2018). Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700447>
4. Angeloni, C., Spencer, J. P. E., Leoncini, E., Biagi, P. L., & Hrelia, S. (2007). Role of quercetin and its in vivo metabolites in protecting H9c2 cells against oxidative stress. *Biochimie*, 89(1), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.006>
5. Artiaco, S., Fusini, F., Zoccola, K., Massè, A., & Colzani, G. (2019). Metallosis in Sequelae of Prosthetic Revision for Ceramic Components Fracture: A Case Report with Clinical Presentation Mimicking Periprosthetic Hip Infection. *Joints*, 07(04), 215–217. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1730981>
6. Bali, E., Ergin, V., Rackova, L., Bayraktar, O., Küçükboyacı, N., & Karasu, Ç. (2014). Olive Leaf Extracts Protect Cardiomyocytes against 4-Hydroxynonenal-Induced Toxicity In Vitro: Comparison with Oleuropein, Hydroxytyrosol, and Quercetin. *Planta Medica*, 80(12), 984–992. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1382881>
7. Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Cobalt. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 201–216. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102420>
8. Benov, L. (2021). Improved Formazan Dissolution for Bacterial MTT Assay. *Microbiology Spectrum*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01637-21>



9. Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, *585*(2–3), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008>
10. Branco, A. F., Pereira, S. P., Gonzalez, S., Gusev, O., Rizvanov, A. A., & Oliveira, P. J. (2015). Gene Expression Profiling of H9c2 Myoblast Differentiation towards a Cardiac-Like Phenotype. *PLOS ONE*, *10*(6), e0129303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129303>
11. Branco, A. F., Sampaio, S. F., Moreira, A. C., Holy, J., Wallace, K. B., Baldeiras, I., Oliveira, P. J., & Sardão, V. A. (2012). Differentiation-Dependent Doxorubicin Toxicity on H9c2 Cardiomyoblasts. *Cardiovascular Toxicology*, *12*(4), 326–340. <https://doi.org/10.1007/s12012-012-9177-8>
12. Campero-Basaldua, C., Herrera-Gamboa, J., Bernal-Ramírez, J., Lopez-Moran, S., Luévano-Martínez, L.-A., Alves-Figueiredo, H., Guerrero, G., García-Rivas, G., & Treviño, V. (2023). The retinoic acid response is a minor component of the cardiac phenotype in H9c2 myoblast differentiation. *BMC Genomics*, *24*(1), 431. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09512-0>
13. Castrillo Bustamante, C., Canteli Álvarez, Á., Burgos Palacios, V., Sarralde Aguayo, J. A., Serrano Lozano, D., Arana Achaga, X., Nuñez Rodríguez, Á., & Cobo Belaustegui, M. (2021). A case report of cobalt cardiomyopathy leading to electric storm and cardiogenic shock: the importance of the orthopaedic background in patients with heart failure of unknown aetiology. *European Heart Journal - Case Reports*, *5*(4). <https://doi.org/10.1093/ehjcr/ytab057>
14. Chen, J.-Y., Hu, R.-Y., & Chou, H.-C. (2013). Quercetin-induced cardioprotection against doxorubicin cytotoxicity. *Journal of Biomedical Science*, *20*(1), 95. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-95>
15. Choi, H.-I., Hong, J. A., Kim, M.-S., Lee, S. E., Jung, S.-H., Yoon, P. W., Song, J. S., & Kim, J.-J. (2019). Severe Cardiomyopathy Due to Arthroprosthetic Cobaltism: Report of Two Cases with Different Outcomes. *Cardiovascular Toxicology*, *19*(1), 82–89. <https://doi.org/10.1007/s12012-018-9480-0>

16. Daubney, J., Bonner, P. L., Hargreaves, A. J., & Dickenson, J. M. (2015). Cardioprotective and Cardiotoxic Effects of Quercetin and Two of Its *In Vivo* Metabolites on Differentiated H9c2 Cardiomyocytes. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(2), 96–109. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12319>
17. Davis, T. P. (2023). Metal-on-Metal Hip Arthroplasty: A Comprehensive Review of the Current Literature. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.48238>
18. Deepika, & Maurya, P. K. (2022). Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules*, 27(8), 2498. <https://doi.org/10.3390/molecules27082498>
19. Edwards, R. L., Lyon, T., Litwin, S. E., Rabovsky, A., Symons, J. D., & Jalili, T. (2007). Quercetin Reduces Blood Pressure in Hypertensive Subjects<sup>1</sup>. *The Journal of Nutrition*, 137(11), 2405–2411. <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2405>
20. Ferenczyova, K., Kalocayova, B., & Bartekova, M. (2020). Potential Implications of Quercetin and its Derivatives in Cardioprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1585. <https://doi.org/10.3390/ijms21051585>
21. Finley, B. L., Monnot, A. D., Gaffney, S. H., & Paustenbach, D. J. (2012). Dose-Response Relationships For Blood Cobalt Concentrations and Health Effects: A Review of the Literature and Application of a Biokinetic Model. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 15(8), 493–523. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.744287>
22. Flora, S. J. S., & Pachauri, V. (2010). Chelation in Metal Intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(7), 2745–2788. <https://doi.org/10.3390/ijerph7072745>
23. Horev-Azaria, L., Kirkpatrick, C. J., Korenstein, R., Marche, P. N., Maimon, O., Ponti, J., Romano, R., Rossi, F., Golla-Schindler, U., Sommer, D., Uboldi, C., Unger, R. E., & Villiers, C. (2011). Predictive Toxicology of Cobalt Nanoparticles and Ions: Comparative In Vitro Study of Different Cellular Models Using Methods of Knowledge Discovery from Data. *Toxicological Sciences*, 122(2), 489–501. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr124>

24. Jenkinson, M. R. J., Meek, R. M. D., Tate, R., MacMillan, S., Grant, M. H., & Currie, S. (2021). Cobalt-induced cardiomyopathy – do circulating cobalt levels matter? *Bone & Joint Research*, *10*(6), 340–347. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.106.BJR-2020-0414.R2>
25. Knoop, A., Planitz, P., Wüst, B., & Thevis, M. (2020). Analysis of cobalt for human sports drug testing purposes using ICP- and LC-ICP-MS. *Drug Testing and Analysis*, *12*(11–12), 1666–1672. <https://doi.org/10.1002/dta.2962>
26. Kuznetsov, A. v., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S., & Grimm, M. (2015). H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1853*(2), 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.015>
27. Lenčo, J., Lenčová-Popelová, O., Link, M., Jirkovská, A., Tambor, V., Potůčková, E., Stulík, J., Šimůnek, T., & Štěrba, M. (2015). Proteomic investigation of embryonic rat heart-derived H9c2 cell line sheds new light on the molecular phenotype of the popular cell model. *Experimental Cell Research*, *339*(2), 174–186. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.020>
28. Leyssens, L., Vinck, B., van der Straeten, C., Wuyts, F., & Maes, L. (2017). Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*, *387*, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.05.015>
29. Lhotka, C., Szekeres, T., Steffan, I., Zhuber, K., & Zweymüller, K. (2003). Four-year study of cobalt and chromium blood levels in patients managed with two different metal-on-metal total hip replacements. *Journal of Orthopaedic Research*, *21*(2), 189–195. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00152-3)
30. Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, *8*(3), 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>
31. Linna, A., Uitti, J., Oksa, P., Toivio, P., Virtanen, V., Lindholm, H., Halkosaari, M., & Sauni, R. (2020). Effects of occupational cobalt exposure on the heart in the production of cobalt and cobalt compounds: a 6-year follow-up. *International*

*Archives of Occupational and Environmental Health*, 93(3), 365–374.  
<https://doi.org/10.1007/s00420-019-01488-3>

32. Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipický, T., & Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(6), 963–975.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010>
33. Muñoz-Sánchez, J., & Chánez-Cárdenas, M. E. (2019). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *Journal of Applied Toxicology*, 39(4), 556–570.  
<https://doi.org/10.1002/jat.3749>
34. Onódi, Z., Visnovitz, T., Kiss, B., Hambalkó, S., Koncz, A., Ágg, B., Váradi, B., Tóth, V. É., Nagy, R. N., Gergely, T. G., Gergő, D., Makkos, A., Pelyhe, C., Varga, N., Reé, D., Apáti, Á., Leszek, P., Kovács, T., Nagy, N., ... Varga, Z. v. (2022). Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 165, 19–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.12.007>
35. Oyagbemi, A. A., Omobowale, T. O., Ola-Davies, O. E., Asenuga, E. R., Ajibade, T. O., Adejumobi, O. A., Arojoye, O. A., Afolabi, J. M., Ogunpolu, B. S., Falayi, O. O., Hassan, F. O., Ochigbo, G. O., Saba, A. B., Adedapo, A. A., & Yakubu, M. A. (2018). Quercetin attenuates hypertension induced by sodium fluoride via reduction in oxidative stress and modulation of HSP 70/ERK/PPAR $\gamma$  signaling pathways. *BioFactors*, 44(5), 465–479. <https://doi.org/10.1002/biof.1445>
36. Packer, M. (2016). Cobalt Cardiomyopathy. *Circulation: Heart Failure*, 9(12).  
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003604>
37. Papakyriakopoulou, P., Velidakis, N., Khattab, E., Valsami, G., Korakianitis, I., & Kadoglou, N. P. (2022). Potential Pharmaceutical Applications of Quercetin in Cardiovascular Diseases. *Pharmaceuticals*, 15(8), 1019.  
<https://doi.org/10.3390/ph15081019>

38. Paustenbach, D. J., Tvermoes, B. E., Unice, K. M., Finley, B. L., & Kerger, B. D. (2013). A review of the health hazards posed by cobalt. *Critical Reviews in Toxicology*, 43(4), 316–362. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.779633>
39. Pelclova, D., Sklensky, M., Janicek, P., & Lach, K. (2012). Severe cobalt intoxication following hip replacement revision: Clinical features and outcome. *Clinical Toxicology*, 50(4), 262–265. <https://doi.org/10.3109/15563650.2012.670244>
40. Pereira, S. L., Ramalho-Santos, J., Branco, A. F., Sardão, V. A., Oliveira, P. J., & Carvalho, R. A. (2011). Metabolic Remodeling During H9c2 Myoblast Differentiation: Relevance for In Vitro Toxicity Studies. *Cardiovascular Toxicology*, 11(2), 180–190. <https://doi.org/10.1007/s12012-011-9112-4>
41. Qi, W., Qi, W., Xiong, D., & Long, M. (2022). Quercetin: Its Antioxidant Mechanism, Antibacterial Properties and Potential Application in Prevention and Control of Toxipathy. *Molecules*, 27(19), 6545. <https://doi.org/10.3390/molecules27196545>
42. Rana, N. K., Singh, P., & Koch, B. (2019). CoCl<sub>2</sub> simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis. *Biological Research*, 52(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0221-z>
43. Rodrigo, R., Retamal, C., Schupper, D., Vergara-Hernández, D., Saha, S., Profumo, E., Buttari, B., & Saso, L. (2022). Antioxidant Cardioprotection against Reperfusion Injury: Potential Therapeutic Roles of Resveratrol and Quercetin. *Molecules*, 27(8), 2564. <https://doi.org/10.3390/molecules27082564>
44. Rottenbornová, L. (2023). *Hodnocení markerů senescence u h9c2 buněčné linie po expozici kobaltem.*
45. Simonsen, L. O., Harbak, H., & Bennekou, P. (2012). Cobalt metabolism and toxicology—A brief update. *Science of The Total Environment*, 432, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.009>

46. Singh, P., Arif, Y., Bajguz, A., & Hayat, S. (2021). The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *166*, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.023>
47. Terao, J. (2017). Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochemical Pharmacology*, *139*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.021>
48. Tripathi, A., Kumar, B., & Sagi, S. S. K. (2019). Prophylactic efficacy of Quercetin in ameliorating the hypoxia induced vascular leakage in lungs of rats. *PLOS ONE*, *14*(6), e0219075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219075>
49. Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A.-H., & Jaremko, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, *25*(22), 5243. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>
50. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
51. Vejtlupková Jana, Cikrt Miroslav, Fialová Jarmila, Filipová Jarmila, Kasl Zdeněk, Klener Vladislav, Kohout Josef, Lebedová Jindřiška, Lukáš Edgar, Macháčková Jiřina, Okrouhlík Bohumil, Pelclová Daniela, Pícková Jana, Richtr Milan, Sklenský Bohuslav, Slepíčka Jiří, Spáčilová Maria, & Šalandová Jana. (1995). *Nemoci z povolání (Pracovní lékařství -klinická část)*.
52. Zhang, X., Li, P., Guo, S., Wang, S., & Liu, D. (2018). Quantitation of  $\beta$ -carboline and quercetin in alligator weed (&lt;i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart.) Griseb.) by LC-MS/MS and evaluation of cardioprotective effects of the methanol extracts. *Drug Discoveries & Therapeutics*, *12*(6), 341–346. <https://doi.org/10.5582/ddt.2018.01070>
53. Zhou, Y., Suo, W., Zhang, X., Lv, J., Liu, Z., & Liu, R. (2022). Roles and mechanisms of quercetin on cardiac arrhythmia: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *153*, 113447. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113447>