

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**STUDIUM PROTEKTIVNÍCH VLASTNOSTÍ SÉRIE NOVÝCH  
AROYLHYDRAZONOVÝCH CHELÁTORŮ IONTŮ ŽELEZA  
PŘED POŠKOZENÍM SRDEČNÍCH BUNĚK OXIDAČNÍM  
STRESEM**

Diplomová práce



Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Pavlína Hašková, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Kateřina Pravdíková

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D. a konzultantce RNDr. Pavlíně Haškové, Ph.D. za trpělivé vedení a dobré rady při vypracování této diplomové práce. Dále pak Mgr. Elišce Mackové, Mgr. Haně Jansové, Mgr. Kateřině Hruškové za pomoc a rady v průběhu experimentů a v neposlední řadě také děkuji ostatním zaměstnancům a studentům na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Také děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy za finanční podporu (grant GA UK 367911).

Hradec Králové, 2013

Kateřina Pravdíková

**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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.**

**Souhlasím, aby byla práce půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.**

Hradec Králové, 2013

Kateřina Pravdíková

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

Kandidát: Kateřina Pravdíková  
Školitel: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.  
Název diplomové práce: Studium protektivních vlastností série nových aroylhydrazonových chelátorů iontů železa před poškozením srdečních buněk oxidačním stresem.

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů. Při tomto ději dochází prostřednictvím Haber-Weissovy reakce, kde se jako katalyzátor účastní redoxně aktivní železo, k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Ty hrají významnou roli v patogenezi mnoha onemocnění včetně kardiovaskulárních. Po objasnění úlohy železa v těchto dějích se pozornost zaměřila na chelátory železa. Jejich užití pomáhá odstranit volné ionty železa, které tak nemohou katalyzovat radikálové reakce, což vede k zamezení dalšího rozvoje oxidačního poškození myokardu.

Cílem této práce bylo studium kardioprotektivních účinků nově syntetizovaných aroylhydrazonových derivátů chelátoru železa SIH proti toxickému působení peroxidu vodíku *in vitro*. Zkoumána byla také jejich vlastní toxicita.

K hodnocení protektivních i toxických účinků jednotlivých chelátorů byla použita buněčná linie H9c2 odvozená od potkaních embryonálních srdečních myoblastů. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí testu viability buněk založeného na vychytávání neutrální červeně živými buňkami. K fotografické dokumentaci byla použita fluorescenční mikroskopie buněk barvených fluorescenční sondou JC-1.

Výsledky ukázaly, že redukované deriváty rSIH, rHAPI a rHPPI nemají žádné kardioprotektivní účinky. Naopak chelátory BHPPI, 2API a 7HII vykazovaly při srovnání s referenčním chelátorem SIH lepší kardioprotektivní účinky. Ovšem vlastní toxicita všech těchto látek byla ve srovnání se SIH vyšší. Při porovnání poměru cytoprotektivní účinnosti a vlastní toxicity žádný zkoušený chelátor nevykazoval lepší poměr než referenční chelátor SIH.

Nicméně tato práce přináší řadu poznatků, které poslouží jako zpětná vazba kolegům v chemické laboratoři při plánování syntéz dalších perspektivních derivátů.

## ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kateřina Pravdíková  
Supervisor: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.  
Title of diploma thesis: Study of the protective properties of the series of novel aroylhydrazone iron chelators against the oxidative stress-induced cardiomyocyte injury.

Oxidative stress is an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of oxidants. In this process occurs the formation of reactive oxygen species (ROS) via the Haber-Weiss reaction, where a redox-active iron participates as the catalyst. ROS play an important role in the pathogenesis of many diseases, including cardiovascular diseases. After clarifying the role of iron in these processes, attention has focused on iron chelators. They may remove free iron ions, which thus cannot catalyze radical reactions, and prevent further development of oxidative damage to the myocardium.

The aim of this work was to study the cardioprotective effects of newly synthesized aroylhydrazone derivatives of iron chelator SIH against the toxic effects of hydrogen peroxide *in vitro*. Their own toxicities were also examined.

H9c2 cell line derived from rat embryonic cardiac myoblasts was used for evaluation of the protective and toxic effects of chelators. The evaluation was done using a cell viability assay based on the uptake of neutral red by living cells. Fluorescence microscopy was used for photographic documentation of stained cells with fluorescent probe JC-1.

The results showed that the reduced derivatives rSIH, rHAPI and rHPPI do not possess any cardioprotective effects. On the contrary, chelators BHPPI, 2API and 7HII showed better cardioprotective effects in comparison to reference chelator SIH. However, the inherent toxicity of these compounds was higher than of SIH. There was no tested chelator with a better ratio of cytoprotective effect and inherent toxicity than the reference chelator SIH.

However, this work brings a lot of findings that serve as feedback for colleagues in the chemical laboratory in planning syntheses of other promising derivatives.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Současný stav řešené problematiky</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1. Kyslík</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2. Reaktivní formy kyslíku</b> .....	<b>11</b>
2.2.1 Volné radikály .....	12
2.2.1.1 Superoxidový radikál .....	12
2.2.1.2 Hydroxylový radikál.....	13
2.2.1.3 Hydroperoxylový radikál.....	13
2.2.1.4 Peroxylové a alkoxylové radikály.....	14
2.2.2 Sloučeniny neradikálového typu .....	14
2.2.2.1 Singletový kyslík.....	14
2.2.2.2 Peroxid vodíku.....	14
2.2.2.3 Ozón.....	15
2.2.2.4 Kyselina chlorná.....	15
2.2.3 Zdroje ROS .....	16
<b>2.3. Oxidační stres</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Fentonova reakce.....	18
2.3.2 Haber-Weissova reakce .....	19
<b>2.4. Železo</b> .....	<b>20</b>
2.4.1 Vstřebávání železa.....	21
2.4.2 Transport železa .....	23
2.4.3 Vstup do buňky .....	23
2.4.4. Skladování.....	24
2.4.5 Regulace homeostázy železa.....	25
2.4.6 Vylučování .....	25
<b>2.5 Chelátory železa</b> .....	<b>26</b>
2.5.1 Siderofory .....	26
2.5.1.1 Desferrioxamin .....	26
2.5.1.2 Desferrithiocin a desferri-exocheliny .....	27
2.5.2 Syntetické chelátory železa .....	28
2.5.2.1 Deferasirox.....	28
2.5.2.2 Deferipron.....	29
2.5.2.3 Tachpyridin .....	30

2.5.2.4 Aroylhydrazony.....	30
2.5.2.4.1 PIH a analogy.....	30
2.5.2.4.2 SIH a analogy.....	31
2.5.2.4.3 NIH a analogy.....	32
2.5.2.4.4 PCIH, PKIH a jejich analogy.....	32
2.5.2.5 Thiosemikarbazony.....	33
2.5.2.5.1 Triapin.....	33
2.5.2.6 Hybridní chelátory odvozené od thiosemikarbazonů a aroylhydrazonů.....	34
<b>2.6 Prochelátory železa.....</b>	<b>35</b>
<b><u>3. Cíle práce.....</u></b>	<b>37</b>
<b><u>4. Materiál a metodiky.....</u></b>	<b>38</b>
<b>4.1 Materiál.....</b>	<b>38</b>
4.1.1 Přístrojové vybavení.....	38
4.1.1.1 Zařízení pro sterilní práci a kultivaci buněčných linií.....	38
4.1.1.2 Čtečka 96-jamkových mikrotitračních destiček.....	39
4.1.1.3 Ostatní laboratorní vybavení.....	39
4.1.2 Reagencie a chemikálie.....	39
<b>4.2 Metodiky.....</b>	<b>42</b>
4.2.1 Buněčná linie H9c2.....	42
4.2.1.1 Kultivace.....	42
4.2.1.2 Pasážování.....	42
4.2.1.3 Počítání buněk.....	43
4.2.1.4 Studium kardioprotektivních účinků testovaných látek.....	43
4.2.1.4.1 Schéma pokusů.....	43
4.2.1.4.2 Roztoky přidávané k buňkám před 24 hodinovou inkubací.....	44
4.2.1.4.3 Zásobní roztoky.....	45
4.2.1.5 Studium kardiotoxických účinků testovaných látek.....	46
4.2.1.5.1 Schéma pokusů.....	46
4.2.1.5.2 Roztoky přidávané k buňkám před 72 hodinovou inkubací.....	46
4.2.1.5.3 Zásobní roztoky.....	47
4.2.2 Vyhodnocení pokusů.....	47
4.2.2.1 Test vychytávání neutrální červeně.....	47
4.2.2.1.1 Roztoky potřebné při vyhodnocení.....	48
4.2.2.2 Fotografická dokumentace.....	48
4.2.2.2.1 Fluorescenční barvení mitochondrií.....	48

4.2.3 Statistické zpracování dat.....	49
<b><u>5. Výsledky</u></b> .....	<b>50</b>
<b><i>5.1 Úvodní experimenty</i></b> .....	<b>50</b>
5.1.1 Toxicita peroxidu vodíku .....	50
5.1.2 Kardioprotektivní účinky referenčního chelátoru železa SIH .....	51
5.1.3 Kardiotoxické účinky referenčního chelátoru železa SIH.....	52
<b><i>5.2 Studium kardioprotektivních účinků nových derivátů</i></b> .....	<b>53</b>
5.2.1 Studium kardioprotektivních účinků rSIH.....	53
5.2.2 Studium kardioprotektivních účinků rHAPI .....	54
5.2.3 Studium kardioprotektivních účinků rHPPI.....	55
5.2.4 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa BHAPI .....	56
5.2.5 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa BHPPI.....	57
5.2.6 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa 2API.....	58
5.2.7 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa 7HII.....	59
5.2.8 Studium kardioprotektivních účinků H16.....	60
5.2.9 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa H18 .....	61
5.2.10 Srovnání kardioprotektivních účinků zkoušených látek .....	62
<b><i>5.3 Studium kardiotoxických účinků nových derivátů</i></b> .....	<b>63</b>
5.3.1 Studium kardiotoxických účinků rSIH .....	63
5.3.2 Studium kardiotoxických účinků rHAPI.....	64
5.3.3 Studium kardiotoxických účinků rHPPI.....	65
5.3.4 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa BHAPI.....	66
5.3.5 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa BHPPI .....	67
5.3.6 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa 2API .....	68
5.3.7 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa 7HII.....	69
5.3.8 Studium kardiotoxických účinků H16 .....	70
5.3.9 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa H18.....	71
<b><u>6. Diskuze</u></b> .....	<b>72</b>
<b><u>7. Závěry</u></b> .....	<b>82</b>
<b><u>8. Seznam zkratk</u></b> .....	<b>83</b>
<b><u>9. Literatura</u></b> .....	<b>86</b>



## **1. Úvod**

Tato práce je součástí širšího výzkumu prováděného na Farmaceutické fakultě UK, který se zabývá možnostmi farmakologické ochrany srdečních buněk před působením oxidačního stresu.

Cílem této diplomové práce bylo úvodní studium nových aroylhydrazonových chelátorů železa syntetizovaných na katedře anorganické a organické chemie FaF UK. Toto studium bylo prováděno v podmínkách *in vitro* na buněčné linii H9c2 odvozené od potkaních embryonálních srdečních myoblastů a jeho záměrem bylo vytipovat zajímavé a nadějně látky pro další studium a pro potenciální využití v terapii srdečních onemocnění se známou nebo předpokládanou rolí oxidačního stresu a přinést zpětnou vazbu kolegům z chemického pracoviště pro syntézy dalších látek.

## **2. Současný stav řešené problematiky**

### **2.1. Kyslík**

Kyslík je nejrozšířenějším prvkem v přírodě. Existuje ve dvou alotropických formách. Atmosférický kyslík tvoří dvojjatomové molekuly O<sub>2</sub>, které nás obklopují. Druhou alotropickou formou je ozón (viz 2.2.2.3). Kyslík se vyskytuje v několika přírodních izotopech. Nejhojnějším je <sup>16</sup>O a v minimální míře se vyskytují <sup>17</sup>O a <sup>18</sup>O (Krätsmár-Šmogrovič 2007, Rayner-Canham a Overton 2006).

Skoro všechny organismy, s výjimkou některých anaerobních a aerotolerantních, potřebují kyslík. Využívají jej pro efektivní výrobu energie pomocí elektronových transportních řetězců, jako jsou ty v mitochondriích eukaryotních buněk a buněčných membránách mnoha bakterií (Halliwell a Gutteridge 2007).

Mnohobuněčné organismy, včetně savců, mají vyvinuty mechanismy, které zajišťují, aby byl kyslík doručen ke všem buňkám, které jej potřebují. Malé množství O<sub>2</sub> může cestovat rozpuštěno v krevní plazmě. Toto množství je limitováno rozpustností kyslíku ve vodném prostředí při tělesné teplotě. Zbylý kyslík je přenášen pomocí přenašečů (Halliwell a Gutteridge 2007).

Globiny jsou malé respirační proteiny, které reverzibilně váží a přenášejí O<sub>2</sub> prostřednictvím porfyrinového kruhu obsahujícího železo. Většina globinů se podílí na udržení přísunu kyslíku do aerobního metabolismu respiračního řetězce, i když jsou jim také připisovány enzymatické funkce (Brunori a Gibson 2001, Flögel et al. 2001, Minning et al. 1999, Pesce et al. 2003).

Hemoglobin (Hb) transportuje kyslík v oběhovém systému. Myoglobin (Mb) se nachází v srdci a v příčně pruhovaných svalech, kde usnadňuje šíření O<sub>2</sub>. Neuroglobin (Nb) zásobuje kyslíkem nervovou tkáň (Halliwell a Gutteridge 2007, Pesce et al. 2003, Rokyta 2000).

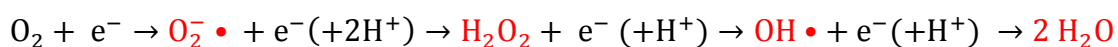
I když je kyslík biogenním prvkem a jeho přítomnost je nezbytná pro existenci většiny živých organismů na této planetě, má i mnoho toxických účinků (Halliwell a Gutteridge 1984).

## 2.2. Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou sloučeniny odvozeny od molekulárního kyslíku, které zahrnují nejen volné kyslíkové radikály, ale také sloučeniny neradikálového typu (viz Tab. 2.1.) (Battino et al. 1999, Circu a Aw 2010, Turrens 2003).

Biradikální molekulární kyslík má dva nepárové elektrony lokalizované v různých  $\pi^*$  antivazebných orbitalech. Tyto elektrony mají stejný spin, a kyslík tak může přijímat elektrony pouze po jednom (Halliwell a Gutteridge 2007). Z toho vyplývá, že kyslík není příliš reaktivní. Situace se změní, pokud dojde k excitaci jednoho z těchto dvou elektronů. Excitovaný elektron změni svůj spin, čímž vzniká silný a rychle reagující oxidant (dva elektrony s odlišným spinem jsou schopny snadno reagovat s jinými páry elektronů především ve dvojné vazbě) (Turrens 2003).

Redukce molekulárního kyslíku probíhá ve čtyřech krocích, během kterých vznikají různé reaktivní formy kyslíku:



(Galaris a Pantopoulos 2008)

Radikály	Neradikály
Superoxidový radikál $\text{O}_2^- \cdot$	Singletový kyslík $^1\text{O}_2$
Hydroxylový radikál $\text{OH} \cdot$	Peroxid vodíku $\text{H}_2\text{O}_2$
Hydroperoxylový radikál $\text{HO}_2 \cdot$	Ozón $\text{O}_3$
Peroxylový radikál $\text{RO}_2 \cdot$	Kyselina chlorná $\text{HOCl}$
Alkoxylový radikál $\text{RO} \cdot$	
Aryloxylový radikál $\text{ArO} \cdot$	
Arylperoxylový radikál $\text{ArO}_2 \cdot$	
Acyloxylový radikál $\text{RCO}_2 \cdot$	
Acyloxylový radikál $\text{RCO}_3 \cdot$	

Tab. 2.1. Reaktivní formy kyslíku (Battino et al. 1999).

## 2.2.1 Volné radikály

Volné radikály (VR) jsou definovány jako částice, které mají jeden nebo více nepárových elektronů (Halliwell a Gutteridge 2007). Mohou být pozitivně či negativně nabitě, nebo elektricky neutrální (Battino et al. 1999).

Radikály mohou vznikat různými způsoby. Ztrátou jednoho elektronu z neradikálu (kation-radikál), nebo naopak přijetím elektronu (anion-radikál). Také mohou vznikat homolytickým štěpením kovalentní vazby – jeden elektron z vazebného páru zůstává každému atomu. Energie potřebná pro rozštěpení kovalentní vazby je získávána teplem, UV zářením či ionizujícím zářením. VR také mohou vznikat procesem zvaným vakuové vymrazování neboli lyofilizace (Halliwell a Gutteridge 2007).

Chemická reaktivita volných radikálů se vzájemně velmi liší (Halliwell a Gutteridge 2007).

### 2.2.1.1 Superoxidový radikál

Superoxidový anion-radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ) vzniká přidáním jednoho elektronu do základního stavu kyslíku. Jedná se o prekurzor většiny ROS a je prostředníkem při oxidačních řetězových reakcích (Turrens 2003). Jeho poločas je přibližně 2-4  $\mu s$  (Dat et al. 2000).

$O_2^{\cdot-}$  je tvořen téměř ve všech aerobních buňkách. Jedním z důležitých zdrojů je respirační vzplanutí fagocytů, poté co odhalí cizí částice nebo imunitní komplexy. Při tomto vzplanutí dochází k aktivaci NADPH oxidázy, která katalyzuje vznik superoxidu. Mezi fagocytující buňky, které vytváří  $O_2^{\cdot-}$ , patří neutrofilů, monocytů, makrofágů a eozinofilů (Halliwell a Gutteridge 1984, Turrens 2003). Superoxid také může vznikat díky proteolytické konverzi xantindehydrogenázy na xantinoxidázu či působením cytochrom P450-dependentní oxygenázy. Mimo tyto enzymatické reakce může vznikat i neenzymaticky (Turrens 2003).

Reakcí s druhým  $O_2^{\cdot-}$  poskytuje další ROS. Dismutací vzniká peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), přijetím elektronu vzniká peroxidový aniont, který se může dále měnit na kyslíkový aniont ( $O^{2-}$ ) (Halliwell a Gutteridge 2007, Turrens 2003).  $O_2^{\cdot-}$  také může přijmout proton za vzniku hydroperoxylového radikálu ( $HO_2^{\cdot}$ ) (Battino et al. 1999). Kromě toho může  $O_2^{\cdot-}$  reagovat s dalšími radikály, mezi které patří oxid dusnatý ( $NO^{\cdot}$ ). Touto reakcí vzniká peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), který je také velmi silný oxidant (Turrens

2003), je však považován za méně reaktivní než peroxidy (Dat et al. 2000). Pro oxidanty obsahující dusík, které jsou odvozené od  $\text{NO}\bullet$  se používá označení reaktivní formy dusíku (RNS) (Turrens 2003).

Superoxidový radikál může oxidovat některé aminokyseliny (histidin, methionin a tryptofan). Také je zodpovědný za peroxidaci lipidů, která způsobuje oslabení membrán (Dat et al. 2000).

### **2.2.1.2 Hydroxylový radikál**

Homolytickým štěpením vazby O-O v peroxidu vodíku vzniká hydroxylový radikál ( $\text{HO}\bullet$ ). Tato reakce může být katalyzována teplem, ionizujícím zářením nebo přítomností některých kovů jako je železo či měď. Dalšími zdroji hydroxylového radikálu jsou ozón (ve vodném roztoku se rozkládá za vzniku  $\text{HO}\bullet$ ), peroxyinitrit, kyselina chlorná (reakcí s  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), ultrazvuk (vodné roztoky jsou vystaveny procesu zvanému akustická kavitace, a tím se získá potřebná energie k homolytickému štěpení vody). Také chinony a semichinony mohou produkovat  $\text{HO}\bullet$  z peroxidu vodíku (Halliwell a Gutteridge 2007).

Hydroxylový radikál má velmi krátký poločas, který je menší než 1  $\mu\text{s}$  (Dat et al. 2000). Extrémně rychle reaguje s téměř každým typem molekuly nacházejícím se v živých buňkách, který se ocitne v jeho blízkosti (Halliwell a Gutteridge 1984). Může poškodit DNA prostřednictvím reakcí s bazemi. S guaninem vytváří 8-oxo-7,8-dihydro-20-deoxyguanosin (8-oxo-dG), který je dobrý ukazatel oxidačního poškození. Také poškozuje buněčné membrány reakcí s lipidy (Valko et al. 2005).

Jeho reakce se mohou rozdělit na tři typy - dehydrogenace, adice a přenos elektronu (Halliwell a Gutteridge 2007).

### **2.2.1.3 Hydroperoxylový radikál**

Vzniká reakcí superoxidového radikálu s  $\text{H}^+$ . V porovnání se superoxidem je mnohem silnější oxidační činidlo. Díky tomu, že nenesení žádný náboj, by měl prostupovat snadněji membránami (na rozdíl od  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Tato skutečnost naznačuje, že má potenciál způsobovat poškození buněk (Halliwell a Gutteridge 2007).

#### **2.2.1.4 Peroxylové a alkoxylové radikály**

Peroxylové ( $\text{RO}_2\bullet$ ) a alkoxylové ( $\text{RO}\bullet$ ) radikály jsou obvykle dobrými oxidačními činidly (Halliwell a Gutteridge 2007).  $\text{RO}_2\bullet$  jsou méně reaktivní a více selektivní než  $\text{OH}\bullet$  (Pierrefiche a Laborit 1995).

Peroxylové radikály mohou vznikat reakcí uhlíkových radikálů ( $\text{R}\bullet$ ) s kyslíkem či hydroperoxylového radikálu s peroxidy. Při této reakci kromě  $\text{RO}_2\bullet$  vzniká i peroxid vodíku. Jiným způsobem vedoucím k jejich tvorbě je reakce alkoxylových radikálů, kde dochází k odtržení  $\text{H}\bullet$  z peroxidů. Také  $\text{Fe}^{3+}$  a některé jeho cheláty mohou rozložit peroxidy na peroxylový radikál (Halliwell a Gutteridge 2007).

Alkoxylové radikály jsou tvořeny rozkladem organických peroxidů ( $\text{ROOH}$ ) či produkovány substituovanými N-hydroxypyridony (Halliwell a Gutteridge 2007).

### **2.2.2 Sloučeniny neradikálového typu**

#### **2.2.2.1 Singletový kyslík**

Singletový kyslík je reaktivnější forma kyslíku, která má větší oxidační účinky. Toho bylo dosaženo excitací jednoho elektronu a změnou spinu, a tím byla odstraněna spinová restrikce (Halliwell a Gutteridge 2007, Turrens 2003). Této excitace lze dosáhnout pomocí některých látek (chlorofyl, retinal, flavonoidy, porfyriny) fotosenzitizační reakcí. Singletový kyslík nemá žádné nepárové elektrony – nejedná se tedy o volný radikál (Halliwell a Gutteridge 2007, Martínez-Cayuela 1995).

#### **2.2.2.2 Peroxid vodíku**

Peroxid vodíku je téměř bezbarvá lehce namodralá vysoce viskózní kapalina. Je extrémně korozivní (Rayner-Canham a Overton 2006).

Přidáním druhého elektronu na superoxidový anion vzniká peroxidový anion ( $\text{O}_2^{2-}$ ), který nemá žádné nepárové elektrony a není tedy volným radikálem (Battino et al. 1999). Jakýkoli  $\text{O}_2^{2-}$  vytvořený při fyziologickém pH bude okamžitě protonován za vzniku peroxidu vodíku. Ve vodném roztoku  $\text{O}_2\bullet^-$  podstupuje dismutaci za vzniku  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$ . Tato reakce probíhá spontánně nebo je katalyzovaná superoxidodismutázou (SOD). Rychlost dismutace je větší při kyselém pH (Halliwell a Gutteridge 1984). Takto vzniklý peroxid vodíku může být plně redukován na vodu nebo jen částečně na hydroxylový radikál (Turrens 2003). Také v přítomnosti iontů přechodných kovů se snadno rozkládá a produkuje hydroxylový radikál skrze Haber-Weissovu či Fentonovu

reakci (Battino et al. 1999, Dat et al. 2000, Turrens 2003). Peroxid vodíku může také vznikat činností některých enzymů, jako je například monoaminoxidáza (MAO), xantinoxidáza (XO) a urát oxidáza (Halliwell a Gutteridge 2007). Poločas peroxidu vodíku je 1 ms (Dat et al. 2000).

Peroxid vodíku volně prochází pomocí akvaporinů přes biologické membrány, a díky delšímu poločasu tak může napadat i místa vzdálenější od svého vzniku (Dat et al. 2000, Halliwell a Gutteridge 2007). V rozmezí koncentrací 10-100  $\mu\text{M}$  způsobuje  $\text{H}_2\text{O}_2$  stárnutí nebo apoptózu. Při nižších koncentracích může podpořit proliferaci některých buněk a naopak při vyšších koncentracích potlačuje apoptózu a podněcuje nekrózu (Halliwell a Gutteridge 2007).

### **2.2.2.3 Ozón**

Ozón ( $\text{O}_3$ ) je druhá alotropní modifikace kyslíku (viz 2.1). Jedná se o tříatomovou molekulu, která se vyskytuje ve formě plynu. Tento plyn je velmi dráždivý, má charakteristický pronikavý zápach, který může být rozpoznán v koncentraci tak nízké jako 0,01 ppm (Krätsmár-Šmogrovič 2007).

I když se jedná většinou o exogenní látku, může být generována i *in vivo* v aterosklerotickém plátu při ozónolýze cholesterolu (Halliwell a Gutteridge 2007).

Již při nízkých koncentracích jako je 0,5 ppm může exogenní ozón způsobit ztrátu plicních řasinkových buněk a pneumocytů I. typu. Tato poškození nastávají již během pár hodin. Dále v plicích způsobuje zánět, aktivuje makrofágy a přitahuje do plic neutrofilů, které pak vytváří další ROS a jsou dalším zdrojem oxidačního stresu. Kromě toho ozón dráždí i další orgány jako je kůže a oči tím, že oxiduje proteiny a lipidy (Halliwell a Gutteridge 2007).

### **2.2.2.4 Kyselina chlorná**

Kyselina chlorná HOCl je slabá kyselina (Halliwell a Gutteridge 2007) produkována enzymem myeloperoxidázou (MPO), který je obsažen v azurofilních granulích neutrofilních granulocytů a v lyzozomech monocytů. HOCl je až padesátkrát účinnější v zabíjení mikrobů než peroxid vodíku (Racek 2008).

Patří mezi silná oxidační činidla s vysokou reaktivitou a schopností poškozovat biomolekuly jak přímo, tak rozpadem za tvorby chlóru (Halliwell a Gutteridge 2007).

Kyselina chlorná reaguje se superoxidovým radikálem nebo za přítomnosti železnatých ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iontů za vzniku  $\text{OH}\cdot$ , reakcí s peroxidem vodíku vzniká singletový kyslík (Halliwell a Gutteridge 2007, Racek 2008).

$\text{HOCl}$  oxiduje thiole, askorbát,  $\text{NAD(P)H}$  a DNA. Také může chlorovat DNA baze (především pyrimidinové) a tyrosinové zbytky v proteinech. To způsobuje poškození postranních řetězců, fragmentaci a agregaci proteinů. Také je považována za hlavní faktor, uplatňující se v oxidační modifikaci lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) s aterogenním účinkem (Racek 2008).

Může během sekund inaktivovat  $\alpha_1$ -antitrypsin tím, že napadne jeho methioninový zbytek a vytvoří methioninsulfoxid. Tím pádem nemůže  $\alpha_1$ -antitrypsin inhibovat některé proteolytické enzymy (například elastázu) a dochází k závažnému poškození plic (emfyzém). Také inaktivuje antikoagulačně aktivní trombomodulin (opět reakcí na methioninu) a zvyšuje srážlivost krve (Halliwell a Gutteridge 2007).

### 2.2.3 Zdroje ROS

*In vivo* mohou volné radikály vznikat z různých zdrojů, mezi které patří například autooxidace, fotochemické a enzymatické reakce a může zahrnovat jak exogenní sloučeniny, tak xenobiotika (Kehrer 2000).

Mezi enzymy schopné generovat ROS patří cytochrom P450, různé oxidázy, peroxidázy, lipooxygenázy a dehydrogenázy. Zapojení xenobiotik může být zvláště důležité při určování rozsahu tvorby ROS generovanými těmito enzymy. Například různé chinony mohou podstoupit redoxní cyklení a generovat velké množství ROS, aniž by byly samy degradovány.  $\text{NADPH}$  oxidáza je dobře známá jako zdroj ROS, což je součást její antibakteriální funkce ve fagocytujících buňkách. Na druhou stranu je tento enzym přítomen i v dalších buňkách a má důležitou roli při transdukcí signálu (Kehrer 2000).

Co se týče buněčných kompartmentů, produkce těchto reaktivních forem byla identifikována v cytosolu, peroxisomech, plazmě a membránách endoplazmatického retikula i matrix a membránách mitochondrií (Venditti et al. 2013).

Hlavními místy produkce ROS jsou v mitochondriích komplexy I a III. Nedávno byla prokázána produkce ROS i v komplexu II u hlístice *Ascaris suum* a u potkana. Kromě toho bylo také prokázáno, že podstatná část produkce  $\text{H}_2\text{O}_2$ , obvykle přičítána mitochondriální glycerol-3-fosfátdehydrogenáze (mGPDH), pochází z elektronového toku do komplexu II.  $\text{FAD}$ , chinonový (Q) pool u *A. suum* a flavinová síť u potkanů



v mitochondriích v komplexu II (za přítomnosti sukcinátu) byly navrženy jako zdroj ROS (Venditti et al. 2013).

## 2.3. Oxidační stres

ROS jsou průběžně produkovány buňkami a také průběžně odstraňovány specifickými buněčnými enzymatickými systémy. Tento dynamický stav se výrazně liší u různých druhů buněk a zároveň v různých kompartmentech jedné buňky, stejně jako míra jejich odstraňování. Jakmile hladiny ROS překročí určitý práh, projeví se jejich škodlivé účinky a stávají se nebezpečnými pro buněčnou integritu (Galaris a Pantopoulos 2008).

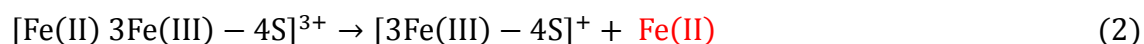
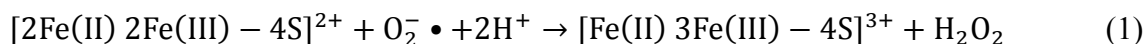
Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů, která může potenciálně vést k závažnému poškození buněk. Oxidanty jsou tvořeny jako normální produkty aerobního metabolismu, ale také mohou být produkovány ve zvýšené míře za patofyziologických podmínek (Sies 1997).

Klíčového hráče určujícího konečný výsledek účinků vyvolaných ROS představuje železo (Galaris a Pantopoulos 2008).

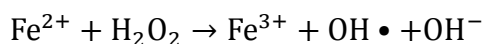
### 2.3.1 Fentonova reakce

Téměř ve všech případech souvisejících s oxidačním stresem je počátečním reaktivním meziproduktem  $O_2^{\cdot-}$ , který je převeden na  $H_2O_2$ . Ani jeden z nich není silným oxidačním činidlem a jedinými intracelulárními cíly, se kterými mohou obvykle přímo interagovat, jsou železo nebo molekuly obsahující železo (Galaris a Pantopoulos 2008).

Superoxid je schopný reagovat s proteiny obsahujícími Fe-S centra (zejména 4Fe-4S) se souběžným uvolňováním železa a inaktivací těchto proteinů (Galaris a Pantopoulos 2008). Inaktivace těchto proteinů je rychlý proces a vede k oxidaci Fe-S klastrů (1), ze kterých se pak uvolňuje  $Fe^{2+}$ , které už není tak silně vázáno (2) (Jomova a Valko 2011).

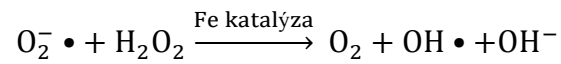


Pokud jsou k dispozici redoxně aktivní ionty železa, může probíhat Fentonova reakce, při které vznikají extrémně reaktivní  $HO^{\cdot}$  (Galaris a Pantopoulos 2008, Kalinowski a Richardson 2005).

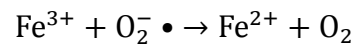


### 2.3.2 Haber-Weissova reakce

Při tomto ději reaguje peroxid vodíku se superoxidem za katalýzy železem (Kalinowski a Richardson 2005).



Tato reakce je kombinací Fentonovy reakce a redukce železitých iontů pomocí superoxidu (Jomova a Valko 2011).



Ačkoliv jsou i jiné přechodné kovy schopny katalyzovat Haber-Weissovu reakci, právě katalýza železem je považována za hlavní mechanismus, kterým vzniká škodlivý HO• v biologických systémech (Kehrer 2000).

## 2.4. Železo

Železo (Fe) je čtvrtý nejhojnější prvek na Zemi (Halliwell a Gutteridge 2007). Má zásadní roli v buněčném růstu a replikaci díky tomu, že mnoho proteinů obsahujících železo ve své molekule katalyzuje klíčové reakce spojené s energetickým metabolismem (cytochromy, mitochondriální akonitáza, Fe-S proteiny elektronového transportního řetězce), dýcháním (hemoglobin a myoglobin) a syntézou DNA (ribonukleotidreduktáza) (Richardson a Ponka 1997).

Biologické funkce železa jsou založeny na jeho chemických vlastnostech (například tvoří různé koordinační sloučeniny s organickými ligandy a má vhodný redoxní potenciál) (Galey 2001, Papanikolaou a Pantopoulos 2005). Na druhé straně má ale také schopnost katalyzovat tvorbu reaktivních radikálů. Buňky musí udržovat koncentrace volného železa tak nízké, jak je to jen možné, aby se zabránilo tvorbě těchto radikálů, které vedou k poškození DNA, peroxidaci lipidů a mnoha dalším toxickým efektům (Galey 2001, Valko et al. 2005).

V živé hmotě existuje železo ve dvou stabilních oxidačních stavech jako železnaté ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a železité ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ionty (Arredondo a Núñez 2005). Při fyziologickém pH je  $\text{Fe}^{2+}$  rozpustné, ale ve vodném prostředí je nestabilní a má tendenci reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku  $\text{Fe}^{3+}$  a superoxidu.  $\text{Fe}^{3+}$  má naopak nízkou rozpustnost ve vodě a precipituje ve formě hydroxidů  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (Valko et al. 2005, Jomova a Valko 2011). V důsledku toho je rozpustnost železa v oxidačním prostředí, jako je extracelulární tekutina, omezena součinem rozpustnosti  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (Arredondo a Núñez 2005). Z těchto poznatků vyplývá omezená biologická dostupnost železa (Papanikolaou a Pantopoulos 2005). V průběhu času se vyvinuly proteiny, které dokážou vázat  $\text{Fe}^{3+}$  tak, aby bylo termodynamicky stabilní, a zároveň dostupné pro biologické procesy (Arredondo a Núñez 2005).

Hladina železa je v biologických systémech přísně kontrolována transportními a skladovacími proteiny, aby se zabránilo nežádoucím radikálovým reakcím (Galey 2001). Obsah železa v organismu se pohybuje od 45 mg/kg u žen do 55 mg/kg u mužů, což celkově činí asi 3-5 g (Fontecave a Pierre 1993, Papanikolaou a Pantopoulos 2005). Zhruba 65 % z tohoto množství se nachází v hemoglobinu, zatímco myoglobin, cytochromy a jiné enzymy obsahující železo zaujímají dalších 10 %. 25 % železa je rozděleno mezi skladovací proteiny feritin a hemosiderin. Extracelulární transportní protein transferin obsahuje pouze 0,1 % železa (Jomova a Valko 2011).

Nedostatek železa je široce rozšířený stav, který postihuje přibližně 500 milionů lidí na celém světě (Valko et al. 2005). Nedostatek může vést k anémii, mentální retardaci u rostoucích dětí (poruchy myelinizace), poruchám dopaminergních drah či snížení imunity (Arredondo a Núñez 2005).

Naopak přetížení železem je méně časté. Jedná se o vady vstřebávání či dopravy železa nebo sekundární poruchy. Případy akutní toxicity jsou poměrně vzácné a souvisí s hepatotoxicitou. Chronická toxicita železa může být spojena s primární hemochromatózou (genetická porucha, při které je zvýšena absorpce železa ve střevech), vysokým příjmem železa v potravě nebo častými krevními transfuzemi. Vysoký obsah železa je spojován s několika patologickými stavy (onemocnění jater, srdeční choroby, rakovina, neurodegenerativní poruchy, diabetes, hormonální abnormality a abnormality imunitního systému) (Valko et al. 2005).

#### **2.4.1 Vstřebávání železa**

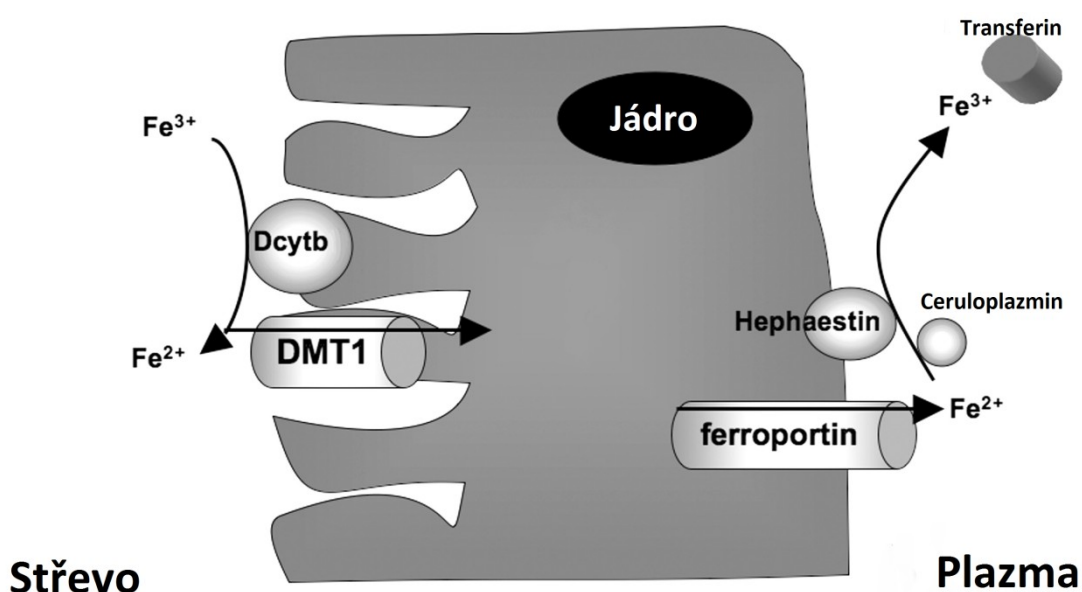
K absorpci do organismu dochází v tenkém střevě pomocí enterocytů. Ty mohou vstřebávat železo ve dvou formách – jako hemové, nebo nehemové anorganické (Kalinowski a Richardson 2005).

Vstřebávání hemového železa je odlišné od nehemového. Hem je vysoce biologicky dostupný zdroj železa a absorbuje se jako intaktní metaloporfyrin, který je méně ovlivněn lumenálními ligandy. Vstřebává se pomocí proteinu přenašejícího hem (HCP1). Jeho exprese je regulována transkripčně a posttranslačně. Vychytávání hemu zprostředkované HCP1 je závislé na teplotě a je saturabilní. Absorbovaný hem je degradován inducibilní hemoxygenázou (HO-1) za vzniku biliverdinu, oxidu uhelnatého a anorganického železa, které je uvolněno do cytosolu (Galaris a Pantopoulos 2008, Latunde-Dada et al. 2006).

Nehemové železo je transportováno přes buněčnou membránu enterocytů do cytosolu pomocí přenašeče divalentních iontů kovů 1 (DMT1; nebo také DCT1, Nramp2). Jak z názvu vyplývá, DMT1 může přenášet pouze dvojmocné ionty kovů. Protože anorganické železo nacházející se v potravě je ve formě nedostupných a nerozpustných železitých sloučenin, musí být před absorpcí redukováno na železnatou formu. K této redukci dochází duodenálním cytochromem b (Dcytb), který má ferrireduktázovou aktivitu (Kalinowski a Richardson 2005). Hemoprotein Dcytb se nachází na apikální membráně enterocytů. DMT1 je také zapojen do vychytávání  $Fe^{2+}$  v ledvinách a do transportu železa v mozku (Hentze et al. 2004). Absorpci nehemového

železa usnadňuje například kyselina askorbová, maso a ryby, naopak za inhibici absorpce jsou zodpovědné například třísloviny, fytáty, vejce či mléko (Hallberg 1981).

Nakonec je železo uvolněno z enterocytů do krevního řečiště pomocí proteinu ferroportinu 1 (Ireg1, MTP). Na tomto procesu se podílí i hephaestin, který oxiduje  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  (Valko et al. 2005) a usnadňuje inkorporaci železa do transferinu (Singh et al. 2011). Hefhaestin je transmembránový ceruloplazminový homolog, který je exprimován ve střevě. Ferroportin je exprimován na basolaterální membráně duodenálních enterocytů (Hentze et al. 2004, Kalinowski a Richardson 2005) a nedostatek železa indukuje jeho expresi (Arredondo a Núñez 2005).



**Obr. 2.1.** Model absorpce anorganického železa enterocyty. Požitě  $\text{Fe}^{3+}$  je redukováno v lumen střeva na  $\text{Fe}^{2+}$  pomocí duodenálního cytochromu b (Dcytb) a transportováno přes apikální membránu pomocí DMT1. Transport  $\text{Fe}^{2+}$  přes basolaterální membránu je zprostředkován ferroportinem. Doručení železa do cirkulujícího transferinu je spojené s jeho reoxidací na  $\text{Fe}^{3+}$  pomocí hephaestinu vázaného na basolaterální membráně a rozpustného ceruloplazminu (Galaris a Pantopoulos 2008).

Důležitou roli při regulaci železa hraje také 25-aminokyselinový peptidový hormon produkovaný hepatocyty označovaný jako hepcidin (nazýván také HAMP či LEAP-1 dle místa dřívější izolace). Hepcidin existuje jako prekurzor preprohepcidin, který obsahuje 84 aminokyselin. Enzymatickým štěpením se uvolní aminokyselinová sekvence o 64 aminokyselinách, která je transportována z cytoplasmy do lumen endoplazmatického retikula (ER) a následuje odstranění 39 aminokyselin konvertázou podobnou furinu (Singh et al. 2011). Hepcidin způsobuje inhibici intestinálního vstřebávání železa (Papanikolaou et al 2005) vazbou na ferroportin, čímž indukuje jeho

internalizaci a degradaci (Singht et al. 2011). Zánět a přetížení železem indukuje syntézu hepcidinu, naopak anémie či hypoxie ji potlačuje (Papanikolaou et al. 2005).

### **2.4.2 Transport železa**

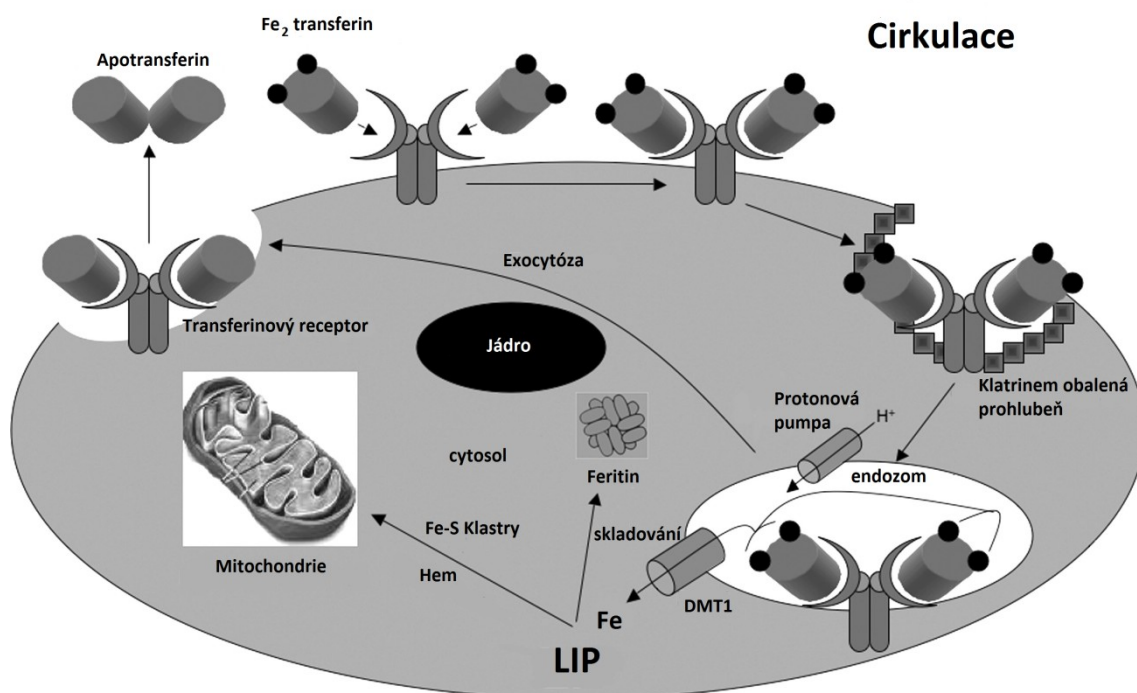
Aby mohlo být železo přeneseno, musí se navázat na apotransferin (apoTf). Tím vzniká protein transferin (Tf), který dodává železo buňkám a tkáním (Arredondo a Núñez 2005, Galaris a Pantopoulos 2008). Transferin je vysokoafinitní a nízkokapacitní monomerní protein, který může transportovat pouze dva  $\text{Fe}^{3+}$  ionty (Puntarulo 2005, Valko et al. 2005). Za fyziologických podmínek je pouze zhruba 30 % transferinu saturováno železem a zbytek zůstává v apo-formě (Galaris a Pantopoulos 2008). Při přetížení železem se v plazmě vyskytuje i volné železo nevázané na transferin (NTBI) (Henzte et al. 2004).

Drtivá většina železa vázaného na transferin pochází z retikuloendoteliálních makrofágů, které recyklují železo ze zestárých červených krvinek pomocí fagocytózy (Galaris a Pantopoulos 2008).

### **2.4.3 Vstup do buňky**

Transferin doručí svůj náklad do buňky navázáním na transferinový receptor (TfR). Transferinový receptor 1 (TfR1) je exprimován na většině typů buněk. Transferinový receptor 2 (TfR2) je homolog TfR1 a je exprimován na hepatocytech a hematopoetických buňkách. TfR2 má dvě formy  $\alpha$  a  $\beta$  (Aisen et al. 2001, Galaris a Pantopoulos 2008, Sheftel et al. 2012).

Za fyziologických podmínek Fe vstupuje do buňky v komplexu Tf/TfR1 pomocí endocytózy. V kyselém pH endozomu je  $\text{Fe}^{3+}$  uvolněno z transferinu, redukováno na  $\text{Fe}^{2+}$  (pomocí ferrireduktázy Steap3) a transportováno do cytosolu díky DMT1. Podstatná část intracelulárního železa je využita mitochondriemi pro syntézu hemu a sestavení Fe-S klastrů. Do této organely je železo transportováno pomocí mitoferinu (Arredondo a Núñez 2005, Galaris a Pantopoulos 2008). Díky kyselému pH zůstává apotransferin navázán na TfR a tento komplex putuje zpět k plazmatické membráně. Zde je neutrální prostředí, dochází k rychlé disociaci a obě části komplexu jsou pak reutilizovány pro další použití (Richardson a Ponka 1997).



**Obr. 2.2.** Buněčné vychytávání železa cestou transferinového cyklu. Fe<sub>2</sub> transferin se naváže na transferinový receptor a za účasti klatrinu je endocytován. Acidifikace endozomu pomocí protonové pumpy vyústí v uvolnění železa, které je následně transportováno přes endozomální membránu do cytosolu pomocí DMT1. Internalizované železo je využito pro metabolické účely v mitochondriích a přebytek je skladován ve feritinu v cytosolu. Část intracelulárního železa zůstává v labilní formě (LIP). Receptorový komplex apotransferin/transferin je recyklován na povrch buňky, kde je apotransferin uvolněn (Galaris a Pantopoulos 2008).

#### 2.4.4. Skladování

Přebytek železa, který překročí buněčné požadavky a není využit pro metabolické děje je skladován v cytosolu buňky ve feritinu. Feritin se skládá z 24 podjednotek těžkých H (heavy či heart) a lehkých L (light či liver) řetězců. Oba tyto řetězce jsou potřebné pro jeho správnou funkci. Jedná se o vysokokapacitní a nízkoafinitní protein, který je schopný pojmout až 4 500 atomů železa. Expres feritinu je regulována na posttranskripční úrovni (Galaris a Pantopoulos 2008, Valko et al. 2005). Feritin hraje důležitou roli v prevenci toxicity železa, protože je schopný vázat železo ve své centrální dutině v rozpustné, netoxické a biologicky dostupné formě. Dalším zásobní formou železa je hemosiderin, který je ve vodě špatně rozpustný produkt rozkladu feritinu (Puntarulo 2005).

Mimoto je železo v cytosolu přítomno také v labilní redoxně aktivní formě (LIP). Železo se do cytosolu dostává po uvolnění z endozomu, kde je pravděpodobně vázáno na nízkomolekulární ligandy, jako je citrát, ATP, AMP, kyselina citronová nebo



pyrofosfát (Galaris a Pantopoulos 2008, Puntarulo 2005). LIP představuje pouze 3-5 % celkového buněčného železa (Arredondo a Núñez 2005).

Redoxně aktivní železo není přítomno pouze v cytosolu a v mitochondriích, ale hlavně v rámci jiných buněčných kompartmentů (lyzozomy, ER) (Arredondo a Núñez 2005, Galaris a Pantopoulos 2008).

Hlavními skladovacími místy železa jsou játra (zhruba 1/3), slezina a kostní dřeň (Puntarulo 2005).

#### **2.4.5 Regulace homeostázy železa**

Homeostáza železa je regulována posttranskripčně. Je prováděna pomocí proteinů regulujících železo IRP1 a IRP2, které se vážou na elementy kontrolující železo IREs. IREs se nacházejí v nepřekládaných regionech mRNA hlavních proteinů regulujících buněčnou homeostázu železa (TfR, ferritin). IRP1 může fungovat jako protein, který se váže na mRNA nebo jako akonitáza (podle toho jestli je nebo není přítomný Fe-S klastr). IRP2 je strukturálně a funkčně podobný IRP1, ale nesestavuje klastry ani nevykazuje akonitázovou aktivitu (Aisen et al. 2001, Arredondo a Núñez 2005, Cairo et al. 2002, Eisenstein a Ross 2003).

IRPs nereagují pouze na změny v úrovni železa, ale také jsou citlivé na ROS. IRP1 je rapidně indukován oxidativním stresem ve formě extracelulárního H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aktivace IRP1 zprostředkovaná peroxidem vodíku stimuluje vychytávání železa pomocí TfR1 a potlačuje syntézu ferritinu (Arredondo a Núñez 2005, Galaris a Pantopoulos 2008, Puntarulo 2005).

#### **2.4.6 Vylučování**

Jakmile železo vstoupí do krevního oběhu, organismus nemá žádné fyziologicky významné mechanismy, které by způsobovaly větší vylučování železa. V malých množstvích, přibližně 1-3 mg/den, se železo ztrácí deskvamací buněk především ze střeva, ale také žlučí, z kůže nebo krvácením a u žen menstruací (Fontecave a Pierre 1993, Galey 2001, Puntarulo 2005, Valko et al. 2005).

## 2.5 Chelátory železa

Jak již bylo zmíněno výše, i přes to, že železo hraje zásadní roli v biologických systémech, je také díky své redoxní aktivitě potencionálně toxický kov. Chelatace železa exogenními ligandy se tedy nabízí jako možnost, jak léčit například nemoci z přetížení železa, či jak omezit účast Fe na reakcích, které generují VR a tím ovlivňují oxidační rovnováhu buněk a tkání (Buss et al. 2004).

Existuje několik důležitých kritérií, které musíme brát v úvahu při snaze nalézt účinné chelátory železa. Jedná se o cestu podání, chelatační účinnost a toxicita ligandu (Kalinowski a Richardson 2005). Chelátor musí mít vysokou afinitu k železu, specifickou ve srovnání s jinými kovovými ionty, vhodnou tkáňovou distribuci, metabolismus a biologickou dostupnost (Galey 2001). V ideálním případě by měl být účinný po perorálním podání, ekonomicky dostupný a bez nežádoucích účinků (Kalinowski a Richardson 2005).

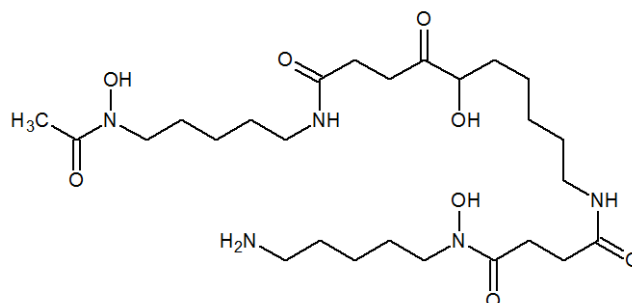
### 2.5.1 Siderofory

Jedná se o přírodní chelátory železa produkované některými mikroorganismy, kterým zajišťují železo pro jejich růst (Galey 2001, Kalinowski a Richardson 2005). Mají vysoké afinitní konstanty, nicméně, s výjimkou DFO, omezenou biologickou dostupnost a sklon ostraňovat  $Fe^{3+}$  z feritinu i transferinu. To limituje jejich použití *in vivo*. Další nevýhodou těchto látek je možné zvýšení patogenity některých bakterií a plísní (Galey 2001, Sharpe et al. 2011).

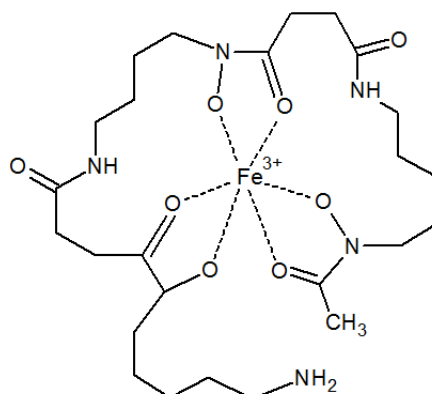
#### 2.5.1.1 Desferrioxamin

Desferrioxamin (DFO) je hexadentální siderofor izolovaný ze *Streptomyces pilosus* (Buss et al. 2004). Používá se pro terapii nemocí z přetížení železem jako je například  $\beta$ -talasémie či dědičná hemochromatóza, kde funguje jako účinný způsob odstranění nadměrného množství železa z organismu (Galey 2001). Má vysokou afinitu pro  $Fe^{3+}$ . Vytváří s ním metabolicky neaktivní vysoce stabilní komplexy v poměru 1:1, a tím zabraňuje produkci ROS (Kalinowski a Richardson 2005, Sharpe et al. 2011). Afinita DFO k  $Fe^{2+}$  je o 20 řádů nižší (Sharpe et al. 2011). Účinnost je však velmi ovlivněna jeho hydrofilitou. Ta způsobuje špatnou absorpci z gastrointestinálního traktu (je tedy perorálně neúčinný) a má krátký plazmatický poločas. Proto se podává podkožními injekcemi, které se musí podávat dvakrát denně a navíc tyto infuze trvají až

12 hodin (Buss et al. 2004, Kalinowski a Richardson 2005, Sharpe et al. 2011). To je pro spolupráci pacientů velmi nepříznivé a proto se provádí různé pokusy s cílem zlepšit metody doručení DFO, například konjugací se škrobem či prodloužené uvolňování z lipozomů (Kontoghiorghes et al. 2005, Sharpe et al. 2011). DFO má také antineoplastickou aktivitu (Kalinowski a Richardson 2005).



**Obr. 2.3.** Chemická struktura desferrioxaminu (DFO) (Kalinowski a Richardson 2005).



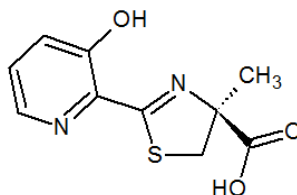
**Obr. 2.4.** Chemická struktura komplexu DFO s trojmocným železem (Kalinowski a Richardson 2005).

### 2.5.1.2 Desferrithiocin a desferri-exocheliny

Desferrithiocin (DFT) je tridentální siderofor izolovaný z bakterie *Streptomyces antibioticus* (Tam et al. 2003). Tento ligand váže železo prostřednictvím fenolického kyslíku, karboxylového kyslíku a thiazolového dusíku (Buss et al. 2004, Sharpe et al. 2011). Patří mezi první orálně aktivní siderofory. Nicméně jeho výzkum byl ukončen v II. fázi klinických studií, protože se objevily toxické účinky na ledviny (Sharpe et al. 2011). Kvůli tomuto nepříznivému nežádoucímu účinku byly studovány další analogy. Ty již nebyly nefrotoxické, ale vykazovaly GIT toxicitu (Kalinowski a Richardson 2005). Kromě afinity k železu má také afinitu k iontům zinku a mědi (Buss et al. 2004).

Desferri-exocheliny jsou skupina hexadentálních sideroforů uvolněných z *Mycobacterium tuberculosis* (Pahl et al. 2000), které využívají kyslíkové atomy, aby vázaly železo (Kalinowski a Richardson 2005). Byly provedeny studie, které ukázaly

schopnost těchto sideroforů přímo odstraňovat železo z lidského transferinu a koňského feritinu (Gobin a Horwitz 1996). Byla u nich prokázána silná protinádorová aktivita na buňkách MCF-7 (Kalinowski a Richardson 2005).

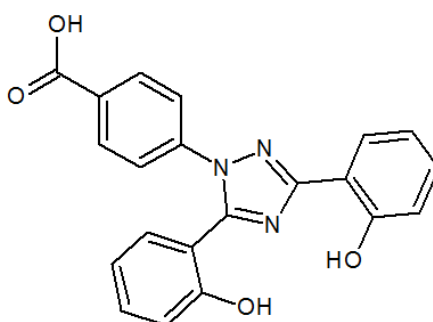


**Obr. 2.5.** Chemická struktura desferrithiocinu (DFT) (Kalinowski a Richardson 2005).

## 2.5.2 Syntetické chelátory železa

### 2.5.2.1 Deferasirox

Deferasirox (ICL670A) je 4-[3,5-bis(2-hydroxyfenyl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoová kyselina (Tam et al. 2003). Jedná se o perorálně aktivní tridentální chelátor (Kontoghiorghes et al. 2005), který jako donorové skupiny využívá triazolylový dusík a dva fenolické kyslíky. Selektivně váže  $\text{Fe}^{2+}$  a nebo  $\text{Fe}^{3+}$  (Kalinowski a Richardson 2005). Má nízkou rychlost plazmatické clearance, proto se užívá pouze jednou denně. Častější podávání by způsobilo hromadění léku v plazmě a tkáních a následné zvýšení toxicity. Je schopen vstoupit do buněk, ale jeho komplexy s železem nemusí být schopny difundovat z buněk ven kvůli mnohem vyšší molekulové hmotnosti (Kontoghiorghes et al. 2005). U této sloučeniny byla také prokázána antiproliferační aktivita ovšem při vyšších koncentracích než vykazují jiné chelátory, které se vyvíjí jako protinádorové látky (Richardson et al. 2009).



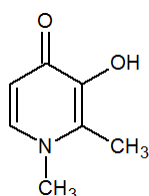
**Obr. 2.6.** Chemická struktura deferasiroxu (Kalinowski a Richardson 2005).

### 2.5.2.2 Deferipron

1,2-dimethyl-3-hydroxypyridin-4-on (L1, CP20, deferipron) je bidentální chelátor (Kalinowski a Richardson 2005). Má velmi hořkou chuť a je těžce rozpustný ve vodě při neutrálním pH. Oproti tomu v kyselém prostředí žaludku je velmi dobře rozpustný, a proto se podává ve formě tablet či kapslí (Kontoghiorghes et al. 2005). Díky své perorální aktivitě, byl první sloučeninou, která řešila problém non-compliance pacientů s léčbou DFO (Sharpe et al. 2011).

Byly provedeny studie, kde se užívala kombinace L1 a DFO ve snaze zvýšit clearance železa (Kalinowski a Richardson 2005, Sharpe et al. 2011). Tato kombinace se zdá být účinná při snižování závažného srdečního zatížení železem (Sharpe et al. 2011). Tato léčba je zvláště důležitá pro záchranu života pacientů s kardiomyopatií způsobené nadměrným ukládáním železa v srdci (Kontoghiorghes et al. 2005). Menší lipofilní chelátor váže železo v intracelulárních kompartmentech nepřístupných pro větší ligand. Pak přenese svůj náklad k silnějšímu extracelulárnímu hexadentálnímu chelátoru, což vede k synergickému efektu (Sharpe et al. 2011). Během těchto studií bylo zjištěno dvojnásobné zvýšení mediánu hladiny železa vylučované močí u talasemických pacientů ve srovnání s monoterapií jednotlivými chelátory (Kalinowski a Richardson 2005). Tato kombináční léčba může umožnit použití nižších dávek obou chelátorů a tím omezit toxicitu pozorovanou při vyšších dávkách (Sharpe et al. 2011).

Již byly zkoumány také analogy deferipronu. Jedním z nich je L1NAII, který patří do druhé generace analogů. Allyl substituent zvyšuje lipofilitu sloučeniny a vykazuje lepší účinek na mobilizaci železa než L1. Také je pomaleji metabolizován (Kontoghiorghes et al. 2005). Fluorované deriváty deferipronu byly zveřejněny v patentu. Byly vyvinuty, aby procházely hematoencefalickou bariérou do mozku a působily jako léčebné prostředky při neurodegenerativních onemocněních jako je Parkinsonova či Alzheimerova nemoc (Sharpe et al. 2011).



**Obr. 2.7.** Chemická struktura deferipronu (Sharpe et al. 2011).

### 2.5.2.3 Tachpyridin

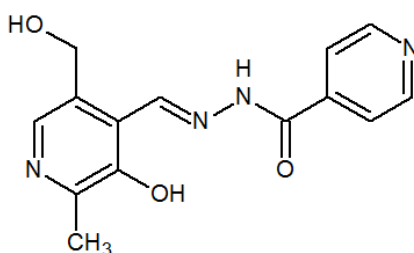
Hexadentální chelátor, který využívá tři pyridylové dusíky a tři sekundární aminové dusíky k vázání železa (Buss et al. 2004). Za aerobních podmínek váže silněji  $\text{Fe}^{2+}$  než  $\text{Fe}^{3+}$  (Planalp et al. 2002), navíc bylo zjištěno, že dokáže redukovat navázané trojmocné železo na železo dvojmocné (Park et al. 1998).

### 2.5.2.4 Aroylhydrazony

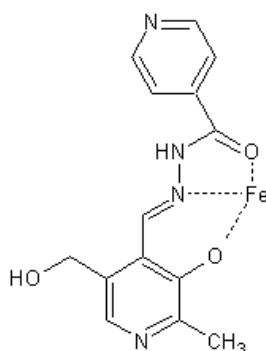
#### 2.5.2.4.1 PIH a analogy

Pyridoxalisonikotinoylhydrazon (PIH) je perorálně účinný tridentální chelátor (Tam et al. 2003), který váže železo oktahedrálně přes karbonylový kyslík, iminový dusík a fenolický kyslík. Poměr ligandu a železa je 2:1. PIH a jeho analogy jsou známy jako série 100 (Kalinowski a Richardson 2005). Má vysokou afinitu pro  $\text{Fe}^{3+}$ , dokáže účinně prostupovat přes plazmatické a mitochondriální membrány jako volný ligand i v komplexu s železem, díky čemuž má chelatační účinnost přinejmenším srovnatelnou s DFO (Chaston a Richardson 2003, Kalinowski a Richardson 2005). PIH také váže  $\text{Fe}^{2+}$ , ale s nižší afinitou. Železnatý komplex PIH je citlivý k oxidační konverzi v přítomnosti kyslíku, kdy tvoří železité komplexy (Sharpe et al. 2011). Tím se snižuje hladina  $\text{Fe}^{2+}$  dostupného pro produkci ROS (Kalinowski a Richardson 2005). Bylo také prokázáno, že PIH a jeho analogy vážou ionty vápenaté, manganaté a zinečnaté, ačkoliv s mnohem nižší afinitou než železité ionty (Sharpe et al. 2011).

Komplexy železa a PIH či jeho analogů nejsou zcela inertní. Schopnost PIH a dalších analogů série 100 podporovat ROS hraje roli v oxidačním poškození buněk. Míra tohoto efektu je ovšem nižší než je tomu u cytotoxických chelátorů jako je například triapin nebo chelátory PKIH řady (viz 2.5.2.4.4) (Kalinowski a Richardson 2005).



**Obr. 2.8.** Chemická struktura PIH (Chaston a Richardson 2003).

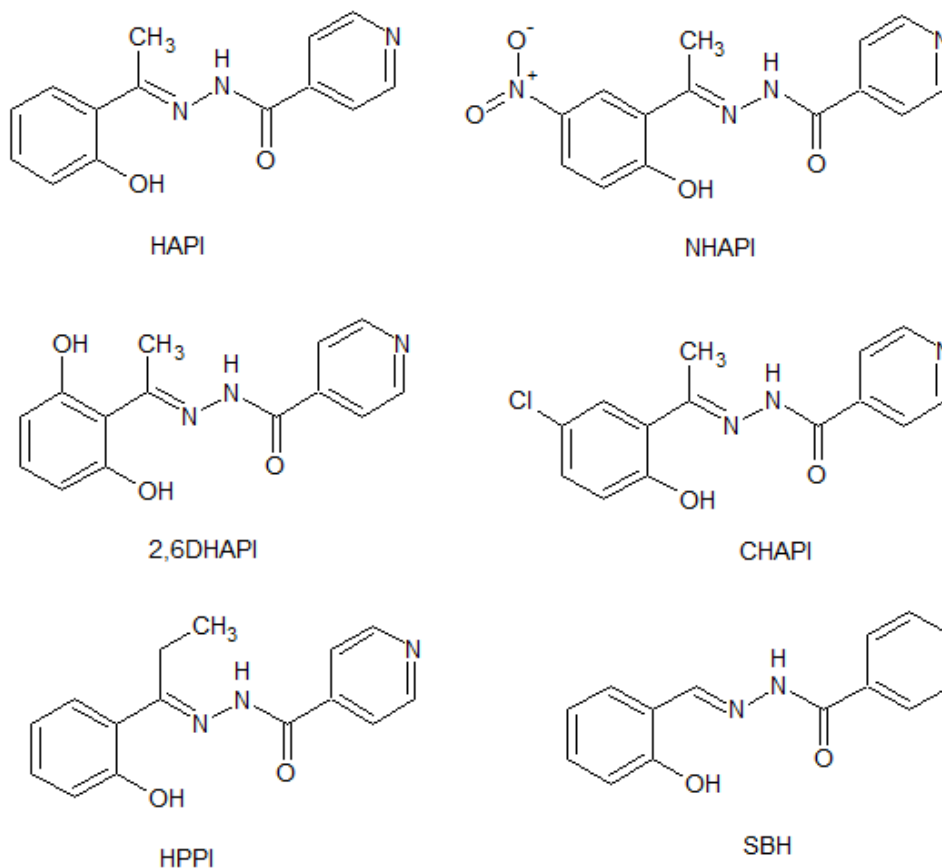


**Obr. 2.9.** Tridentální chelátor PIH používá k navázání železa karbonylový a fenolický kyslík a iminový dusík (Kalinowski a Richardson 2005).

#### 2.5.2.4.2 SIH a analogy

Další chelátory vznikly náhradou pyridoxalu v PIH více lipofilní salicylaldehydovou skupinou. Vznikla tak série 200. Tato strukturální obměna má za následek zvýšenou afinitu k iontům železa než PIH. Tyto chelátory mají jak účinky vázat železo, tak cytotoxické. U chelátorů série 200 byla prokázána vyšší účinnost v prevenci vychytávání železa z Tf než u DFO. Díky tomu mají tyto chelátory potenciál nahradit problematické použití DFO v klinické léčbě nemocí z přetížení železem. Navíc při studiích *in vivo* na králících nebyly patrné nežádoucí účinky (Kalinowski a Richardson 2005).

Mateřskou sloučeninou je salicylaldehydisonikotinoylhydrazon (SIH) (Kalinowski a Richardson 2005). SIH je tridentální chelátor. Díky své lipofilitě snadno vstupuje do buněk, kde pevně chelatuje intracelulární redoxně aktivní železo a tvoří s železitými ionty komplexy v poměru 2:1. Dokáže tedy efektivně blokovat produkci  $\text{OH}\cdot$  z  $\text{H}_2\text{O}_2$  závislou na železe (Horackova et al. 2000, Šimůnek et al. 2005). Také bylo prokázáno, že SIH chrání proti kardiotoxicitě způsobené antracyklinem daunorubicinem jak *in vitro*, tak *in vivo* (Šimůnek et al. 2008, Štěrbá et al. 2007). Nevýhodou je jeho krátký biologický poločas. Proto vznikají stále nové analogy SIH, u kterých je snaha dosáhnout vyšší stability a také lepších účinků. Příkladem mohou být chelátory HAPI; NHAPI; 2,6DHAPI, CHAPI, HPPI, SBH a další (Hrušková et al. 2011, Charkoudian et al. 2007).



**Obr. 2.10.** Příklady chemických struktur některých aroylhydrazonových chelátorů odvozených od SIH (Hrušková et al. 2011, Charkoudian et al. 2007).

#### 2.5.2.4.3 NIH a analogy

Jedná se o další řadu analogů PIH, které tvoří sérii 300. Bylo u nich dosaženo vyšší lipofility než u předchozích dvou sérií začleněním 2-hydroxy-1-naftaldehydové skupiny. Tato škála látek opět využívá dva kyslíkové atomy a jeden atom dusíku, aby mohla tvořit komplex s železitými ionty. Komplexy s železnatými ionty nejsou stabilní. Produkce VR není součástí cytotoxického účinku těchto látek, protože železo v komplexu nemůže měnit svůj stav z trojmocného na dvojmocné (Richardson a Bernhardt 1999).

Znalosti získané z posouzení biologické aktivity chelátorů sérií 100, 200 a 300 byly následně použity pro přípravu různých nových tříd ligandů, které mají potenciál pro léčbu nemocí z přetížení železem či rakoviny (Kalinowski Richardson 2005).

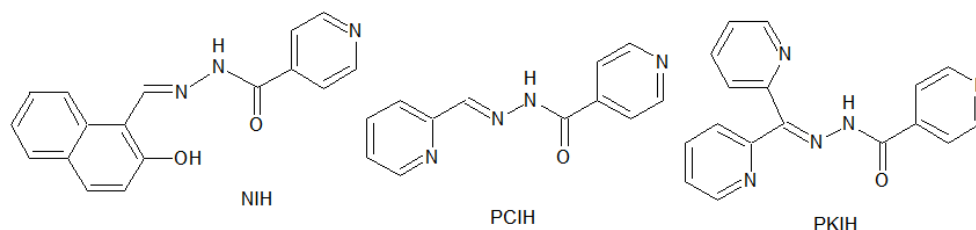
#### 2.5.2.4.4 PCIH, PKIH a jejich analogy

2-pyridylkarboxaldehydisonikotinoylhydrazon (PCIH) a jeho analogy jsou tridentální chelátory, které váží železo prostřednictvím iminového a pyridylového



dusíku a karbonylového kyslíku (Kalinowski a Richardson 2005). Tyto látky váží téměř výlučně železnaté ionty (Sharpe et al 2011). V *in vitro* studiích byl zvýrazněn jejich potenciál nahradit DFO při léčbě nemocí z přetížení železem. Studie používající model mitochondriálního přetížení železem demonstrovala potencionální použití těchto ligandů pro léčbu Friedreichovy ataxie. Byly také přezkoumány redoxní aktivity výsledných komplexů železa PCIH analogů. Komplexy s železem nevyvolávají škodlivé redoxní reakce a tím potvrzují potenciál série PCIH pro léčbu přetížení železem (Kalinowski a Richardson 2005).

Další skupinou látek jsou di-2-pyridylketonisonikotinoylhydrazon (PKIH) a od něj odvozené analogy. Stejně jako u předchozích látek se jedná o tridentální chelátory železa. Při fyziologickém pH zůstávají tyto látky neutrální, a mohou prostupovat buněčnými membránami. Bylo zjištěno, že PKIH analogy stimulují hydroxylaci benzoátu v přítomnosti železnatých iontů a peroxidu vodíku. Železnaté komplexy také v přítomnosti peroxidu vodíku zvyšují degeneraci plazmidové DNA. PKIH výrazně zvýšil generaci intracelulárních ROS. To vše přispívá k cytotoxicitě PKIH analogů (Bernhardt et al. 2003, Kalinowski a Richardson 2005).



**Obr. 2.11.** Struktury vybraných aroylhydrazonových chelátorů (Kalinowski a Richardson 2005).

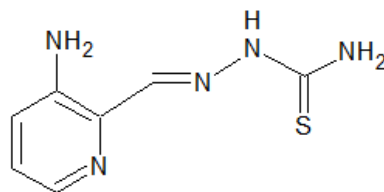
### 2.5.2.5 Thiosemikarbazony

Thiosemikarbazony patří mezi první chelátory, které vykazaly potenciál jako protinádorové látky. Tyto ligandy mají vysokou afinitu k iontům železa a dalším iontům kovů jako je  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{2+}$  či  $\text{Co}^{2+}$ . Jedná se o tridentální chelátory, které vážou železo pomocí atomu síry a dvou dusíkových donorových atomů (Richardson et al. 2009).

#### 2.5.2.5.1 Triapin

Chemická struktura triapinu je 3-aminopyridin-2-karboxaldehyd thiosemikarbazon. Působí jako inhibitor ribonukleotidreduktázy (RR) (Chaston a Richardson 2003, Tam et al. 2003). Triapinový komplex železa je redoxně aktivní.

Železitý komplex se redukuje na železnatou formu a dochází k vytváření ROS, které jsou schopny inaktivovat enzym RR (Richardson et al. 2009).



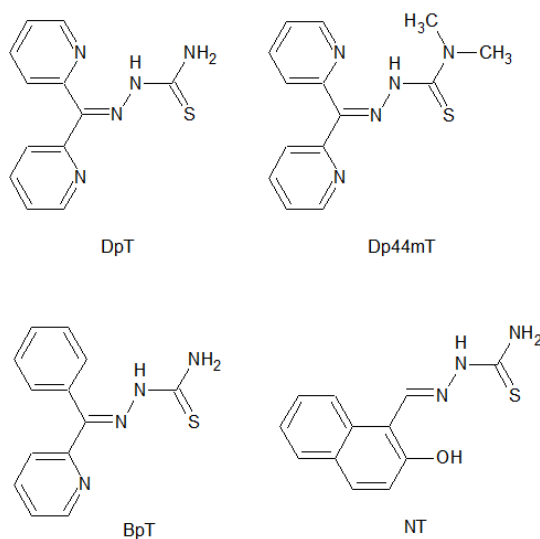
**Obr. 2.12.** Chemická struktury triapinu (Kalinowski a Richardson 2005).

### 2.5.2.6 Hybridní chelátory odvozené od thiosemikarbazonů a aroylhydrazonů

2-hydroxy-1-naftylaldehyd-3-thiosemikarbazon (NT) je mateřskou látkou, od které byly odvozeny další analogy. U těchto chelátorů byl prokázán významný potenciál pro léčbu poruch z přetížení železem s nízkou antiproliferativní aktivitou (Chaston a Richardson 2003, Kalinowski a Richardson 2005).

Di-2-pyridylketonthiosemikarbazon (DpT) a jeho analogy tvoří další skupinu hybridních chelátorů. Jedná se o křížence PKIH a 2-hydroxy-1-naftylaldehyd thiosemikarbazonové série ligandů (Richardson et al. 2009). Jednou z velmi účinných sloučenin této řady je di-2-pyridylketon-4,4,-dimethyl-3-thiosemikarbazon (Dp44mT), který vykazoval vysokou antiproliferativní účinnost (Kalinowski a Richardson 2005).

Také je potřeba zmínit 2-benzoylpyridinthiosemikarbazon (BpT) a jeho analogy. Substitucí 2-pyridylového kruhu v DpT sérii fenylovou skupinou došlo ke zvýšení lipofility. BpT chelátory prokazují větší antiproliferační aktivitu než jejich odpovídající DpT protějšky díky zvýšené redoxní aktivitě komplexu BpT s železem (Richardson et al. 2009).



**Obr. 2.13.** Chemické struktury vybraných hybridních chelátorů (Kalinowski a Richardson 2005, Richardson et al. 2009).

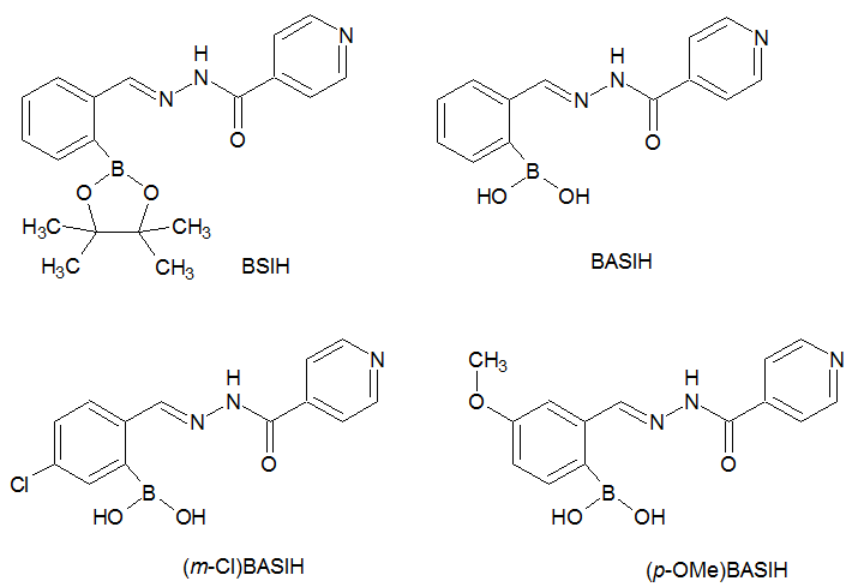
## 2.6 Prochelátory železa

Jednou z dalších možností jsou tzv. prochelátory železa. Jedná se o látky, jejichž chelatační účinek je maskován. Tyto látky mají malou nebo žádnou afinitu ke kovovým iontům. Tento stav se mění v přítomnosti ROS, které dokážou toto maskování selektivně odstranit a vznikají tak vysokoafinitní ligandy schopné vázat železo. Výhodou je, že díky maskování chelatačního účinku mají minimální vlastní toxicitu (nezpůsobují depleci železa buňkám) a jejich aktivace probíhá tam, kde je právě potřeba, díky přítomnosti ROS. Jedná se o látky odvozené od salicylaldehydisonikotinoylhydrazonu (SIH) a salicylaldehydbenzoylhydrazonu (SBH) (Charkoudian et al. 2006, Charkoudian et al. 2007).

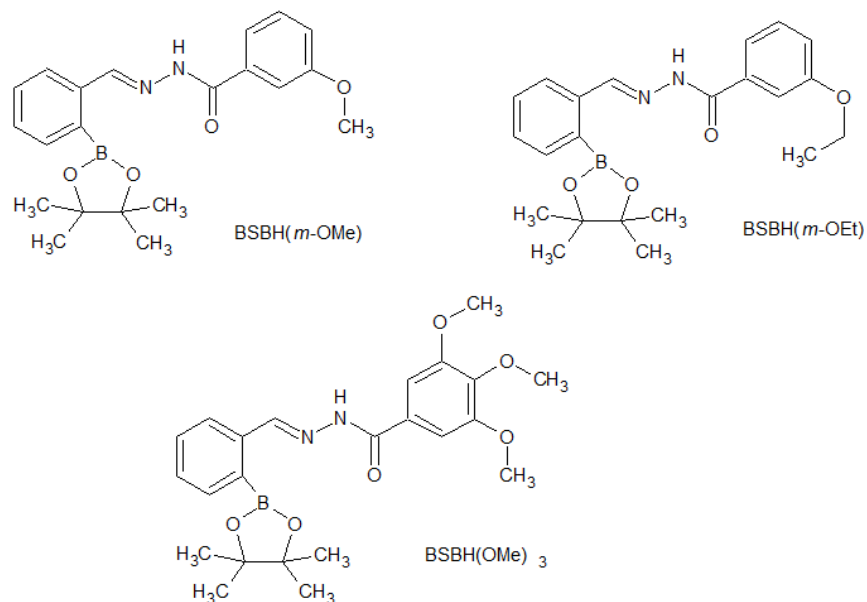
První látkou této skupiny byl BSIH. Jedná se o chemickou modifikaci SIH, kde je fenolický hydroxyl chráněn boronylovou skupinou. Při ataku  $H_2O_2$  dochází k oxidaci vazby bor-uhlík a odštěpení boronových kyselin nebo jejich esterů. Výhodou je, že odstupující boronové kyseliny či konečný produkt kyselina boritá nejsou toxické. Patří sem také další prochelátory železa odvozené rovněž od SIH jako například BASIH, (*p*-OMe)BASIH či (*m*-Cl)BASIH (Charkoudian et al. 2006, Charkoudian et al. 2007).

Druhou skupinu prochelátorů odvozených od SBH zastupují například látky BSBH(*m*-OMe), BSBH(*m*-OEt) či BSBH(MeO)<sub>3</sub> (Charkoudian et al. 2007).

Při zkoumání těchto nových látek vykazoval slibné účinky prochelátor BSIH, u kterého nebyla zaznamenána prakticky žádná vlastní toxicita. Vykazoval lepší účinky než SIH ve vyšších dávkách (300  $\mu$ M a 600  $\mu$ M) při ochraně buněk před oxidačním poškozením vyvolaným toxickou dávkou peroxidu vodíku 200  $\mu$ M (Macháček 2012).



**Obr. 2.14.** Vybrané aroylhydrazonové prochelátory železa odvozené od chelátoru SIH (Charkoudian et al. 2007).



**Obr. 2.15.** Vybrané aroylhydrazonové prochelátory železa odvozené od chelátoru SBH (Charkoudian et al. 2007).

### **3. Cíle práce**

- *In vitro* studium nových aroylhydrazonových potenciálních cytoprotektivních chelátorů železa rSIH, rHAPI, rHPPI, BHAPI, BHPPI, 2API, 7HII, H16 a H18 na embryonální kardiomyblastové buněčné linii H9c2 izolované z potkana kmene BD1X (*Rattus norvegicus*):
  - hodnocení protektivních účinků studovaných potenciálních chelátorů v závislosti na použité koncentraci na modelový oxidační stres vyvolaný peroxidem vodíku o koncentraci 200  $\mu$ M (24-hodinová inkubace buněk s testovanými látkami v kombinaci s peroxidem vodíku)
  - stanovení vlastní toxicity studovaných potenciálních chelátorů v závislosti na dávce (72-hodinová inkubace buněk s testovanými látkami)
  - výpočet koncentrací vedoucích k ochraně 50 % buněk ( $EC_{50}$ ) a koncentrací vedoucích k usmrcení 50 % buněk ( $TC_{50}$ ) studovaných látek
  - porovnání protektivních a toxických účinků jednotlivých potenciálních chelátorů mezi sebou a s referenčním chelátorem SIH

## **4. Materiál a metodiky**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Přístrojové vybavení**

##### ***4.1.1.1 Zařízení pro sterilní práci a kultivaci buněčných linií***

- vodní lázeň Memmert WB 14 LV (Memmert, Německo)
- box s laminárním prouděním Aura 2000 m.a.c. s třídou biohazardu A (BioAir, Itálie)
- buněčný inkubátor s termostatem a regulací koncentrace CO<sub>2</sub> Forma Scientific CO<sub>2</sub> incubator, model 311 (Forma Scientific, USA)
- invertovaný mikroskop Nikon Eclipse TS 100 s objektivem Nikon 10x/0,25 (Nikon, Japonsko)
- sterilní plastové kultivační lahve T75, 96-jamkové a 12-jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem (TPP, Švýcarsko)
- sterilní plastové zkumavky o různém objemu (TPP, Švýcarsko)
- plastové mikrozkušavky 0,5 ml (Eppendorf, Německo)
- pipetíky Eppendorf easypet (Eppendorf, Německo) a BioHit midi plus (Biohit, Finsko)
- sterilní plastové sérologické pipety různého rozsahu (TPP, Švýcarsko)
- automatické pipety Eppendorf research různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET BioHit 500-1200 µl (BioHit, Finsko)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET BioHit 5-100 µl (BioHit, Finsko)
- sterilní jednorázové špičky různého rozsahu na příslušné pipety (Eppendorf, Německo; BioHit, Finsko)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- sterilní laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- sterilní plastové Petriho misky 150 cm<sup>2</sup> (TPP, Švýcarsko)

#### 4.1.1.2 Čtečka 96-jamkových mikrotitračních destiček

Pro spektrofotometrická stanovení na 96-jamkových destičkách byla použita čtečka mikrotitračních destiček Infinite M 200 PRO s optickým hranolem (Tecan, Rakousko). Jako detektor zde slouží UV křemíkové fotodiody pro měření absorbance.

#### 4.1.1.3 Ostatní laboratorní vybavení

- analytické váhy ScalTec SBC 22
- laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- plastové zkumavky o různém objemu (TPP, Švýcarsko)
- mikrozukavky 0,5; 1 ml (Eppendorf, Německo)
- automatické pipety Eppendorf Research různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- špičky pro automatické pipety různého objemu (Eppendorf, Německo; BioHit, Finsko)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- laboratorní třepačky vortex IKA MS3 basic (IKA, Německo)

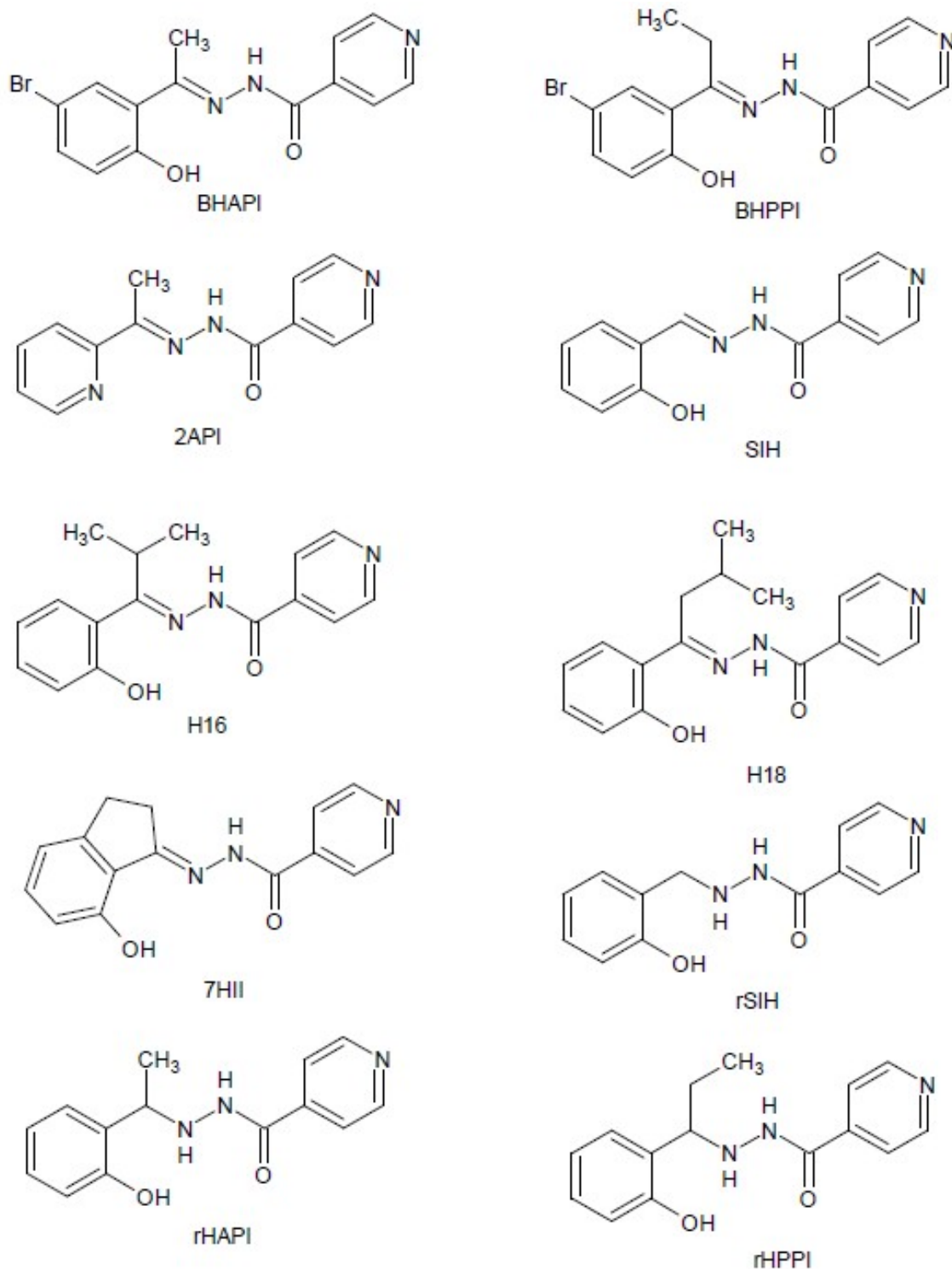
#### 4.1.2 Reagencie a chemikálie

- dimethylsulfoxid  $\geq 99,9\%$  (DMSO) (Sigma, Německo)
- ethanol absolutní p.a.  $\geq 99,9\%$  (Penta, Česká republika)
- formaldehyd 36,3% (Penta, Česká republika)
- fosfátový pufr v tabletách (PBS) (Sigma, Německo)
- kyselina octová ledová p.a.  $\geq 99,9\%$  (Penta, Česká republika)
- roztok neutrální červeně 3,3 g/l (Sigma, Německo)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) pro SCM (Lonza, Belgie)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) pro SFM (Sigma, Německo)
- teplem deaktivované fetální hovězí sérum (Lonza, Belgie)
- směs penicilinu a streptomycinu (P/S; koncentrace penicilinu 10 000 jednotek/ml a streptomycinu 10 mg/ml) (Lonza, Belgie)
- HEPES pufr 1 M (*N*-(2-hydroxyethyl)piperazin-*N'*-(2-ethansulfonová kyselina)) (Sigma, Německo)
- trypsin s EDTA (roztok 0,5% trypsinu a 0,02% EDTA) (Lonza, Belgie)
- chlorid vápenatý (Penta, Česká republika)

- peroxid vodíku 3% roztok (Sigma, Německo)
- trypanová modř (Sigma, Německo)
- ultradestilovaná voda (MQ-voda, přístroj Milli-Q RG, Millipore, Česká republika)
- ADS pufr o pH 7,4 (NaCl 116 mM; KCl 5,3 mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,2 mM, HEPES 20 mM)
- fluorescenční sonda JC-1 (Molecular Probes, USA)
- salicylaldehydisonikotinoylhydrazon (SIH; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- *N'*-(2-hydroxybenzyl)isonikotinoylhydrazid (rSIH; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- *N'*-(1-(2-hydroxyfenyl)ethyl)isonikotinoylhydrazid (rHAPI; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- *N'*-(1-(2-hydroxyfenyl)propyl)isonikotinoylhydrazid (rHPPI; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-(1-(5-brom-2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid (BHAPI; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-(1-(5-brom-2-hydroxyfenyl)propyliden)isonikotinoylhydrazid (BHPPI; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-(1-(pyridin-2-yl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid (2API; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-(7-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yliden)isonikotinoylhydrazid (7HII; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-(1-(2-hydroxyfenyl)-2-methylpropyliden)isonikotinoylhydrazid (H16; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-(1-(2-hydroxyfenyl)-3-methylbutyliden)isonikotinoylhydrazid (H18; katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)



Struktura a čistota látek připravených na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty byla potvrzena  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrií (Varian Mercury-Vx BB 300 a VNMR S5000) a infračervenou spektrometrií (Nicolet Impact 4), teploty tání byly měřeny na Koflerově přístroji.



**Obr. 4.1.** Chemické struktury nově syntetizovaných látek studovaných v rámci této diplomové práce.

## 4.2 Metodiky

### 4.2.1 Buněčná linie H9c2

Buněčná linie H9c2 odvozená od nenádorových embryonálních kardiomyoblastů izolovaných z potkana kmene BD1X (*Rattus norvegicus*), která byla použita při všech pokusech, byla získána z americké banky buněčných linií (American Type Culture Collection; Rockville, MD, USA).

Tato linie je velmi často využívána jako model srdeční tkáně *in vitro* díky snadné pasážovatelnosti a velmi snadné dostupnosti potřebného počtu buněk.

#### 4.2.1.1 Kultivace

Buňky byly kultivovány v 75 cm<sup>2</sup> kultivačních lahvích v inkubátoru, při standardní teplotě 37 °C a v atmosféře, která svým 5% obsahem oxidu uhličitého napodobuje bilanci plynů uvnitř lidského těla.

Pro kultivaci buněk bylo použito médium DMEM, které navíc obsahovalo 10 % tepelně inaktivovaného fetálního hovězího séra, 1 % pufru HEPES (pH = 7,4) a 1 % směsi penicilinu a streptomycinu (dále jen SCM).

Všechny manipulace s buňkami byly prováděny za sterilních podmínek v laminárním boxu a veškeré přidávané tekutiny byly vytemperovány na 37 °C.

#### 4.2.1.2 Pasážování

Buňky byly zpasážovány každý 3. až 4. den po dosažení 80-90% konfluency do nových kultivačních nádob s čerstvým médiem. Ředění bylo voleno podle rychlosti dělení buněk a plánované doby mezi pasážemi tak, aby odpovídalo dosažení maximálně 80-90% konfluency před následujícím pasážováním.

Nejprve se slilo médium z buněk. Pro odstranění zbylého séra se provedly dva oplachy 5 ml PBS. Pak byly přidány 2 ml trypsinu s EDTA a kultivační lahev se nechala cca 5 minut inkubovat při 37 °C v inkubátoru. Poté se několikrát lehce uhodilo do hrany dna inkubační lahve, aby se všechny buňky uvolnily (zkontrolováno pod mikroskopem). Pro inaktivaci trypsinu bylo přidáno 10 ml SCM.

Po důkladné resuspendaci buněk v médiu pomocí sterilní pipety byl přenesen potřebný objem suspenze do nové sterilní kultivační lahve s potřebným množstvím čerstvého média – celkový objem SCM v lahvi byl maximálně 20 ml. Pomocí

jednoduchých pohybů byly buňky rovnoměrně rozprostřeny po celém dně lahve a lahev byla vložena do inkubátoru.

Zbylá suspenze buněk, která nebyla použita k udržení buněčné linie, byla použita na *in vitro* pokusy.

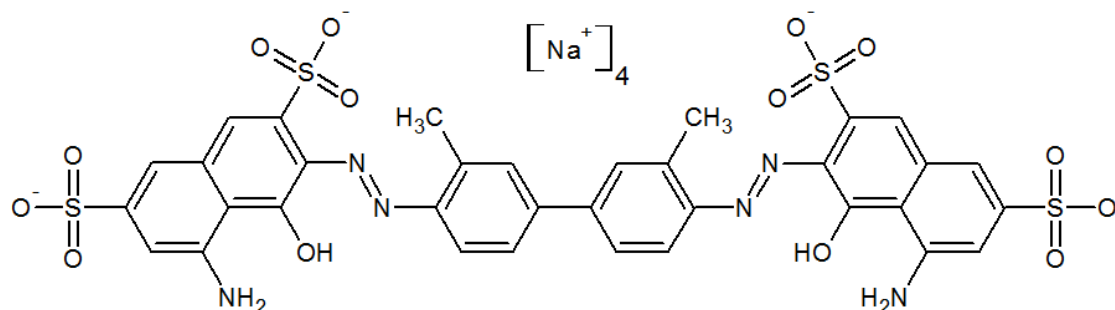
#### 4.2.1.3 Počítání buněk

Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce pod mikroskopem.

Po důkladném promíchání suspenze buněk bylo odebráno 100  $\mu$ l do mikrozskumavky se 100  $\mu$ l 0,4% roztoku trypanové modři. Vše se dobře promíchalo a nechalo stát cca 5 minutu při pokojové teplotě. Trypanová modř obarví pouze mrtvé buňky (modré), neboť živé buňky barvivo aktivně transportují ven ze svého nitra a zůstávají bezbarvé. Pozadí je v zorném poli světla modré.

Po stanovené době se obarvená suspenze důkladně promíchala a co nejrychleji se napipetovalo 10  $\mu$ l na každou polovinu Bürkerovy komůrky.

Pod mikroskopem se na každé polovině Bürkerovy komůrky spočítaly buňky v pěti z devíti čtverců a to vždy stejným způsobem. Výsledek se pak vynásobil číslem 2 000 a tím byl získán počet buněk v 1 ml suspenze.



Obr. 4.2. Chemická struktura trypanové modři.

#### 4.2.1.4 Studium kardioprotektivních účinků testovaných látek

##### 4.2.1.4.1 Schéma pokusů

Buněčná suspenze získaná při pasážování se naředila na hustotu 100 000 buněk/ml a důkladně se promíchala. Z vaničky byla tato suspenze pipetována multikanálovou pipetou na 96-jamkovou destičku, do každé jamky 100  $\mu$ l suspenze, tzn. 10 000 buněk na jamku. Destička byla poté vložena na 24 hodin do inkubátoru, aby se buňky přichytily na dně jamek.

Druhý den se ze všech jamek odpipetovalo médium a nahradilo se 200  $\mu$ l bezsérového média DMEM, které navíc obsahovalo 1 % pufru HEPES (pH = 7,4) a 1 % směsi penicilinu a streptomycinu (dále jen SFM), aby buňky přestaly proliferovat. Destička byla opět vložena na 24 hodin do inkubátoru.

Třetí den se ze všech jamek odpipetovalo staré médium, nahradilo se 100  $\mu$ l SFM a poté se do každé jamky přidalo dalších 100  $\mu$ l roztoků zkoušených látek ve dvojnásobné koncentraci než byla koncentrace požadovaná (výsledná). Poté se počkalo cca 15 minut, aby se studované látky mohly dostat do buněk a na závěr se přidalo 5  $\mu$ l roztoku peroxidu vodíku v SFM o předem stanovené koncentraci. Destičky se nechaly inkubovat při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po inkubaci následovalo vyhodnocení pomocí testu vychytávání neutrální červeně.

#### **4.2.1.4.2 Roztoky přidávané k buňkám před 24 hodinovou inkubací**

Roztoky testovaných látek byly na 96-jamkovou destičku nanášeny po sloupcích.

Na každé destičce byl první sloupec věnován negativní kontrole, tzn. všechny buňky byly po inkubaci mrtvé. Látkou pro negativní kontrolu byl 3% peroxid vodíku zředěný kultivačním médiem na koncentraci 0,01 M (výsledná koncentrace po přidání k buňkám byla 0,005 M).

Dále byly alespoň dva sloupce na každé destičce věnovány pozitivní kontrole. Do těchto sloupců bylo přidáno kultivační médium a rozpouštědlo, které bylo použito pro přípravu zásobních roztoků testovaných látek (DMSO), ve stejném množství, jako v ostatních jamkách na destičce. Pokud bylo v nějakém sloupci použito více rozpouštědla, byl na destičku přidán alespoň jeden sloupec s kontrolou s vyšší koncentrací rozpouštědla.

Do ostatních sloupců byly přidány roztoky zkoušených látek připravených v SFM z předpřipravených zásobních roztoků (viz 4.2.1.4.3). Při přípravě bylo dbáno na to, aby koncentrace rozpouštědla byla u všech vzorků stejná.

Dále byla do sloupců se zkoušenými látkami přidána směs kultivačního média a peroxid vodíku, jehož koncentrace byla určena v samostatném pokusu (viz 5.1.1).

### ***Testované látky***

Redukované formy potenciálních chelátorů železa rSIH, rHAPI, rHPPI byly studovány ve výsledných koncentracích 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  a 1 000  $\mu\text{M}$ . Chelátory SIH, BHAPI, BHPPI, 2API, 7HII, H16 a H18 byly studovány ve výsledných koncentracích 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . Potenciální chelátor H16 byl navíc zkoušen ve výsledné koncentraci 300  $\mu\text{M}$ .

Ve výsledných roztocích byl DMSO přítomen v koncentraci 0,1 %. Výjimkou byl roztok studované látky H16 o koncentraci 300  $\mu\text{M}$ , kde bylo obsaženo 0,3 % DMSO.

### ***Peroxid vodíku***

Roztok peroxidu vodíku v SFM byl do jednotlivých sloupců přidáván tak, aby byla výsledná koncentrace 200  $\mu\text{M}$ .

#### **4.2.1.4.3 Zásobní roztoky**

##### ***Aroylhydrazonové chelátory železa***

Aroylhydrazonové chelátory jsou velmi málo rozpustné ve vodě. Proto bylo pro zásobní roztoky jako rozpouštědlo použito DMSO, kde jsou chelátory rozpustné a navíc jsou chráněny před hydrolyzou.

Připravovalo se 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku studovaných látek rSIH, rHAPI, rHPPI o koncentraci 1 M rozpuštěním práškových látek v DMSO. Z těchto roztoků byly pak ještě ředěním pomocí DMSO připraveny koncentrace 100 mM a 10 mM.

U chelátorů SIH, BHAPI, BHPPI, 2API, 7HII, H16 a H18 se připravovalo 200  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku o koncentraci 100 mM rozpuštěním práškových chelátorů v DMSO. Z těchto roztoků byly pak ještě pomocí DMSO připraveny koncentrace 10 mM a 1 mM.

Takto připravené roztoky byly uchovávány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby se zabránilo kontaminaci vzdušnou vlhkostí a degradaci vzorku.

#### **4.2.1.5 Studium kardiotoxických účinků testovaných látek**

##### **4.2.1.5.1 Schéma pokusů**

Buněčná suspenze získaná při pasážování se naředila na hustotu 100 000 buněk/ml a důkladně se promíchala. Z vaničky byla tato suspenze pipetována multikanálovou pipetou na 96-jamkovou destičku, do každé jamky 100  $\mu$ l suspenze, tzn. 10 000 buněk na jamku. Destička byla poté vložena na 24 hodin do inkubátoru, aby se buňky přichytily na dně jamek.

Druhý den se ze všech jamek odpipetovalo médium a nahradilo se 200  $\mu$ l bezsérového média SFM (viz výše). Destička byla opět vložena na 24 hodin do inkubátoru.

Třetí den se ze všech jamek odpipetovalo staré médium, nahradilo se 100  $\mu$ l SFM a poté se do každé jamky přidalo dalších 100  $\mu$ l roztoků zkoušených látek ve dvojnásobné koncentraci než byla koncentrace požadovaná (výsledná). Destičky se nechaly inkubovat při 37 °C po dobu 72 hodin.

Po inkubaci následovalo vyhodnocení pomocí testu vychytávání neutrální červeně.

##### **4.2.1.5.2 Roztoky přidávané k buňkám před 72 hodinovou inkubací**

Roztoky byly na 96-jamkovou destičku nanášeny po sloupcích.

Na každé destičce byly sloupce věnované negativní kontrole a pozitivní kontrole, jak je to popsáno v bodě 4.2.1.4.2. Do ostatních sloupců byly přidány roztoky zkoušených látek připravených v SFM z předpřipravených zásobních roztoků (viz 4.2.1.4.3). Při přípravě bylo dbáno na to, aby koncentrace rozpouštědla byla u všech vzorků stejná.

#### ***Aroylhydrazonové chelátory železa***

Potenciální chelátory železa rSIH, rHAPI, rHPPI byly studovány ve výsledných koncentracích 50  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M a 500  $\mu$ M. Chelátory BHAPI, BHPPI, 2API, 7HII, H16 a H18 byly studovány ve výsledných koncentracích 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Chelátor SIH byl studován ve výsledných koncentracích 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M a 300  $\mu$ M.

Ve výsledných roztocích byl DMSO přítomen v koncentraci 0,1 %. Výjimkou byl roztok chelátoru SIH o koncentraci 300  $\mu\text{M}$ , kde bylo obsaženo 0,3 % DMSO.

#### **4.2.1.5.3 Zásobní roztoky**

Byly použity stejné zásobní roztoky studovaných látek o stejných koncentracích jako v bodě 4.2.1.4.3.

### **4.2.2 Vyhodnocení pokusů**

#### **4.2.2.1 Test vychytávání neutrální červeně**

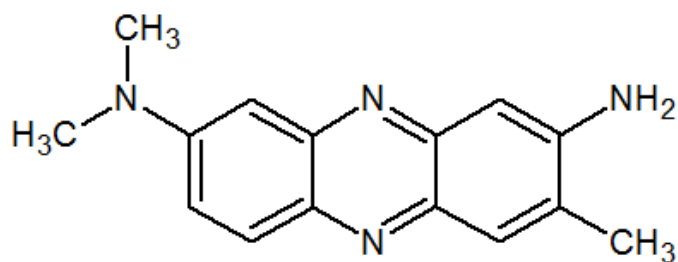
Po 24 hodinové inkubaci se studovanými látkami a peroxidem vodíku či po 72 hodinové inkubaci se studovanými látkami bylo z každé jamky odsáto 100  $\mu\text{l}$  média. Poté se přidalo 100  $\mu\text{l}$  roztoku neutrální červeně o koncentraci 80  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledná koncentrace neutrální červeně po přidání tedy byla 40  $\mu\text{g/ml}$ .

Roztok, který se přidával, byl získán naředěním komerčně dostupného zásobního roztoku o koncentraci 3,3 g/l kultivačním médiem v čas potřeby.

Buňky se nechaly 3 hodiny inkubovat. Poté se tekutina z jamek odpipetovala. Do každé jamky se přidalo 100  $\mu\text{l}$  fixačního roztoku a destičky se nechaly stát při pokojové teplotě 15 minut. Pak se roztok odsál a buňky se dvakrát opláchly 100  $\mu\text{l}$  PBS pufrem. Po opláchnutí se přidalo 200  $\mu\text{l}$  lyzačního roztoku a opět se nechalo stát při pokojové teplotě 15 minut. Destičky se umístily na třepačku a třepaly se dalších 15 minut při 650 otáčkách za minutu.

U takto připravených destiček jsme měřili absorbanci při 540 nm na přístroji TECAN. Absorbanci negativní kontroly jsme odečetli od ostatních sloupců.

Tato metoda je založena na schopnosti živých buněk začlenit a vázat barvivo neutrální červeně. Jedná se o slabě kationové barvivo, které proniká přes buněčné membrány a koncentruje se v lyzozomech (Repetto et al. 2008). Můžeme tedy konstatovat, že čím větší je absorbance naměřená v dané jamce, tím více životaschopných buněk tam bylo.



**Obr. 4.3.** Chemická struktura molekuly neutrální červeně.

#### 4.2.2.1.1 Roztoky potřebné při vyhodnocení

Všechny níže uvedené roztoky byly připravovány do zásoby a uchovávány při pokojové teplotě.

##### ***PBS pufr***

Byl připraven rozpuštěním komerčně dostupných tablet v předepsaném množství MQ-vody.

##### ***Fixační roztok pro test vychytávání neutrální červeně***

Jedná se o 0,5% roztok formaldehydu v 1% roztoku chloridu vápenatého.

##### ***Lyzační roztok pro test vychytávání neutrální červeně***

Jedná se o 1% roztok kyseliny octové v 50% ethanolu.

#### 4.2.2.2 Fotografická dokumentace

K fluorescenční mikroskopii byl použit mikroskop Nikon Eclipse TS100-F s objektivy 10x/0,25 (Nikon Corporation, Japonsko). Pro pořizování fotografické dokumentace je k mikroskopu připojena chlazená CCD kamera COOL-13Q (VDS Vosskühler GmbH, Německo). Jako UV zdroj byl použit Nikon S-CHG s rtuťovou lampou. Filtry Texas Red (TxR) a FITC jsou rovněž od firmy Nikon. Ke zpracování snímků byl použit program NIS-Elements AR 2.20 (Laboratory Imaging s.r.o., Česká republika).

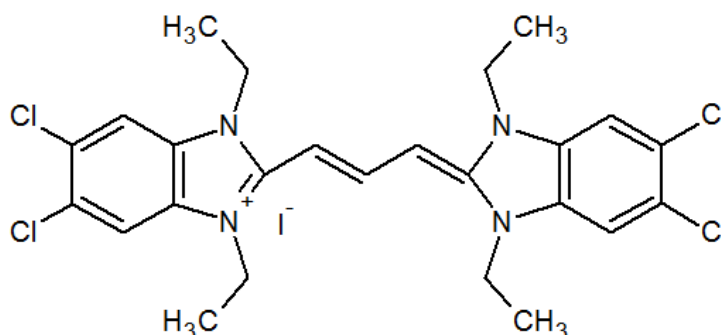
##### 4.2.2.2.1 Fluorescenční barvení mitochondrií

K fotografické dokumentaci mitochondrií byla použita fluorescenční sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbocyanin jodid). Jedná se



o kationické barvivo indikující potenciál na membráně mitochondrií. Barva sondy se odvíjí od potenciálově-citlivého barevného posunu (akumulace v místech s vysokým elektrickým potenciálem – např. nepoškozené mitochondrie). V mitochondriích je tedy vysoká koncentrace tohoto barviva, které zde dimerizuje za tvorby tzv. J-agregátů, jež fluoreskují červeně. Pokud dojde k poškození mitochondriální membrány a narušení jejího potenciálu, uniká barvivo volně do cytoplazmy, kde má nižší koncentraci, nevytváří dimery a fluoreskuje jasně zeleně.

K buňkám 24 hodin inkubovaným se studovanými látkami se přidalo 20  $\mu$ l 50  $\mu$ M JC-1 sondy, takže výsledná koncentrace byla 1  $\mu$ M. Buňky se nechaly 30 minut inkubovat v temnu při 37  $^{\circ}$ C. Poté se dvakrát opláchly 1 ml ADS pufru s 1 g/l glukózy.



**Obr. 4.4.** Chemická struktura fluorescenční sondy JC-1.

#### 4.2.3 Statistické zpracování dat

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat pro Windows 3.0 (SPSS, USA). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty měření se standardními chybami (+ SE) daného počtu experimentů (n). Pro detekci odlehlých hodnot byl použit Grubbsův test. Pro vypočítání statistické významnosti se využila metoda One-Way ANOVA s Bonferroniho *post hoc* testem pro hodnoty s normálním rozložením. Pro hodnoty bez normálního rozložení se využila metoda One-Way ANOVA on Ranks s Dunnyho *post hoc* testem.

K vypočítání hodnot  $EC_{50}$  a  $TC_{50}$  byl použit software CalcuSyn 2.0 (BioSoft, Velká Británie). Hodnota  $EC_{50}$  je koncentrace, která vede k ochraně 50 % buněk. Hodnota  $TC_{50}$  je koncentrace, která vede k usmrcení 50 % buněk.

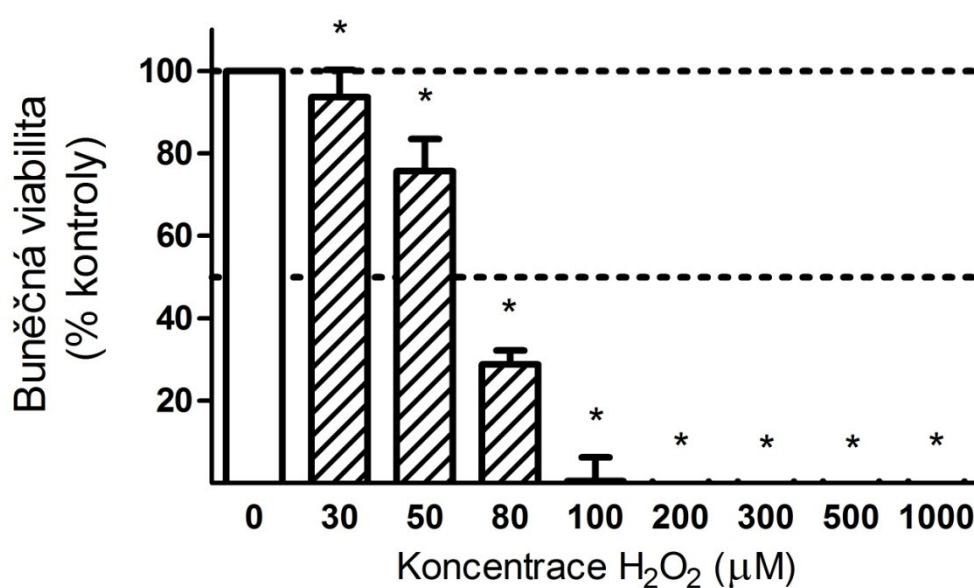
K sestrojení grafů byl použit program GraphPad Prism 6.0 pro Windows.

## 5. Výsledky

### 5.1 Úvodní experimenty

#### 5.1.1 Toxicita peroxidu vodíku

Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi peroxidu vodíku byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk, a to již od 30  $\mu\text{M}$  koncentrace.  $\text{TC}_{50}(\text{H}_2\text{O}_2) = 62,39 \pm 1,70 \mu\text{M}$ .

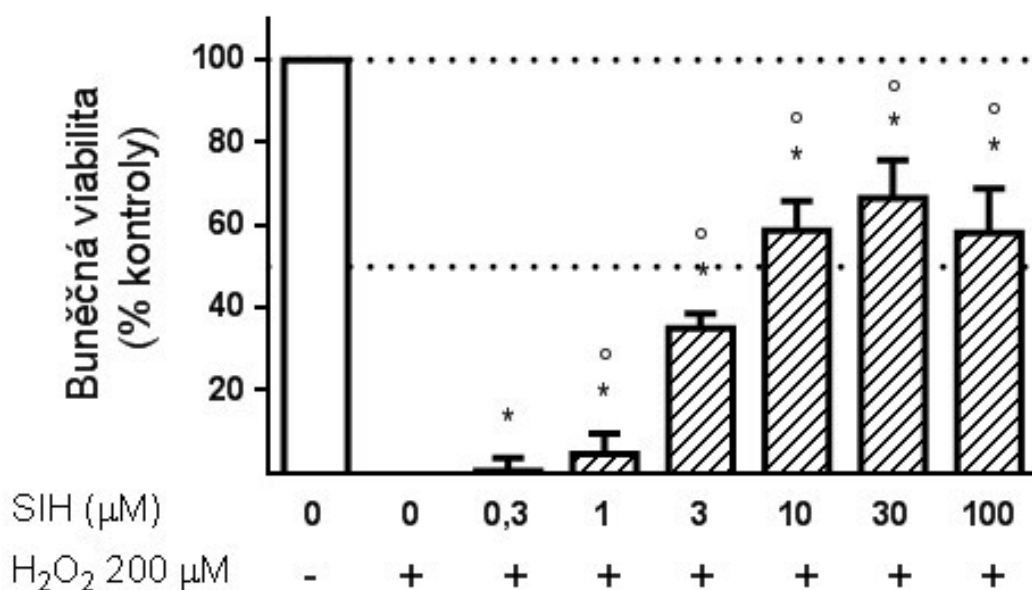


**Obr. 5.1.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi peroxidu vodíku hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty + SE,  $n = 4$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

Pro zjišťování, zda jsou nové chelátory železa schopny ochránit srdeční buňky před oxidačním poškozením, byl použit 200  $\mu\text{M}$  peroxid vodíku, který snížil viabilitu buněk na 0 % oproti kontrolní skupině (100 %).

### 5.1.2 Kardioprotektivní účinky referenčního chelátoru železa SIH

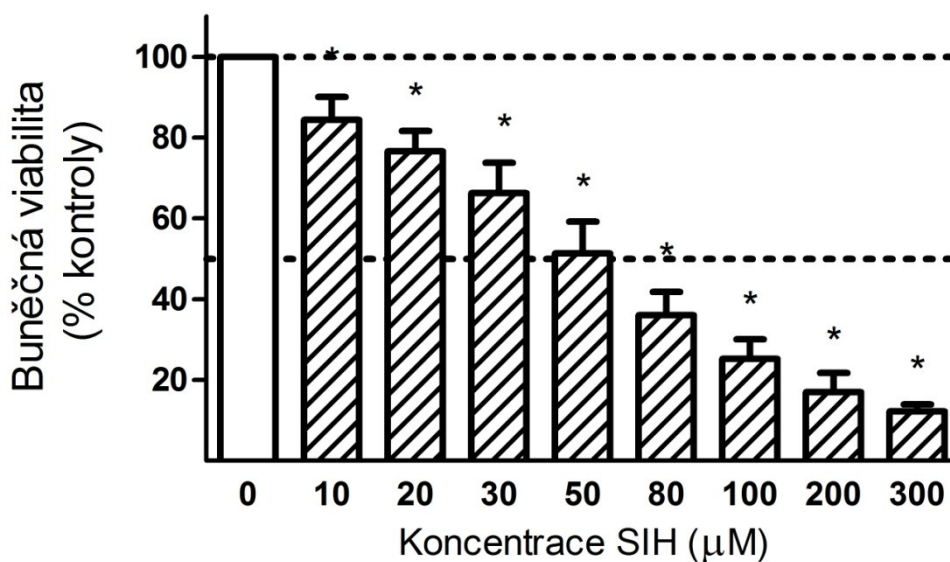
Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa SIH bylo testem vychytávání neutrální červeně zaznamenáno statisticky významné, dávkově závislé zvýšení viability buněk již od 1  $\mu\text{M}$  koncentrace. Nejvyšší protekce bylo dosaženo při použití koncentrace 30  $\mu\text{M}$  SIH, kdy bylo ochráněno 67 % buněk (ve srovnání s kontrolní skupinou 100 %).  $\text{EC}_{50}$  (SIH) = 17,63  $\pm$  1,38  $\mu\text{M}$ .



**Obr. 5.2.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa SIH hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE, n = 11. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

### 5.1.3 Kardiotoxické účinky referenčního chelátoru železa SIH

Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa SIH byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk již od 10  $\mu\text{M}$  koncentrace.  $\text{TC}_{50}$  (SIH) =  $49,47 \pm 1,77 \mu\text{M}$ .

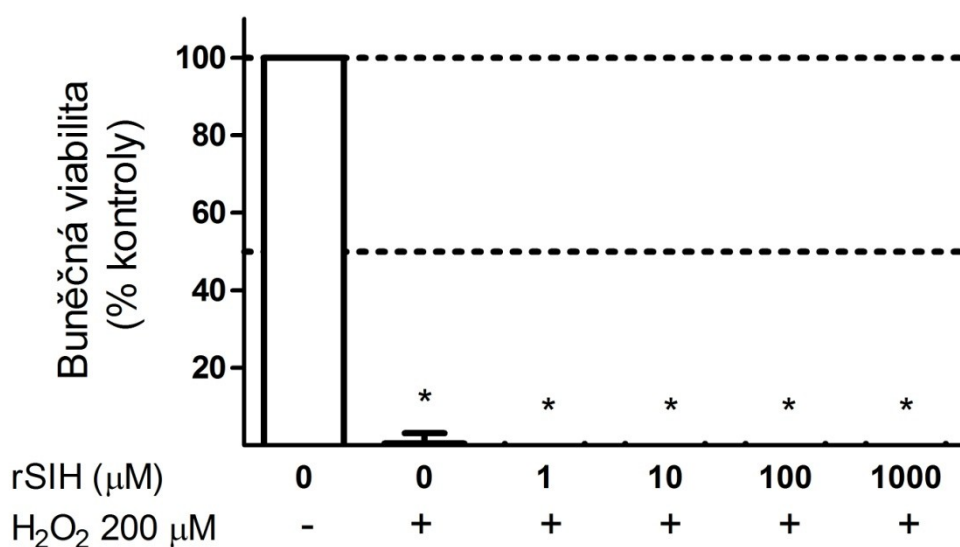


**Obr. 5.3.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa SIH hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 4$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

## 5.2 Studium kardioprotektivních účinků nových derivátů

### 5.2.1 Studium kardioprotektivních účinků rSIH

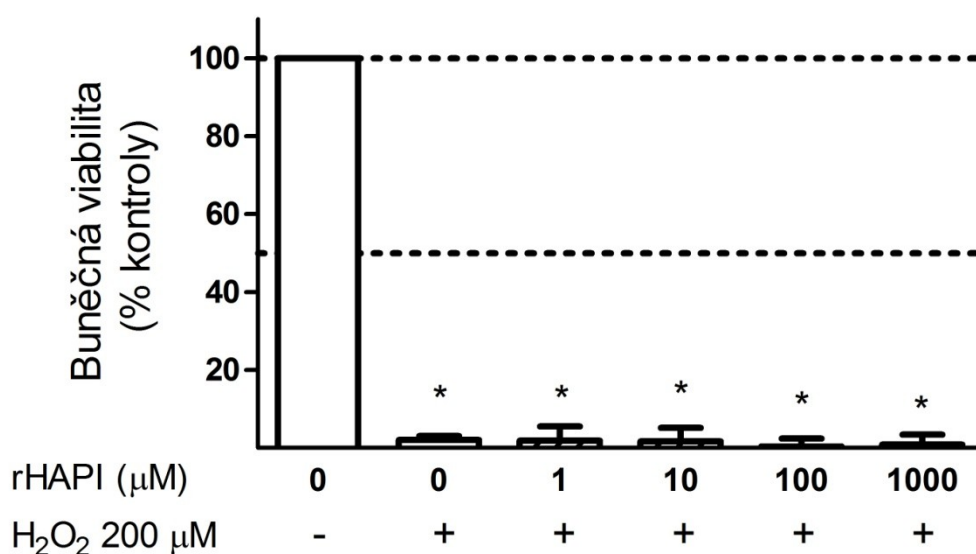
Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi rSIH byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný pokles viability buněk. Studovaná látka rSIH nebyla schopna v žádné ze zkoušených koncentrací ochránit buňky před poškozením vyvolaným 200  $\mu\text{M}$  peroxidem vodíku. Míra viability buněk byla při všech zkoušených koncentracích rSIH 0 % oproti kontrolní skupině (100 %).  $\text{EC}_{50}$  (rSIH) nebylo možné vypočítat.



**Obr. 5.4.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi rSIH hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE,  $n = 4$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

## 5.2.2 Studium kardioprotektivních účinků rHAPI

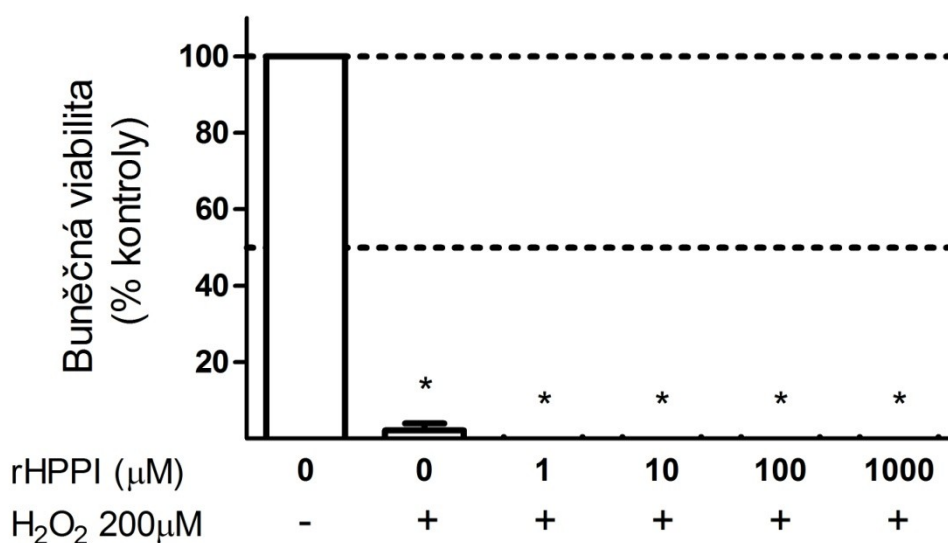
Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi rHAPI byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný pokles viability buněk. Studovaná látka rHAPI nebyla schopna v žádné ze zkoušených koncentrací ochránit buňky před poškozením vyvolaným 200  $\mu\text{M}$  peroxidem vodíku. Míra viability buněk se při všech zkoušených koncentracích rHAPI pohybovala v rozmezí 0 % až 2 % oproti kontrolní skupině (100 %).  $\text{EC}_{50}$  (rHAPI) nebylo možné vypočítat.



**Obr. 5.5.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi rHAPI hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE,  $n = 4$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

### 5.2.3 Studium kardioprotektivních účinků rHPPI

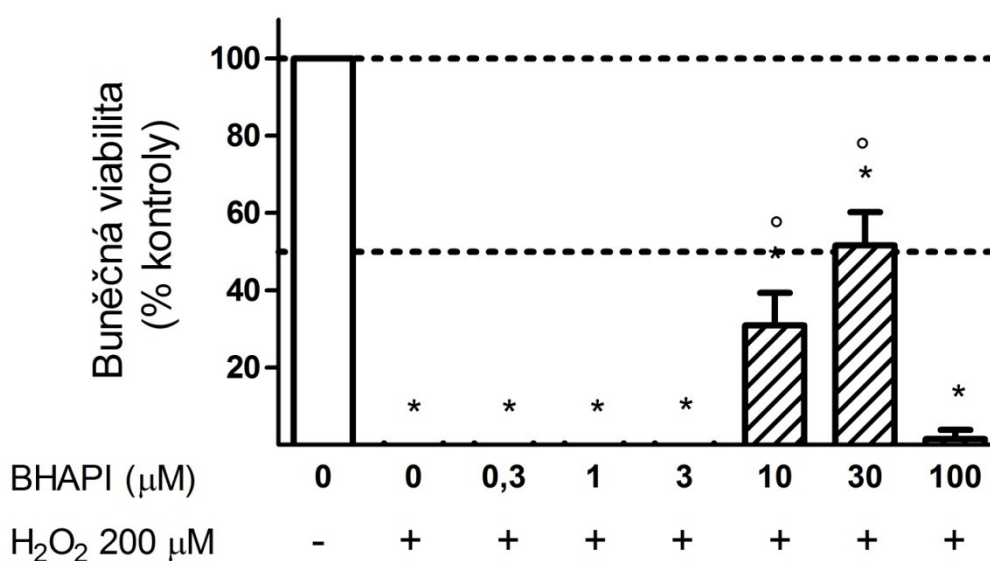
Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi rHPPI byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný pokles viability buněk. Studovaná látka rHPPI nebyla schopna v žádné ze zkoušených koncentrací ochránit buňky před poškozením vyvolaným 200  $\mu\text{M}$  peroxidem vodíku. Míra viability buněk byla při všech zkoušených koncentracích rHPPI 0 % oproti kontrolní skupině (100 %).  $\text{EC}_{50}$  (rHPPI) nebylo možné vypočítat.



**Obr. 5.6.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi rHPPI hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE,  $n = 3$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

### 5.2.4 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa BHAPI

Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa BHAPI bylo testem vychytávání neutrální červeně zaznamenáno statisticky významné, dávkově závislé zvýšení viability buněk od 10  $\mu\text{M}$  koncentrace. Nejvyšší protekce bylo dosaženo při použití koncentrace 30  $\mu\text{M}$  BHAPI, kdy bylo ochráněno 52 % buněk (ve srovnání s kontrolní skupinou 100 %). Při nejvyšší zkoušené koncentraci 100  $\mu\text{M}$  BHAPI míra viability buněk rapidně poklesla na 2 % oproti kontrolní skupině (100 %).  $\text{EC}_{50}$  (BHAPI) =  $30,34 \pm 7,23 \mu\text{M}$ .

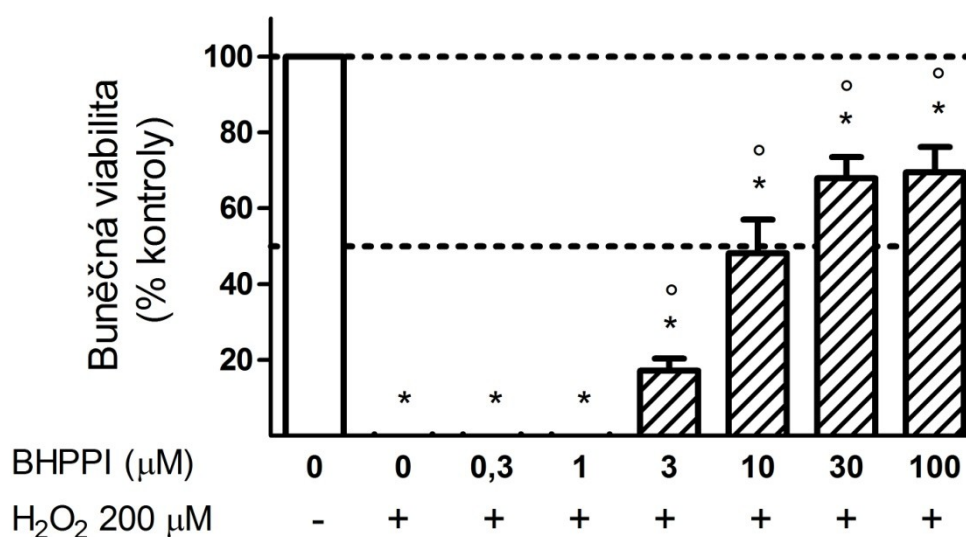


**Obr. 5.7.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa BHAPI hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE,  $n = 4$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.



### 5.2.5 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa BHPPI

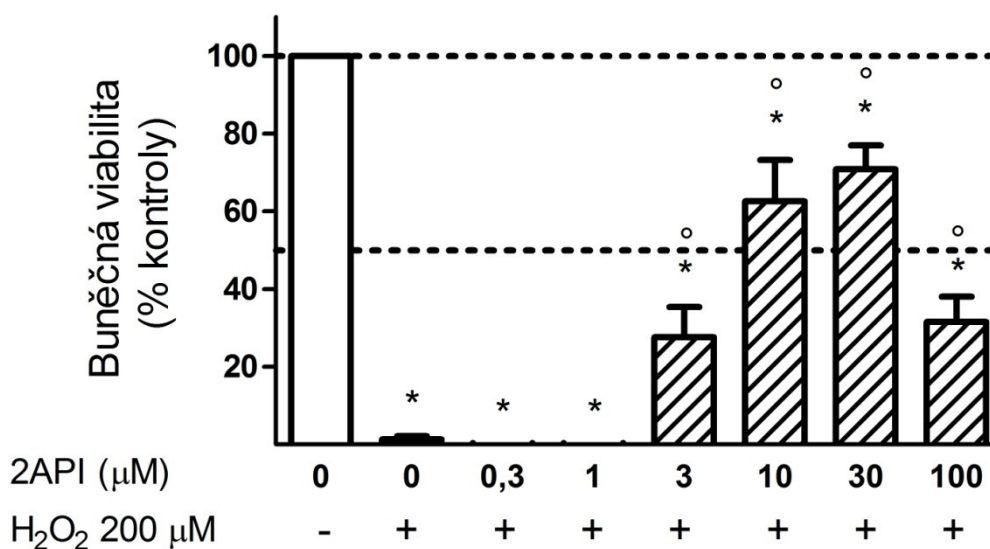
Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa BHPPI bylo testem vychytávání neutrální červeně zaznamenáno statisticky významné, dávkově závislé zvýšení viability buněk od 3  $\mu\text{M}$  koncentrace. Nejvyšší protekce bylo dosaženo při použití koncentrace 100  $\mu\text{M}$  BHPPI, kdy bylo ochráněno 69 % buněk (ve srovnání s kontrolní skupinou 100 %).  $\text{EC}_{50}$  (BHPPI) =  $17,18 \pm 4,39 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.8.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa BHPPI hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE,  $n = 6$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

### 5.2.6 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa 2API

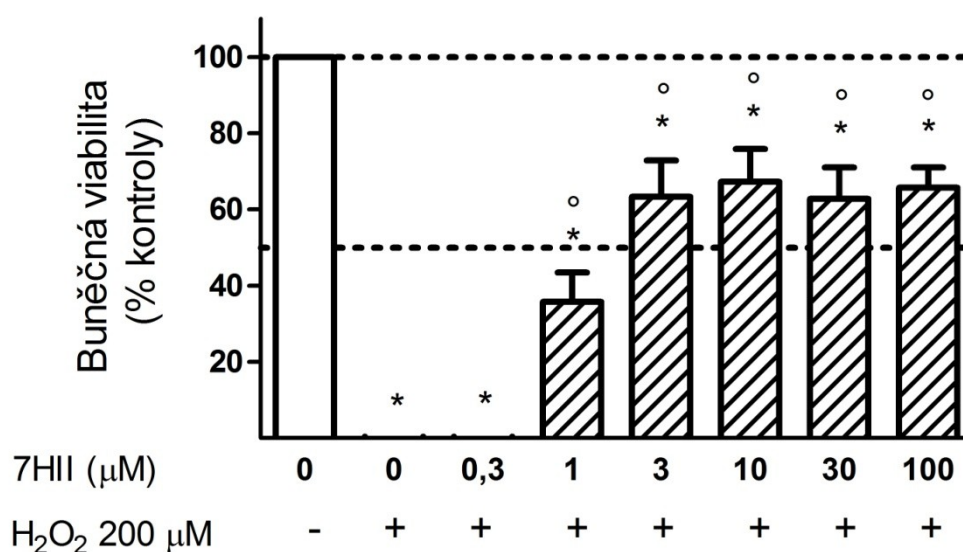
Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa 2API bylo testem vychytávání neutrální červeně zaznamenáno statisticky významné, dávkově závislé zvýšení viability buněk od 3  $\mu\text{M}$  koncentrace. Nejvyšší protekce bylo dosaženo při použití koncentrace 30  $\mu\text{M}$  2API, kdy bylo ochráněno 71 % buněk (ve srovnání s kontrolní skupinou 100 %).  $\text{EC}_{50}$  (2API) =  $8,48 \pm 3,11 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.9.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa 2API hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE,  $n = 5$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

### 5.2.7 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa 7HII

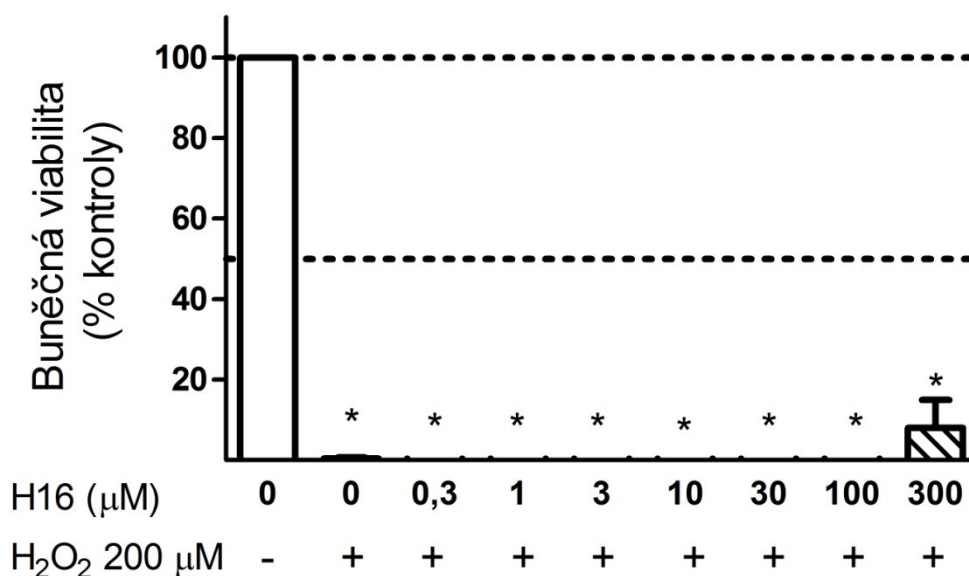
Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa 7HII bylo testem vychytávání neutrální červeně zaznamenáno statisticky významné, dávkově závislé zvýšení viability buněk od 1  $\mu\text{M}$  koncentrace. Od následné koncentrace (3  $\mu\text{M}$ ) do nejvyšší zkoušené koncentrace (100  $\mu\text{M}$ ) 7HII se viabilita buněk pohybovala v rozmezí 63 % až 67 %. Nejvyšší protekce bylo dosaženo při použití koncentrace 10  $\mu\text{M}$  7HII, kdy bylo ochráněno 67 % buněk (ve srovnání s kontrolní skupinou 100 %).  $\text{EC}_{50}$  (7HII) =  $2,68 \pm 1,30 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.10.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa 7HII hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE,  $n = 6$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

### 5.2.8 Studium kardioprotektivních účinků H16

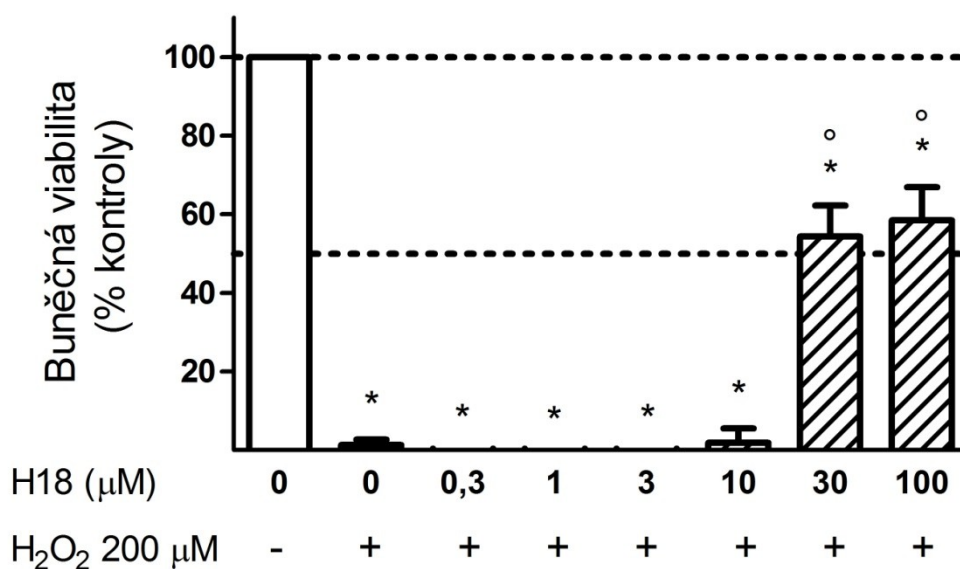
Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi H16 byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný pokles viability buněk. Studovaná látka H16 nebyla schopna ve většině zkoušených koncentrací ochránit buňky před poškozením vyvolaným 200  $\mu\text{M}$  peroxidem vodíku. Při koncentraci 300  $\mu\text{M}$  H16 bylo ochráněno 8 % buněk oproti kontrolní skupině (100 %).  $\text{EC}_{50}$  (H16) nebylo možné vypočítat.



**Obr. 5.11.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi H16 hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE, n = 6. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

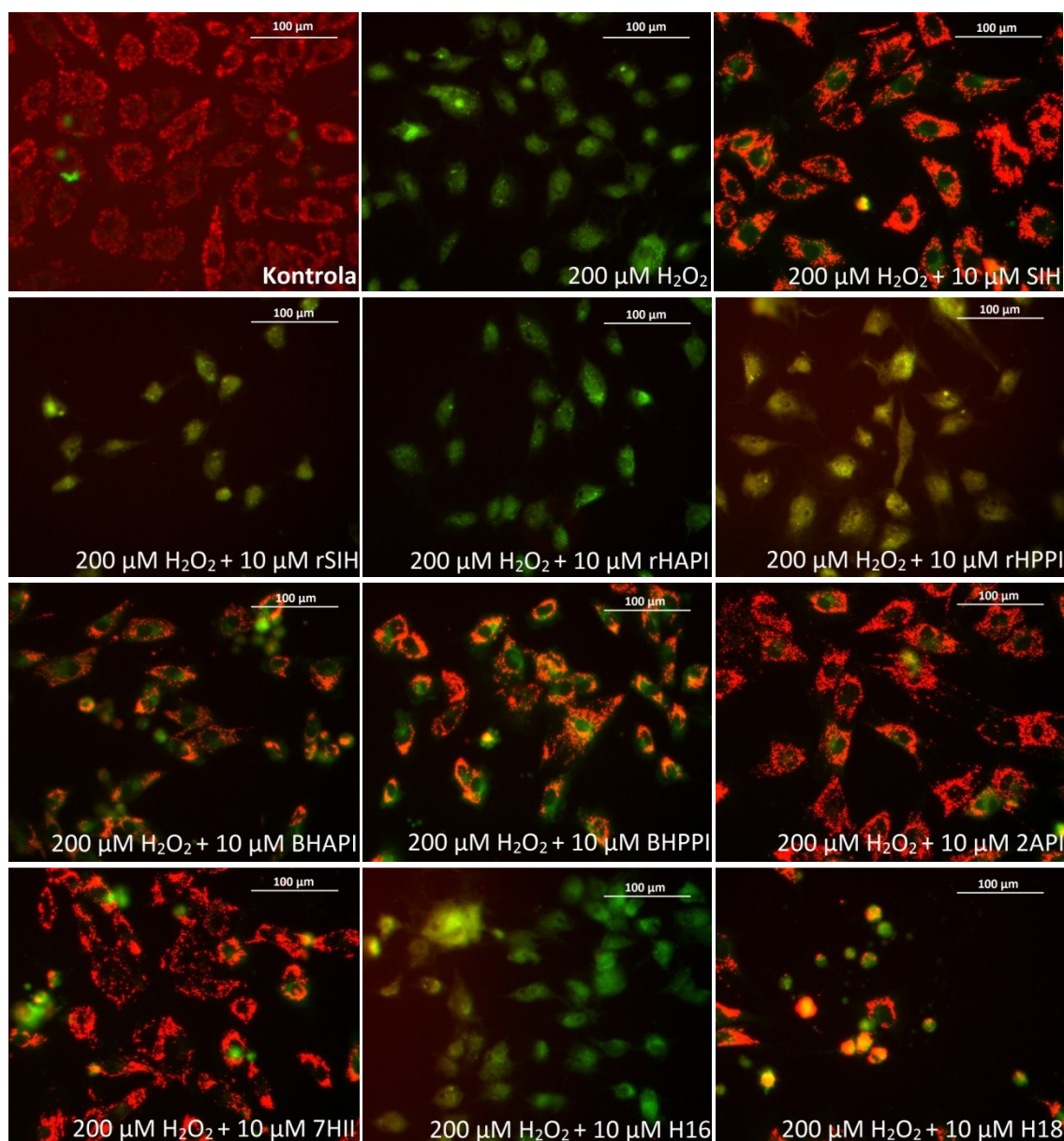
### 5.2.9 Studium kardioprotektivních účinků chelátoru železa H18

Po 24 hodinové inkubaci buněk H9c2 s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa H18 bylo testem vychytávání neutrální červeně zaznamenáno statisticky významné, dávkově závislé zvýšení viability buněk od 30  $\mu\text{M}$  koncentrace. Nejvyšší protekce bylo dosaženo při použití koncentrace 100  $\mu\text{M}$  H18, kdy bylo ochráněno 58 % buněk (ve srovnání s kontrolní skupinou 100 %).  $\text{EC}_{50}$  (H18) =  $27,76 \pm 3,90 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.12.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200  $\mu\text{M}$  roztokem peroxidu vodíku v kombinaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa H18 hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty + SE, n = 6. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

## 5.2.10 Srovnání kardioprotektivních účinků zkoušených látek

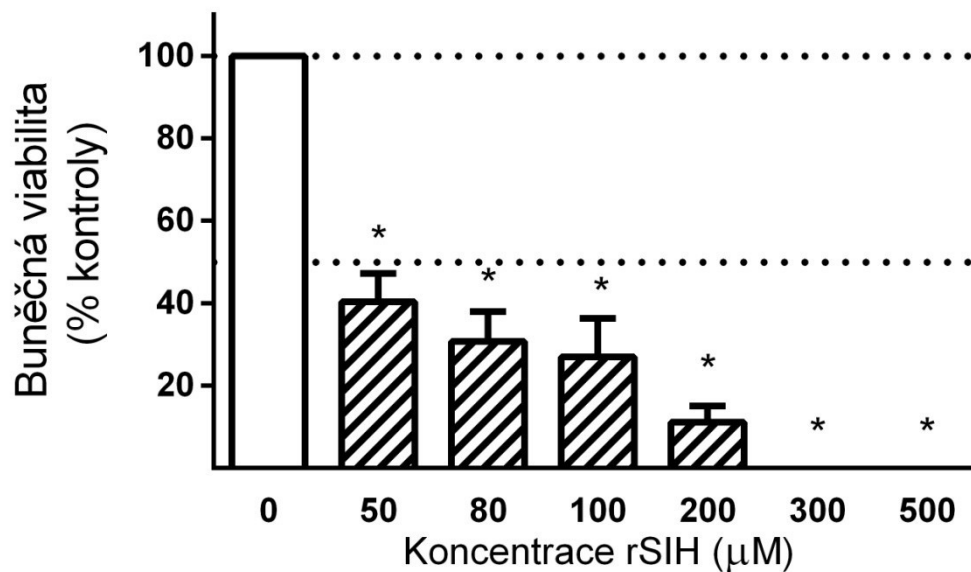


**Obr. 5.13.** Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> samotným anebo v kombinaci s 10 μM chelátorem SIH či studovanými látkami rSIH, rHAPI, rHPPI, BHAPI, BHPPI, 2API, 7HII, H16 nebo H18 po barvení fluorescenční sondou JC-1, která se akumuluje v místech s vysokým elektrickým potenciálem – např. nepoškozené mitochondrie. V mitochondriích viabilních buněk je tedy vysoká koncentrace tohoto barviva, které zde dimerizuje za tvorby tzv. J-agregátů, jež fluoreskují červeně. Pokud dojde k poškození mitochondriální membrány a narušení jejího potenciálu, uniká barvivo volně do cytoplazmy, kde má nižší koncentraci, nevytváří dimery a fluoreskuje jasně zeleně.

## 5.3 Studium kardiotoxických účinků nových derivátů

### 5.3.1 Studium kardiotoxických účinků rSIH

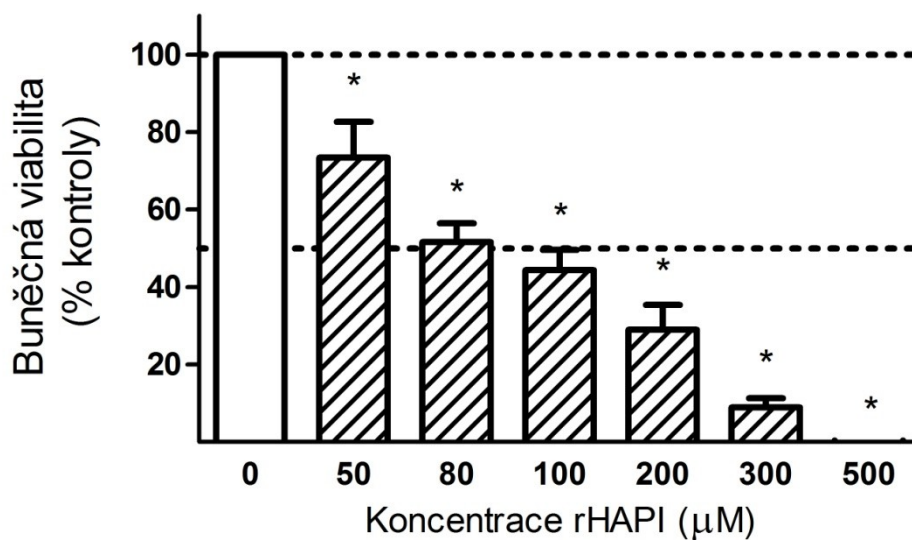
Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi rSIH byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk od 50  $\mu\text{M}$  koncentrace.  $\text{TC}_{50}$  (rSIH) =  $39,59 \pm 5,11 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.14.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi rSIH hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 4$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

### 5.3.2 Studium kardiotoxických účinků rHAPI

Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi rHAPI byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk od 50  $\mu\text{M}$  koncentrace.  $\text{TC}_{50}$  (rHAPI) =  $83,96 \pm 2,76 \mu\text{M}$ .

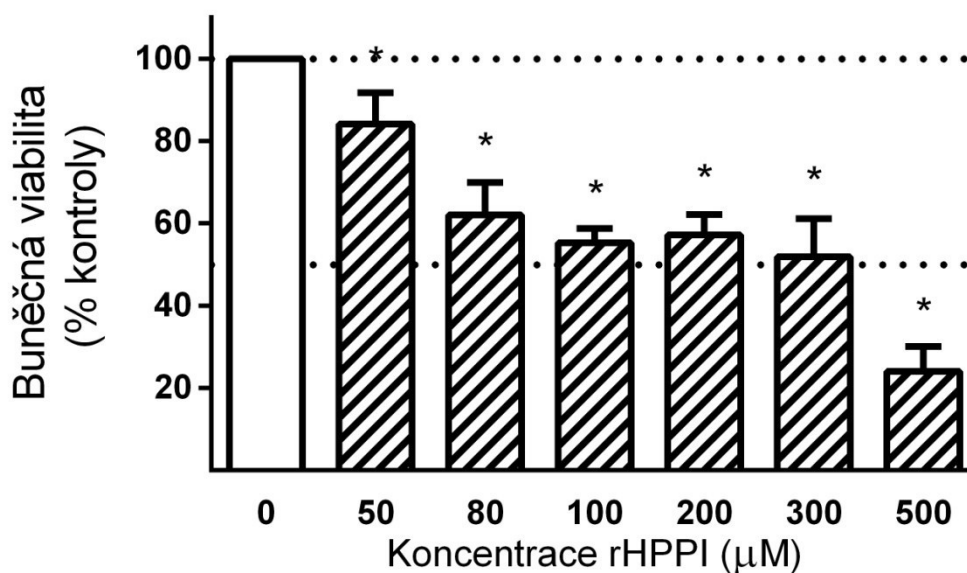


**Obr. 5.15.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi rHAPI hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 4$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.



### 5.3.3 Studium kardiotoxických účinků rHPPI

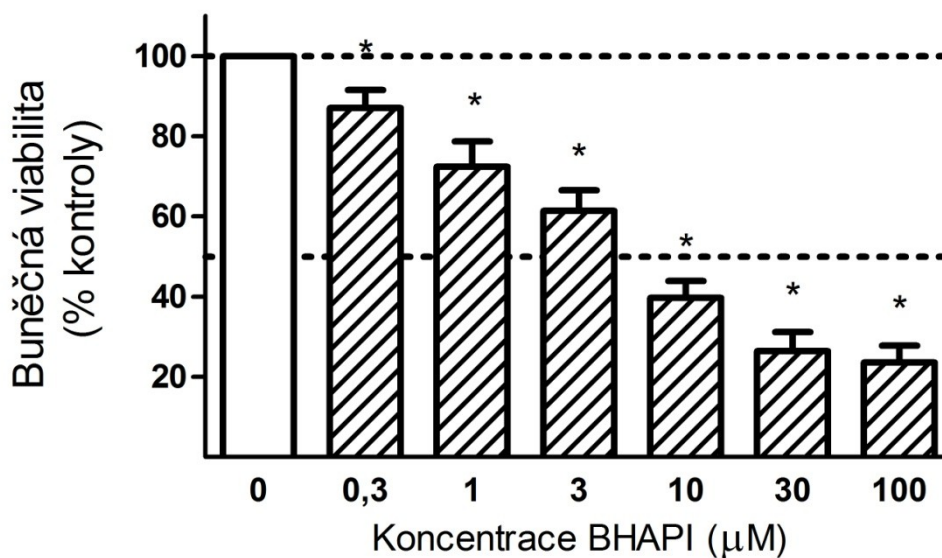
Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi rHPPI byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk od 50  $\mu\text{M}$  koncentrace.  $\text{TC}_{50}$  (rHPPI) =  $226,12 \pm 6,31 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.16.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi rHPPI hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 4$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

### 5.3.4 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa BHAPI

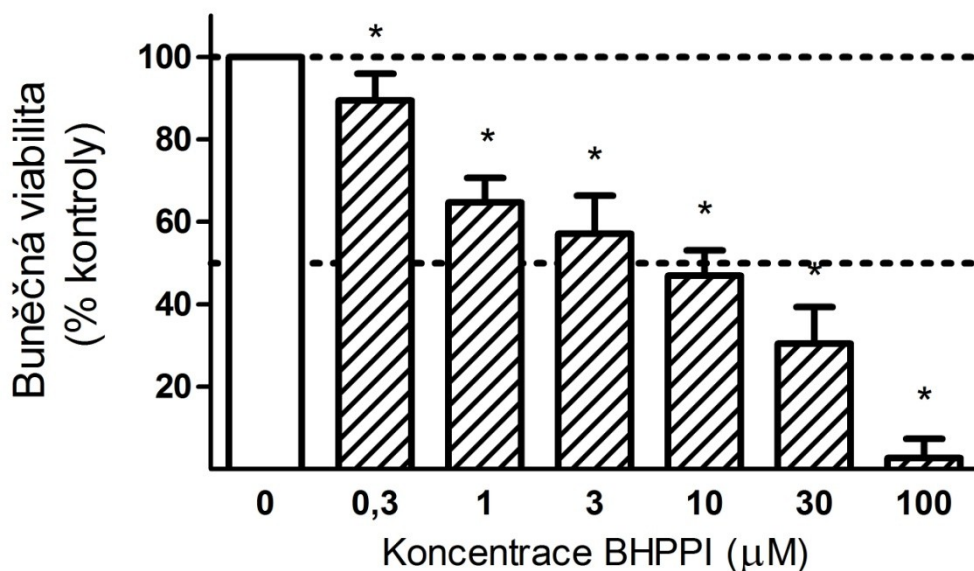
Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa BHAPI byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk od 0,3  $\mu\text{M}$  koncentrace.  $\text{TC}_{50}$  (BHAPI) =  $6,99 \pm 0,82 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.17.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa BHAPI hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 4$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

### 5.3.5 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa BHPPI

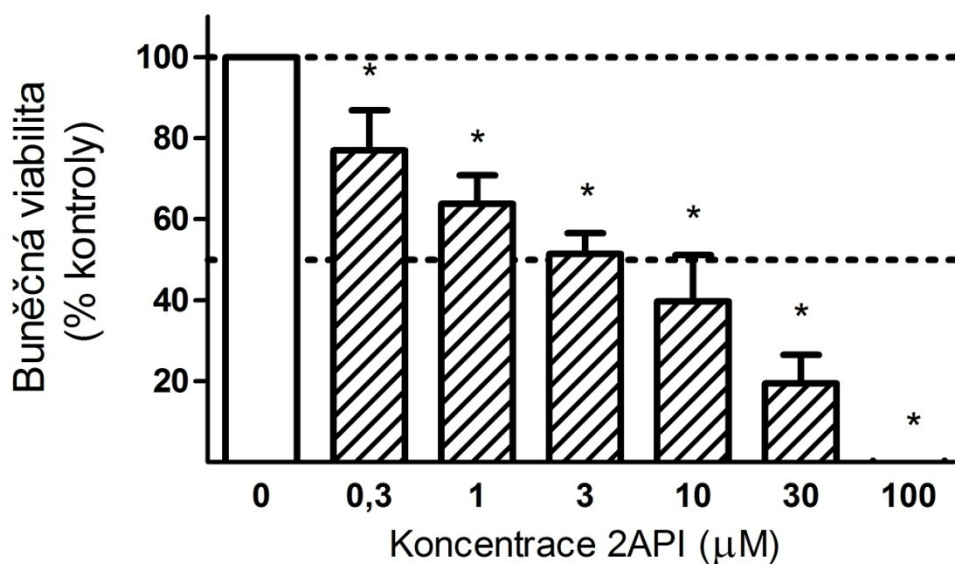
Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa BHPPI byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk od 0,3  $\mu\text{M}$  koncentrace.  $\text{TC}_{50}$  (BHPPI) =  $6,31 \pm 0,59 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.18.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa BHPPI hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 6$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

### 5.3.6 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa 2API

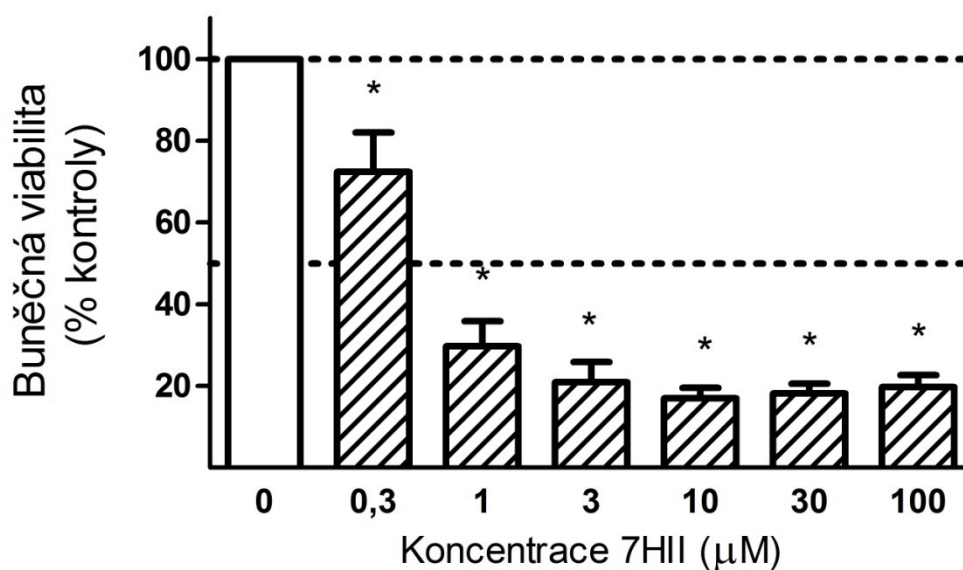
Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa 2API byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk od 0,3  $\mu\text{M}$  koncentrace.  $\text{TC}_{50}$  (2API) =  $3,07 \pm 0,55 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.19.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa 2API hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 3$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

### 5.3.7 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa 7HII

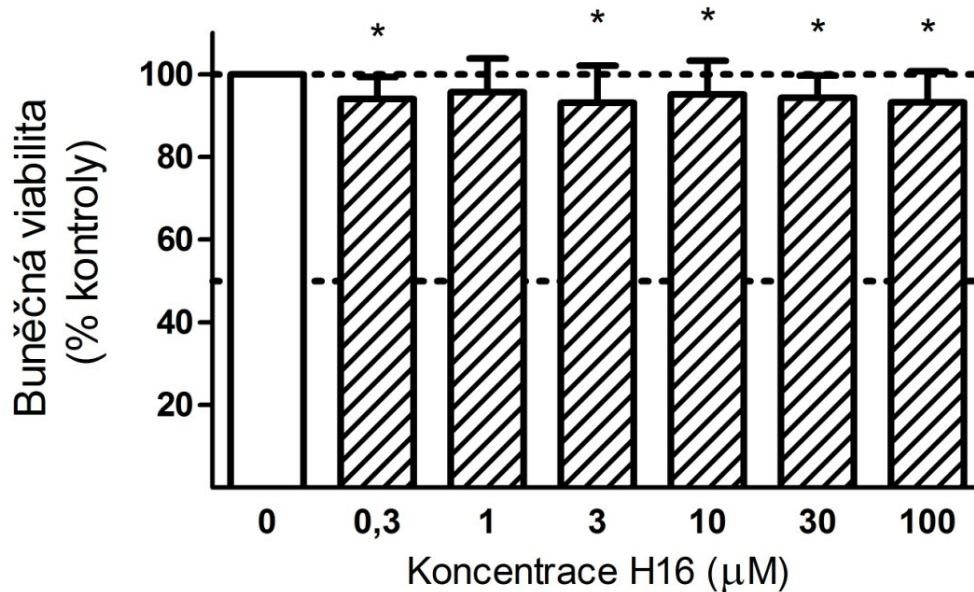
Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa 7HII byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk od 0,3  $\mu\text{M}$  koncentrace. Při následných zkoušených koncentracích se hodnoty viability pohybovaly v rozmezí 30 % až 18 % oproti kontrolní skupině (100 %). Nejvyšší toxicita byla způsobena koncentrací 10  $\mu\text{M}$  7HII.  $\text{TC}_{50}$  (7HII) =  $0,62 \pm 0,17 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.20.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa 7HII hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 6$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

### 5.3.8 Studium kardiotoxických účinků H16

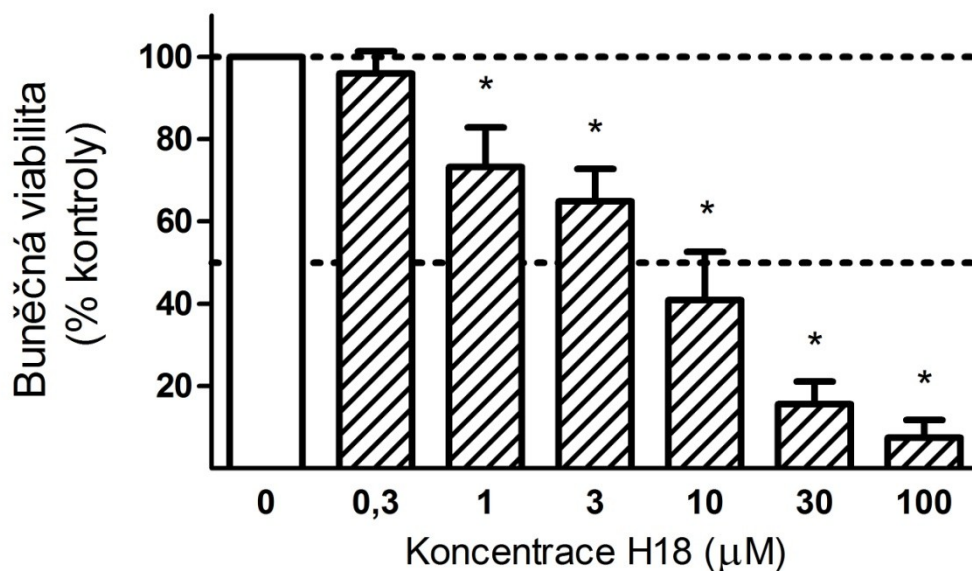
Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi H16 byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný pokles viability buněk při 0,3  $\mu\text{M}$ ; 3  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 30  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  koncentracích. Ovšem snížení viability buněk se pohybovalo pouze v rozmezí 93 % až 96 % oproti kontrolní skupině (100 %).  $\text{TC}_{50}$  (H16) nebylo možné vypočítat.



**Obr. 5.21.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi H16 hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 6$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

### 5.3.9 Studium kardiotoxických účinků chelátoru železa H18

Po 72 hodinové inkubaci buněk H9c2 se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa H18 byl testem vychytávání neutrální červeně zaznamenán statisticky významný, dávkově závislý pokles viability buněk od 1  $\mu\text{M}$  koncentrace.  $\text{TC}_{50}$  (H18) =  $7,40 \pm 2,13 \mu\text{M}$ .



**Obr. 5.22.** Viabilita H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi chelátoru železa H18 hodnocená testem vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n = 5$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

## **6. Diskuze**

Pojem oxidační stres je často používán při mnoha biochemických, fyziologických a patofyziologických situacích. Jak již bylo popsáno, tento pojem popisuje následek zvýšené produkce ROS a/nebo pokles v jejich eliminaci (Azzi 2007).

ROS jsou nebezpečné pro buňky, tkáně i orgány a z tohoto zjištění bylo vyvozeno, že oxidační stres hraje důležitou roli v patogenezi a rozvoji kardiovaskulárních onemocnění včetně hypertenze, dyslipidemie, diabetes mellitus (DM), aterosklerózy, infarktu myokardu (IM), ventrikulární hypertrofie, ischemické choroby srdeční (ICHS), anginy pectoris, srdečního selhání, fibrilace síní a dalších onemocnění jako jsou neurodegenerativní onemocnění, zánětlivá onemocnění, virus lidské imunodeficience (HIV) či rakovina (Akao et al. 2003, Azzi 2007, Dröge 2002, Higashi et al. 2009, Valko et al. 2007). Všechna tato onemocnění se mohou dělit do dvou kategorií. První kategorie (DM, rakovina) ukazuje běžný prooxidační posun v systémovém thiol/disulfid redoxním stavu a poruchu glukózové clearance. Může se jednat o mitochondriální oxidační stres. Bez terapeutické intervence může dojít k hromadnému chřadnutí kosterního svalstva připomínajícímu chřadnutí spojené se stárnutím. Druhá skupina, které se dá říkat zánětlivé oxidační podmínky, je typicky spojena s nadměrnou stimulací aktivity NADPH oxidázy cytokiny nebo dalšími činiteli (Dröge 2002).

Odhaduje se, že až 5 % kyslíku spotřebovaného v tkáních je transformováno na ROS. V kardiovaskulárním systému mohou ROS pocházet z několika různých celulárních zdrojů. Jedná se o mitochondriální elektronový transportní řetězec, XO, lipooxygenázy, cyklooxygenázy (COX), peroxidázy, NADPH oxidázy, endoteliální NO syntázu (eNOS), MPO jakož i další bílkoviny obsahující hem (Higashi et al. 2009, Sugamura a Keaney 2011, Zhang et al. 2012). Tyto látky jsou účinně detoxikovány endogenními enzymatickými lapači volných radikálů, jako je SOD či glutathionperoxidáza. Nicméně za podmínek spojených s nadměrnou produkcí ROS (zánět, ischemie-reperfuze) může dojít k překročení kapacity této endogenní antioxidační ochrany (Lefer a Granger 2000).

Ischemicko-reperfuzní poškození (I/R) myokardu nevzniká při hypoxii, ale až po obnovení průtoku dostatečně okysličené krve ischemickou tkání. Charakteristickým znakem je zde zvýšená tvorba ROS, které jsou hlavními mediátory tohoto poškození.



Ischemické poškození je mnohem složitější děj, než jen deplece  $O_2$  a ATP či nahromadění  $CO_2$ . Tyto události zjednodušeně představují první důsledky ischemie, což vyvolává nesčetné množství změn na subcelulární, buněčné, tkáňové a orgánové úrovni (Raedschelders et al. 2012). Po ischemii při následné reperfuzi vzniká mateřský radikál  $O_2^{\cdot-}$ , který slouží jako prekurzor pro další radikály, cestou Haber-Weissovy a Fentonovy reakce zprostředkované volnými redoxně aktivními ionty železa (Munoz et al. 2010, Raedschelders et al. 2012).

Jak již bylo naznačeno, jedna ze strategií pro zmírnění reperfučního poškození závislého na ROS se týká odstraňování volného železa, aby tento prvek nebyl přítomen v tkáni během ischemie a reperfuze. Volné železo podporuje oxidaci lipidů, a to zejména v přítomnosti ROS. Kromě toho železem katalyzované oxidační reakce byly spojeny se srdeční dysfunkcí v průběhu ischemie a reperfuze. Takže není překvapující, že chelatace kovů je testována jako antioxidační strategie v oblasti prevence I/R poškození (Voest et al. 1994, Sugamura a Keaney 2011).

Intracelulární železo se dramaticky zvyšuje během ischemie (z důvodu akumulace redukčních ekvivalentů a také z důvodu ischemií vyvolané acidózy). Proto bylo navrženo použití chelátorů železa, aby se snížilo po-ischemické poškození tkáně (Galey 2001). Řada studií ukázala, že užití DFO zlepšilo přežití a fyziologické funkce v různých modelech cerebrálního nebo srdečního I/R poškození (Galay 2001, Sugamura a Keaney 2011). Tyto výsledky naznačují, že chelátory železa mohou být prospěšné při léčbě mrtvice a infarktu. Také by mohly být prospěšné během kardiopulmonálního bypassu či při transplantaci orgánů, kde také dochází k přechodné ischemii (Galey 2001).

Bohužel DFO je hydrofilní a proto špatně prochází plazmatickými membránami, což má za následek velmi omezený přístup k intracelulárnímu volnému železu. Tento fakt, společně s (pro pacienta) nepříznivým způsobem podání, vedl k hledání efektivnějších kardioprotektivních chelátorů železa (Šimůnek et al. 2005).

SIH je oproti dříve zmíněnému chelátoru DFO vysoce lipofilní. Snadno vstupuje do buněk, pevně chelatuje intracelulárně redoxně aktivní železo a je tedy schopen účinně blokovat produkci  $OH^{\cdot}$  (Šimůnek et al. 2005). Studie provedená Šimůnkem et al. (2005) ukázala, že SIH je výrazně účinnější, již v mikromolárních koncentracích, v ochraně kardiomyocytů před toxicitou  $H_2O_2$  než DFO. Ve studii provedené Bendovou et al. (2010) SIH ukázal nejlepší poměr cytoprotektivní účinnosti a vlastní toxicity ze sedmi chelatačních látek z několika různých chemických rodin včetně tří klinicky

užívaných léků – DFO, deferipron a deferasirox. Jak již bylo zmíněno výše, také dokáže chránit proti kardiotoxicitě způsobené daunorubicinem (Šimůnek et al. 2008). Ovšem kvůli labilní hydrazonové vazbě SIH snadno podléhá hydrolýze a má tedy krátký biologický poločas. Tento fakt omezuje jeho potenciál pro použití v klinické praxi (Hrušková et al. 2011).

Při zkoumání dalších chelátorů Hruškovou et al. (2011) vykazovaly slibné účinky chelátory železa HAPI a HPPI. U obou těchto látek byla prokázána vyšší stabilita proti hydrolýze oproti labilnímu SIH (díky nahrazení aldiminového vodíku SIH za objemější elektron donorovou alkylovou skupinu), která byla testována *in vitro* v králičí plazmě. Také vykazovaly vysokou chelatační aktivitu v roztoku, ovšem při porovnání chelatační aktivity v buňkách H9c2 se výrazně nelišily od referenčního SIH. Kardioprotektivní vlastnosti byly rozvěž zkoumány na buněčné linii H9c2 v přítomnosti 200  $\mu\text{M}$  *tert*-butylhydroperoxidu (*t*-BHP). Při 24 hodinové inkubaci buněk s *t*-BHP a s HAPI a HPPI byla stále zachována buněčná morfolgie a tyto látky byly schopny statisticky významně zvýšit životaschopnost buněk. Při porovnání kardioprotektivních účinků SIH, HAPI a HPPI při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  s 200  $\mu\text{M}$  *t*-BHP, oba naposledy zmíněné vykazovaly vyšší účinnost. Stanovení vlastní toxicity chelátorů probíhalo jednak 24 hodinovou, a také 72 hodinovou inkubací buněk H9c2 s HAPI a HPPI (opět 100  $\mu\text{M}$ ). V porovnání se SIH oba chelátory vykazovaly nižší vlastní toxicitu při 24 hodinové inkubaci, ovšem při 72 hodinové inkubaci byla jejich toxicita vyšší než u SIH. Chelátor HAPI by díky absenci krátkodobé 24 hodinové toxicity a lepším antioxidačním a cytoprotektivním účinkům mohl najít uplatnění při krátkodobém podání například u I/R poranění.

Nadějně výsledky zkoumání těchto chelátorů odvozených od SIH vedlo k syntéze dalších látek s různými strukturálními obměnami ve snaze zlepšit jejich vlastnosti, zvýšit účinnost či snížit toxicitu.

Cílem této práce bylo prozkoumat tyto nové deriváty, nastínit jejich účinnost a vlastní toxicitu a určit, zda mají potenciál pro další studium a případné využití v terapii srdečních onemocnění.

Redukcí hydrazonové vazby u chelátorů SIH, HAPI a HPPI, které v dřívějších studiích vykazovaly dobré kardioprotektivní účinky (Hrušková et al. 2011), vznikly redukované formy rSIH, rHAPI a rHPPI. Tyto potenciální chelátory byly snahou získat stabilnější deriváty, protože právě přítomnost dvojnásobné vazby mezi atomy dusíku a uhlíku je náchylná k hydrolýze.

Další chelátory BHAPI a BHPPI byly získány zavedením halogenu do molekuly CHAPI a HPPI. Tato chemická obměna zvyšuje lipofilitu molekul, které tak mohou lépe pronikat do buněk. Mimo to může brom ovlivňovat stabilitu hydrazonové vazby a chelatační schopnost.

Záměnou fenolického hydroxylylu za pyridinový dusík v ketonové části molekuly vznikl chelátor 2API. Jedná se o analog HAPI.

Poslední zkoumané chelátory železa 7HII, H16 a H18 obsahují v ketonové části delší, větvené či cyklické alkylové řetězce. 7HII a H16 obsahují v ketonové části molekuly stejný počet uhlíků jako HPPI s tím rozdílem, že 7HII je má uspořádané do kruhu a H16 má rozvětvený řetězec v  $\alpha$  poloze vůči hydrazonové vazbě. H18 obsahuje v již zmíněné ketonové části isobutylový zbytek.

Z proběhlých měření byly stanoveny hodnoty  $EC_{50}$  ( $\mu M$ ) pro modelový chelátor železa SIH a ostatní zkoušené potenciální chelátory železa.

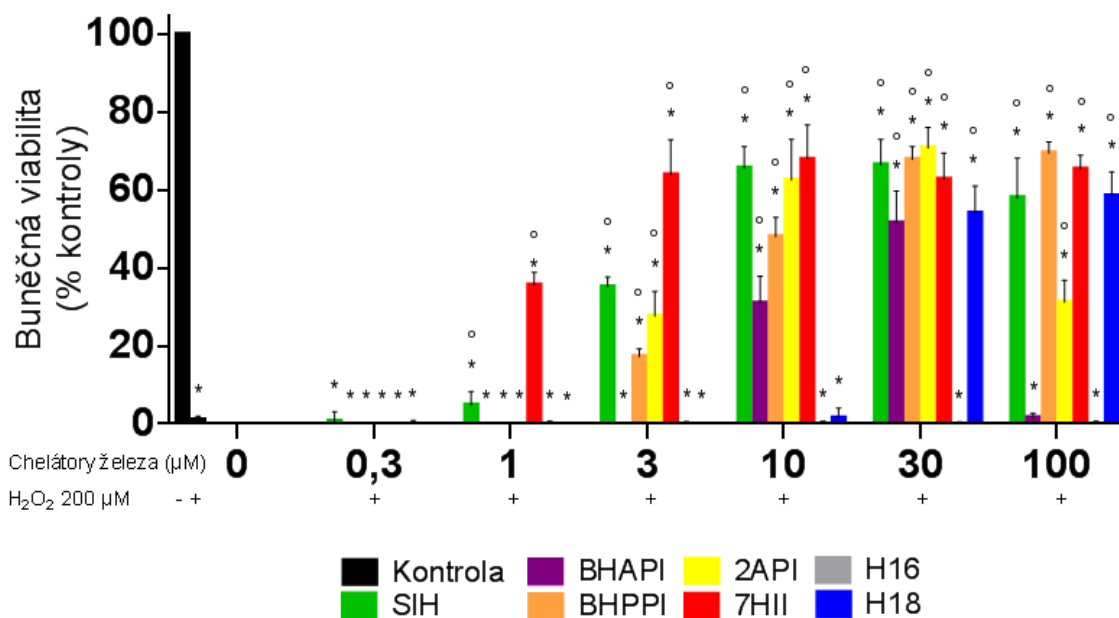
Chelátor	$EC_{50}$
SIH	17,63 $\pm$ 1,38
rSIH	*
rHAPI	*
rHPPI	*
BHAPI	30,34 $\pm$ 7,23
BHPPI	17,18 $\pm$ 4,39
2API	8,48 $\pm$ 3,11
7HII	2,68 $\pm$ 1,30
H16	*
H18	27,76 $\pm$ 3,90

**Tab. 6.1.** Hodnoty  $EC_{50}$  ( $\mu M$ ) chelátoru železa SIH a zkoušených potenciálních chelátorů železa, které byly získány 24 hodinovou inkubací buněk H9c2 se zkoušenými chelátory a s 200  $\mu M$  peroxidem vodíku a výpočtem pomocí software CalcuSyn. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota  $\pm$  SE,  $n \geq 4$ . Hodnoty  $EC_{50}$ , které nemohly být vypočítány, jsou označeny symbolem \*.

Na základě porovnání hodnot  $EC_{50}$  můžeme konstatovat, že v porovnání se SIH jako modelovým chelátorem železa vykazovaly lepší kardioprotektivní účinky proti oxidačnímu poškození způsobenému toxickou dávkou 200  $\mu M$   $H_2O_2$  chelátory BHPPI, 2API a 7HII. Chelátory železa BHAPI a H18 měly nižší kardioprotektivní účinky než modelový SIH a redukované studované látky rSIH, rHAPI, rHPPI a H16 vzniklý

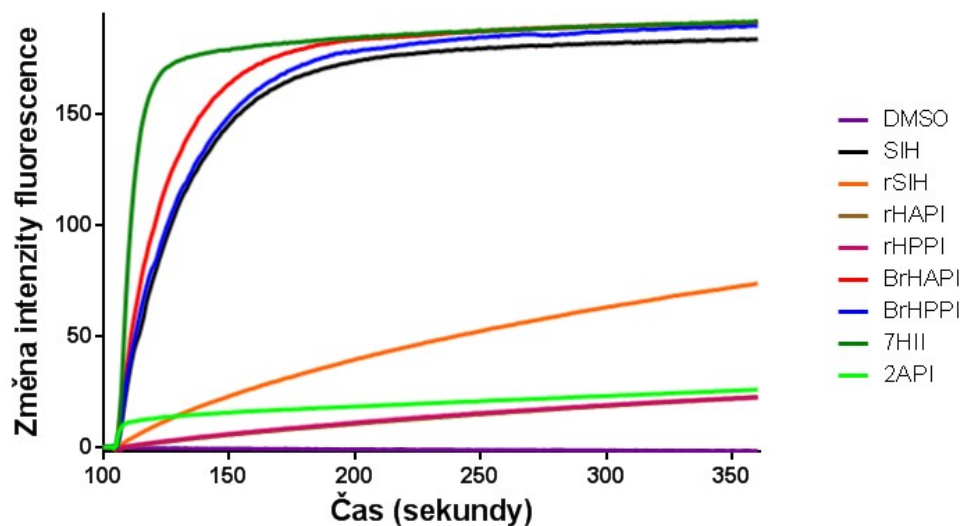
změnou postranního uhlíkového řetězce nevykazovaly žádnou kardioprotektivní aktivitu.

Srovnání kardioprotektivních účinků vybraných potenciálních chelátorů železa je zobrazeno v následujícím obrázku 6.1.

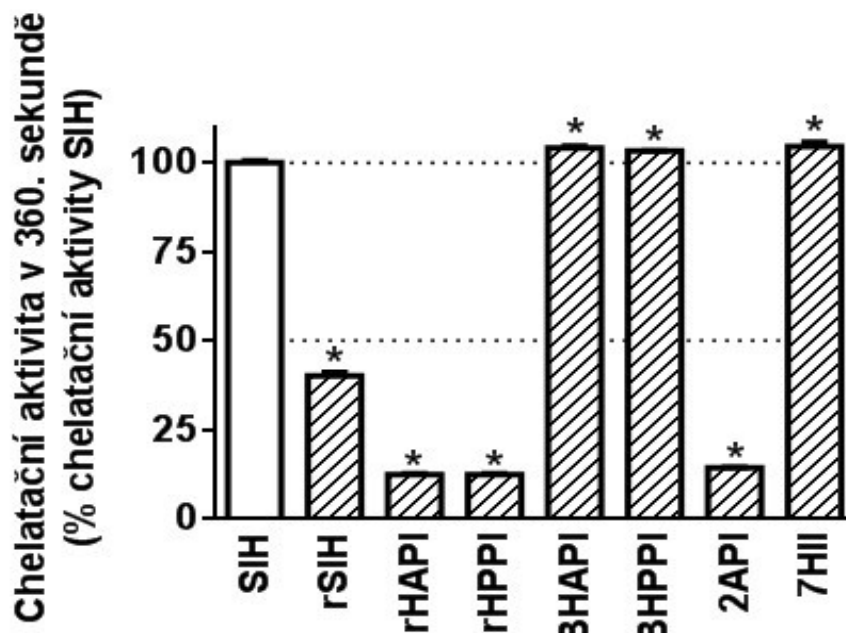


**Obr. 6.1.** Vzájemné porovnání viability H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi vybraných chelátorů železa a 200 μM peroxidem vodíku hodnocená pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE, n ≥ 4. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; p < 0,05) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*, statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; p < 0,05) oproti skupině s peroxidem vodíku jsou označeny symbolem °.

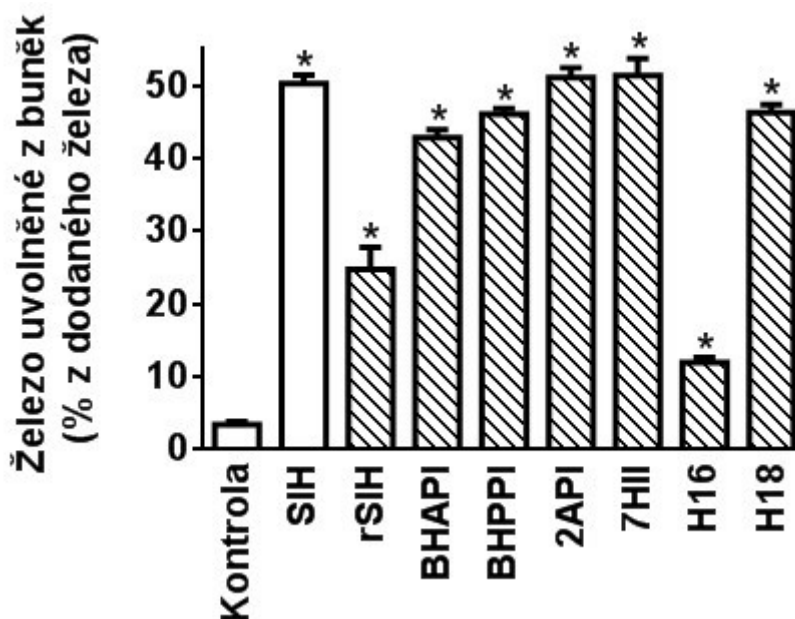
Kvůli neschopnosti redukováných studovaných látek ochránit buňky proti oxidačnímu poškození bylo zkoumáno, zda vůbec a pokud ano, tak v jaké míře dokáží tyto potenciální chelátory nové série chelatovat železo. Data uvedená na obr. 6.2, 6.3 a 6.4 byla naměřena a vyhodnocena kolegyní z pracoviště Mgr. Eliškou Mackovou a zobrazují výsledky testů chelatační aktivity jednotlivých chelátorů jednak v roztoku pomocí slabého chelátoru železa kalceinu (viz obr. 6.2 a obr. 6.3), ale také v buňkách MCF-7 metodou mobilizace <sup>59</sup>Fe z buněk (viz obr. 6.4).



**Obr. 6.2.** Dynamika procesu chelatace iontů železa v roztoku jednotlivými zkoušenými potenciálními chelátory, n = 3.



**Obr. 6.3.** Stanovení chelatační aktivity jednotlivých zkoušených potenciálních chelátorů pomocí kalceinu (5  $\mu$ M) v roztoku. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE, n = 3. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p \leq 0,05$ ) oproti SIH jsou označeny symbolem \*.



**Obr. 6.4.** Stanovení chelatační aktivity jednotlivých zkoušených potenciálních chelátorů pomocí buněčné  $^{59}\text{Fe}$  mobilizace (buňky MCF-7,  $25 \mu\text{M}$ ). Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n \geq 3$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p \leq 0,05$ ) oproti kontrolní (neléčené) skupině jsou označeny symbolem \*.

Jak je patrné z těchto obrázků, redukované formy rSIH, rHAPI a rHPPI vykazují nízkou chelatační aktivitu. Redoxně aktivní ionty železa tedy nejsou chelátovány a jako volné mohou katalyzovat vznik ROS, které vedou k poškození buněk. Ztráta chelatační schopnosti zřejmě vyplývá ze změny prostorové orientace molekuly, či změnou elektronové hustoty na dusíku díky změně hybridizace. Při stanovení chelatační aktivity pomocí buněčné  $^{59}\text{Fe}$  mobilizace také studovaná látka H16 vykazovala nižší aktivitu. Z obrázku 6.4 je patrné, že H16 nedokázal dostatečně chelátovat železo a vynést ho v komplexu z buňky ven. Tato zjištění dokreslují poznatky získané v této práci, že studované látky rSIH, rHAPI, rHPPI a H16 nedokáží ochránit buňky před oxidačním stresem vyvolaným  $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ . Můžeme tedy konstatovat, že přítomnost hydrazonové vazby je nezbytná pro kardioprotektivní účinek chelátorů.

Chelátory BHAPI, BHPPI, 7HII vykazovaly nepatrně vyšší chelatační aktivitu v roztoku než referenční chelátor SIH. Při testování chelatační aktivity v MCF-7 buňkách vykazoval chelátor 7HII nepatrně vyšší aktivitu a chelátory BHAPI, BHPPI a H18 nižší chelatační aktivitu než SIH, díky které dokáží tyto chelátory ochránit buňky před poškozením vyvolaným oxidačním stresem. Chelátor 2API vykazoval nízkou chelatační aktivitu v roztoku, ale při testech na buňkách byla jeho chelatační aktivita srovnatelná se SIH a kardioprotektivní účinky vykazoval dokonce větší než SIH.

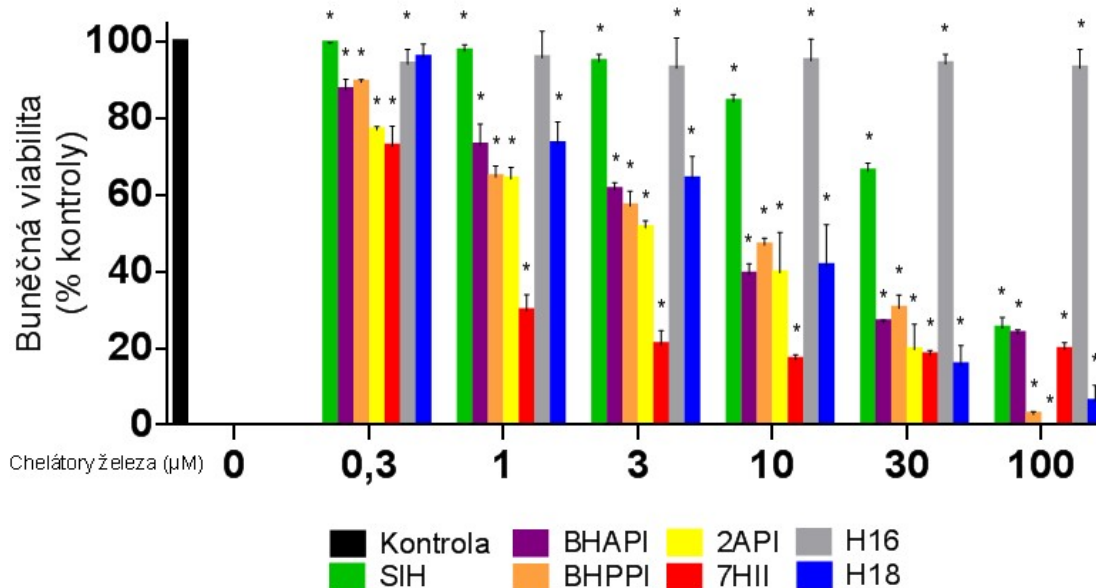
Co se týče kardioprotektivních účinků, můžeme říct, že chelátory BHPPI, 2API a 7HII vykazují vyšší účinnost než referenční SIH. Ovšem samotné toto konstatování nestačí. Abychom mohli posoudit, zda jsou tyto chelátory lepší než SIH, musíme také posoudit jejich vlastní toxicitu vůči buňkám.

Při zkoumání vlastní toxicity chelátorů byla z experimentů s jednotlivými chelátory vypočítána hodnota  $TC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ).

Chelátor	$TC_{50}$
SIH	49,47 $\pm$ 1,77
rSIH	39,59 $\pm$ 5,11
rHAPI	83,96 $\pm$ 2,76
rHPPI	226,12 $\pm$ 6,31
BHAPI	6,99 $\pm$ 0,82
BHPPI	6,31 $\pm$ 0,59
2API	3,07 $\pm$ 0,55
7HII	0,62 $\pm$ 0,17
H16	*
H18	7,40 $\pm$ 2,13
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>62,39 <math>\pm</math> 1,70</b>

**Tab. 6.2.** Hodnoty  $TC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) peroxidu vodíku, chelátoru železa SIH a studovaných látek, které byly získány 72 hodinovou inkubací buněk H9c2 se studovanými látkami a výpočtem pomocí software CalcuSyn. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se + SE,  $n \geq 3$ . Hodnoty  $TC_{50}$ , které nemohly být vypočítány, jsou označeny symbolem \*.

Redukované studované látky rHAPI a rHPPI sice vykazovaly nižší vlastní toxicitu než SIH, ovšem kvůli neschopnosti ochránit buňky před oxidačním poškozením nemá toto zjištění pro potencionální terapii srdečních onemocnění zvláštní význam. Další redukovaná studovaná látka rSIH, stejně jako ostatní zkoušené chelátory BHAPI, BHPPI, 2API, 7HII a H18 měly v porovnání se SIH vyšší toxicitu. Nejvyšší toxicita byla zjištěna u chelátoru 7HII, což lze vysvětlit zvýšenou schopností této látky pronikat do buněk. Vysoká toxicita chelátorů je způsobena pravděpodobně deplecí železa v buňkách. Látka H16 vykazovala velmi nízkou toxicitu ve všech zkoušených koncentracích. Z tohoto důvodu nemohla být vypočítána hodnota  $TC_{50}$ . Nízká vlastní toxicita je pravděpodobně způsobena rozvětvením řetězce v těsné blízkosti hydrazonové vazby, které stericky brání hydrolýze.



**Obr. 6.5.** Vzájemné porovnání viability H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se vzrůstajícími koncentracemi vybraných chelátorů železa hodnocená pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota + SE,  $n \geq 3$ . Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA;  $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem \*.

Pro komplexní porovnání cytoprotektivních účinků a vlastní toxicity referenčního chelátoru železa SIH s novými aroylhydrazonovými chelátory železa byl vypočítán poměr  $TC_{50}/EC_{50}$ , který můžeme chápat jako jakousi analogii terapeutického indexu.

Chelátor	$TC_{50}/EC_{50}$
SIH	2,81
rSIH	*
rHAPI	*
rHPPI	*
BHAPI	0,23
BHPPI	0,37
2API	0,36
7HII	0,23
H16	*
H18	0,27

**Tab. 6.3.** Poměry vlastní toxicity ( $TC_{50}$ ) a cytoprotektivní účinnosti ( $EC_{50}$ ) jednotlivých zkoušených chelátorů.  $N \geq 3$ . Hodnoty  $TC_{50}/EC_{50}$ , které nemohly být vypočítány, jsou označeny symbolem \*.



Jak vidíme v tabulce 6.3 i přes slibné kardioprotektivní účinky některých chelátorů, žádný nevykazuje lepší poměr účinnosti a toxicity než SIH. Nejlepších hodnot dosáhly chelátory 2API a BHPPI. Oba tyto chelátory stejně jako BHAPI, 7HII a H18 si jistě zasluhují další zkoumání.

Tato série zkoumaných aroylhydrazonových chelátorů iontů železa sice nespĺnila kladená očekávání, ale díky nastínění kardioprotektivních a toxických účinků jednotlivých studovaných látek umožní další postup při vývoji nových chemických struktur, aby mohlo být dosaženo co nejvyššího účinku společně s co nejnižší toxicitou.

## 7. Závěry

- Redukované studované látky rSIH, rHAPI, rHPPI:
  - nedokázaly ani v nejvyšší zkoušené koncentraci 1 000  $\mu\text{M}$  ochránit buňky H9c2 před oxidačním poškozením vyvolaným 200  $\mu\text{M}$  peroxidem vodíku.
  - vlastní toxicita látky rSIH byla vyšší oproti SIH. Vlastní toxicita rHAPI a rHPPI byla nižší než SIH.
- Ostatní zkoušené nové chelátory železa vykazovaly dávkově závislé kardioprotektivní účinky.
  - Bromované chelátory BHAPI a BHPPI:
    - BHAPI vykazoval nižší kardioprotektivní účinky v porovnání s modelovým chelátorem SIH i ostatními zkoušenými chelátory. Vlastní toxicita BHAPI byla vyšší oproti SIH.
    - BHPPI vykazoval vyšší kardioprotektivní účinnost oproti SIH i oproti BHAPI. Vlastní toxicita BHPPI byla vyšší oproti SIH a BHAPI.
  - Chelátory obsahující modifikaci ketonové části řetězce 2API a 7HII:
    - vykazovaly nejvyšší kardioprotektivní účinky oproti SIH i dalším zkoušeným chelátorům. Ovšem vykazují také vyšší vlastní toxicitu.
  - Studované látky s prodlouženým postranním alkylovým řetězcem H16 a H18:
    - H16 nevykazoval kardioprotektivní účinky. Jeho toxicita vůči buňkám H9c2 byla minimální při všech zkoušených koncentracích.
    - H18 vykazoval nižší kardioprotektivní účinky a vyšší vlastní toxicitu než SIH.
- Při porovnání poměru vlastní toxicity a cytoprotektivní účinnosti žádný zkoušený chelátor nevykázal lepší poměr než modelový chelátor SIH.

## **8. Seznam zkratek**

$^{16}\text{O}$ , $^{17}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$	izotopy kyslíku
2,6DHAPI	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(2,6-dihydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid
2API	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(pyridin-2-yl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid
7HII	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(7-hydroxy-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-yliden)isonikotinoylhydrazid
8-oxo-dG	8-oxo-7,8-dihydro-20-deoxyguanosin
AMP	adenosinmonofosfát
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
apoTf	apotransferin
ATP	adenosintrifosfát
BHAPI	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(5-brom-2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid
BHPPI	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(5-brom-2-hydroxyfenyl)propyliden)isonikotinoylhydrazid
BpT	2-benzoylpyridinthiosemikarbazon
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
Dcytb	duodenální cytochrom b
DFO	desferrioxamin
DFT	desferrithiocin
DM	diabetes mellitus
DMEM	kultivační médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT1, DCT1, Nramp2	přenašeč divalentních iontů kovů 1 (divalent metal-ion transporter 1)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
Dp44mT	di-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon
DpT	di-2-pyridylketonthiosemikarbazon
EC <sub>50</sub>	molární koncentrace, která vede k ochraně 50 % buněk
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
ER	endoplazmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
FBS	fetální bovinní sérum
Fe(OH) <sub>3</sub>	hydroxid železitý
Fe <sup>2+</sup>	železnaté ionty
Fe <sup>3+</sup>	železité ionty
GIT	gastrointestinální trakt

H16	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)-2-methylpropyliden)isonikotinoylhydrazid
H18	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)-3-methylbutyliden)isonikotinoylhydrazid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HAMP, LEAP-1	hepcidin
HAPI	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid
Hb	hemoglobin
HCP1	protein přenášející hem 1 (haem carrier protein 1)
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethansulfonová kyselina
HO-1	hemoxygenáza
HO <sub>2</sub> •	hydroperoxylový radikál
HOCl	kyselina chlorná
HPPI	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)propyliden)isonikotinoylhydrazid
CHAPI	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid
I/R	ischemicko-reperfuzní poškození
ICL670A	deferasirox
ICHS	ischemická choroba srdeční
IM	infarkt myokardu
Ireg1, MPT, FPN	ferroportin
IREs	na železo reagující složky (iron responsive elements)
IRP1, IRP2	proteiny regulující železo (iron regulatory proteins)
L1, CP20	deferipron
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou (low density lipoproteins)
LIP	zásoba labilního železa (labile iron pool)
MAO	monoaminoxidáza
Mb	myoglobin
MPO	myeloperoxidáza
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
n	počet experimentů
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
Nb	neuroglobin
NHAPI	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid
NMR	nukleární magnetická rezonance
NO•	oxid dusnatý
NR	neutrální červěň (neutral red)
NT	2-hydroxy-1-naftylaldehyd-3-thiosemikarbazon

NTBI	železo nevázané na transferin (non-transferrin bound iron)
O <sub>2</sub>	kyslík
O <sup>2-</sup>	kyslíkový anion
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	superoxidový anion-radikál
O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	peroxidový anion
O <sub>3</sub>	ozón
OH <sup>•</sup>	hydroxylový radikál
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrit
p	hladina statistické významnosti
PCIH	2-pyridylkarboxaldehydisonikotinoylhydrazon
PIH	pyridoxalisonikotinoylhydrazon
PKIH	di-2-pyridylketonisonikotinoylhydrazon
R <sup>•</sup>	uhlíkový radikál
rHAPI	<i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)ethyl)isonikotinoylhydrazid
rHPPI	<i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)propyl)isonikotinoylhydrazid
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
RO <sup>•</sup>	alkoxylový radikál
RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	peroxylový radikál
ROOH	organické peroxidy
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RR	ribonukleotidreduktáza
rSIH	<i>N'</i> -(2-hydroxybenzyl)isonikotinoylhydrazid
SBH	salicylaldehydbenzoylhydrazon
SCM	DMEM obsahující sérum (serum containing medium)
SE	standardní chyba (standard error)
SFM	DMEM neobsahující sérum (serum free medium)
SIH	salicylaldehydisonikotinoylhydrazon
SOD	superoxiddismutáza
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
TC <sub>50</sub>	molární koncentrace, která vede k usmrcení 50 % buněk
TC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>	poměr, který lze chápat jako terapeutický index studované látky
Tf	transferin
TfR 1, 2	transferinové receptory 1, 2
VR	volné radikály
XO	xantinoxidáza

## **9. Literatura**

- AISEN, P., ENNS, C., WESSLINF-RESNICK, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2001, roč. 33, č. 10, s. 940-959.
- AKAO, M., O'ROURKE, B., TESHIMA, Y., SEHARASEYON, J., MARBÁN, E. Mechanistically Distinct Steps in the Mitochondrial Death Pathway Triggered by Oxidative Stress in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*. 2003, roč. 92, č. 2, s. 186-194.
- ARREDONDO, M., NÚÑEZ, M. T. Iron and copper metabolism. *Trace Elements and Human Health*. 2005, roč. 26, č. 4-5, s. 313-327.
- AZZI, A. Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, roč. 362, č. 2, s. 230-232.
- BATTINO, M., BULLON P., WILSON, M., NEWMAN, H. Oxidative Injury and Inflammatory Periodontal Diseases: the Challenge of Anti-Oxidants to Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Critical Reviews in Oral Biology*. 1999, roč. 10, č. 4, s. 458-476.
- BENDOVÁ, P., MACKOVÁ, E., HAŠKOVÁ, P., VÁVROVÁ, A., JIRKOVSKÝ, E., ŠTĚRBA, M., POPELOVÁ, O., KALINOWSKI, D. S., KOVAŘÍKOVÁ, P., VÁVROVÁ, K., RICHARDSON, D. R., ŠIMŮNEK, T. Comparison of Clinically Used and Experimental Iron Chelators for Protection against Oxidative Stress-Induced Cellular Injury. *Chemical Research in Toxicology*. 2010, roč. 23, č. 6, s. 1105-1114.
- BERNHARDT, P. V., CALDWELL, L. M., CHASTON, T. B., CHIN, P., RICHARDSON, D. R. Cytotoxic iron chelators: characterization of the structure, solution chemistry and redox activity of ligands and iron complexes of the di-2-pyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (HPKIH) analogues. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2003, roč. 8, č. 8, s. 866-880.
- BRUNORI, M., GIBSON, Q. H. Cavities and packing defects in the structural dynamics of myoglobin. *EMBO Reports*. 2001, roč. 2, č. 8, s. 674-679.
- BUSS, J. L., GREENE, B. T., TURNER, J., TORTI, F. M., TORTI, S. V. Iron Chelators in Cancer Chemotherapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2004, roč. 4, č. 15, s. 1623-1635.
- CAIRO, G., RECALCATI, S., PIETRANGELO, A., MINOTTI, G. The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002, roč. 32, č. 12, s. 1237-1243.
- CIRCU, M. L., AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010, roč. 48, č. 6, s. 749-762.

- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVÁ, E., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D., VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2000, roč. 57, č. 5, s. 779-795.
- DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*. 2002, roč. 82, č. 1, s. 47-95.
- EISENSTEIN, R. S., ROSS, K. L. Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *The Journal of nutrition*. 2003, roč. 133, č. 5, s. 1510S-1516S.
- FLÖGEL, U., MERX M. W., GODECKE, A., DECKING, U. K. M., SCHRADES, J. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, roč. 98, č. 2, s. 735-740.
- FONTECAVE, M., PIERRE, J. L. Iron: Metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie*. 1993, roč. 75, č. 9, s. 767-773.
- GALARIS, D., PANTOPOULOS, K. Oxidative Stress and Iron Homeostasis: Mechanistic and Health Aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2008, roč. 45, č. 1, s. 1-23.
- GALEY, J. B. Recent advances in the design of iron chelators against oxidative damage. *Mini Reviews In Medicinal Chemistry*. 2001, roč. 1, č. 3, s. 233-42.
- GOBIN, J. HORWITZ, M. A. Exochelins of Mycobacterium tuberculosis remove iron for human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the M. tuberculosis cell wall. *Journal of Experimental Medicine*. 1996, roč. 183, č. 4, s. 1527-1532.
- HALLBERG, L. Bioavailability of Dietary Iron in Man. *Annual Review of Nutrition*. 1981, roč. 1, č. 1, s. 123-147.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007, xxxvi, 851 p., [8] p. of plates.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*. 1984, roč. 219, č. 1, s. 1-14.
- HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U., ANDREWS, N. C. Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. *Cell*. 2004, roč. 117, č. 3, s. 285-297.
- HIGASHI, Y., NOMA, K., YOSHIKUMI, M., KIHARA, Y. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circulation Journal*. 2009, roč. 73, č. 3, s. 411-418.
- HORACKOVA, M., PONKA, P., BYCZKO, Z. The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*. 2000, roč. 47, č. 3, s. 529-536.
- HRUŠKOVÁ, K., KOVAŘÍKOVÁ, P., BENDO VÁ, P., HAŠKOVÁ, P., MACKOVÁ, E., STARIAT, J., VÁVROVÁ, A., VÁVROVÁ, K., ŠIMŮNEK, T. Synthesis and Initial in

Vitro Evaluations of Novel Antioxidant Aroylhydrazone Iron Chelators with Increased Stability against Plasma Hydrolysis. *Chemical Research in Toxicology*. 2011, roč. 24, č. 3, s. 290-302.

- CHARKOUDIAN, L. K., PHAM, D. M., FRANZ, K. J. A Pro-Chelator Triggered by Hydrogen Peroxide Inhibits Iron-Promoted Hydroxyl Radical Formation. *Journal of the American Chemical Society*. 2006, roč. 128, č. 38, s. 12424-12425.
- CHARKOUDIAN, L. K., PHAM, D. M., KWON, A. M., VANGELOFF, A. D., FRANZ, K. J. Modifications of boronic ester pro-chelators triggered by hydrogen peroxide tune reactivity to inhibit metal-promoted oxidative stress. *Dalton Transactions*. 2007, č. 43, s. 5031-5042.
- CHASTON, T. B., RICHARDSON, D. R., FRANZ, K. J. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: Relationship between structure, redox activity, and toxicity. *American Journal of Hematology*. 2003, roč. 73, č. 3, s. 200-210.
- JOMOVA, K., VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011, roč. 283, 2–3, s. 65-87.
- KALINOWSKI, D. S., RICHARDSON, D. R. The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacological Reviews*. 2005, roč. 57, č. 4, s. 547-583.
- KEHRER, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000, roč. 149, č. 1, s. 43-50.
- KONTOGHIORGHES, G., ERACLEOUS, E., ECONOMIDES, CH., KOLNAGOU, A. Advances in Iron Overload Therapies. Prospects for Effective Use of Deferiprone (L1), Deferoxamine, the New Experimental Chelators ICL670, GT56-252, LINAI and their Combinations. *Current Medicinal Chemistry*. 2005, roč. 12, č. 23, s. 2663-2681.
- KRÄTSMÁR-ŠMOGROVIČ, J. *Všeobecná a anorganická chémie: učebnica pre farmaceutické fakulty*. 2. upr. vyd. Martin: Osveta, 2007, 399 s.
- LATUNDE-DADA, G. O., TAKEUCHI, K., SIMPSON, R. J., MCKIE, A. T. Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Letters*. 2006, roč. 580, č. 30, s. 6865-6870.
- LEFER, D. J., GRANGER, D. N. Oxidative stress and cardiac disease. *The American Journal of Medicine*. 2000, roč. 109, č. 4, s. 315-323.
- MACHÁČEK, M. 2012. Studium cytoprotektivních vlastností nových oxidačním stresem aktivovaných aroylhydrazonových prochelátorů železa. *Diplomová práce, Katedra biochemických věd, Farmaceutická Fakulta Univerzity Karlovy*. Hradec Králové, 2012, 111 s.



- MARTÍNEZ-CAYUELA, M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 1995, roč. 77, č. 3, s. 147-161.
- MINNING, D. M., GOW, A. J., BONAVENTURA, J., BRAUN, R., DEWHIRST, M., GOLDBERG, D. E., STAMLER, J. S. Ascaris haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase'. *Nature*. 1999, roč. 401, č. 6752, s. 497-502.
- MUNOZ, J. P., CHIONG, M., GARCÍA, L., TRONCOSO, R., TORO, B., PEDROZO, Z., DIAZ-ELIZONDO, J., SALAS, D., PARRA, V., NÚÑEZ, M. T., HIDALGO, C., LAVANDERO, S. Iron induces protection and necrosis in cultured cardiomyocytes: Role of reactive oxygen species and nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010, roč. 48, č. 4, s. 526-534.
- PAHL, P. M. B., YAN X. D., HODGES Y. K., ROSENTHAL, E. A., HORWITZ M. A., HORWITZ L. D. An Exochelin of Mycobacterium tuberculosis Reversibly Arrests Growth of Human Vascular Smooth Muscle Cells in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, roč. 275, č. 23, s. 17821-17826.
- PAPANIKOLAOU, G., PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005, roč. 202, č. 2, s. 199-211.
- PAPANIKOLAOU, G., TZILIANOS, M., CHRISTAKIS, J. I., BOBDANOS, D., TSIMIRIKA, K., MACFARLANE, J., GOLDBERG, Y. P., SAKELLAROPOULOS, N., GANZ, T., NEMETH, E. Heparin in iron overload disorders. *Blood*. 2005, roč. 105, č. 10, s. 4103-4105.
- PARK, G., LU, F. H., YE, N., BRECHBIEL, M. W., TORTI, S. V., TORTI, F. M., PLANALP, R. P. Novel iron complexes and chelators based on cis,cis-1,3,5-triaminocyclohexane: iron-mediated ligand oxidation and biochemical properties. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1998, roč. 3, č. 5, s. 449-457.
- PESCE, A., DEWILDE, S., NARDINI, M., MOENS, L., ASCENZI, P., HANKELN, T., BURMESTER, T., BOLOGNESI, M. Human Brain Neuroglobin Structure Reveals a Distinct Mode of Controlling Oxygen Affinity. *Structure*. 2003, roč. 11, č. 9, s. 1087-1095.
- PIERREFICHE, G., LABORIT, H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. Proceedings of the Second International *Symposium on the Neurobiology and Neuroendocrinology of Aging*. 1995, roč. 30, č. 3-4, s. 213-227.
- PLANALP, R. P., PRZYBOROWSKA, A. M., PARK, G., YE, N., LU, F. H., ROGERS, R. D., BROKER, G. A., TORTI, S. V., BRECHBIEL, M. W. Novel cytotoxic chelators that bind iron(II) selectively over zinc(II) under aqueous aerobic conditions. *Biochemical Society Transactions*. 2002, roč. 30, č. 4, s. 758-761. Převzato z Kalinowski a Richardson 2005.

- PUNTARULO, S. Iron, oxidative stress and human health. *Trace Elements and Human Health*. 2005, roč. 26, č. 4-5, s. 299-312.
- RACEK, J. Myeloperoxidáza. *Klinická biochemie a metabolismus*. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2008, roč. 16/37, č. 4, s. 222-227.
- RAEDSCHELDERS, K, ANSLEY, D. M., CHEN, D. D. Y. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology*. 2012, roč. 133, č. 2, s. 230-255.
- RAYNER-CANHAM, G., OVERTON, T. *Descriptive inorganic chemistry*. 4. ed. Nueva York: W. H. Freeman, 2006.
- REPETTO, G., DEL PESO, A., ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. 2008, roč. 3, č. 7, s. 1125-1131.
- RICHARDSON, D. R., BERNHARDT, P. V. Crystal and molecular structure of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde isonicotinoyl hydrazone (NIH) and its iron(III) complex: an iron chelator with anti-tumour activity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1999, roč. 4, č. 3, s. 266-273.
- RICHARDSON, D. R., KALINOWSKI, D. S., LAU, S., JANSSON, P. J., LOVEJOY, D. B. Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2009, roč. 1790, č. 7, s. 702-717.
- RICHARDSON, D. R., PONKA, P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 1997, roč. 1331, č. 1, s. 1-40.
- ROKYTA, R. *Fyziologie: pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. 1. vyd. Praha: ISV nakladatelství, 2000, 359 s.
- SHARPE, P. C., RICHARDSON, D. R., KALINOWSKI, D. S., BERNHARDT, P. V. Synthetic and natural products as iron chelators. *Current Topics In Medicinal Chemistry*. 2011, roč. 11, č. 5, s. 591-607.
- SHEFTEL, A. D., MASON, A. B., PONKA, P. The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2012, roč. 1820, č. 3, s. 161-187.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997, roč. 82, č. 2, s. 291-295.
- SINGH, B., ARORA, S., AGRAWAL, P., GUPTA, S. K. Hepcidin: A novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clinica Chimica Acta*. 2011, roč. 412, č. 11-12, s. 823-830.

- SUGAMURA, K., KEANEY, J. F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011, roč. 51, č. 5, s. 978-992.
- ŠIMŮNEK, T., BOER, C., BOUWMAN, R. A., VLASBLOM, R., VERSTEILEN, A. M. G., ŠTĚRBA, M., GERŠL, V., HRDINA, R., POŇKA, P., DE LANGE, J. J., PAULUS, W. J., MUSTERS, R. J. P. SIH - a novel lipophilic iron chelator - protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2005, roč. 39, č. 2, s. 345-354.
- ŠIMŮNEK, T., ŠTĚRBA, M., POPELOVÁ, O., KAISEROVÁ, H., ADAMCOVÁ, M., HROCH, M., HAŠKOVÁ, P., POŇKA, P., GERŠL, V. Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *British Journal of Pharmacology*. 2008, roč. 155, č. 1, s. 138-148.
- ŠTĚRBA, M., POPELOVÁ, O., ŠIMŮNEK, T., MAZUROVÁ, Y., POTÁČOVÁ, A., ADAMCOVÁ, M., GUNČOVÁ, I., KAISEROVÁ, H., PALIČKA, V., POŇKA, P., GERŠL, V. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: A study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology*. 2007, roč. 235, č. 3, s. 150-166.
- TAM, T. F., LEUNG-TOUNG, R., LI, W., WANG, Y., KARIMIAN, K., SPINO, M. Iron Chelator Research: Past, Present, and Future. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, roč. 10, č. 12, s. 983-995.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 2003, roč. 552, č. 2, s. 335-344.
- VALKO, M., MORRIS, H., CRONIN, M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*. 2005, roč. 12, č. 10, s. 1161-1208.
- VENDITTI, P., DI STEFANO, L., DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. 2013, roč. 13, č. 2, s. 71-82.
- VOEST, E. E., VREUGDENHIL, G., MARX, J. J. M. Iron-Chelating Agents in Non-Iron Overload Conditions. *Annals of Internal Medicine*. 1994, roč. 120, č. 6, s. 490-499.
- ZHANG, Y., TOCCHETTI, C. G., KRIEG, T., MOENS, A. L. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012, roč. 53, č. 8, s. 1531-1540.