

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra farmakologie a toxikologie



**Stanovení stechiometrie komplexu aktivního metabolitu dexrazoxanu  
ADR-925 s železem a mědí standardní Jobovou metodou**

Diplomová práce

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

„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 použita k získání jiného či stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Tereza Morávková

.....

.....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala mému školiteli doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D., za konzultace, připomínky a cenné rady při psaní této diplomové práce a také předchozímu školiteli PharmDr. Tomáši Filipskému, Ph.D., který mi velice pomáhal při experimentální činnosti v laboratoři. Také děkuji Katedře farmakologie a toxikologie za poskytnutí laboratoře pro naměření mých výsledků. Dále děkuji všem mým blízkým za podporu.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Tereza Morávková

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

Název diplomové práce: Stanovení stechiometrie komplexu aktivního metabolitu dexrazoxanu ADR-925 s železem a mědí standardní Jobovou metodou

Železo a měď jsou pro organismus důležité stopové prvky, které hrají roli v mnoha fyziologických procesech lidského organismu. Koncentrace obou těchto prvků je v lidském těle udržována v rovnováze. Když je rovnováha narušena, může dojít k nedostatku či nadbytku těchto prvků. Oba stavy jsou pro organismus škodlivé. Volné ionty železa a mědi katalyzují tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), které pak poškozují proteiny i DNA. Porušení homeostázy těchto kovů má také souvislost s diabetem 2. typu, kardiotoxicitou, cirhózou jater a neurodegenerativním onemocněním jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba.

Dexrazoxan je léčivo, které se používá jako kardioprotektivum před toxicitou způsobenou antracykliny. Původní teorie ukazovala na železo-chelatační schopnost jeho aktivního metabolitu ADR-925 jako mechanismu protekce před těmito cytostatiky.

Předmětem této diplomové práce bylo zjistit, zda ADR-925 je schopen chelatovat ionty  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  za fyziologicky a patofyziologicky významných pH hodnot (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) a stanovit stechiometrii vznikajících komplexů za pomoci standardní Jobovy metody.

Bylo zjištěno, že ADR-925 dobře chelatuje ionty železa i mědi za všech pH podmínek. Ve většině případů metodika ukázala na vznik komplexu 1:1, v určitých případech ale stanovení stechiometrie selhalo.

## **ABSTRACT**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Tereza Morávková

Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

Title of Thesis: Assessment of the complex stoichiometry of the active dexrazoxane metabolite ADR-925 with iron and copper by the standard Job's method

Iron and copper are important trace elements which participate on many physiological processes in humans. Their kinetics in the organism is tightly regulated since both lack or excess of these elements are associated with pathological states. Free ions of iron and copper can catalyse reactive oxygen species (ROS) production and hence cause damage to proteins and DNA. Imbalance in these metals is linked with diabetes, cardiotoxicity, cirrhosis of the liver and neurodegenerative diseases as Alzheimer's disease or Parkinson's disease.

Dexrazoxane is a drug with documented protecting effect against cardiotoxicity of anthracyclines. A former theory associated its protective effects against these cytotoxic drugs with the iron-chelating properties of its active metabolite ADR-925.

The goal of this diploma thesis was to explore if ADR-925 is able to chelate  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions at physiologically and pathophysiologically relevant pH values (4,5; 5,5; 6,8 and 7,5) and to determine the stoichiometry of the formed complexes by use of the standard Job's method.

It was found that ADR-925 is chelating iron and copper ions at all selected pH conditions. The complex 1:1 was found in most conditions, however, the method failed to establish the stoichiometry in certain cases.

## **OBSAH:**

1	Úvod .....	1
2	Cíl práce .....	2
3	Teoretická část.....	3
3.1	Význam a výskyt železa .....	3
3.2	Toxicita železa.....	4
3.3	Hospodaření se železem.....	4
3.4	Nedostatek železa .....	5
3.5	Nadbytek železa.....	6
3.6	Měď v organismu - fyziologie a její význam a toxicita.....	7
3.7	Nedostatek mědi v organismu .....	9
3.8	Nadbytek mědi v organismu.....	9
3.9	Porucha homeostázy železa a mědi .....	10
3.10	Antracykliny a jejich kardiotoxicita.....	11
3.11	Chelatace .....	12
3.12	Chelátory železa a mědi.....	13
3.12.1	Syntetické látky .....	13
3.12.2	Přírodní látky.....	16
4	Experimentální část .....	18
4.1	Materiál a přístroje.....	18
4.1.1	Chemikálie.....	18
4.1.2	Přístroje a vybavení.....	18
4.2	Pracovní postupy .....	19
4.2.1	Hodnocení zásobních roztoků.....	19
4.2.2	Ionty kovů a pH prostředí .....	19
4.2.3	Stanovení absorpčního maxima ADR-925 a jeho komplexu .....	20

4.2.4	Jobova metoda.....	20
4.2.5	Statistická analýza.....	21
5	Výsledky .....	21
6	Diskuze.....	39
7	Závěr .....	41
8	Seznam zkratk.....	42
9	Seznam použité literatury .....	43

# 1 Úvod

Železo a měď jsou přechodné kovy, které jsou pro organismus esenciální. Jsou potřebné pro řadu životně důležitých reakcí. Železo se podílí na přenosu kyslíku, při syntéze DNA a katalyzuje řadu oxidačně-redukčních reakcí. Měď je součástí mnoha enzymů. Jejich množství však musí být ve fyziologickém rozmezí. Nadbytek železa a mědi může mít škodlivý dopad na buňky, protože volné ionty těchto přechodných kovů se podílí na tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS).

Dexrazoxan je dlouhodobě klinicky používané léčivo, které se používá pro prevenci kardiotoxicity způsobené antracykliny. Antracykliny se totiž za spoluúčasti železa účastní reakcí, které směřují k tvorbě škodlivých ROS. Dexrazoxan se po podání hydrolyzuje přes meziprodukty až na aktivní metabolit ADR-925, který je zodpovědný za chelatační aktivitu tohoto léčiva. Právě tento mechanismus byl dříve považován za klíčový při ochraně před kardiotoxicitou antracyklinů.



## 2 Cíl práce

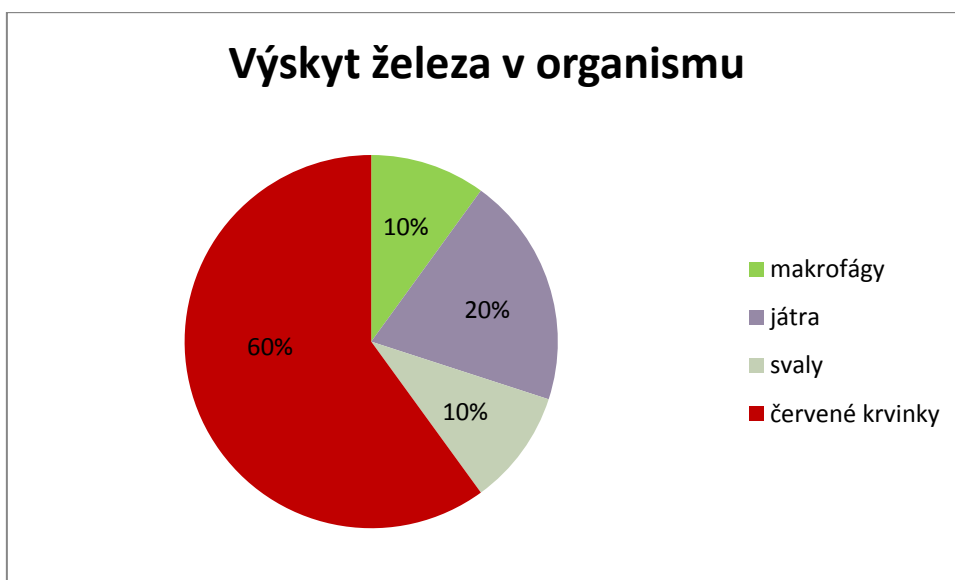
Cílem této práce bylo:

- a) zjistit, zda ADR-925 tvoří komplexy s redukovanými i oxidovanými ionty železa a mědi za různých fyziologických i patofyziologických významných pH podmínek (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5)
- b) stanovit stechiometrii vznikajících komplexů standartní Jobovou metodou.

### 3 Teoretická část

#### 3.1 Význam a výskyt železa

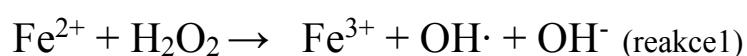
Železo je pro člověka velmi významným stopovým prvkem. Je důležité pro transport kyslíku, jelikož je součástí hemoglobinu v krvi, myoglobinu ve svalech, dále je součástí stovek enzymů v každé buňce (např. cytochromů, NO synthasy), které jsou důležité pro řadu chemických reakcí (Wilhelm 2017). Je proto důležité ho přijímat v dostatečném množství - doporučená denní dávka je 1-2mg a nachází se například ve vnitřnostech, vejcích, rybách, ořích a listové zelenině (Filipský et al. 2013). Množství železa v organismu u dospělé ženy je okolo 2g, u dospělého muže přibližně okolo 5g (Wilhelm 2017). Většina železa je ve formě hemoglobinu červených krvinek v krvi a jejich prekurzorech v kostní dřeni. Dále je zásobní železo ve formě feritinu uloženo v játrech a makrofágích (Hurrell et al. 2004). Významné množství se také nachází v myoglobinu svalů (Obr.1). Velmi malé množství železa je vázáno na transferin v krvi, který se za den recykluje zhruba pětkrát (Andrews 1999, Vokurka et al. 2018).



Obr.1 Výskyt železa v organismu (Vokurka et al. 2018)

### 3.2 Toxicita železa

Železo se může nacházet ve dvou oxidačních stavech a to ve formě iontů  $\text{Fe}^{2+}$  nebo  $\text{Fe}^{3+}$ , proto má železo oxidačně-redukční vlastnosti. Díky tomu může katalyzovat řadu prospěšných reakcí. Na druhou stranu může tímto způsobem katalyzovat i reakce toxické. Příkladem toxické reakce je Fentonova (reakce 1) (Racek et al. 1999), při které dochází vlivem kationtu  $\text{Fe}^{2+}$  ke vzniku hydroxylového radikálu, který je velice škodlivý pro buněčné membrány, proteiny a DNA (Masopust et al. 2004).



### 3.3 Hospodaření s železem

Pro pokrytí denní potřeby železa je nutné ho přijímat stravou. Nejvýznamnější potraviny obsahující železo jsou živočišného původu (játra, srdce, červené maso). Ty obsahují železo ve formě hemu, které se dobře absorbuje. Bohaté na železo jsou i luštěniny či různé ořechy a další potraviny rostlinného původu, ale zde se železo vyskytuje v nehemové, anorganické formě a hůře se tak vstřebává (Hurrell et al. 2004, Szarfarc et al. 2001). Toto anorganické železo se vstřebává ze střeva a to pouze ve formě dvojmocných iontů  $\text{Fe}^{2+}$ , proto se trojmocné ionty musí nejprve redukovat, např. redukčními činidly přítomnými v potravě nebo duodenálním cytochromem b.  $\text{Fe}^{2+}$  ionty jsou následně přeneseny přes apikální membránu enterocytů pomocí DMT1 („divalent metal transporter 1“, přenašeč dvojmocných kovů 1). Pokud je železo původem z hemu, transportuje se neznámou cestou do enterocytu, kde je  $\text{Fe}^{2+}$  uvolněn pomocí hemoxygenázy-1. Železo uvnitř enterocytu je následně, nezávisle na jeho původu, transportováno pomocí přenašeče ferroportinu přes basolaterální membránu do krevního řečiště, kde se zároveň reoxiduje na  $\text{Fe}^{3+}$  a váže se na transferin (Yeh et al. 2009).

Jak bylo uvedeno výše, je sice železo pro organismus nezbytné, ve velkém množství však toxické. Tělo tedy musí příjem železa regulovat na úrovni vstřebávání z trávicího traktu, za které je zodpovědný hormon hepcidin. Když je v organismu hodně železa, zvýší se hladina hepcidinu a sníží se tak vstřebávání železa z tenkého střeva. Naopak když je železa málo, hladina hepcidinu se sníží a může se tak vstřebat více železa (Muckenthaler et al. 2008).

Savci ztrácejí železo zejména deskvamací buněk sliznic a kůže, největší ztráty železa jsou během krvácení (menstruační, při úrazech, operacích, žaludečních vředech) a v těhotenství. Dále je železo potřeba na obnovu erytrocytů, což představuje přibližně 25 mg/den, z toho je ale větší část recyklována ve slezině či játrech. Běžné denní ztráty železa jsou 1-2 mg, což je méně jak 0,04 % z celkového množství. Nejvíce železa je potřeba během těhotenství, protože objem krve stoupá až o 40 % a objem erytrocytů přibližně o 20% (Hurrell et al. 2004, Muckenthaler et al. 2008).

Neexistuje žádný regulační mechanismus pro vylučování železa z těla. Proto je rovnováha udržována pouze regulováním vstřebávání železa hepcidinem, jak bylo popsáno výše (Hurrell et al. 2004, Yeh et al. 2009).

### **3.4 Nedostatek železa**

Nedostatek železa v organismu může mít různé, často i kombinované, příčiny - velké ztráty, vyšší potřeby organismu, nedostatečný příjem, či špatné vstřebávání (Wilhelm 2017).

- Velké ztráty krve: hlavně u žen v období menstruace, zejména u těch, které mají v tomto období ztrátu krve větší jak 80ml. Dále při krvácení z gastrointestinálního traktu (žaludeční vředy) (Umbreit 2005, Hoffbrand et al. 1999).
- Vyšší potřeby organismu: to se týká těhotných nebo kojících žen, malých a dospívající dětí, hlavně pak těch, které rychle rostou (Umbreit 2005).

- Nedostatečný příjem: nedostatečně pestrá strava, například u vegetariánů, veganů, nebo také vlivem interakce s některými léčivými, jako jsou antacida (Wilhelm 2017).
- Malabsorpce železa: děje se tak například při celiakii, resekci žaludku, u chorob střev, například v případě Crohnovy choroby (Hoffbrand et al. 1999).

Pokles koncentrace železa může nastat i při různých chronických infekčních onemocněních a nádorovém bujení, kdy nedochází k jeho vylučování, ale hromadí ve tkáních. Tento stav připomíná na první pohled anémii z nedostatku železa, ale léčba substitucí železem stav ještě zhoršuje (Ščudla 2009).

Rozlišujeme 3 stupně nedostatku železa:

- **prelatentní**: dochází ke snižování zásobního železa, ale dodávka železa do erytroblastů a kostní dřeně je v normálu.
- **latentní**: zásoby jsou vyčerpány - feritin je snížen pod spodní hranici normy, zde už se objevuje nižší dodávka do erytroblastů kostní dřeně a nízká hladina železa v séru.
- **manifestní**: rozvíjí se anemie - hodnoty hemoglobinu jsou pod spodní hranicí normy. Až v této fázi se objevují příznaky (např. únava, ztráta chuti k jídlu, bledost sliznic, bolavé koutky úst) (Wilhelm 2017, Masopust et al 2004).

### ***3.5 Nadbytek železa***

Za normálních okolností je železo pevně vázáno na bílkoviny (např. transferin), a tak není nebezpečné. Toxicky působí železo, které je v krvi/buňce volné a může tak katalyzovat tvorbu ROS, které pak mohou způsobit oxidaci lipidů, aminokyselin, a tak poškodit proteiny i DNA (Fleming et al. 2012).

Nadbytek železa může nastat u pacientů, kteří jsou dlouhodobě léčeni krevními transfuzemi. Dalšími příčinami může být předávkování parenterální cestou či jako následek genetických poruch, jakou je například hereditární hemochromatóza. Během této choroby se v důsledku špatné regulace vstřebává z duodena i několiknásobek denní běžné dávky železa (Vokurka et al. 2018).

Nadbytečné železo poškozuje organismus tak, že se hromadí v buňkách a orgánech, kde dochází k tvorbě ROS, které působí škodlivě. Většinou bývají závažně poškozena játra, může zde dojít až k cirhóze a zvyšuje se riziko hepatocelulárního karcinomu. Dalším citlivým orgánem na nadbytek železa je pankreas, kde jeho hromadění způsobí zánik Langerhansových ostrůvků, díky tomu klesá syntéza inzulínu a vzniká diabetes mellitus. U závažnějších stavů tohoto onemocnění je poškozen i myokard, což může vést až k arytmiím a srdečnímu selhání. Dále se může železo ukládat v kloubech, kde působí bolest. Postiženy mohou být i pohlavní žlázy, což může vést až k neplodnosti. Zevně se nadbytek železa projevuje bronzovým zbarvením kůže (Vokurka et al. 2018).

### ***3.6 Měď v organismu - fyziologie, její význam a toxicita***

Měď je důležitým stopovým prvkem vyskytujícím se v každé buňce organismu. Je to stejně jako železo přechodný kov, tudíž se nachází ve více formách a to zejména v následujících dvou: iontech měďných  $\text{Cu}^+$  a iontech měďnatých  $\text{Cu}^{2+}$ . I přes jeho velmi malé množství 0,10-0,15 g v celém organismu, je v lidském těle třetím nejhojněji zastoupeným přechodným prvkem, hned po železe a zinku (Trojan et al. 2003, Hamza et al. 2003).

Tento stopový prvek je nutné přijímat potravou, obsahují ji například hrozny, ořechy nebo vnitřnosti. Denní příjem se pohybuje okolo 0,025g a absorbuje se z tenkého střeva (z jeho proximální části). Když je mědi nedostatek, její vstřebávání se zvýší, naopak při nadbytku se nevstřebává vůbec (Trojan et al. 2003, Racek et al. 1999).

Přesný mechanismus jejího vstřebávání a regulace tohoto procesu není zcela jasný (Jomova et al. 2011). Absorpci mědi ovlivňují i další faktory. Příkladem je současný příjem některých látek, například zinku, či přítomnost některé nemoci, jakou je například Crohnova choroba (Trojan et al. 2003, Racek et al. 1999).

V krvi se měď nachází téměř výhradně ve vázané formě a to na albumin, transkuprein a ceruloplasmin. Ceruloplasmin je hlavním přenašečem mědi do somatických buněk, kde je důležitá pro tvorbu enzymů, které ji obsahují. Hlavním přenašečem pro přenos mědi z trávicího traktu do jater je pak albumin. Jaterní buňky (hepatocyty) jsou důležité pro udržení homeostázy mědi. Fungují jednak jako zásobárna, tím že zabudovávají měď do proteinových struktur. Nadbytečnou měď jsou schopny vyloučit hepatobiliární cestou ven z organismu, což je majoritní cesta vylučování mědi. Minoritně se také vylučuje deskvamací buněk, vypadáváním vlasů, potem a močí. Homeostáza v játrech se udržuje pomocí ATPáz, konkrétně ATP7A a ATP7B, které pomáhají transportovat měď z buněk (Tümer et al 2004, Horn et al 2002).

Význam mědi pro organismus je značný, obsahuje ji každá buňka našeho organismu. Slouží jako kofaktor řady enzymů, katalyzuje enzymatické reakce: buněčné dýchání (součást cytochrom oxidázy C), síťování elastinu a keratinu, tvorbu karnitinu, biosyntézu některých hormonů a neurotransmiterů (dopaminová beta-hydroxyláza). Dále se nepřímo podílí na krvetvorbě, protože ovlivňuje homeostázu železa (ceruloplasmin a hephaestin) (Tümer et al 2004, Horn et al 2002).

Stejně jako železo, může být i měď pro organismus toxická a to podobným mechanismem (analogický pochod jako reakce 1, jen se na ní podílí měďné ionty). Hydroxylové radikály pak poškozují mnoho buněčných struktur, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny, lipidy a další (Racek et al. 1999).

### **3.7 Nedostatek mědi v organismu**

Jedna z příčin nedostatku mědi v organismu je Menkesova choroba. Je to dědičné onemocnění, vázané na chromozom X. Incidence je 1/250 000. První klinické projevy se objevují již 2-3 měsíce po narození křečemi a hypotonií. Většina pacientů umírala bez léčby velmi brzy, ve věku okolo 3 let. Nemoc se projevuje poruchou růstu, změnami skeletu, velice brzy se objeví těžká mentální i fyzická retardace a jedinci s touto chorobou mají tenké, stočené, nepigmentované vlasy, proto se nemoc občas nazývá syndrom uzlíčkových vlasů. Příčinou této nemoci je mutace genu, který kóduje transmembránový protein ATP7A, který se podílí na transportu mědi do cuproenzymů a na exportu přebytečné mědi ven z buněk (Tümer et al 2004, Horn et al 2002).

Nedostatek mědi může mít však další příčiny, mezi které patří malnutrice, velmi těžké průjmy či dlouhodobá parenterální výživa bez obsahu mědi (Racek et al. 1999).

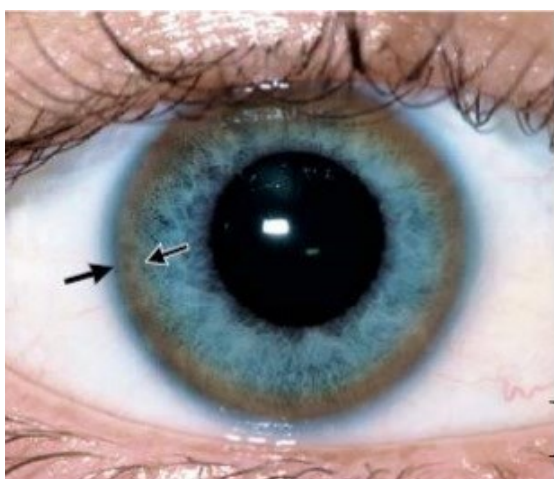
### **3.8 Nadbytek mědi v organismu**

Jednou z příčin nadbytku mědi v organismu je Wilsonova choroba, též nazývaná hepatolentikulární degenerace, což je autosomálně recesivně dědičné onemocnění. Způsobuje ji mutace genu, který kóduje transmembránový protein ATP7B (narozdíl od Menkesovy choroby, kde je mutace genu kódujícího ATP7A) a to působí poruchu kinetiky mědi (Hahn 2014). Gen, který způsobuje Wilsonovu chorobu je na 13. chromozomu (Li et al. 2013). Následkem této mutace se měď nedokáže zabudovat do struktury ceruloplazminu a ani nemůže být vyloučena hepatobiliární cestou. Měď se tak ukládá v játech ale i jiných orgánech a to vede k různým klinickým projevům (Xie et al. 2017).

Jedním z hlavních projevů choroby je neuropatie, zejména poškození extrapyramidového systému. To zahrnuje tremor, tuhost, třes a orofaryngální dysfunkce,



jako například expektorace a dysfonie (Zhang 1959, Veharanta et al. 1981). Dále zde velmi často dochází k akutní či chronické hepatitidě, cirhóze jater až jaterní encefalopatii (Xie et al. 2017). Dalším častým projevem, který je pro Wilsonovu chorobu typický je Kayserův-Fleischerův prstenec, podle kterého lze nemoc v mnoha případech identifikovat (Obr.2) (Veharanta et al. 1981). V důsledku ukládání mědi se kolem vnější části rohovky tvoří červený nebo zelený prstenec. Děj probíhá na povrchu endotelových buněk. (Cope-Yokoyama et al. 2010).



Obr.2 Kayserův-Fleischerův prstenec  
převzato z: Schrafg a Schott (2012)

K dalším klinickým projevům choroby se řadí i osteoporóza, takže pacienti jsou velice náchylní ke zlomeninám (Quemeneur et al. 2014).

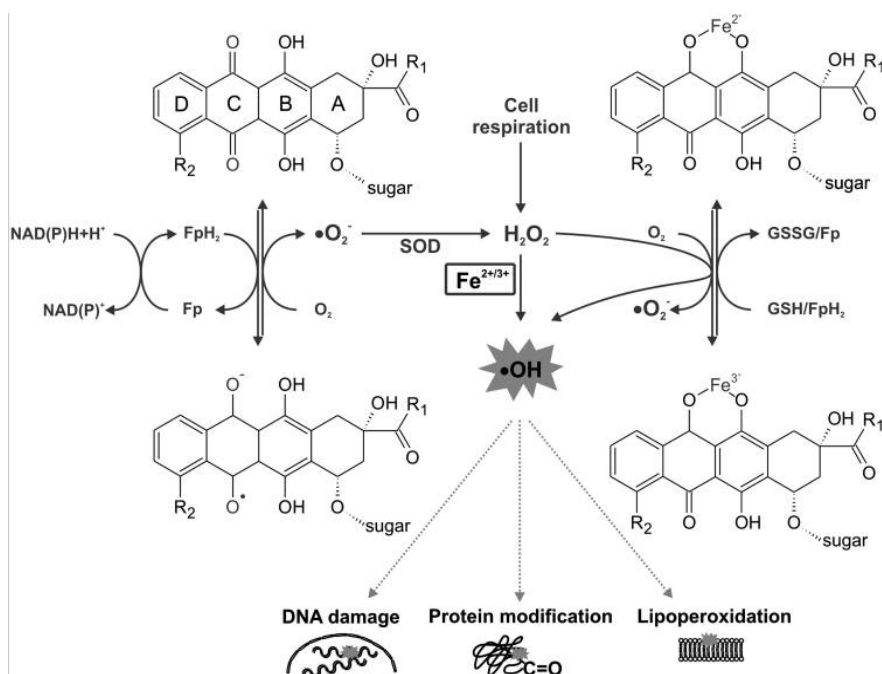
### ***3.9 Porucha homeostázy železa a mědi***

Je důležité zmínit, že porucha homeostázy mědi a železa může mít i vztah k neurodegenerativním onemocněním, jako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba či amyotrofická laterální skleróza. Mozek obsahuje oba tyto přechodné kovy ve vysoké koncentraci, jelikož jsou nezbytné pro mnohé důležité funkce. Ale je možné, že jsou i příčinou některých neurodegenerativních pochodů, a to vlivem tvorby ROS, které pak poškozují proteiny a různé buněčné struktury (Rivera-Mancia et al. 2010).

### 3.10 Antracykliny a jejich kardiotoxicita

Antracykliny patří mezi nejúčinnější protinádorová léčiva, ale zároveň se řadí k nejnebezpečnějším kardiotoxickým léčivům, čímž je jejich použití omezeno. Podle původních teorií je příčinou kardiotoxického působení tvorba ROS, která je zprostředkována železem (Obr. 3). Mezi antracykliny patří doxorubicin, daunorubicin, epirubicin a další (Ewer et al. 2005).

Mechanismem účinku antracyklinů je inhibice topoizomerázy 2, což způsobí zástavu replikace a dělení buněk (Puma et al. 2008). Existují 2 typy topoizomerázy, a to topoizomeráza 2 $\alpha$ , která se nachází v nádorových buňkách a topoizomeráza 2 $\beta$ , která se vyskytuje ve zdravých buňkách. Z posledních výzkumů vyplývá, že vliv na poškození kardiomyocytů má právě inhibice topoizomerázy 2 $\beta$ , zatímco inhibice druhé isoformy je podstatou protinádorového účinku (Mladěnka et al. 2018, Mladosievičová et al. 2014).



Obr. 3 Znárodnění tvorby oxidačního stresu vlivem antracyklinů a za katalýzy železem převzato z Štěrba et al 2013

Kardiotoxicita může nastat buď hned během léčby, případně těsně po podání antracyklinů. Zde hovoříme o akutní kardiotoxicitě, která se projevuje vazodilatací s hypotenzí a poruchami srdečního rytmu (Levitt et al. 2004, Jones et al. 2007). Závažnější jsou chronické formy, které se mohou projevit během jednoho roku, ale i desítek let po jejich podání (Scully et al. 2007). Chronické formy mají často špatnou prognózu (Falker et al. 2000).

Tyto látky se používají, jak již bylo zmíněno k léčbě rakoviny, konkrétně u akutních leukémií u dětí, hematologických a solidních nádorů včetně karcinomu prsu, vaječníků, žaludku, sarkomu měkkých tkání a kostí, non-Hodgkinovu a Hodgkinovu lymfomu a mnohočetnému myelomu (Arcamone et al. 1969).

### ***3.11 Chelatace***

Chelatace znamená děj, při kterém molekulu kovu obklopí jiná molekula (chelátor) a sevře ji. Odtud je odvozen i název; (řecky „klepeto“ je „chelé“). Využití má například při otravě organismu těžkými kovy, kdy molekula antido vytvoří s kovem chelát (Lüllmann et al. 2004). Chelátory se využívají i při léčbě stavů s nadbytkem fyziologicky nezbytných kovů železa i mědi. Chelátory železa byly zkoušeny jako prevence kardiotoxicity navozené antracyklinovými antibiotiky, ale kromě dexrazoxanu nebyla výrazná protekce prokázána (Kalinowski et al. 2005).

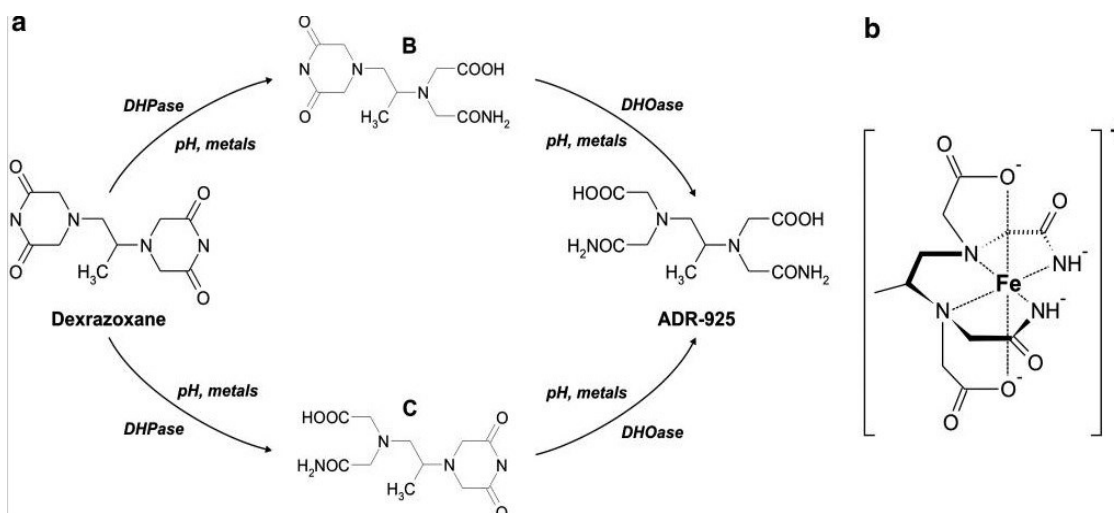
Je důležité, aby vzniklý komplex byl netoxický a dobře se vylučoval z organismu (Lüllmann et al. 2004). Komplexy musí být v organismu stabilní. Když nejsou, kov se může uvolnit z chelátoru a dál škodlivě působit, například železo Fentonovou reakcí (reakce 1) za vzniku ROS. Stabilita je do určité míry dána stechiometrií komplexu. Komplexy s nižší stechiometrií, kde nejsou všechna koordinační místa plně obsazena, jsou méně stabilní. Naopak ty s vyšší stechiometrií, kde jsou všechna koordinační místa obsazena, jsou většinou stabilní (Kalinowski et al. 2005, Zhou et al. 2012). Proto je z klinického hlediska důležité znát stechiometrii komplexů (Filipský et al. 2013).

### 3.12 Chelátory železa a mědi

#### 3.12.1 Syntetické látky

Dexrazoxan je silný chelátor, který byl schválený FDA jako kardioprotektivní látka u pacientů, kteří podstupují chemoterapii antracykliny (Kane et al. 2008). Předpokládalo se, že dexrazoxan je proléčivo, které se metabolizuje na železo-chelatující aktivní metabolit ADR-925, a že právě ten chrání srdce před kardiotoxicitou způsobenou antracykliny. Bylo však zjištěno, že i silnější a selektivnější chelátory železa neposkytly takovou ochranu před toxickým působením antracyklinů. Z novějších studií totiž vyplývá, že kardioprotektivní účinek dexrazoxanu je dán jeho schopností inhibovat topoizomerázu 2 $\beta$  v srdci. Dnes je používání dexrazoxanu bohužel omezeno, kvůli obavám z jeho nežádoucích účinků. To však zatím není podloženo jednoznačnými klinickými důkazy (Mladěnka et al. 2018).

Dexrazoxan je (+)-(S)-enantiomer racemického 1,2-bis-(3,5-dioxopiperazin-1-yl) propanu (razoxanu). Razoxan ale není dobře rozpustný ve vodě a tak je nemožné ho podávat intravenózně (Creaven et al. 1975). Proto je výhodnější používat jeho levotočivý enantiomer dexrazoxan, který je ve vodě až 5krát více rozpustný a lze ho tak podávat intravenózně (Repta et al. 1976). Dexrazoxan podléhá ve vodných roztocích o fyziologickém pH chemické hydrolýze přes meziproducty s jedním otevřeným cyklem až na konečný produkt, čímž je ADR-925, který má oba cykly otevřené (Obr.4a). Tuto hydrolýzu usnadňuje přítomnost iontů, např. Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> nebo Zn<sup>2+</sup> (Hasinoff 1994, Hasinoff et al. 2000).

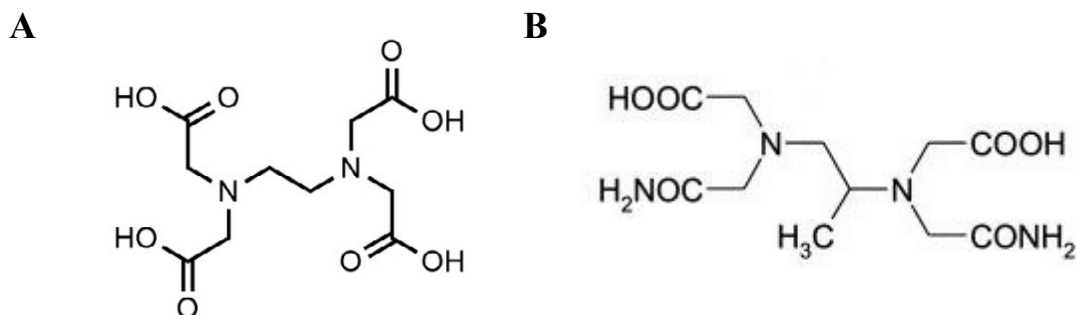


Obr. 4a Znárodnění hydrolyzy dexrazoxanu přes meziprodukty B a C na výsledný metabolit ADR-925

Obr. 4b Chemická struktura komplexů ADR-925 s Fe<sup>3+</sup>  
převzato z Štěrba et al. 2013

ADR-925 je produkt celkové hydrolyzy léčiva dexrazoxanu a má významnou afinitu k iontům Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>, se kterými tvoří komplexy, což je znázorněno na obrázku (Obr. 4b). Silným chelátorem je i EDTA, která je svou strukturou podobná ADR-925 (Obr. 5) (Diop et al. 2000).

Je důležité, že ADR-925 je silnější chelatační činidlo než antracyklinová chemoterapeutika a tak může vytěšňovat ionty železa z jejich komplexů s antracykliny a zabránit tak tvorbě ROS a poškození kardiocytů (Buss et al. 1995). Dále bylo zjištěno, že dexrazoxan navíc chrání ledviny před experimentální nefrotoxitou vyvolanou antracykliny (Zhang et al. 1996).

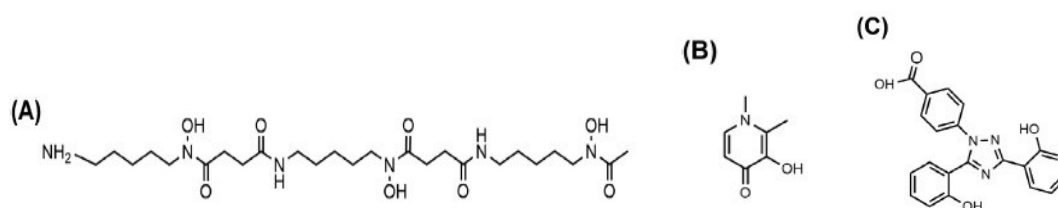


Obr. 5 Chemické struktury EDTA (A) a ADR-925 (B).

(A) převzato z Štěrbá et al. 2013

(B) převzato z Filipický et al (2013)

Dalšími klinicky používanými chelátory jsou deferoxamin, deferasirox a deferipron (Obr.6). Mimo jiné se používají u pacientů, kteří dlouhodobě podstupují krevní transfuze (Filipický et al. 2013).

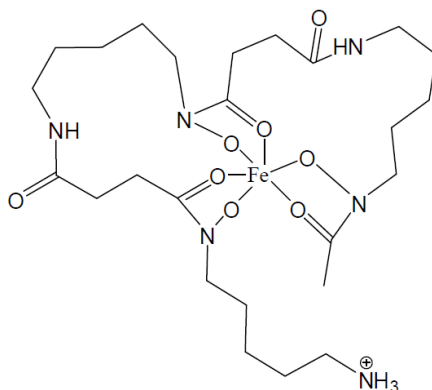


Obr.6 Strukturální vzorce syntetických chelátorů: deferoxamin (A), deferipron (B), deferasirox (C)

Převzato z Filipický et al (2013)

Deferoxamin je výborné chelatační činidlo, ve struktuře obsahuje tři skupiny kyseliny hydroxámové, které váží železo s vysokou afinitou (Obr.7). Potvrdil se u něj kardioprotektivní účinek před škodlivým působením antracyklinů, konkrétně doxorubicinu, ale pouze v buňkách, které mají železa nadbytek. V buňkách, které mají normální hodnoty koncentrace železa, se účinek nepotvrdil. I tak je deferoxamin nejúčinnější a nejrychleji působící chelátor železa, a proto se využívá u akutních intoxikacích železem. Při otravách železem se deferoxamin podává intravenózní infuzí

a zároveň perorálně. Po perorálním podání se sice nevstřebává, ale snižuje vstřebávání železa z gastrointestinálního traktu. Pro dlouhodobém podávání se aplikuje subkutánně, což může snížit compliance. Jeho velkou výhodou jsou dlouhodobé zkušenosti, dobrá účinnost a bezpečnost (Filipský et al. 2013, Lüllmann et al. 2004).



Obr.7 Deferoxamin s chelatovaným železem

Převzato z Kalinowski a Richardson (2005)

Výhodou novějších chelátorů je možnost perorálního podávání, což umožňuje lepší manipulaci a lepší compliance pacientů (Gabutti a Piga, 1996). Studie prokázaly účinnost deferipronu v inhibici toxicity způsobené antracykliny (Nisbet-Brown et al. 2003). V současné době dochází k vývoji chelatačních činidel, které mají slibný potenciál v terapii stavů nadbytku železa a mědi (Filipský et al 2013). Dalším perorálně podávaným chelátorem je deferasirox, kdy na jednu molekulu železa jsou potřeba dvě molekuly deferasiroxu. Jeho výhodou je dlouhý biologický poločas a tím méně časté dávkování (Nisbet-Brown et al. 2003).

### 3.12.2 Přírodní látky

Mezi přírodní látky se schopností cheltovat kovy se řadí flavonoidy. Jsou to polyfenolické látky přírodního původu. Do této skupiny patří více jak 4000 látek. Flavonoidy fungují jako antioxidanty, které přijímáme stravou. Denní příjem se liší,

záleží hlavně na stravovacích návycích jedince. Hojně se vyskytují v ovoci, hlavně v jablkách, borůvkách, moruších, citrusech a dalších, dále pak v zelenině, ořechách, ale také v nápojích jako je čaj, víno nebo pivo (Mladěnka et al. 2010, Del Rio et al. 2013).

Studie dokazují, že flavonoidy mají příznivé účinky na kardiovaskulární nemoci. Tyto příznivé účinky spočívají v jejich antioxidační aktivitě, která je dosahována různými mechanismy. Jedním z nich je chelatace volných přechodných kovů, čímž zabraňují tvorbě ROS, které jsou škodlivé pro organismus (Mladěnka et al. 2010).



## **4 Experimentální část**

### **4.1 Materiál a přístroje**

#### **4.1.1 Chemikálie**

ADR-925 monohydrát byl připraven na Katedře organické a bioorganické chemie z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (doc. Jaroslav Roh a Prof. Kateřina Vávrová). Heptahydrát síranu železnatého, hexahydrát chloridu železitého, vinnan železitý, pentahydrát síranu měďnatého, chlorid měďný, hydroxylamin hydrochlorid, sodná sůl kyseliny 3-(2-pyridyl)-5,6-difenyl-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonové (ferrozin), kyselina chlorovodíková, octan sodný, kyselina octová, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) a její sodná sůl byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Německo). Chlorid sodný byl zakoupen od firmy Lachema (ČR), methanol od firmy J.T.Baker (Avantor Performance Materials Inc., USA). Ultračistá voda byla získána pomocí přístroje Milli-Q RG od firmy MerckMillipore (USA).

#### **4.1.2 Přístroje a vybavení**

K navažování vzorků byly využity analytické váhy KERN ALT-220 4NM (Kern, Německo). Všechny vzorky byly měřeny UV-Vis spektrofotometrem HELIOS GAMMA (ThermoScientific Inc., USA) v polystyrenových nebo UV-Vis kyvetách (BrandTechScientific Inc., Velká Británie). Zaznamenání absorpčních spekter umožnil software VISIONlite (verze 2.2, ThermoScientific Inc., USA).

## 4.2 Pracovní postupy

### 4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok železnatých iontů byl 5mM vodný roztok heptahydrátu síranu železnatého, pro železité ionty 5mM roztok hexahydrát chloridu železitého pro pH 4,5 a 5,5 a 5mM roztok vlnanu železitého pro pH 6,8 a 7,5 (Filipský et al. 2013).

Kalibrace iontů železa byla provedena dle standardizovaného postupu. Před každým experimentem byla koncentrace železa v připravených zásobních roztocích kontrolována pomocí ferrozinu. Ferrozín je spektrofotometrické činidlo, které specificky reaguje s  $\text{Fe}^{2+}$  ionty a vzniká tak stabilní purpurově zbarvený komplex s jedním absorpčním maximem při vlnové délce 562 nm. Kalibrace  $\text{Fe}^{3+}$  iontů se prováděla nepřímou metodou - nejprve se provedla redukce  $\text{Fe}^{3+}$  iontů na  $\text{Fe}^{2+}$  ionty redukčním činidlem hydroxylaminem (finální koncentrace byla 10mM) a až následně se jejich koncentrace stanovila pomocí ferrozinu (finální koncentrace byla 5mM) (Filipský et al. 2013).

Zásobní roztok  $\text{Cu}^+$  iontů (5mM) byl připraven rozpuštěním chloridu měďného ve vodném roztoku HCl (0,1M) a NaCl (1M). Roztok  $\text{Cu}^{2+}$  iontů byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého přímo v destilované vodě na 5mM koncentraci. Tyto roztoky byly zkalibrovány za použití bathocuproindisulfonátu sodného podle předchozích publikovaných postupů (Říha et al. 2013).

### 4.2.2 Ionty kovů a pH prostředí

Stechiometrie se stanovovala vždy ve 4 různých (pato)fyziologicky významných pH (4.5, 5.5, 6.8 a 7.5). Pro pH 4.5 a 5.5 byl použit 15mM octanový pufr. Pro pH 6.8 a 7.5 byl použit 15mM HEPES pufr. Z důvodu zabránění oxidace železnatých iontů

při pH 7,5, byl k HEPES pufru přidán hydroxylamin ve finální koncentraci 5mM. Při měření chelatace železitých iontů při pH 7,5, byl použit HEPES pufr bez hydroxylaminu. Z důvodu špatné rozpustnosti, respektive nestability železitých iontů ve vodných roztocích, byly pro měření chelatace železitých iontů použity dvě soli, tj. hexahydrát chloridu železitého a vínan železitý. Hexahydrát chloridu železitého byl použit pro pH 4,5 a 5,5 a vínan železitý pro pH 6,8 a 7,5 (Filipský et al. 2013).

#### **4.2.3 Stanovení absorpčního maxima ADR-925 a jeho komplexu**

Absorpční spektra ADR-925 byla měřena za všech čtyř pH podmínek v rozmezí vlnové délky 220 až 600 nm a byla stanovena vlnová délka absorpčního maxima ADR-925, opět za všech pH podmínek, které byly měřeny (Filipský et al. 2013).

Tak jako tomu bylo u samotné substance ADR-925, byly určeny vlnové délky absorpčních maxim ( $\lambda_{Cmax}$ ) i u jeho komplexů s kovy. Byl použit nadbytek kovových iontů, a to v koncentračním poměru až do 1:6 (ADR-925:železo), či 1:10 (ADR-925:měď). Slepý vzorek tvořil pufr a rozpouštědlo (methanol) v poměru 2:1 (pufr:methanol) (Filipský et al. 2013).

#### **4.2.4 Jobova metoda**

V této práci byla k určení stechiometrie probíhajících reakcí použita Jobova metoda. Je to jednoduchá analytická metoda, která se používá k určení stechiometrie dvou reagujících komponent. Její princip spočívá v konstantní celkové molární koncentraci dvou reagentů, přičemž poměry molárních koncentrací se mění v rámci série vzorků (Job 1928).

Vodný roztok kovových iontů byl vždy po dobu 3 minut míchán s methanolickým roztokem testovaného ADR-925 v různých koncentračních poměrech od 0,25:1 do 6:1 (testovaná látka:železo) a následně změřena absorpční spektra

na spektrofotometru. Takto se změřila absorpční spektra přivšech čtyřech pH podmínkách. Slepý vzorek se skládal z pufru a rozpouštědla, tj. metanolu, v poměru 2:1 (pufr:rozpouštědlo) (Filipský et al. 2013).

#### 4.2.5 Statistická analýza

Všechna měření byla provedena minimálně dvakrát. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka vypočítaná podle vzorce  $\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$ , kde  $x$  je každá změřená hodnota,  $\bar{x}$  je průměr všech změřených hodnot a  $n$  je počet vzorků.

## 5 Výsledky

Absorpční spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek od 220 do 600 nm. V Tabulce 1 jsou uvedeny vlnové délky absorpčních maxim ADR-925 a jeho komplexů s železem. Absorpční maxima komplexů ADR-925 s železem jsou při vlnových délkách 222,5 až 251,5 nm. V Tabulce 2 jsou uvedeny vlnové délky absorpčních maxim ADR-925 a odpovídajících komplexů s mědí. Ty se nacházejí při vlnových délkách 238,5 nm až 266,5 nm.

Látka/komplex	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,8			pH 7,5		
	ADR	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	ADR	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	ADR	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	ADR	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>
$\lambda$ [nm]	221	251,5	*	220 $\pm$ 1	222,5	*	222	244	232	221	247,5	230

Tabulka 1: Vlnové délky absorpčních maxim ADR-925 a odpovídajících komplexů se železem.

\* = nebylo stanoveno z důvodu interference s absorbancí samotných Fe<sup>3+</sup> iontů

	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,8			pH 7,5		
Látka/komplex	ADR	Cu <sup>+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	ADR	Cu <sup>+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	ADR	Cu <sup>+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	ADR	Cu <sup>+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
λ[nm]	228±6	250	266,5	234	250	258	221±1	251,5	238,5	228±8	254	241

Tabulka 2: Vlnové délky absorpčních maxim ADR-925 a odpovídajících komplexů s mědi.

Pomocí Jobovy metody byly dále stanoveny chelatační poměry. Jak je uvedeno na obrázcích níže, bylo zjištěno, že ADR-925 chelatuje Fe<sup>2+</sup> ionty při pH 4,5, 5,5 a 6,8 v chelatačním poměru 1:1 (Obr 8 - 11). Pouze při pH 7,5 chelatuje v chelatačním poměru 3:2. Fe<sup>3+</sup> ionty jsou chelatovány při pH 4,5 a 5,5 v poměru 1:1 (Obr. 12 a 13). Při pH 6,8 a při pH 7,5 nelze chelatační poměry ADR-925 a Fe<sup>3+</sup> z naměřených výsledků jednoznačně stanovit (Obr.15).

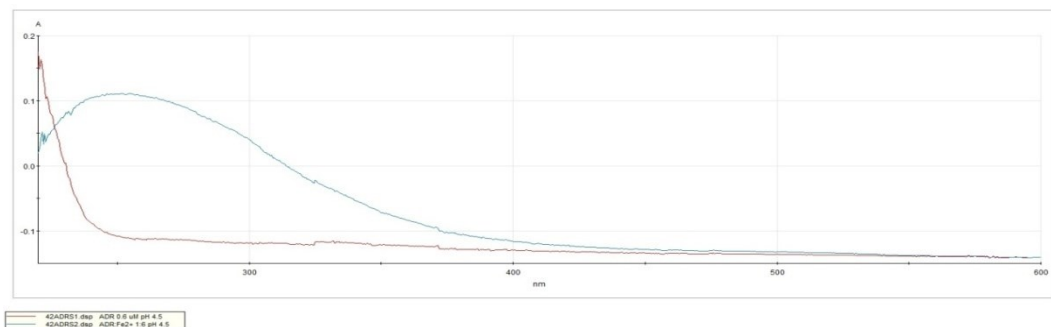
Touto metodou bylo dále stanoveno, jak ADR-925 chelatuje ionty mědi. Bylo zjištěno, že ADR-925 chelatuje Cu<sup>+</sup> ionty při všech stanovovaných pH (Obr. 16 - 19) v poměru 1:1, výsledky s Cu<sup>2+</sup> ionty nejsou jednoznačné, ale vypadá to z hlediska pravděpodobnosti na poměry 1:1 (Obr. 20 - 23).

Pro přehlednost jsou v Tabulce 3 shrnuty zjištěné chelatační poměry ADR-925 a iontů železa či mědi při měřených pH.

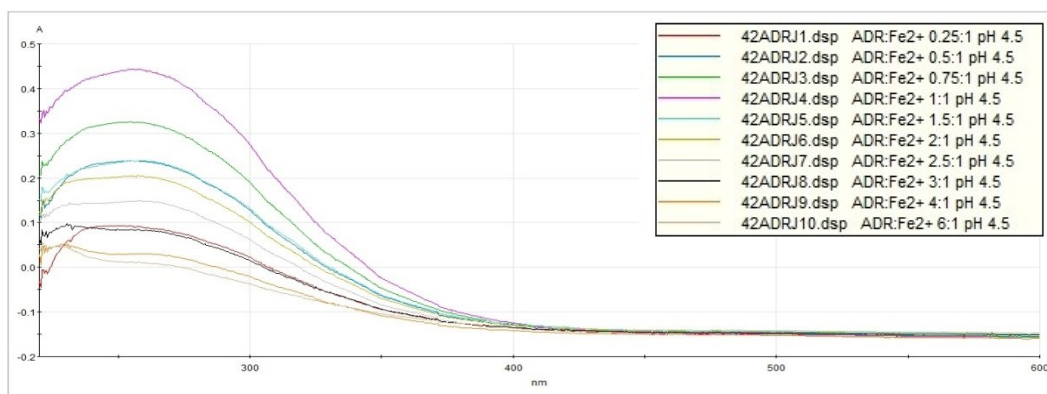
ADR-925 : kov	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,8	pH 7,5
Fe <sup>2+</sup>	1:1	1:1	1:1	1,5:1
Fe <sup>3+</sup>	1:1	1:1	?	?
Cu <sup>+</sup>	1:1	1:1	1:1	1:1
Cu <sup>2+</sup>	1:1 ?	1:1?	1:1?	1:1?

Tabulka 3: Chelatační poměry ADR-925 a iontů železa či mědi při různých pH.  
 ?= chelatuje, ale stechiometrii nelze s jistotou stanovit.

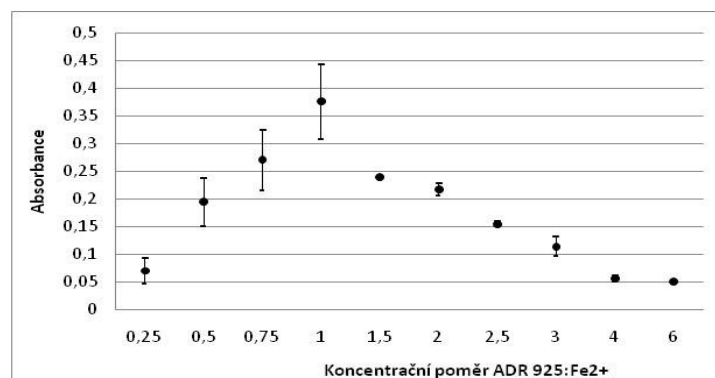
A



B

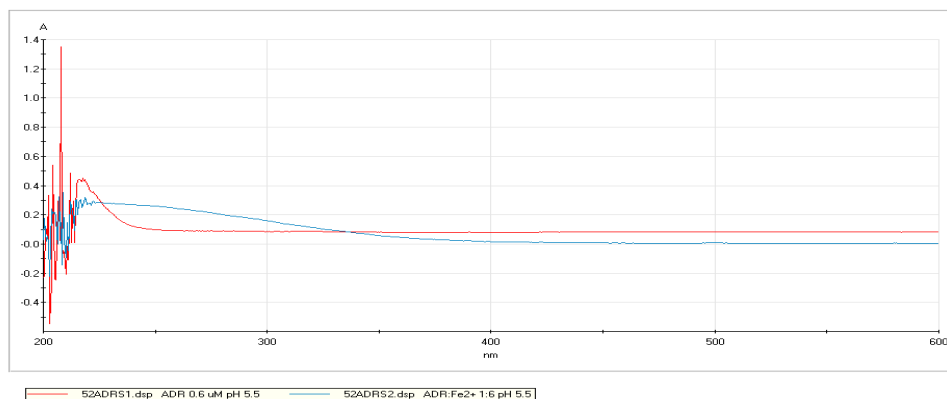


C

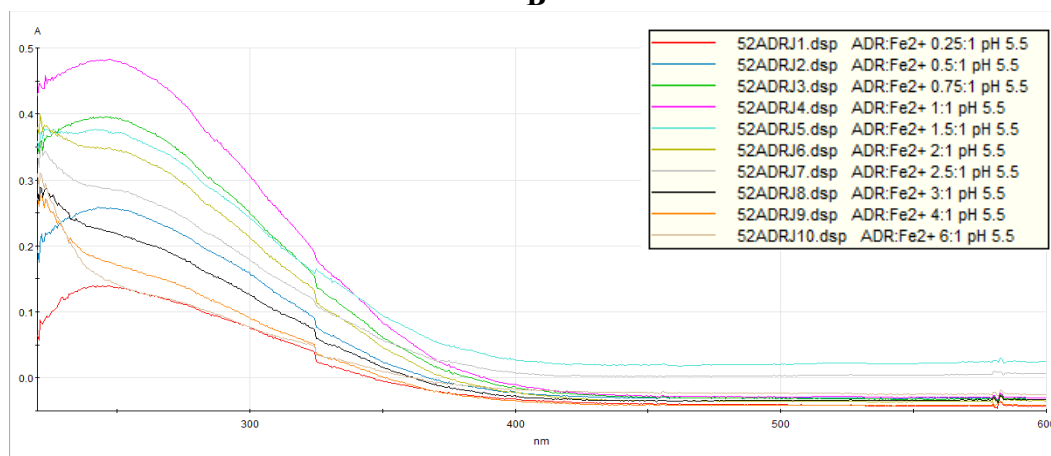


Obr. 8: ADR-925 a Fe<sup>2+</sup> při pH 4,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,6 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 221 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:železo (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco Fe<sup>2+</sup> byla 0,5 mM) s maximem při 251,5 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>2+</sup> při pH 4,5 – souhrnná koncentrace obou reagensů byla 0,5 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Z grafu jednoznačně vyplývá tvorba komplexu 1 : 1.

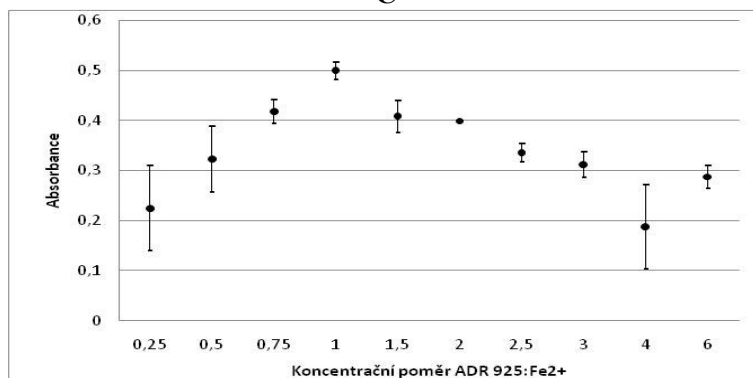
A



B

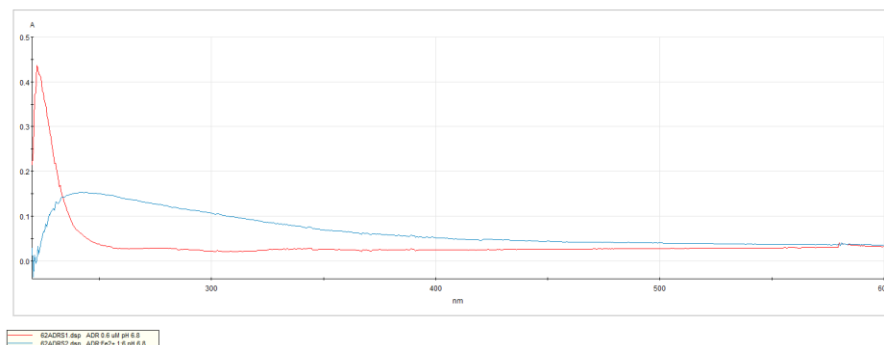


C

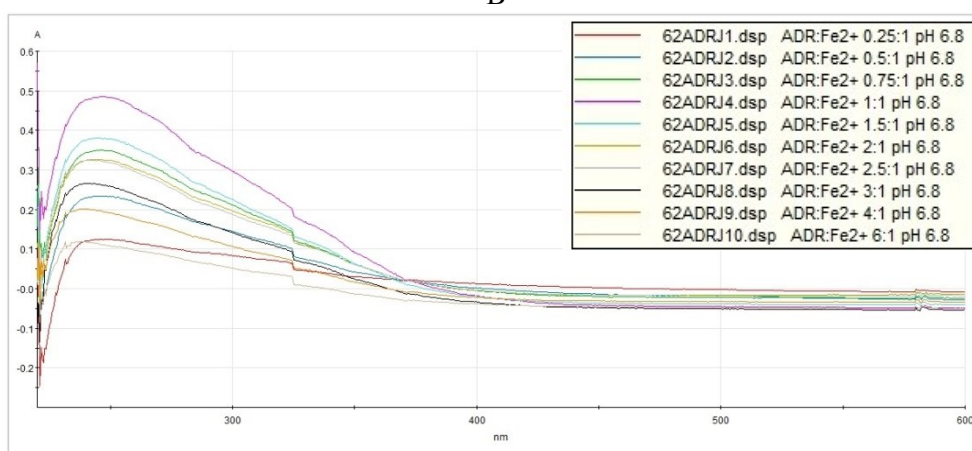


Obr. 9: ADR-925 a  $\text{Fe}^{2+}$  při pH 5,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,6 mM) s absorpčním maximem 219 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:železo (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco  $\text{Fe}^{2+}$  byla 0,5 mM) s absorpčním maximem při 222,5 nm. B) Jobova metoda a chelatace  $\text{Fe}^{2+}$  při pH 5,5 - souhrnná koncentrace obou reagensů byla 0,5 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody-závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Výsledky jednoznačně ukazují na poměr 1:1.

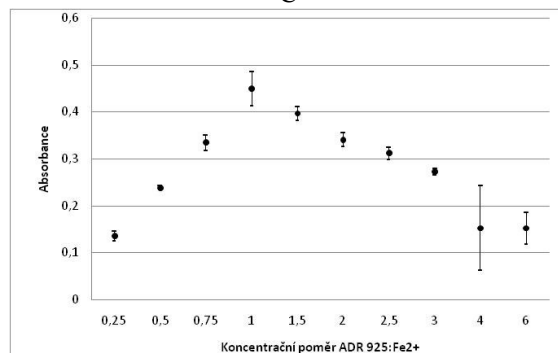
A



B

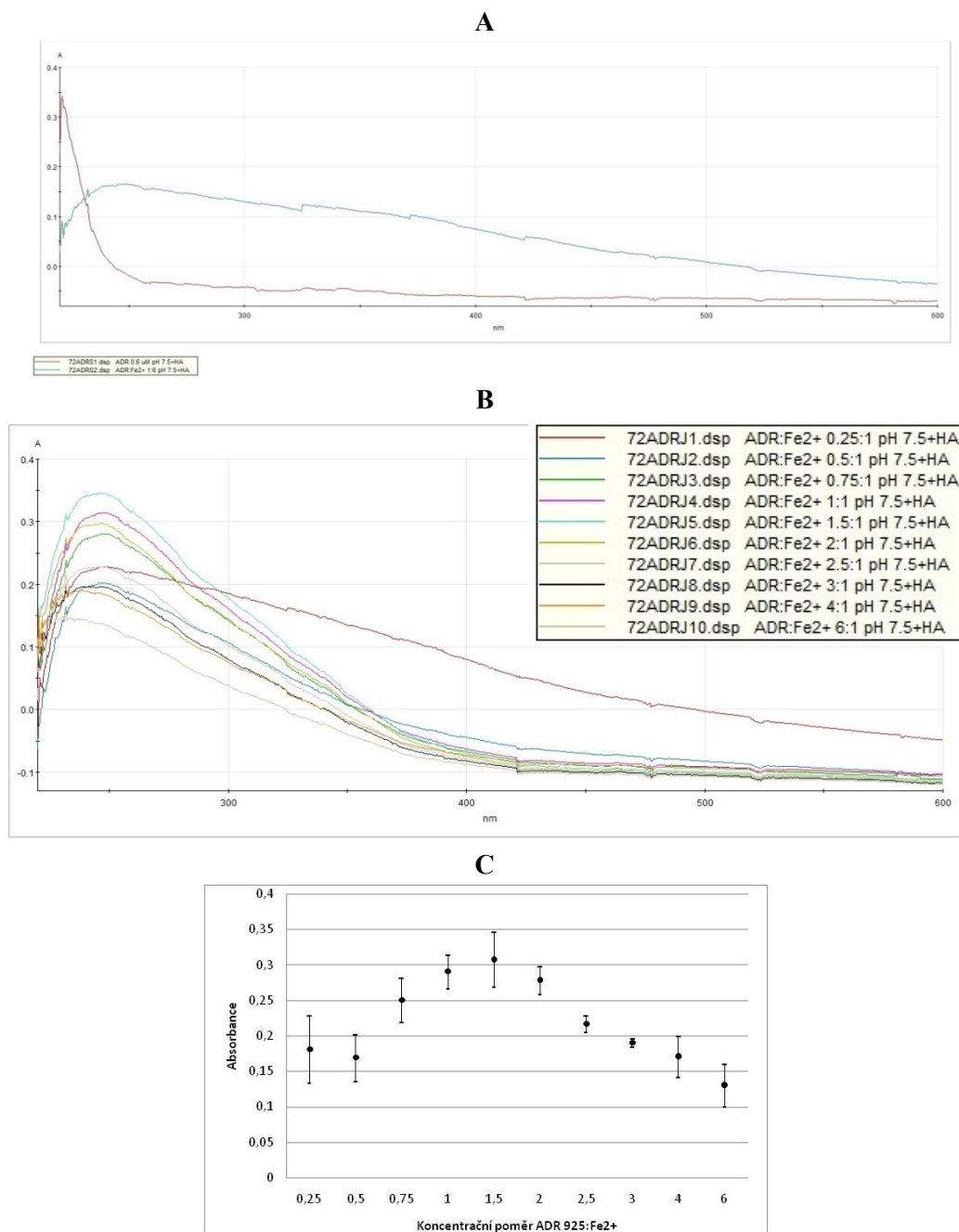


C



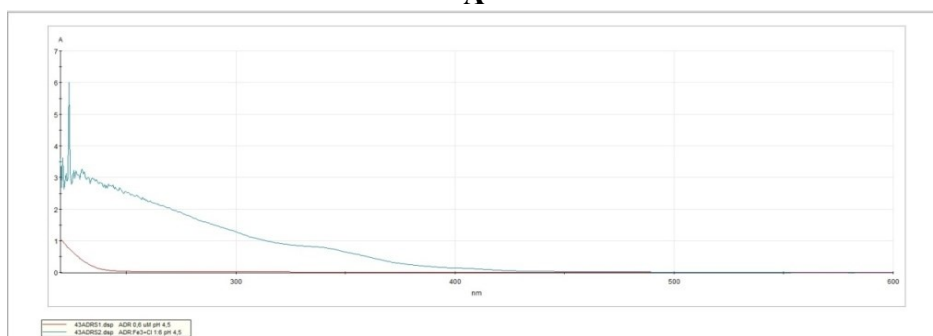
Obr. 10: ADR-925 a  $\text{Fe}^{2+}$  při pH 6,8. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,6 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 222 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:železo (finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco  $\text{Fe}^{2+}$  byla 0,5 mM) s maximem při 244 nm. B) Jobova metoda a chelatace  $\text{Fe}^{2+}$  při pH 6,8 – souhrnná koncentrace obou reagentů byla 0,5 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Z grafu jednoznačně vyplývá tvorba komplexu 1 : 1.



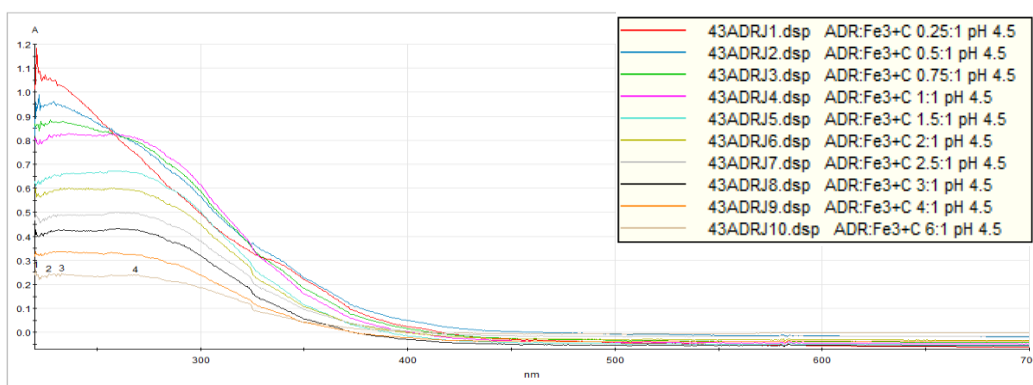


Obr. 11: ADR-925 a Fe<sup>2+</sup> při pH 7,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka finální koncentrace byla 0,6 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 221 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:železo (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco Fe<sup>2+</sup> byla 0,5 mM) s maximem při 247,5 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>2+</sup> při pH 7,5 – souhrnná koncentrace obou reagensů byla 0,5 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Výsledky ukazují na pravděpodobný chelatační poměr 3:2 (maximum u koncentračního poměru 1,5 : 1).

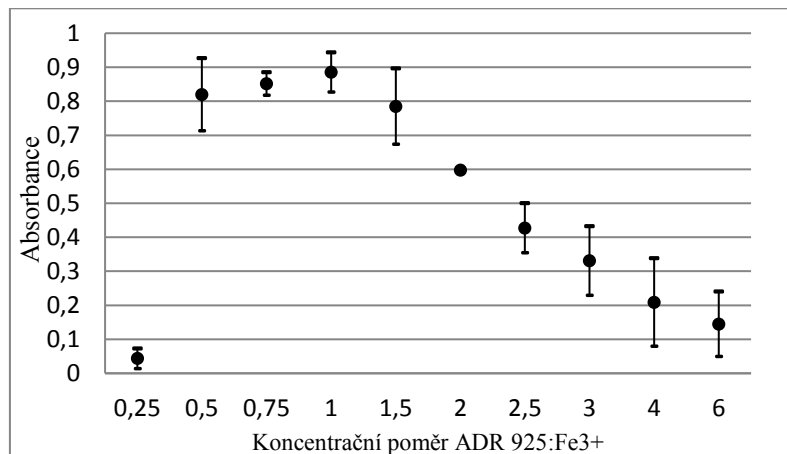
A



B

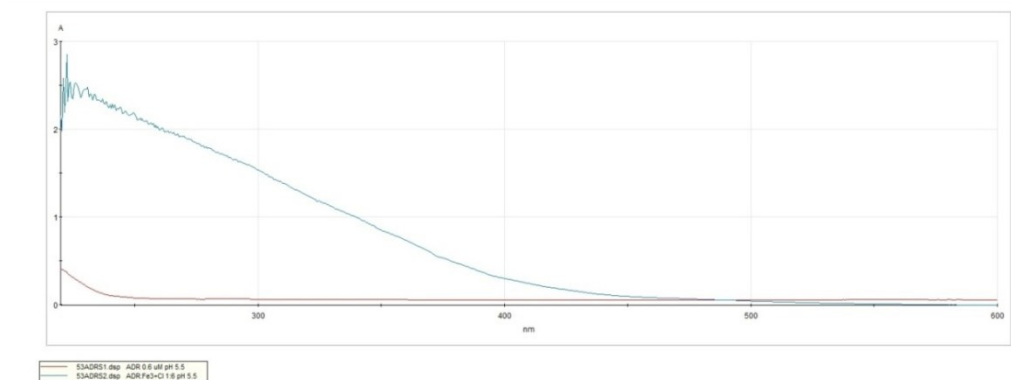


C

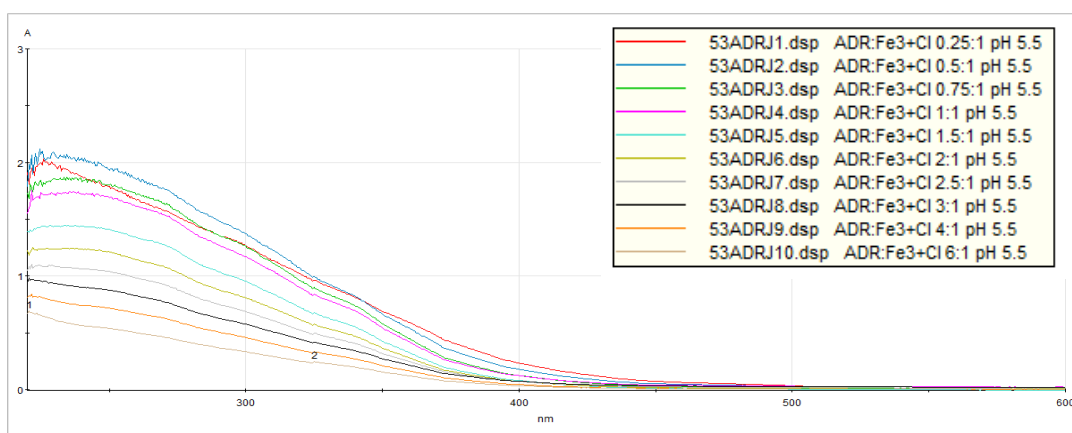


Obr. 12: ADR-925 a Fe<sup>3+</sup> při pH 4,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,6 mM) s absorpčním maximem 221 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:železo (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco Fe<sup>3+</sup> byla 0,5 mM). B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>3+</sup> při pH 4,5 – souhrnná koncentrace obou reagentů byla 0,5 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Přestože grafické znázornění v obrázku C nemusí dávat nepřesvědčivější obrázek, při pohledu na vlastní spektra (část B) je komplex 1:1 jednoznačný.

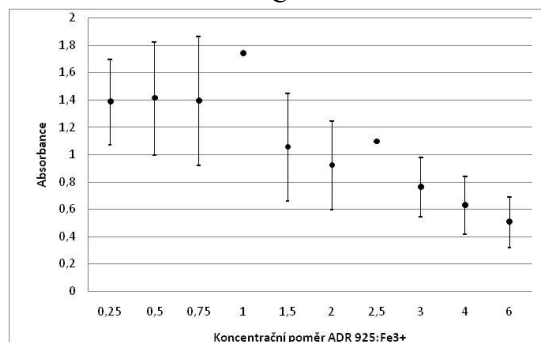
A



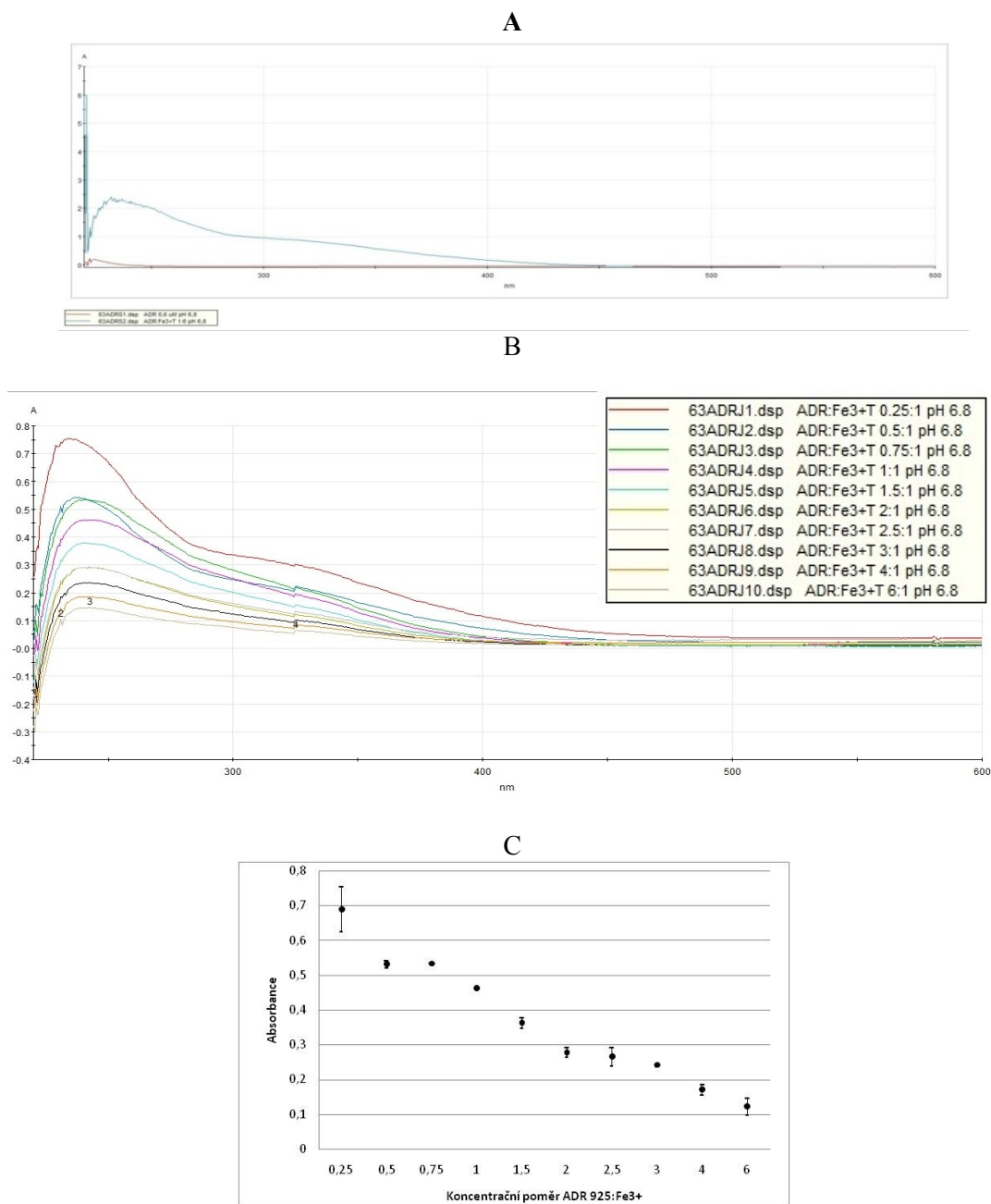
B



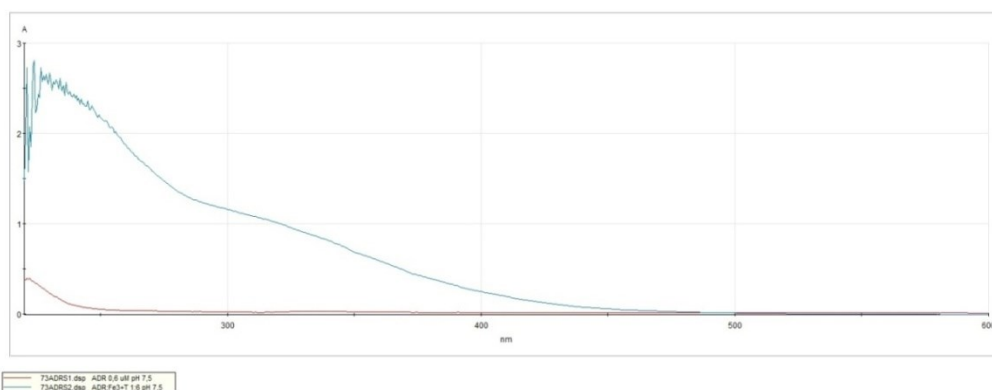
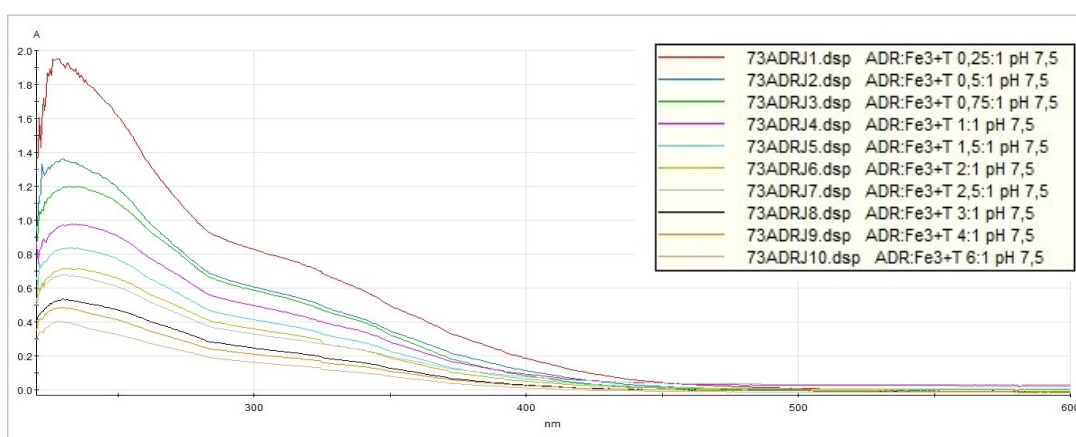
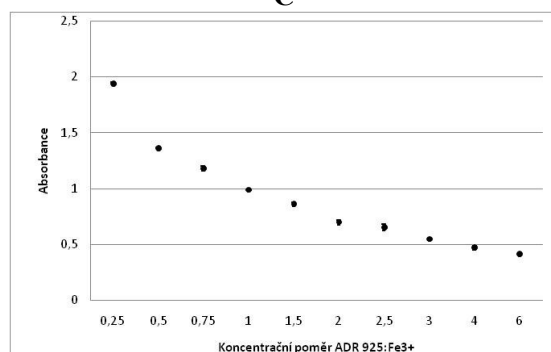
C



Obr. 13: ADR-925 a Fe<sup>3+</sup> při pH 5,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,6 mM) s absorpčním maximem 221 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:železo (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco Fe<sup>3+</sup> byla 0,5 mM). B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>3+</sup> při pH 5,5 – souhrnná koncentrace obou reagentů byla 0,5 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. V tomto případě již výsledky nejsou tak jednoznačné, ale poměr 1:1 je i s přihlédnutím ke spektru pravděpodobný.

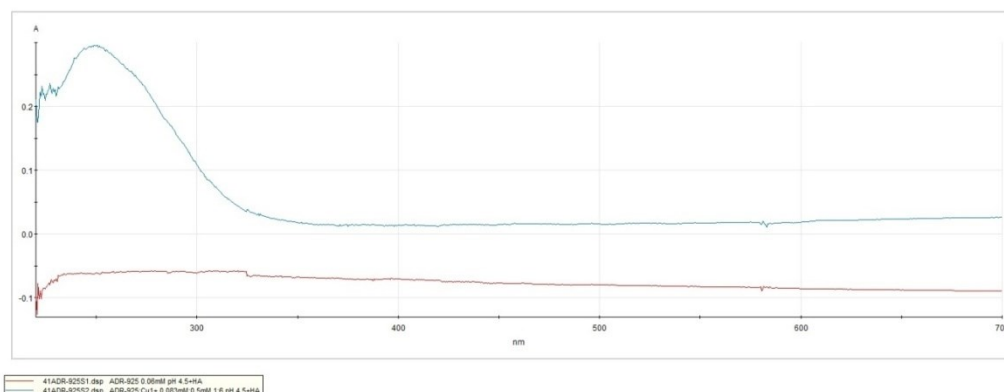


Obr. 14: ADR-925 a Fe<sup>3+</sup> při pH 6,8. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,6 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 222 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:železo (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco Fe<sup>3+</sup> byla 0,5 mM) s maximem při 232 nm. B) Jobova metoda a chelatace Fe<sup>3+</sup> při pH 6,8 – souhrnná koncentrace obou reagensů byla 0,5 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. V tomto případě nelze komplex určit, důvodem může být i výše popsaná interference s Fe<sup>3+</sup> ionty, které absorbují ve stejné oblasti.

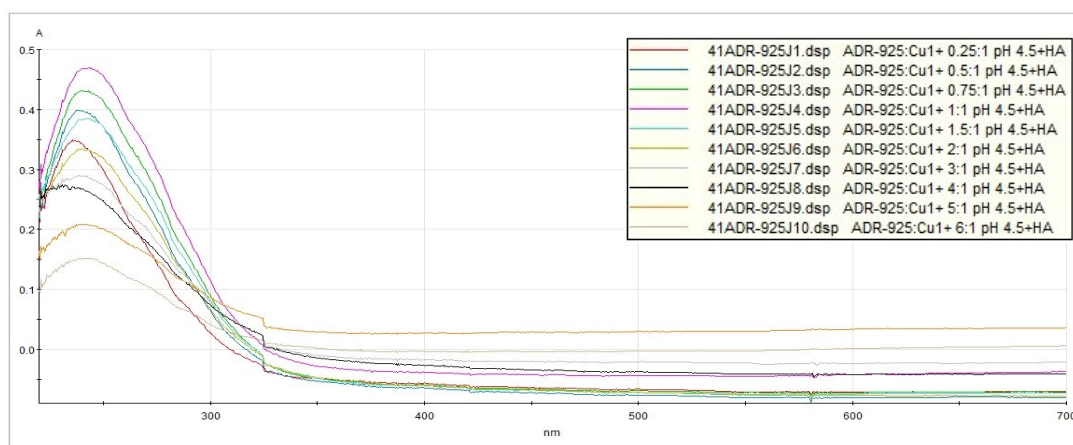
**A****B****C**

Obr. 15: ADR-925 a  $\text{Fe}^{3+}$  při pH 7,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,6 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 221 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:železo (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco  $\text{Fe}^{3+}$  byla 0,5 mM) s absorpčním maximem 230 nm. B) Jobova metoda a chelatace  $\text{Fe}^{3+}$  při pH 7,5 – souhrnná koncentrace obou reagentů byla 0,5 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Jako v případě pH 6,8 nelze komplex určit, důvodem může být opět výše popsaná interference s  $\text{Fe}^{3+}$  ionty, které absorbují ve stejné oblasti.

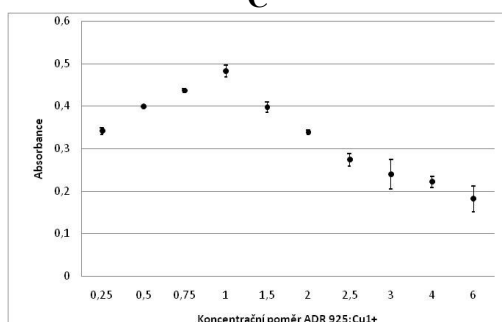
A



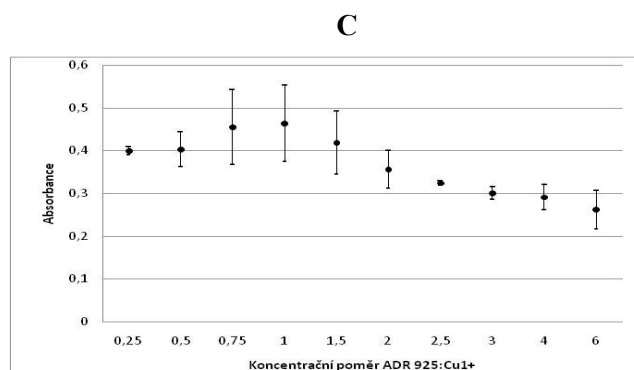
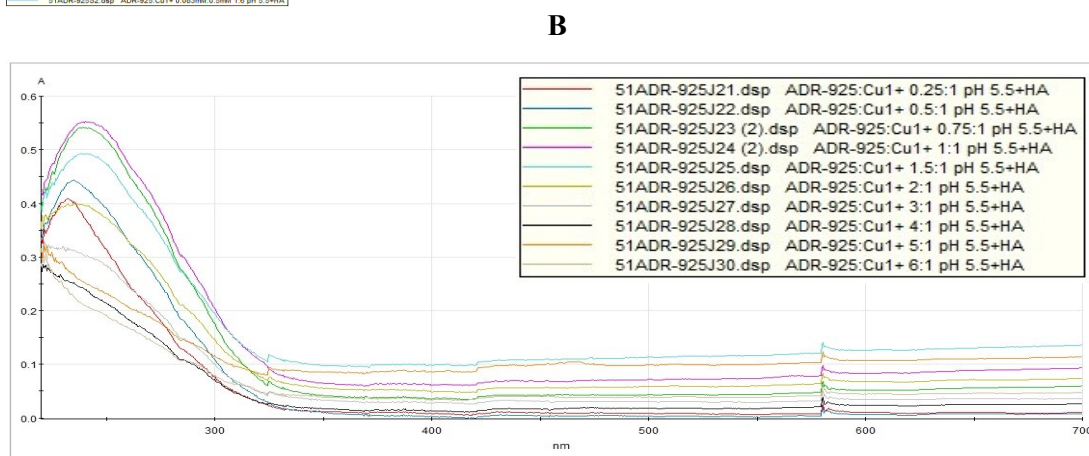
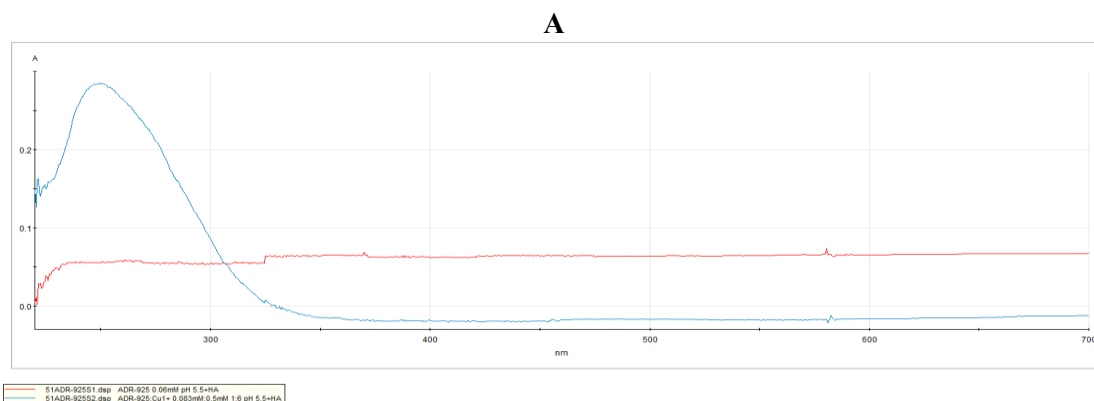
B



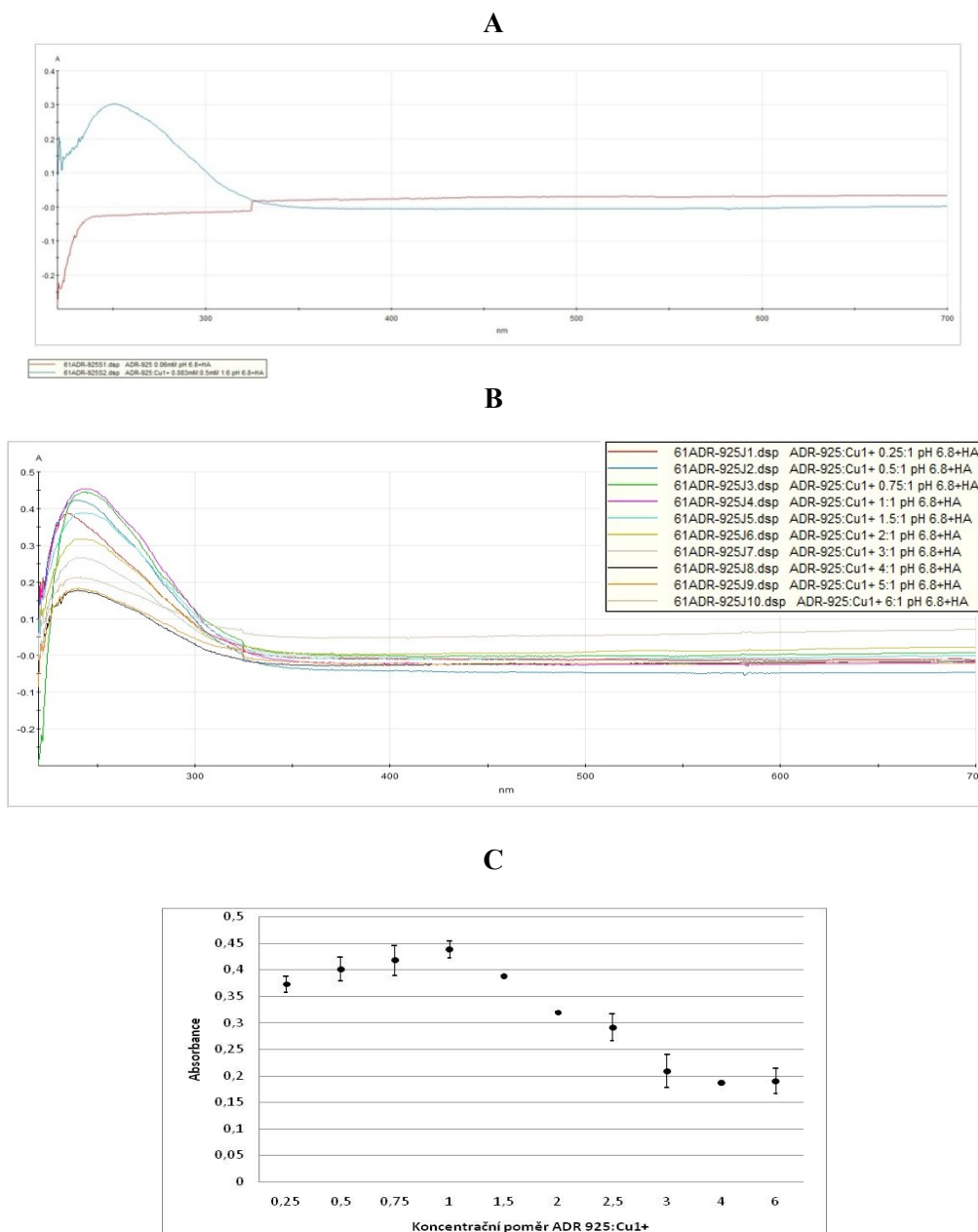
C



Obr. 16: ADR-925 a  $\text{Cu}^+$  při pH 4,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,06 mM) s absorpčním maximem 234 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:měď (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco  $\text{Cu}^+$  byla 0,5 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 250 nm. B) Jobova metoda a chelatace  $\text{Cu}^+$  při pH 4,5 – souhrnná koncentrace obou reagensů byla 0,25 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Za těchto podmínek vzniká jednoznačně komplex 1:1.

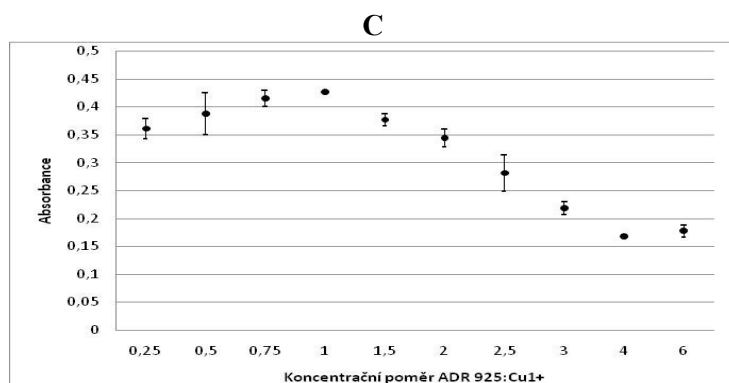
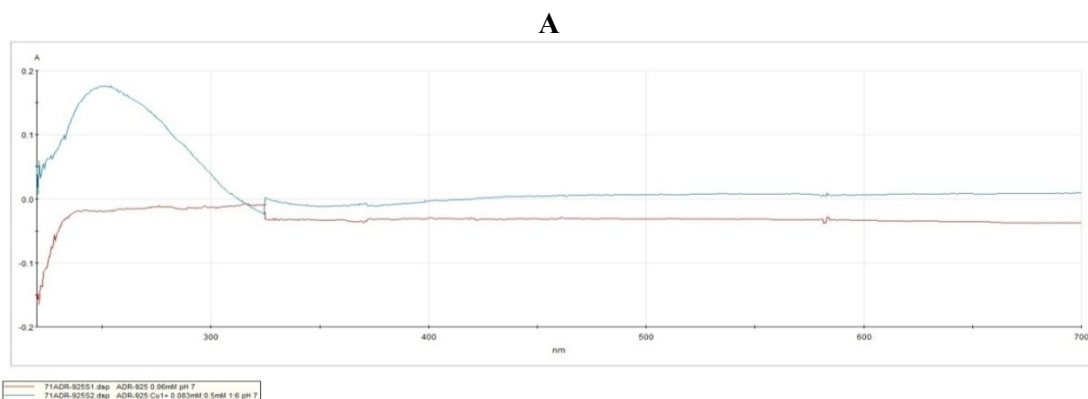


Obr. 17: ADR-925 a  $\text{Cu}^+$  při pH 5,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,06 mM) s absorpčním maximem 234 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:měď (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco  $\text{Cu}^+$  byla 0,5 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 250 nm. B) Jobova metoda a chelatace  $\text{Cu}^+$  při pH 5,5 – souhrnná koncentrace obou reagentů byla 0,25 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Výsledky v tomto případě nejsou již tak jednoznačné, ale vzhledem k nepravděpodobnosti komplexu 0.75:1 (3:4, viz spektrum část B), lze očekávat tvorbu komplexu 1:1.

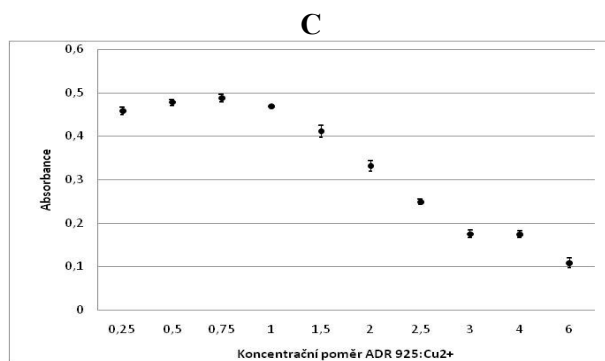
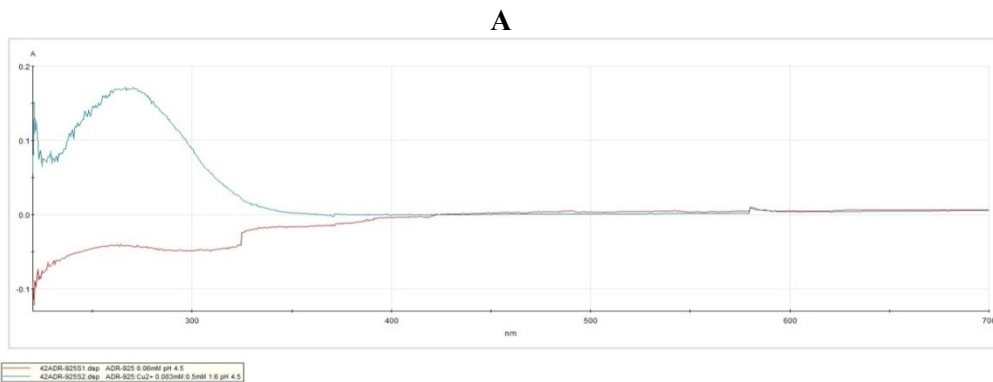


Obr. 18: ADR-925 a  $\text{Cu}^+$  při pH 6,8. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,06 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 220 a odpovídajícího komplexu ADR-925:měď (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco  $\text{Cu}^+$  byla 0,5 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 251,5 nm. B) Jobova metoda a chelatace  $\text{Cu}^+$  při pH 6,8 – souhrnná koncentrace obou reagentů byla 0,25 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Při shrnutí dostupných výsledků se podle grafického znázornění jeví komplex 1:1 jako pravděpodobný.

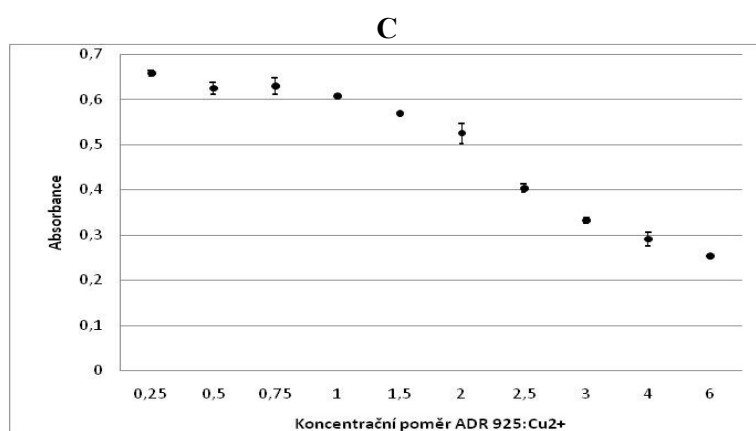
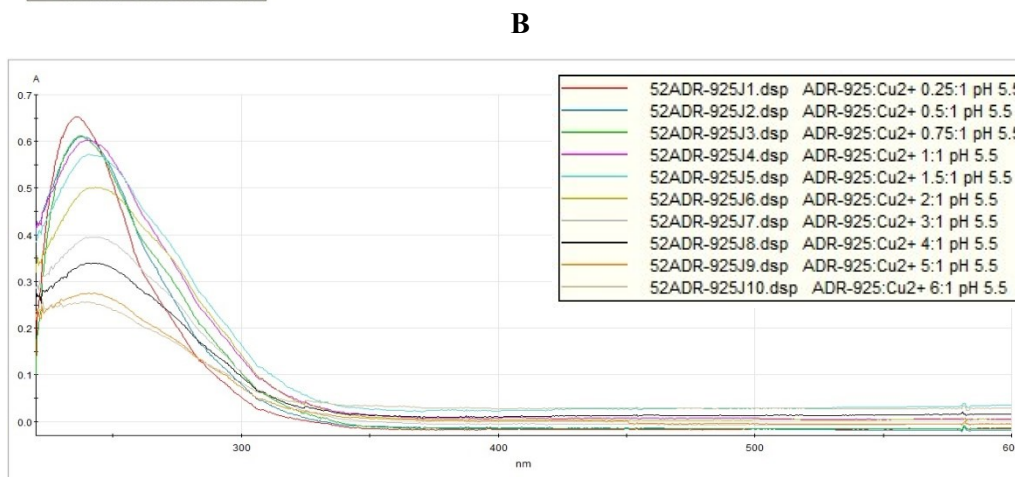
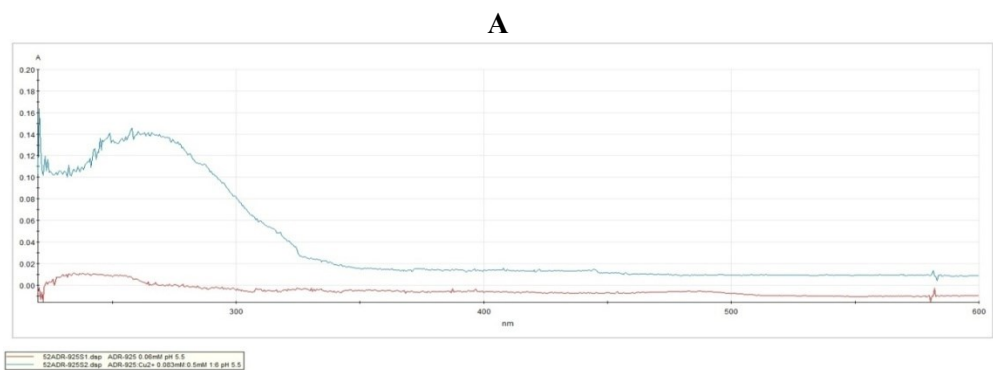




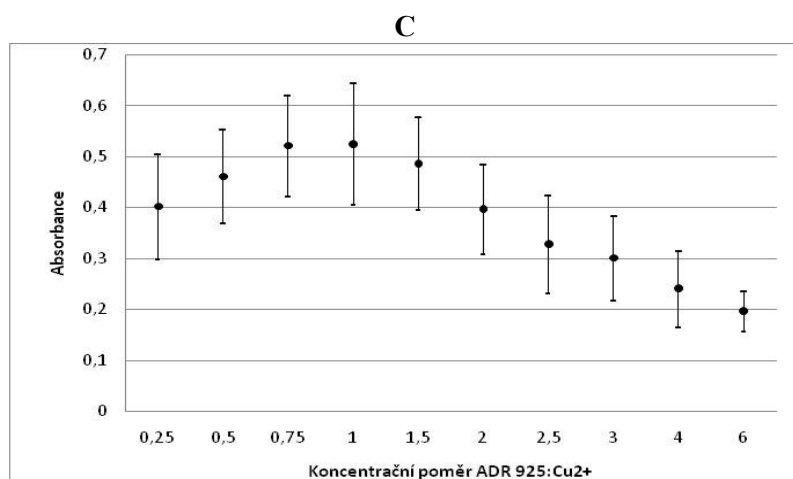
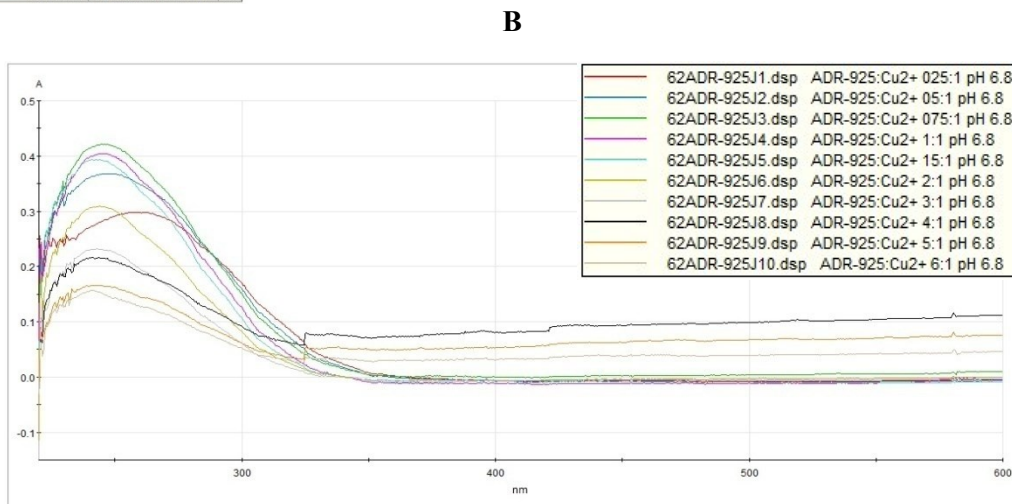
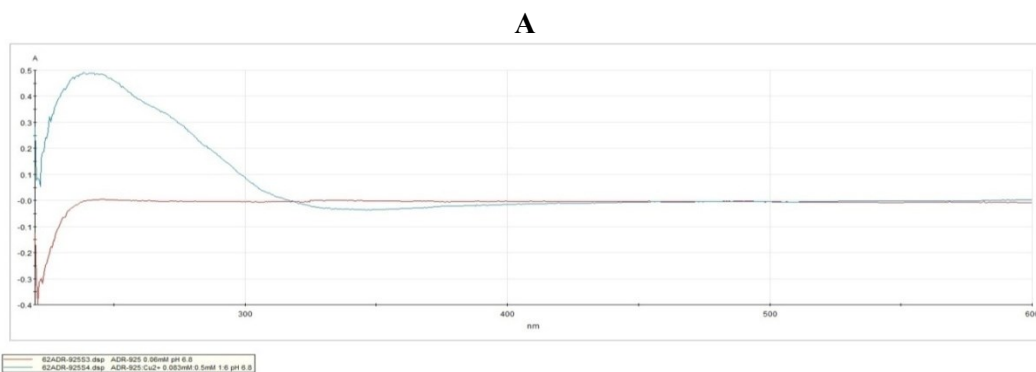
Obr. 19: ADR-925 a  $\text{Cu}^+$  při pH 7,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,06 mM) s absorpčním maximem při 220 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:měď (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco  $\text{Cu}^+$  byla 0,5 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 254 nm. B) Jobova metoda a chelatace  $\text{Cu}^+$  při pH 7,5 – souhrnná koncentrace obou reagentů byla 0,25 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. V tomto případě lze velmi pravděpodobně usuzovat na komplex 1:1.



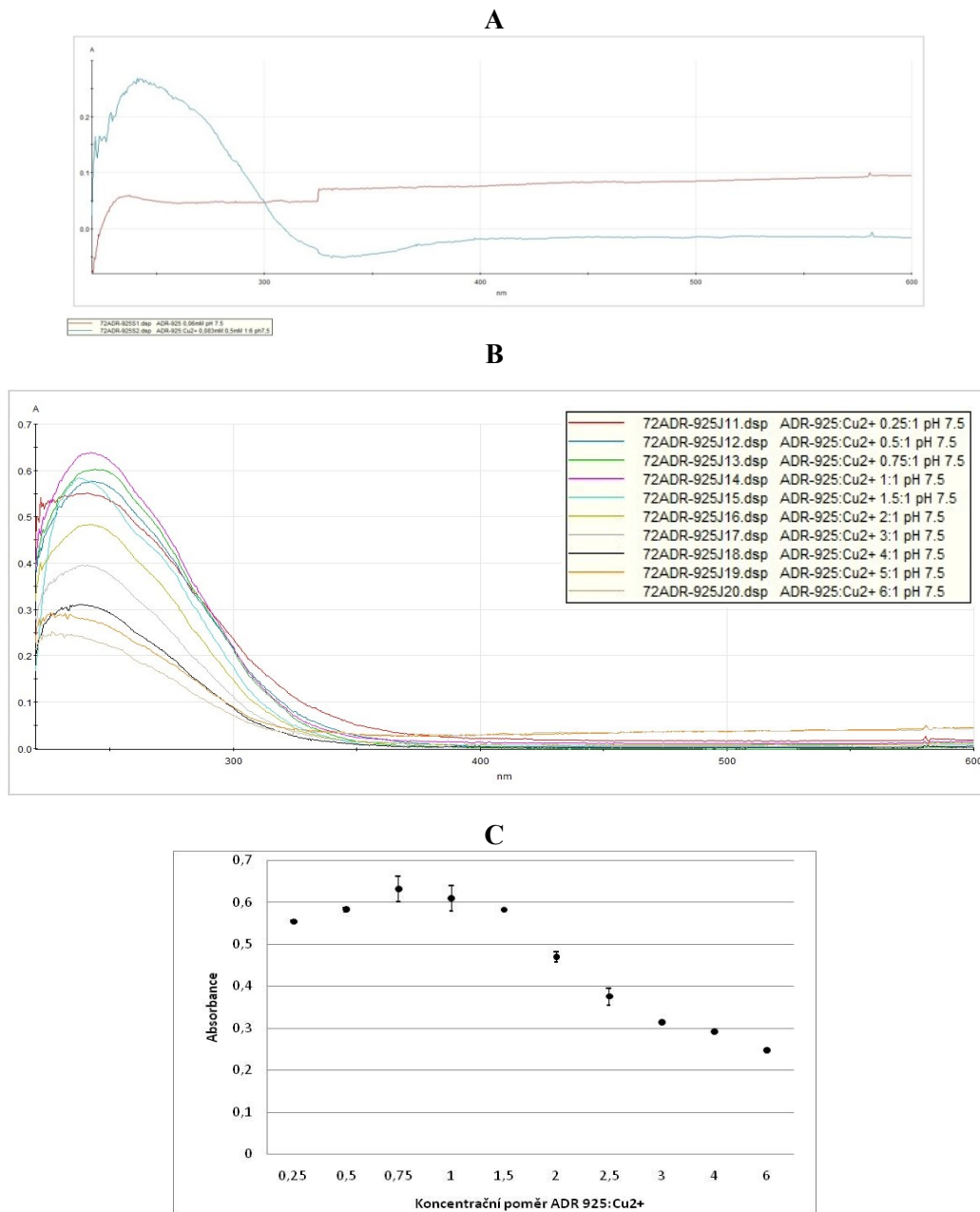
Obr. 20: ADR-925 a Cu<sup>2+</sup> při pH 4,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,06 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 222 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:měď (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco Cu<sup>2+</sup> byla 0,5 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 266,5 nm. B) Jobova metoda a chelatace Cu<sup>2+</sup> při pH 5,5 – souhrnná koncentrace obou reagensů byla 0,25 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Z výsledků lze odhadovat, že komplex bude pravděpodobně 1:1. Absorbance začíná výrazně klesat při vyšších poměrech, což může ukazovat na interferenci s absorpencí volného Cu<sup>2+</sup>.



Obr. 21: ADR-925 a  $\text{Cu}^{2+}$  při pH 5,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,06 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 234 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:měď (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco  $\text{Cu}^{2+}$  byla 0,5 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 258 nm. B) Jobova metoda a chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  při pH 5,5 – souhrnná koncentrace obou reagentů byla 0,25 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Opět jako v předchozím případě, lze usuzovat na poměr 1:1.



Obr. 22: ADR-925 a Cu<sup>2+</sup> při pH 6,8. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,06 mM) s absorpčním maximem 222 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:měď (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco Cu<sup>2+</sup> byla 0,5 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 238,5 nm. B) Jobova metoda a chelatace Cu<sup>2+</sup> při pH 6,8 – souhrnná koncentrace obou reagensů byla 0,25 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Při zprůměrování obou měření, se komplex 1:1 jeví jako pravděpodobný.



Obr. 23: ADR-925 a  $\text{Cu}^{2+}$  při pH 7,5. A) Absorpční spektra ADR-925 (červená křivka, finální koncentrace byla 0,06 mM) s absorpčním maximem 236 nm a odpovídajícího komplexu ADR-925:měď (modrá křivka, finální koncentrace ADR-925 byla 0,083 mM, zatímco  $\text{Cu}^{2+}$  byla 0,5 mM) s absorpčním maximem při vlnové délce 241 nm. B) Jobova metoda a chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  při pH 7,5 – souhrnná koncentrace obou reagensů byla 0,25 mM. Obrázek znázorňuje jedno měření. C) Grafické znázornění výsledků Jobovy metody - závislost absorbance na koncentračních poměrech při absorpčním maximu komplexu. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Zde nejsou výsledky úplně jednoznačné, ale podle grafického znázornění, je opět komplex 1:1 nejpravděpodobnější.

## 6 Diskuze

V současné době existuje již mnoho studií zabývajících se výzkumem chelatační aktivity různých látek ať už přírodního či syntetického původu. Cílem této práce bylo zhodnotit stechiometrii komplexu ADR-925 s přechodnými kovy, konkrétně ionty železa a mědi.

Z experimentální části této diplomové práce vyplývá, že ADR-925 vykazuje chelatační vlastnosti k oběma zkoumaným kovům a oběma oxidačním stavům za všech výše zmiňovaných pH podmínek. Určitým problémem je, že absorpční maxima komplexu leží v blízkosti maxima absorbance testované látky a hlavně absorbance přidávaných kovových iontů. Z tohoto důvodu nebylo možné za všech podmínek stechiometrii komplexu jednoznačně určit. Velkou výhodou bude v tomto případě použití komplementární metodiky vyvinuté na našem pracovišti (Filipský et al. 2013). Při této metodice je totiž koncentrace iontů kovu v sérii vzorku vždy stejná a měla by se tak odstranit interference pozorovaná v případě Jobovy metody, a to zejména v nízkých poměrech kov:ADR-925 (0.25-0.75). V těchto poměrech jsou totiž při použití Jobovy metody vysoké koncentrace kovů, které tak mohou ovlivnit výsledky (Filipský et al. 2013).

Studie Buss et al. z roku 1995 ukázala, že dvojmocné ionty kovů,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  podporují hydrolyzu dexrazoxanu na dva meziprodukty s jedním otevřeným kruhem, které se dále hydrolyzují na ADR-925. Předpokládalo se, že právě tyto produkty a meziprodukty hydrolyzy jsou aktivní látky, které svými chelatačními schopnostmi, stojí za kardioprotektivním účinkem léčiva (Buss et al. 1995). K podobným výsledkům dospěla naše pracovní skupina u železnatých iontů. Železnaté ionty za neutrálního a slabě kyselého pH pomalu zvyšovaly chelatační schopnosti dexrazoxanu, což naznačuje opět usnadnění tvorby ADR-925 nebo jeho prekurzorů železnatými ionty (Zatloukalová et al., 2012).

Jak již bylo v této práci výše zmíněno, dnes se upouští od původní myšlenky, že mechanismem účinku dexrazoxanu je jeho schopnost chelatovat ionty železa. Nové

studie dokazují, že mechanismus účinku z větší části spočívá v inhibici a následném rozkladu topoizomerázy 2 $\beta$  v srdci. Ale stále existují i důkazy o tom, že kardiotoxicita antracyklinů je částečně způsobena jimi indukovanou tvorbou ROS. Galetta F. et al. (2009) toto tvrzení potvrdili klinickou studií. Studie hodnotila antioxidační aktivitu v plazmě u pacientů s non-Hodgkinovým syndromem, léčených epirubicinem. Bylo tak prokázáno, že u pacientů, kterým byl podáván samotný epirubicin, došlo k výraznému snížení antioxidační aktivity plasmy. U pacientů léčených epirubicinem, kterým byl zároveň podáván dexrazoxan, byl tento pokles nižší a po ukončení léčby došlo rychleji k normalizaci toho parametru. To zároveň potvrdilo poznatky, že antracykliny svým působením způsobují oxidační stres (Galetta et al. 2009).

Dexrazoxan je schváleným lékem na prevenci antracyklinové kardiotoxicity. Existuje však studie, která uvádí, že dexrazoxan by mohl být účinný i v prevenci katecholaminové kardiotoxicity, kde také hraje roli železo. Studie byla zaměřena na analýzu akutního účinku dexrazoxanu na isoprenalinovém modelu akutního infarktu myokardu, který navozuje patologický stav podobný akutnímu infarktu myokardu. Ukázalo se, že dexrazoxan má v tomto případě mírné kardioprotektivní účinky: snižuje úmrtnost, důsledky poškození myokardu a přetížení kardiomyocytů vápníkem. Neměl ale vliv na vznik atrioventrikulárních bloků způsobených isoprenalinem. Autoři spekulují, že protekce byla spíše navozena účinkem na homeostázu vápníku než chelatací iontů železa (Zatloukalová et al. 2012). Bude jistě v budoucnu zajímavé otestovat i vliv dexrazoxanu, respektive jeho aktivního metabolitu na vápenaté ionty.

Výsledky této diplomové práce ukazují, že aktivní metabolit dexrazoxanu je schopen také chelatace nejen měďnatých iontů (už prokázáno ve studii Buss et al. 1995), ale i měďných iontů.

## 7 Závěr

Tato diplomová práce ukázala, že metabolit dexrazoxanu ADR-925 je nejen chelátorem iontů železa, ale také iontů mědi. Při všech testovaných pH v (pato)fyziologicky významném rozmezí 4.5-7.5 bylo dokázáno, že ADR-925 tvoří komplexy s měďnými, měďnatými, železnatými i železitými ionty. Komplexy se tvořily většinou v poměru 1:1, za některých podmínek nebylo možné stechiometrii jednoznačně určit.



## 8 Seznam zkratk

ROS.... Reaktivní formy kyslíku z angl. „reactive oxygen species“

FDA.... Úřad pro kontrolu potravin a léčiv z angl. „Food and Drug Administration“

EDTA.. kyselina ethylendiamintetraoctová z angl. „ethylenediaminetetraacetic acid“

HH..... hereditární hemochromatóza

## 9 Seznam použité literatury

1. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 1999;341:1986
2. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C, Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *BiotechnolBioeng.* 1969;11:1101–1110.
3. Buss JL a Hasinoff BB. Ferrous ion strongly promotes the ring opening of the hydrolysis intermediates of the antioxidant cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) *Arch BiochemBiophys.* 1995;317:121–127.
4. Cope-Yokoyama S, Finegold MJ, Sturniolo GC, Kim K, Mescoli C, Rugge M, Medici V. Wilson disease: histopathological correlations with treatment on follow-up liver biopsies. *World J Gastroenterol.*2010; 16:1487-1494
5. Creaven PJ, Allen LM, Alford DA. The bioavailability in man of ICRF-159 a new oral antineoplastic agent. *J PharmPharmacol.* 1975;27:914–918.
6. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18:1818–1892.
7. Diop NK, Vitellaro LK, Arnold P, Shang M, Marusak RA. Iron complexes of the cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) and its desmethyl derivative, ICRF-154: solid state structure, solution thermodynamics, and DNA cleavage activity. *J InorgBiochem.* 2000;78:209–216.
8. Ewer MS a Lippman SM. Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. *J ClinOncol.* 2005;23:2900–2902.
9. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, ClemetsonDE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000;342:1077–1084.
10. Filipský T, Říha M, Hrdina R, Vávrová K, Mladěnka P. Mathematical calculations of iron complex stoichiometry by direct UV–Vis spectrophotometry. *BioorgChem.* 2013;49:1-8.

11. Fleming RE a Ponka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med.* 2012;366:348- 359.
12. Gabutti V a Piga A. Results of long term iron-chelating therapy. *Acta Haematol.* 1996; 95: 26-36
13. Galetta F, Franzoni F, Cervetti G et al. In vitro and in vivo study on the antioxidant activity of dexrazoxane. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2009; 64(4): 1-5.
14. Hahn SH. Population screening for Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2014; 1315:64-69.
15. Hamza I, Prohaska J, Gitlin JD. Essential role for Atox1 in thecopper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase. *ProcNatlAcadSci USA.* 2003; 100:1215–1220.
16. Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, Ferrans VJ. Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem.* 1998;5:1–28.
17. Hasinoff BB. Pharmacodynamics of the hydrolysis-activation of the cardioprotective agent (+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane. *J Pharm Sci.* 1994;83:64–67.
18. Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD. *Postgraduate Haematology.* 4th edition,Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd., 1999, s. 23–47
19. Horn N, Tümer Z. Menkes disease and the occipital horn syndrome in Royce PM, Steinmann B (eds): *Connective tissue and its heritable disorders: Molecular, genetic, and medical aspects.* New York: John Wiley and Sons Inc.2002,s. 651–685.
20. Hurrell RF, Lynch S, Bothwell T, et al.Enhancing the absorption off ortification iron. A SUSTAIN TaskForcereport.*Int J VitamNutr Res.* 2004;74(6):387-401
21. Job P, *Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution.* *Ann Chim.* 1928;9:113-134
22. Jomova K a Valko M. Advances in metal-inducedoxidative stress and human disease, *Toxicology.* 2011; 283, 65–87

23. Jones RL, Swanton C, Ewer MS. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin DrugSaf.* 2006;5:791–809.
24. Kalinowski DS a Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2005; 57, 547–583.
25. Kane RC, McGuinn WD, Dagher R, Justice R, Pazdur R. Dexrazoxane (Totect) FDA review and approval for the treatment of accidental extravasation following intravenous anthracycline chemotherapy. *Oncologist* 2008; 13: 445- 450
26. Levitt GA, Dorup I, Sorensen K, Sullivan I. Does anthracycline administration by infusion in children affect late cardiotoxicity? *Br J Haematol.* 2004;124:463–468.
27. Li WJ, Wang JF, Wang XP. Wilson's disease: Update on integrated Chinese and Western medicine. *Chin J Integr Med.* 2013; 19:233-240
28. Lüllmann H. et al. *Farmakologie a toxikologie*, Praha: GradaPublishing, a.s., 2004,s. 607-608
29. Masopust J a Průša R. *Patobiochemie metabolických drah 2. vydání*. Praha: Univerzita Karlova, 2004, 119–120
30. Mladěnka P, Applová L, Patočka J, et al. Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents. *Med Res Rep.* 2018, in press
31. Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free RadicBiol Med.* 2010;49:963–975.
32. Mladosievičová B, et al. *Kardioonkologie: 2., přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada 2014, s. 36-37
33. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:197–213
34. Nisbet-Brown E, Olivieri NF, Giardina PJ, et al. Effectiveness and safety of ICL670 in iron-loaded patients with thalassaemia: a randomized, double-blind, placebo controlled dose escalation trial. *Lancet.*2003;361: 1597- 1602

35. Puma N, Ruggiero A, Ridola V, et al. Anthracycline-related cardiotoxicity: risk factors and therapeutic options in childhood cancers. *Signa Vitae*. 2008; 30–34.
36. Quemeneur AS, Trocello JM, Ea HK, et al. Bone status and fractures in 85 adults with Wilson's disease. *Osteoporos Int*. 2014; 25:2573-2580.
37. Racek J, et al. *Klinická biochemie*. Praha: Galén – Karolinum, 1999,135-138.
38. Repta AJ, Baltezor MJ, Bansal PC. Utilization of an enantiomer as a solution to a pharmaceutical problem: application to solubilization of 1,2-di(4-piperazine-2,6-dione)propane. *J PharmSci*. 1976;65:238–242.
39. Rivera-Mancia S, Perez-Neri I, Rios C, Tristan-Lopez L, Rivera-Espinosa L, Montes S. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *ChemBiol Interact*. 2010;186, 184–199
40. Říha M, Karlíčková J, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *J InorgBioch* 2013; 123: 80-7
41. Scully RE a Lipshultz SE. Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. *CardiovascToxicol*. 2007;7:122–128.
42. Szarfarc SC, de Cassana LM, Fujimori E, et al. Relative effectiveness of iron bis-glycinatetechnetate (Ferrochel) and ferrous sulfate in the control of iron deficiency in pregnant women. *ArchLatinoamNutr*. 2001;51(1 Suppl 1):42-7
43. Ščudla V. Anémie chronických chorob. *Postgraduální medicína, příloha Zdravotnických novin* 2009: 37-44
44. Šimůnek T, Štěrbá M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep*. 2009; 61(1), 154-171
45. Štěrbá M, Popelová O, Vávrová A, et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Therapeutics: Forum Review article*. Hradec Králové, 2013, 899-929. DOI: 10.1089/ars.2012.4795.
46. Trojan S, et al. *Lékařská fyziologie*. Praha: GradaPublishing, a.s., 2003;s. 398-399.

47. Tümer Z a Horn N. Menkes disease in Roach ES, Miller VS (eds): Neurocutaneous syndromes. Cambridge: Cambridge University Press; 2004, s. 222–233.
48. Umbreit J. Iron deficiency: a concise review. *Am J Hematol.* 2005; 78 (3): 225–231.
49. Veharanta T a Immonen P. Hepatolenticular degeneration, Wilson's disease. *Duodecim.* 1981; 97:743-745
50. Vokurka M, et al. Atlas fyziologie a patofyziologie dostupné z <http://www.physiome.cz/atlas/vnitriProstredi/04/>, staženo 9.3.2018
51. Wilhelm Z. Co je dobré vědět o železe. *Praktické lékařství.* 2007;1:41-44.
52. Xie JJ a Wu ZY. Wilson's Disease in China. *Neurosci Bull.* 2017; 33:323-330.
53. Yeh KY, Yeh M, Mims L, Glass J. Iron feeding induces ferroportin 1 and hephaest in migration and interaction in rat duodenal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296:G55–G65
54. Zatloukalová L, Filipický T, Mladěnka P, et al. Dexrazoxane provided moderate protection in a catecholamine model of severe cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012; 90(4):473-484.
55. Zhang J, Clark JR Jr, Herman EH, Ferrans VJ. Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:1931–1943.
56. Zhang YC. Research on hepatolenticular degeneration over the past 10 years. *Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi.* 1959; 5:326-327.
57. Zhou T, Ma Y, Kong X, Hider RC. Design of iron chelators with therapeutic application. *Dalton Trans.* 2012; 41 6371–6389.