



UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studium interakce antimikrobiálních peptidů s tkáňovými kulturami

Study of interaction of antimicrobial peptides with cells in culture

Diplomová práce

Obor: Biochemie

Vypracovala: Bc.Hilda Kroupová

Školitel: RNDr. Jiřina Slaninová, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Jiřiny Slaninové, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha) a konsulantky Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. (PřF UK, Praha), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala všem pracovníkům Antimikrobiálních peptidů AV ČR za projevenou ochotu a podporu při provedení diplomové práce, zejména své školitelce RNDr. Jiřině Slaninové, CSc., za trpělivost, toleranci, cenné rady a předané zkušenosti při práci v laboratoři. Mé díky také patří Dr. Pavlu Šáchovi z oddělení pro biochemii AV ČR, za poskytnutí odborných rad během pozorování na fluorescenční mikroskopii.

Ráda bych také poděkovala své vedoucí práce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DSc. za podnětné připomínky při práci a za pomoc při přípravě ke státní závěrečné zkoušce.

V neposlední řadě patří mé velké díky celé rodině za psychickou i finanční podporu při mých studiích.

ABSTRAKT

Česky

Práce se zabývá studiem nových antimikrobiálních peptidů (AMP) Halictinů (HAL-1, GMWSKILGHLIR-NH₂ a HAL-2, GKWMSLLKHILK-NH₂) a jejich strukturních analogů izolovaných z jedových včků divokých včel *Halictus sexcinctus*. Struktura a antimikrobiální aktivita těchto peptidů byly popsány dříve [1]. Cílem práce bylo nalézt takový peptid, který by byl silně toxický pouze pro rakovinné buňky a netoxický vůči normálním buňkám a pomocí fluorescenčně značených peptidů získat informace o mechanismu účinku studovaných peptidů.

Toxicita HAL-1 a HAL-2 a jejich analogů byla stanovována vůči 2 normálním buněčným liniím (lidské endotheliální buňky pupečnickové vény, HUVEC, a krysím střevním epitelialním buňkám, IEC) a 2 nádorovým liniím (nádorové buňky děložního čípku, HeLa-S3 a buňky karcinomu tlustého střeva, CRC SW 480) metodou MTT (stanovení hodnoty IC₅₀).

V prvé řadě jsme testovali peptidy s vysokou antimikrobiální aktivitou a nízkou hemolytickou aktivitou, pro kontrolu jsme stanovovali toxicitu i méně aktivních analogů. Zjistili jsme, že nejcitlivější vůči těmto peptidům jsou buňky HeLa-S3. Nejtoxičtější peptidy (HAL-1/9, HAL-1/18, HAL-2/2) usmrcují 50% buněk v testu již v koncentracích 2,5 – 10 μM. Vůči ostatním liniím buněk je třeba k docílení stejného efektu 5-10 krát vyšší koncentrace peptidů. Peptidy nejúčinnější vůči HeLa-S3 buňkám mají také jak bylo popsáno [1] vysokou antibakteriální účinnost. Buňky kolorektálního karcinomu bohužel jsou srovnatelně citlivé resp. necitlivé k testovaným peptidům jako buňky HUVEC a IEC. Pomocí fluorescenční mikroskopie bylo zjištěno, v koncentracích nižších než je IC₅₀ peptidy do buněk pronikají jen v malém množství, zatímco po dosažení koncentrace rovnající se IC₅₀ nebo vyšší peptidy pronikají rychle do buňky a zabíjejí ji. Nejvyšší koncentrace fluorescence byla zjištěna v okolí jádra a v útvech, které polohou odpovídají mitochondriím, což je nutno dokázat v příštích experimentech.

Výsledky ukazují na možnost vývoje léčiva na bázi antimikrobiálních peptidů.

[1] Monincová L. et al , Amino Acids, 2010, Published online DOI 10.1007/s00726-010-0519-1

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, analoga antimikrobiálních peptidů, buněčné linie, cytotoxicita, fluorescenční mikroskopie

In English

The thesis deals with research of novel antimicrobial peptides (AMP) Halictines (HAL-1, GMWSKILGHLIR-NH₂ a HAL-2, GKWMSLLKHILK-NH₂) and their structural analogs isolated from the venom of the wild bee *Halictus sexcinctus*. The structure and antimicrobial activity of these peptides had been described earlier [1]. The goal of this diploma thesis is to find peptide which is strongly toxic only for cancer cells and nontoxic for normal cells. Using of the fluorescent marked peptides we aimed to acquire the information about mechanism of action of the studied peptides on the cells.

Using the MTT test (determination of valuation IC₅₀), the toxicity of HAL-1 and HAL-2 and their analogs against 2 normal cell lines (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC, and normal rat intestinal cells, IEC) and against 2 cancer cell lines (cancer cells of suppository uterine, HeLa-S3 and cancer cells of human colorectal carcinoma, CRC SW 480) was determined.

First we tested antimicrobial peptides with antimicrobial activity and low hemolytic activity. For verification the toxicity of less active analogs was also determined. We found out that the HeLa-S3 cells are the most sensitive to these peptides. The most toxic peptides (HAL-1/9, HAL-1/18, HAL-2/2) kill 50% of cells in the concentration 2,5 – 10 μM. To obtain the same effect against the other cell lines, the 5-10 times higher concentration of peptides was needed. The most effective peptides have also high antibacterial efficiency against HeLa-S3 cells as had been already described [1]. However the cells of colorectal carcinoma as well as HUVEC cells and IEC cells are comparably sensitive or more precisely insensitive to the tested peptides.

Using the fluorescent microscopy we have also found that only low quantities of peptides penetrate the cell in the concentration lower than IC₅₀. On the other hand, in the concentrations higher or equal to IC₅₀ the peptides penetrate the cell very fast and kill the cell. The highest fluorescence was found around the nucleus of the cells and in the structures whose position corresponds to mitochondria. This phenomenon should however be proved by further investigation.

The results suggest that drugs that are based on antimicrobial peptides might to be developed.

[1] Monincová L. et al , Amino Acids, 2010, Published online DOI 10.1007/s00726-010-0519-1

The key words: antimicrobial peptides, analogs of antimicrobial peptides, cell lines, cytotoxicity, fluorescent microscopy

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1. ÚVOD	10
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1. ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY OBECNĚ	11
2.1.1. Základní charakteristika antimikrobiálních peptidů	11
2.1.2 Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů	13
2.1.3. Aktivity antimikrobiálních peptidů	15
2.1.3.1. Antibakteriální aktivita	15
2.1.3.2. Antifungální aktivita	16
2.1.3.3. Hemolytická aktivita	16
2.1.3.4. Cytotoxicita	16
2.2. ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY IZOLOVANÉ Z JEDU DIVOKÝCH VČEL	16
2.2.1. Melectin	16
2.2.2. Lasioglossiny	17
2.2.3. Halictiny	17
2.3. STANOVENÍ CYTOTOXICITY AMP	21
2.3.1. Buněčné linie pro testování cytotoxicity AMP	21
2.3.2. Testy pro stanovení cytotoxicity sloučenin vůči buněčným liniím	21
2.3.2.1. Test využívající 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitroimidazolium bromid (MTT test)	21
2.3.2.2. Test využívající 2,3-bis(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-[(fenylamino)karbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid (XTT test)	22
2.3.2.3. Test využívající Trypanovou modř	22
2.3.2.4. Test založený na barvení buněk propidium jodidem	23
2.4. STUDIUM MECHANISMU ÚČINKU NA EUKARYOTICKÉ BUŇKY	23
3. CÍL PRÁCE	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1. MATERIÁLY	27
4.2. METODY	28
4.2.1. Ředění a uchovávání antimikrobiálních peptidů	28
4.2.2. Pěstování buněčných linií	28

4.2.2.1. Rozmrazení buněčné kultury a pěstování	29
4.2.2.2 Pasážování buněk.....	29
4.2.2.3. Nasazování buněk do pokusu.....	30
4.2.2.4 Stanovení počtu buněk Bürkerovou komůrkou.....	30
4.2.2.5. Zamrazení buněčné kultury.....	31
4.2.3. Vybrané buněčné linie	31
4.2.3.1. Lidské endoteliální buňky pupečnickové žíly (HUVEC)	31
4.2.3.2. Potkaní střevní endoteliální buňky (IEC).....	32
4.2.3.3. Buňky karcinomu děložního čípku (HeLa-S3)	32
4.2.3.4 Buňky kolorektálního karcinomu (CRC SW 480).....	33
4.2.4. Testování životaschopnosti buněk neboli stanovení toxicity (MTT test)	34
4.2.5. Fluorescenční mikroskopie	35
4.2.5.1. Příprava buněk pro fluorescenční mikroskopii	35
4.2.5.2. Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii	35
4.2.5.3. Mikroskopování	36
4.2.5.4. Počítačové zpracování výsledků	36
5. VÝSLEDKY	37
5.1. STANOVENÍ CYTOTOXICITY AMP HALICTINŮ VŮČI VYBRANÝM BUNĚČNÝM LINIÍM	37
5.1.1. Toxicita vybraných analogů Halictinů vůči HUVEC buňkám.....	37
5.1.2. Toxicita vybraných analogů Halictinů vůči IEC buňkám	39
5.1.3. Toxicita vybraných analogů Halictinů vůči HeLa-S3 buňkám	41
5.1.4. Toxicita vybraných analogů Halictinů vůči CRC SW 480 buňkám.....	43
5.2. VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE PRO SLEDOVÁNÍ VSTUPU A DISTRIBUCE AMP V BUŇKÁCH.....	46
5.2.1. Studium účinku peptidu LL-8 vůči buňkám HUVEC	46
5.2.2. Studium účinku a lokalizace peptidu LL-8 vůči buňkám IEC	50
5.2.3. Studium účinku a lokalizace peptidu LL-8 vůči buňkám HeLa-S3	53
5.2.4. Studium účinku a lokalizace peptidu LL-8 vůči buňkám CRC SW 480	56
5.3. VYUŽITÍ VIDITELNÉ MIKROSKOPIE PRO SLEDOVÁNÍ VLIVU AMP NA BUNĚČNÉ LINIE	60
5.3.1. Studium účinku peptidu LL-8 v buňkách HUVEC	60
5.3.2. Studium účinku peptidu HAL-1/18 v buňkách CRC SW 480	61
6. DISKUSE.....	67
6.1. TOXICITA AMP VŮČI BUNĚČNÝM LINIÍM	67
6.2. SLEDOVÁNÍ VSTUPU A DISTRIBUCE AMP POMOCÍ FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE.....	71
7. ZÁVĚR	73
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	74

Seznam použitých zkratek

- AMP antimikrobiální peptidy
- MEP Melectin
- LL Lasioglossiny
- HAL Halicitny
- HUVEC lidské endoteliální buňky pupečnickové žíly
- CRC SW 480 buňky kolorektálního karcinomu
- HeLa-S3 buňky karcinomu děložního čípku
- IEC potkaní střevní endoteliální buňky
- DMSO dimethylsulfoxid
- DMEM Živné médium modifikované Dulbeccem (Dulbecco s modified Eagle s medium)
- RPMI médium vhodné pro kultivaci normálních lidských buněk (Roswell Park Memorial Institute)
- DPBS fyziologický roztok pufovaný fosfátem (Dulbecco s Phosphate Buffered Saline)
- FBS fetální hovězí sérum
- MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromide
- MIC minimální inhibiční koncentrace
- SDS dodecylsulfát sodný
- TFE trifluorethanol
- IC₅₀ inhibiční koncentrace při níž dochází k 50% úmrtí buněk
- FL-LL-8 fluorescenčně značený peptid, fluoresceinová skupina vázána na primární aminoskupině v poloze 1 (Fluorescein-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH₂)
- Fluo-1 fluorescenčně značený peptid, fluoresceinová skupina vázána na ε-aminoskupině lysinu analogu LL-8, který má v poloze 1 lysin místo valinu
(H-Lys-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH₂
|
Fluorescein
- Zkratky názvů jednotlivých aminokyselin v tří písmenkovém a jedno písmenkovém kódu odpovídá mezinárodní nomenklatuře.

1. Úvod

Tato práce navazuje na vědecký projekt zaměřený na studium antimikrobiálních peptidů (AMP) izolovaných z jedu hmyzu, řešený na ÚOCHB AV ČR. V jeho rámci jsou izolovány nové AMP z jedových váček vos a divokých včel a připraveny synteticky velké série analogů těchto nových peptidů.

AMP jsou malé, amfifilní, kationické peptidy složené z 12 – 50 aminokyselin, přičemž 50% aminokyselin tvoří hydrofobní zbytky.

AMP hrají klíčovou úlohu v mechanismu vrozené imunity a přispívají také k regulaci adaptivní imunity. Dále vykazují celou řadu aktivit – antibakteriální, antivirální, hemolytickou či antifungální.

Jsou rovněž typem látek nadějných pro vývoj léků vhodných k léčbě karcinomů, neboť byl, v porovnání s konvenční terapií, prokázán toxický účinek na rakovinné buňky a netoxický účinek na celkový organismus. Rizikem léčby karcinomů konvenční terapií je škodlivé působení léčiv na zdravé buňky a častá rezistence vůči těmto látkám.

Cílem předkládané diplomové práce je stanovení cytotoxicity nově izolovaných a synteticky připravených látek vůči rakovinným buňkám a normálním buňkám. Cílem je i nalezení takového peptidu, který by byl silně toxický vůči rakovinným buňkám a netoxický vůči buňkám normálním. Dále bude studována lokalizace těchto peptidů v buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie.

2. *Současný stav řešené problematiky*

2.1. **Antimikrobiální peptidy**

AMP jsou evolučně zachované složky imunitního systému tvořící první linii obrany proti infekci. Kromě toho aktivně participují na vyšších úrovních imunitní obrany. Při aktivaci imunitní odpovědi AMP indukují tvorbu některých cytokinů (např. IL-8, IL-1b) či chemokinů, působí chemotakticky na neutrofile, monocyty a T-buňky^[1]. Dále aktivují nebo tlumí tvorbu protizánětlivých mediátorů a podporují apoptózu^[2].

Některé AMP jsou rovněž potenciálně vhodné pro léčbu karcinomů, neboť jsou schopny rychle zabíjet rakovinné buňky, ničí primární tumory a zabraňují metastázám. Důležitým aspektem této terapie je, že na rozdíl od léčení karcinomů konvenční terapií, která je omezena toxickým působením léčiv na zdravé buňky a častou rezistencí vůči těmto látkám, neničí normální zdravé savčí buňky^[1].

2.1.1. **Základní charakteristika antimikrobiálních peptidů**

Antimikrobiální peptidy jsou malé, amfifilní, kationické peptidy, které jsou složeny z méně než 50 aminokyselin. Díky přítomnosti aminokyselin lysinu nebo argininu ve struktuře kationických peptidů je jejich celkový náboj od +2 do +10. Minimální množství kladného náboje pro interakci peptidu s membránou patogenu, která je nabita záporně, je právě +2. Nižší hodnoty již nejsou dostatečné pro signifikantní selektivitu k mikroorganismům. Zvyšování kladného náboje antimikrobiálních peptidů záměnou aminokyselin může v určitém rozsahu zvýšit jejich antimikrobiální účinky. Někdy však může zvýšení kladného náboje naopak plně potlačit antimikrobiální aktivitu a zlepšit např. lytické účinky namířené proti hostitelským buňkám^[5].

Mezi nejdůležitější parametry, které ovlivňují působení antimikrobiálních peptidů jsou:

- konformace
- stupeň hydrofobicity
- stupeň amfipaticity
- velikost náboje
- velikost hydrofobního momentu

Konformace je velice často α -helikální, přičemž α -helix je indukovatelný. Hydrofobicita je dána procentem hydrofobních aminokyselin v peptidovém řetězci, které se většinou pohybuje kolem 50%. Zvyšování hydrofobicity silně koreluje s toxicitou vůči savčím buňkám a ztrátou specifity vůči buňkám mikrobiálním^[2]. Antimikrobiální peptidy jsou amfipatické povahy, tj. v rámci molekuly obsahují současně hydrofilní a hydrofobní část. V případě α -helixů to znamená, že hydrofilní aminokyselinové zbytky jsou situovány na jedné straně α -helixu, zatímco hydrofobní aminokyselinové zbytky jsou umístěny na straně opačné. Výše uvedené vlastnosti peptidů jsou na sobě navzájem závislé a změna jednoho je vždy kompenzována změnou ostatních. Extrémní odchylky těchto parametrů často vedou ke snížení antimikrobiální aktivity a selektivní toxicity. Kationické peptidy jsou rozdělovány na základě struktur a převažujících motivů do 4 základních tříd:

1. Antimikrobiální proteiny
2. Lineární peptidy s α -helikálními doménami
3. Lineární peptidy se zvýšeným obsahem dané aminokyseliny
4. Cyklické peptidy obsahující disulfidické vazby

AMP jsou v organismu syntetizovány různými typy buněk, např. makrofágy, epiteliálními buňkami či žírnými buňkami. Obecně jsou exprimovány jako pro-peptidy, které jsou následně proteolýzou štěpeny a postranlačně modifikovány na biologicky aktivní obranné peptidy. Mezi postranlační modifikace vyskytující se u AMP patří tvorba disulfidických můstků, glykosylace či amidace C-konce. Obecně je exprese těchto peptidů zvýšena na počátku infekce nebo při určitém zánětu. Celkem bylo izolováno a v databázích popsáno přes 800 antimikrobiálních peptidů, prakticky ze všech typů organismů a rostlin^[2].

Podle role, kterou AMP hrají v organismu, je můžeme rozdělit na tzv. „klasické“ AMP, jejichž role v nativním obranném systému je jasná a ostatní, jejichž úloha v organismu není zcela objasněna, ale které v testech vykazují silné antimikrobiální účinky. Příklady prvních jsou defensiny, cekropiny, a katelicidin, příkladem druhých AMP z jedu hmyzu. Mohou se také lišit mechanismem působení^[5].

Defensiny jsou obranné peptidy, typické pro eukaryotní organismy, včetně člověka. Vyznačují se rozmanitou expresí v různých tkáních, kde potlačují spolu s přirozenou mikroflórou různé infekce. Vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu vůči gram-pozitivním či gram-negativním bakteriím.

Katelicidiny tvoří významnou skupinu savčích kationických (bazických) peptidů bohatých na prolin. Vyskytují se v **neutrofilech**. Bylo popsáno, že mohou zabíjet gram-negativní i gram-pozitivní bakterie, plísně, parazity a obalené viry. Mechanismus jejich působení není zcela objasněn.

Cecropiny – jedná se o lineární antimikrobiální peptidy, poprvé získané z hemolymfy motýla *Hyalophora cecropia*. U savců byly dále nalezeny např. v prasečích střevech a v hovězích nadledvinách. Jsou aktivní proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím. Mechanismus účinku je založen na lytickém rozkladu buňky.

V práci Papo a Shai^[6] byly testovány další kationické, amfipatické, α -helikální AMP izolované z bezobratlých organismů. Byl studován např. hmyzí cecropin a magainin (izolovaný z žabí kůže). U těchto AMP byla zjištěna vysoká účinnost vůči gram-pozitivním, gram-negativní bakteriím. Dále byla pozorována vysoká toxicita vůči rakovinným buňkám a minimální toxicita vůči normálním, savčím buňkám.

Naopak u AMP typu Melittinu a Tachyplesinu II (izolovaný z krabu trnitého), lidských neutrofilních defensinů a lidských LL-37, byla zjištěna vysoká toxicita na gram-pozitivní, gram-negativní bakterie, dále také na zdravé i rakovinné savčí buňky^[6].

2.1.2. Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů

Prvním krokem při působení antimikrobiálních peptidů je přiblížení a interakce s buněčnou membránou. AMP poměrně spolehlivě odlišují savčí buněčnou membránu od membrány bakteriální. Toto rozpoznaní umožňují rozdíly ve struktuře, složení a transmembránovém potenciálu (ψ) mezi bakteriální a

eukaryotickou membránou. Membrány bakterií jsou bohaté na fosfolipidy (např. na fosfatidylglycerol, kardiolipin) a spolu s dalšími složkami bakteriální stěny vytvářejí negativní náboj. Naopak fosfolipidová dvojvrstva eukaryotických buněk obsahuje ve své struktuře velké množství obojetných iontů fosfatidylethanolaminu, fosfatidylcholinu či molekuly cholesterolu udávající membráně náboj neutrální. Rozdílná distribuce jednotlivých molekul na vnitřní a vnější straně membrány vede k tvorbě transmembránového potenciálu. Hodnota (ψ) je určující pro elektrostatické přibližování AMP k bakteriální membráně.

Peptidy narušující celistvost membrány jsou převážně ze skupiny α -helikálních peptidů. Tvorba iontově selektivních kanálů může vést ke ztrátě transmembránového potenciálu a tedy ke ztrátě energetické funkce biomembrány.

Existuje několik možností narušení buněčné membrány - fatální depolarizace membrány, vytváření selektivních kanálů či „děr“ a ztráta buněčného obsahu, aktivace destrukčních procesů, která zahrnuje aktivaci hydrolas buněčné stěny, narušení funkce membrány translokací lipidů a nakonec průnik některých peptidů až k intracelulárnímu cíli^[5].

Větší „díry“ mohou vést ke ztrátě životně důležitých látek a způsobují smrt dané buňky. Včlenění AMP mezi hydrofobní a hydrofilní část membrány, vytváří místo, kde se následně agregují další molekuly peptidů. Po dosažení kritické koncentrace se peptidy reorientují za tvorby kanálů umožňující průnik protonů, jiných iontů, případně větších molekul.

Poněkud odlišný typ je tzv. „kobercový“ mechanismus účinku AMP, kdy dochází k agregaci peptidů vně membrány a po dosažení kritické koncentrace dochází ke vzniku póru či micelizaci a prolomení membrány.

Některé AMP mohou však být translokovány membránou bez jejího znatelného narušení. Uvnitř buňky AMP způsobují např. inhibici cytoplazmatického „heat - shock“ chaperonu DNA, nebo silně narušují samotnou syntézu DNA a inhibují syntézu RNA a proteinů či způsobují nesprávnou translaci RNA^[5].

Molekulární mechanismus působení AMP na rakovinné buňky není zcela jasný. Předpokládají se dvě možné alternativy poškození a následné destrukce nádorových buněk^[6]:

- 1) Nekrósou prostřednictvím lytického efektu - plazmatická membrána je rozrušena tvorbou pórů, které umožňují pronikání iontů a jiných materiálů ven z buňky
- 2) Indukcí apoptózy – membránově aktivní peptidy indukují „nabobtnávání“ mitochondrií, které vede k uvolnění cytochromu c. Uvolněný cytochrom c indukuje Apaf-1 oligomerizaci, aktivaci kaspasy 9 a následně přeměnu prokaspasy 3 na kaspasu 3, v konečné fázi všechny tyto děje způsobují smrt buňky

2.1.3. Aktivity antimikrobiálních peptidů

AMP vykazují celou řadu aktivit – antibakteriální, antivirální, fungicidní, hemolytickou či antikarcinogenní.

2.1.3.1. Antibakteriální aktivita

Antibakteriální aktivita peptidů je testována proti celé řadě gram-pozitivních a gram-negativních bakterií, zejména v naší laboratoři proti *Bacillus subtilis* (G+), *Staphylococcus aureus* (G+), *Escherichia coli* (G-) a *Pseudomonas aeruginosa* (G-).

Antibakteriální aktivitu lze kvalitativně stanovit tzv. dvou-vrstvou technikou na agaru, ale častější technikou je mikrodiluční metoda. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je stanovena pozorováním růstu bakterií na mnohojamkové destičce. Bakterie jsou ve střední exponenciální fázi růstu přidány k roztokům peptidů o různých koncentracích, které jsou pipetovány v jednotlivých jamkách destičky. V naší laboratoři jsou bakterie s těmito peptidy inkubovány při 37 °C po dobu 20 hodin při stálém míchání na Bioscreen C přístroji (Finland) a během této doby je absorbance proměřována každých 15 minut při 540 nm. Každý vybraný peptid je testován nejméně 3x a pro určení antibakteriální aktivity je použito $1,2 \times 10^3$ - $7,5 \times 10^3$ CFU bakterií na jamku. Tetracyklin je testován jako standard v koncentračním rozmezí 1-50 μM ^[8].

2.1.3.2. Antifungální aktivita

Antifungální aktivita AMP je testována proti vybraným druhům patogenních kvasinek, především rodu *Candida* nebo *Saccharomyces cerevisiae*. Stanovuje se podobně jako aktivita antibakteriální.

2.1.3.3. Hemolytická aktivita

Hemolytická aktivita se stanovuje inkubací krysích nebo lidských červených krvinek (erytrocytů) s peptidy při 37 °C po dobu 1 hodiny ve fyziologickém roztoku. Koncentrace peptidů se pohybuje v rozmezí 1-100 μM a koncentrace erytrocytů bývá nejčastěji 5%. Kontrola pro nulovou (tj. žádnou) a 100% hemolýzu se určuje pomocí supernatantu krevních buněk inkubovaných jednak ve fyziologickém roztoku a jednak v roztoku 0,2% Tritonu X100 ve fyziologickém roztoku.

2.1.3.4. Cytotoxicita^[9]

Cytotoxicita vyjadřuje míru škodlivosti daných látek, v našem případě vybraných analogů AMP vůči savčím buňkám. Látky s cytotoxickým účinkem často porušují integritu buněčné membrány, která většinou vede k destrukci celé buňky. Cytotoxicitu lze sledovat pomocí specifických testů uvedených v kapitole 2.3.2., na str. 21.

2.2. Antimikrobiální peptidy izolované z jedu divokých včel

2.2.1. Melectin

Melectin (MEP) je kationický amfipatický peptid izolovaný z jedu divoké včely *Melecta albifrons*. Primární struktura MEP je tvořena 18 aminokyselinovými zbytky (GFLSILKKVLPKVMAMHK-NH₂), přičemž v poloze 11 je navázán aminokyselina prolin (Pro11), která hraje podstatnou úlohu v biologické aktivitě MEP. Tento peptid vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu vůči gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím, avšak nízkou hemolytickou aktivitu. V sekundární struktuře MEP byl dále zjištěn vysoký obsah α-helikálních struktur umožňující

přizpůsobovat jejich amfipatickou sekundární strukturu bakteriální buněčné membráně. V laboratoři, kde byla vypracována diplomová práce byla připravena různá analoga MEP, kdy Pro11 byl nahrazen jinými aminokyselinovými zbytky^[8]. Dále byla provedena rozsáhlá studie vztahu mezi strukturním uspořádáním peptidového řetězce MEP a antibakteriální aktivitou.

2.2.2. Lasioglossiny

Lasioglossiny (LL) jsou kationické amfipatické peptidy izolované z jedu divoké včely *Lasioglossum laticeps*. Jejich primární struktura je tvořena 15 aminokyselinovými zbytky (Tabulka 1, str. 17) a sekundární struktura se vyznačuje snadnou tvorbou α -helikální struktury. Tyto peptidy vykazují silnou antimikrobiální aktivitu vůči gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím a nízkou hemolytickou aktivitu.

V dalších studiích bylo připraveno mnoho analogů LL-peptidů a provedena rozsáhlá studie SAR^[14]. LL vykazují pozitivní náboj +6, který je optimální pro jejich antimikrobiální aktivitu v rámci většiny přirozených AMP. Zvýšení či snížení tohoto náboje vedlo většinou ke snížení antimikrobiální aktivity. Lasioglossiny představují atraktivní podskupinu AMP, která by mohla být modifikována na určitá terapeutika potřebná k léčbě infekcí.

Tabulka 1: Aminokyselinové sekvence přírodních Lasioglossinů - LL-I, LL-II, LL-III

<u>ZKRATKA PEPTIDU</u>	<u>AMINOKYSELINOVÁ SEKVENCE</u>
LL-I	VNWKKVLGKIIKVAK-NH ₂
LL-II	VNWKKILGKIIKVAK-NH ₂
LL-III	VNWKKILGKIIKVVK-NH ₂

2.2.3. Halictiny

Halictiny HAL-1 a HAL-2^[15] jsou považovány za nejkratší lineární kationické peptidy s α -helikální sekundární strukturou. Jejich primární struktura je

tvořena 12 aminokyselinovými zbytky (Tabulka 2 a 3, str. 19 a 20). Byly izolovány z jedu divoké včely *Halictus sexcinctus* (Obr. 1, str. 18). Podobně jako lasioglossiny a melectin vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu vůči gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím, nízkou hemolytickou aktivitu a vysokou antifungální aktivitu proti kvasinkám *Candida albicans*. Jsou rovněž schopny lyzovat a tím zabíjet určité typy rakovinných buněk^[15].



Obr.1: *Halictus sexcinctus* (upraveno dle citace [16])

Čeřovský a spolupracovníci^[15] provedli rozsáhlou strukturně aktivní studii HAL-1 a HAL-2, jejichž pozitivní náboj je + 3 a + 4, kde se zaměřili na modifikaci hydrofobicity, stupně α -helicity, kationicity a amfipaticity. V této studii, kdy synteticky připravili více než 50 analogů halictinů a u všech stanovili antimikrobiální aktivitu vůči 4 druhům bakterií bylo např. prokázáno, že silná hemolytická aktivita některých AMP koreluje s vysokou hydrofobicitou, vysokou α -helicitou a vysokou amfipatickou. Naopak zvýšení kationicity HAL, která je velmi důležitá pro elektrostatickou přitažlivost peptidů k negativně nabitě fosfolipidové buněčné membráně bakterií, vedlo ke zvýšení antimikrobiální aktivity bez zvýšené toxicity vůči krvinkám.

Tabulka 2: Aminokyselinové sekvence Halictinu HAL-1 a jeho analogů. Převzato z práce^[15]. Zvýrazněné symboly aminokyselin v aminokyselinové sekvenci popisují modifikaci provedenou při syntéze tohoto analogu, jsou-li tučná písmena v aminokyselinové sekvenci totožná s původní aminokyselinou HAL-1, znamená to, že L-aminokyselina byla zaměněna za D-aminokyselinu. MeL znamená N-methyллеucin.

<u><i>HALICTINY ZKTRATKA PEPTIDU</i></u>	<u><i>AMINOKYSELINOVÁ SEKVENCE</i></u>
HAL-1	GMWSKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/1	GMWSKILPHLIR-NH ₂
HAL-1/2	GMWSKILGPLIR-NH ₂
HAL-1/3	GMWSKIPGHLIR-NH ₂
HAL-1/4	GMWSKILGHLKR-NH ₂
HAL-1/5	GMWKKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/6	GMWKKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/7	GMWSKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/8	GMWSKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/9	GMWSKILGKLIR-NH ₂
HAL-1/10	GMWKKILGKLIR-NH ₂
HAL-1/11	GMWPKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/12	GKWSKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/15	GMWSKLLGHLLR-NH ₂
HAL-1/17	KMWSKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/18	GMWSKILKHLIR-NH ₂
HAL-1/19	GKWKKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/20	GKWSKILGKLIR-NH ₂
HAL-1/21	GKWKKILGKLIR-NH ₂
HAL-1/22	GMWSKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/24	MWSKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/25	WSKILGHLIR-NH ₂
HAL-1/26	GMWSKILGHLI-NH ₂
HAL-1/27	GMWSKILGHL-NH ₂
HAL-1/28	GMWSKIMeLGHLIR-NH ₂
HAL-1/29	GMWSKILGHLIR-NH ₂

Tabulka 3: Aminokyselinové sekvence Halictinu HAL-2 a jeho analogů. Převzato z práce^[15]. Zvýrazněné symboly aminokyselin v aminokyselinové sekvenci popisují modifikaci provedou při syntéze tohoto analogu, jsou-li tučná písmena v aminokyselinové sekvenci totožná s původní aminokyselinou HAL-2, znamená to, že L-aminokyselina byla zaměněna za D-aminokyselinu. β A- β -alanin, Nal-naftylalanin.

<u>HALICTINY ZKRATKA PEPTIDU</u>	<u>AMINOKYSELINOVÁ SEKVENCE</u>
HAL-2	GKWMSLLKHILK-NH ₂
HAL-2/1	GKW K SLLKHILK-NH ₂
HAL-2/2	GKWM K LLKHILK-NH ₂
HAL-2/3	GKWMS K LKHILK-NH ₂
HAL-2/4	GKWMSLL K KILK-NH ₂
HAL-2/5	K KWMSLLKHILK-NH ₂
HAL-2/6	GKWMS F LKHILK-NH ₂
HAL-2/7	GKWMS β ALKHILK-NH ₂
HAL-2/8	GKWMSLLKHILK-NH ₂
HAL-2/9	GKW Q SLLKHILK-NH ₂
HAL-2/10	GKW W SLLKHILK-NH ₂
HAL-2/11	GKW L SLLKHILK-NH ₂
HAL-2/12	GKWM H LLKHILK-NH ₂
HAL-2/13	GKW M TLLKHILK-NH ₂
HAL-2/14	GKWMSLL Q ILK-NH ₂
HAL-2/15	GKWMS A LKHILK-NH ₂
HAL-2/16	S KWMSLLKHILK-NH ₂
HAL-2/17	H KWMSLLKHILK-NH ₂
HAL-2/18	GKWMSLLK H IWK-NH ₂
HAL-2/19	GKWMSLLK H WLK-NH ₂
HAL-2/20	GKWMS L WKHILK-NH ₂
HAL-2/21	GKWMS W LKHILK-NH ₂
HAL-2/22	GKWMSLLKHILK-NH ₂
HAL-2/23	G K AMSLLKHILK-NH ₂
HAL-2/24	G K FMSLLKHILK-NH ₂
HAL-2/25	G K Na I MSLLKHILK-NH ₂
HAL-2/26	GKWMSLLKHILK-NH ₂

2.3. Stanovení cytotoxicity AMP

2.3.1. Buněčné linie pro testování cytotoxicity AMP

Pro stanovení cytotoxicity AMP se používají jak normální tak rakovinné buněčné linie, a to pro porovnání, které látky jsou toxické na rakovinné buňky a netoxické na zdravé buňky a naopak.

Jako příklad normálních, zdravých buněčných linií na kterých se cytotoxicita testuje lze uvést .:

- potkaní a lidské hepatocyty
- lidské endoteliální buňky pupečnickové žíly (HUVEC)
- lidské osteoblasty
- lidské keratinocyty
- potkaní endoteliální buňky (IEC)
- potkaní neonatální kardiomyocyty

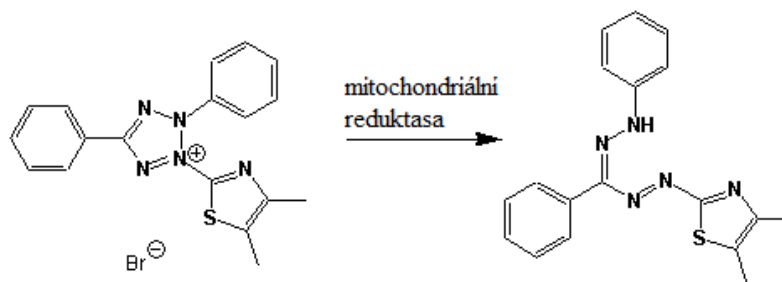
Nejčastěji používané rakovinné linie jsou:

- buňky lidského jaterního karcinomu (HepG2)
- buňky primárního osteosarkomu (SaOS)
- buňky lidské leukemie (HL-60)
- buňky karcinomu děložního čípku (HeLa)
- buňky kolorektálního karcinomu (SW 480)

2.3.2. Testy pro stanovení cytotoxicity sloučenin vůči buněčným liniím

2.3.2.1. Test využívající 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT test)^[17]

Tento test je založen na principu, že žlutá látka 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT látka) je mitochondriálními enzymy živých buněk redukována na ve vodě nerozpustnou modrofialovou látku formazan, která zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných krystalů (Obr. 2, str. 22). Rychlost tvorby formazanu odpovídá aktivitě dýchacího řetězce a odráží tak metabolickou aktivitu buňky. Po rozpuštění je koncentrace formazanu stanovována fotometricky, a to při vlnové délce 540 nm.



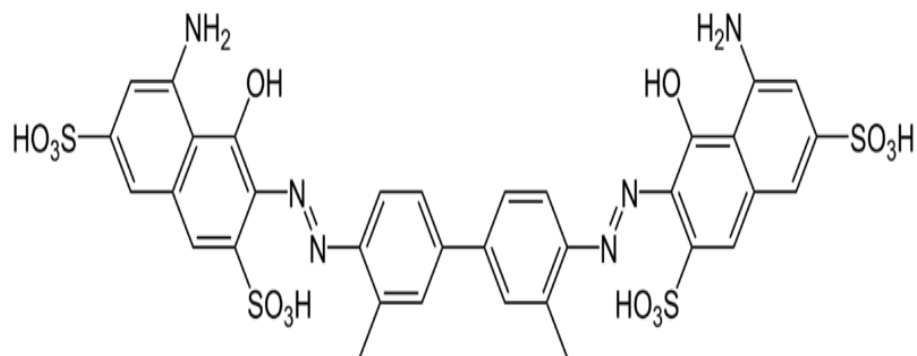
Obr.2: Redukce žlutého 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnetrazolium bromidu (MTT) na modrofialový formazan

2.3.2.2. Test využívající 2,3-bis(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-[(fenylamino)karbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid (XTT test)^[18]

Tento test je založen na stejném principu jako MTT test, přičemž vzniklý formazanový produkt je ve vodě rozpustný. Je rovněž kvantifikován fotometricky, ale při vlnové délce 450-480 nm a doba stanovení životaschopnosti buněk je vymezena maximálně na 3 hodiny, oproti MTT testu.

2.3.2.3. Test využívající Trypanovou modř^[19]

Trypanová modř (obr. 3, str. 23) slouží ke stanovení živých a mrtvých buněk ve vzorku. Toto barvivo neprochází intaktní buněčnou membránou nebo je z intracelulárního prostoru aktivně transportováno ven. Živé buňky zůstávají bezbarvé, zatímco mrtvé buňky, u nichž dochází k porušení integrity buněčné membrány a jejich transportních mechanismů, se rychle zabarví na modro. Nejčastěji je používán 0,4% roztok trypanové modři (1:1).



Obr.3: Trypanová modř

2.3.2.4. Test založený na barvení buněk propidium jodidem^[20]

Propidium jodid je fluorescenční barvivo, které proniká pouze do mrtvých buněk a interkaluje do jejich DNA. Dále se používá pro určení živých buněk průtokovou-cytometrií.

2.4. Studium mechanismu účinku AMP na eukaryotické buňky

Jak již bylo řečeno výše, mechanismus účinku AMP není přesně znám, není jasné zda probíhá apoptózou, nekrotózou či autofagií. Není ani známo, jak dalece a jak rychle peptidy vstupují do buňky. Pro detekci peptidů je výhodné fluorescenční značení. Fluorescenční mikroskopické metody jsou stále více uplatňovány jak ve výzkumu tak v diagnostické klinice. Umožňují, za použití různých fluorochromů, vizualizovat sledované látky a struktury v buňce.

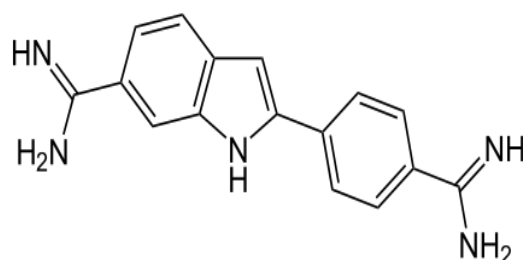
Různých fluorochromů se užívá k vizualizaci zejména buněčných jader, chromozomů, jadérek, cytoskeletárních struktur, specifických buněčných antigenů a dalších struktur. Velmi rozšířená je varianta fluorescenční mikroskopie s použitím vybraných protilátek – imunofluorescenční technika.

Mezi nejčastěji používané fluorochromy se řadí:

- 1) 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), propidium jodid, fluorescein
- 2) Ethidium bromid
- 3) Congo red
- 4) Fluorescein isothiokyanát (FITC)
- 5) Rhodamin

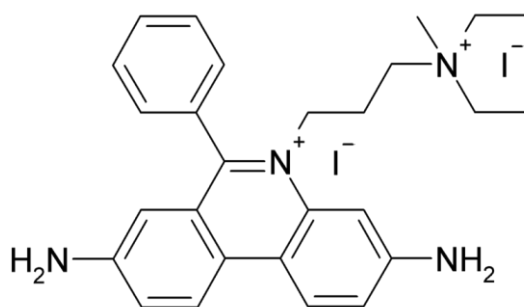
Z výše uvedených typů fluorochromů byly pro naše studium vybrány tyto fluorochromy:

1) 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI)^[22] (obr. 4) je fluorescenční barvivo silně se vázající na DNA buněčných jader. Na fluorescenční mikroskopii je excitováno ultrafialovým světlem o vlnové délce 358 nm a po navázání na DNA vykazuje emisní maximum při 461 nm. Vzhledem k tomu, že DAPI je látka, která snadno vstupuje do buněk, interaguje s DNA a tak barví jádra jak živých, tak mrtvých buněk, je rovněž považována za toxickou a mutagenní.



Obr.4: DAPI

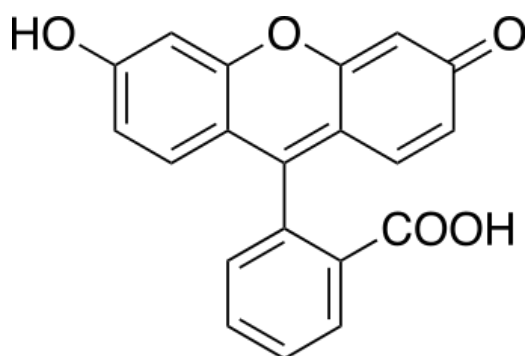
2) Propidium jodid (PI)^[20] – (obr. 5) činidlo, které interkaluje do DNA, používá se k barvení DNA a pro kvantitativní vyhodnocení buněčné DNA. Na rozdíl od DAPI je to látka pro buněčnou membránu nepropustná, je vylučována živými buňkami a běžně se užívá pro identifikaci mrtvých buněk ve vzorcích. Excitační/emisní maximum je v oblasti 510-550/570/590 nm.



Obr.5: Propidium jodid

3) Fluorescein (FL) a fluoresceinem značené peptidy^[23]

Fluorescein (obr. 6) je vysoce fluoreskující látka, absorbující světlo hlavně v modré oblasti a vyzařující světlo v oblasti zelené. Excitační/emisní maximum je 490/505/510 nm. Tato látka se obecně používá pro kovalentní značení proteinů, peptidů či jiných biomolekul. Je vázána na primární NH₂- skupinu nebo SH skupinu příslušné aminokyseliny v peptidovém řetězci. V případě přítomnosti aminokyseliny se dvěma NH₂- skupinami (Lysin) v peptidovém řetězci v poloze 1, může být fluorescein vázán buď na primární α-NH₂ nebo koncovou ε-NH₂-skupinu této aminokyseliny. Fluoresceinem značené molekuly mohou mít rozdílné vlastnosti právě díky místu v molekule, kde je umístěna fluorescenční značka. Ke značení se používají deriváty fluoresceinu, nejčastěji fluorescein isothiokyanát (FITC), s reaktivní funkční skupinou (-N=C=S) nahrazující vodík na spodním kruhu molekuly. Tento derivát reaguje s aminy a sulfhydrylovými skupinami proteinů. Krom fluorescenční mikroskopie je dále využíván např. *in situ* hybridizaci, pro fluorescenční značení sond, které jsou často používány v imunohistochemii k detekci protilátek.



Obr.6: Fluorescein

3. Cíl práce

Základní cíle předkládané diplomové práce:

1. Získání látek silně cytotoxických vůči rakovinným buňkám, ale netoxických pro normální zdravé buňky, výběr je prováděn z velké série syntetických antimikrobiálních peptidů (AMP)
2. Testování cytotoxicity vybraných AMP na 4 buněčných liniích
3. Srovnání cytotoxicity syntetických AMP pro normální a rakovinné buňky
4. Studium lokalizace těchto AMP v buňkách jednotlivých studovaných buněčných linií pomocí fluorescenční mikroskopie
5. Formulace možného mechanismu působení syntetických AMP na nádorové buňky

4. Experimentální část

4.1. Materiál

- DMEM 4,5 g/l (500 ml) PAA, BioTech a.s.
- RPMI 1640 (500 ml) PAA, BioTech a.s.
- EndoGRO™-LS Complete Media kit Millipore, USA
 - EndoGRO™ Basal medium (500 ml)
 - EndoGRO-LS Supplement obsahující:
 - rh EGF, Ascorbic acid, *L-glutamine*,
 - *Hydrocortisone Hemisuccinate, Heparin Sulfate, FBS*
- FBS (500 ML) KRD, s.r.o.

- Glutamin (200 mM) PAA, BioTech a.s.
- Penicilin-Streptomycin (10 000 jednotek Penicilinu, 10 g/ml Streptomycinu v 0,9% NaCl) PAA, BioTech a.s.
- Insulin Sigma, St. Louis, USA
- DMSO FlukaChemie, Steinheim, Švýcarsko
- Fyziologický roztok Infusia, Hořátek, ČR
- Trypsin (0,25 % ve 100 ml PBS) PAA, BioTech a.s.
- DPBS (Dulbecco sůl fosfátového pufru) Sigma, St. Louis, USA
- MTT Sigma, St. Louis, USA
- Testované peptidy byly připraveny synteticky ve skupině „Antimikrobiálních peptidů“ Dr. V. Čeřovského. Jejich struktura a zkratky jsou uvedeny v textu a Tabulkách na str. 13-18.

- Mowiol CalBiochem, USA
- DAPI Sigma, St. Louis, USA
- propidium jodid Sigma, St. Louis, USA
- trypanová modř Sigma, St. Louis, USA
- formaldehyd Sigma, St. Louis, USA
- olejíček na objektiv Olympus 03, Japan

- Destičky Costar (24 well Cell Culture Cluster) Corning, NY 14831, USA
- Destičky (96 Well Cell Culture Cluster) OrangeScientific, Belgie
- Sterilní pipety (5, 10, 25 ml) Bibby Sterilin, UK
- „Falkonky” (50 ml Self-standing Centrifuge Tube) Corning, NY 14831, USA
- Kultivační lahve (75 cm²) TPP BioTech
- Kultivační lahve (25 cm²) TPP BioTech
- Centrifugační tuby 50 ml (kónické) TPP BioTech
- Centrifugační tuby 50 ml stojící TPP BioTech
- Serologické pipety 25 ml, 10ml a 5 ml TPP BioTech
- Podložní sklička (76x26 mm) P-LAB, ČR
- kulatá krycí sklička P-LAB, ČR

4.2. Metody

4.2.1. Ředění a uchování antimikrobiálních peptidů

AMP a jejich analoga připravená organickými chemiky byla uchována buď lyofilizovaná při -76 °C nebo jako 1 mM roztoky ve fyziologickém roztoku při -20 °C.

Před testováním, v den pokusu, byly zásobní roztoky AMP rozmrazeny a připraveny požadované roztoky v kultivačním médiu. Peptidy byly ředěny v kultivačním médiu tzv. dvojkovou řadou, kdy koncentrace připravených vzorků klesala vždy na polovinu oproti koncentraci předchozího roztoku, tj. stejný objem roztoku peptidu byl pipetován do následující zkumavky. Zkumavka byla promíchána na Vortexu a tímto způsobem bylo pokračováno dokud nebylo dosaženo nejnižší požadované koncentrace. Roztoky peptidů byly ředěny v koncentračním rozmezí 5-100 μM.

4.2.2. Pěstování buněčných linií

Veškerá práce s buněčnými liniemi byla, pokud není uvedeno jinak, provedena za sterilních podmínek v laminárním „flowboxu” (Jouan, Trigon-plus®).

4.2.2.1. Rozmrazení buněčné kultury a pěstování

Zamrazovací ampule se suspenzí buněk byla vyjmuta z nádoby s tekutým dusíkem a co nejrychleji ponořena do kádinky s destilovanou vodou o teplotě 40 °C. Rozmrazená buněčná suspenze byla ředěna 5 ml kultivačního média tj. médiem, ve kterém jsou buňky pěstovány. Pro odstranění kryoprotektiva, v našem případě dimethylsulfoxidu (DMSO), který brání správné kultivaci a růstu buněk byla suspenze centrifugována při 2000 g po dobu 4 minut (UNIVERZAL 320, Hettich Zentrifugen, Scholler). Supernatant byl odstraněn a sediment buněk suspendován v 5-10 ml kultivačního média. V této suspenzi byl stanoven počet buněk na 1 ml. Poté byly buňky nasazeny do kultivačních lahví, nejméně ve 2-3 různých koncentracích a „rozpěstovány“. V případě velkého množství buněk byly „nasazeny“ do velkých kultivačních lahví, v případě malého počtu buněk do malých kultivačních lahví jak je uvedeno níže:

I. Velká kultivační láhev – „nasazeno“ 370 000 – 730 000 buněk/25 ml kultivačního média

II. Malá kultivační láhev (vyšší koncentrace buněk) – „nasazeno“ 150 000 – 360 000 buněk/8 ml kultivačního média

III. Malá kultivační láhev (nižší koncentrace buněk) – „nasazeno“ 50 000 – 200 000 buněk/8 ml kultivačního média

Poté byly buňky umístěny do inkubátoru (SANYO CO₂ INCUBATOR, Schoeller, Pharma Praha) a při 37 °C a atmosféře 5% CO₂ po dobu 48 hodin ponechány růst. Jejich růst byl mikroskopicky sledován.

4.2.2.2. „Pasážování“ buněk

Buňky byly uvolňovány ze stěny kultivační láhve enzymově, tj. trypsinizací. Bylo postupováno následovně:

- Odstranění kultivačního média z kultivační láhve
- Šetrné pipetování 8 nebo 15 ml PBS nebo fyziologického roztoku do kultivační láhve (odstranění zbytků média) a následné odstranění tohoto roztoku

- Přidání 2-3 ml trypsinu (0,25 % v PBS) do malých inkubačních lahví, 5 ml trypsinu do velkých inkubačních lahví
- Krátké „poválení“ trypsinu v lahvi a jeho odstranění
- Se zbytky trypsinu se buňky inkubují při 37 °C v inkubátoru, doba inkubace závisí na typu buněk (5-10 minut), průběh trypsinace se sleduje (tzv. „odlupováním“ buněk)
- Po inkubaci se buňky smyjí ze stěny 5-10 ml čerstvého média, následně se suspendují a přenesou se do centrifugační „falkonky“. V suspenzi se stanoví počet buněk na 1 ml.

4.2.2.3. „Nasazování“ buněk do pokusu

Pro testování byly buňky „nasazovány“, tj. pipetovány do 96 či 24 jamkových mikrotitračních destiček. Pro pokus na stanovení toxicity byla použita 96 jamková mikrotitrační destička a pro pokus na fluorescenční mikroskopii byla použita 24 jamková destička.

Buňky byly do obou destiček „nasazovány“ v počtu 20 000 – 25 000 buněk/1ml buněčné suspenze. Podle potřebného počtu buněk k testování byla buněčná suspenze ředěna kultivačním médiem a pipetována po 0,2 ml do jamek 96ti jamkové destičky nebo 1 ml do 24jamkové mikrotitrační destičky. Do vybraných jamek 24 jamkové destičky byla předem umístěna kulatá krycí sklíčka.

Mikrotitrační destičky s buňkami byly opět inkubovány v inkubátoru, při 37 °C v atmosféře 5% CO₂, po dobu 48-72 hodin.

4.2.2.4. Stanovení počtu buněk Bürkerovou komůrkou

Počítání buněk v komůrce je nejjednodušší a mnohdy i nejpřesnější metoda. Na jednom mikroskopickém sklíčku jsou vybroušená dvě pole hluboká přesně 0,1 mm, na jejichž dně je zobrazen síťovitý obrazec. Buňky se počítají při celkovém 400 násobném zvětšení.

Postup počítání buněk:

- buňky se patřičně „naředí“ a promíchají
- kapka suspenze buněk se nanese ke straně komůrky krycího sklíčka

- počítají se buňky ležící ve velkých čtvercích, tj. v oblasti 0,04 mm², a také ty ležící na dvou k sobě kolmých stranách, např. na levé a spodní čáře
- výsledný počet buněk na 1 ml buněčné suspenze se určuje buď výpočtem nebo z přepočítávací tabulky

Bylo-li třeba znát počet živých a mrtvých buněk ve vzorku, k buněčné suspenzi se před počítáním přidával 0,4% roztok trypanové modři. Buňky byly s tímto roztokem (1:1) inkubovány po dobu 5-ti minut. Živé buňky zůstaly bezbarvé, zatímco mrtvé buňky, u nichž byla porušena integrita buněčné membrány, se rychle zabarvily na modro.

4.2.2.5. Zmrazení buněčné kultury

Zmrazení buněk se provádí se živými buňkami (životaschopnost >90%) v logaritmické fázi růstu.

K zmrazení byly použity sterilní 1 ml „kryo-ampulky“ na pevné zašroubování a plastovým štítkem, na kterém bylo uvedeno datum, název typu buněk, popřípadě množství buněk.

Před mražením buněk byla jako primární krok provedena trypsinizace buněk a stanoven počet získaných buněk. Následovala centrifugace po dobu 10 minut (2000 g) a resuspendace v médiu o složení: 10% DMSO, 20% PBS, 70% růstového media pro buňky. Buňky byly suspendovány na koncentraci 1-2 x10⁶ buněk /0,5 ml média a pipetovány do označených ampulí a umístěny do mrazicí nádoby na dobu 24 h, nádoba byla umístěna do hluboko mrazícího boxu (-76 °C, SANYO, Schoeller, Pharma Praha). Po 24 h byly ampule přemístěny do kontajneru s tekutým dusíkem (XT 34 TAYLOR-WHARTON).

4.2.3. Vybrané buněčné linie

4.2.3.1. Lidské endotheliální buňky pupečnickové žíly (HUVEC)

Buňky HUVEC byly během práce rozmrazovány celkem 3x tak, jak je popsáno v kapitole 4.2.2.1.

Buňky HUVEC byly pěstovány v mediu EndoGRO™-LS Complete medium složeném z níže uvedených částí:

- 475 ml EndoGRO™ Basal Medium (uchováno při 4°C)

- 1 ml EndoGRO™-LS Supplement; 0,5 ml rh EGF; 0,5 ml ascorbic acid; 25 ml L-glutaminu; 0,5 ml hydrocortisone hemisuccinate; 0,5 ml heparin sulfate a 10 ml FBS (všechny složky uchovány při -70°C)

Tento typ média je bezbarvý, neobsahuje žádné barevné indikátory či jiné složky, které mohou, u tohoto typu buněk, způsobovat buněčný stres ovlivňující experimentální výsledky. Jedna dávka připraveného media vydržela 14 dní pro pěstování a testování toxicity AMP.

Buňky HUVEC se dobře uvolňovaly trypsinem, stačila maximálně 5 minutová inkubace při 37 °C. Buňky dobře rostly, linearita růstu byla zachována. Počet buněk vzrostl vždy po 24 hodinách na dvojnásobek.

4.2.3.2. Potkaní střevní endotheliální buňky (IEC)

Tyto buňky jsme rozmrazovali a pěstovali celkem 3x. Pěstovány byly v DMEM kultivačním médiu s doplňky viz. Tab.4. na str. 33. Oproti ostatním třem typům buněk byl do média přidáván růstový hormon insulin (Sigma, St. Louis, USA).

Tyto buňky rostly dobře, linearita růstu byla opět zachována. Během „pasážování“ se buňky uvolňovaly trypsinem hůře, bylo potřeba minimálně 10 minut inkubovat.

4.2.3.3. Buňky karcinomu děložního čípku (HeLa)

Pracovali jsme s podklonem HeLa-S3. Jedná se o linii, která je odvozená od mateřské linie buněk HeLa.

Buňky byly během práce rozmrazovány a pěstovány celkem 2x. Pěstovány byly v RPMI 1640 médiu s přidavkem inaktivovaného FBS, glutaminu a antibiotik. Médium bylo připravováno dle rozpisu viz. Tab.4 na str. 33.

Při „pasážování“, na rozdíl od buněk HUVEC, se buňky HeLa-S3 uvolňovaly trypsinem hůře, bylo potřeba 8-10 minutová inkubace při 37 °C .

Během mikroskopického sledování konfluency buňky dobře rostly. Linearita růstu byla opět zachována. Počet buněk vzrostl vždy po cca 24 hodinách na dvojnásobek.

Tabulka 4: Objemová množství jednotlivých složek pro míchání kultivačních médií pro jednotlivé buněčné linie. RPMI a DMEM jsou vhodná kultivační media, obsahující především živiny a pufované roztoky solí. Inaktivované FBS (Fetální hovězí sérum) obsahuje potřebné růstové faktory, vysoké množství proteinů a nízkou koncentraci protilátek, glutamin je aminokyselina podporující růst buněk, postupně se rozkládá, do média se zhruba jednou za dva týdny opět přidává, Penicilin-Streptomycin jsou antibiotika bránící nežádoucí infekci

<u>POŽADOVANÝ OBJEM KULTIVAČNÍHO MÉDIA (ml)</u>						
SLOŽKA	100	150	200	300	400	500
OBJEM SLOŽEK (ml)						
RPMI (DMEM)	88	138	176	264	352	440
Inaktivované FBS	10	15	20	30	40	50
Glutamin	1	1,5	2	3	4	5
Penicilin/Streptomycin	1	1,5	2	3	4	5
Insulin	45 µL	67,5 µL	90 µL	135 µL	180 µL	225 µL

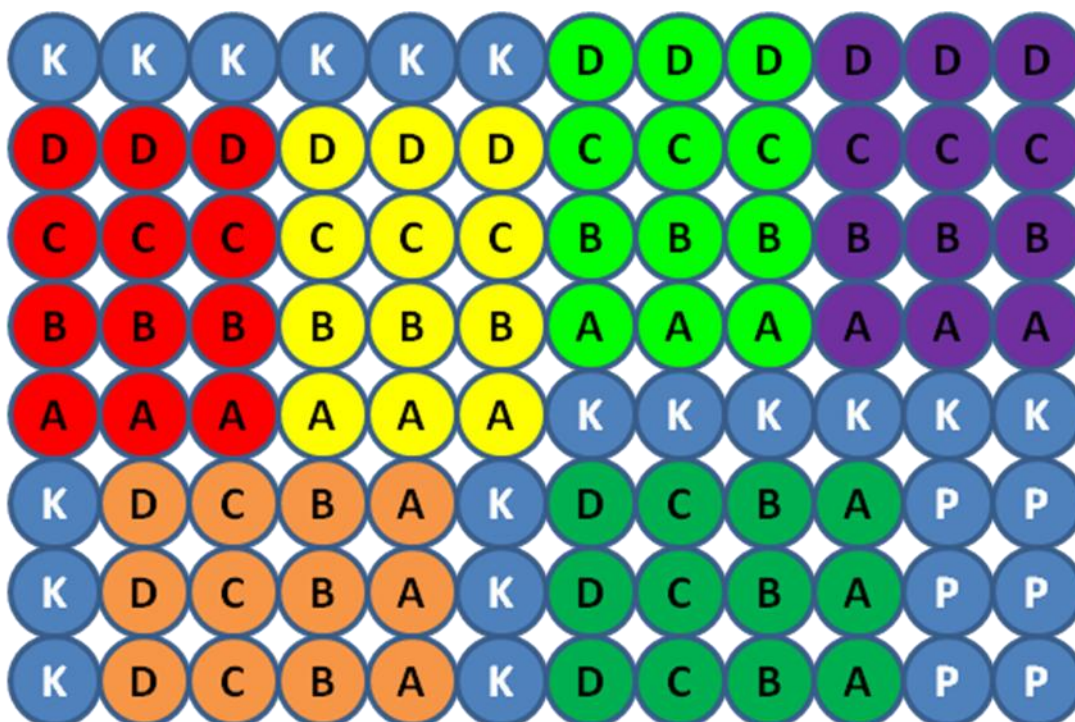
4.2.3.4. Buňky kolorektálního karcinomu (CRC SW 480)

Buňky byly rozmrazovány a pěstovány celkem 3x. Tyto buňky se pěstují v DMEM médium, které je bohatší na živiny. Toto médium bylo připraveno opět smísením všech přídatných složek, jak je uvedeno v Tab. 4. Během „pasážování“ se buňky CRC SW 40 dobře uvolňovaly trypsinem. Pro uvolnění ze stěny inkubační láhve stačila 3- 5 minutová inkubace.

V porovnání s ostatními buněčnými liniemi byl pro buňky CRC SW 480 charakteristický pomalý a nepravidelný růst. Bylo potřeba je déle inkubovat a častěji mikroskopicky sledovat stupeň konfluence.

4.2.4. Testování životaschopnosti buněk stanovení toxicity (MTT test)

Ředěné roztoky testovaných látek viz. kap. (4.2.1.) byly pipetovány do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky v objemu 0,1 ml dle schématu na obr. 6. Každá koncentrace peptidu byla testována v tripletech, kontrolní hodnoty (100 % viabilita, K) byly rozloženy rovnoměrně po destičce pro každou testovanou látku.



Obr. 7: Schéma rozložení vzorků v mikrotitrační destičce. Jednotlivé testované AMP (odlišeny barevně) o různých koncentracích - A nejvyšší koncentrace; B 1/2 koncentrace; C 1/4 koncentrace; D 1/8 koncentrace; K kontrola, tj. buňky v kultivačním médiu bez přidaných AMP; P kontroly pro stanovení počtu buněk

Po inkubaci buněk s peptidy bylo do jamek přidáno 12,5 μ l roztoku MTT (5 mg/ml ve fyziologickém roztoku), mimo posledních 6 jamek (P), které byly určeny ke stanovení počtu buněk v pokuse. Následovala 30 - 60 minutová inkubace s MTT. Délka inkubace závisela na stupni „zmodrání“ kontrolních jamek. Čím více buněk, tím intenzivnější bylo „zmodrání“ a tím kratší doba stačila k úspěšnému stanovení.

Po inkubaci bylo médium odsáto a k modro-fialovému produktu se přidávalo 2x 0,1 ml DMSO (kvůli dobrému rozpouštění) a destička byla třepána 20

minut za laboratorní teploty v třepačce (THERMO SHAKER PST-60 HL plus, BOECO, Germany).

Absorbanci roztoků jsme měřili na spektrofotometru (TECAN, GENIOS, Schoeller, Pharma Praha) při 540 nm proti DMSO. Naměřenou absorbanci roztoků jsme „vynášeli“ do grafu v procentech kontroly proti koncentraci peptidu v jamce. Absorbance jamek, kde byly buňky inkubované pouze s čistým médiem, bez antimikrobiálních peptidů, představují kontroly, tj. 100 % přežití. Z výsledné křivky je určena hodnota IC_{50} , tj. koncentrace při které přežívá (je usmrceno) 50 % buněk, graficky.

4.2.5. Fluorescenční mikroskopie

4.2.5.1. Příprava buněk pro fluorescenční mikroskopii

Do 8 vybraných jamek 24 jamkové mikrotitrační destičky byla umístěna kulatá krycí sklíčka. Tato sklíčka bylo potřeba před aplikací na dno jamky sterilizovat, což se provádí tak, že sklíčka jsou opláchnuta v roztoku ethanolu a následně opálena nad kahanem. Tím se zabrání případné kontaminaci během růstu buněk na sklíčcích. Po vložení sterilního sklíčka na dno jamky bylo do jamek pipetováno po 1 ml ředěné buněčné suspenze. Poté byly destičky inkubovány v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂ po dobu 48 hodin.

4.2.5.2. Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii

Po 48 hodinové inkubaci bylo kultivační médium z jamek mikrotitrační destičky odstraněno a do jamek přidány patřičné roztoky s peptidy. Destička byla inkubována dalších 30-60 minut. V kontrolní jamce bylo pouze kultivační médium.

Po inkubaci byla sklíčka v jamkách promyta 1 ml PBS a fixována 1 ml 4% formaldehydu, který byl připravován vždy čerstvý. Fixace probíhala 15-20 minut. Po fixaci byly buňky opět 2x promyty 1 ml PBS. Poté byla sklíčka s buňkami opatrně vyjmuta z jamek, osušena a stranou s buňkami přiložena na podložní sklíčko, na kterém bylo přidáno 5 µl média Mowiol (polyvinylakohol) s přísadkou DAPI (5 µg/ml). Tato směs byla připravena a nám poskytnuta Dr. P. Šáchou, z oddělení pro biochemii ÚOCHB AV ČR.

Po minimálně 15 minutách (ztuhnutí Mowiolu) bylo možné sledovat vzorek mikroskopem.

4.2.5.3. „Mikroskopování“

Preparáty byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem OLYMPUS JAPAN IX 81, který byl řízen programem Analysis. Buňky byly pozorovány objektivem zvětšujícím 100x. Konečné zvětšení, které je dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru bylo 1000x. Pro lepší viditelnost buněk byla před samotným pozorováním na objektiv kapátkem přidána kapka olejíčku (Immersiol oil, Olympus 03 Japan). Buňky byly pozorovány v UV světle, v modrém světle či ve viditelném světle. Z důvodu nepřesnosti a neurčitosti struktury či případných rozdílů ve viditelném světle byl stav buněk dále dokumentován pomocí fotoaparátu (OLYPMUS CAMEDIA C-5050 zoom, 5.0 Megapixel) napojeného na invertovaný mikroskop (ZEISS, AXIOVERT 40 CFL) a v programu Axiovision.

4.2.5.4. Počítačové zpracování výsledků

Fotografie buněk byly zpracovány v programu GIMP 2.6.4., GNU Image Manipulation Program, Copyright © 1995-2008, Spencer Kimball, Peter Mattis a vývojový tým GIMP. U obrázků byl upraven jas, kontrast, případně jejich velikost.

5. Výsledky

5.1. Stanovení toxicity AMP Halictinů vůči vybraným buněčným liniím

V práci byla testována analoga HAL-1 a HAL-2 a přednostně ta, která jsou účinná vůči bakteriím a kvasinkám. Toxicita těchto látek byla vyjadřována jako IC_{50} (odečtením z grafů závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci látek). Ukázky těchto grafů jsou uvedeny níže, pro každou linii zvlášť (obr. 8 - 11 na str. 39, 41, 43 a 45). Každá látka byla testována nejméně 2-3x, a to vždy ve čtyřech různých koncentracích, v koncentračním rozmezí 12,5-100 μ M. Odečítané a „zprůměrované“ hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v tabulkách 8-15 na str. 38-45. Nejnížší toxicitu vykazují všechna analoga zcela neaktivní v koncentraci 40 μ M ($IC_{50} \gg 40$) a při koncentraci 100 μ M ($IC_{50} > 100$).

5.1.1. Toxicita vybraných analogů Halictinů vůči buňkám HUVEC

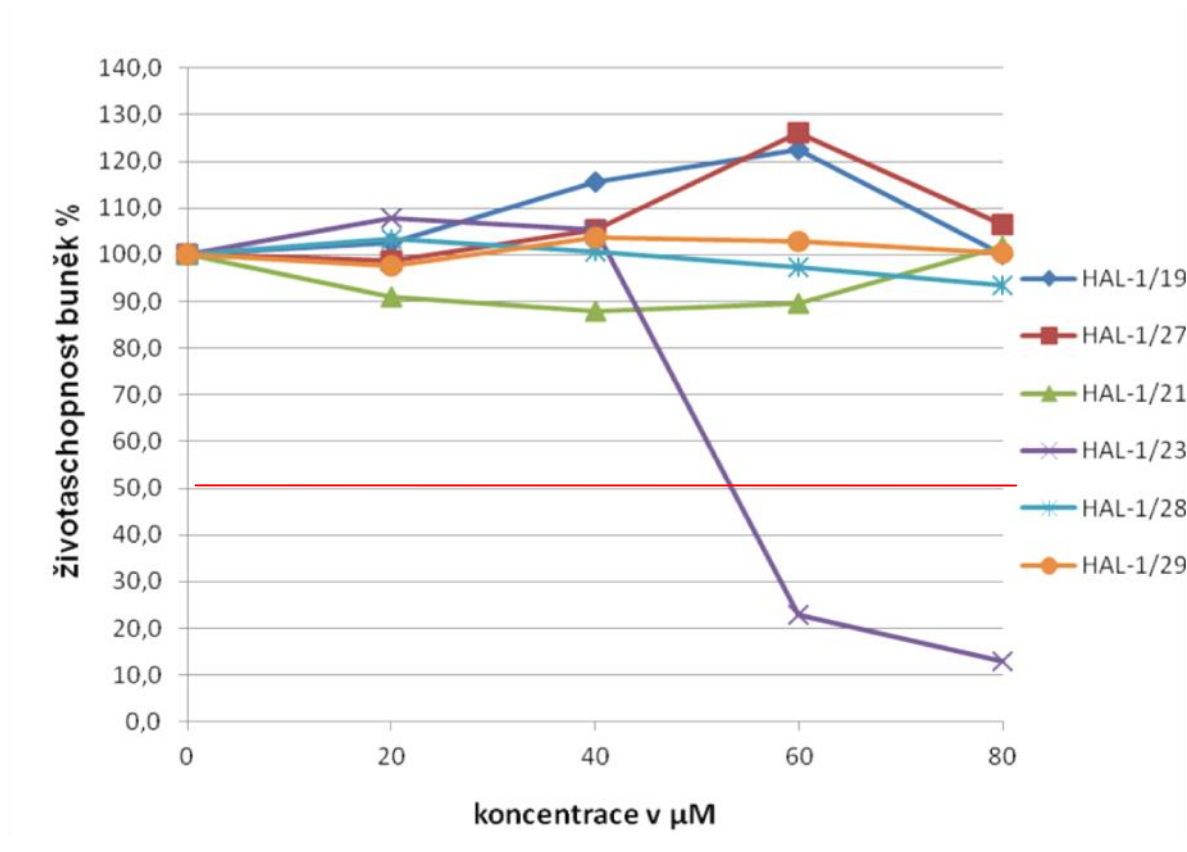
Jak je uvedeno v tabulkách 8 a 9, na str. 38, v případě analogů peptidů HAL-1 vykazují nejvyšší toxicitu HAL-1/6, HAL-1/9, HAL-1/15, HAL-1/16, HAL-1/18 a HAL-1/23. Nejtoxictějšími peptidy, v sérii HAL-2, jsou HAL-2/10, HAL-2/22 a HAL-2/25, neboť již při 15-23 μ M koncentracích tato analoga způsobují inhibici růstu a 50% usmrcení buněk. Nejméně toxické jsou naopak HAL-2/1, HAL-2/3 a HAL-2/20.

Tab. 8: Toxicita analogů HAL-1 vůči buňkám HUVEC. V Tabulce jsou uvedeny průměry hodnot zjištěných ze 2-3 měření.

analog	IC₅₀	analog	IC₅₀	analog	IC₅₀
HAL-1	35	HAL-1/10	63	HAL-1/20	>100
HAL-1/1	>100	HAL-1/11		HAL-1/21	>100
HAL-1/2	>100	HAL-1/12	>100	HAL-1/22	41,5
HAL-1/3		HAL-1/13		HAL-1/23	15
HAL-1/4		HAL-1/14		HAL-1/24	
HAL-1/5	49	HAL-1/15	26	HAL-1/25	
HAL-1/6	26	HAL-1/16	26	HAL-1/26	
HAL-1/7		HAL-1/17	>100	HAL-1/27	>100
HAL-1/8		HAL-1/18	20	HAL-1/28	>100
HAL-1/9	10	HAL-1/19	>100	HAL-1/29	>100

Tab. 9: Toxicita analogů HAL-2 vůči buňkám HUVEC. V Tabulce jsou uvedeny průměry hodnot zjištěných ze 2-3 měření.

analog	IC₅₀	analog	IC₅₀	analog	IC₅₀
HAL-2	22,5	HAL-2/9		HAL-2/18	56
HAL-2/1	>100	HAL-2/10	23	HAL-2/19	39,5
HAL-2/2	40	HAL-2/11	42	HAL-2/20	72,5
HAL-2/3	>100	HAL-2/12		HAL-2/21	
HAL-2/4	≥45	HAL-2/13	>60	HAL-2/22	15
HAL-2/5	57,5	HAL-2/14		HAL-2/23	
HAL-2/6	55	HAL-2/15		HAL-2/24	60
HAL-2/7	>45	HAL-2/16		HAL-2/25	18
HAL-2/8	52,5	HAL-2/17		HAL-2/26	



Obr. 8: Závislost množství živých buněk HUVEC na koncentraci vybraných analogů HAL-1. Obrázek je ukázkou typického experimentu.

Z obr. 8 je patrné, že v přítomnosti testovaných analogů HAL-1 jsou buňky HUVEC živé, nejsou tedy peptidy porušeny. Toxicita vůči těmto buňkám je pozorována pouze u analogu HAL-1/23, počet buněk klesá se zvyšující se koncentrací peptidu a při 58 μM koncentraci peptidu je již 50% buněk bylo usmrceno.

5.1.2. Toxicita vybraných analogů Halictinů vůči buňkám IEC

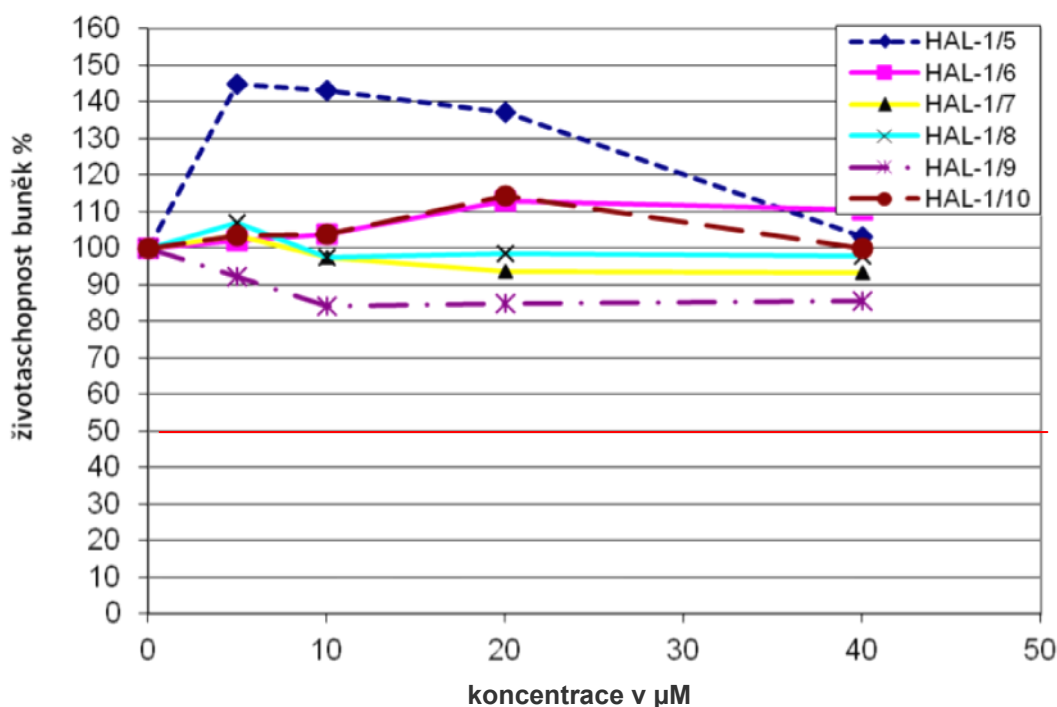
V případě buněk IEC bylo testováno pouze několik analogů Halictinů, neboť již na počátku testování nebyl prokázán toxický účinek těchto látek vůči buňkám IEC. Z tabulek 10 a 11 na str. 40 je viditelný toxický účinek pouze u analogů HAL-2/6 a HAL-2/10 a mírný toxický účinek u látek HAL-1 a Hal-2/2.

Tab. 10: Toxicita analogů HAL-1 vůči buňkám IEC. V Tabulce jsou uvedeny průměry hodnot zjištěných ze 2-3 měření.

analog	IC₅₀	analog	IC₅₀	analog	IC₅₀
HAL-1	36	HAL-1/10	>>40	HAL-1/20	
HAL-1/1	>>40	HAL-1/11	>>40	HAL-1/21	
HAL-1/2	>>40	HAL-1/12	>>40	HAL-1/22	
HAL-1/3	>>40	HAL-1/13		HAL-1/23	
HAL-1/4	>>40	HAL-1/14		HAL-1/24	
HAL-1/5	≥38	HAL-1/15		HAL-1/25	
HAL-1/6	>>40	HAL-1/16		HAL-1/26	
HAL-1/7	>>40	HAL-1/17		HAL-1/27	
HAL-1/8	>>40	HAL-1/18		HAL-1/28	
HAL-1/9	>40	HAL-1/19		HAL-1/29	

Tab. 11: Toxicita analogů HAL-2 vůči buňkám IEC. V Tabulce jsou uvedeny průměry hodnot zjištěných ze 2-3 měření.

analog	IC₅₀	analog	IC₅₀	analog	IC₅₀
HAL-2	≥33	HAL-2/9		HAL-2/18	>40
HAL-2/1	>40	HAL-2/10	25	HAL-2/19	
HAL-2/2	36,5	HAL-2/11		HAL-2/20	>40
HAL-2/3	>40	HAL-2/12		HAL-2/21	
HAL-2/4		HAL-2/13		HAL-2/22	
HAL-2/5		HAL-2/14		HAL-2/23	
HAL-2/6	25	HAL-2/15		HAL-2/24	
HAL-2/7		HAL-2/16		HAL-2/25	
HAL-2/8	>40	HAL-2/17		HAL-2/26	



Obr. 9 : Závislost množství živých buněk IEC na koncentraci vybraných analogů HAL-1. Obrázek je ukázkou typického experimentu.

Z obr. 9 vidíme, že testované látky žádný toxický účinek na buňky IEC nevykazují, neboť žádný z analogů v testovaných koncentracích nesnížil počet buněk o více než 20%. Naopak působením HAL-1/5 zdánlivě počet buněk vzrostl. Po 90 minutové inkubaci je to ale nepravděpodobné. Jiná možnost je, že se zvýšila metabolická aktivita buněk. Opakování pokusu ovšem už zvýšení počtu či aktivity buněk neukázalo.

5.1.3. Toxicita vybraných analogů Halictinů vůči buňkám HeLa-S3

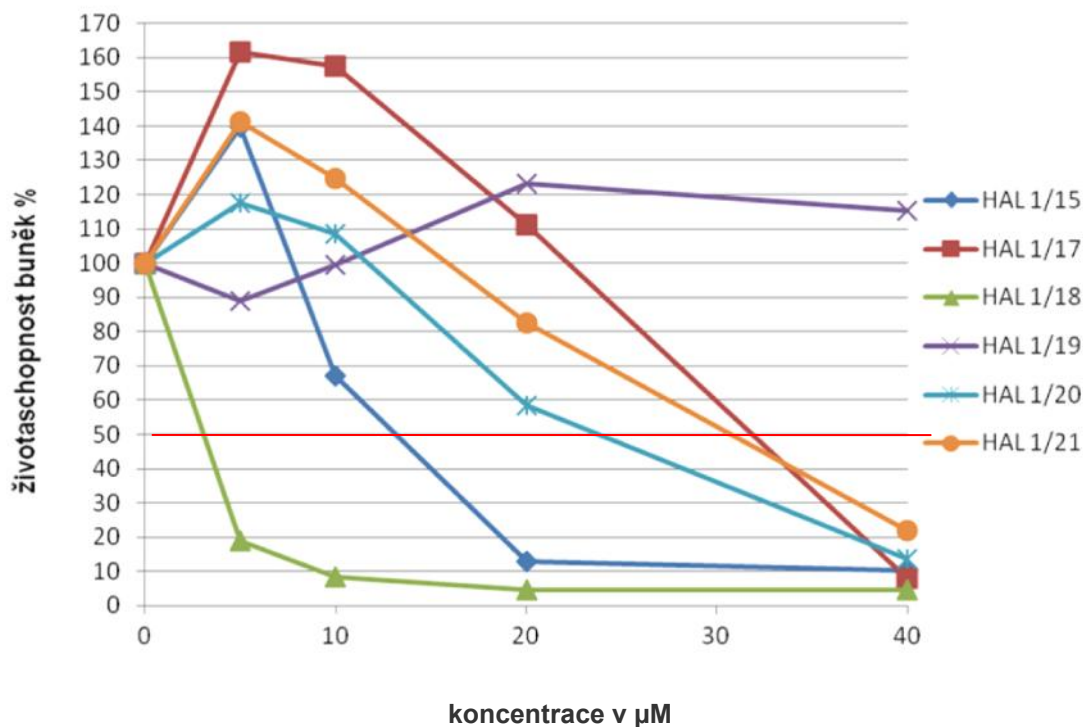
Podíváme-li se na výsledky toxicity studovaných AMP na buňky HeLa-S3 (Tab.12 a 13, na str. 42), je pozorovatelná značná toxicita vybraných analogů HAL-1 vůči těmto buňkám. A to zejména působením HAL-1, HAL-1/5, HAL-1/9, HAL-1/18 a HAL-1/23, neboť tyto látky dosahovaly hodnoty IC_{50} , tj. 50% buněk bylo usmrceno již při koncentracích nižších než 10 μM. V případě analogů HAL-2 vykazuje podobně vysokou toxicitu analog HAL-2/2.

Tab. 12: Toxicita analogů HAL-1 vůči buňkám HeLa-S3. V Tabulce jsou uvedeny průměry hodnot zjištěných ze 2-3 měření.

analog	IC₅₀	analog	IC₅₀	analog	IC₅₀
HAL-1	10,5	HAL-1/10	13	HAL-1/20	22
HAL-1/1	>40	HAL-1/11	>40	HAL-1/21	30
HAL-1/2	>40	HAL-1/12	30	HAL-1/22	14,5
HAL-1/3	>40	HAL-1/13		HAL-1/23	10
HAL-1/4	>40	HAL-1/14		HAL-1/24	>40
HAL-1/5	9	HAL-1/15	14	HAL-1/25	>40
HAL-1/6	15	HAL-1/16		HAL-1/26	30
HAL-1/7		HAL-1/17	35	HAL-1/27	
HAL-1/8	>40	HAL-1/18	2,5	HAL-1/28	>40
HAL-1/9	9	HAL-1/19	>40	HAL-1/29	>40

Tab. 13: Toxicita analogů HAL-2 vůči buňkám HeLa-S3. V Tabulce jsou uvedeny průměry hodnot zjištěných ze 2-3 měření.

analog	IC₅₀	analog	IC₅₀	analog	IC₅₀
HAL-2	11,5	HAL-2/9		HAL-2/18	14
HAL-2/1	13,5	HAL-2/10	12	HAL-2/19	16
HAL-2/2	6	HAL-2/11	14,5	HAL-2/20	30
HAL-2/3		HAL-2/12		HAL-2/21	
HAL-2/4	>40	HAL-2/13	12,5	HAL-2/22	12
HAL-2/5	27,5	HAL-2/14		HAL-2/23	
HAL-2/6	22,5	HAL-2/15		HAL-2/24	34
HAL-2/7	>40	HAL-2/16		HAL-2/25	17
HAL-2/8	15	HAL-2/17	29	HAL-2/26	24



Obr. 10: Závislost množství živých buněk HeLa-S3 na koncentraci analogů HAL-1. Obrázek je ukázkou typického experimentu.

Jak je patrné z obr.10, v tomto konkrétním případě nejvyšší toxicitu vůči buňkám HeLa-S3 vykazuje analog HAL-1/18, neboť již při 2,5 μM koncentraci dochází k 50% usmrcení buněk. Dále značnou toxicitu vykazuje i HAL-1/15, kdy hodnota IC₅₀ je nízká odpovídá 12 μM.

V případě ostatních analogů je při nízkých koncentracích pozorovatelný spíše nárůst počtu buněk či stimulace metabolické aktivity. Při vyšších koncentracích peptidů je již viditelná mírná toxicita, tj. usmrcení malého množství buněk.

5.1.4. Toxicita vybraných analogů Halictinů vůči buňkám CRC SW 480

Toxicita vybraných analogů HAL-1 i HAL-2 vůči nádorovým buňkám CRC SW 480 je velice nízká. Analog HAL-1/18 vykazoval nejvyšší toxicitu, neboť IC₅₀=18 μM (Tab. 14, str. 44). Z důvodu „neaktivity“ a nízkého účinku analogů HAL-1, byla dále testována toxicita i analogů HAL-2, u kterých byla rovněž prokázána nízká aktivita vůči buňkám CRC SW 480. Jak je uvedeno v Tab. 15, na

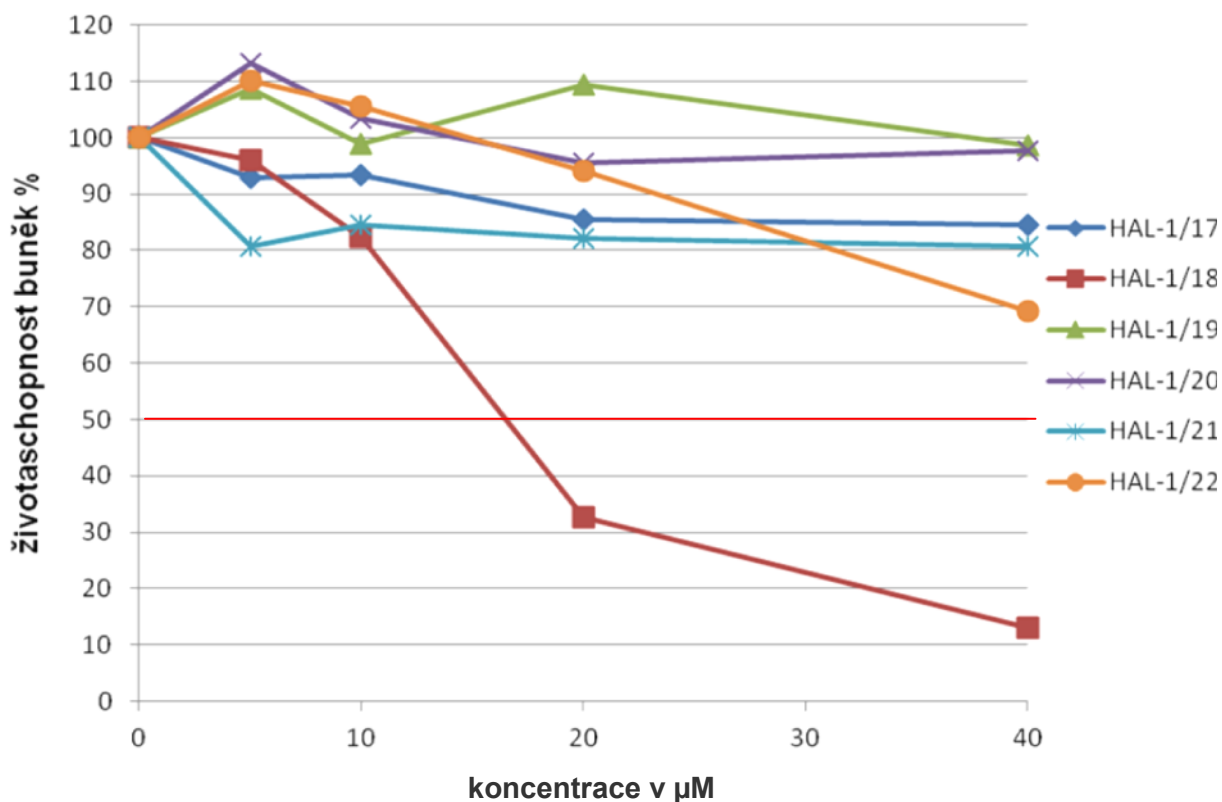
str. 45 relativně vyšší aktivitu vykazovala pouze analoga HAL-2 HAL-2/2 HAL-2/4 HAL-2/10. Zde bylo prokázáno, že téměř většina analogů Halictinů je na buňky kolorektálního karcinomu neúčinná. Na obr. 11 na str. 45 je ilustrační ukázka účinku vybraných analogů HAL-1 na buňky CRC SW 480. Je patrné, že značnou aktivitu vykazuje pouze HAL-1/18.

Tab. 14: Toxicita analogů HAL-1 vůči buňkám CRC SW480. V Tabulce jsou uvedeny průměry hodnot zjištěných ze 2-3 měření.

analog	IC₅₀	analog	IC₅₀	analog	IC₅₀
HAL-1	≥39	HAL-1/10	≥62	HAL-1/20	>40
HAL-1/1	>40	HAL-1/11		HAL-1/21	>40
HAL-1/2		HAL-1/12	>40	HAL-1/22	≥42
HAL-1/3		HAL-1/13		HAL-1/23	
HAL-1/4		HAL-1/14		HAL-1/24	
HAL-1/5	43,5	HAL-1/15	≥34	HAL-1/25	
HAL-1/6	>40	HAL-1/16		HAL-1/26	
HAL-1/7		HAL-1/17	>40	HAL-1/27	
HAL-1/8		HAL-1/18	18	HAL-1/28	
HAL-1/9	≥52	HAL-1/19	>40	HAL-1/29	

Tab. 15: Toxicita analogů HAL-2 vůči buňkám CRC SW 480. V Tabulce jsou uvedeny průměry hodnot zjištěných ze 2-3 měření.

analog	IC ₅₀	analog	IC ₅₀	analog	IC ₅₀
HAL-2	34,5	HAL-2/9		HAL-2/18	>40
HAL-2/1	>40	HAL-2/10	34	HAL-2/19	>40
HAL-2/2	35	HAL-2/11	40	HAL-2/20	>40
HAL-2/3		HAL-2/12		HAL-2/21	
HAL-2/4	≥32,5	HAL-2/13	≥61	HAL-2/22	>40
HAL-2/5		HAL-2/14		HAL-2/23	>40
HAL-2/6	>40	HAL-2/15		HAL-2/24	>40
HAL-2/7	>40	HAL-2/16		HAL-2/25	39
HAL-2/8	>40	HAL-2/17		HAL-2/26	



Obr. 11: Závislost množství živých buněk CRC SW 480 na koncentraci analogů HAL-1. Obrázek je ukázkou typického experimentu.

5.2. Využití fluorescenční mikroskopie pro sledování vstupu a distribuce AMP v buňkách

V prvním experimentu bylo zjišťováno jaká koncentrace fluorescenčního peptidu bude nejvhodnější pro sledování vstupu peptidu do buňky a jeho přítomnosti v buňce. Bylo zjištěno, že nejlepší koncentrace peptidu je 2 μM , to je koncentrace hluboko pod IC_{50} těchto látek, tedy taková, která není pro buňky toxická. Vyšší koncentrace způsobila příliš silné „pozadí“, při nižší koncentraci byl signál příliš slabý.

Dále bylo zjištěno, že je-li fluorescenční peptid přidán k buňkám sám, do buněk s největší pravděpodobností neproniká nebo jen velmi málo. Proto byla při dalším testování s buňkami inkubována směs fluorescenčních peptidů s různými koncentracemi neznačených peptidů, a to s peptidem LL-8, analogem HAL-1/10, HAL-1/18 a MAC-1, peptidy různého původu odvozené od různých přírodních peptidů. Peptidy byly použity jak v koncentraci nižší, tak vyšší než jejich IC_{50} .

V experimentech byly použity dva typy fluorescenčních peptidů o stejných koncentracích (2 μM), FL-LL-8 a Fluo-1, lišících se umístěním fluorescenční skupiny v molekule. FL-LL-8 má fluoresceinovou skupinu navázanu na primární aminoskupinu v poloze 1. Fluo-1 má fluoresceinovou skupinu navázanu na ϵ -aminoskupinu lysinu analogu LL-8, který má v poloze 1 lysin místo valinu.

Dále byl testován samotný, fluorescenčně neznačený analog LL-8 (40-50 μM) či v kombinaci s některým z fluorescenčních peptidů. Pro detekci jader bylo použito fluorescenční barvivo DAPI.

5.2.1. Studium účinku peptidu LL-8 vůči buňkám HUVEC

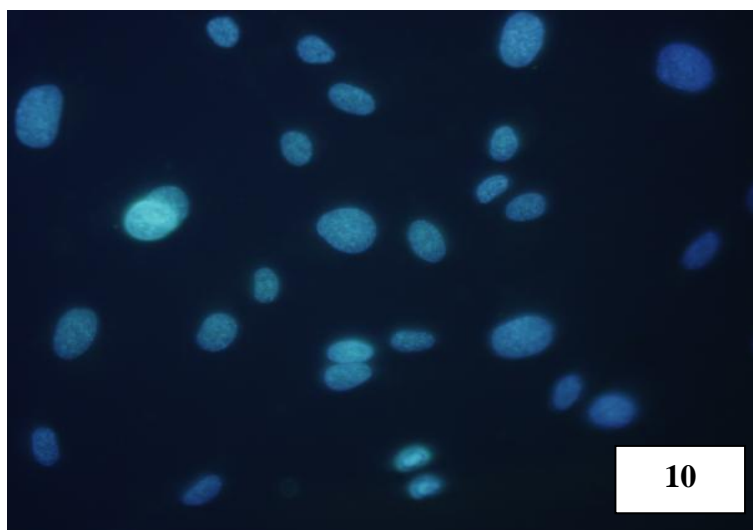
Na obrázcích 12A-C, na str. 48 jsou uvedeny fotografie buněk HUVEC inkubovaných se samotným Fluo-1. Dále jsou zde na snímcích uvedeny hodnoty expozičních časů, kdy v případě použití samotného Fluo-1 byla použita expozice vyšší, neboť tento peptid do buněk pronikal pouze málo.

Jak je z obr. 12A-C, na str. 48 patrné, 2 μM fluorescenční peptid Fluo-1 nezpůsobuje žádné destruktivní změny v buňce, protože pravděpodobně do buněk proniká pouze v malém množství. Proto byl použit vysoký expoziční čas.

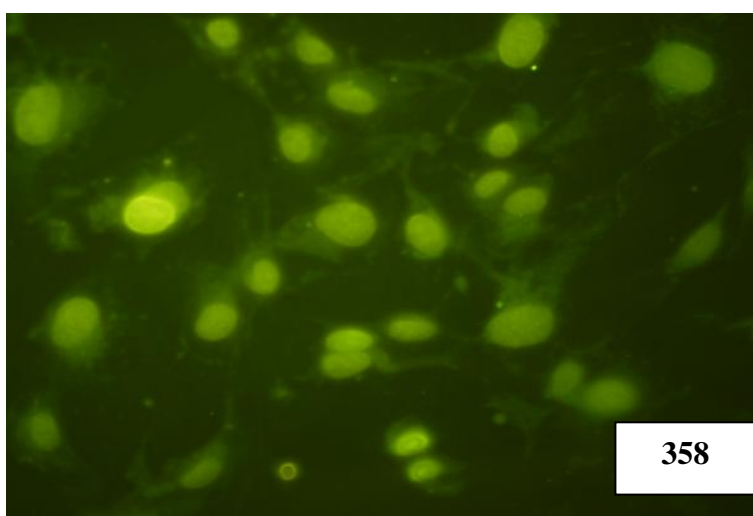
Na obrázcích 13A-C, na str. 49 jsou uvedeny fotografie buněk HUVEC inkubovaných s 2 μ M FL-LL-8 + 50 μ M LL-8. V tomto případě byl použit expoziční čas nižší, neboť ve směsi s neznačeným peptidem LL-8 proniká fluorescenční peptid FL-LL-8 do buňky více.

Účinkem směsi neznačeného analogu peptidu LL-8 s fluorescenčně značeným FL-LL-8, pravděpodobně dochází v případě buněk HUVEC k částečnému poškození buněčné struktury, pod mikroskopem se buňka jeví jako „vylitá“ (Obr. 13B). Příčinnou je vysoká toxicita peptidu LL-8 vůči buňkám HUVEC, která byla zaznamenána i během testování toxicity. Tento jev byl také studován pomocí viditelné mikroskopie (5.3.1.).

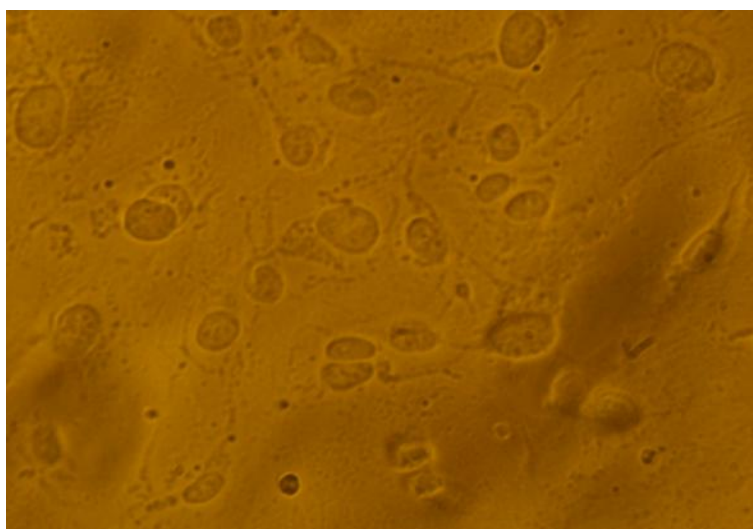
A



B

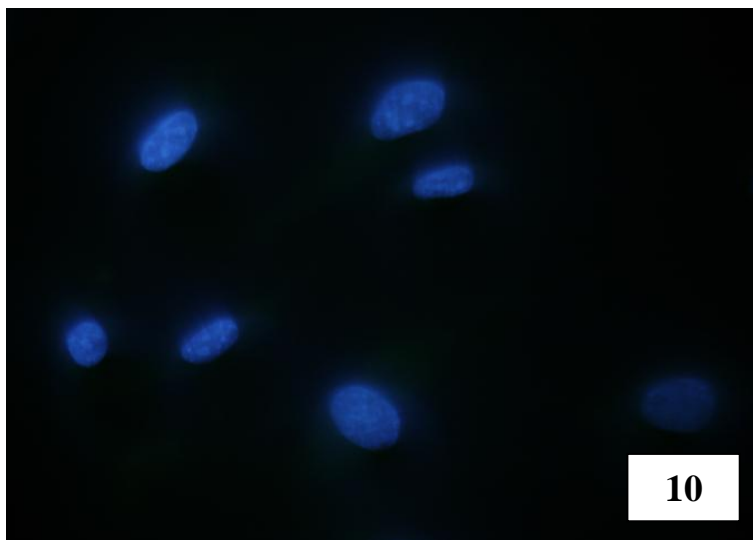


C

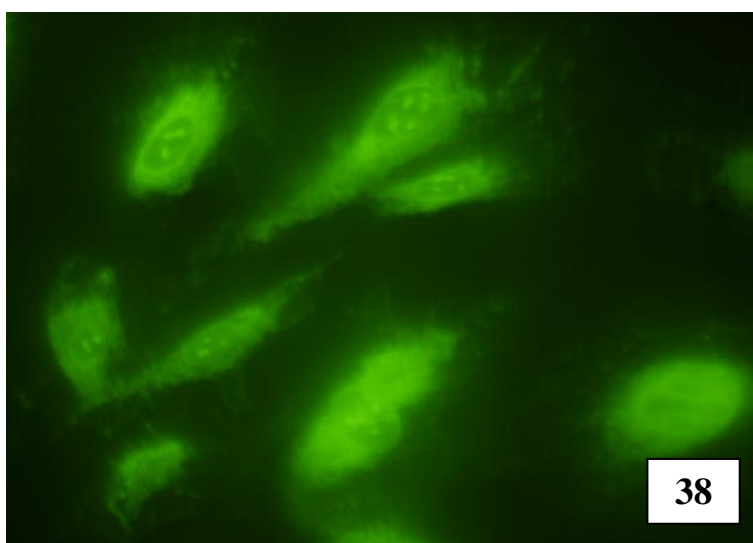


Obr. 12: Buňky HUVEC inkubované 45 minut pouze s 2 μ M Fluo-1. A - obr. v UV světle – obarvená jádra DAPI; B – obr. v modrém světle – fluorescein (Fluo-1); C – obr. ve viditelném světle.

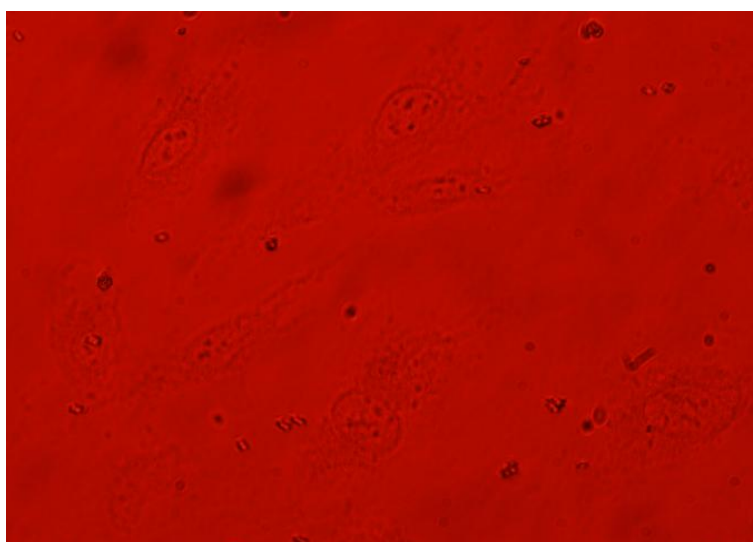
A



B



C



Obr. 13: Buňky HUVEC inkubované 45 minut s 2 μ M FL-LL-8 + 50 μ M LL-8 . A - obr. v UV světle – obarvená jádra DAPI; B – obr. v modrém světle – fluorescein (FL-LL-8); C – obr. ve viditelném světle.

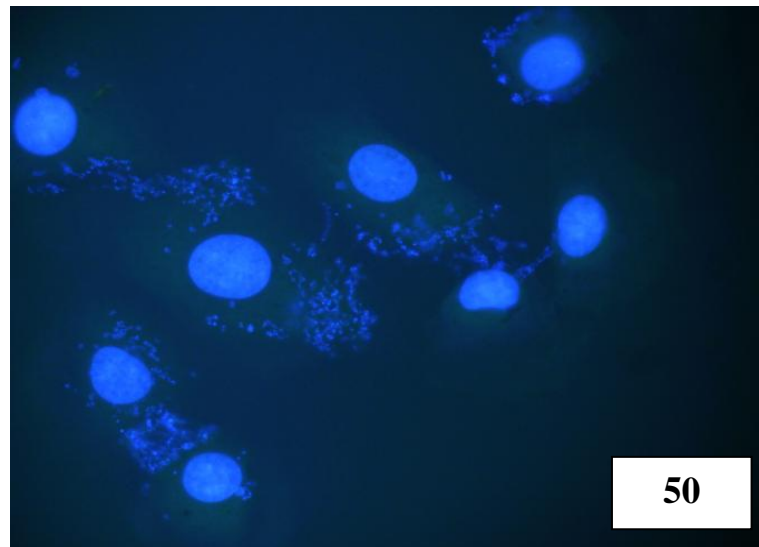
5.2.2. Studium účinku a lokalizace peptidu LL-8 v buňkách IEC

Na obrázcích 14 a 15 A-C jsou fotografie působení fluorescenčně značeného Fluo-1, respektive účinek kombinace značeného Fluo-1 s neznačeným peptidem LL-8 o koncentraci 10 μ M na buňky IEC. Dále jsou na snímcích uvedeny expoziční časy. Opět v případě použití samotného značeného peptidu Fluo-1 je expozice vyšší, neboť peptid proniká do buňky pouze v malém množství. Byla-li použita směs značeného a neznačeného peptidu, expoziční čas byl nižší.

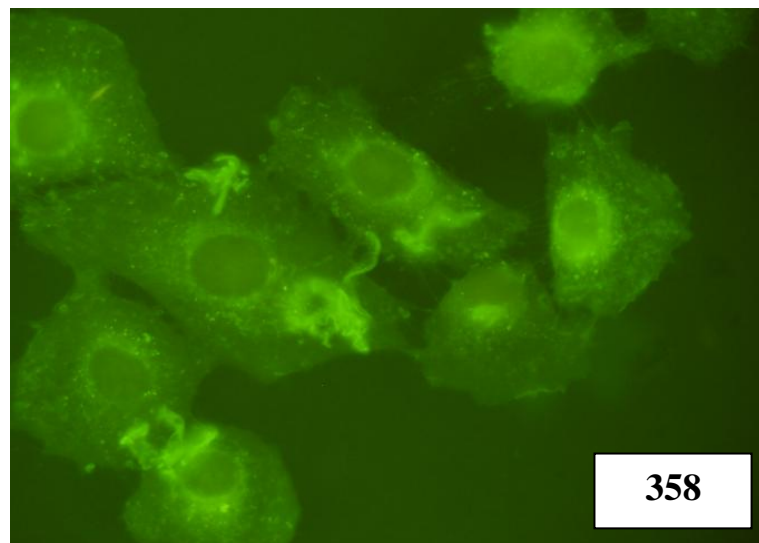
Z obrázků 14A-C je patrné, že účinkem samotného, fluorescenčně značeného peptidu Fluo-1 k porušení buněčné struktury nedochází. Buňka si zachovává svůj specifický tvar.

Na obr. 15A-C lze opět sledovat „nedestruktivní“ účinek na strukturu buňky vlivem fluorescenčně značeného Fluo-1 a neznačeného peptidu LL-8. Koncentrace LL-8 je nižší než toxická. Také bylo pozorováno, že peptid již proniká do buňky, přičemž jeho nejvyšší koncentrace byla, ve formě malých granulí, zaznamenána v cytoplazmě a v okolí jaderné membrány (Obr.10B).

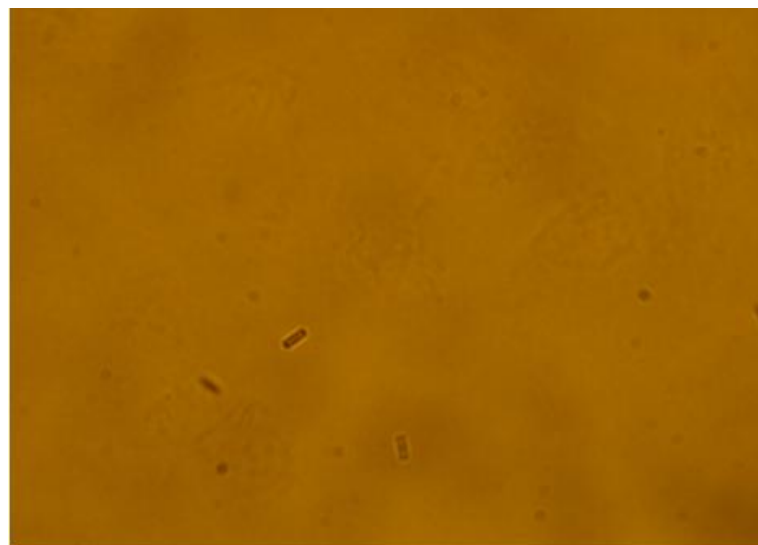
A



B

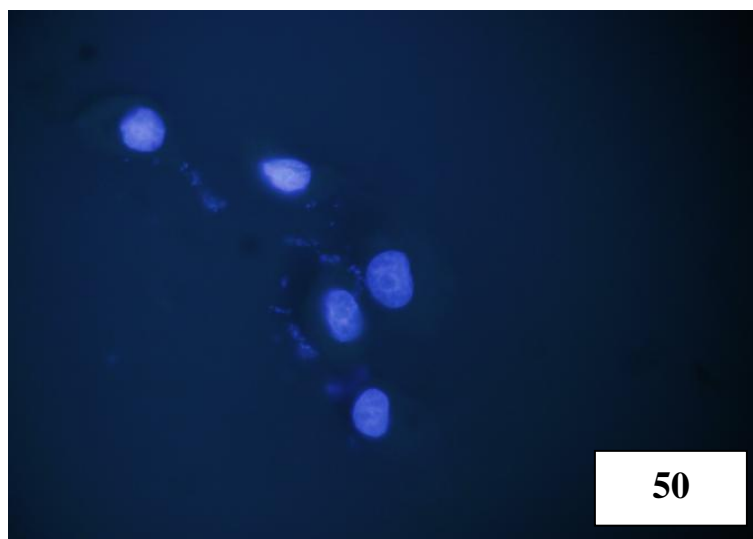


C

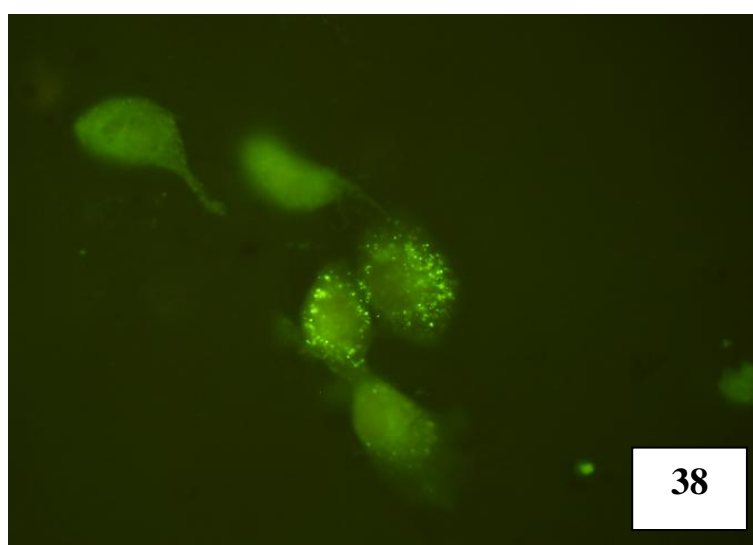


Obr. 14: Buňky IEC inkubované 45 minut s 2 μ M Fluo-1. A - obr. v UV světle – obarvená jádra DAPI; B – obr. v modrém světle – fluorescein (Fluo-1); C – obr. ve viditelném světle.

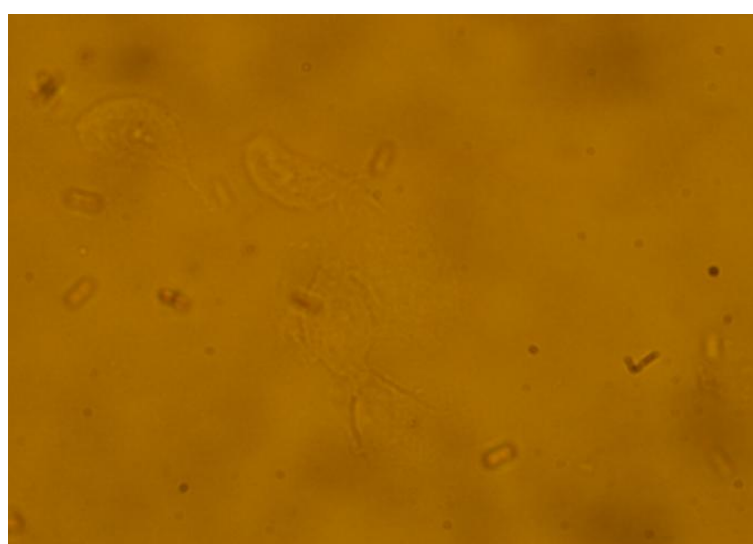
A



B



C



Obr. 15: Buňky IEC inkubované 45 minut s 2 μ M Fluo-1+10 μ l LL-8. A - obr. v UV světle – obarvená jádra DAPI; B – obr. v modrém světle – fluorescein (Fluo-1); C – obr. ve viditelném světle.

5.2.3. Studium účinku a lokalizace peptidu LL-8 v buňkách HeLa- S3

Kromě fluorescenčně značeného peptidu Fluo-1 byly pro studium buněk HeLa-S3 dále použity fluorescenčně neznačené peptidy LL-8, LL-8/12 a HAL-1/10. Fluo-1 byl použit při koncentraci 2 μM .

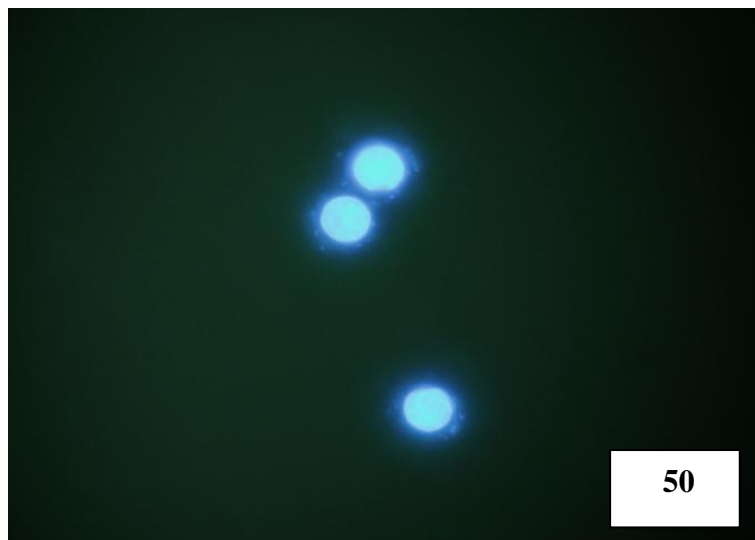
Abychom získali vypovídající obrázky buněk, bylo nutné použít vyšší expoziční čas při inkubaci buněk se samotným, fluorescenčně značeným peptidem a nižší expozici při inkubaci buněk se směsí značeného a neznačeného peptidu. Tedy i u těchto buněk fluorescenční peptid v nízké koncentraci proniká do buněk málo a po přidání neznačených peptidů různého charakteru se jeho průnik do buněk zvýší.

Na obrázcích 16 a 17 A-C jsou fotografie buněk HeLa-S3 po inkubaci se samotným fluorescenčně značeným peptidem Fluo-1 a po inkubaci se směsí značeného Fluo-1 s neznačeným LL-8 proti HeLa-S3. Peptid LL-8 byl použit o koncentraci 10 μM .

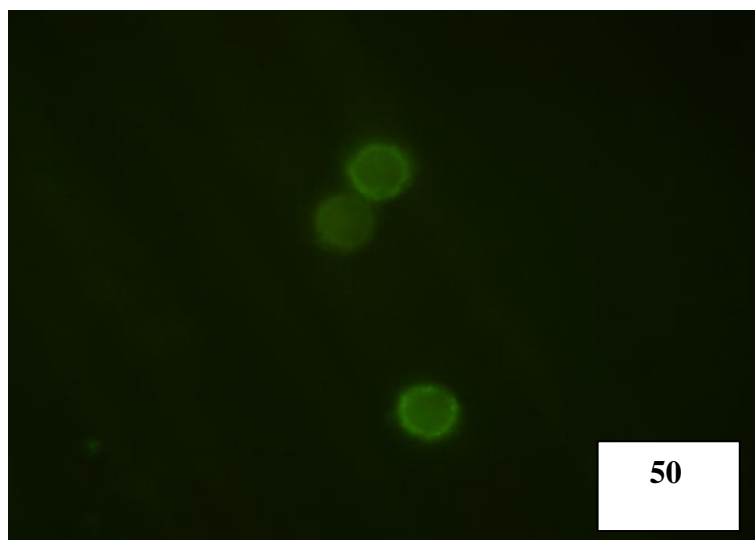
Z obr. 16A-C je patrné, že účinkem samotného fluorescenčně značeného peptidu Fluo-1 nedochází k poškození buněčné struktury, neboť je velice pravděpodobné, že sám do buňky neprochází. Buňky HeLa-S3 si tedy zachovávají svůj kulatý tvar (Obr. 16C).

Z obrázků 17A-C je patrné, že peptid pod vlivem LL-8 proniká do buňky, přičemž jeho koncentrace je nejvyšší v okolí jaderné membrány (Obr. 17B). Struktura buňky není peptidem poškozena.

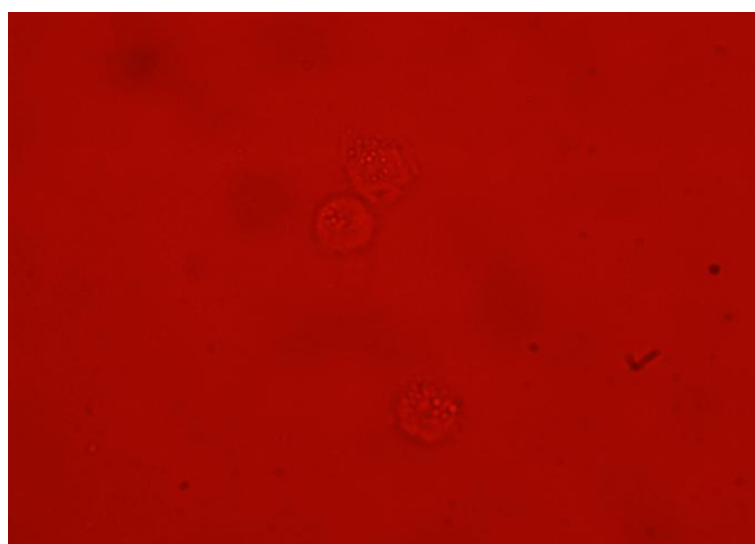
A



B

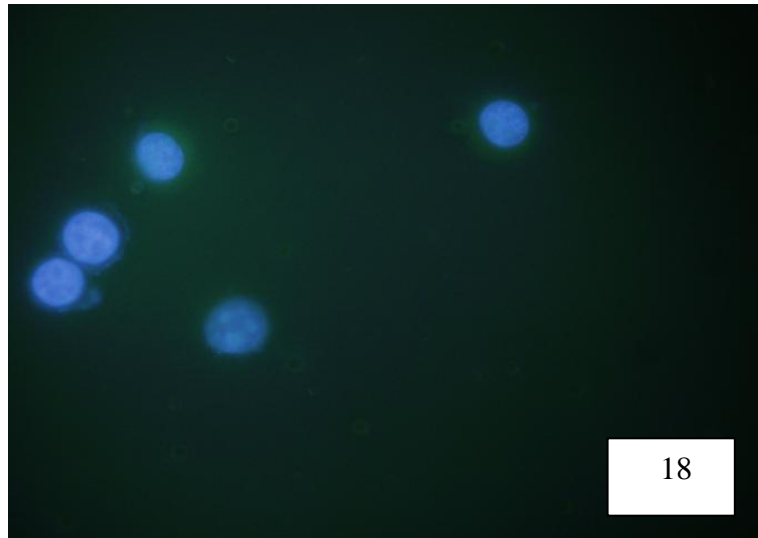


C

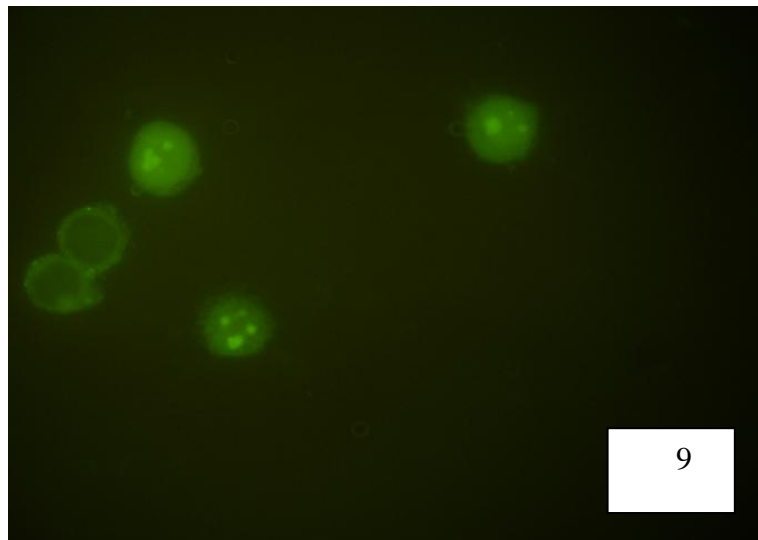


Obr. 16: Buňky HeLa-S3 inkubované 45 minut s 2 μ M Fluo-1. A - obr. v UV světle – obarvená jádra DAPI; B – obr. v modrém světle – fluorescein (Fluo-1); C – obr. ve viditelném světle.

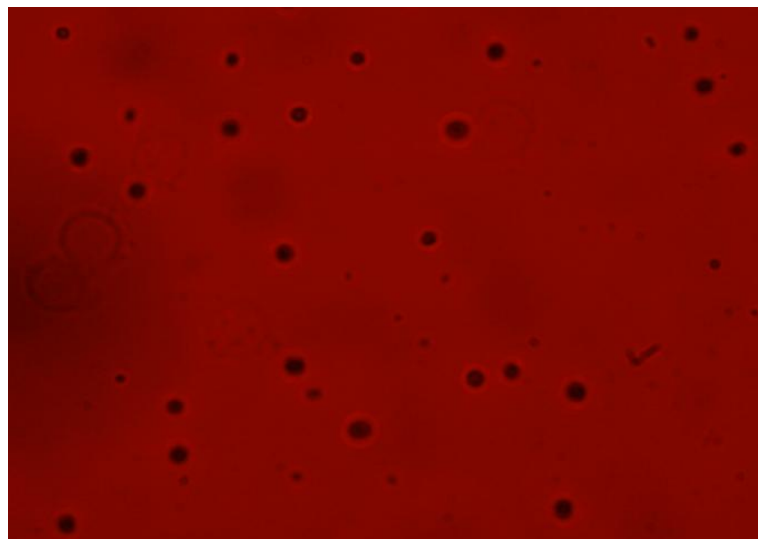
A



B



C



Obr. 17: Buňky HeLa-S3 inkubované 45 minut s 2 μ M Fluo-1+10 *ul* LL-8. A - obr. v UV světle – obarvená jádra DAPI; B – obr. v modrém světle – fluorescein (Fluo-1); C – obr. ve viditelném světle.

5.2.4. Studium účinku a lokalizace peptidu LL-8 v buňkách CRC SW 480

Během testování vlivu AMP na buňky CRC SW 480 byly použity tři fluorescenčně neznačená analoga peptidů- HAL-1/10, LL-8, MAC 1. Dále byl použit fluorescenční peptid FL-LL-8.

Vstup peptidu do buněk záležel na koncentraci interaktivního peptidu. Bylo zjištěno, že opět jako u předcházejících tří typů buněk je nejúčinnější neznačený peptid LL-8.

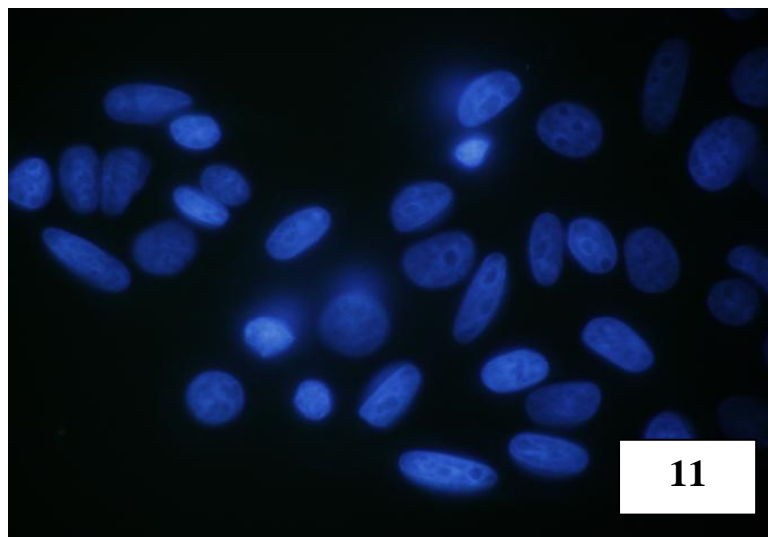
Použitím směsi fluorescenčně značeného a neznačeného peptidu byl použit expoziční čas nižší, neboť vlivem neznačeného peptidu LL-8 proniká fluorescenčně značený peptid do buňky více, v porovnání s použitím samotného značeného peptidu FL-LL-8. V tomto případě byla použita expozice vyšší (Obr. 18B).

Na obrázku 18A-C je uvedena ukázka působení samotného značeného peptidu FL-LL-8 na buňky CRC SW 480. Na obrázcích 19 a 20 A-C jsou pak uvedeny ukázky účinku směsi fluorescenčně značeného FL-LL-8 s neznačeným LL-8 použitým ve dvou koncentracích 8 a 50 μM , nižší než IC_{50} a vyšší než IC_{50} těchto látek pro buňky CRC SW 480.

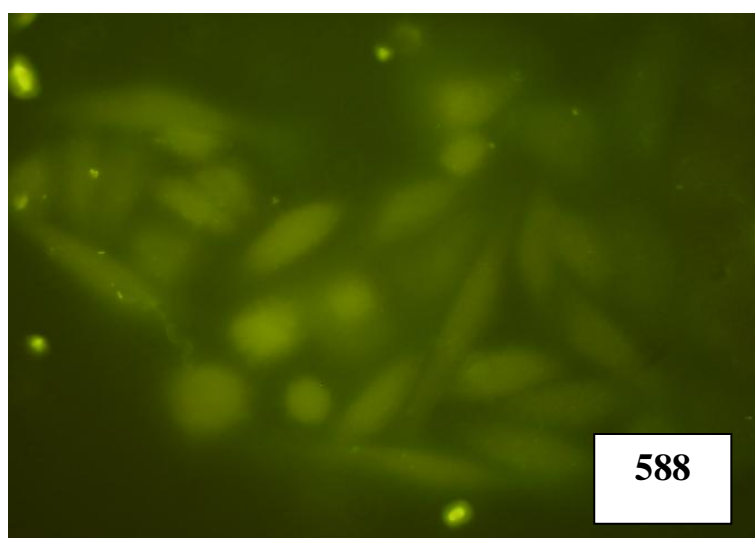
Z obrázků 19B je patrné, že již nízká koncentrace peptidu LL-8 vede ke zvýšenému vstupu FL-LL-8 do buněk. Tvar buněk je stejný, nejsou příliš poškozeny. Jeho nejvyšší koncentrace byla v podobě granulí zaznamenána v okolí jaderné membrány.

Naopak, na obr. 20B je vidět, že buňky jsou poškozeny a silně fluoreskují. Nejsilnější fluorescence je pozorována v okolí jádra a pravděpodobně i v jadéřkách (Obr. 19B). Ve viditelném světle jsou buňky viditelně odlišné.

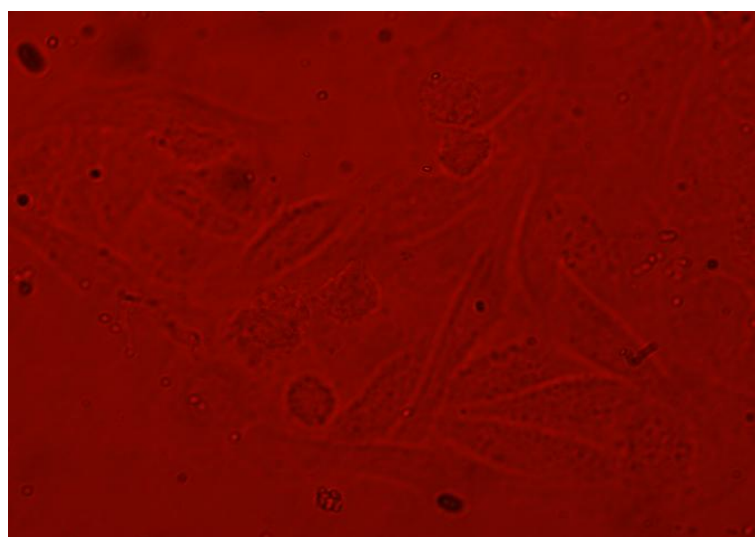
A



B

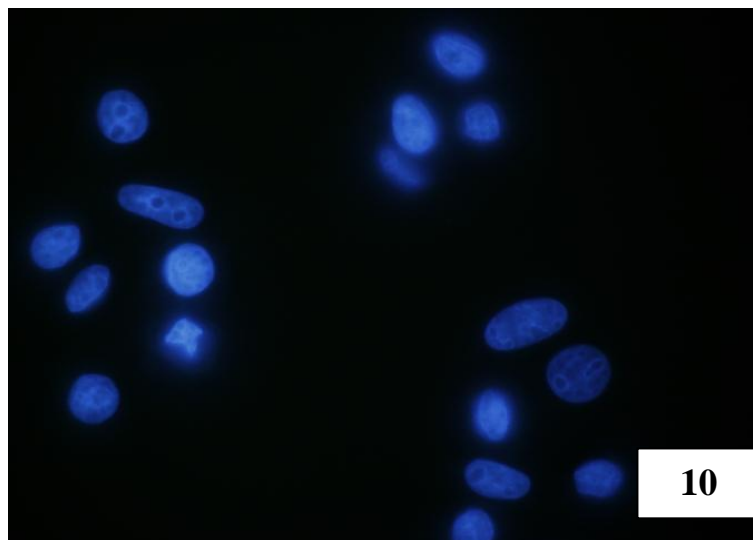


C

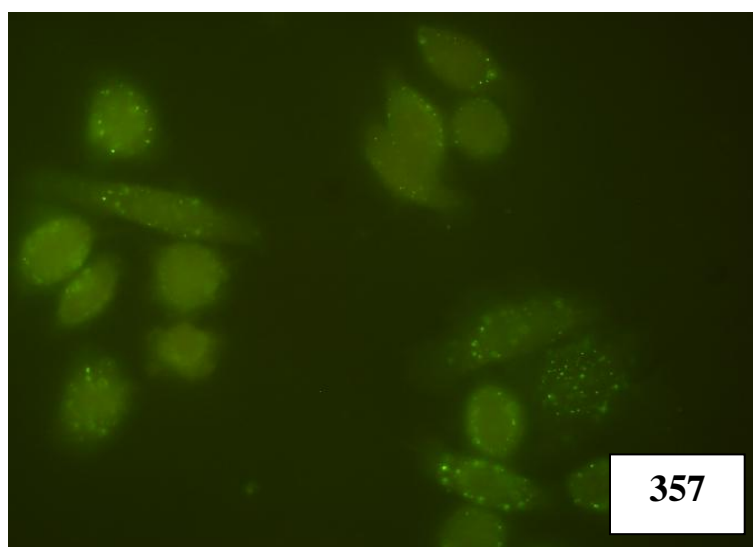


Obr. 18:Buňky CRC SW 480 inkubované 45 minut s 2 μ M FL-LL-8.
A - obr. v UV světle – obarvená jádra DAPI; B – obr. v modrém světle – fluorescein (FL-LL-8); C – obr. ve viditelném světle.

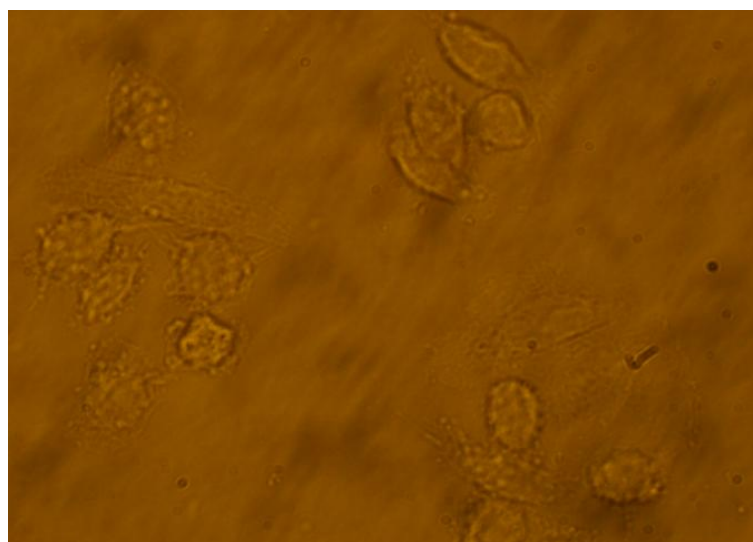
A



B

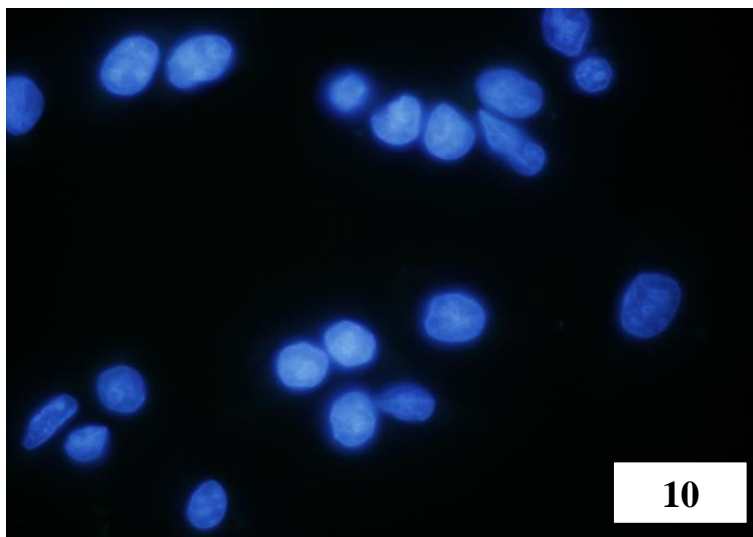


C

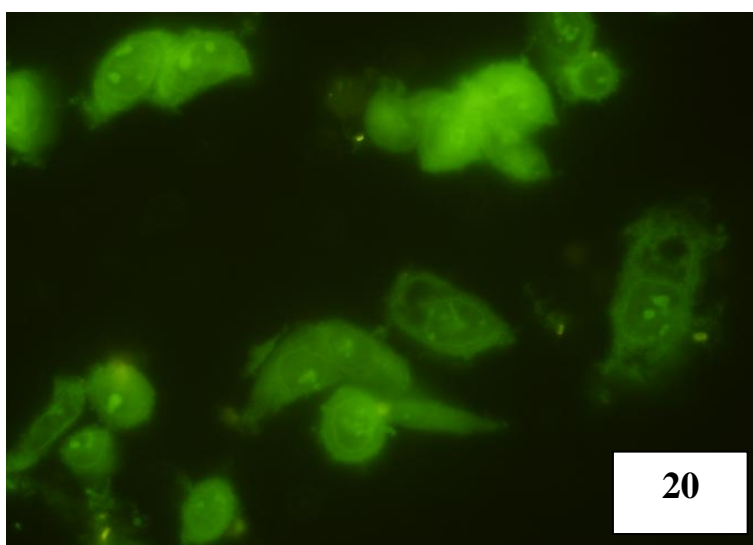


Obr. 19: Buňky CRC SW 480 inkubované 45 minut s 2 μM FL-LL-8+8 μM LL-8. A - obr. v UV světle – obarvená jádra DAPI; B – obr. v modrém světle – fluorescein (FL-LL-8); C – obr. ve viditelném světle.

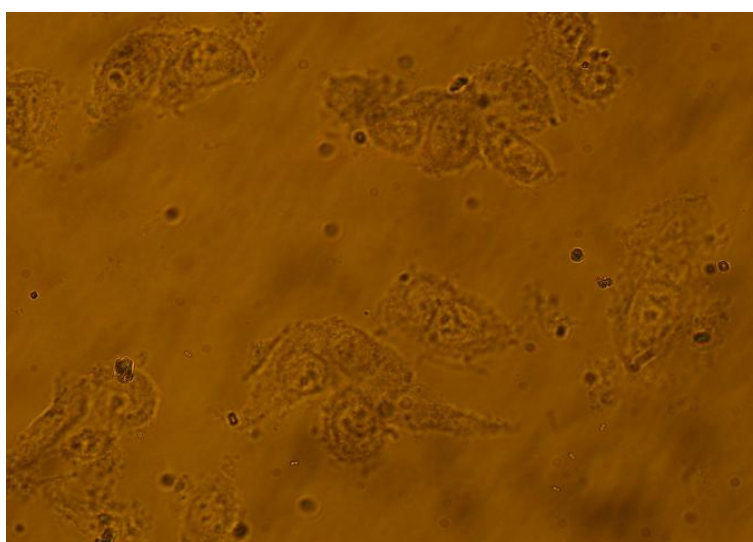
A



B



C



Obr. 20: Buňky CRC SW 480 inkubované 45 minut s 2 μ M FL-LL-8+50 μ M LL-8. A - obr. v UV světle – obarvená jádra DAPI; B – obr. v modrém světle – fluorescein (FL-LL-8); C – obr. ve viditelném světle.

5.3. Využití viditelné mikroskopie pro sledování vlivu AMP na buněčné linie

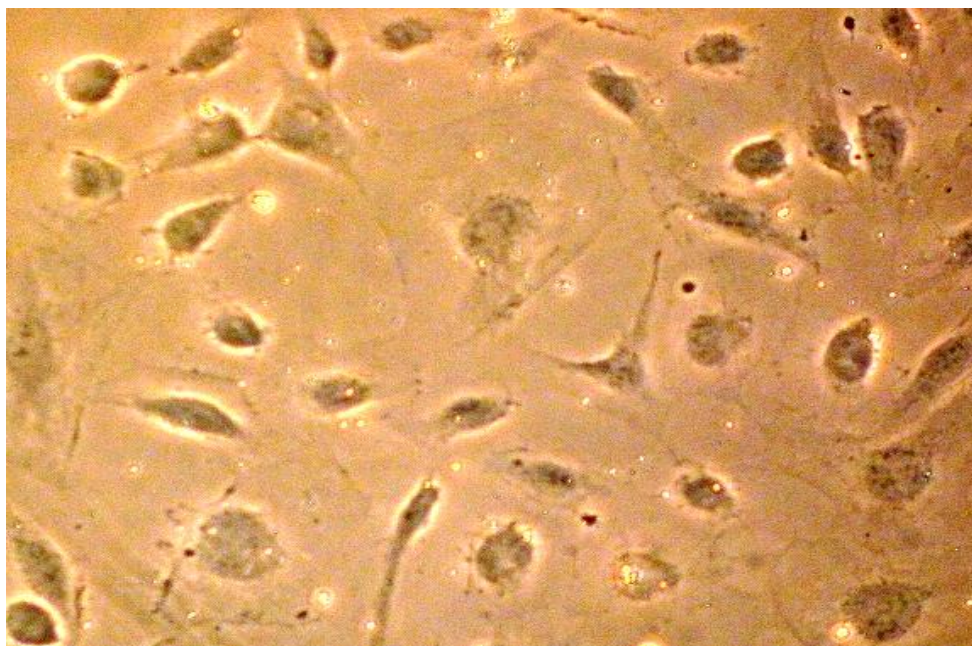
Pro další sledování ovlivnění buněk AMP byly dále buňky analyzovány ve viditelném invertovaném mikroskopu. Konkrétně se jednalo o dvě vybrané buněčné linie. Jednak normální buňky HUVEC a jednak rakovinné buňky CRC SW 480. V experimentech byly použity preparáty připravené již pro jejich sledování pomocí fluorescenční mikroskopie či čerstvě kultivované buňky.

V experimentu byl sledován vliv analogu LL-8 a HAL-1/18 na morfologickou strukturu buněk a tvorba barevného formazanu po přidání MTT v přítomnosti a nepřítomnosti peptidu.

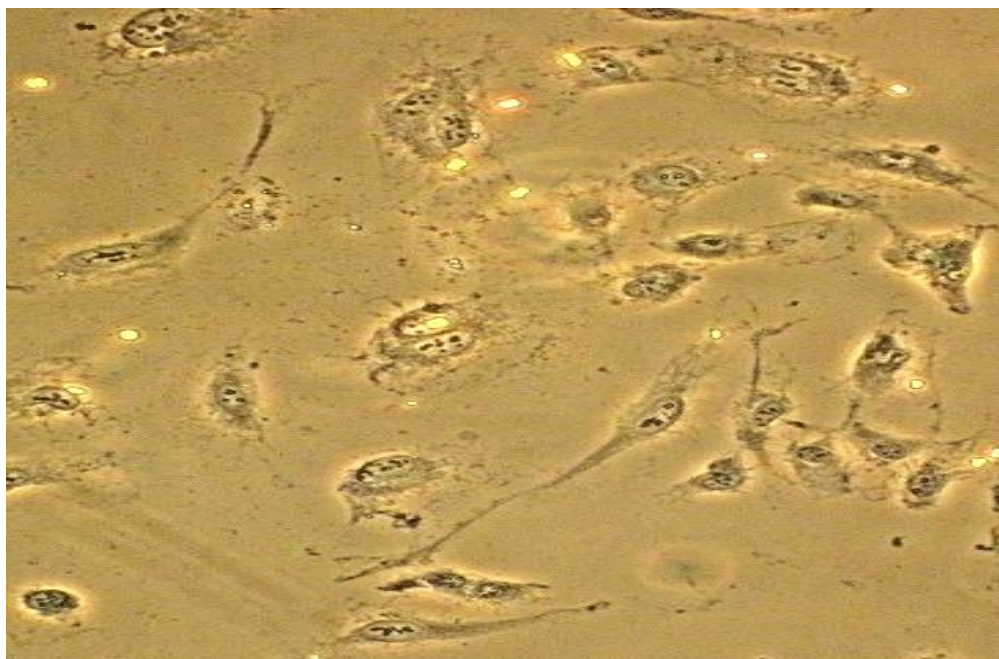
5.3.1. Studium účinku peptidu LL-8 v buňkách HUVEC

Buňky inkubované s FL-LL-8 samotným nebo s nezačleněným peptidem LL-8 byly fixovány formaldehydem a pořízeny jejich snímky (Obr. 21 a 22).

Na obrázcích 21 a 22, str. 60 a 61, jsou viditelné změny ve struktuře buněk způsobené peptidem LL-8. Buňky inkubované bez peptidu mají pevný tvar, buňka je striktně ohraničena membránou. Avšak v případě buněk HUVEC inkubovaných s peptidem LL-8 je viditelně membrána porušena, buňky si svůj původní tvar nezachovávají.



Obr. 21: Buňky HUVEC pěstované bez peptidu LL-8, kontrolní buňky (200krát zvětšeno)



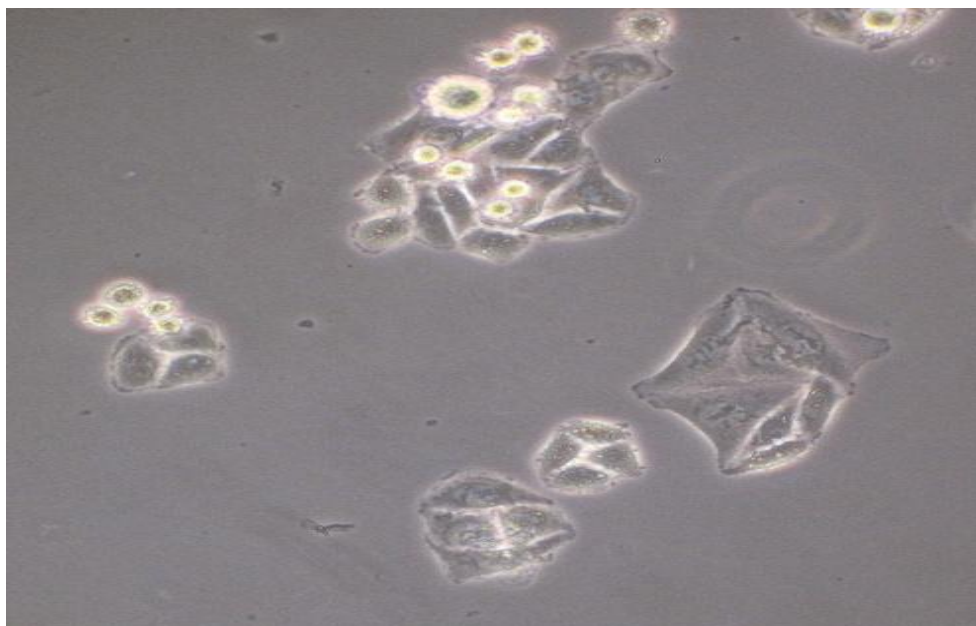
Obr. 22: Buňky HUVEC inkubované s peptidem LL-8 (200krát zvětšeno)

5.3.2. Studium účinku peptidu HAL-1/18 v buňkách CRC SW 480

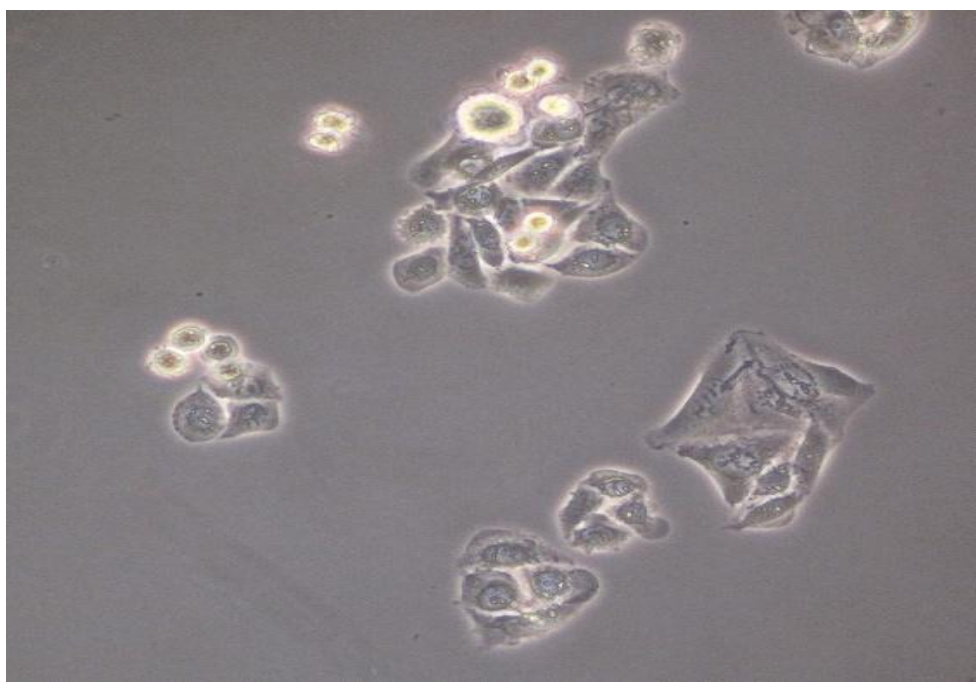
Buňky CRC SW 480 rostoucí 48 hodin za standardních podmínek byly fotografovány v čase 0. Poté k nim byl přidán peptid HAL-1/18 o koncentraci 15 μM a buňky byly dále sledovány a snímkovány v pravidelných intervalech po dobu 20 minut. Poté byl k buňkám přidán MTT a buňky byly opět snímkovány v pravidelných časových intervalech po dobu 60 minut, což nám ukázalo, zda jsou buňky živé či mrtvé. MTT byl přidán v takovém množství, které odpovídalo množství užívanému při stanovení toxicity AMP.

Podíváme-li se na obr. 23 a 24 na str. 62, nebyla pozorována žádná strukturální změna buněk po 20 minutovém působení peptidu, i když z výsledků jeho toxicity mohla být očekávána určitá modifikace v buněčné struktuře.

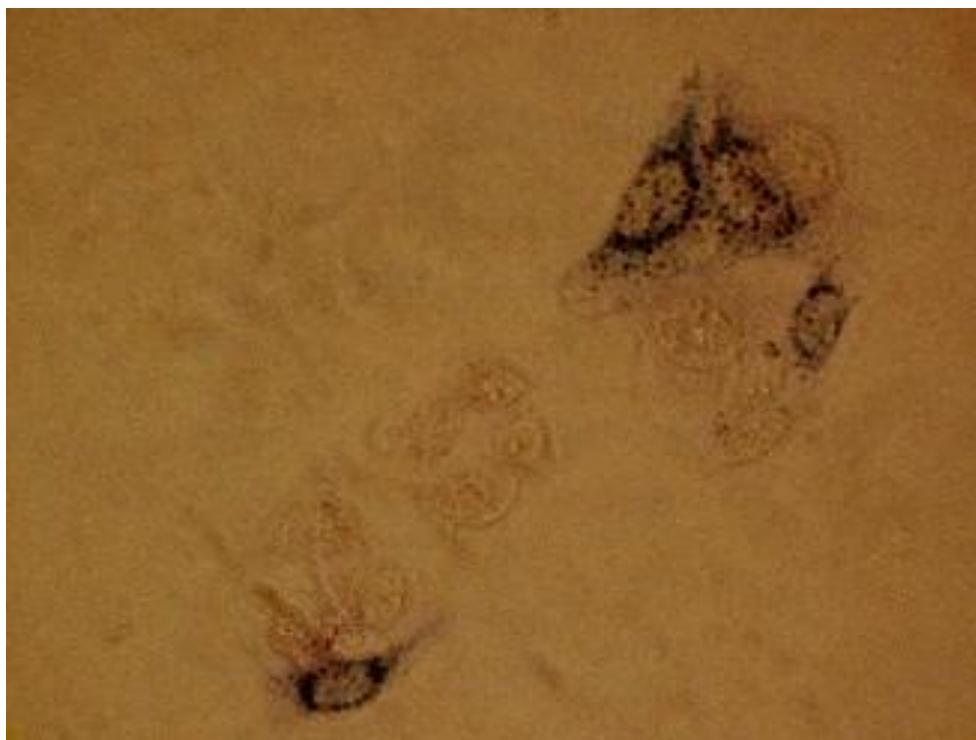
Na obr. 25 a 26, str.63 vidíme, že část buněk je živých (modré zbarvení) a část mrtvých (bezbarvé – nemetabolizující).



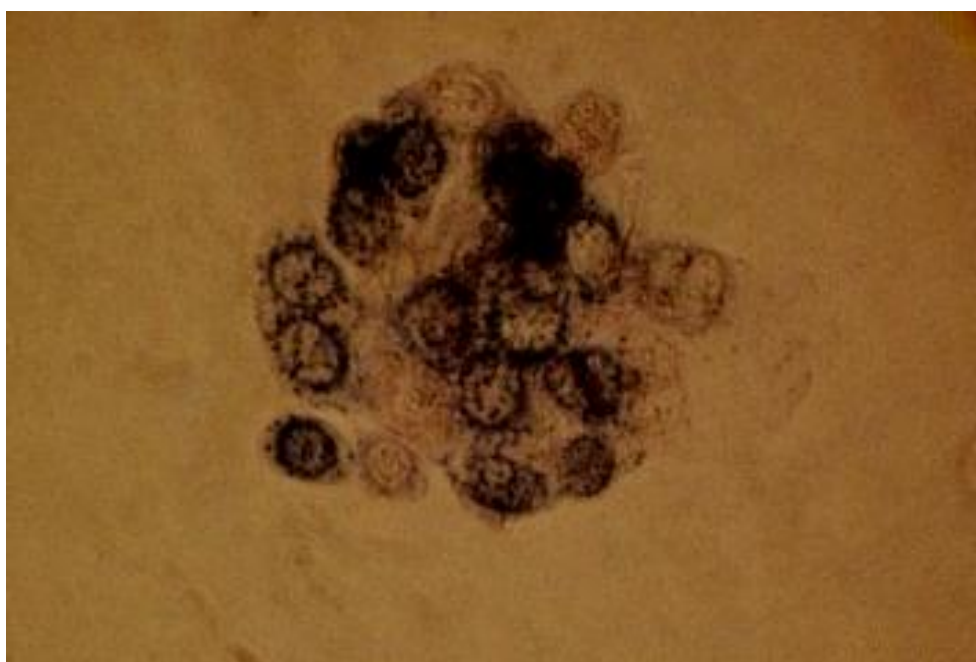
Obr. 23: Buňky CRC SW 480 bez peptidu HAL-1/18 (200krát zvětšeno)



Obr. 24: Buňky CRC SW 480 s HAL-1/18 po 20 min. (200krát zvětšeno)

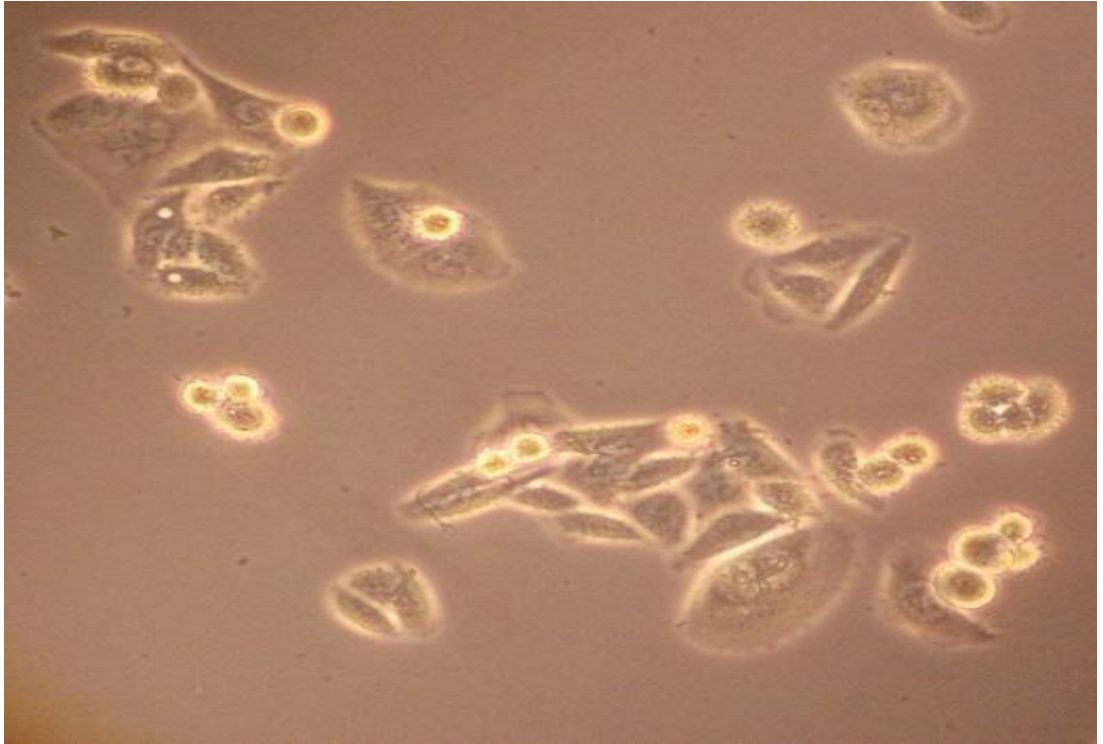


Obr. 25: Buňky CRC SW 480 buňky s HAL-1/18 po 60 min inkubaci s MTT (400krát zvětšeno)

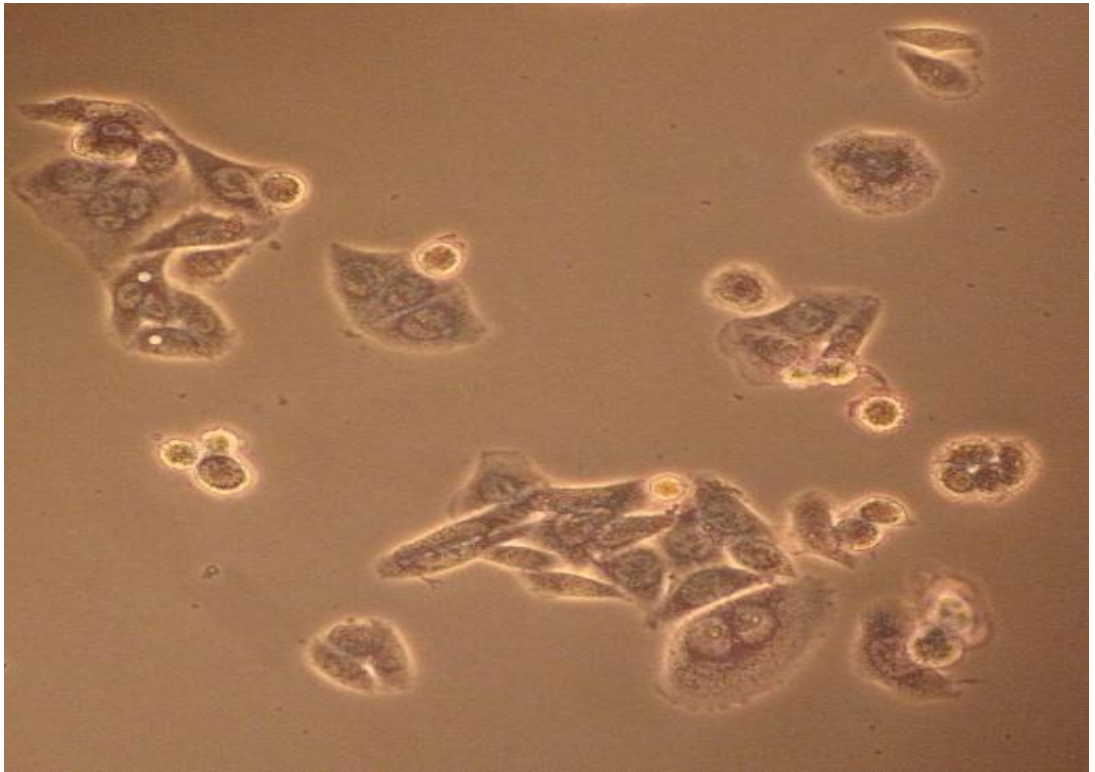


Obr. 26: Buňky CRC SW 480 s HAL-1/18 po 60 min, jiné místo stejného preparátu s MTT (400krát zvětšeno)

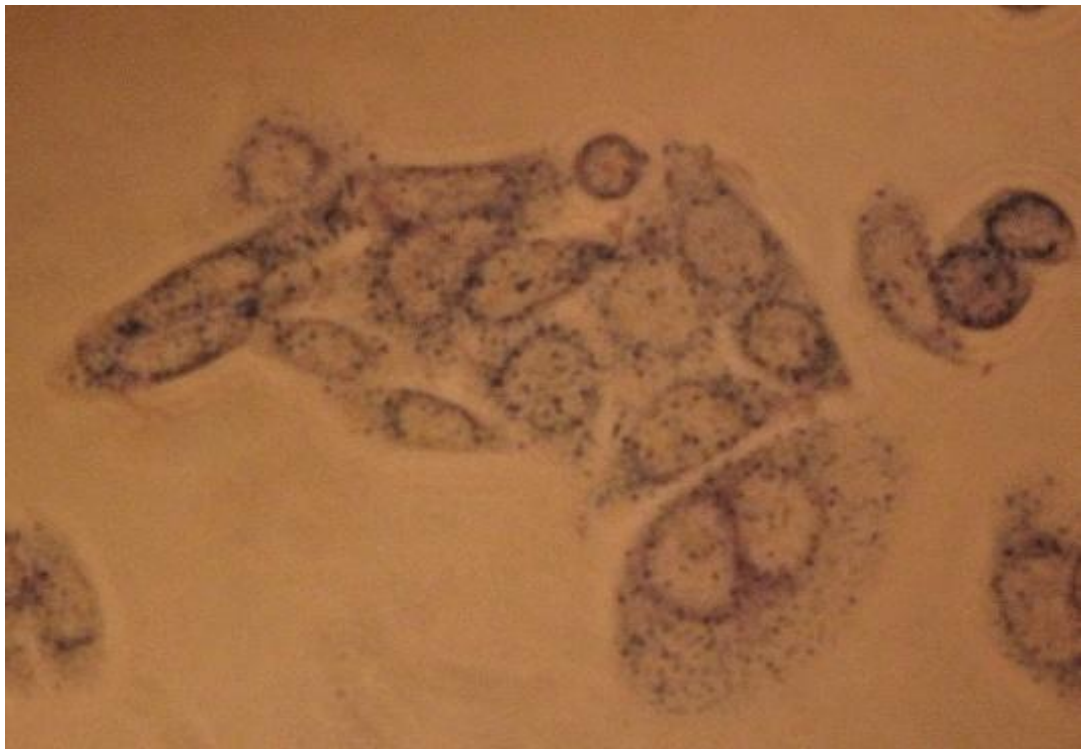
Paralelně byly snímkovány buňky bez přídavku peptidu a po 20 min s přidáním MTT. Výsledky jsou uvedeny na obr. 27 - 31. Na obrázcích je viditelné, že modrofialová látka formazan se tvoří ve všech buňkách (2.3.2.1.), a to již po 10 minutách, neboť všechny buňky jsou živé.



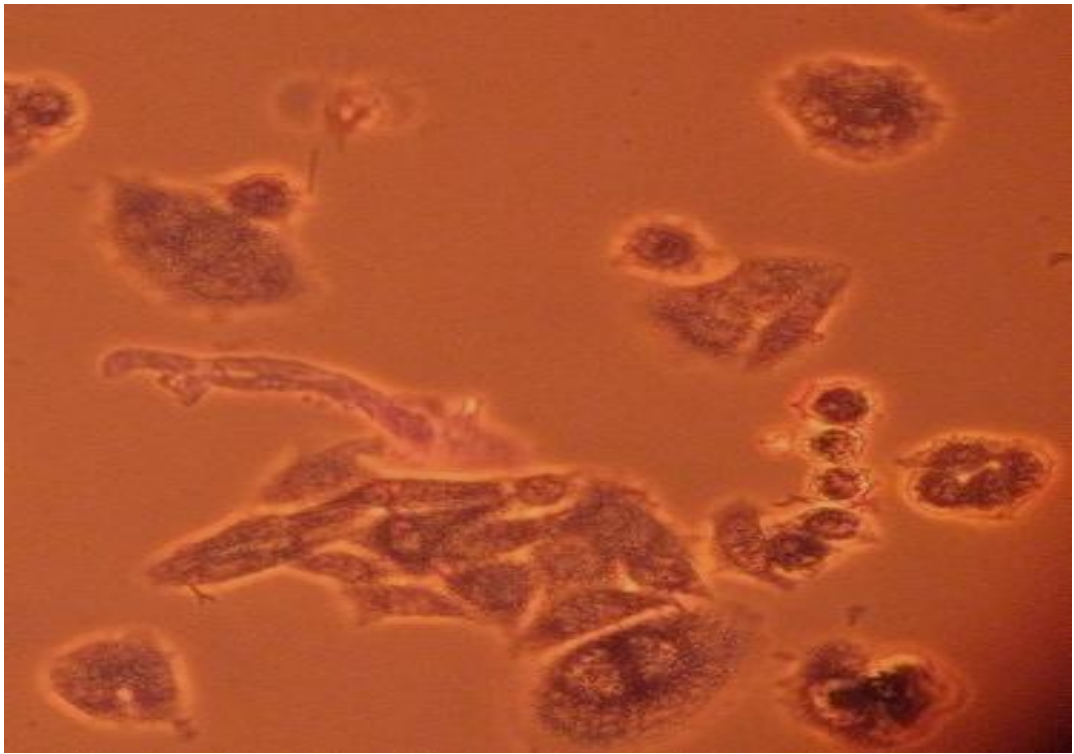
Obr. 27: Buňky CRC SW 480 s MTT po 1 min. (200krát zvětšeno)



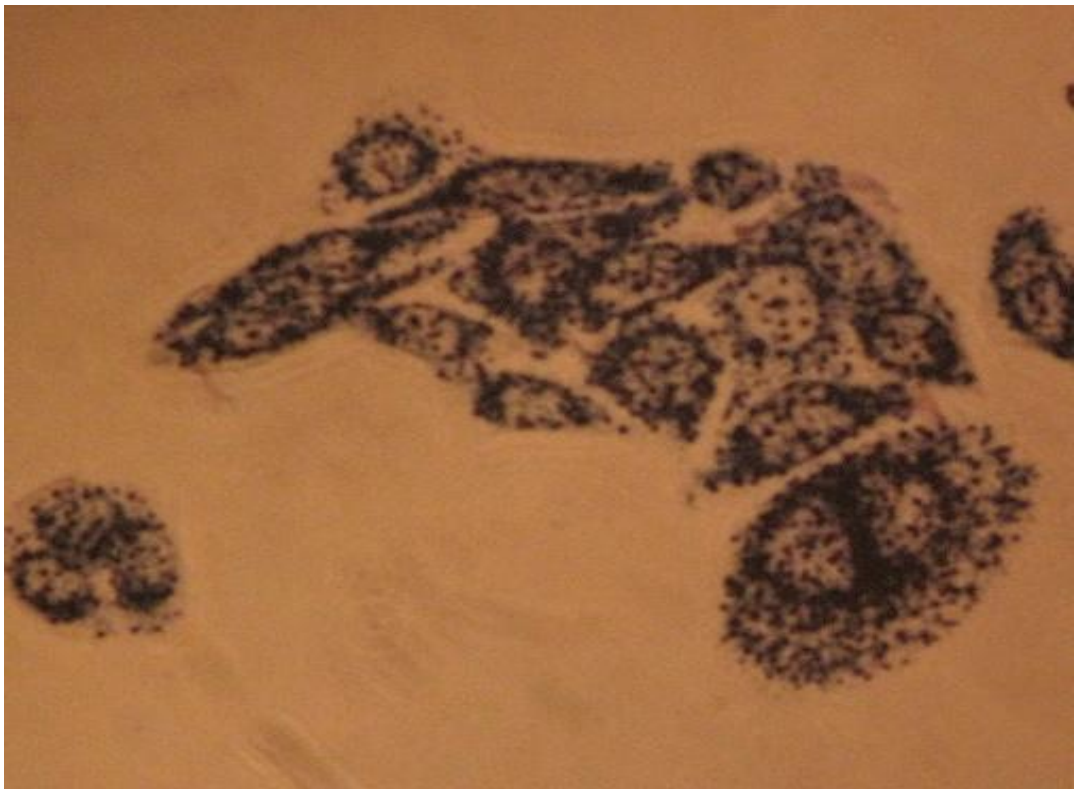
Obr. 28: Buňky CRC SW 480 s MTT po 10 min. (200krát zvětšeno)



Obr. 29: Buňky CRC SW 480 s MTT po 10 min. (400krát zvětšeno). Detail z obr. 28.



Obr. 30: Buňky CRC SW 480 s MTT po 120 min. (200krát zvětšeno)



Obr. 31: Buňky CRC SW 480 s MTT po 120 min. (400krát zvětšeno).Detail z obr. 30.

6. Diskuse

V této předkládané diplomové práci byly provedeny dva typy experimentů sledující toxické účinky antimikrobiálních peptidů Halictinů, které byly izolovány z jedu divoké včely *Halictus sexcinctus* a jejich analogy. Testována byla cytotoxicita těchto látek vůči čtyřem vybraným buněčným liniím a pomocí fluorescenční mikroskopie byl sledován vstup fluorescenčně značených peptidů do buněk.

6.1. Toxicita AMP vůči buněčným liniím

Pro lepší orientaci diskutovaných výsledků cytotoxicity Halictinů jsou na str. 68 a 69 uvedeny souhrnné tabulky (Tab. 16 a 17) prezentující výsledky toxických/netoxických analogů HAL-1 a HAL-2 pro všechny 4 testované buněčné linie.

Z Tabulek 16 a 17 jsou viditelné značné rozdíly v účincích vybraných analogů HAL na testované buněčné linie. Porovnáme-li všechny testované látky je patrné, že tyto peptidy jsou obecně nejméně aktivní vůči normálním buňkám HUVEC a buňkám IEC a rakovinným kolorektálním buňkám CRC SW 480. Nejvíce aktivní jsou vůči buňkám HeLa-S3.

Podíváme-li se dále na buňky HUVEC, nejvyšší toxicita byla pozorována v případě analogů HAL-1/6, HAL-1/9, HAL-1/15, HAL-1/18, HAL-1/23, HAL-2, HAL-2/22, HAL-2/10 a HAL-2/25. Všechna tato analoga vykazují dle výsledků popsaných v práci [15] vysokou antimikrobiální aktivitu. Naopak netoxická byla analoga HAL-1/1, HAL-1/2, HAL-1/17, HAL-1/19, HAL-1/20, HAL-1/21, HAL-1/27, HAL-1/28, HAL-1/29, HAL-2/1 a HAL-2/3. Z těchto analogů jsou zajímavé látky HAL-1/17, HAL-1/19, HAL-1/20, HAL-1/21 a HAL-2/, neboť nejsou toxická pro buňky HUVEC, ale mají silnou antimikrobiální aktivitu. V případě buněk IEC bylo testováno pouze malé množství vybraných analogů HAL-1 a HAL-2, neboť již od začátku nebyl zaznamenán téměř žádný toxický účinek AMP na tyto buňky. Z Tab. 16 a 17 je patrné, že téměř všechna analoga HAL jeví nízkou aktivitu vůči všem buňkám. Pouze analoga HAL-2/6 a HAL-2/10 vykazují mírný toxický účinek, neboť tyto látky dosahovaly hodnoty $IC_{50} = 25 \mu M$, tj. 50% buněk bylo usmrceno při 25 μM koncentraci. Z látek HAL-1/17, HAL-1/19, HAL-1/20, HAL-1/21 a HAL-2/1, které byly nejslibnějšími z hlediska toxicity vůči buňkám HUVEC, byly vůči buňkám IEC testován pouze analog HAL-2/1, který byl netoxický. Ostatní 4 látky budou testovány až budou znovu synteticky připraveny.

Tab. 16: Přehled hodnot IC₅₀ testovaných analogů HAL-1 vůči sledovaným buněčným liniím.

<u>IC₅₀ [μM] TESTOVANÝCH ANALOGŮ HALICTINŮ</u>				
	BUŇKY			
ANALOGA	HUVEC	IEC	HeLa-S3	CRC SW 480
HAL-1	35	36	10,5	≥39
HAL-1/1	>100	>>40	>40	>40
HAL-1/2	>100	>>40	>40	
HAL-1/3		>4>0	>40	
HAL-1/4		>>40	>40	
HAL-1/5	49	≥38	9	43,5
HAL-1/6	26	>>40	15	>>40
HAL-1/7		>>40		
HAL-1/8		>>40	>40	
HAL-1/9	10	>>40	9	≥52
HAL-1/10	63	>>40	13	≥62
HAL-1/11		>>40	>40	
HAL-1/12	>100	>>40	12	>>40
HAL-1/15	26		14	≥34
HAL-1/17	>100		35	>>40
HAL-1/18	20		2,5	18
HAL-1/19	>100		>40	>>40
HAL-1/20	>100		22	>>40
HAL-1/21	>100		30	>>40
HAL-1/22	42		14,5	≥42
HAL-1/23	15		10	
HAL-1/24			>40	
HAL-1/25			>40	
HAL-1/27	>100			
HAL-1/28	>100		>40	
HAL-1/29	>100		>40	

Tab. 17: Přehled hodnot IC₅₀ testovaných analogů HAL-2 vůči sledovaným buněčným liniím.

<u>IC 50 [μM] TESTOVANÝCH ANALOGŮ HALICTINŮ</u>				
	BUŇKY			
ANALOGA	HUVEC	IEC	HeLa-S3	CRC SW 480
HAL-2	22,5	>40	11,5	35
HAL-2/1	>100	>>40	13,5	>>40
HAL-2/2	40	36	6	35
HAL-2/3	>100	>>40		
HAL-2/4	>100		>40	≥32,5
HAL-2/6	55	25	23	>40
HAL-2/7	>60		>40	>40
HAL-2/8	52	>40	15	>40
HAL-2/10	23	25	12	34
HAL-2/11	42		14,5	40
HAL-2/13	>60		12,5	≥61
HAL-2/18	56	>40	14	>40
HAL-2/19	40		16	>40
HAL-2/20	73	>40	30	>40
HAL-2/22	15		12	>>40
HAL-2/23				>>40
HAL-2/24	60		34	>40
HAL-2/25	18		17	39

Vůči buňkám HeLa-S3 byla pozorována vysoká cytotoxicita téměř všech testovaných analogů HAL. Nejvyšší toxicitu vykazovala analoga HAL- 1/5, HAL-1/9, HAL-1/18 a HAL-2/2.

V případě buněk CRC SW 480 nebyl pozorován výrazný toxický účinek analogů HAL. Mírnou toxicitu vykazovala pouze analoga HAL-2/4 a HAL-2/10. Nejvyšší aktivita vůči těmto buňkám byla nalezena u analogu HAL-1/18, neboť již při 18 μ M koncentraci bylo usmrceno 50% buněk.

V porovnání se zjištěnými hodnotami antibakteriálních aktivit ze studie Monincové, L., et al. ^[15], lze konstatovat, že analoga, která vykazují nejvyšší toxicitu vůči buňkám HeLa-S3 mají i vysoký antibakteriální účinek. Jedná se především o analoga HAL- 1/5 HAL-1/9 HAL-1/18 a HAL-2/2. U ostatních analogů, která vykazují nižší, ale přesto vysokou toxicitu oproti výše uvedeným buňkám, byl zjištěn rovněž vysoký antibakteriální účinek. Lze tedy říci, že analoga kationických antimikrobiálních peptidů, která jsou vysoce účinná proti bakteriím, vykazují rovněž značně vysokou toxicitu vůči tomuto typu rakovinných buněk.

Nízká antibakteriální aktivita (MIC >100 μ M) byla nalezena u analogů HAL-1/1 HAL-1/2 HAL-1/3 HAL-1/8 HAL-1/11 HAL-1/25 HAL-1/27 HAL-1/28 HAL-2/7 a HAL-2/23. U těchto látek byla také, pro porovnání, studována toxicita specifická pro každou buněčnou linii.

V případě buněk HUVEC byla z výše uvedených látek testována analoga HAL-1/1, HAL-1/2, HAL-1/27, HAL-1/28 a HAL-2/7. Jak je uvedeno v Tab. 16 a 17 tyto látky vykazují nízký cytotoxický účinek vůči těmto buňkám. Podíváme-li se na buňky IEC, zde byla testována analoga HAL-1/1, HAL-1/2, HAL-1/3, HAL-1/8 a HAL-1/11. Opět u všech analogů byla pozorována nízká toxicita vůči těmto buňkám.

V případě buněk HeLa-S3 byla testována analoga HAL-1/1, HAL-1/2, HAL-1/3, HAL-1/8, HAL-1/11, HAL-1/25, HAL-2/7 a u buněk CRC SW 480 analoga HAL-1/1 a HAL-2/23. U obou buněčných linií byl prokázán nízký toxický účinek studovaných látek.

Závěrem lze říci, že nejvýhodnějším AMP je analog HAL-2/1, který je toxický vůči buňkám HeLa-S3, netoxický vůči normálním buňkám a má vysokou antimikrobiální aktivitu. Tento analog má zvýšenou kationicitu oproti přírodnímu peptidu HAL-2 – v poloze 4 má místo methioninu lysin. Analog HAL-1/18 má podobné vlastnosti, ale jeho

toxicita vůči normálním buňkám je již měřitelná. I tento analog vykazuje zvýšenou kationicitu, proti přírodnímu peptidu HAL-1, má v poloze 8 místo glycinu lysin.

6.2. Sledování vstupu a distribuce AMP pomocí fluorescenční mikroskopie

Z výsledků studie využívající fluorescenční mikroskopie lze konstatovat, že optimální koncentrace fluorescenčně značených peptidů FL-LL-8 a Fluo-1 byla 2 μM , tj. koncentrace nižší než hodnota IC_{50} , která není pro buňky toxická. Nižší či vyšší koncentrace látek vedly k nepřesným výsledkům.

Z výsledků experimentů bylo vyzorováno, že vstup fluorescenčně značeného peptidu do buňky závisel na interakci s neznačeným peptidem. Při inkubaci buněk se samotným fluorescenčně značeným peptidem musel být pro fotografování použit vyšší expoziční čas, neboť buňky fluoreskovaly pouze slabě. Z toho jsme vyvodili, že peptid pravděpodobně do buňky vstupoval pouze málo. Byla-li použita směs značeného a neznačeného peptidu, vlivem neznačeného peptidu docházelo k intenzivnějšímu vstupu fluorescenčně značeného peptidu do buněk a expozice pro pořízení snímku mohla být výrazně nižší.

V naší studii bylo dále potvrzeno, že vysoce toxickým vůči testovaným buněčným liniím, je fluorescenčně neznačený peptid LL-8. Účinkem peptidu LL-8 byla pravděpodobně poškozena buněčná membrána, tím peptid mohl pronikat do buňky a způsobovat tak destruktivní změny v morfologii buňky. Nejvyšší míra fluorescence byla pozorována v cytoplazmě, v okolí jaderné membrány a v útvech místně odpovídajícím mitochondriím.

K silnému průniku fluorescenčně značených látek do buněk docházelo pouze v případě, byl-li použit k inkubaci neznačený peptid v koncentraci odpovídající hodnotě IC_{50} nebo vyšší.

Zajímavý výsledek byl získán pomocí viditelné mikroskopie. Působením LL-8 na buňky HUVEC dochází k viditelnému porušení buněčné struktury. Naopak působením HAL-1/18 vůči buňkám CRC SW 480 v časovém rozmezí 1-20 minut při použité koncentraci peptidu odpovídající hodnotě IC_{50} tj. 15 μM , kdy jsme předpokládali, že bude způsobovat určité modifikace ve struktuře buněk, nebyla pozorována žádná strukturální změna buněk.

Na druhé straně po přidání MTT k těmto buňkám se přibližně polovina buněk zabarvila modře a polovina zůstala nezabarvená. Z toho usuzujeme, že buňky jsou mrtvé dříve, než na nich pozorujeme morfologické změny.

V budoucnu bude testována naše hypotéza, že analoga peptidů inkubovaná s vybranou buněčnou linií vstupují, kromě výše uvedených míst, pravděpodobně i do mitochondrií. V mitochondriích indukují tzv. „nabobtnávání“, které vede k uvolnění cytochromu c. Uvolněný cytochrom c indukuje aktivaci kaspasy 9 a následně přeměnu pro-kaspasy 3 na kaspasu 3. Ve finále dojde k apoptóze a následné destrukci celé buňky. K tomuto účelu poslouží savčí expresní vektor charakteristický pro fluorescenční značení mitochondrií – Mito-DsRed2. Tento protein se pomocí „fúze“ označí červeným fluorescenčním proteinem DsRed2 a do mitochondrií savčích buněk bude zaveden standardní transfekční metodou. Jejich přítomnost v mitochondriích bude detekována pomocí fluorescenční mikroskopie. Podaří-li se tento problém vyřešit, bude potvrzena další možnost molekulárního působení AMP na rakovinné buňky, který dodnes není ještě zcela jasný.

7. Závěr

Závěrem můžeme konstatovat, že cíle diplomové práce byly splněny. Byla vybrána analoga AMP Halictinů, která jsou cytotoxická na buňky karcinomu děložního čípku (HeLa-S3) a zároveň netoxická pro normální buňky, v našem případě reprezentované buňkami HUVEC a IEC. Jde především o analog HAL-1/18, který má zároveň silné antimikrobiální účinky vůči gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím. Totéž bohužel nelze říci o buňkách kolorektálního karcinomu (CR SW 480), které jsou vůči testovaným peptidům stejně citlivé resp. necitlivé jako normální buňky. V každém případě je však nadějně, že lze oddělit toxický účinek na normální a rakovinné buňky.

Dále bylo pomocí fluorescenční mikroskopie a fluorescenčně značených peptidů zjištěno, že peptidy pronikají do buňky až po dosažení cytotoxické koncentrace rovnající se hodnotě IC_{50} . Jejich nejvyšší koncentrace byla pozorována v cytoplazmě, v okolí jaderné membrány a v útvarech polohou odpovídající mitochondriím.

Pro budoucí výzkum nově izolovaných peptidů z jedového váčku hmyzu je nezbytně nutné co nejpřesněji zjistit na jaké další orgány se peptidy v buňkách váží, případně jaké biochemické děje v organelách způsobují. Dále co nejpřesněji prozkoumat oba předpoklady molekulárních mechanismů účinku nových peptidů vůči rakovinným buňkám tak, aby byl ve finále prokázán silný toxický účinek pouze na tyto buňky, nikoliv na normální zdravé buňky eukaryotního organismu. Tyto problémy budou předmětem další experimentální práce.

8. Seznam literatury:

1. Mookherjee, N., Hancock, R.E.W.: Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections, *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 922-933 (2007)
2. Marková, J.: Antimikrobiální peptidy, XXIV. Sjezd SSAKI a ČSAKI Trnava, 332-335 (2007)
3. Yeaman, M.R., Yount, N.Y.: Mechanism of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol. Rev.* 55, 27-55 (2003)
4. Brown, K.L., Hancock, R.: Cationic host defence (antimicrobial) peptide, *Curr. Opin. Immunol* 63, 1294-1313 (2006)
5. Neubauerová, T., Macková, M., Macek, T., Koutek, B.: Kationické antimikrobiální peptidy, *Chem. Listy* 103, 460-468 (2009)
6. Papo, N., Shai, Y.: Host defense peptides as new weapons in cancer treatment, *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 784-790 (2005)
7. [http:// botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/MB_vnejsi_vlivy_t.pdf](http://botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/MB_vnejsi_vlivy_t.pdf) (staženo dne 10. 4. 2010)
8. Čerovský, V., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Bednářová, L., Borovničková, L., Slaninová, J., Fučík, V.: Melectin: A novel antimicrobial peptide from the venom of the cleptoparasitic bee *Melecta albifrons*, *ChemBioChem* 9, 1-8 (2008)
9. Mather, J.P., Roberts, P. E.: Introduction to cell and tissue culture: theory and technique, Plenum Press, New York (1998)
10. Hancock, R.E., Diamond, G.: The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends Microbiol.* 8, 402-410 (2000)
11. Papo, N., Shahar, M., Eisenbach, L., Shai, Y.: A novel lytic peptide composed of D,L amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice, *J. Biol. Chem.* 278, 21018-21023 (2003)
12. Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A.: Amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers* 55, 4-30 (2000)

13. Leuschner, C., Hansel, W.: Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments, *Curr. Pharm. Des.* 10, 2299-2310 (2004)
14. Čerovský V., Budešínský, M., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Slaninová, J., Borovničková, L., Fučík, V., Bednárová, L., Votruba, I., Straka, J.: Lasioglossins: Three novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Lasioglossum laticeps* (*Hymenoptera:Halictidae*), *ChemBioChem* 10, 2089-2099 (2009)
15. Monincová, L., Buděšínský, M., Slaninová, J., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Fučík, V., Borovničková, L., Bednárová, L., Strak, J., Čerovský, V.: Novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Halictus sexcinctus* (*Hymenoptera:Halictidae*) and their analogs, (2010)
16. [http://domenicus.malleotus.free.fr/a/img/halictus_sexcinctus_002a_\(femelle\).jpg](http://domenicus.malleotus.free.fr/a/img/halictus_sexcinctus_002a_(femelle).jpg) (staženo 12.2.2010)
17. Wang, K.R., Zhang, B.Z, Zhang, W., Yan, J.X., Li, J., Wang, R.: Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide plybia-MPI, *Peptides* 29, 963-968 (2008)
18. www.generi-biotech.com/xtt-test-cytotoxicity/ (staženo 17.2.2010)
19. <http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf> (staženo 25.2.2010)
20. ulb.upol.cz/klinicka/pdtII.pdf (staženo 25.2.2010)
21. www.millipore.com (staženo 28.3.2010)
22. Černý, J.: Fluorescenční mikroskopie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha (2008)
23. www.newworldencyclopedia.org/entry/Fluorescein (staženo 18.3.2010)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka

