

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

VLIV SLOUČENIN SELENU NA PROLIFERACI BUNĚČNÝCH
LINIÍ IZOLOVANÝCH Z KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU -
SROVNÁNÍ VHODNOSTI POUŽITÝCH METOD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:

Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Školitel specialista:

RNDr. Ladislava Schröterová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2009

ADÉLA VORÁČOVÁ

Poděkování:

Děkuji své školitelce RNDr. Ladislavě Schröterové, Ph.D. za odborné vedení v průběhu této práce, podnětné připomínky a rady. Děkuji také Doc. PharmDr. Tomášovi Šimůnkovi, Ph.D. Dále děkuji všem pracovníkům Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za ochotu a pomoc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Abstract

Selenium has been shown to have anti-cancer properties in both *in vivo* and *in vitro* models including colorectal cancer cells. The effect is dependent on the chemical nature and concentration of the selenium compound used in the study. This work compared the anti-proliferative effects of three selenium compounds, sodium selenite, seleno-L-methionine (SeMet) and Se-(Methyl)selenocysteine (SeMCys) on the colorectal cancer cell lines HT-29, SW480 and SW620, measured by WST, XTT, MTT, Brilliant blue (BB) and Neutral red (NR) assays. Cells were exposed to the selected selenium compounds in the concentration range of 0 – 256 μM during 48 hours. In all model cell lines, WST and XTT failed to detect cytotoxic effect, with the exception of the highest concentration of selenium compounds tested. Conversely, the metabolic activity of selenium treated cells measured by WST and XTT significantly increased in comparison to untreated controls. MTT, Neutral red and Brilliant blue assays were more sensitive and yielded mutually comparable results, with significant decrease of measured parameters in a concentration-dependent manner. The highest cytotoxic effect was associated with Se-(Methyl)selenocysteine, the lowest with seleno-L-methionine.

Abstrakt

Bylo prokázáno, že selen má protinádorové vlastnosti v *in vivo* i *in vitro* modelech, včetně buněk kolorektálního karcinomu. Účinek je závislý na jeho chemické formě a koncentraci. Srovnávali jsme antiproliferativní efekt tří sloučenin selenu; seleničitanu sodného, seleno-L-methioninu (SeMet) a Se-(Methyl)selenocysteinu (SeMCys) na tři linie buněk odvozených z kolorektálního karcinomu - HT29, SW480 a SW620. K měření byly použity metody WST, XTT, MTT, Brilliant blue (BB) a neutrální červeň (NR). Buňky byly ovlivněny jednotlivými sloučeninami selenu v koncentracích od 0-256 μM po dobu 48 hodin. Ve všech třech liniích metodami WST a XTT nebylo možné prokázat cytotoxický účinek, s výjimkou nejvyšších koncentrací sloučenin selenu, dokonce metabolická aktivita ovlivněných buněk významně vzrostla oproti kontrole. MTT, neutrální červeň a Brilliant blue byly citlivější a poskytly vzájemně podobné výsledky s významným poklesem měřených parametrů v závislosti na koncentraci. Nejvyšší cytotoxický účinek byl spojen se Se-(Methyl)selenocysteinem, nejnižší se seleno-L-methioninem.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Selen.....	10
2.1.1	Fyzikální a chemické vlastnosti	10
2.1.2	Význam ve výživě	10
2.1.3	Metabolismus selenu.....	12
2.1.4	Protinádorové působení selenu	14
2.1.4.1	Vliv na buněčný růst, cyklus a apoptózu	15
2.1.4.2	Redox aktivity selenu.....	16
2.1.4.3	Selen a poškození DNA.....	17
2.2	Metody stanovení buněčné proliferace a cytotoxicity	18
2.2.1	Testy metabolické aktivity	18
2.2.1.1	WST	18
2.2.1.2	XTT.....	19
2.2.1.3	MTT	20
2.2.2	Stanovení obsahu proteinu.....	21
2.2.2.1	Brilliant blue - BB.....	21
2.2.3	Test celistvosti buněčné membrány	22
2.2.3.1	Neutrální červeně - NR.....	22
3	Cíle	23
4	Experimentální část	24
4.1	Biologický materiál.....	25
4.2	Přístroje a pomůcky	26
4.3	Chemikálie	27
4.4	Pasážování buněk.....	28
4.4.1	Postup.....	28
4.4.2	Počítání buněk.....	28
4.4.3	Příprava reagensů	29
4.5	Ovlivnění buněk.....	30
4.6	Metody	32
4.6.1	WST	32

4.6.2	XTT.....	32
4.6.3	MTT.....	33
4.6.4	NR.....	33
4.6.5	BB.....	34
4.7	Statistika.....	35
5	Výsledky.....	36
5.1	Seleničitan sodný.....	37
5.1.1	HT29.....	37
5.1.2	SW480.....	38
5.1.3	SW620.....	39
5.2	Seleno-L-methionin.....	40
5.2.1	HT29.....	40
5.2.2	SW480.....	41
5.2.3	SW620.....	42
5.3	Se-(Methyl)selenocystein.....	43
5.3.1	HT29.....	43
5.3.2	SW480.....	44
5.3.3	SW620.....	45
6	Diskuze.....	46
7	Závěr.....	48
8	Seznamy.....	49
8.1	Seznam zkratek.....	49
8.2	Seznam použité literatury.....	51

1 Úvod

Rakovina tlustého střeva a konečníku je jednou z nejčastějších příčin úmrtí způsobených nádorovými onemocněními. Je známo, že stravovací faktory mohou významně přispívat k riziku kolorektálního karcinomu. Jedním z prvků s možnými protinádorovými vlastnostmi je selen. Několik epidemiologických a klinických studií ukázalo schopnost sloučenin selenu snižovat incidenci různých typů nádorů včetně kolorektálního karcinomu.

Selen je stopový prvek nezbytný ke správné funkci buněčných bílkovin. Nachází se v přírodě v různých chemických formách. V lidském těle je součástí selenoenzymů, které jsou životně důležité. Podílí se na regulaci buněčného cyklu a apoptózy, je součástí antioxidantní obrany buňky. Účinky selenu jsou závislé na jeho chemické formě a koncentraci. Nedostatek i nadbytek selenu mají negativní dopad na organismus.

Pro vyhodnocení buněčné toxicity je k dispozici řada metod. Tyto metody mohou podávat rozdílné výsledky při použití stejných buněčných linií a stejných koncentrací. Proto je důležité vhodně zvolit více testů, aby nedocházelo k falešně pozitivním či falešně negativním výsledkům.

2 Teoretická část

2.1 Selen

2.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

Selen je nekovový prvek ze skupiny chalkogenů (VI. A skupina PSP) s atomovým číslem 34. Byl objeven roku 1817 švédským chemikem J. J. Berzeliiem. Svými chemickými vlastnostmi se podobá síře. Existuje v různých oxidačních stavech (-II, IV, VI) (www 1).

Je to poměrně vzácný prvek. V přírodě se nejčastěji vyskytuje ve formě selenidů, které jako stopové příměsi doprovází sulfidy a polysulfidy kovů. Přírodní selen tvoří směs 6 izotopů. Nejrozšířenější je nuklid ^{80}Se . Vyskytuje se nejméně v šesti alotropických modifikacích, ve třech červených formách, v krystalické šedé a jako černý sklovitý selen. (Krätsmár-Šmogrovič, 1994)

Je prakticky nerozpustný ve vodě, poměrně dobře se rozpouští v sirouhlíku. Elementární selen je za normálních podmínek stálý, poměrně snadno se slučuje s kyslíkem a halogeny. Oxidy selenu vytváří reakcí s vodou příslušné kyseliny.

Mezi nejdůležitější anorganické sloučeniny selenu patří seleničitan sodný (Na_2SeO_3) a selenan sodný (Na_2SeO_4). Selenosulfidy vznikají reakcí kyseliny seleničité se sulfanem a jsou pro své prooxidační vlastnosti považovány za kancerogeny.

Organické sloučeniny selenu jsou zásadní v biologických procesech. Selen má ve většině organických sloučenin oxidační číslo -II. Nejčastější formy jsou selenomethionin, selenocystein a Se-(Methyl)selenocystein.

2.1.2 Význam ve výživě

Selen je pro savce esenciální stopový prvek. Je důležitý pro mnoho buněčných pochodů. Do potravního řetězce vstupuje přes rostliny. Množství selenu ve stravě je závislé na jeho množství v půdě. Velmi chudé půdy obsahují méně než 0,05 ppm, bohaté půdy více než 5 ppm.

Rostliny přijímají selen z půdy v anorganické formě a začleňují ho do svých proteinů. V rostlinách bylo identifikováno skoro 20 chemických forem selenu.

Ve zvýšené míře obsahují selen česnek, cibule, chřest a brukev. Z živočišné stravy jsou nejbohatší na selen ryby a vejce.

Organické formy se vstřebávají lépe než anorganické. Z potravy se absorbuje zhruba 80 % selenu. Je přijímán hlavně ve formě seleno-L-methioninu, v menším množství jako selenocystein a Se-(Methyl)selenocystein. Nejdostupnější pro člověka je seleno-L-methionin, který se vstřebává v tenkém střevě. V potravinových doplňcích se používá seleno-L-methionin (ve formě obohacených kvasinek) a seleničitan sodný (Shen et al., 2001).

Doporučený denní příjem je 55 µg/den pro zdravé dospělé (El-Bayoumy, 2001, Whanger, 2004). Maximální bezpečná denní dávka byla stanovena na 400 µg/den. Příznaky toxicity byly odhadnuty na základě rozhovorů s pacienty ohledně změn vlasů, nehtů a dýchání. Malé nežádoucí účinky se objevují při dávce 1540-1600 µg/den. Selenóza se objevuje při příjmu 3200-5000 µg/den (Reid et al., 2004). Dávka okolo 40 µg/den byla navržena jako minimum. Příjem pod 11 µg/den způsobuje chorobu z nedostatku selenu (Whanger, 2004).

Choroby z nedostatku selenu byly poprvé popsány v některých oblastech Číny. Jsou to Keshanská nemoc (kardiomyopatie) a Kashin-Beckova choroba (artritida) (Rayman, 2000). Některé studie naznačují, že nedostatek selenu je doprovázen oslabením imunitní odpovědi. Dále je spojován s výskytem, virulencí a progresí virového onemocnění (např. přeměna HIV na AIDS) (Spallholz et al., 1990). Nízká hladina selenu v séru zvyšuje u žen riziko potratu (Barrington et al., 1996) a u mužů je spojena s poklesem pohyblivosti spermií (Scott et al., 1998). U starších lidí souvisí nízká hladina selenu se senilitou, Alzheimerovou chorobou a depresí (Hawkes and Hornbostel, 1996).

Dlouhodobý nadbytečný příjem selenu vede ke stavu zvanému selenóza. Projevuje se jako vypadávání vlasů, lámavost nehtů, gastrointestinální obtíže, kožní vyrážka, česnekový dech, poruchy nervového systému a endokrinních funkcí, poruchy imunity. Jednorázové předávkování má za následek zvracení, průjem, parestázie, slabost, zmatenost.

Selen je v organismu součástí selenoenzymů (Allan et al., 1999):

- glutathion peroxidasy (GPx) (redukují hydrogenperoxydy a lipidové a fosfolipidové peroxydy, recyklují glutathion, 4 izoformy)

- selenoprotein P (plazmatický protein, hlavní plazmatický přenašeč selenu, působí jako extracelulární antioxidant zejména ve vaskulárním endotelu, kde odbourává peroxonitril)
- jodothyronin deiodinasy (účastní se syntézy a metabolické regulace hormonů štítné žlázy, 3 izoformy)
- thioredoxin reductasa (redukuje intracelulární substráty, např. nukleotidy pro DNA syntézu, ovlivňuje genovou expresi)
- selenofosfát syntetasa (nutná pro syntézu selenofosfátu, ze kterého vzniká selenocystein v selenoproteinech, 2 izoformy)

2.1.3 Metabolismus selenu

Selen se v potravě nachází v anorganické (seleničitan sodný, selenan sodný) i organické formě (selenomethionin, seleno-L-cystein a Se-(Methyl)selenocystein) (Schrauzer, 2001). V anorganické formě se vyskytuje méně často a ve velmi malých množstvích. V organické formě převažuje seleno-L-methionin. Selen v organických sloučeninách je přítomen v redukovaném stavu (selenid: Se^{2-}). V anorganických sloučeninách se nachází v oxidovaném stavu (seleničitan: Se^{4+} , selenan: Se^{6+}). Anorganické formy selenu jsou při absorpci redukovány glutathionem a NADPH na selenovodík (H_2Se). Organické formy uvolňují selen ve stavu Se^{2-} jako výsledek katabolismu.

H_2Se je součástí redukčního metabolismu i methylační cesty selenu. Slouží jako prekurzor pro syntézu selenoproteinů jako jsou glutathion peroxidasa, thioredoxin reductasa, iodothyronin deiodinasa, a selenoprotein P, nebo podstupuje postupnou metylaci. Reakcí thiol-S-methyltransferasy vznikají mono-, di- a tri- methylované formy selenu: methylselenol, dimethylselenid a trimethylselenoniový ion (Ip et al., 1991, Meuillet et al., 2004).

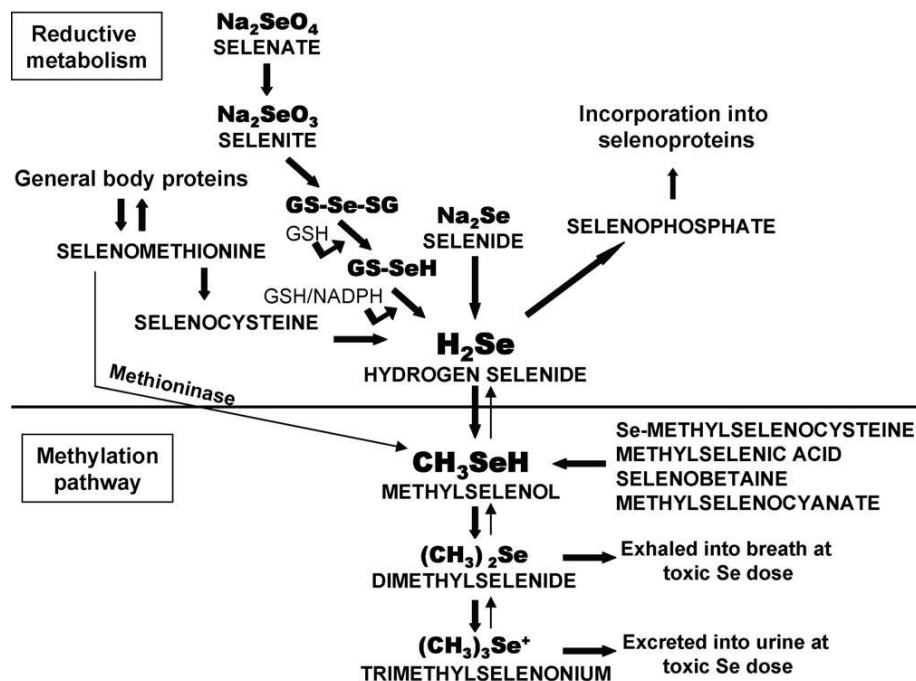
Selenomethionin se účastní různých metabolických cest. Je nespecificky zabudováván do bílkovin (např. albuminu) na místě methioninu. Nebo je přeměněn trans-sulfurací na selenocystein, který je postupně přeměněn na H_2Se (Esaki et al., 1981). Nebo může tvořit methylselenol. Tato reakce je zprostředkována α,γ -lyasou, také známou jako methioninasa (Meuillet et al., 2004).

Selenocystein, přijatý potravou nebo odvozený ze selenomethioninu, je přeměněn na H_2Se . Selenocystein se také z H_2Se může tvořit, poté co je H_2Se přeměněn selenofosfát syntetasou na selenofosfát. Inzerce selenocysteinu do bílkoviny je určena v mRNA kodonem UGA (Hatfield and Gladyshev, 2002).

Se-(Methyl)selenocystein se na rozdíl od selenomethioninu nezačleňuje do bílkovin, ale může být přeměněn β -lyasou na methylselenol (Foster et al., 1986). Methylselenol je považován za hlavní intermediární metabolit spojený v buněčných pochodech s chemopreventivním účinkem selenu (Combs and Gray, 1998; Ip et al., 2000, El-Bayoumy and Sinha, 2004).

Exkrece selenu se děje methylací nebo přeměnou na cukry. Vzniká řada metabolitů: methylselenol (CH_3SeH) a dimethylselenid ($[CH_3]_2Se$), které jsou vylučovány plícemi, trimethylselenoniový ion ($[CH_3]_3Se^+$) a 1- β -methylseleno-N-acetyl-D-galaktosamin ($CH_3Se-GalN$), které jsou vylučovány ledvinami (Sunde et al., 2006; Kobayashi et al., 2002). Při nízkých dávkách selenu jsou jako hlavní forma vylučovány močí monomethylované formy, zatímco trimethylované formy převládají při vysokých dávkách. Dimethylované formy jsou vylučovány dechem, když hladina trimethylselenoniového iontu nasytí metabolické plató (Itoh and Suzuki, 1997).

Vylučování různých typů selenu v různých množstvích může sloužit jako indikátor zdravých a toxických dávek selenu (Kobayashi et al., 2002). Methylační cesta se považuje za detoxifikační cestu (Foster et al., 1986, Lu et al., 1995).



Obrázek 1 Schématické znázornění metabolických přeměn selenu (převzato z Letavayova et al., 2006).

2.1.4 Protinádorové působení selenu

Selen je spojován s protinádorovým působením od 60. let 20. století (Shamberger and Frost, 1969). Existuje mnoho studií zabývajících se vztahem mezi množstvím selenu v potravě a incidencí rakoviny. Vyplývá z nich, že selen má určitý protektivní účinek proti některým typům rakoviny v oblastech kde je příjem selenu potravou nízký. Tzn. pokud lidem, kteří měli v séru velmi malou koncentraci selenu, byl dodán selen, byl u nich prokázán jeho protektivní účinek před rakovinou. Jedná se zejména o rakovinu tlustého střeva, rekta, prostaty a plic. (Combs and Gray, 1998).

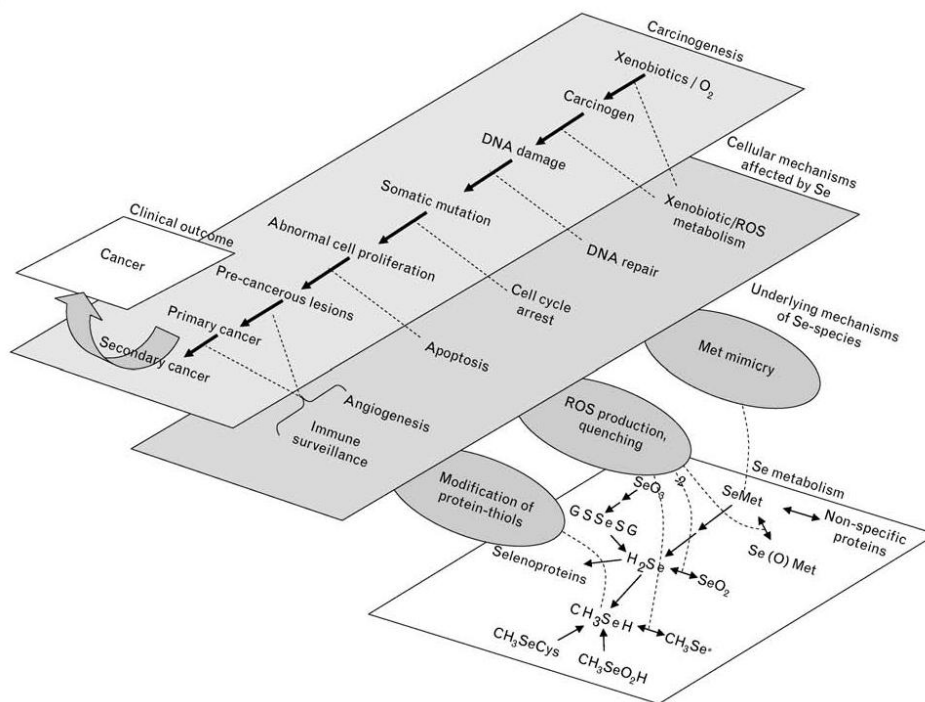
Sloučeniny selenu snižují aktivaci prokarcinogenů prostřednictvím inhibice enzymů fáze I a indukci enzymů fáze II. Enzymy fáze I jsou členy cytochrom P450 systému. Jsou zodpovědné za přeměnu chemických karcinogenů na reaktivní sloučeniny, které mohou poškodit DNA. Enzymy fáze II mají detoxifikační vlastnosti a zabraňují karcinogennímu poškození (El-Bayoumy, 2001; Ip and Lisk, 1994).

2.1.4.1 Vliv na buněčný růst, cyklus a apoptózu

Selen je v koncentraci nmol/l esenciální pro růst buněk (McKeehan et al., 1976; Guilbert and Iscove, 1976). Regulace buněčného cyklu hraje klíčovou roli v konečné diferenciaci, růstu a vývoji (Pines, 1994; Pines 1995). Existuje souvislost mezi rakovinou a kontrolními body buněčného cyklu G1/S a G2/M (Pines, 1994; Pines 1995; Blagosklonny and Pardee, 2001). Studie (Zeng, 2002) prokázala, že nízké hladiny selenu (nmol/l) zvýšily buněčnou proliferaci a způsobily up-regulaci exprese mnoha genů spojených s buněčným cyklem a fosforylací bílkovin. To vedlo ke vstupu do buněčného cyklu, částečně přechodu do G2/M a/nebo k redukci apoptózy, hlavně v G1 buňkách V buňkách kultivovaných v médiu bez selenu významně poklesla aktivita selenoenzymů jako jsou glutathion peroxidasa a thioredoxin reduktasa a následovala indukce buněčné smrti (Saito et al., 2003). V tučích rozpustný antioxidant (vitamín E) kompletně zabránil buněčné smrti navozené nedostatkem selenu, ačkoliv vitamín E nemůže obnovit aktivitu selenoenzymů (Saito et al., 2003).

Bylo prokázáno, že selen zprostředkovává množství dějů podobných působení insulinu *in vivo* i *in vitro*, včetně stimulace vychytávání glukosy a regulace glykolýzy, glukoneogeneze, syntézy mastných kyselin a ovlivnění pentoso-fosfátové dráhy (Stapleton, 2000). Selen zvyšuje vychytávání glukosy a tvorbu ATP prostřednictvím aktivace glykolýzy a způsobuje up-regulaci antiapoptotického proteinu Bcl-2, udržuje membránový potenciál mitochondrií, stimuluje syntézu mastných kyselin a zvyšuje aktivitu pentoso-fosfátové dráhy. Tento mechanismus zahrnuje aktivaci klíčových proteinů zapojených do insulinové signalizační kaskády a nepřímou stimulaci fosforylace tyrosinu a aktivaci mitogenem-aktivovaných proteinkinás (MAPK) (Stapleton, 2000; Stapleton et al., 1997). Selen také přímo řídí aktivitu mnoha proteinů rozhodujících pro intracelulární signalizační cesty. Nutriční hladina selenu tlumí aktivitu apoptózu regulující kinasy-1 (ASK1). Nedostatek selenu může snížit ochranu proti oxidačnímu stresu a oslabuje imunitní odpověď. Zdá se, že některé typy nádorů jsou relativně necitlivé k nedostatku selenu (Irmak et al., 2003).

Anorganické i organické formy selenu v supranutričních, ale netoxických dávkách podporují maximální expresi selenoenzymů (Combs, 2005; Whanger, 2004; Ip, 1998). Selen inhibuje růst nádorových buněk snižováním buněčné proliferace zastavením buněčného cyklu a/nebo zvýšením apoptózy (Whanger, 2004; Ip, 1998; Ganther, 1999; Lu, 2001).



Obrázek 2 Vliv selenu na karcinogenezi (převzato z Jackson and Combs, 2008).

2.1.4.2 Redox aktivity selenu

Selen je součástí antioxidační obrany buňky jako látka likvidující volné radikály a jako součást selenoenzymů. Glutathion peroxidasa katalyzuje redukci peroxidu vodíku a lipidových peroxidů. Thioredoxin reduktasa je klíčovým enzymem v metabolismu selenu. Redukuje sloučeniny selenu a kontroluje intracelulární redox prostředí (Lee et al., 2000; Madeja et al., 2005). Jodothyronin deiodinasa tvoří z neaktivního prekursoru T4 aktivní hormon štítné žlázy T3. Selenoprotein P chrání endoteliální buňky před poškozením volnými radikály. Tyto enzymy obsahují selen ve formě selenocysteinu. Zdá se, že pro optimální syntézu a fungování selenoproteinů jsou potřeba vyšší hladiny selenu, než mnozí lidé mají (Xia et al., 2005; Rayman et al., 2005).

Supranutriční dávky sloučenin selenu inhibují buněčný růst a generují superoxid. Vyšší koncentrace, hlavně anorganické formy selenu, jsou akutně toxické, způsobují zlomy DNA (Combs and Gray, 1998). Selenidy (RSe^-) vyvolávají v cílových buňkách oxidační stres (Spallholz, 1997). Volné radikály ničí strukturu a následně zasahují do funkcí enzymů, nukleových kyselin a důležitých makromolekul. Předpokládá se, že oxidační stres je hlavním důvodem cytotoxicity selenu a má podíl na tom, že sloučeniny

selenu indukují apoptózu (Kim et al.; 2004, Drake, 2006). Zdá se, že prooxidační aktivita selenu má jak škodlivou, tak prospěšnou roli (Stewart et al., 1999).

Seleničitan sodný je efektivní katalyzátor oxidace glutathionu na selenodiglutathion (GSSeSG). Bylo navrženo, že toxicita je způsobena interakcí selenu s disulfidickými a thiolovými skupinami bílkovin tvořících selenotrisulfidy (RSSeSR). Výsledkem je inhbece enzymové aktivity. Selenotrisulfidy mohou být redukovány nadbytkem thiolů nebo glutathion reduktasy a tvořit tak vysoce reaktivní selenopersulfidový anion (RSSe⁻) (Spallholz, 1994).

Oxidace glutathionu pomocí seleničitanu sodného vede k produkci volného radikálu O₂⁻ a elementárního selenu Se⁰ (Seko et al., 1989). Seleničitan sodný je pokládán za prooxidační katalyzátor (Spallholz, 1994, 1997).

Předpokládá se, že sloučeniny selenu, které zabraňují vzniku nádoru, jsou metabolizovány na methylselenol (CH₃SeH) (Ip et al., 2000). Protinádorový účinek stejně jako toxicita jsou způsobeny katalytickou povahou selenidového aniontu (RSe⁻), následnou tvorbou O₂⁻ a oxidačního stresu, který indukuje apoptózu a může přispívat ke karcinostatické aktivitě (Spallholz, 1997; Spallholz et al., 2004).

Sloučeniny selenu, které snadno tvoří selenidový anion RSe⁻, produkují během *in vitro* oxidace glutathionu nebo jiných thiolů (RSH), radikál O₂⁻. Seleno-L-methionin a Se-(Methyl)selenocystein netvoří methylselenol během redukce glutathionu přímo. Methylselenidový anion se tvoří pomocí methioninasy (v případě seleno-L-methioninu) nebo β-lyasy (v případě Se-(Methyl)selenocysteinu).

2.1.4.3 Selen a poškození DNA

Některé sloučeniny selenu mají potenciál indukovat poškození DNA. Seleničitan sodný v koncentraci 5-10 μM způsobí jedno- a dvou-vláknové zlomy DNA, buněčnou smrt navozenou nekrózou a náhlý buněčný rozpad. Poškození DNA je spojeno s prooxidační aktivitou (Lu et al., 1994, 1995).

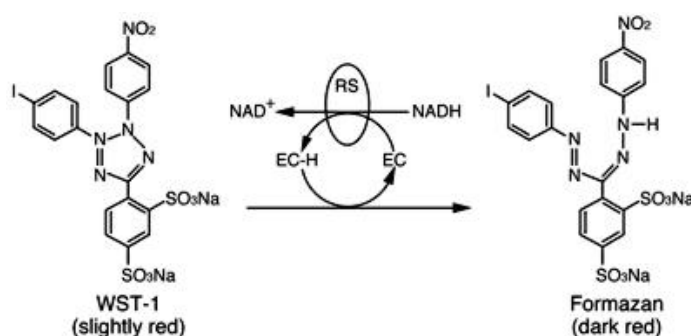
Methylované sloučeniny selenu (např. methylselenocystein) v koncentraci 10-50 μM indukují buněčnou smrt navozenou hlavně apoptózou (Wilson et al., 1992; Lu et al., 1995).

2.2 Metody stanovení buněčné proliferace a cytotoxicity

2.2.1 Testy metabolické aktivity

2.2.1.1 WST

WST assay je kolorimetrická metoda používaná k měření buněčné viability, proliferace a cytotoxicity. Je založena na štěpení tetrazoliové soli [4-(3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzen disulfonát] za vzniku ve vodě rozpustného, barevného produktu - formazanu.



Obrázek 3 Rozštěpení tetrazoliové soli WST na formazan
(EC-elektron-vázající činidlo, RS-mitochondriální sukcinát-tetrazolium-reduktasový systém)

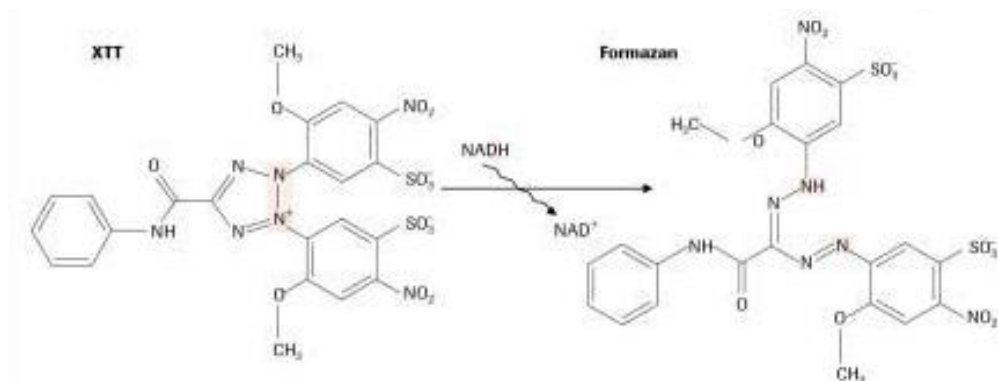
WST je v přítomnosti akceptorů elektronů účinně redukováno pomocí NADH a NADPH i bez přítomnosti buněk či enzymů a tato redukce zahrnuje superoxid. Redukce WST je silně inhibována superoxid dismutasou (SOD) (Berridge et al., 1996).

WST je charakterizováno negativním nábojem a proto je přes buňku značně neprostupné. Redukce probíhá na buněčném povrchu nebo na úrovni plasmatické membrány pomocí transmembránového transportu elektronů (Berridge et al., 2005). WST může být redukováno sukcinátem v přítomnosti mitochondriální sukcinát dehydrogenasy.

Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné metabolické aktivitě buňky a kvantifikuje se měřením absorbance při 420-480 nm (maximum je při 450 nm).

2.2.1.2 XTT

XTT assay je jednoduchá metoda, která se používá k měření buněčné proliferace, viability a cytotoxicity. XTT [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid] je tetrazoliová sůl, která je štěpena za vzniku oranžově zbarveného, ve vodě rozpustného produktu - formazanu.



Obrázek 4 Rozštěpení tetrazoliové soli XTT

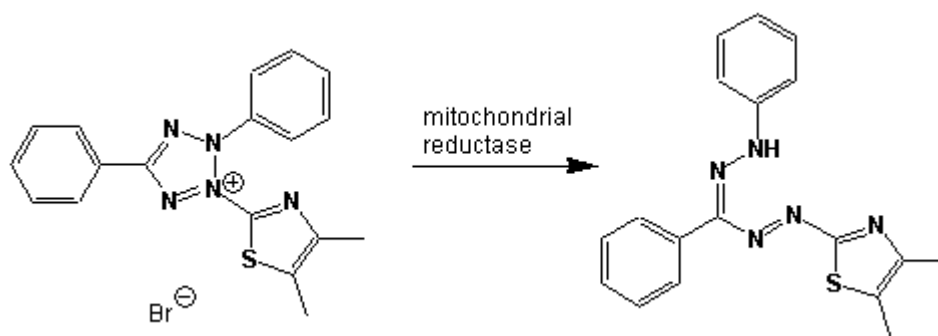
Redukce probíhá v životaschopných buňkách za přítomnosti činidla vázajícího elektrony. XTT je charakterizováno negativním nábojem a proto je přes buňku značně neprostupné. Redukce probíhá na povrchu buňky nebo na úrovni plasmatické membrány prostřednictvím transportu elektronů přes plasmatickou membránu (Berridge et al., 2005).

V přítomnosti intermediárního akceptoru elektronů je XTT rychle redukováno pomocí NADH a NADPH v nepřítomnosti buňky nebo enzymů. Zdá se, že mitochondrie silně inhibují tuto NADH závislou redukci. Naopak redukce závislá na sukcinátu je pomalá a závisí na mitochondriálních enzimech (sukcinát dehydrogenasa). Redukce je silně inhibována superoxid dismutasou (SOD). (Berridge et al., 1996).

Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu žijících buněk a může být kvantifikováno měřením absorbance při vlnové délce 450 – 500 nm; maximum je při 475 nm.

2.2.1.3 MTT

MTT assay je široce užívaná metoda k měření buněčné proliferace, viability a cytotoxicity. Je založena na redukcí žluté tetrazoliové soli, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid). Vzniká fialově zbarvený, ve vodě nerozpustný produkt - formazan. Tato reakce probíhá pouze v žijících (metabolicky aktivních) buňkách.



Obrázek 5 Rozštěpení tetrazoliové soli MTT

Redukce MTT je spojena s enzymy endoplazmatického retikula a zahrnuje redukované pyridinové nukleotidy NADH a v menším rozsahu NADPH. Redukce MTT není spojena pouze s mitochondriemi, ale také s cytoplasmou a membránami, včetně endosomálního/lysosomálního kompartmentu. Předpokládá se, že rozhodujícím faktorem ovlivňující buněčný příjem tetrazoliové soli přes plasmatickou membránu je její kladný náboj. (Berridge et al., 2005). Sukcinát také může působit jako donor elektronů v redukcí MTT přes mitochondriální sukcinát dehydrogenasu, ale tato redukce je pomalá a jen málo přispívá k celkové buněčné redukcí MTT (Berridge et al., 1996).

Krystaly formazanu se rozpustí ve vhodném médiu (okyselený isopropanol, dimethylsulfoxid). Množství vzniklého formazanu je kvantifikováno měřením absorbance při vlnové délce 570 nm.

2.2.2 Stanovení obsahu proteinu

2.2.2.1 Brilliant blue - BB

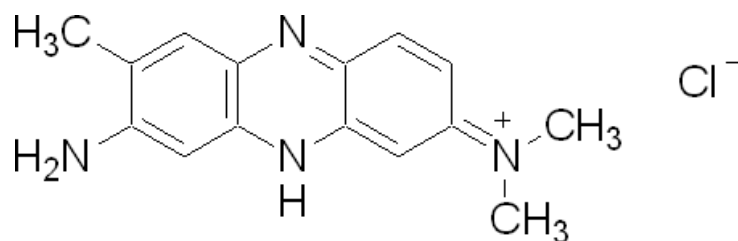
Brilliant blue assay, jinak nazývaná jako Bradford protein assay, je spektroskopická analytická metoda používaná k měření koncentrace bílkovin v roztoku. Je založena na rovnováze mezi třemi formami barviva: kationickou červenou formou s maximem absorpance při 470 nm, neutrální zelenou formou s maximem při 650 nm a anionickou modrou formou s maximem při 595 nm. Barvivo se váže na bazické aminokyseliny, hlavně arginin a aromatické aminokyseliny. V silně kyselém prostředí je barvivo stabilní jako červená forma se dvěma protony. Po navázání na protein je nejstabilnější modrá forma bez protonů. Během tvorby komplexu barvivo-protein dochází ke dvěma vazebným interakcím. Nejprve červená forma barviva odevzdá volný proton ionizovatelným skupinám proteinu, což způsobí poruchu nativního stavu proteinu, následkem toho se vytvoří hydrofobní kapsy. Tyto kapsy na terciární struktuře vážou nekovalentně nepolární oblasti barviva pomocí van der Waalsových sil. Tím dojde k přiblížení a iontové interakci pozitivních aminoskupin a negativního náboje barviva. Navázání na protein stabilizuje modrou formu barviva. Množství komplexu v roztoku je úměrné koncentraci bílkoviny. Nárůst absorpance při 595 nm je úměrný množství navázaného barviva a tedy celkové koncentraci bílkoviny ve vzorku.

Tato metoda může být ovlivněna zvýšenou koncentrací SDS (sodium dodecyl sulfát). Je to běžný detergent, který se používá k porušení lipidové membrány při lýze buněk a proto se může nacházet ve vzorku. Interference s SDS probíhá dvěma způsoby, které závisí na koncentraci SDS. Při koncentraci nižší než je kritická micelární koncentrace (CMC) má SDS tendenci vázat se na bílkovinu a tím brání navázání barviva na vazebné místo. To může vést k podhodnocení koncentrace bílkoviny v roztoku. Při vyšší koncentraci než je CMC se SDS silně váže na zelenou formu barviva, tím dochází k posunu rovnováhy, čímž vzniká více modré formy barviva. Dojde ke zvýšení absorpance při 595 nm nezávisle na obsahu bílkovin. Vysoká koncentrace pufru může způsobit vyčerpání volných protonů konjugačními bázemi a tím dojde k nadhodnocení obsahu bílkoviny (www 2).

2.2.3 Test celistvosti buněčné membrány

2.2.3.1 Neutrální červeň - NR

Stanovení neutrální červeň (neutral red assay) je založeno na schopnosti živých nepoškozených buněk zabudovat neutrální červeň do lysosomů. NR je slabé kationaktivní barvivo, které rychle proniká buněčnou membránou a hromadí se v lysosomech (pH lysosomu < pH cytoplasmy). Zde se váže na anionické skupiny lysosomální matrix.



▪ Obrázek 6 Vzorec neutrální červeň

Mrtvé buňky nebo buňky s poškozenou plasmatickou nebo lysosomální membránou nejsou schopné při promytí udržet barvivo a dochází k jejich odbarvení (Repetto et al., 2008).

Množství navázaného barviva je měřeno spektrofotometricky při 540 nm a je přímo úměrné počtu buněk s neporušenou membránou.

3 Cíle

1. Studovat a porovnat inhibiční vliv seleničitanu sodného, seleno-L-methioninu a Se-(Methyl)selenocysteinu na proliferaci tří linií buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu s rozdílným zhoubným potenciálem (HT29, SW480, SW620,).
2. Porovnat inhibici proliferace u linií HT29, SW480 a SW620 .
3. Porovnat vybrané metody (WST, MTT, XTT, Brilliant blue a neutrální červeně).

4 Experimentální část

4.1 Biologický materiál

Buněčná linie HT 29

- původ: lidský kolorektální adenokarcinom (*neinvazivní, nemigrující*)
- zdroj: American Type Culture Collection (ATCC), kat.č. HTB-38
- charakteristika: morfologie epitelální, rostou v bocháncích, jež se spojují
- médium: D-MEM (Sevapharma) + 10% FTS
- pasážování: 2x týdně (Po+Čt), trypsin 0,05% + EDTA, 3x oplach 3-4min, 5min
v termostatu, buňky více adherují k povrchu kultivační láhve
- množství suspenze k nasazení: 3ml do střední kultivační láhve s filtrem

Buněčná linie SW 480

- původ: lidský kolorektální adenokarcinom (*neinvazivní, migrující*)
- zdroj: American Type Culture Collection (ATCC), kat.č. CCL-228
- charakteristika: morfologie epitelální
- médium: D-MEM (Sevapharma) + 10% FTS
- pasážování: 2x týdně (Po+Čt), trypsin 0,05% + EDTA, oplachovat 1min, 5min
v termostatu
- množství suspenze k nasazení: 1ml do střední kultivační láhve s filtrem

Buněčná linie SW 620

- původ: lidský kolorektální adenokarcinom metastazující v lymf. uzlině
(*invazivní, migrující*)
- zdroj: American Type Culture Collection (ATCC), kat.č. CCL-227
- charakteristika: morfologie epitelální, výskyt velkých mnohojaderných buněk
- médium: D-MEM (Sevapharma) + 10% FTS
- pasážování: 2x týdně (Po+Čt), trypsin 0,05% + EDTA, 3x oplach, 5min v termostatu,
buňky více adherují k povrchu kultivační láhve
- množství suspenze k nasazení: 2ml do střední kultivační láhve s filtrem

4.2 Přístroje a pomůcky

Přístroje

Analytické váhy HA-180M, A&D Company, limited

Invertovaný mikroskop CK2, Olympus

Laminární box BSB 42, ICN Flow

Lednice – BRANDT Apollo

Lednice s mrazákem, ARDO

Hlubokomrazicí box ULTRA LOW, SANYO

Spektrofotometr SPETRAFluor Plus, Tecan

Termostat IG 150, JOUAN

Vodní lázeň, Memmert

Vortex – MS 2 Minishaker, IKA[®]

Nástroje a pomůcky

96-jamkové transparentní mikrotitrační destičky s víčkem, Nunclon

Automatické pipety Finnpiquette a jednorázové špičky

Injekční stříkačka + filtr (0,20 μ m), Santorius

Korýtko (1x50ml, 8x10ml)

Kultivační láhve – střední (20ml) s filtrem, Nunclon

Pipetboy acu, IBS integra biosciences

Plastové kontejnery a zkumavky Eppendorf – různé velikosti

Neubauerova komůrka – hematocytometer

Odměrné sklo – kádinky, odměrné válce, skleněné pipety (10ml)

Skleněné pipety

4.3 Chemikálie

Chemikálie

Aqua pro injectione, Ardeapharma a.s.

Bovinní sérový albumin (BSA) (kat. č. A 8022),Sigma

Dulbecco's Modified Eagles medium (D-MEM), Sevapharma

Fetální telecí sérum (FTS) (kat. č. 1502 –P206008)

Nutrient mixture F-12 Ham, Sigma (kat. č. N4888)

Penicilin/Streptomycin, PAN™ (kat. č. P06-07100)

PBS bez Ca a Mg iontů (fosfátový pufr) (kat. č. P04 – 53500), PAN™

Trypsin 0,05 % + EDTA (kat. č. P10-22100), PAN™

Se-(methyl)selenocystein (kat.č. M6680), Sigma-Aldrich

Seleno-L-methionin (kat. č. S3132), Sigma-Aldrich

Seleničitan sodný (kat. č. S1382), Sigma-Aldrich

Briliant blue G (kat.č. 20139-1), Sigma-Aldrich

MTT (kat. č. M5655), Sigma-Aldrich

Neutral red Solution (0.33%) (kat. č. N2889), Sigma-Aldrich

WST (kat. č. 1 644 807), Roche

XTT (kat. č. 30007), Biotium Hayward

Isopropanol, Lachema a.s.

Ethanol, Lachema a.s.

Methanol, Lachema a.s.

Kyselina octová, Lachema a.s.

Kyselina chlorovodíková, Lachema a.s.

Chlorid vápenatý, Lachema a.s.

Formaldehyd, Lachema a.s.

4.4 Pasážování buněk

4.4.1 Postup

- ve vodní lázni ohřát na 37°C D-MEM+10%FBS
- popsat kultivační lahve (linie, datum, pasáž, podpis)
- buňky v kultivační lahvi prohlédnout v invertovaném mikroskopu: nejprve pod malým zvětšením-přehled o růstu, poté pod větším zvětšením-stav buněk a kontaminace
- obsah kultivační lahve vylít do sterilní skleněné lahvičky
- přidat 2 ml trypsinu a kývavým pohybem omývat buňky (opakovat 3x), slít do sterilní skleněné lahvičky, ponechat malé množství trypsinu v kultivační lahvi (asi 1 ml)
- kultivační láhev uložit na 5 min do termostatu
- po uvolnění buňky oplachovat a resuspendovat v 10 ml média
- malé množství odpipetovat do zkumavky a spočítat množství buněk v 1 ml
- 2 ml buněčné suspenze ponechat v kultivační lahvi nebo nasadit do nové
- doplnit médiem do 10% objemu lahve (20 ml) a promíchat se suspenzí
- kultivovat v termostatu

4.4.2 Počítání buněk

- důkladně promíchat buněčnou suspenzí
- naplnit Neubauerovu komůrku
- spočítat buňky ve velkém prostředním čtverci (složen z 25 středních čtverců) vždy tak, že jsou brány v úvahu pouze buňky ležící ve čtverci a buňky dotýkající se jakkoliv pouze dvou stran čtverce, buňky dotýkající se druhých dvou stran čtverce nejsou počítány
- počet buněk ve velkém prostředním čtverci násobit $\times 10^4$ → množství buněk v 1 ml

4.4.3 Příprava reagensí

PBS bez Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů (DPBS): koncentrovaný roztok před použitím 10x naředit
Aqua pro injectione

Trypsin 0,05% + EDTA: koncentrovaný roztok před použitím 10x naředit DPBS

D-MEM + 10 % FTS (500 ml): 50 ml FTS
 45 ml D-MEM
 7 ml NaHCO_3
 5 ml penicilinu/streptomycinu
do 500 ml doplnit Aqua pro injectione

4.5 Ovlivnění buněk

Pondělí: nasadit buňky (SW480, SW620, HT29) do 96 jamkových destiček v koncentraci 8000 buněk na jamku → inkubovat v termostatu 24 hodin (37°C, 5% CO₂, konstantní vlhkost)

Úterý: odsát médium, k buňkám přidat 200 µl média s Na₂SeO₃, seleno-L-methioninem a Se-(Methyl)selenocysteinem, inkubace 48 hodin v termostatu

Čtvrtek: odsát médium se selenem a vyhodnocení

Sloupec kontrola (K) se neovlivňuje selenem, sloupec slepý vzorek - blank (B1) neobsahuje buňky, jen médium.

Tabulka 1 Rozmístění koncentrací sloučenin selenu na 96-ti jamkové destičce

B1	256µM	128µM	64µM	32 µM	K	16µM	8µM	4µM	2µM	1µM	

Médium D-MEM

D-MEM + 10% FTS (500 ml):
50 ml FTS
45 ml D-MEM
7 ml NaHCO₃
5 ml penicilinu/streptomycinu
do 500 ml doplnit Aqua pro injectione

Médium F 12

F12 + 1 mM Glutamin + 1% FTS (250 ml):

2,5 ml FTS

2,5 ml penicilinu/streptomycinu

1,25 ml L-Glutamin (200 mM)

do 250 ml doplnit Nutrient mixture F-12 Ham

Příprava roztoků:

1mg SeMet se rozpustí v 200 μl Aqua pro injectione. Ke 100 μl tohoto zásobního roztoku přidáme 9,9 ml média F 12. Vznikne roztok o koncentraci 256 μM . Odebereme 5 ml tohoto roztoku a přidáme 5 ml média F 12. Tím vznikne roztok o koncentraci 128 μM . Tímto způsobem pokračujeme až do koncentrace 1 μM . Obdobně postupujeme u SeMCys a Na_2SeO_3

Tabulka 2 Zásobní roztoky sloučenin selenu o koncentraci 25,6 mM

látka	molární hmotnost [g/mol]	látkové množství [mol]	navážka [mg]	Aqua pro injectione[μl]
SeMet	196	$5,1 * 10^{-3}$	1	200
SeMCys	182	$5,5 * 10^{-3}$	1	213
Na_2SeO_3	173	$5,8 * 10^{-3}$	1	226

Tabulka 3 Příprava pracovních roztoků sloučenin selenu

Koncentrace pracovního roztoku sloučeniny selenu [μM]	Množství zásobního roztoku sloučeniny selenu	Množství média F12 + 1 mM Glutamin + 1 % FBS [ml]
256	100 μl 25,6 mM zásobního roztoku	4,9
128	5 ml 256 μM roztoku selenu	5
64	5 ml 128 μM roztoku selenu	5
32	5 ml 64 μM roztoku selenu	5
16	5 ml 32 μM roztoku selenu	5
8	5 ml 16 μM roztoku selenu	5
4	5 ml 8 μM roztoku selenu	5
2	5 ml 4 μM roztoku selenu	5
1	5 ml 2 μM roztoku selenu	5

4.6 Metody

4.6.1 WST

Pracovní roztok: smíchat 1,25 ml WST s 23,75 ml média F 12

Postup stanovení:

- nasazení buněk do 96 jamkové destičky v počtu 8000 buněk/jamku, kultivace 24 hodin (37°C, 5% CO₂)
- ovlivnění buněk sloučeninami selenu, kultivace 48 hodin (37°C, 5% CO₂)
- odstranění původního média, přidání 100 µl pracovního roztoku WST
- měření absorbance v čase 0 hod při 450 nm, referenční vlnová délka je 650 nm
- inkubace 2 hod v inkubátoru (37°C, 5% CO₂)
- měření absorbance v čase 2 hod při 450 nm, referenční vlnová délka je 650 nm

4.6.2 XTT

Příprava roztoků

- kit obsahuje: 5 lahviček XTT Solution (10ml)
5 lahviček Activation Reagent PMS (50 µl)
- příprava aktivovaného roztoku XTT: smíchat 10 µl Activation Reagent s 2 ml s XTT Solution
- smíchat aktivovaný roztok XTT s médiem v poměru 3 díly média + 1 díl aktivovaného roztoku XTT

Postup stanovení:

- nasazení buněk do 96 jamkové destičky v počtu 8000 buněk/jamku, kultivace 24 hodin (37°C, 5% CO₂)
- ovlivnění buněk sloučeninami selenu, kultivace 48 hodin (37°C, 5% CO₂)
- odstranění původního média, přidání 100 µl roztoku XTT v médiu
- měření absorbance v čase 0 hod při 450 nm, referenční vlnová délka je 650 nm

- inkubace 3 hod v inkubátoru (37°C, 5% CO₂)
- měření absorbance v čase 3 hod při 450 nm, referenční vlnová délka je 650 nm

4.6.3 MTT

Roztok isopropanolu: 2 ml 4M HCl + 98 ml isopropanolu

Postup stanovení:

- nasazení buněk do 96 jamkové destičky v počtu 8000 buněk/jamku, kultivace 24 hodin (37°C, 5% CO₂)
- ovlivnění buněk sloučeninami selenu, kultivace 48 hodin (37°C, 5% CO₂)
- odstranění původního média, přidat 100 µl roztoku MTT
- inkubace 4 hod (37°C, 5% CO₂)
- odstranit roztok MTT, přidat 50 µl roztoku isopropanolu
- 15 min třepat
- měření absorbance při 560 nm

4.6.4 NR

Příprava roztoků:

- fixační roztok: 1g/100ml CaCl₂ v 0,5% formaldehydu
- lyzační roztok: 1% CH₃COOH v 50% ethanolu
- pracovní roztok neutrální červeně (80 µg/ml): 250 µl zásobního roztoku neutrální červeně (3,3 g/l) do 10 ml média

Postup stanovení:

- nasazení buněk do 96 jamkové destičky v počtu 8000 buněk/jamku, kultivace 24 hodin (37°C, 5% CO₂)
- ovlivnění buněk sloučeninami selenu, kultivace 48 hodin (37°C, 5% CO₂)
- odsátí 100 µl média, přidání 100 µl pracovního roztoku neutrální červeně

- 3 hod inkubovat (37°C, 5% CO₂)
- odstranění média, přídavek 100 µl fixačního roztoku
- působení 15 min při pokojové teplotě
- 2x oplach 200 µl PBS bez iontů
- přídavek 200 µl lyzačního roztoku
- působení 15 min při pokojové teplotě
- 15 min třepat
- měření absorbance při 540 nm

4.6.5 BB

Příprava roztoků:

- FIX: ethanol (50%), H₂O (49%), ledová kyselina octová (1%)
- OPL: H₂O (85%), ethanol (10%), ledová kyselina octová (5%)
- BB: zásobní roztok: 0,8 g Brilliant blue, 1260 ml H₂O, 500 ml ethanol
- čerstvý roztok: 88 ml zásobního roztoku, 12 ml ledové kyseliny octové
- DES: 98 mg octanu draselného, 700 ml ethanolu, 300 ml H₂O

Postup stanovení:

- nasazení buněk do 96 jamkové destičky v počtu 8000 buněk/jamku, kultivace 24 hodin (37°C, 5% CO₂)
- ovlivnění buněk sloučeninami selenu, kultivace 48 hodin (37°C, 5% CO₂)
- odstranění původního média, přidání 100 µl roztoku FIX-20 min
- 1x oplach PBS 200 µl/jamku
- 200 µl BB/jamku-60 min
- 3x oplach roztokem OPL 200 µl/jamku
- 200 µl roztoku DES/jamku-60 min třepat
- měření absorbance při 620 nm, referenční vlnová délka je 450 nm

4.7 Statistika

Testované koncentrace sloučenin selenu byly vždy porovnávány s aktuální kontrolou vyjádřenou jako 100%. Ke statistickému vyhodnocení byl použit Studentův t test $n=6$; $p<0,05$.

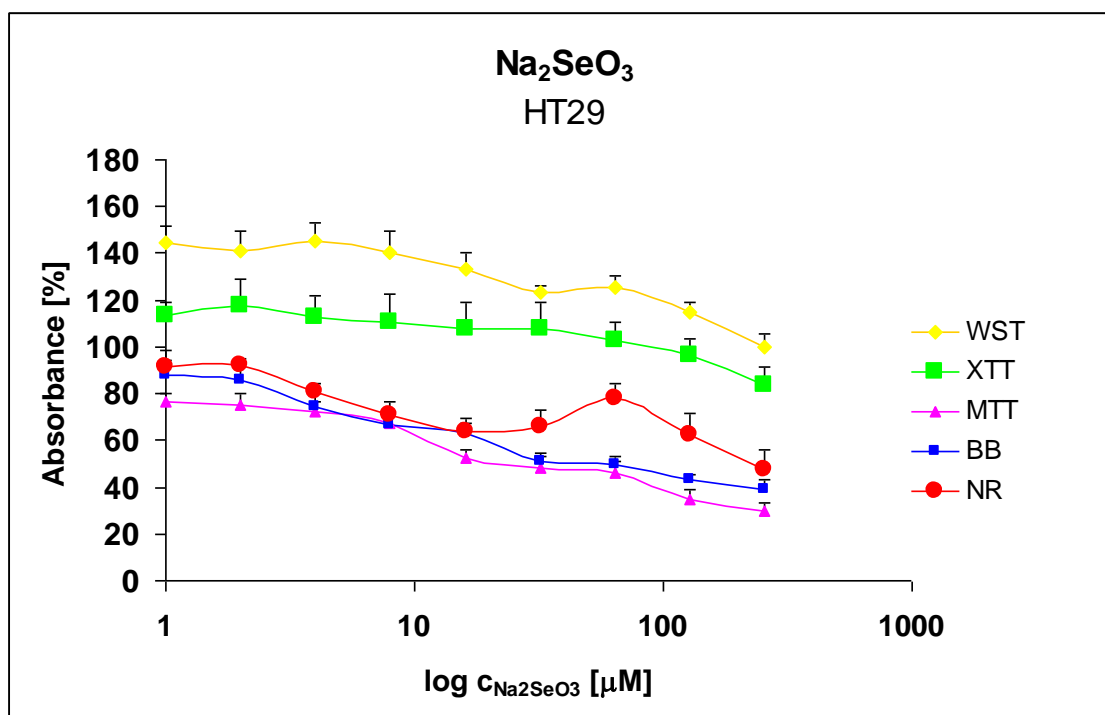
5 Výsledky

5.1 Seleničitan sodný

5.1.1 HT29

Tabulka 4 Vliv seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) v koncentracích 1-256 μM na buňky HT29 vyjádřen jako procento kontroly. Doba inkubace 48 hodin.

Na_2SeO_3	μM	1	2	4	8	16	32	64	128	256
%K	WST	144,5	141,0	145,3	140,2	133,3	123,3	125,5	114,5	100,2
	XTT	113,2	117,6	112,7	110,4	107,9	107,9	102,9	96,0	83,9
	MTT	76,5	75,4	72,2	67,2	52,7	48,5	45,7	34,5	29,4
	BB	87,6	86,0	74,6	66,8	63,2	50,8	49,8	43,5	39,2
	NR	91,4	92,4	80,6	71,2	64,0	65,8	77,7	62,1	47,8



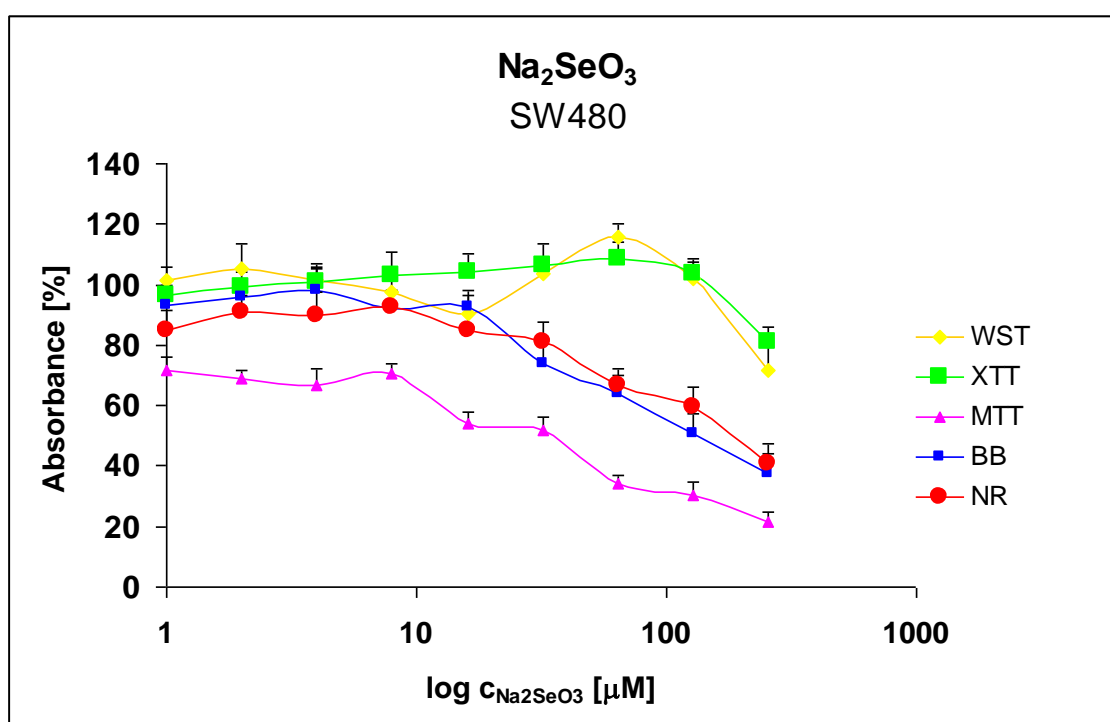
Graf 1 Vliv seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) v koncentracích 1-256 μM na buňky HT29. Doba inkubace 48 hodin. Měřeno metodami WST, XTT, MTT, NR a BB.

WST a XTT testy nevykázaly, kromě nejvyšší použité koncentrace Na_2SeO_3 (256 μM), významný pokles v metabolické aktivitě. Nižší koncentrace seleničitanu sodného naopak zvýšily metabolickou aktivitu měřenou pomocí WST a XTT. U WST to bylo až o 40% oproti kontrole. Nejcitlivější metodou bylo MTT, které ukázalo významný pokles metabolické aktivity. Neutrální červeň a Brilliant blue testy vykazovaly v podstatě obdobné výsledky jako MTT, kromě koncentrace 64 μM , kde neutrální červeň vykazovala vzrůst.

5.1.2 SW480

Tabulka 5 Vliv seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW480 vyjádřen jako procento kontroly. Doba inkubace 48 hodin.

Na_2SeO_3	μM	1	2	4	8	16	32	64	128	254
%K	WST	101,4	105,1	101,6	97,8	90,3	103,8	115,6	102,2	71,7
	XTT	96,5	99,3	101,0	103,3	104,1	106,2	108,5	103,6	81,3
	MTT	71,8	69,0	66,5	70,5	54,2	51,7	34,4	30,2	21,5
	BB	93,2	95,8	97,9	92,3	92,5	73,8	63,7	50,7	37,4
	NR	84,9	91,0	90,1	92,4	84,9	80,8	66,4	59,3	40,5



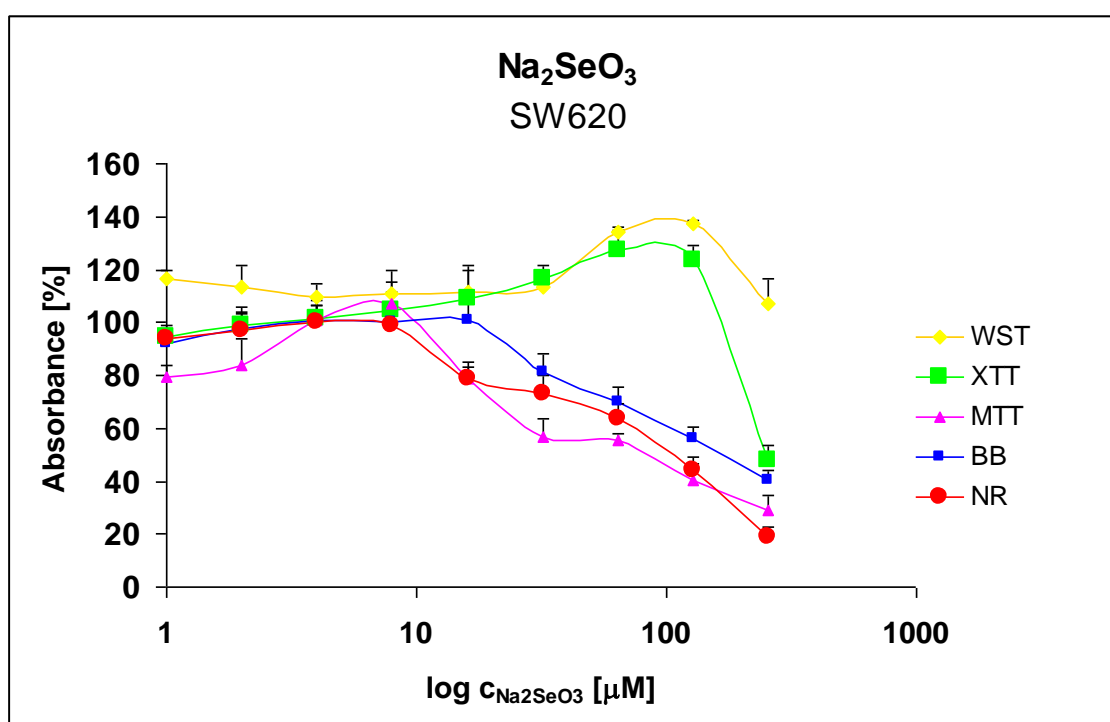
Graf 2 Vliv seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW480. Doba inkubace 48 hodin. Měřeno metodami WST, XTT, MTT, NR a BB.

WST a XTT testy nevykázaly významný pokles v metabolické aktivitě, kromě nejvyšší použité koncentrace Na_2SeO_3 (256 μM). WST a XTT ukázaly zvýšenou metabolickou aktivitu. Nejcitlivější metodou bylo MTT, které ukázalo významný pokles metabolické aktivity. Neutrální červeně a Brilliant blue testy vykazovaly v podstatě obdobné výsledky jako MTT.

5.1.3 SW620

Tabulka 6. Vliv seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW620 vyjádřen jako procento kontroly. Doba inkubace 48 hodin.

Na_2SeO_3	μM	1	2	4	8	16	32	64	128	254
%K	WST	116,6	113,7	109,9	110,7	111,4	113,4	134,3	137,2	107,3
	XTT	94,5	99,0	101,5	104,7	108,7	116,3	127,1	123,3	48,1
	MTT	79,2	83,6	100,5	106,8	78,8	56,8	55,2	40,1	29,0
	BB	92,2	97,7	100,7	100,4	100,7	81,5	69,8	55,8	40,0
	NR	94,0	97,2	100,4	99,1	78,9	72,9	63,9	44,3	18,7



Graf 3 Vliv seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW620. Doba inkubace 48 hodin. Měřeno metodami WST, XTT, MTT, NR a BB.

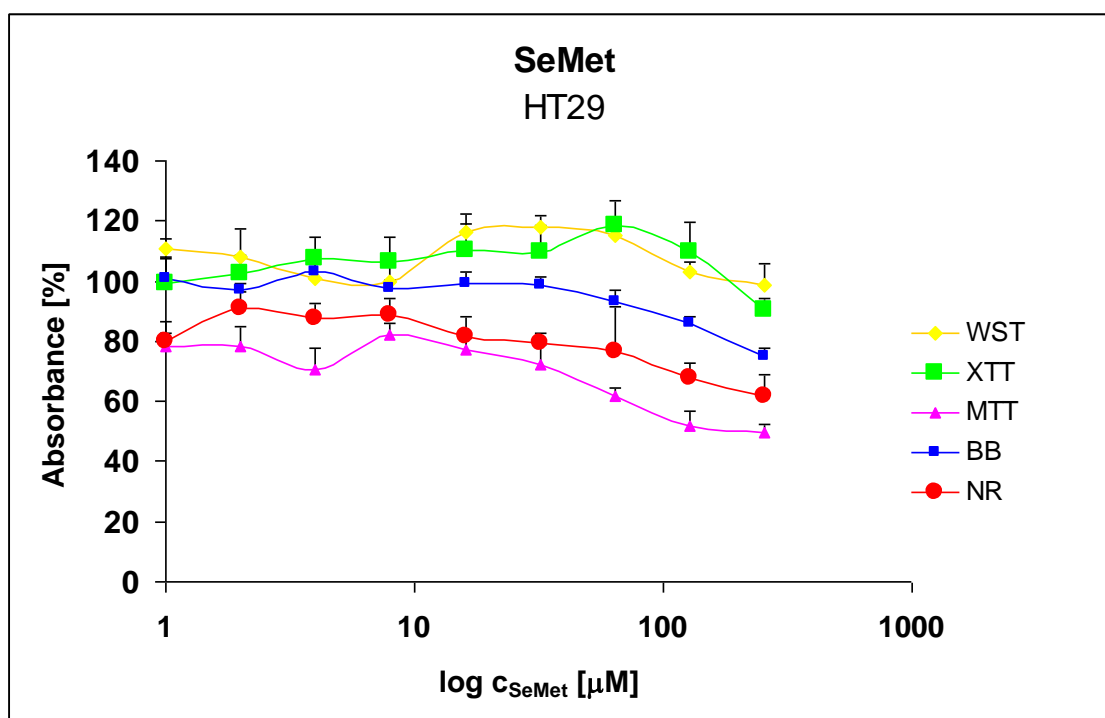
Nejcitlivější metodou bylo MTT, které vykázalo významný pokles metabolické aktivity, s výjimkou koncentrací 4 a 8 μM Na_2SeO_3 . U nejvyšších koncentracích seleničitanu činil pokles metabolické aktivity 21-29% kontroly. XTT vykázalo pokles u nejvyšší koncentrace (256 μM), naopak u koncentrací 16-128 μM byl zaznamenán vzrůst metabolické aktivity. Metodou WST žádný pokles metabolické aktivity buněk po ovlivnění Na_2SeO_3 zaznamenán nebyl. Neutrální červeň a Brilliant blue testy vykazovaly v podstatě obdobné výsledky jako MTT.

5.2 Seleno-L-methionin

5.2.1 HT29

Tabulka 7. Vliv seleno-L-methioninu (SeMet) v koncentracích 1-256 μM na buňky HT29 vyjádřen jako procento kontroly. Doba inkubace 48 hodin.

SeMet	μM	1	2	4	8	16	32	64	128	254
%K	WST	110,7	107,8	100,6	99,7	116,4	118,0	115,3	103,0	98,5
	XTT	99,0	102,5	107,6	106,4	110,2	109,7	118,2	109,8	90,3
	MTT	78,5	78,3	70,7	82,1	77,2	72,0	61,6	51,6	49,9
	BB	101,1	97,3	102,9	97,6	99,1	98,7	93,0	85,9	75,1
	NR	79,8	91,1	87,8	88,8	81,7	79,4	76,6	68,0	61,6



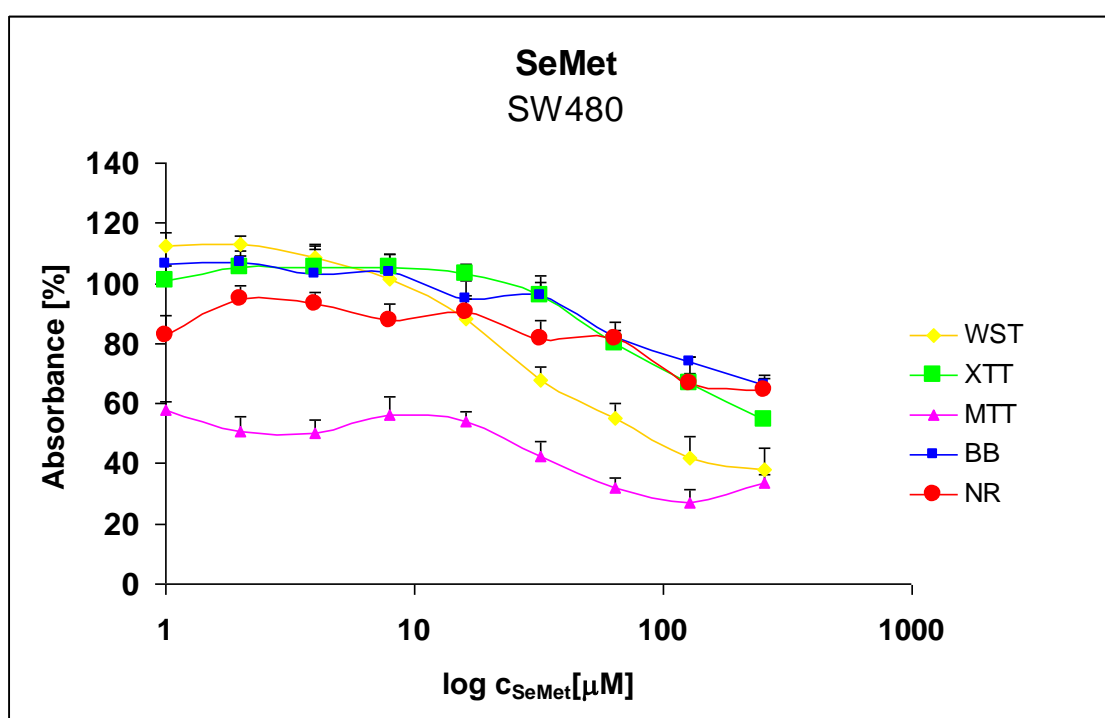
Graf 4 Vliv seleno-L-methioninu (SeMet) v koncentracích 1-256 μM na buňky HT29. Doba inkubace 48 hodin. Měřeno metodami WST, XTT, MTT, NR a BB.

Seleno-L-methionin nesnižoval metabolickou aktivitu buněk měřenou metodami WST a XTT s výjimkou nejvyšší koncentrace u XTT. Nejcitlivější metodou bylo MTT, kde docházelo ke statisticky významnému poklesu ve všech koncentracích. Stejného výsledku bylo dosaženo i u neutrální červeně. Brilliant blue ukazovalo pokles oproti kontrole od koncentrace 128 μM SeMet.

5.2.2 SW480

Tabulka 8 Vliv seleno-L-methioninu (SeMet) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW480 vyjádřen jako procento kontroly. Doba inkubace 48 hodin.

SeMet	μM	1	2	4	8	16	32	64	128	254
%K	WST	112,5	113,1	108,6	101,5	88,3	67,9	54,9	41,9	38,1
	XTT	100,7	105,2	105,3	105,0	103,1	96,0	80,2	66,5	54,8
	MTT	57,6	50,7	50,2	56,4	54,2	42,2	31,8	27,2	33,8
	BB	106,1	106,8	103,1	102,4	94,9	86,9	82,1	76,5	66,0
	NR	82,8	94,6	92,9	87,9	90,2	81,5	81,8	66,6	64,7



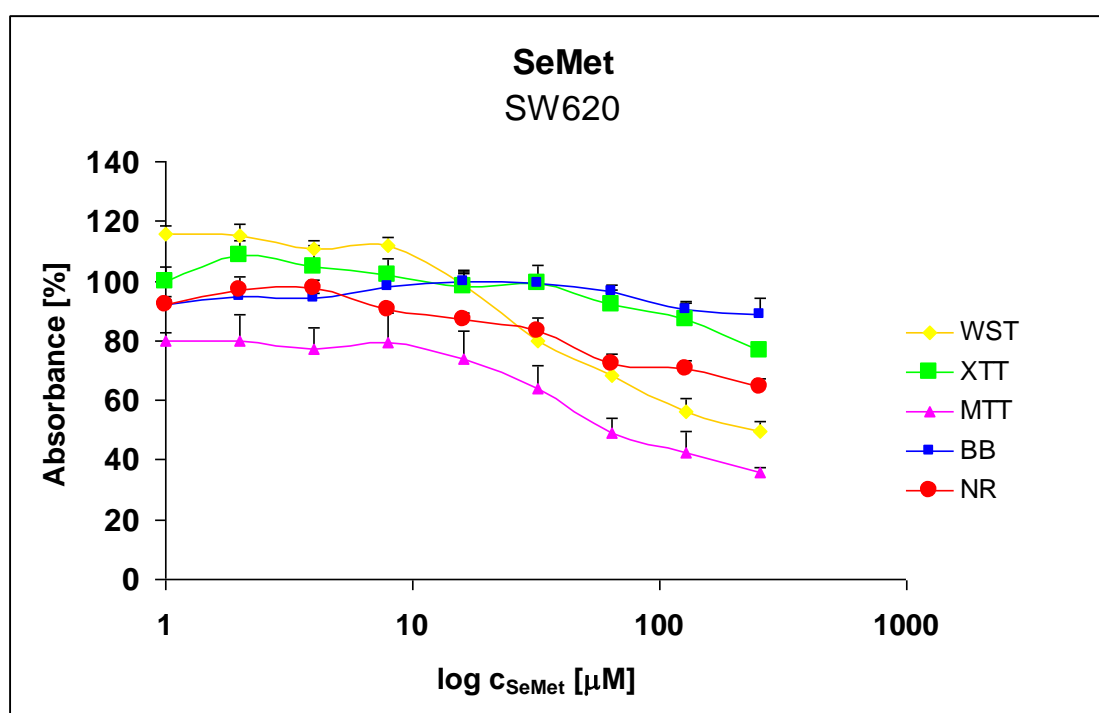
Graf 5 Vliv seleno-L-methioninu (SeMet) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW480 . Doba inkubace 48 hodin. Měřeno metodami WST, XTT, MTT, NR a BB.

Nejcitlivější metodou bylo MTT. Statisticky významný pokles oproti kontrole byl naměřen metodami XTT, BB a NR od koncentrace 64, 32 resp. 16 μM SeMet. WST vykazovalo pokles aktivity od koncentrace 16 μM seleno-L-methioninu.

5.2.3 SW620

Tabulka 9 Vliv seleno-L-methioninu (SeMet) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW620 vyjádřen jako procento kontroly. Doba inkubace 48 hodin.

SeMet	μM	1	2	4	8	16	32	64	128	254
%K	WST	115,6	115,1	110,7	111,7	98,5	79,8	68,4	56,4	49,5
	XTT	99,9	108,4	105,0	101,8	98,2	99,4	92,1	87,3	76,4
	MTT	79,7	79,8	76,9	79,3	73,9	64,1	49,1	42,2	35,6
	BB	92,2	94,6	94,2	102,0	99,6	106,0	99,1	97,7	88,5
	NR	92,3	96,8	97,5	90,3	87,1	83,1	72,3	70,3	64,6



Graf 6 Vliv seleno-L-methioninu (SeMet) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW620. Doba inkubace 48 hodin. Měřeno metodami WST, XTT, MTT, NR a BB.

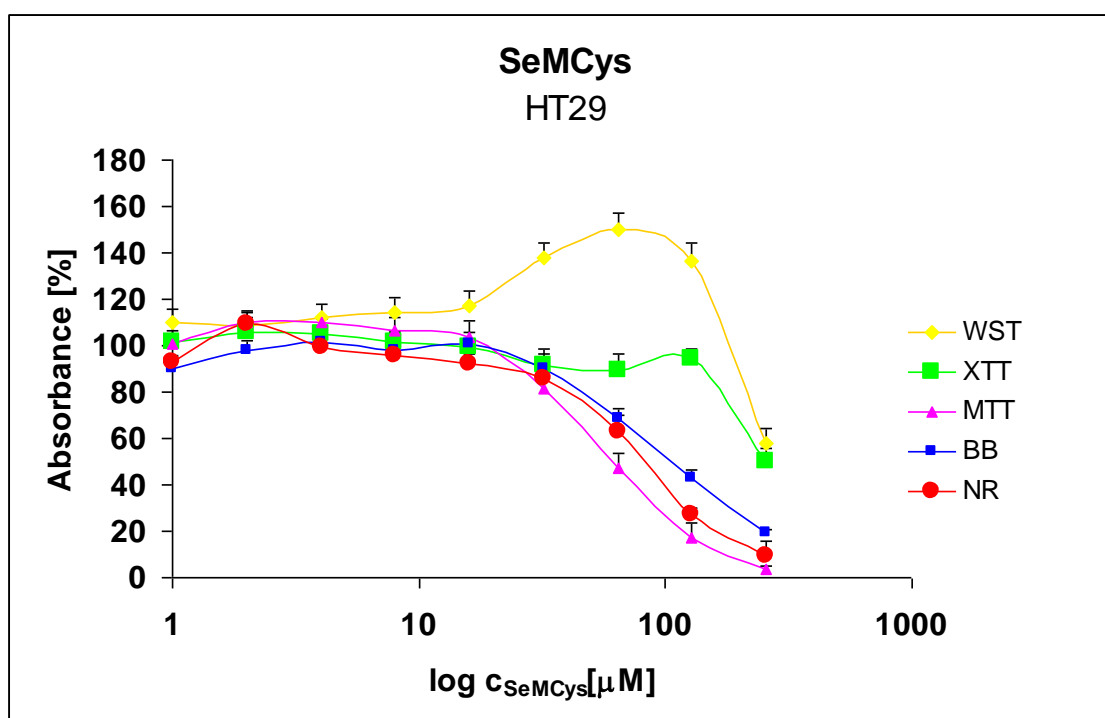
Nejcitlivější metodou bylo MTT, ukázalo významné snížení metabolické aktivity po ovlivnění seleno-L-methioninem ve všech koncentracích. WST ukázalo pokles aktivity od 32 μM seleno-L-methioninu. Metabolická aktivita měřená metodou XTT vykazovala statisticky významný pokles od koncentrace 64 μM . Pokles BB po ovlivnění SeMet byl pozorován pouze u nejvyšší koncentrace. Statisticky významný pokles v porovnání s kontrolou byl u NR pozorován od koncentrace 8 μM .

5.3 Se-(Methyl)selenocystein

5.3.1 HT29

Tabulka 10 Vliv Se-(Methyl)selenocysteinu (SeMCys) v koncentracích 1-256 μM na buňky HT29 vyjádřen jako procento kontroly. Doba inkubace 48 hodin.

SeMCys	uM	1	2	4	8	16	32	64	128	254
%K	WST	110,2	108,6	112,2	114,1	117,0	137,6	150,3	136,6	57,6
	XTT	101,2	105,9	104,9	101,4	99,1	91,2	89,6	94,4	49,8
	MTT	101,0	109,7	109,7	90,4	103,6	80,8	39,8	17,5	3,7
	BB	90,2	97,9	101,7	99,4	100,5	87,1	53,5	35,8	19,0
	NR	93,0	109,0	99,0	96,0	92,0	86,0	63,0	27,0	9,0



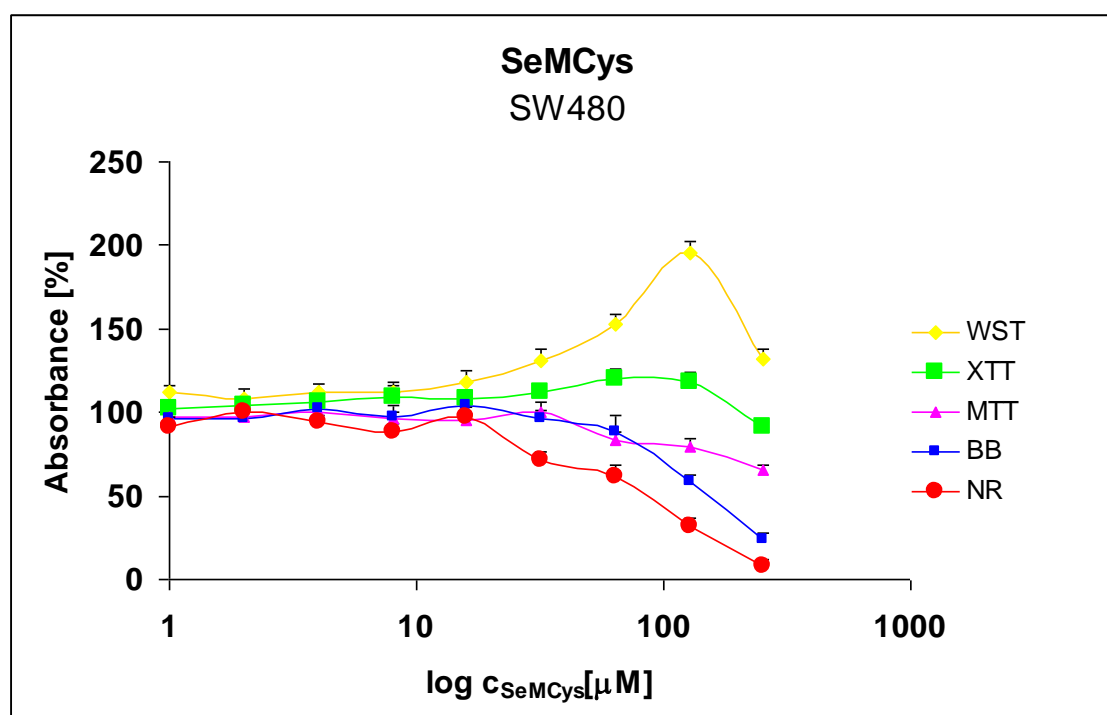
Graf 7 Vliv Se-(Methyl)selenocysteinu v koncentracích 1-256 μM na buňky HT29. Doba inkubace .48 hodin. Měřeno metodami WST, XTT, MTT, NR a BB.

Se-(Methyl)-selenocystein způsobil výrazný vzrůst metabolické aktivity při měření XTT a WST. U těchto testů bylo pozorována inhibice metabolické aktivity jen u nejvyšší koncentrace Se-(Methyl)-selenocysteinu (256 μM). MTT, Brilliant blue a neutrální červen poskytl navzájem podobné výsledky, s významným poklesem měřených parametrů od koncentrace Se-(Methyl)-selenocysteinu 32 resp. 16 μM .

5.3.2 SW480

Tabulka 11 Vliv Se-(Methyl)selenocysteinu (SeMCys) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW480 vyjádřen jako procento kontroly. Doba inkubace 48 hodin.

SeMCys	μM	1	2	4	8	16	32	64	128	254
%K	WST	111,8	108,4	111,6	112,4	118,1	130,5	153,0	195,5	131,6
	XTT	102,3	103,8	106,1	109,5	108,4	112,6	120,0	118,4	91,4
	MTT	97,5	97,7	99,8	87,0	95,6	92,5	80,8	79,5	65,9
	BB	96,6	95,9	102,3	90,1	103,8	90,3	73,0	51,8	24,2
	NR	91,0	100,0	94,0	88,0	97,0	71,0	62,0	32,0	8,0



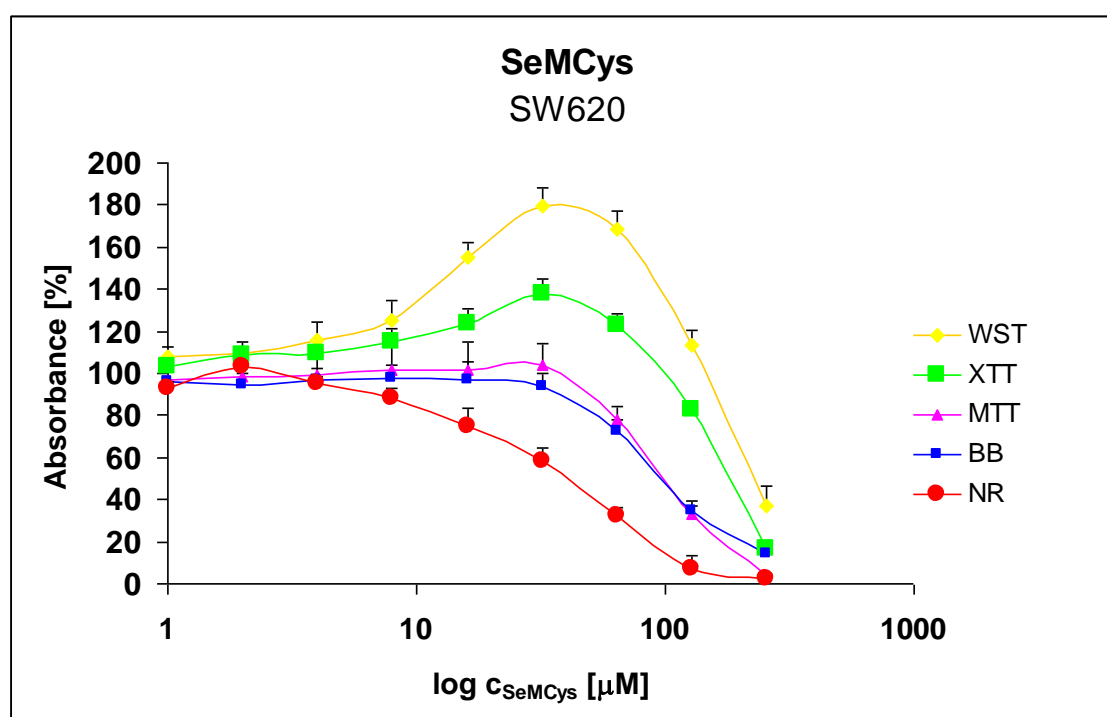
Graf 8 Vliv Se-(Methyl)selenocysteinu v koncentracích 1-256 μM na buňky SW480. Doba inkubace 48 hodin. Měřeno metodami WST, XTT, MTT, NR a BB.

Se-(Methyl)-selenocystein způsobil výrazný vzrůst metabolické aktivity při měření XTT a WST. WST dosáhlo až 195% kontroly. MTT, Brilliant blue a neutrální červen poskytl navzájem podobné výsledky, s významným poklesem měřených parametrů od koncentrace Se-(Methyl)-selenocysteinu 64 resp. 32 μM a koncentrace 8 μM . Neutrální červen vykazovala nejnižší hodnoty v porovnání s ostatními testy.

5.3.3 SW620

Tabulka 12 Vliv Se-(Methyl)selenocysteinu (SeMCys) v koncentracích 1-256 μM na buňky SW620 vyjádřen jako procento kontroly. Doba inkubace 48 hodin.

SeMCys	μM	1	2	4	8	16	32	64	128	254
%K	WST	107,7	109,6	115,7	124,9	155,3	179,6	168,2	113,3	36,9
	XTT	102,8	108,5	109,4	115,0	123,8	138,1	122,9	82,3	16,2
	MTT	97,2	98,7	99,3	93,7	101,2	101,5	66,1	33,4	4,1
	BB	96,4	94,5	97,1	97,5	97,1	88,0	59,7	32,0	14,3
	NR	93,0	103,0	95,0	88,0	75,0	58,0	32,0	7,0	2,0



Graf 9 Vliv Se-(Methyl)selenocysteinu v koncentracích 1-256 μM na buňky SW620. Doba inkubace 48 hodin. Měřeno metodami WST, XTT, MTT, NR a BB

Se-(Methyl)-selenocystein způsobil výrazný vzrůst metabolické aktivity při měření XTT a WST až na 168 resp. 138% kontroly. U těchto testů bylo pozorována inhibice metabolické aktivity jen u nejvyšší koncentrace Se-(Methyl)-selenocysteinu (256 μM). MTT, Brilliant blue a neutrální červen poskytl navzájem podobné výsledky, s významným poklesem měřených parametrů od koncentrace Se-(Methyl)-selenocysteinu 64, 32 resp. 8 μM . Neutrální červen vykazovala nejnižší hodnoty v porovnání s ostatními testy.

6 Diskuze

Sloučeniny selenu ovlivňují proliferaci a indukují buněčnou smrt v *in vitro* modelech (Zeng, 2007). Vliv selenu je závislý na koncentraci a chemické formě zkoušené sloučeniny selenu. Také jednotlivé buněčné linie se mohou lišit jejich citlivostí k ovlivnění selenem (Husbeck et al., 2006, Jonsson-Videsate et al., 2004, Jariwalla et al., 2009). Také používání různých metod stanovení cytotoxicity komplikuje shrnutí výsledků jednotlivých studií. V této studii předkládáme výsledky získané ovlivněním tří buněčných linií izolovaných z kolorektálního karcinomu třemi vybranými sloučeninami selenu za použití pěti různých běžně používaných testů cytotoxicity.

Buněčné linie izolované z kolorektálního karcinomu se liší svým zhoubným a metastazujícím potenciálem. Buňky HT29 byly izolovány z primárního kolorektálního adenokarcinomu stupně 1 (Fogh and Trempe, 1975). Buňky SW480 byly získány z primárního kolorektálního adenokarcinomu stupně 3-4, buňky jsou považovány za neinvazivní. Buňky SW620 byly izolovány z metastázy primárního kolorektálního adenokarcinomu v lymfatické uzlině. Buňky mají invazivní a metastatický potenciál (Leibovitz et al., 1976).

Vybrané sloučeniny selenu se liší v mechanismu jejich biologického účinku. Seleničitan sodný je glutathionem redukován na selenovodík, který pak slouží jako prekurzor pro syntézu selenoproteinů. Tento proces je doprovázen produkcí peroxidového radikálu, který je v případě zvýšené koncentrace seleničitanu, odpovědný za prooxidační účinek seleničitanu a může způsobit poškození DNA. (Letavayova et al., 2006). Seleno-L-methionin je buď přeměněn na selenovodík (Esaki et al., 1981) nebo je nespecificky inkorporován do buněčných bílkovin na místě methioninu (Shiobara et al., 1998) nebo tvoří methylselenol následkem činnosti methioninasy (Meuillet et al., 2004). Se-(Methyl)selenocystein může přímo tvořit methylselenol činností β -lyasy (Foster et al., 1986). Methylselenol je považován za klíčový metabolit selenu odpovědný za chemoprevenci díky jeho schopnosti ovlivnit buněčné molekuly během jeho redoxního cyklu.

Naše výsledky jasně ukazují, že ačkoli jsou určité rozdíly v citlivosti buněčných linií, největší pozorované rozdíly pocházejí z použití rozdílných testů cytotoxicity.

U všech buněčných linií, WST a XTT selhaly v detekci cytotoxického účinku, s výjimkou nejvyšších koncentrací sloučenin selenu. Metabolická aktivita buněk ovlivněných selenem významně vzrostla oproti neovlivněné kontrole. Tento účinek byl pozorován u takových koncentrací selenu, které při použití dalších tří metod (MTT, Brilliant blue a NR) prokázaly pokles v měřených parametrech. Neutrální červeň vykazovala výsledky srovnatelné s výsledky získanými metodou MTT. Podobný výsledek zveřejnil Weyermann (Weyermann et al., 2005).

Rozdíl v citlivosti MTT oproti WST a XTT metod může být způsoben rozdílnými mechanismy redukce. Redukce MTT probíhá intracelulárně, nejen ve spojení s mitochondriemi, ale i cytoplamou a dalšími membránovými kompartmenty. WST a XTT jsou redukovány extracelulárně na buněčném povrchu prostřednictvím transportu elektronů přes plasmatickou membránu (Berridge et al., 2005).

Výsledky získané Brilliant blue metodou jsou porovnatelné s výsledky získanými MTT a NR metodou, s výjimkou seleno-L-methioninu, kde pokles koncentrace bílkoviny byl mírný nebo nezjištěný. Seleno-L-methionin vykazoval nejnižší cytotoxický účinek v porovnání se seleničitanem sodným a Se-(Methyl)selenocysteinem. To může být způsobeno jeho schopností inkorporovat se do buněčných bílkovin. Nejvyšší cytotoxický účinek projevil Se-(Methyl)selenocystein. Tato sloučenina se neakumuluje ve struktuře proteinů a jeho potenciál tvořit methylselenol může být v nádorových buňkách vyšší (díky zvýšené aktivitě β -lyasy) a může zodpovídat za zvýšenou účinnost Se-(Methyl)selenocysteinu v porovnání s jinými sloučeninami selenu (Spallholz et al., 2004).

Zjistili jsme, že pozorovaný cytotoxický účinek seleničitanu sodného, seleno-L-methioninu a Se-(Methyl)selenocysteinu na buňky izolované z kolorektálního karcinomu závisí na použitém testu cytotoxicity. MTT, NR a Brilliant blue metody poskytovaly porovnatelné výsledky. Naopak WST a XTT testy nepřinesly pozitivní výsledky při sledování cytotoxického účinku sloučenin selenu (zejména u SeMCys) a lze je označit jako falešně negativní. Při plánování studie cytotoxicity by se proto mělo postupovat opatrně a k hodnocení cytotoxického účinku testovaných látek v *in vitro* studiích používat více metod.

7 Závěr

Tato práce se zabývala studiem vlivu seleničitanu sodného, L-selenomethioninu a Se-(Methyl)selenocysteinu na proliferaci tří linií buněk kolorektálního karcinomu (HT29, SW480, SW620). K vyhodnocení cytotoxicity bylo použito pět různých metod (WST, MTT, XTT, Brilliant blue a neutrální červeň). Buňky byly ovlivněny sloučeninami selenu v koncentraci 0-256 μM po dobu 48 hodin.

Největší cytotoxický účinek byl pozorován při ovlivnění buněk Se-(Methyl)selenocysteinem. U nejvyšší koncentrace klesla metabolická aktivita na 4-65% kontroly.

Buňky SW480 byly nejcitlivější při ovlivnění seleno-L-methioninem za použití MTT testu. Při použití seleničitanu sodného byl největší pokles metabolické aktivity u nejvyšší koncentrace zaznamenán u buněk SW620.

Nejcitlivější metodou byl MTT test. Brilliant blue a Neutral red testy vykazovaly porovnatelné výsledky. Metody WST a XTT naopak zklamaly při vyhodnocování cytotoxického účinku u jednotlivých sloučenin selenu. V určitých koncentracích vzrostla metabolická aktivita až na 195% kontroly

8 Seznamy

8.1 Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
ASK1	apoptózu regulující kinasa-1
BB	Brilliant blue
Bcl	protiapoptotický mitochondriální protein
Bl	blank (slepý vzorek)
CH ₃ SeH	methylselenol
(CH ₃) ₂ Se	dimethylselenid
(CH ₃) ₃ Se ⁺	trimethylselenoniový ion
CH ₃ Se-GalN	1-β-methylseleno-N-acetyl-D-galaktosamin
CMC	kritická micelární koncentrace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagles medium
DPBS	PBS bez Ca ²⁺ a Mg ²⁺ iontů
FTS	fetální telecí sérum
GPx	glutathion peroxidasa
GSSeSG	selenodiglutathion
H ₂ Se	selenovodík
K	kontrola
MAPK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
Na ₂ SeO ₃	seleničitan sodný
Na ₂ SeO ₄	selenan sodný
NR	neutrální červeň
ppm	parts per million
PSP	periodická soustava prvků
RSe ⁻	selenid
RSH	thiol
RSSe ⁻	selenopersulfidový anion

RSSeSR	selenotrisulfid
SeCys	selenocystein
SeMCys	Se-(Methyl)selenocystein
SeMet	seleno-L-methionin
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxid dismutasa
T3	trijodthyronin
T4	tyroxin
WST	4-(3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzen disulfonát
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5- karboxanilid)

8.2 Seznam použité literatury

- Allan, B.C., Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C., 1999. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu Rev Nutr.* 19, 1-16
- Barrington, J.W., Lindsay, P., James, D., Smith, S., Roberts, A., 1996. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Br. J. Obstet Gynaecol* 103, 130-132
- Blagosklonny, M.V., Pardee, A.B., 2001. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells. *Cancer Res* 61, 4301-5
- Berridge, M.V., Herst, P.M. and Tan, A.S., 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11, 127-152
- Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R., 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4, 14-19
- Combs Jr, G.F., 2005. Current evidence and research needs to support a health claim for selenium and cancer prevention. *J Nutr* 135, 343-7
- Combs Jr., G.F., Gray, W.P., 1998. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* 79, 179-192
- Drake, E.N., 2006. Cancer chemoprevention: selenium as prooxidant, not an antioxidant. *Med Hypotheses* 67, 318-322
- El-Bayoumy, K., 2001. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res* 475, 123-139
- El-Bayoumy, K., Sinha, R., 2004. Mechanism of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res* 551, 181-197
- Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., Suzuki, T., Morino, Y. and Soda, K., 1981. Enzymatic synthesis of selenocysteine in rat liver. *Biochemistry* 20, 4492-4496
- Fogh, J., Trempe, G., 1975. New human tumor cell lines. *Human tumor cells in vitro*. Plenum Press, New York, p.115-160
- Foster, S.J., Kraus, R.J. and Ganther, H.E., 1986. The metabolism of selenomethionine, Se-methylselenocysteine, their selenonium derivatives, and trimethylselenonium in the rat. *Arch Biochem Biophys* 251, 77-86
- Ganther, H.E., 1999. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanism of cancer prevention. *Carcinogenesis* 20, 1657-66
- Guilbert, L.J., Iscove, N.N., 1976. Partial replacement of serum by selenite, transferring, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature (Lond)* 263, 594-5

- Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 22, 3565-3576.
- Hawkes, W.C., Hornbostel, L., 1996. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biol Psychiatry* 39, 121-128
- Husbeck, B., Nonn, L., Peehl, D.M. and Knox, S.J., 2006. Tumor-selective killing by selenite in patient-matched pairs of normal and malignant prostate cells. *Prostate* 66, 218-225
- Ip, C., 1998. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr* 128, 1845-54
- Ip, C., Hayes, C., Budnick, R.M., Ganther, H.E., 1991. Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Res* 51, 595-600
- Ip, C., Lisk, D.J., 1994. Enrichment of selenium in allium vegetables for cancer prevention. *Carcinogenesis* 15, 1881-1885
- Ip, C., Thompson, H.J., Zhu, Z., Ganther, H.E., 2000. *In vitro* and *in vivo* studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. *Cancer Res* 60, 2882-2886
- Irmak, M.B., Ince, G., Ozturk, M., Cetin-Atalay, R., 2003. Acquired tolerance of hepatocellular carcinoma cells to selenium deficiency: a selective survival mechanism? *Cancer Res* 63, 6707-15
- Itoh, M., Suzuki, K.T., 1997. Effects of dose on the methylation of selenium to monomethylselenol and trimethylselenonium ion in rats. *Arch Toxicol* 71, 461-466
- Jackson, M.I., Combs Jr, G.F., 2008. Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. *Curr Opin Clin Metab Care* 11, 718-726
- Jariwalla, R.J., Gangapurkar, B. and Nakamura, D., 2009. Differential sensitivity of various human tumour-derived cell types to apoptosis by organic derivatives of selenium. *Br J Nutr* 101, 182-189
- Jonsson-Videsater, K., Bjorkhem-Bergman, L., Hossain, A., Soderberg, A., Eriksson, L.C., Paul, C., Rosen, A. and Bjornstedt, M., 2004. Selenite-induced apoptosis in doxorubicin-resistant cells and effects on the thioredoxin system. *Biochem Pharmacol* 67, 513-522
- Kim, Y.S., Jhon, D.Y., Lee, D.Y., 2004. Involvement of ROS and JNK1 in selenite-induced apoptosis in Chang liver cells. *Exp Mol Med* 36, 157-164
- Kobayashi, Y., Ogra, Y., Ishiwata, K., Takayama, H., Aimi, N., Suzuki, K.T., 2002. Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15932-6
- Krätsmár-Šmogrovič, J.: Všeobecná a anorganická chémia, Osveta, Banská Bystrica, 1994, s. 398

- Lee, S.R., Bar-Noy, S., Kwon, J., Levine, R.L., Stadtman, T.C., Rhee, S.G., 2000. Mammalian thioredoxin reductase: oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2521-2526
- Leibovitz, A., Stinson, J.C., McCombs, W.B., 3rd, McCoy, C.E., Mazur, K.C. and Mabry, N.D., 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562-4569
- Letavayova, L., Vlckova, V. and Brozmanova, J., 2006. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology* 227, 1-14
- Lu, J., 2001. Apoptosis and angiogenesis in cancer prevention by selenium. *Adv Exp Med Biol* 492, 131-45
- Lu, J., Jiang, C., Kaeck, M., Ganther, H., Vadhanavikit, S., Ip, C., Thompson, H., 1995. Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium. *Biochem Pharmacol* 50, 213-219
- Lu, J., Kaeck, M., Jiang, C., Wilson, A.C., Thompson, H.J., 1994. Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 47, 1531-1535
- Madeja, Z., Sroka, J., Nystrom, C., Bjorkhem-Bergman, L., Nordman, T., Damdimopoulos, A., Nalvarte, I., Eriksson, L.C., Spyrou, G., Olsson, J.M., Bjornstedt, M., 2005. The role of thioredoxin reductase activity in selenium-induced cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 69, 1765-1772
- McKeehan, W.L., Hamilton, W.G., Ham, R.G., 1976. Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2023-7
- Meuillet, E., Stratton, S., Cherukuri, D., Goulet, A.-C., Kagey, J., Porterfield, B. and Nelson, M., 2004. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: An update on current clinical trials and preclinical findings. *J Cell Biochem* 91, 443-458
- Pines, J., 1994. The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol* 5, 305-13
- Pines, J., 1995. Cyclins, CDKs and cancer. *Semin Cancer Biol* 6, 63-72
- Rayman, M.P., 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356, 233-241.
- Rayman, M.P., 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc* 64, 527-542
- Reid, M.E., Stratton, M.S., Lillico, A.J., Fakih, M., Natarajan, R., Clark, L.C., Marshall, J.R., 2004. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 69-74

- Repetto, G., del Peso, A., Zurita J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3(7):1125-31
- Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa, T., Takahashi, K., Niki, E., 2003. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem* 278 (10): 39428-34
- Schrauzer, G.N., 2001. Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. *J. Am Coll Nutr* 20, 1-4
- Scott, R., Macpherson, A., Yates, R.W., Hussian, B., Dixon, J., 1998. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol* 82, 76-80
- Seko, Y., Saito, Y., Kitahara, J., Imuta, N., 1989. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione *in vitro*. In Wendel, A., *Selenium in Biology and Medicine*. Springer Verlag, Berlin, pp. 70-73
- Shamberger, R.J., Frost, D.V., 1969. Possible protective effect of selenium against human cancer. *Can Med Assoc J.* 100, 682
- Shen, C.L., Song, W., Pence, B.C., 2001. Interactions of selenium compounds with other antioxidants in DNA damage and apoptosis in human normal keratinocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 385-390
- Shiobara, Y., Yoshida, T. and Suzuki, K.T., 1998. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine. *Toxicol Appl Pharmacol* 152, 309-314
- Spallholz, J.E., 1994. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic Biol Med.* 17, 45-64
- Spallholz, J.E., 1997. Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomed Environ Sci* 10, 260-270
- Spallholz, J.E., Boylan, L.M., Larsen, H.S., 1990. Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Ann NY Acad Sci* 587, 123-139
- Spallholz, J.E., Palace, V.P. and Reid, T.W., 2004. Methioninase and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an *in vitro* chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids. *Biochem Pharmacol* 67, 547-554
- Stapleton, S.R., 2000. Selenium: an insulin-mimetic. *Cell Mol Life Sci* 57, 1874-9
- Stapleton, S.R., Garlock, G.L., Foellmi-Adams, L., Kletzien, R.F., 1997. Selenium: potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase. *Biochim Biophys Acta* 1355, 259-69
- Stewart, M.S., Spallholz, J.E., Neldner, K.H., Pence, B.C., 1999. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic Biol Med* 26, 42-48

- Sunde, R.A. Selenium. In: Bowman, B.A., Russell, R.M., editors. Present knowledge in nutrition. 9th ed. Washington (DC): ILSI Press Inc.; 2006. s. 480-97
- www 1: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Selen>
- www 2: http://en.wikipedia.org/wiki/Bradford_protein_assay
- Weyermann, J., Lochmann, D. and Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 288, 369-376
- Whanger, P.D., 2002. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J Am Coll Nutr* 21, 223-232
- Whanger, P.D., 2004. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br J Nutr* 91, 11-28
- Wilson, A.C., Thompson, H.J., Schedin, P.J., Gibson, N.W., Ganther, H.E., 1992. Effect of methylated forms of selenium on cell viability and the induction of DNA strand breakage. *Biochem Pharmacol* 43, 1137-1141
- Xia, Z., Hill, K.E., Byrne, D.W., Xu, J., Burk, R.F., 2005. Effectiveness of selenium supplements in a low- selenium area in China. *Am J Clin Nutr* 81, 829-834
- Zeng, H., 2002. Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression. *J Nutr* 132, 674-9
- Zeng, H., Gerald F, Combs Jr, 2007. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *Journal of Nutritional Biochemistry* Jun 22, epub ahead