

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Nela Rozumová

**BIOTRANSFORMAČNÍ ASPEKTY NOVÝCH
KARBOCYKLIČKÝCH ANALOGŮ NUKLEOSIDŮ**

**Biotransformation aspects of novel carbocyclic nucleoside
analogs**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Helena Mertlíková-Kaiserová, PhD.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením projektu GA ČR
P303/11/1297.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

Chtěla bych poděkovat školitelce PharmDr. Heleně Mertlíkové-Kaiserové, PhD. za cenné rady, starostlivé vedení, trpělivost a za pomoc při zpracování výsledků.

Také chci poděkovat Ing. Pavle Plačkové za čas, který mi věnovala, za celkovou ochotu a vstřícnost a RNDr. Ivanu Votrubovi, DrSc., Ing. Evě Tloušťové a Karolíně Müllerové za účinnou pomoc především po metodické stránce. Dále děkuji celému týmu Biochemické farmakologie antimetabolitů z ÚOCHB AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obrovské “děkuji” patří mé rodině a příteli, především za psychickou podporu a pevné nervy.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	10
2.1 NUKLEOSIDY A NUKLEOSIDOVÉ ANALOGY	10
2.1.1 KARBOCYKlickÉ NUKLEOSIDOVÉ ANALOGY	11
2.1.2 ANALOGY KARBOCYKlickÝCH NUKLEOSIDŮ S NORBORNANOVÝM SKELETEM...13	
2.1.2.1 METABOLISMUS A MECHANISMUS ÚČINKU	15
2.2 GLUTATHION-CHARAKTERISTIKA A FUNKCE.....	17
2.3 BIOSYNTÉZA A DEGRADACE GLUTATHIONU	18
2.4 GLUTATHION A REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU.....	19
2.5 GSH-DEPENDENTNÍ ENZYMY A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA	20
2.5.1 GLUTATHION-S-TRANSFERASA	21
2.5.1.1 SUBCELULÁRNÍ LOKALIZACE GLUTATHION-S-TRANSFERAS.....	22
3. CÍLE PRÁCE.....	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1 MATERIÁL	24
4.1.1 STUDOVANÉ LÁTKY.....	24
4.1.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	24
4.1.3 CHEMIKÁLIE.....	24
4.1.4 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	26
4.2 METODY	27
4.2.1 KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE CCRF-CEM A INKUBACE BUNĚK S LÁTKAMI.....	27
4.2.2 STANOVENÍ POČTU BUNĚK A JEJICH VIABILITY	27
4.2.3 ATP TEST CYTOTOXICITY	28
4.2.4 XTT TEST CYTOTOXICITY.....	29
4.2.5 STANOVENÍ CELKOVÉHO A OXIDOVANÉHO GLUTATHIONU	31
4.2.6 KONCENTRACE PROTEINU	34
4.2.7 STANOVENÍ REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU	36
4.2.8 AKTIVITA GLUTATHION-S-TRANSFERASY	37
4.2.9 AKTIVITA GLUTATHIONREDUKTASY.....	39
4.2.1 KINETIKA KONJUGACE MS 254 S PURIFIKOVANOU PLACENTÁRNÍ GST	41

5. VÝSLEDKY A DISKUSE	43
5.1 CYTOTOXICITA LÁTEK MS 254, MS 255 A MS 320 V CCRF CEM BUŇKÁCH.....	43
5.2 VLIV MS 254 NA MNOŽSTVÍ CELKOVÉHO A OXIDOVANÉHO GLUTATHIONU	45
5.3 STANOVENÍ REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU POMOCÍ FLUORESCENČNÍ SONDY	47
5.4 VLIV GLUTATHIONU NA CYTOTOXICITU MS 254.....	49
5.5 VLIV MS 254 NA AKTIVITU GST A GR	52
5.6 KINETIKA KONJUGACE MS 254 S PURIFIKOVANOU PLACENTÁRNÍ GST	53
6. ZÁVĚR	56
7. PŘEHLED LITERATURY	57

SEZNAM ZKRATEK

<i>AMK</i>	<i>aminokyselina</i>
<i>ATP</i>	<i>adenosintrifosfát</i>
<i>BCA</i>	<i>bicinchoninová kyselina</i>
<i>BSA</i>	<i>hovězí sérový albumin</i>
<i>BSO</i>	<i>L-buthioninsulfoximin</i>
<i>CAT</i>	<i>katalasa</i>
<i>CDNB</i>	<i>1-chlor-2,4-dinitrobenzen</i>
<i>CM-H₂DCFDA</i>	<i>chlormethylový derivát dihydrodichlorfluoresceindiacetátu</i>
<i>CP</i>	<i>chlorpurin</i>
<i>CU</i>	<i>chlormočová kyselina</i>
<i>Da</i>	<i>dalton (atomová hmotnostní jednotka)</i>
<i>DTNB</i>	<i>5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina</i>
<i>EDTA</i>	<i>ethylendiamintetraoctová kyselina</i>
<i>FAD</i>	<i>flavinadenindinukleotid</i>
<i>GPx</i>	<i>glutathionperoxidasy</i>
<i>GR</i>	<i>glutathionreduktasa</i>
<i>GS-DNB</i>	<i>S-2,4-dinitrofenylglutathion</i>
<i>GSH</i>	<i>glutathion: redukovaná forma</i>
<i>GSSG</i>	<i>glutathion: oxidovaná forma</i>
<i>GST</i>	<i>glutathion-S-transferasa</i>
<i>GS-TNB</i>	<i>smíšený disulfid 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny</i>
<i>cGST</i>	<i>cytosolické glutathion-S-transferasy</i>
<i>mGST</i>	<i>mikrosomální glutathion-S-transferasy</i>
<i>HBSS</i>	<i>roztok solí dle Hanka</i>

<i>IC₅₀</i>	<i>koncentrace, při které je určitý proces inhibován z 50 %</i>
<i>K_M</i>	<i>Michaelisova konstanta</i>
<i>KPi</i>	<i>draselno-fosfátový pufr</i>
<i>MS-GSH</i>	<i>glutathion-S-konjugát s látkou MS 254</i>
<i>NAC</i>	<i>N-acetylcystein</i>
<i>NADPH</i>	<i>nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaná forma)</i>
<i>NaPi</i>	<i>sodno-fosfátový pufr</i>
<i>PBS</i>	<i>fyzilogický roztok puřrovaný fosfátem</i>
<i>PDA</i>	<i>detektor diodového pole</i>
<i>ROS</i>	<i>reaktivní formy kyslíku</i>
<i>SOD</i>	<i>superoxiddismutasa</i>
<i>SSA</i>	<i>sulfosalicylová kyselina</i>
<i>TNB</i>	<i>5-thio-2-nitrobenzoová kyselina</i>
<i>ÚOCHB AV ČR</i>	<i>Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky</i>
<i>V_{max}</i>	<i>maximální rychlost enzymové reakce</i>
<i>VP</i>	<i>vinylpyridin</i>
<i>XTT</i>	<i>2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxyanilid</i>

Abstrakt

Analogy karbocyklických nukleosidů s norbornanovým skeletem byly syntetizovány na ÚOCHB AV ČR a představují nová potenciální chemoterapeutika s významnou aktivitou proti Coxsackie virům. Základním cílem této práce bylo zkoumání metabolismu a mechanismu účinku původního karbocyklického nukleosidového analogu MS 254, jež se vyznačuje protivirovou a cytostatickou aktivitou. Částečně je pozornost věnována i dvěma strukturně příbuzným látkám (MS 255, MS 320). V této práci byla stanovena cytotoxicita těchto látek v buněčné kultuře a vliv látky MS 254 na množství celkového a oxidovaného glutathionu, na aktivitu glutathion-S-transferasy (GST), glutathionreduktasy (GR) a na oxidační stres. Dále byla stanovena kinetika přeměny MS 254 lidskou GST. Bylo potvrzeno, že ze tří sledovaných látek je nejvíce cytotoxická látka MS 255 a nejméně cytotoxická je látka MS 254. Dále bylo zjištěno, že látka MS 254 nenavozuje v buňce oxidační stres a že se vzrůstající koncentrací této látky se zvyšuje aktivita GST i GR. Michaelis-Mentenové konstanta pro konjugaci látky MS 254 s glutathionem (hlavní metabolická cesta) byla stanovena v řádech milimolů, což ukazuje na relativně nízkou afinitu substrátu ke GST.

Klíčová slova

Analogy karbocyklických nukleosidů, glutathion, glutathion-S-transferasa, glutathionreduktasa, reaktivní formy kyslíku, oxidační stres

Abstract

Carbocyclic nucleoside analogs with norbornane moiety that have been synthesized at IOCB AS CR, represent new potential chemotherapeutic agents with significant activity against Cocksackieviruses. The main objective of this work was to study the metabolism and mechanism of action of the original analog carbocyclic nucleoside MS 254, which is characterized by its antiviral and cytostatic effects. The attention was partially paid also to the two structurally related substances (MS 255, MS 320). In this work, we determined cytotoxicity of these compounds in cell culture and the effect of MS 254 on the amount of total and oxidized glutathione, activity of glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) and the effect on cellular oxidative stress. The kinetics of the conjugation of MS 254 by human GST was also studied. It was found that of the three substances tested MS 255 was the most cytotoxic and MS 254 was the least cytotoxic compound. It was further found that MS 254 does not cause significant oxidative stress and that it increases the activity of GST and GR in a dose-dependent manner. Michaelis-Menten constant of the conjugation of MS 254 with the glutathione (main metabolic pathway) was determined in the milimolar range, indicating a relatively low affinity of MS 254 for GST.

Key words

Analogs of carbocyclic nucleosides, glutathione, glutathione-S-transferase, glutathione reductase, reactive oxygen species, oxidative stress

1. ÚVOD

Nukleosidové a nukleotidové analogy představují historicky osvědčenou a hojně využívanou skupinu léčiv s využitím zejména v protivirové a protinádorové terapii. Tato problematika je stále aktuální, svědčí o tom např. celosvětové rozšíření viru HIV a řady dalších život ohrožujících virů. Faktem zůstává i vzestup onkologických onemocnění vzhledem ke stárnoucí populaci a stále dokonalejší diagnostice.

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky výrazně přispěl k rozvoji této terapeutické oblasti, a to zejména prostřednictvím Prof. RNDr. Antonína Holého, DrSc. Dr.h.c. mult. K jeho nejznámějším objevům patří léky účinné proti HIV infekci a zpomalení rozvoje AIDS (VireadTM, TruvadaTM, AtriplaTM), lék proti oparům (DuvirigelTM), pro léčbu chronické virové hepatitidy B (HepseraTM) a cytomegalovirové retinitidy (VistideTM)¹. Na základě této tradice zde vývoj antivirotik stále pokračuje a v souladu s aktuálními trendy a potřebami dnešní medicíny se poslední dobou orientuje převážně do oblasti RNA virů. Kromě hlavního směru výzkumu a vývoje zaměřeného na látky s aktivitou proti viru hepatitidy C se jedná i o méně známé skupiny RNA virů, které jsou mnohdy také původci život ohrožujících onemocnění. Do této skupiny můžeme zařadit např. enteroviry. Na ÚOCHB AV ČR byla v posledních letech připravena série inovačních karbocyklických nukleosidů účinná proti enterovirům. Některé deriváty vykazují také slibnou cytostatickou aktivitu na leukemických buňkách a mohly by se stát budoucími chemoterapeutiky nádorových onemocnění. Do této doby nejsou publikovány žádné informace o jejich metabolismu a mechanismu protivirového a cytostatického účinku. Příspěvkem k této problematice je i tato diplomová práce, která se zabývá tématy souvisejícími s hlavní metabolickou cestou těchto látek objevenou v naší laboratoři - konjugací s glutathionem (GSH). Jelikož je GSH zapojen v mnoha buněčných procesech, ať už jde o antioxidační ochranu, detoxikaci xenobiotik nebo rozvoj lékové rezistence, byla v této práci věnována pozornost vlivu studovaných látek na hladinu GSH, GSH-dependentních enzymů a reaktivních kyslíkových forem. Byl sledován také vliv hladiny buněčného GSH na cytotoxicitu těchto sloučenin. Poznatky získané v této práci představují nedílnou součást komplexní metabolické charakteristiky nových potenciálních léčiv.

¹ TM Trademark neboli ochranná známka

2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

2.1 Nukleosidy a nukleosidové analogy

Nukleosidy jsou součástí všech biologických systémů a mají významné fyziologické funkce.¹ Skládají se z purinové (adenin, guanin) nebo pyrimidinové (cytosin, thymin, uracil) báze, která je připojena N-glykosidovou vazbou na první uhlík (C1) β -D-ribosy nebo 2'-deoxy- β -D-ribosy.² Nukleosidy obsahující ribosu se označují jako ribonukleosidy a nukleosidy obsahující deoxyribosu jako deoxyribonukleosidy (obr. 1a). Po navázání fosfátového zbytku na C5' cukerné části nukleosidu dojde ke vzniku nukleotidu.³ Nukleotidy tvoří základní stavební kameny nukleových kyselin.⁴ V buňkách ale plní i mnoho dalších funkcí, zastávají úlohu krátkodobých přenašečů energie, aktivují molekuly v řadě biosyntéz a slouží jako zdroje fosfátové skupiny, jsou součástí i některých kofaktorů (NAD⁺, NADP⁺, FAD, koenzym A) a specifické nukleotidy slouží jako signální molekuly v buňce (cyklický adenosinmonofosfát).^{5,6,7}

Syntetické nukleosidové analogy jsou odvozené od přirozených nukleosidů modifikací jejich struktury a jsou v popředí zájmu zejména jako potenciální antivirotika, a protinádorová léčiva. Mají totiž schopnost inhibovat některé klíčové enzymy replikace nukleových kyselin a přerušovat tak životní cyklus nádorových buněk nebo virů.⁸

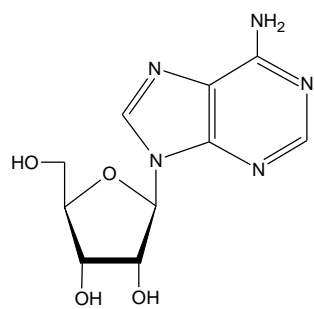
Molekulu nukleosidu lze modifikovat jak na cukerné složce, tak na heterocyklické bázi.¹ Nejznámějším zástupcem analogů s modifikovanou cukernou částí je acyklovir [9-(2'-hydroxyethoxymethyl)guanin] (obr.1b),⁹ vykazující protitherpetickou aktivitu. Ribosový skelet je u něj nahrazen acyklickým řetězcem a tím dojde ke vzniku enzymaticky odolnější N-alkylové vazby na guaninu. Po fosforylaci virovou thymidin-kinasou pak acyklovir-trifosfát inhibuje aktivitu DNA polymerasy a ukončuje elongaci řetězce virové DNA. Dalším příkladem purinového nukleosidového analogu, který inhibuje syntézu virové DNA a používá se k léčbě herpetických infekcí, je vidarabin (arabinosyladenin). Vidarabin má však menší účinnost a větší toxicitu než acyklovir.^{10,11}

V klinické praxi se využívá i několik dalších derivátů guaninu, např.: valaciklovir (ester acykloviru s L-valinem)¹² penciklovir (9-[4-hydroxy-3-(hydroxymetyl) butyl]guanin)¹³ nebo famciklovir (diacetát 6-deoxy-pencikloviru)¹⁴, které jsou také efektivně používány k potlačení nebo léčbě onemocnění způsobené herpes viry.^{15,16}

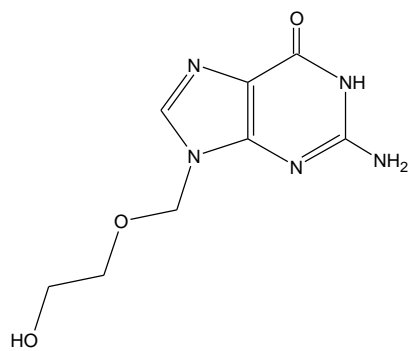
2.1.1 Karbocyklické nukleosidové analogy

N-glykosidická vazba mezi cukernou částí a heterocyklickou bází v derivátech přirozených nukleosidů je enzymaticky nestabilní, proto je pozornost věnována také tzv. karbocyklickým nukleosidům, kde kyslík cukerné složky je nahrazen methylenovou skupinou. Díky této jednoduché výměně mají karbocyklické analogy zvýšenou stabilitu a metabolickou odolnost vůči enzymatické degradaci, což je nespornou výhodou těchto látek.^{17,18}

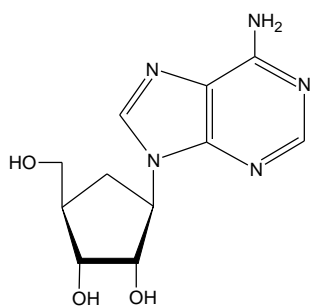
Objev nadějných protinádorových a antibiotických účinků některých přirozených karbocyklických nukleosidů např. aristeromycinu (obr. 1c), karbodinu a neplanocinu stimuloval vývoj syntetických karbocyklických analogů nukleosidů.^{19,20} Nejznámějšími zástupci syntetických karbocyklických nukleosidů jsou karbovir a abakavir (obr. 1d), u kterých byla prokázána inhibice replikace viru HIV, původce AIDS. Také tyto molekuly jsou fosforylovány buněčnými kinasami a během replikace nebo transkripce inkorporovány na místa přirozených nukleotidů do vznikajících nukleových řetězců. Předčasně tak zastavují prolougaci řetězce, protože neobsahují funkční skupiny pro vytvoření další fosfodiesterové vazby.^{17,21}



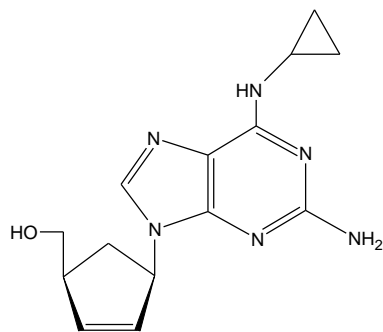
a



b



c



d

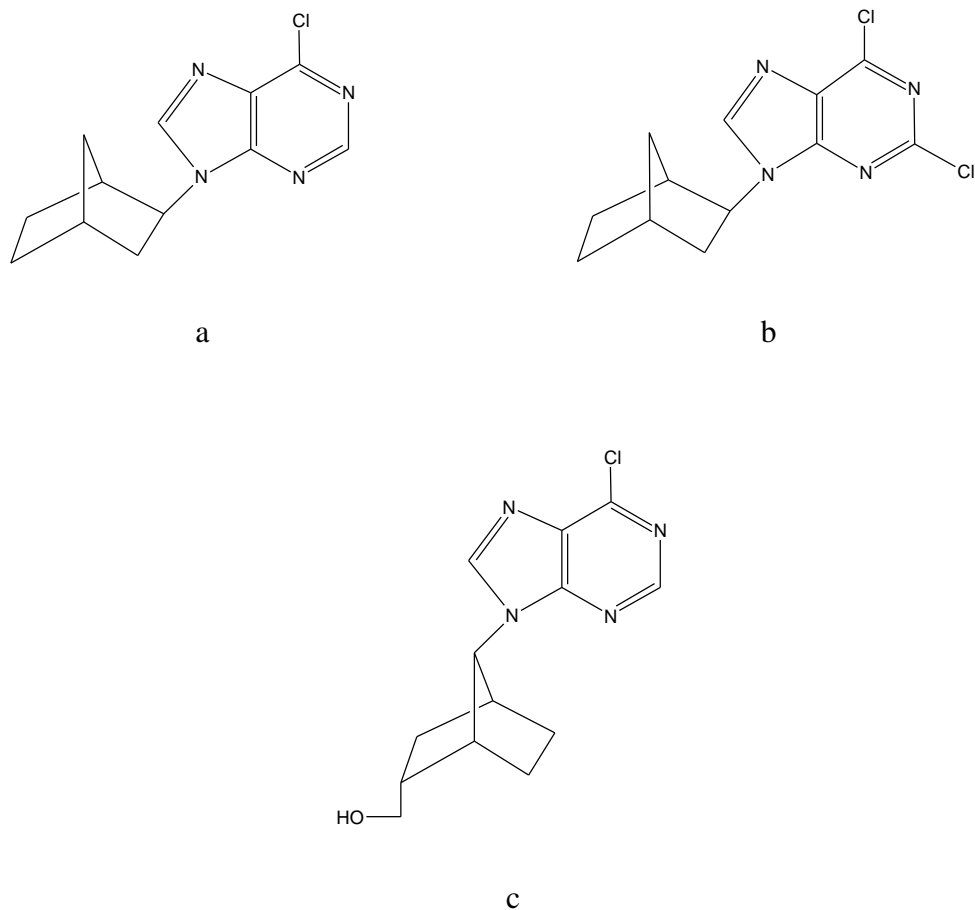
Obr. 1 Struktury nukleosidů. Přirozený nukleosid adenosin (a), guaninový nukleosidový analog acyklovir (b), přírodní karbocyklický analog aristeromycin (c), syntetický karbocyklický analog abakavir (d).

2.1.2 Analogy karbocyklických nukleosidů s norbornanovým skeletem

Předmětem této práce jsou analogy karbocyklických nukleosidů s norbornanovým skeletem, kde norbornan nahrazuje cukernou část (obr. 2). Tyto látky byly navrženy a připraveny na ÚOCHB AV ČR RNDr. Hubertem Hřebabeckým, CSc. a RNDr. Michalem Šálou, PhD. (bývalá skupina Prof. Holého). Představují nová potenciální chemoterapeutika s významnou aktivitou proti Coxsackievirům. Viry rodu Coxsackie patří do skupiny enterovirů a jsou původci širokého spektra onemocnění jako jsou infekce dýchacích cest, herpangina, „hand-foot-mouth“ syndrom, krvácivé záněty spojivek a zažívacího traktu. Způsobují také život ohrožující myokarditidy, aseptické meningitidy či encefalitidy. Kromě toho, epidemiologická data ukazují, že Coxsackieviry mohou hrát roli v patogenezi diabetu mellitus I. typu. V současné době nejsou dostupné žádné vakcíny ani antivirotika proti enterovirům.²²

Bylo zjištěno, že zejména 6-chlorpuriny substituované v poloze 9 různě modifikovanými bicykly (bicyklo [2.2.1] heptan/hepten tzn. norbornan/norbornen) mají výraznou protienterovirovou aktivitu při minimální nebo nulové toxicitě. Nahrazení atomu chlóru ostatními halogeny v poloze C-6 vedlo v případě náhrady fluorem k výraznému snížení, u ostatních k úplné ztrátě antivirové aktivity. Zavedení jiných funkčních skupin do této polohy, např.- 6-trifluormethyl či 6-kyano, mělo opět za následek významný pokles antivirové aktivity nebo její úplnou ztrátu. Z těchto důvodů byla pozornost dalšího výzkumu zaměřena na deriváty 6-chlor-9-norbornylpurinu, který vyniká svou chemickou stabilitou a významnou antivirovou aktivitou.²³

Pro metabolické studie a zkoumání mechanismu účinku byly z řady syntetizovaných látek vybrány tři sloučeniny, které se vyznačují vysokými antivirovými nebo cytostatickými účinky (MS 254, MS 255) nebo zajímavým strukturním prvkem v molekule, potenciálně ovlivňujícím charakter mechanismu účinku (MS 320). Tato práce je věnována zkoumání zejména látky MS 254, která představuje prototypovou strukturu celé skupiny.



Obr. 2 Struktury karbocyklických nukleosidů s norbornanovým skeletem.

(MS 254; 9-(bicyklo[2.2.1]hept-2-yl)-6-chlor-9H-purin) (a), MS 255; 9-(bicyklo[2.2.1]-hept-2-yl)-2,6-dichlor-9H-purin) (b), MS 320; [7-(6-chlor-9H-purin-9-yl)bicyklo-[2.2.1]hept-2-yl]methanol) (c).²

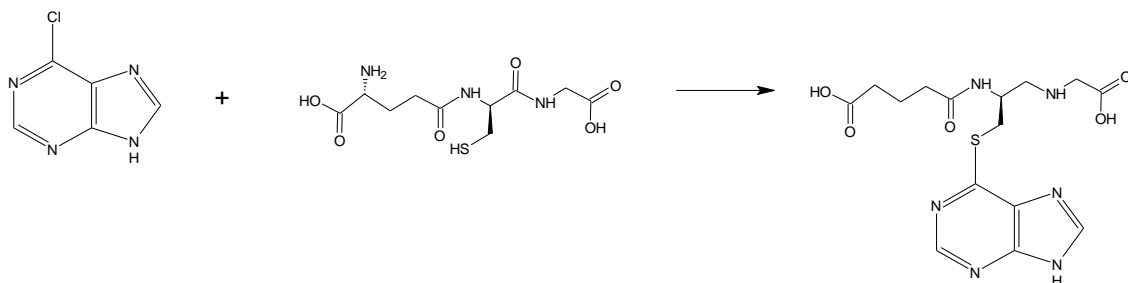
² MS 254: iniciály autora (RNDr. Michal Šála, PhD.) a číslo syntézy

2.1.2.1 Metabolismus a mechanismus účinku

Jelikož jde o látky zcela nové, mechanismus účinku není dosud objasněn a není prostudován ani metabolismus těchto látek. Z literatury jsou známy pouze metabolické přeměny samotné 6-chlorpurinové báze a samotného norbornanu.

6-Chlorpurin (6-CP) představuje syntetický antimetabolit, u něž byla prokázána protinádorová aktivita u zvířat i lidí.²⁴ Některé 6-CP analogy inhibují bakteriální RNA polymerasu.²⁵ První popsanou metabolickou cestou 6-CP je oxidace na 6-chlormočovou kyselinu (6-CU) xanthinoxidasou.²⁶ V této studii byly substrát i produkt identifikovány zároveň jako inhibitory xanthinoxidasy a urikasy. V návazné *in vivo* metabolické studii na potkanech byla pak pozorována přeměna radioaktivně značeného 6-CP na oxid uhličitý, 6-CU, alantoin, močovinu, močovou kyselinu a hypoxanthin.²⁷

V jiné studii byla popsána *in vitro* a *in vivo* konjugace 6-CP s glutathionem za vzniku S-(6-puriny)-glutathionu (obr. 3), který byl dále metabolizován na 6-merkaptopurin. 6-Merkaptopurin je široce používaný jako chemoterapeutikum a je přeměňován xanthinoxidasou a thiolmethyltransferasou na 6-thiomočovou kyselinu a 6-methylthiopurin.^{24,28}



Obr. 3 Konjugace 6-chlorpurinu s glutathionem za vzniku S-(6-puriny)-glutathionu

U norbornanu je popsána pouze hydroxylace cytochromem P-450 na *exo*- a *endo*-2-norborneol v poměru 3,4:1.²⁹ V případě, že by byla podobně metabolizována i norbornanová uskupení ve studovaných karbocyklických nukleosidech, mohly by teoreticky tyto metabolicky vnesené hydroxylové skupiny mimikovat 3'-OH skupinu přirozených nukleosidů a inkorporovat se po příslušné fosforylaci do nukleových kyselin mechanismem napodobujícím „klasické“

nukleosidové analogy. Pilotní metabolické studie provedené v naší laboratoři tomu ale zatím příliš nenasvědčují (nepublikovaná pozorování).

Díličí témata a úkoly této diplomové práce se odvíjejí především od poznatku, že v předběžných experimentech byl jako hlavní metabolit látky MS 254 identifikován její konjugát s glutathionem (publikace v přípravě).

2.2 Glutathion - charakteristika a funkce

Glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycin)³⁰ je nízkomolekulární tripeptid vyskytující se ve většině eukaryotických buněk.^{31,32} Zastává rozmanité biologické funkce, je důležitým antioxidantem podílejícím se na detoxikaci xenobiotik, kovů a peroxidu vodíku, má schopnost chránit thiolové skupiny proteinů před oxidací,³³ podílí se na konjugaci s látkami endogenního i exogenního původu³⁴ a je kofaktorem různých enzymů. Glutathion je především široce používán jako ukazatel oxidačního stresu.³⁵

V buňkách se glutathion fyziologicky vyskytuje převážně ve své redukované formě.³⁶ Spojením dvou molekul redukované formy disulfidovým můstkem přechází redukovaný glutathion (GSH) na oxidovanou formu (GSSG) a tím vytvoří redoxní pár. Stabilita glutathionu a jeho nízký redoxní potenciál jsou zajištěny neobvyklou γ -vazbou mezi glutamátem a cysteinem a to mu umožňuje odolávat peptidasám a dosahovat v buňce vysokých koncentrací.^{30,32}

Působením biotických a abiotických faktorů dochází ke tvorbě tzv. reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou za normálních podmínek fyziologickou součástí organismu. Při nadprodukcí ROS dochází ke vzniku oxidačního stresu. Jak glutathion s volnými radikály či jinými nebezpečnými sloučeninami reaguje, ubývá redukované formy a přibývá oxidované a poměr mezi GSH a GSSG klesá.^{35,37} Proto je poměr redukované a oxidované formy glutathionu důležitým ukazatelem míry oxidativního stresu.^{32,38,39} Fyziologický poměr GSH/GSSG je udržován působením glutathion-reduktasy, která s pomocí redukované formy nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) zpětně redukuje GSSG na dvě molekuly GSH a tím zajišťuje jeho regeneraci a opětovnou možnost zneškodnit radikály.^{32,38}

2.3 Biosyntéza a degradace glutathionu

Veškeré reakce vedoucí ke vzniku a degradaci glutathionu tvoří dohromady γ -glutamylový cyklus, navržený Meisterem a Orłowskim (1970).³² Syntéza glutathionu probíhá ve dvou krocích. Tyto reakce jsou katalyzované C-glutamylcysteinsynthetasou a glutathionsynthetasou.^{32,40} V prvním kroku spolu reaguje kyselina glutamová s cysteinem za vzniku peptidové vazby mezi α -aminoskupinou cysteinu a γ -karboxylovou skupinou kyseliny glutamové za spotřeby energie v podobě adenosintrifosfátu (ATP). Aminoskupina glycinu reaguje se zbytkem kyseliny fosforečné a uvolňuje anorganický fosfát. Vzniká dipeptid γ -glutamylcystein a následuje druhý krok reakce, kde se na C-konec dipeptidu připojí glycin za spotřeby ATP.^{32,41}

Degradační reakce glutathionu jsou součástí γ -glutamylového cyklu. Existují dvě možné cesty degradace GSH. První degradační krok tohoto cyklu zahrnuje štěpení a přenos γ -glutamylu na akceptorovou aminokyselinu (AMK) za současného uvolnění cysteinylglycinu. Reakce je katalyzována γ -glutamyltranspeptidasou.³² Druhý krok není tak specifický jako první, protože vazba mezi cysteinem a glycinem může být katalyzována více enzymy. Glutamát vázaný na akceptorovou AMK je přeměněn na 5-oxoprolin pomocí γ -glutamylcyklotransferasy. 5-Oxoprolin je nakonec přeměněn na glutamát za katalysy 5-oxoprolinasy. Vzniklý glutamát je využit na syntézu GSH nebo jiných peptidů. Další možnou degradační cestou je odštěpení glycinu vyžadující aktivitu karboxypeptidasy. Tento enzym odštěpuje glycin z GSH-konjugátů i z GSSG.³⁸

2.4 Glutathion a reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku vznikají působením různých fyzikálních a chemických faktorů na živé organismy jako nevyhnutelné vedlejší produkty aerobního metabolismu.⁴² Jsou to částečně redukované formy atmosférického kyslíku, vznikající přenosem jednoho, dvou nebo čtyř elektronů při redukcí kyslíku na vodu. Nejméně nebezpečný je oxidový anion (O^{2-}). Peroxidový anion (O_2^{2-}) je sám o sobě reaktivní a může tvořit peroxid vodíku. Nejnebezpečnější je superoxidový anion radikál ($O_2^{\cdot-}$), který se může navzájem redukovat i oxidovat, neboli podléhat dismutaci, a být tak za pomoci superoxidodismutasy přeměněn na peroxid vodíku.^{42,43,44} Reaktivní kyslíkové formy jsou schopné neomezené oxidace různých buněčných komponent. Mají destruktivní účinky na lipidy, nukleové kyseliny i proteiny.³⁷ Nejreaktivnější je hydroxylový anion radikál ($OH^{\cdot-}$), který pravděpodobně spouští řetězovou reakci šíření ROS. Jakmile $OH^{\cdot-}$ vznikne, okamžitě reaguje s jakoukoliv molekulou, která je v dosahu. Mezi ROS se řadí i neradikálové molekuly jako jsou peroxid vodíku, ozón a singletový kyslík.^{42,43,45}

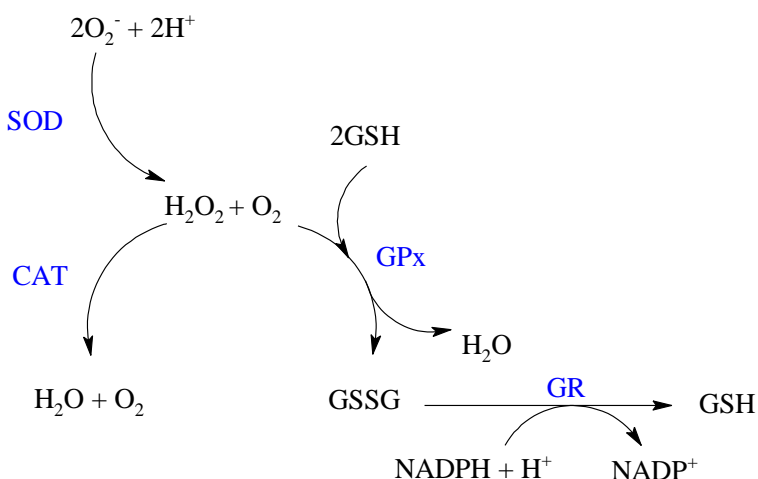
Existuje mnoho potenciálních zdrojů ROS, které vznikají vlivem nejrůznějších stresů, ale projevit se mohou i za běžných fyziologických podmínek. Dělí se na endogenní a exogenní. Mezi endogenní zdroje se řadí reakce, které se podílí na bazálním metabolismu, jako je fotosyntéza či únik elektronů v respiračním systému mitochondrií. Další možné zdroje mohou vznikat během fotorespirace glykolát oxidasy v peroxisomech a při tvorbě peroxidu vodíku. Mezi exogenní zdroje patří ionizující radiace, UV záření, tepelný šok či látky znečišťující ovzduší jako je ozón nebo oxid siřičitý.^{42,43} Zvýšení tvorby ROS během stresu může představovat pro buňky hrozbu, ale ROS mohou také fungovat jako signály pro aktivaci stresové reakce a obranné cesty, lze je považovat za ukazatele buněčného stresu a sekundární posly podílející se na signálu stresové reakce.⁴³

Reaktivní formy kyslíku mohou být odstraňovány pomocí glutathionu buď přímou reakcí s ním nebo reakcí s oxidovanými substráty, které opět zredukuje. Silné antioxidační účinky GSH jsou podmíněny obsahem thiolové skupiny v jeho molekule.^{35,46} Glutathion slouží také jako donor elektronů pro řadu detoxikačních (antioxidačních a biotransformačních) enzymů.

2.5 Glutathion-dependentní enzymy a antioxidační ochrana

Buňky mají mnoho systémů k udržení homeostázy redoxního prostředí pomocí působení antioxidačních enzymů.³⁷ Enzymy spojené s metabolismem ROS lze rozdělit podle toho, zda se přímo uplatňují při tvorbě, degradaci nebo ve vzájemných přeměnách nebo zda mají k metabolismu ROS nepřímý vztah. Mezi enzymy podílející se přímo na tvorbě ROS patří např. NADPH-oxidasa, xanthinoxidasa či cyklooxygenasa. Hlavními enzymy antioxidační ochrany jsou katalasa (CAT) a glutathionperoxidasy (GPx). Existují však enzymy, které mají nepřímý vztah s metabolismem ROS, kam se řadí glutathionreduktasa (GR) a glutathion-S-transferasa (GST).^{47,48}

Glutathionperoxidasy detoxikují široké množství volných kyslíkových metabolitů a chrání tak před oxidačním poškozením. Katalyzují redukci peroxidu vodíku redukovaným glutathionem, přičemž GSH přechází na GSSG a vzniká voda. Glutathion je následně v γ -glutamylovém cyklu regenerován pomocí GR, která katalyzuje přeměnu GSSG na GSH za účasti NADPH. Glutathionreduktasa je flavoprotein, obsahující dvě identické molekuly flavinadenin nukleotidu (FAD). Jedná se o termostabilní enzym.⁴⁹ Vyskytuje se ve všech typech buněk rostlin i živočichů.^{31,50,51} Superoxiddismutasa (SOD) a myeloperoxidasa jsou enzymy přeměňující jednu reaktivní formu kyslíku na druhou. SOD transformuje superoxidový anion na biatomický kyslík a peroxid vodíku. Peroxid vodíku lze eliminovat GPx nebo CAT za vzniku vody (obr. 4).^{48,52}

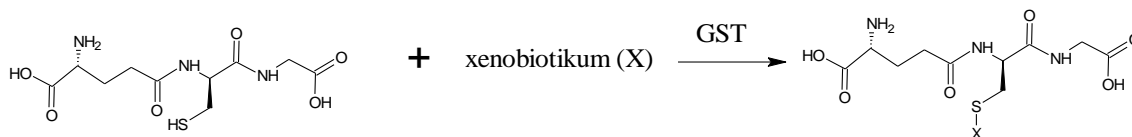


Obr. 4 Schéma působení antioxidačních enzymů.

2.5.1 Glutathion-S-transferasa

Glutathion-S-transferasy jsou všudypřítomné enzymy, podílející se na ochraně buněk před toxickými látkami, hrají také důležitou roli při buněčné signalizaci a v dalších buněčných procesech. Glutathion-S-transferasy tvoří velmi důležitou skupinu enzymů, nalezených ve všech třídách eukaryot a bakterií, včetně osmnácti lidských GST podjednotek.⁵³

Strukturně rozlišujeme dvě supergenové rodiny kódující proteiny s GST aktivitou. Za prvé jsou to enzymy nacházející se v cytosolu, které jsou rozpustné a za druhé mikrosomální, neboli membránově vázané enzymy. Nejvyšší aktivita GST byla pozorována v játrech a následně v ledvinách.^{54,55} Tyto enzymy katalyzují konjugační reakce thiolové skupiny glutathionu s rozmanitými elektrofilními sloučeninami (obr. 5). Vznikají tak produkty více rozpustné ve vodě. Glutathion-S-konjugáty mohou být dále metabolizovány a štěpeny na volné aminokyseliny glutamát, glycin a cystein. Cystein je následně acetylován za vzniku finální merkapturové kyseliny. Tyto S-alkylované deriváty N-acetylcysteinu jsou následně vyloučeny močí.⁵⁶



Obr. 5 Schéma obecné GST reakce v detoxikaci xenobiotik. Konjugace glutathionu s elektrofilními sloučeninami za vzniku glutathion-S-konjugátu.

Glutathion-S-transferasy se uplatňují také při vzniku lékové rezistence, jako nádorové markery nebo v biotechnologických aplikacích. Vznik a rozvoj mnohočetné lékové rezistence, tj. schopnosti rakovinných buněk získat odolnost k různým lékům, je častou komplikací protinádorové léčby vedoucí mnohdy až k jejímu selhání. Bylo navrženo několik mechanismů jejího vzniku i opatření, jak se tomuto multifaktoriálnímu jevu vyhnout.^{57,58} Jedním z mechanismů získání rezistence je zvýšená exprese a tím i aktivita enzymů, které mohou zvýšit detoxikaci léčiv a xenobiotik. Glutathion-S-transferasa katalyzuje přímou konjugaci některých

chemoterapeutik s glutathionem, při které vznikají polární deriváty léčiv, tedy méně toxické GSH-S-konjugáty, které mohou být snadněji vyloučeny z buňky a snižovat tak účinek chemoterapie. U rezistentních nádorových buněk proto mnohdy nalézáme zvýšenou hladinu GST a produkci většího množství GSH. Pokud by se podařilo snížit hladinu intracelulárního GSH, například pomocí látek blokujících jeho syntézu (L-buthioninsulfoximin), citlivost rezistentních nádorových buněk k léčbě by mohla být zvýšena.^{46,59,60}

2.5.1.1 Subcelulární lokalizace glutathion-S- transferas

Cytosolické GST (cGST) savců se hojně vyskytují v játrech a ledvinách. Strukturně tvoří homodimery nebo heterodimery skládající se z více než dvaceti různých podjednotek o molekulové hmotnosti 24,5 až 28,5 kDa.^{54,61} Klasifikovat tyto enzymy lze více způsoby, např.: podle struktury podjednotek se dělí do osmi různých tříd: Alfa, Mu, Pí, Theta, Kappa, Zeta a Omega, podle kinetických vlastností do čtyř tříd: Alfa, Mu, Pí a Theta.⁶²

Mikrosomální GST (mGST) jsou hojně se vyskytující enzymy u většiny aerobních organismů. Podílejí se na buněčné ochraně před reaktivními elektrofilny a oxidačním stresem.⁶³ Mikrosomální GST se strukturálně i imunologicky liší od cGST. Strukturně se jedná o homotrimery, složené ze shodných podjednotek s molekulovou hmotností 17,2 kDa. Tyto trimery mohou být aktivovány sulfhydrylovými činidly (N-ethylmaleinimid), které se kovalentně váží na cysteinový zbytek jednotlivých polypeptidů a slouží tak k získání čisté mGST bez kontaminace cGST. Podle podjednotek a struktury se mGST dělí do čtyř tříd (I, I, III, IV).^{64,65}

3. CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- Zpracovat materiály z nejnovější odborné literatury a vypracovat literární rešerši o problematice karbocyklických nukleosidů s norbornanovým skeletem se zaměřením na jejich biotransformační přeměny a vztah k metabolismu glutathionu

Experimentální část

- Stanovit cytotoxicitu látek MS 254, MS 255 a MS 320 v CCRF-CEM buňkách pomocí XTT a ATP testu a porovnání obou metod
- Stanovit vliv MS 254 na množství celkového a oxidovaného glutathionu v ovlivněných buňkách
- Zjistit vliv látky MS 254 na intracelulární tvorbu reaktivních forem kyslíku
- Popsat vztah glutathionu k cytotoxicitě MS 254
- Stanovit vliv látky MS 254 na aktivitu vybraných GSH-dependentních enzymů (glutathion-S-transferasa, glutathionreduktasa)
- Charakterizovat kinetiku přeměny MS 254 lidskou glutathion-S-transferasou *in vitro* (stanovení Michaelisovy konstanty - K_M a maximální rychlosti reakce - V_{max})

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Studované látky

Název	Dodavatel
MS 254	ÚOCHB AV ČR
MS 255	ÚOCHB AV ČR
MS 320	ÚOCHB AV ČR

4.1.2 Biologický materiál

Název	Původ	Dodavatel
Glutathionreduktasa	kvasnice (<i>S. cerevisiae</i>)	Sigma Aldrich, USA
Glutathion-S-transferasa	lidská placenta	Sigma Aldrich, USA
CCRF-CEM	lidské lymfoblasty	ATCC, USA

4.1.3 Chemikálie

Název	Čistota	Dodavatel
Acetonitril	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
N-acetyl-L-cystein	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
BCA Kit I		Sigma Aldrich, USA
BCA Kit II		Sigma Aldrich, USA
L-buthioninsulfoximin	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
Cell Titer Glo [®] Kit		Promega, USA
Cell Proliferation Kit II [®]		Roche, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný, bezvodý	p.a.	Serva, Německo

Dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát	p.a.	Serva, Německo
Dimethylsulfoxid	≥ 99 %	Sigma Aldrich, UK
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina	≥ 98 %	Sigma Aldrich, USA
Ethylendiamintetraoctová kyselina	99+ %	Sigma Aldrich, USA
Fyziologický roztok pufovaný fosfátem	p.a.	Sigma Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan draselný, bezvodý	p.a.	Serva, Německo
Hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát	p.a.	Serva, Německo
1-Chlor-2,4-dinitrobenzen	99+ %	Sigma Aldrich, USA
5-(6-)Chlormethyl-2,7-dihydrodichlor- -fluoresceindiacetát		Invitrogen, USA
Chlorovodíková kyselina (35 %)	p.a.	Penta, ČR
Medium RPMI 1640		Sigma Aldrich, USA
Methanol	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
Nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukováná forma)	p.a.	Serva, Německo
Oxidovaný glutathion	≥ 98 %	Sigma Aldrich, USA
Peroxid vodíku (31,74 %)		Calbiochem, USA
Redukovaný glutathion	≥ 98 %	Sigma Aldrich, USA
Roztok solí dle Hanka		Sigma Aldrich, USA
Sérový albumin	≥ 98 %	Sigma Aldrich, USA
Sulfosalicylová kyselina	95 %	Sigma Aldrich, USA
Tris (hydroxymetyl) aminomethan	99,8 %	Serva, Německo
Trypanová modř		Invitrogen, USA
Vinylpyridin	97 %	Sigma Aldrich, USA

4.1.4 Přístroje a pomůcky

Přístroj	Specifikace	Dodavatel
Centrifuga	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Německo
Centrifuga	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Německo
Cytometr	FACSAria™	BD Biosciences, USA
UV-VIS Detektor	PDA 2996	Waters, USA
Filtr	0,2 µm x 47 mm	Supelco, USA
Filtrační zkumavky	Ultrafree-MC GV	Millipore, USA
Hamiltonova pipeta	Rainin Instrument	Hamilton, USA
HPLC kolona	Supelcosil LC-18-S	Sigma Aldrich, USA
Kapalinový chromatograf	Alliance™ HT 2795	Waters, USA
Mikrotitrační destička	průhledná	TPP, Švýcarsko
Mikrotitrační destička	černá	Nunclon, Dánsko
Mikrováhy	CPA	Sartorius, Německo
Multikanálová pipeta	Nichipet	Nichiryo, Japonsko
pH-metr	pHm 240	Meterlab, Francie
Pipety automatické	Nichipet	Nichiryo, Japonsko
Počítač buněk	Countess Cell Counter	Invitrogen, USA
Shaker	Termo-shaker TS 100C	Biosan, Lotyšsko
UV-VIS Spektrofotometr	DU 800	Beckman Coulter, USA
Spektrofotometr	Tecan Genios	Schoeller, ČR
Spektrofotometr	Tecan Sunrise	Schoeller, ČR
Třepací inkubátor	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Německo
Ultrazvuk	Soniprep 150	MSE, UK
Ultrazvuk	Elmasonic	P-lab a.s., ČR
Váhy	M214	BEL engineering, Itálie
Vodní lázeň	TW20	Julabo, Německo
Vortex	MS 3 basic	IKA, Německo

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace buněčné linie CCRF-CEM a inkubace buněk s látkami

Experimentálním modelem byla zvolena linie lidských leukemických lymfoblastických buněk CCRF-CEM (ATCC, CRL 330147). Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5% obsahem CO₂ v plastových kultivačních lahvičkách (25 cm²). Kultivačním médiem bylo RPMI 1640, ke kterému bylo přidáno 10 % fetálního bovinního séra, 2 mmol.l⁻¹ stabilizovaného glutaminu (GlutaMax[®]) a směs antibiotik (200 U.ml⁻¹ penicilinu a 200 µg.ml⁻¹ streptomycinu) Buňky byly pasážovány dvakrát týdně.

Pro stanovení množství glutathionu, aktivity GST a GR byly buňky nasazeny do 20 ml kultivačního média v množství $2 \cdot 10^6$ buněk na kultivační lahvičku (25 cm²). Po 24 hod v termostatu (37 °C, 5 % CO₂) bylo k buňkám přidáno 50 µl zásobního roztoku studované látky (finální koncentrace 0 - 20 µmol.l⁻¹ MS 254) a po 72hod inkubaci byly buňky spočítány, centrifugací promyty fyziologickým roztokem (PBS) a buněčné pelety byly uloženy do -20 °C pro pozdější stanovení celkového GSH, aktivity GST nebo GR.

4.2.2 Stanovení počtu buněk a jejich viability

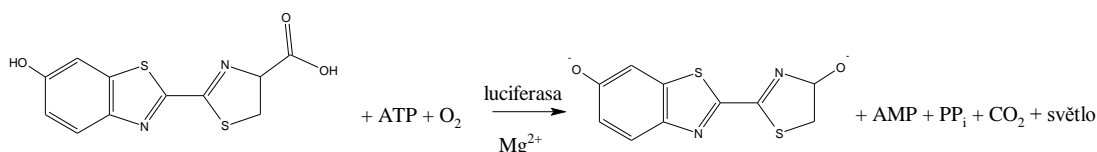
Viabilita buněk byla stanovena barvením trypanovou modří. Trypanová modř je z živých buněk aktivně transportována přes buněčnou membránu. Živé buňky zůstanou bezbarvé, zatímco mrtvé buňky, u nichž je porušena integrita buněčné membrány a její transportní mechanismy, se rychle zbarví na modro.

Do mikrozkušavky bylo pipetováno 50 µl buněčné suspenze a k ní byl přidán stejný objem roztoku 0,4% trypanové modří. Obsah mikrozkušavky byl důkladně protřepán a napipetován do jednorázové plastové Bürkerovy komůrky. Počet a viabilita buněk byly stanoveny automatickým počítačem buněk Countess[™], který pracuje na principu mikroskopické obrazové analýzy. Buněčná suspenze byla pro všechny pokusy ředěna na koncentraci $1 \cdot 10^5$ živých buněk.ml⁻¹.

4.2.3 ATP test cytotoxicity

Princip:

Metoda je založená na kvantifikaci ATP, který signalizuje přítomnost metabolicky aktivních buněk. Činidlo (luciferin/luciferasa) se přidává přímo k buňkám kultivovaným v médiu (obr. 6) Tento typ testu je velmi citlivý. Vzniklý luminiscenční signál je přímo úměrný množství ATP a množství ATP je přímo úměrné počtu buněk přítomných v kultuře. Pro tento test byl použit komerční kit CellTiter-Glo (Promega).⁶⁶



Obr. 6 Princip ATP testu. Enzym luciferasa využívá energii z ATP v přítomnosti luciferinu, kyslíku a hořečnatých iontů a tím okysličuje luciferin za vzniku oxyluciferinu a produkce světla.

Pracovní postup:

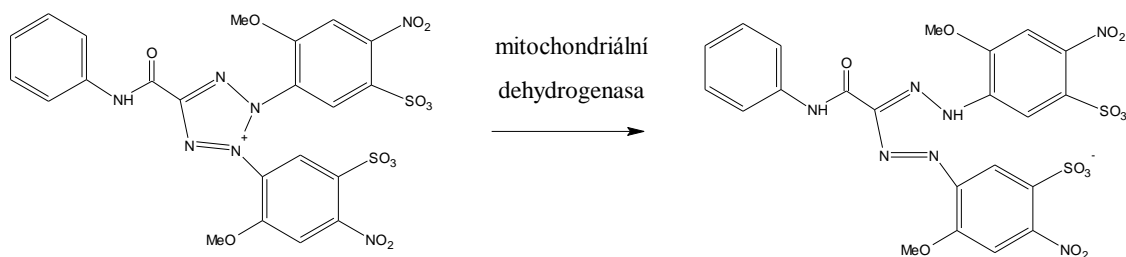
CEM buňky byly pipetovány do bílé 96-ti jamkové destičky v množství $1 \cdot 10^5$ buněk na jamku ve 100 μl suspenze. Buňky byly ponechány v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) a po 24hod kultivaci byly ovlivněny testovanými látkami (výsledné koncentrace 0 - 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MS 254, 0 - 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MS 255 a 0 - 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MS 320), které byly přidávány v objemu 5 μl ze zásobních roztoků. Po 72hod inkubaci (37 °C, 5 % CO₂) bylo do každé jamky přidáno 100 μl roztoku obsahujícího systém luciferin/luciferasa (součást kitu). Luminescence produktu byla měřena po 10 min při pokojové teplotě.

V případě experimentů určených ke stanovení vlivu množství GSH na cytotoxicitu látky MS 254 byly buňky preinkubovány 24 hod s 5 mmol.l^{-1} N-acetylcysteinem (NAC, donor -SH skupiny) nebo s 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ L-buthionin-sulfoximinem (BSO, inhibitor syntézy GSH) a následně inkubovány 72 hod s látkou MS 254 v rozmezí výsledných koncentrací 0 - 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Zásobní roztoky BSO, NAC a MS 254 byly přidávány vždy v objemu 2,5 μl .

4.2.4 XTT test cytotoxicity

Princip:

XTT test je založen na přeměně žluté tetrazoliové soli XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxyanilid] na oranžový formazan mitochondriálními dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk (obr. 7). Vznikající barvivo je rozpustné ve vodě a může být přímo kvantifikováno za použití spektrofotometru. Odpadá tedy složité promývání a rozpouštění krystalů nutné u starší MTT metody. Absorbance produktu je měřena při vlnové délce 492 nm a referenční vlnové délce 690 nm. Pro tento test byl použit komerční kit Cell Proliferation Kit II (Roche).^{67, 68}



Obr. 7 Princip XTT testu. Přeměna žluté tetrazoliové soli mitochondriální dehydrogenasou na oranžově zbarvený formazan.

Pracovní postup:

CEM buňky byly pipetovány do průhledné 96-ti jamkové destičky v množství $1 \cdot 10^5$ buněk na jamku ve 100 μl suspenze. Buňky byly ponechány v inkubátoru (37 °C, 5 % CO_2) a po 24hod kultivaci byly ovlivněny testovanými látkami (v rozmezí výsledných koncentrací 0 - 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MS 254, 0 - 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MS 255 a 0 - 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MS 320). Zásobní roztoky látek byly přidávány v objemu 5 μl . Po 72hod inkubaci (37 °C, 5 % CO_2) bylo do každé jamky přidáno 50 μl XTT směsi obsahující složky A:B v poměru 50:1 (A: sodná sůl 3'-[1-(fenylaminokarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzen sulfonové kyseliny v mediu RPMI 1640;

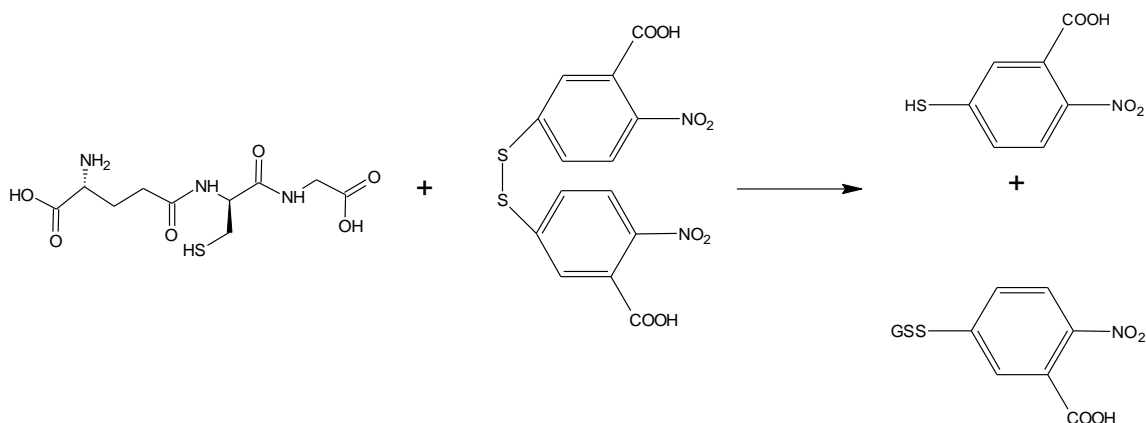
B: N-methyl-dibenzopyrazin-methylsulfát v PBS). Absorbance produktu byla měřena po 1hod inkubaci v termostatu (37 °C, 5 % CO₂) při 492 nm.

V případě experimentů určených ke stanovení vlivu množství GSH na cytotoxicitu látky MS 254 byly nejprve buňky preinkubovány 24 hod s 5 mmol.l⁻¹ NAC (donor -SH skupiny) nebo s 50 μmol.l⁻¹ BSO (inhibitor syntézy GSH) a následně 72 hod ovlivněny látkou MS 254 v rozmezí výsledných koncentrací 0 - 30 μmol.l⁻¹. Zásobní roztoky BSO, NAC i MS 254 byly k buněčné suspenzi přidávány po 2,5 μl.

4.2.5 Stanovení celkového a oxidovaného glutathionu v buněčných lyzátech

Princip:

Pro kvantifikaci GSH byla použita optimalizovaná enzymatická recyklační metoda dle Tietzeho.⁶⁹ Je využívána reakce thiolových skupin GSH s kyselinou 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou (DTNB) za vzniku žluté 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB). Současně vzniká smíšený disulfid (GS-TNB) (obr. 8), ze kterého jsou působením glutathionreduktasy uvolněny další molekuly TNB. Smíšený disulfid se stanoví spektrofotometricky při 405 nm. GSSG se na GSH převádí redukcí pyridinovým koenzymem NADPH opět za katalýzy glutathionreduktasy. Pro selektivní stanovení oxidované formy glutathionu je nutné přítomný GSH maskovat 2-vinylpyridinem (VP).^{33, 70}



Obr. 8 Princip kvantifikace glutathionu. Reakce glutathionu s kyselinou 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou za vzniku žluté 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny a smíšeného disulfidu.

Pracovní postup:

Nejdříve byly připraveny pracovní roztoky a standardy GSH a GSSG dle tab. 1.

Tab. 1 Příprava pracovních roztoků a standardů pro stanovení celkového a oxidovaného glutathionu.

Reagencie	Popis	Příprava
KPi pufr/EDTA	145 mmol.l ⁻¹ /1 mmol.l ⁻¹ , pH 7,4	1,77 g KH ₂ PO ₄ 10,35 g K ₂ HPO ₄ 0,18 g EDTA upravit objem na 500 ml upravit pH kyselinou fosforečnou
SSA	13%	15,6 g SSA 119 ml ultračisté vody 1 ml 37% HCl
SSA	1,3% v 10 mmol.l ⁻¹ HCl	10 x zředěný 13% roztok
DTNB	6 mmol.l ⁻¹ - uchovat na ledu	0,0024 g DTNB 1 ml KPi pufru
NADPH	9 mmol.l ⁻¹ - uchovat na ledu	6,7 mg NADPH 1 ml KPi pufru
GSH	10 mmol.l ⁻¹ - uchovat na ledu	3,06 mg GSH 1 ml 1,3% SSA
GSSG	10 mmol.l ⁻¹ - uchovat na ledu	6,12 mg GSSG 1 ml 1,3% SSA

Před stanovením byly buňky (viz kap. 4.2.1) resuspendovány ve 400 µl 1,3% sulfosalicylové kyseliny (SSA), sonikovány v ultrazvuku a stočeny po dobu 15 min, 20 800 x g, při 4 °C. Pro stanovení byl použit supernatant. Část vzorku byla odebrána pro pozdější stanovení bílkoviny. Pro analýzu oxidovaného glutathionu byl zásobní roztok standardu GSSG 2000x zředěn a do 96-ti jamkové destičky bylo pipetováno 100 µl vzorku/standardu (dle tab. 2) a 10 µl vinylpyridinu. Směs byla inkubována 1 hod na třepačce při 27 °C.

Tab. 2 Příprava standardů pro derivatizaci s 2-vinylpyridinem.

Zásobní GSSG μl	1,3% SSA μl	Výsledná GSSG μmol.l ⁻¹
100	0	5
80	20	4
60	40	3
40	60	2
30	70	1,5
20	80	1
10	90	0,5
0	100	0

Pro vlastní stanovení GSH/GSSG bylo do další 96-ti jamkové destičky pipetováno 50 μl vzorku/standardu/standardu s VP (dle tab. 3). Pro dosažení uvedených finálních koncentrací byl zásobní roztok standardu pro GSH 500x zředěn a zásobní roztok standardu pro GSSG byl ředěn 2000x.

Tab. 3 Příprava standardů pro vlastní stanovení GSH/GSSG.

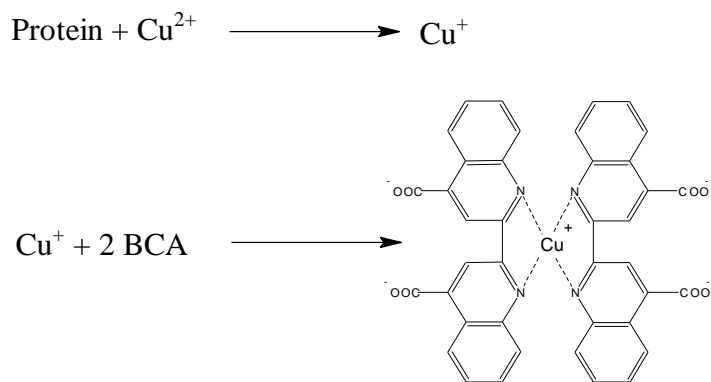
Zásobní GSH/GSSG μl	1,3% SSA μl	Výsledná GSH μmol.l ⁻¹	Výsledná GSSG μmol.l ⁻¹
50	0	20	5
40	10	16	4
30	20	12	3
20	30	8	2
15	35	6	1,5
10	40	4	1
5	45	2	0,5
0	50	0	0

Automatickou multikanálovou pipetou bylo k oběma destičkám přidáno 100 μl pracovního roztoku (12,6 ml draselno-fosfátového pufru (KPi)/EDTA; 0,7 ml DTNB a 0,7 ml NADPH) a následně 50 μl roztoku glutathionreduktasy (7 ml KPi/EDTA pufru a 50 μl GR), kterým byla reakce nastartována. Absorbance byla odečítána v pravidelných intervalech (0 s, 75 s, 150 s) při vlnové délce 405 nm. Měření bylo provedeno ve třech nezávislých experimentech, vždy v triplicátech.

4.2.6 Koncentrace proteinu

Princip:

Principem metody je reakce proteinů s měďnatými kationty v alkalickém prostředí. Dochází k redukci na měďné ionty, které pak reagují s bicinchoninovou kyselinou (BCA) za vzniku barevného komplexu (obr. 9) s absorpčním maximem při 562 nm. Pro toto stanovení byl použit komerční BCA assay kit (Sigma Aldrich).⁷¹



Obr. 9 Princip BCA metody. Reakce proteinů s měďnatými kationty za vzniku měďných kationtů a následný vznik barevného BCA Cu^+ komplexu.

Pracovní postup:

Ze zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly připraveny kalibrační roztoky o koncentraci 0,5 - 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (dle tab. 4).

Tab. 4 Příprava kalibračních roztoků BSA o koncentraci 0,5 - 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

voda μl	Zásobní BSA μl	Výsledná koncentrace $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
1000	0	0
990	10	0,5
900	100	5
800	200	10
600	400	20
400	600	30

Do 96-ti jamkových destiček bylo napipetováno 150 μl vzorku/standardu. Ke všem vzorkům a standardům bylo multikanálovou pipetou přidáno 150 μl pracovního roztoku (pufr/BCA/4% CuSO_4 v poměru 1:1:0,04) a destička byla inkubována 1 hod při 60 °C. Po inkubaci byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Data byla zpracována z kalibrační přímky metodou lineární regrese.

4.2.7 Stanovení reaktivních forem kyslíku

Princip:

Produkce ROS v buňkách byla sledována pomocí fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA, což je chlormethylový derivát dihydrodichlorfluoresceindiacetátu. Dostává se do buněk pasivní difúzí, kde působením buněčných esteráz jsou jeho acetátové skupiny štěpeny a jeho thiol-reaktivní chlormethylová skupina reaguje s glutathionem a dalšími thioley. Následuje oxidace produktu přítomnými ROS za vzniku fluoreskujícího aduktu. Oxidovaná forma je excitována zářením o vlnové délce 485 nm a poskytuje fluorescenční signál při emisní vlnové délce 535 nm.⁷²

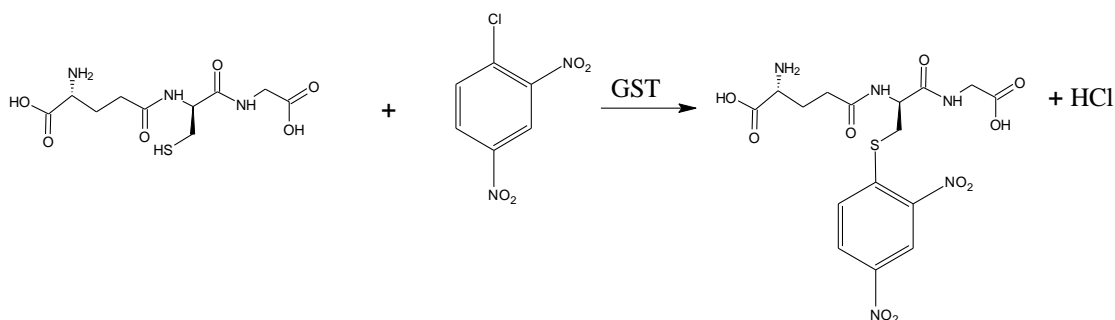
Pracovní postup:

Vliv látky MS 254 na ROS byl stanoven jak za normálních podmínek, tak za podmínek oxidačního stresu (v přítomnosti H₂O₂). CEM buňky byly nanášeny na 6-ti jamkovou destičku v koncentraci $5 \cdot 10^5$ buněk na jamku v objemu 5 ml. Destička byla kultivována 24 hod (37 °C, 5 % CO₂) a poté bylo přidáno 50 µl testované látky (v rozmezí výsledných koncentrací 0 - 20 µmol.l⁻¹ MS 254). Po 72hod inkubaci při stejných podmínkách byly buňky spočítány a z každého vzorku byl odebrán objem obsahující 500 000 buněk. Vzorky byly centrifugovány 5 min, 250 x g, při laboratorní teplotě. Po odsátí supernatantu byly pelety resuspendovány v 0,5 ml pracovního roztoku 1 µmol.l⁻¹ CM-H₂DCFDA v roztoku solí dle Hanka (HBSS) a ponechány 1 hod při 37 °C. Poté byly vzorky opět stočeny 5 min, 250 x g, při laboratorní teplotě. Supernatant byl znovu odsát a pelety byly resuspendovány v 1 ml čistého HBSS a bez prodlení analyzovány na průtokovém cytometru. Pro vliv MS 254 na hladinu ROS za podmínek oxidačního stresu byl postup stejný, ale pelety byly po preinkubaci se sondou promyty v 1 ml 1 mmol.l⁻¹ H₂O₂ v HBSS a inkubovány další hodinu při 37 °C. Intenzita zelené fluorescence v jednotlivých vzorcích byla vyhodnocena v softwaru FlowJo po vyloučení mrtvých a vážně poškozených buněk a odečtení hodnoty pozadí (autofluorescence neznačených buněk).

4.2.8 Aktivita glutathiontransferasy

Princip:

Ke spektrofotometrickému stanovení aktivity GST byl použit specifický substrát 1-chlor-2,4-dinitrobenzen (CDNB), který je spolu s GSH v přítomnosti enzymu GST přeměněn na S-2,4-dinitrofenylglutathion (GS-DNB) (obr. 10). GS-DNB je spektrofotometricky měřitelný při vlnové délce 340 nm.⁵⁶



Obr. 10 Princip stanovení aktivity GST. Reakce glutathionu s 1-chlor-2,4-dinitrobenzenem za vzniku konjugátu S-2,4-dinitrofenylglutathionu.

Pracovní postup:

Nejprve byly připraveny pracovní roztoky dle tab. 5.

Tab. 5 Příprava pracovních roztoků a standardů pro stanovení aktivity GST.

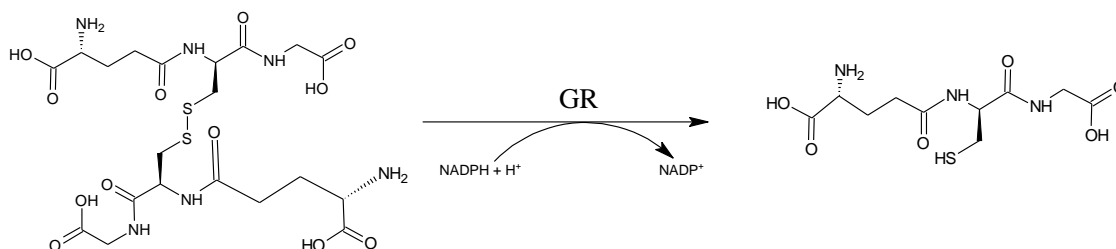
Reagencie	Popis	Příprava
CDNB	0,1 mol.l ⁻¹	30,4 mg rozpustit v 1,5 ml 96% ethanolu
GSH	0,1 mol.l ⁻¹	46,1 mg rozpustit v 1,5 ml vody
NaPi pufr	0,1 mol.l ⁻¹ , pH 6,5	1,79 g Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O rozpustit v 50 ml vody 0,78 g NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O rozpustit v 50 ml vody smíchat v poměru 1:3 za kontroly pH

Do kyvety bylo pipetováno 970 μl 0,1 mol.l^{-1} sodno-fosfátového pufru (NaPi), pH 6,5; 10 μl 0,1 mol.l^{-1} GSH a 10 μl cytosolu (příprava viz kap. 4.2.1). Směs byla protřepána a reakce byla startována přidáním 10 μl 0,1 mol.l^{-1} CDNB (v ethanolu). Enzymová aktivita byla stanovena spektrofotometricky jako nárůst absorbance při 340 nm. Poměr konjugovaného substrátu byl vypočítán z odečtené absorbance po 1 min. Tabelovaná hodnota extinkčního koeficientu konjugátu je 9,6 $\text{mmol.l}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Koncentrace produktu byla vypočítána pomocí Lambert-Beerova zákona.

4.2.9 Aktivita glutathionreduktasy

Princip:

Glutathionreduktasa katalyzuje redukci GSSG pomocí NADPH na dvě molekuly GSH (obr. 11). NADPH absorbuje při vlnové délce 340 nm.⁵¹



Obr. 11 Princip stanovení aktivity GR. Redukce oxidovaného glutathionu na dvě molekuly redukováného glutathionu za účasti NADPH.

Pracovní postup:

Nejprve byly připraveny pracovní roztoky dle tab. 6.

Tab. 6 Příprava pracovních roztoků a standardů pro stanovení aktivity GR.

Reagencie	Popis	Příprava
KPi pufr/EDTA	0,2 mol.l ⁻¹ /2 mmol.l ⁻¹ pH 7,0	10,45 g K ₂ HPO ₄ rozpustit v 300 ml vody 8,17 g KH ₂ PO ₄ rozpustit v 300 ml vody 0,37 g EDTA smíchat v poměru 1:1 upravit pH pomocí K ₂ HPO ₄
GSSG	20 mmol.l ⁻¹	7,35 mg rozpustit v 0,6 ml vody
NADPH/TRIS-Cl	2 mmol.l ⁻¹ /10 mmol.l ⁻¹ pH 7,0	1 mg NADPH rozpustit v 0,6 ml vody 0,61 g TRIS-Cl rozpustit v 500 ml vody

Do kyvety bylo pipetováno 500 μl 0,2 mol.l^{-1} KPi pufru/2 mmol.l^{-1} EDTA, pH 7,0; 50 μl 20 mmol.l^{-1} GSSG, 50 μl 2 mmol.l^{-1} NADPH (v 2 mmol.l^{-1} TRIS-Cl, pH 7,0); 10 μl vzorku, směs byla promíchána a doplněna vodou do 1 ml. Enzymová aktivita byla stanovena spektrofotometricky při 340 nm. Poměr konjugovaného substrátu byl vypočítán z odečtené absorbance po 1 min s použitím extinkčního koeficientu 9,6 $\text{mmol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Koncentrace vzniklého konjugátu byly vypočítány pomocí Lambert-Beerova zákona.

4.2.10 Kinetika konjugace MS 254 s purifikovanou placentární glutathion-S-transferasou

Princip:

Glutathion-S-transferasa katalyzuje konjugaci výchozí látky (substrátu, MS 254) s glutathionem za vzniku glutathion-S-konjugátu (MS-GSH). Substrát i produkt jsou následně z inkubační směsi extrahovány methanolem a analyzovány na kapalinovém chromatografu Waters AllianceTM HT 2795. Látky byly detekovány detektorem diodového pole (PDA) v rozpětí vlnových délek 210-400 nm.

Ke kvantifikaci substrátu a produktu byly použity autentické standardy 6 mmol.l⁻¹MS 254 a 1 mmol.l⁻¹ MS-GSH.

Pracovní postup:

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky (dle tab. 7). Celkový objem reakční směsi byl 30 µl.

Tab. 7 Příprava zásobních roztoků a složení inkubační směsi pro stanovení kinetiky konjugace MS 254 s GST.

Pořadí	Reagencie	Zásobní koncentrace	Pipetovaný objem µl	Výsledná koncentrace
1.	voda	-	14,5	-
2.	KPi, pH 7,4	0,5 mmol.l ⁻¹	3,0	0,05 mmol.l ⁻¹
3.	GSH	10 mmol.l ⁻¹	3,0	1 mmol.l ⁻¹
4.	MS 254	0-5 mmol.l ⁻¹	3,0	0-0,5 mmol.l ⁻¹
5.	BSA	1 mg.ml ⁻¹	0,7	0,1 mg.ml ⁻¹
6.	GST	26 U.ml ⁻¹	5,8	5 U.ml ⁻¹

Do mikrozkušavek byly v pořadí dle tab. 7 pipetovány všechny zásobní roztoky. Všechny vzorky byly vždy doplněny BSA na koncentraci proteinu 0,1 mg.ml⁻¹.

Do kontrolního vzorku (bez látky MS 254) bylo pipetováno 15,2 μl vody; 3,0 μl KPi pufry; 3,0 μl GSH; 3,0 μl BSA namísto 3,0 μl MS 254 a 5,8 μl GST. Reakce byla startována přidáním GST, směs byla intenzivně promíchána, stočena a inkubována 10 min při 37 °C. Reakce byla zastavena přidávkem 69,8 μl methanolu a vymražována při -20 °C po dobu 1 hod. Po uplynutí této doby byla směs stočena po dobu 5 min, 19 300 x g, při laboratorní teplotě a následně přepipetována do filtračních zkumavek (Millipore, Ultrafree-MC, GV 0,22 μm) a znovu stočena po dobu 1 min, 19 300 x g, při laboratorní teplotě a přepipetována do otevřených mikrozkušavek připravených k analýze na HPLC. Pro separaci byla použita kolona Supelcosil LC-18-S (150 mm x 4,6 mm I. D., 5 μm), teplota kolony byla 30 °C a teplota autosampleru 5 °C. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,9 ml.min⁻¹. Typ eluce a volba mobilní fáze jsou uvedeny v tab. 8.

Tab. 8 Experimentální podmínky HPLC analýzy.

Parametr	Podmínky	Změny MF
Typ eluce	0 - 5 min isokratická	100 % C
	5 - 6 min	100 % C - 100 % B
	6 - 20 min gradientová nelineární	100 % B - 50 % A/50 % B
	20 - 35 min gradientová lineární	50 % A/50 % B - 100 % A
	35 - 40 min očištění kolony	100 % A
	40 - 41 min	100 % A - 100 % C
	41 - 65 min ekvilibrace	100 % C
Mobilní fáze	A: 50 mmol.l ⁻¹ KPi + 50% acetonitril	
	B: 50 mmol.l ⁻¹ KPi + 10% acetonitril	
	C: 50 mmol.l ⁻¹ KPi	

Na jeden vzorek bylo potřeba 30 ml A, 20 ml B a 30 ml C. Všechny mobilní fáze byly před analýzou zfiltrvány přes ultrafiltr (0,2 μm). Celková doba jedné analýzy trvala 65 min. Chromatogramy byly vyhodnoceny v programu Empower 3 (Chromatography Data System) integrací plochy pod píkem.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Cytotoxicita látek MS 254, MS 255 a MS 320 v CCRF-CEM buňkách. Srovnání XTT a ATP testu.

Existuje celá řada testů pro stanovení cytotoxicity. Jsou to metody založené na měření metabolické aktivity (ATP, XTT), poškození membrán (LDH, calcein) nebo na přímém měření počtu buněk. V této práci byly srovnány dva často používané testy cytotoxicity z první skupiny, tedy ATP a XTT test. Testy byly provedeny na proliferující buněčné linii odvozené od T-lymfoblastů. Byla hodnocena cytotoxicita tří karbocyklických nukleosidů s norbornanovým skeletem. Pomocí softwaru GraphPad Prism byla metodou nelineární regrese vypočtena koncentrace inhibitoru, při které za daných podmínek (72hod inkubace) dochází k 50% poklesu sledovaného parametru odrážejícího viabilitu buněk (IC_{50}). V tab. 9 jsou uvedeny výsledné hodnoty.

Tab. 9 Cytotoxicita látek MS 254, MS 255 a MS 320 vyjádřená jako IC_{50} . Srovnání ATP a XTT testu.

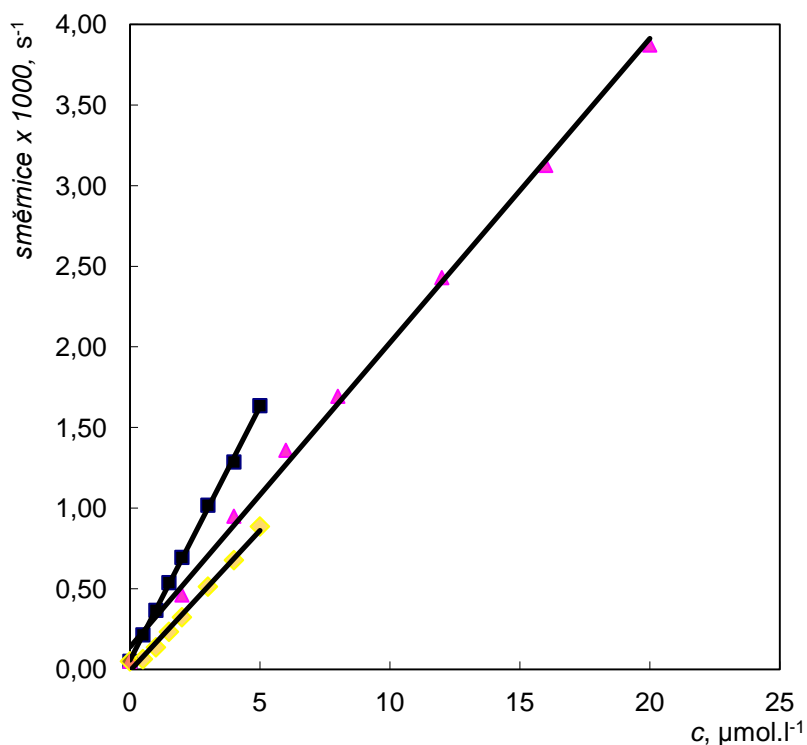
	IC_{50} $\mu\text{mol.l}^{-1}$	
	ATP test	XTT test
MS 254	$10,20 \pm 0,99$	$11,89 \pm 1,30$
MS 255	$3,13 \pm 0,11$	$2,72 \pm 0,44$
MS 320	$6,02 \pm 1,14$	$4,67 \pm 0,69$

Z literatury je známo, že ATP test vyniká především svou citlivostí.^{66,73} Nevýhodou proti jiným cytotoxicitním testům je relativně vysoká cena. XTT test bývá nejčastěji porovnáván s MTT testem, přičemž kolorimetrické stanovení buněčné viability pomocí XTT testu bylo prokázáno jako rychlejší a spolehlivější.⁷⁴ Proti ATP testu dosahují jak MTT tak XTT nižší citlivosti a nevýhodou je i možná interference s redox-aktivními látkami (přímá redukce tetrazoliové soli sledovanou látkou). V těchto případech vede použití testu k falešně pozitivním výsledkům.

Oba testy jsou založeny na rozdílných principech stanovení metabolicky aktivních buněk, nicméně naměřené hodnoty IC_{50} jsou v rámci odchylek srovnatelné a jednoznačně z nich vyplývá, že ze tří sledovaných látek je nejvíce cytotoxická látka MS 255 a nejméně cytotoxická je látka MS 254.

5.2 Vliv MS 254 na množství celkového a oxidovaného glutathionu v buněčných lyzátech

Pro každou koncentraci standardu byla vypočítána směrnice z hodnot závislosti absorbance na čase (měřeno při čase 0, 75 a 150 s), tyto směrnice byly vyneseny do grafu proti koncentraci příslušného standardu (obr. 12).



Obr. 12 Kalibrace pro stanovení glutathionu. GSH (0 - 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) ▲, GSSG (0 - 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) ■ a derivatizovaný GSSG (0 - 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) ◆.

Jednotlivé body grafu byly proloženy regresními přímkami, ze kterých byly získány následující rovnice: $y = 3,1 \cdot 10^{-4} + 0,6 \cdot 10^{-4} s$ $R^2 = 0,9993$ (pro GSH)

$$y = 1,9 \cdot 10^{-4} + 1,4 \cdot 10^{-4} s \quad R^2 = 0,9978 \quad (\text{pro GSSG})$$

$$y = 1,7 \cdot 10^{-4} - 0,1 \cdot 10^{-4} s \quad R^2 = 0,9911 \quad (\text{pro GSSG-VP})$$

Z rovnic jednotlivých přímek byly vypočítány koncentrace celkového a oxidovaného glutathionu. Koncentraci redukovaného glutathionu lze určit z výpočtu $\text{GSH} = \text{celkový GSH} - 2x \text{GSSG}$. Hodnoty koncentrací byly dále přepočítány na množství proteinů. Měření bylo provedeno třikrát. V tab. 10 jsou uvedeny výsledky

v absolutních hodnotách a v procentuálním vyjádření. Je zřejmé, že hladina celkového glutathionu se vzrůstající koncentrací látky MS 254 klesá. Při 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentraci látky MS 254 se hladina GSH snížila 3,7x oproti kontrolnímu vzorku. Oxidovaný glutathion zůstal u všech vzorků pod detekčním limitem metody. Celkový glutathion se v tomto případě tedy rovná redukovanému glutathionu. Z toho můžeme usuzovat, že buňky nebyly vystaveny významnému oxidačnímu stresu.

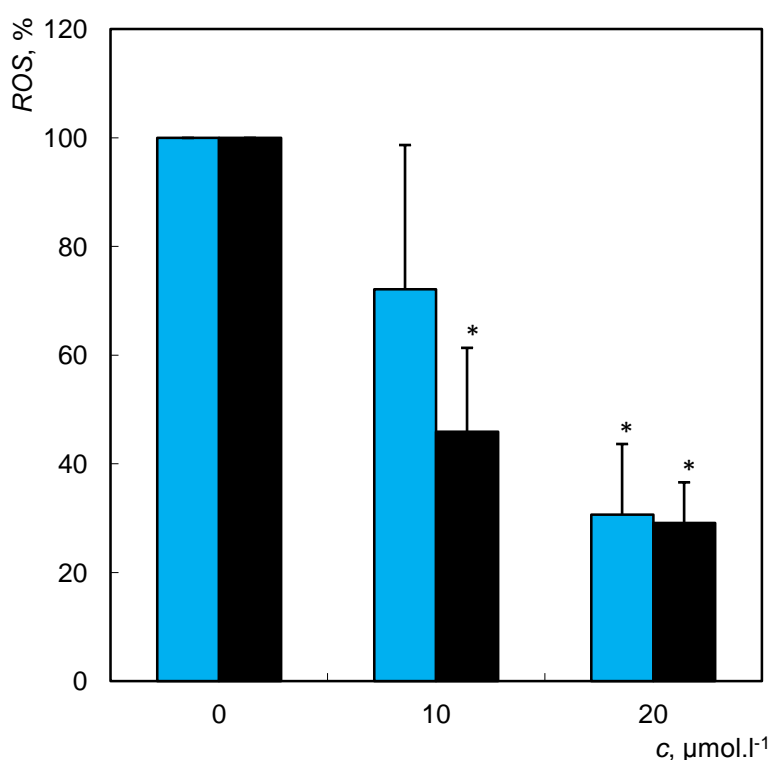
Tab. 10 Vliv látky MS 254 na obsah celkového glutathionu v CCRF-CEM buňkách po 72hod inkubaci. Měření bylo provedeno třikrát.

MS 254 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	Celkový GSH/protein $\mu\text{mol.mg}^{-1}$	Celkový GSH %
0	$0,22 \pm 0,07$	100
5	$0,19 \pm 0,07$	87
10	$0,18 \pm 0,08$	79
15	$0,08 \pm 0,03^*$	42
20	$0,05 \pm 0,03^*$	27

Získané výsledky byly podrobeny analýze rozptylu (ANOVA) s následným Dunnettovým srovnávacím testem na hladině pravděpodobnosti 95 % (*P < 0,05 vůči vzorku bez MS 254) pomocí softwaru GraphPad Prism. Statisticky významný rozdíl vůči kontrole představují dvě nejvyšší koncentrace látky MS 254.

5.3 Stanovení reaktivních forem kyslíku pomocí fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA

Tento experiment byl proveden pro ověření pozorování, že MS 254 nezpůsobuje oxidační stres. Stanovení ROS probíhalo za dvou různých podmínek. Nejdříve byl sledován vliv MS 254 na hladinu ROS za normálních podmínek a poté vliv MS 254 na hladinu ROS za podmínek oxidačního stresu. Reaktivní kyslíkové formy byly detekovány pomocí fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA. Výsledné hodnoty intracelulární hladiny ROS jsou graficky znázorněny v obr. 13.



Obr. 13 Vliv vzrůstající koncentrace látky MS 254 (v rozmezí 0 - 20 μmol.l⁻¹) na intracelulární hladinu reaktivních kyslíkových forem. Hodnoty fluorescence jsou vyjádřeny relativně k látkou neovlivněnému vzorku (100 %). MS 254 bez peroxidu (modrá), MS 254 + 1mmol.l⁻¹ H₂O₂ (černá). Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. Výsledky byly podrobeny analýze rozptylu (ANOVA) s následným Dunnettovým srovnávacím testem (*P < 0,05 vůči vzorku bez MS 254).

Z obr. 13 je viditelné, že intracelulární hladina ROS klesá se vzrůstající koncentrací látky MS 254 a to jak za normálních podmínek, tak za podmínek oxidačního stresu (s peroxidem). Tento výsledek je poměrně překvapivý. Vzhledem k tomu, že látka MS 254 ve $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentraci signifikantně snižuje buněčný glutathion (viz kapitola 5.2), dalo by se očekávat, že vyvolá naopak zvýšenou citlivost buněk vůči oxidačnímu stresu. Pozorované snížení ROS po aplikaci látky do buněčné kultury bychom mohli vysvětlit například indukcí některých antioxidačních enzymů působením látky.

5.4 Vliv glutathionu na cytotoxicitu MS 254

V dalších experimentech byla sledována možnost ovlivnění cytotoxicity látky MS 254 intracelulární hladinou glutathionu při použití ATP a XTT cytotoxického testu. K tomuto účelu byla využita preinkubace buněk s N-acetylcysteinem (NAC) jako donorem –SH skupin a L-buthioninsulfoximinem (BSO) jako specifickým inhibitorem γ -glutamylcysteinsynthetasy, což je krok určující rychlost syntézy GSH.⁷⁵⁻⁷⁷ Tyto látky tak umožňují pohodlně modulovat hladinu GSH v buňce za účelem studia jeho vlivu na sledované procesy.

Pomocí softwaru GraphPad Prism byla metodou nelineární regrese vypočtena koncentrace inhibitoru, při které za daných podmínek (72hod inkubace) dochází k 50% poklesu sledovaného parametru odrážejícího viabilitu buněk (IC_{50}). V tab. 11 jsou uvedeny vypočítané hodnoty IC_{50} . Grafické znázornění je pak uvedeno na obr. 14 na str. 51 (a,b).

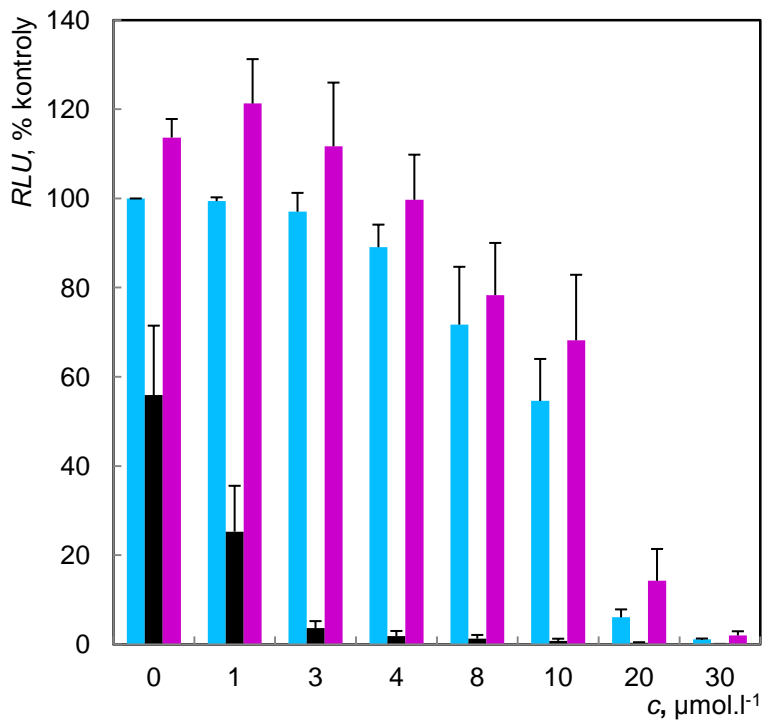
Tab. 11 Vliv intracelulární hladiny GSH na cytotoxicitu MS 254. Hodnoty IC_{50} stanovené XTT a ATP testem pro látku MS 254 bez preinkubace a s preinkubací 5 mmol.l⁻¹ N-acetylcysteinem nebo 50 μ mol.l⁻¹ L-buthioninsulfoximinem. Měření bylo provedeno třikrát.

	IC_{50} μ mol.l ⁻¹	
	ATP test	XTT test
MS 254	10,20 \pm 0,99	12,88 \pm 1,35
MS 254 + NAC	10,99 \pm 1,14	11,89 \pm 1,30
MS 254 + BSO	0,82 \pm 0,25*	7,37 \pm 1,88*

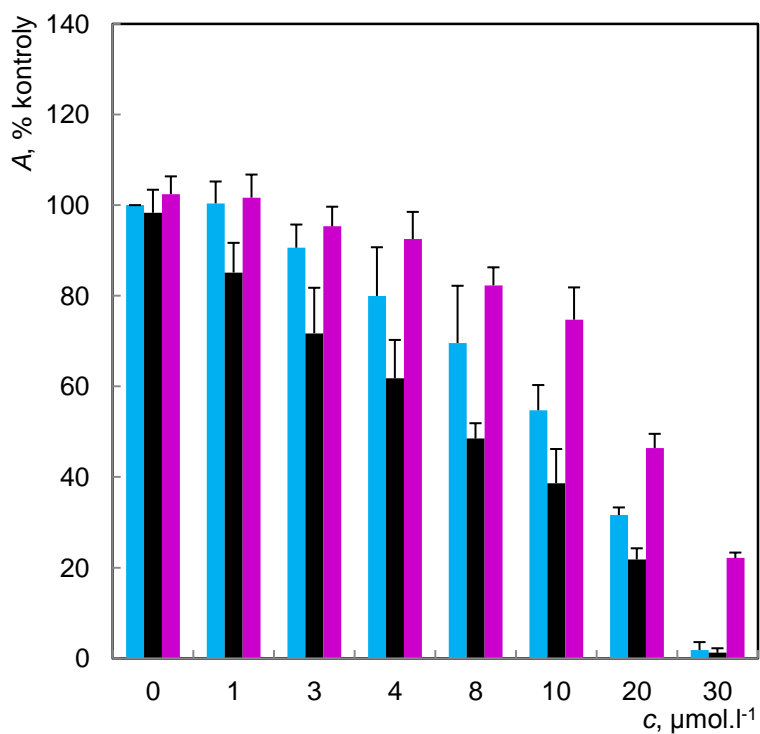
Získané výsledky byly podrobeny analýze rozptylu (ANOVA) s následným Dunnettovým srovnávacím testem (*P < 0,05 vůči vzorku bez preinkubace). Statisticky významný rozdíl v hodnotách IC_{50} byl zjištěn pouze u vzorků preinkubovaných s BSO vůči samotné látce MS 254. N-acetylcystein neměl na cytotoxicitu látky MS 254 signifikantní vliv.

Výsledky XTT a ATP testu jsou srovnatelné pro samotnou látku MS 254 a pro preinkubaci s NAC. Při preinkubaci látky MS 254 s BSO se již výsledky ATP a XTT značně liší. Zdá se, že XTT test na snížení GSH reaguje mnohem méně citlivě. Na rozdíl od XTT testu byla ATP testem zachycena i nezanedbatelná toxicita samotného BSO. Nicméně oba testy shodně potvrdily, že přídavek BSO, který způsobuje depleci intracelulárního GSH blokuje jeho syntézu, k látce MS 254, statisticky významně snižuje viabilitu buněk oproti buňkám, které byly inkubovány pouze s látkou MS 254. Z těchto výsledků vyvozujeme, že látka MS 254 je cytotoxická především ve své nezměněné formě, zatímco její hlavní metabolit - konjugát s GSH - je cytotoxický méně.

a:



b:



Obr. 14 Srovnání viability CEM buněk po 72 hod inkubaci s 0 - 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MS 254 (modrá), MS 254 + 5 mmol.l⁻¹ N-acetylcystein (fialová) a MS 254 + 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ L-buthioninsulfoximin (černá). Stanoveno paralelně ATP testem (A) a XTT testem (B) a vyjádřeno relativně v % kontroly.

5.5 Vliv MS 254 na aktivitu glutathion-S-transferasy a glutathionreduktasy

Aktivity GST a GR v buňkách ovlivněných MS 254 byly stanoveny ve dvou paralelních koncentračních řadách (0 - 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MS 254), vždy v triplicátech. Vypočítané hodnoty aktivit jsou uvedeny v tab. 12.

Tab. 12 Vliv látky MS 254 na aktivitu GST a GR. Měření bylo provedeno třikrát.

MS 254 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	Specifická aktivita GST $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	Specifická aktivita GR $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$
0	1,37 \pm 0,15	0,32 \pm 0,04
5	1,47 \pm 0,18	0,35 \pm 0,01
10	1,59 \pm 0,36	0,39 \pm 0,00*
15	1,94 \pm 0,47	0,43 \pm 0,02*
20	2,57 \pm 0,68*	0,58 \pm 0,08*

Získané výsledky byly podrobeny analýze rozptylu (ANOVA) s Dunnettovým srovnávacím testem (*P < 0,05 vůči vzorku bez MS 254).

Tab. 12 uvádí aktivity příslušných enzymů v lyzátech buněk inkubovaných 72 hod s látkou MS 254 v rozmezí výsledných koncentrací 0 - 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Nejvyšší aktivita GST byla zjištěna u buněk ovlivněných 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentrací látky MS 254, vykazovala 1,9x vyšší specifickou aktivitu než kontrolní vzorek. Také v případě GR byl pozorován na koncentraci závislý vzestup specifické aktivity GR. Nejvyšší testovaná koncentrace MS 254 (20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) vyvolala 1,8x vyšší specifickou aktivitu GR ve srovnání s neovlivněným vzorkem. Vysvětlení tohoto jevu bude předmětem dalšího zkoumání přesahujícího rámec této diplomové práce. Předpokládáme ale, že by se mohlo jednat o enzymovou indukci, tedy zvýšení přepisu mRNA pro gen(y) kódující GST/GR vlivem induktoru (zde MS 254) nebo o přímé ovlivnění katalytické aktivity proteinu. Zvýšená aktivita glutathion-dependentních enzymů v ovlivněných buňkách by mohla alespoň zčásti stát za pozorovaným antioxidačním chováním látky MS 254.

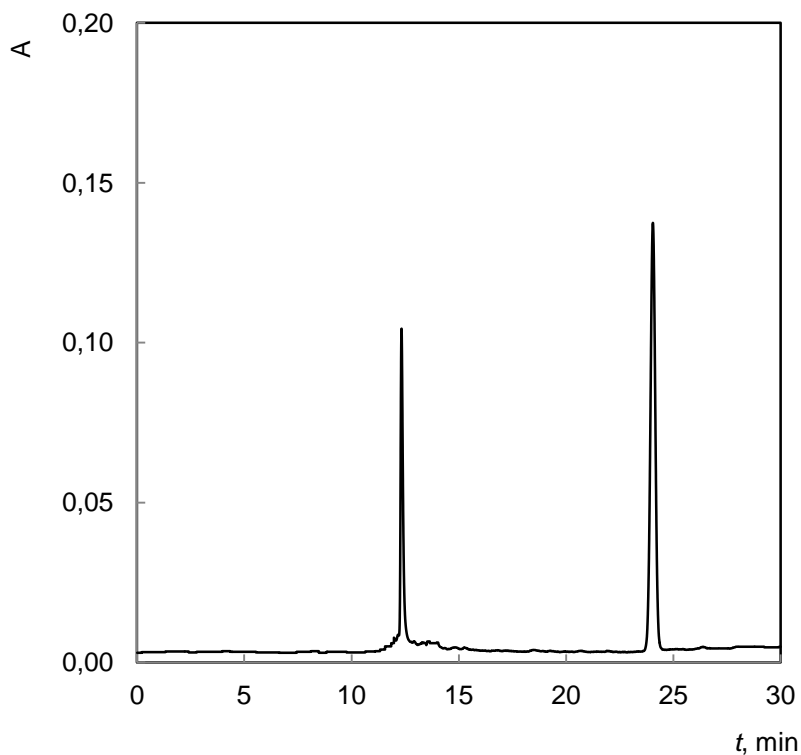
5.6 Kinetika konjugace MS 254 s purifikovanou placentární GST

Po HPLC analýze byly naměřené plochy pod píkem (AUC) přepočteny pomocí standardů na koncentrace. Výsledné hodnoty jsou zobrazeny v tab. 13.

Tab. 13 Závislost tvorby MS-GSH na koncentraci substrátu (MS 254).

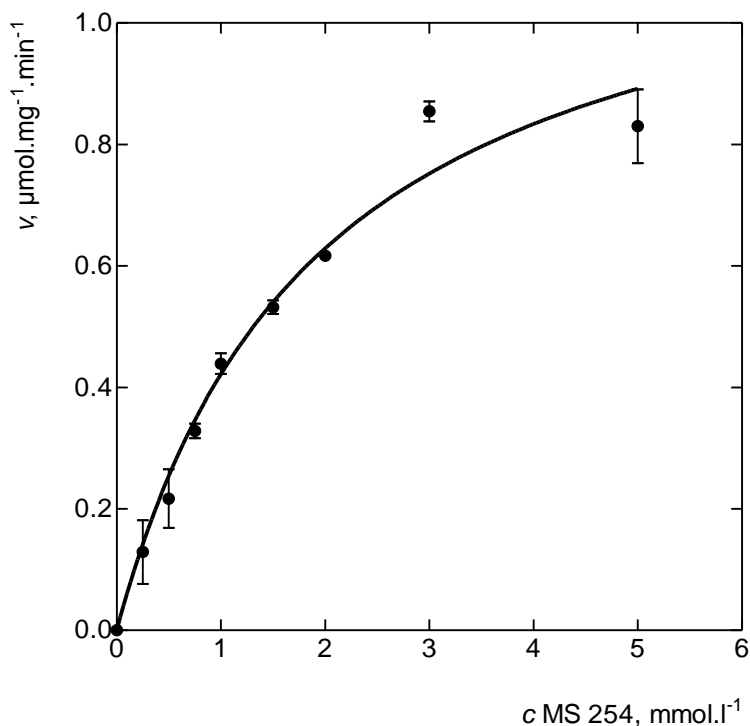
MS 254 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	Konverze %	MS-GSH $\mu\text{mol.l}^{-1}$	Rychlost reakce $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$
0	0	0	0
250	21	$2,98 \pm 1,20$	$0,13 \pm 0,05$
500	19	$5,01 \pm 1,12$	$0,22 \pm 0,05$
750	18	$7,59 \pm 0,27$	$0,33 \pm 0,01$
1000	16	$10,14 \pm 0,40$	$0,44 \pm 0,02$
1500	13	$12,29 \pm 0,27$	$0,53 \pm 0,01$
2000	11	$14,26 \pm 0,10$	$0,62 \pm 0,00$
3000	10	$19,73 \pm 0,37$	$0,85 \pm 0,02$
5000	7	$19,16 \pm 1,41$	$0,83 \pm 0,06$

Na ukázkou je uveden též ilustrační chromatogram z HPLC analýzy při koncentraci substrátu $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (obr. 15). Retenční čas substrátu je 12,3 min a konjugátu 24,0 min.



Obr. 15 Chromatografický záznam substrátu a produktu při koncentraci substrátu $0,250 \text{ mmol.l}^{-1}$. Retenční čas substrátu je 12,3 min a konjugátu 24,0 min. Chromatografické podmínky: SF: kolona Supelcosil LC-18-S (150 mm x 4,6 mm I. D., $5 \mu\text{m}$), MF: směs pufru a ACN (viz tab. 5) průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml.min}^{-1}$, teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $A_{210} - A_{400}$.

Naměřené hodnoty (tab. 13) byly proloženy funkcí podle Michaelise a Mentenové (obr. 16), která odráží saturační závislost koncentrace reakčního produktu (MS-GSH) na koncentraci substrátu (MS 254) a byly stanoveny základní kinetické parametry (V_{max} , K_M) (GraphPad Prism).



Obr. 16 Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu (MS 254) v rozmezí 0 - 5 mmol.l⁻¹.

Hodnota maximální rychlosti enzymové reakce byla stanovena na $1,24 \pm 0,08 \mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. K polovičnímu nasycení enzymu substrátem dochází při koncentraci $1,93 \pm 0,30 \text{ mmol.l}^{-1}$, tato hodnota vyjadřuje Michaelisovu konstantu. Vyšší hodnoty K_M ukazují na relativně nižší afinitu substrátu k enzymu.

Vzhledem k pozorované rychlé tvorbě konjugátu v prvotních experimentech, se nepředpokládalo, že hodnota K_M bude v řádu milimolů. V práci Hwanga a spol. (1993), kde se zabývali konjugací GSH s 6-CP *in vitro*, zejména srovnáním mikrosomální a cytosolické GST aktivity v játrech a ledvinách, byly ale nalezeny podobné hodnoty. V hodnotách maximálních rychlostí se už od těchto publikovaných hodnot poněkud více odlišujeme, námi získaná hodnota V_{max} je cca 7,5x vyšší než publikovaná hodnota pro jaterní cytosolickou GST, nicméně přímé srovnání není možné, protože jde jednak o značně odlišné modely (tkáňové homogenáty vs. purifikovaný enzym) i odlišné látky (chlorpurin vs. chlorpurin s norbornanovým skeletem).

6. ZÁVĚR

V této práci byly porovnány testy cytotoxicity - ATP a XTT test na třech odlišných karbocyklických nukleosidech s norbornanovým skeletem. Oba testy jsou založeny na různých principech, nicméně výsledky stanovené hodnoty IC_{50} byly ve všech třech případech srovnatelné. Bylo stanoveno, že nejvíce cytotoxická je látka MS 255 a nejméně látka MS 254, což je hlavní studovaná sloučenina v této práci. Při stanovení celkového, redukovaného a oxidovaného glutathionu v buněčné kultuře bylo pozorováno snížení celkového GSH se vzrůstající koncentrací látky MS 254. Hladina oxidovaného glutathionu zůstala u všech vzorků pod detekčním limitem metody, celkový glutathion se v tomto pokusu tedy rovnal redukovanému, z čehož bylo vyvozeno, že látka MS 254 nenavozuje v buňkách oxidační stres. To bylo potvrzeno i v následném experimentu s fluoresceinovou sondou reagující na přítomnost ROS zelenou fluorescencí. Bylo zjištěno, že dokonce i za podmínek uměle navozeného oxidačního stresu látka MS 254 produkci ROS nezvyšuje, naopak působí antioxidantně.

Dále byl sledován vliv modulátorů intracelulárního GSH (NAC, BSO) na cytotoxicitu MS 254. Bylo zjištěno, že NAC viabilitu buněk neovlivňuje, zatímco vlivem BSO se cytotoxicita MS 254 prohlubuje. Na základě toho je usuzováno, že hlavní metabolit látky MS 254, tedy její konjugát s GSH, je méně toxický než původní látka a jde tedy o typickou detoxikační reakci. Zajímavým výsledkem je i fakt, že ATP test reagoval na snížení GSH mnohem citlivěji než XTT test (byla zachycena i toxicita samotného BSO).

Byly stanoveny aktivity dvou glutathion-dependentních enzymů, GST a GR, v buňkách ovlivněných MS 254. V obou případech byl pozorován na dávce závislý nárůst enzymové aktivity. Předpokladem je, že by se mohlo jednat o enzymovou indukci, což bude ověřeno v dalších pokusech přesahujících rozsah této práce.

Byla charakterizována kinetika konjugace MS 254 s lidskou placentární GST a byla získána hodnota Michaelisovy konstanty $1,93 \pm 0,30 \text{ mmol.l}^{-1}$ a maximální rychlosti enzymové reakce $1,24 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

7. LITERATURA

1. Gelpi, M. E.; Cadenas, R. A.; Mosettig, J.; Zuazo, B. N.: *Steroids J.* 67, 263-267 (2002).
2. Matouš, B. a kol., 1. vydání Praha, nakladatelství Galén 2010.
4. Liu, J.; Cao, S.; Jia, B.; Wei, D.; Liao, X.; Lu, J.; Zhao, Y.: *Int. J. Mass Spectrom.* 282, 1–5 (2009).
5. Stasolla, C.; Katahira, R.; Thorpe, T.A.; Ashihara, H: Review: *J. Plant Physiol.* 160, 1271-1295 (2003).
6. Balimane, P.V.; Sinko, P.J.: *Adv. Drug Deliver. Rev.* 39, 183-209 (1999).
7. Cheng, Z.; Bunetello, A.; Gatlin, D.M.: *Fish Shellfish Immun.* 30, 143-147 (2011).
8. Micheli, V.; Simmonds, H.A.; Bari, M.; Pompucci, G.: *Clin. Chim. Acta* 220, 1-17 (1993).
9. Liu, P.; Sharon, A.; Chu, Ch.K.: *J. Fluorine Chem.* 129, 743-766 (2008).
10. Park, N.H.; Pavan-Langston, D.; McLean, S.L.: *Antivir. Res.* 65, 49–55 (2005).
11. Suzuki, M.; Okuda, T.; Shiraki, K.: *Antivir. Res.* 72, 157-161 (2006).
12. McClean, K.; Preston, Ch.; Spence, D.; Sutton, P.W.; Whittall J.: *Tetrahedron Lett.* 52, 215-218 (2011).
13. Zhu, W.; Yu, A.; Wang, W.; Dong, R.; Wu, J.; Zhai, G.: *Int. J. Pharm.* 360, 184-190 (2008).
14. Cirelli, R.; Herne, K.; McCrary, M.; Lee, P.; Tyring, S.K.: *Antivir. Res.* 29, 141-151 (1996).
15. Efstathiou, S.; Filed, H.J.; Griffiths, P.D.; Kern, E.R.; Sacks, S.L.; Sawtell, N.M.; Stanberry, L.R.: *Antivir. Res.* 41, 85-100 (1999).
16. Li, N.; Smith, T.J.; Zong, M.: *Advance* 28, 348-366 (2010).
17. Crimmins, M.T.; King, B.W.; Zuercher, W.J.; Choy, A.L.: *J. Org. Chem.* 65, 8499-8509 (2000).
18. Quadrelli, P.; Scrocchi, R.; Caramella, P.; Rescifina, A.; Piperno, A.: *Tetrahedron* 60, 3643–3651 (2004).
19. Hamon, N.; Uttaro, J.P.; Mathé, Ch.; Périgaud, Ch.: *Bioorg. Chem.* 38, 275-278 (2010).

20. Burlina, F.; Favre, A.; Fourrey, J.L.; Thomas, M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 247-250 (1997).
21. Biswajit, G.R.; Prithwish, K.J., Basudeb, A.; Sukhenbu, B.M.: *Tetrahedron Lett.* 48, 1563-1566 (2007).
22. Šála, M.; De Palma, A.M.; Hřebabecký, H.; Dejmek, M.; Dračinský, M.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Mertlíková-Kaiserová, H.; Nencka, R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4271-4275 (2011).
23. Šála, M.; De Palma, A.M.; Hřebabecký, H.; Nencka, R.; Dračinský, M.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Holý, A.: *Bioorg. Med. Chem.* 18, 4374-4384 (2010).
24. Hwang, I.Y.; Elfarra, A.A.: *J. Pharm. Exp. Therap.* 264, 41-46 (1993)
25. Ikejiri, M.; Saijo, M.; Morikawa, S.; Fukushi, S.; Mizutani, T.; Kurane, I.; Maruyama, T.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 2470-2473 (2007).
26. Duggan, D.E.; Titus, E.: *J. Biol. Chem.* 234, 2100-2104 (1959).
27. Duggan, D.E.; Titus, E.: *Lab. Chem. Pharm.* 130, 375-382 (1960).
28. Gunnarsdottir, S.; Elfarra, A.A.: *J. Pharm. Exp. Therap.* 290, 950-957 (1999).
29. Groves, J.T.; McClusky, G.A.; White, R.E.; Coon, M.J.: *Biochem. Bioph. Res. Co.* 81, 154-160 (1978).
30. Meister, A.: *J. Biol. Chem.* 263, 17205-17208 (1988).
31. Dickinson, D.A.; Forman, H.J.: *Biochem. Pharm.* 64, 1019-1026 (2002).
32. Ganguli, D.; Kumar, Ch.; Bachhawat, A. K.: *Genetics*, 1137-1151 (2007).
33. Akerboom, T. P. M.; Sies H.: *Method. Enzymol.* 77, 373-382 (1981).
34. Meister, A.: *Science* 220, 472-477 (1983).
35. Tausz, M.; Šircelj, H.; Grill, D.: *J. Exp. Bot.* 55, 1955-1962 (2004)
36. Yang, M.S.; Chan, H.W.; Yu, L.C.: *Toxicology* 226, 126-130 (2006).
37. Droux, M.: *Photosynth. Res.* 79, 331-348 (2004).
38. Noctor, G.; Gomez, L.; Vanacker, H.; Foyer, Ch.H.: *J. Exp. Bot.* 53, 1283-1304 (2002).
39. Leeuwenburgh, Ch.; Ji, L.L.: *Arch. Biochem. Bioph.* 316, 941-949 (1995).
40. Mittova, V.; Theodoulou, F.L.; Kiddle, G.; Gómez, L.; Volokita, M.; Tal, M.; Foyer, Ch.H.; Guy, M.: *FEBS Letters* 554, 417-421 (2003).
41. Noctor, G.; Arisi, A.C.M.; Jouanin, L.; Kunert, K.J.; Rennenberg, H.; Foyer, Ch.H.: *J. Exp. Bot.* 49, 623-547 (1998).

42. Bartosz, G.: *Acta Physiol. Plantarum* 19, 47-64 (1997).
43. Mittler, R.: *Trends Plants Sci.* 7, 405-410 (2002).
44. Fransen, M.; Nordgren, M.; Wang, B.; Apanasets, O.: *Biochim. Biophys. Acta* 9, 1-11 (2011).
45. Pelicano, H.; Carney, D.; Huang, P.: *Resistance Updates* 7, 97–110 (2004).
46. Backos, D.S.; Franklin, Ch.C.; Reigan, P.: *Biochem. Pharm.* 1-8 (2011).
47. Racek, J.; Holeček, V.: *Chem. Listy* 93, 774-780 (1999).
48. Chiou, T.J.; Tzeng, W.F.: *Toxicology* 154, 75-84 (2000).
49. Tandogan, B.; Ulus, N.N.: *J. Pharm. Sci.* 31, 230-237 (2006).
50. Foyer, Ch. H.; Halliwell, B.: *Planta* 133, 21-25 (1976).
51. Mannervik, B.: *Curr. Prot. Tox.* 7.2.1-7.2.4 (1999).
52. Saydam, N.; Kirb, A.; Demir, O.; Hazan, E.; Oto, O.; Saydam, O.; Guner, G.: *Cancer Lett.* 119, 13-19 (1997).
53. Atkinson, H.J.; Babbitt, P.C.: *Biochem.* 11108-11116 (2009).
54. Simic, T.; Pljesa-Ercegovac, M.; Savic-Radojevic, A.; Hadziahmetovic, M.; Mimoc-Oka, J.: *Amino Acids*, 495-498 (2006).
55. Strange, R.C.; Spiteri, M.A.; Ramachandran, S.; Fryer, A.A.: *Mutat. Res.* 482, 21-26 (2001).
56. Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B.: *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139 (1974).
57. Sau, A.; Tregno, F.P.; Valentino, F.; Federici, G.; Caccuri, A.M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 500, 116–122 (2010).
58. Beckett, G.J.; Hayes, J.D.: *Adv. in Clin. Chem.* 30, 281-380 (1993).
59. Su, F.; Hu, X.; Jia, W.; Gong, Ch.; Song, E.; Hamar, P.: *J. Surg. Res.* 113, 102-108 (2003).
60. Krishna, R.; Mayer, L.D.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, 265–283 (2000).
61. Ji, Y.; Toader, V.; Bennett, B.M.: *Biochem. Pharmacol.* 63, 1397-1404 (2002).
62. Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V. M.; Dowd, C. A.: *Biochem. J.* 360, 1-16 (2001).
63. Rinaldi, R.; Aniya, Y.; Svensson, R.; Eliasson, E.; Swedmark, S.; Shimoji, M.; Morgenstern, R.: *Chem-Biol. Interact* 147, 163–172 (2004).
64. Scarcella, S.; Lamenza, P.; Virkel, G.; Solana, H.: *Mol. Biochem. Parasit.* 181, 37– 39 (2011).

65. Zhang, J.; Ye, Z.; Lou, I.: *Chem-Biol. Interact.* 152, 101–106 (2005).
66. Cree, I.A.; Anderotti, P.E.: *Toxicol. in vitro*, 553-556 (1997).
67. Bensaid, A.; Thierie, J.; Penninckx, M.: *J. Microbiol. Meth.* 40, 255-263 (2000).
68. Wang, S.; Yu, H.; Wickliffe, J.K.: *Toxicol.in vitro* 25, 2147-1151 (2011).
69. Tietze, F.: *Anal. Biochem.*27, 502-522 (1969).
70. Forman, H.J.; Zhang, H.; Rinna, A.: *Mol. Aspect. Med.* 30, 1-12 (2009).
71. Bainor, A; Chang, L; McQuade, T.J.; Webb, B.; Gestwicki, J.E.: *Anal. Biochem.* 410, 310–312 (2011).
72. Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J.L.F.C.: *J. Biochem. Biophys. Meth.* 65, 45 – 80 (2005).
73. Cree, I.A.; Glaysher, S.: *Method. Mol. Biol.* 741, 247-257 (2011).
74. Choi, K.H.; Maheswaran, S.K.; Choi, C.S.: *Vet. Microbiol.* 45, 191-200 (1995).
75. Bailey, H.H.: *Chem-Biol. Interact.* 111 – 112, 239 – 254 (1998).
76. Capela, J.A.; Macedo, C.; Branco, P.S.; Ferreira, L.M.; Lobo, A.M.; Fernandes, E.; Remião, F.; Bastos, M.L.; Dirnagl, U.; Carvalho, F.: *Neuroscience* 146, 1743–1757 (2007).
77. Thanislass, J.; Raveendran, M.; Devaraj, H.: *Biochem. Pharm.* 50, 229-554 (1995).