UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

STUDIUM CHELÁTORU ŽELEZA SALICYLALDEHYD ISONIKOTINOYL HYDRAZONU (SIH) PRO PREVENCI POŠKOZENÍ SRDEČNÍCH BUNĚK OXIDAČNÍM STRESEM

Diplomová práce

Eduard Jirkovský

Školitel: PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Hradec Králové, 2008

Děkuji mému školiteli Pharm.Dr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D. za bezmeznou ochotu, inspiraci a cenné rady, které mi pomohly při vypracování mé diplomové práce. Děkuji i ostatním spolupracovníkům z Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za ochotu a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také Grantové agentuře Univerzity Karlovy v Praze za finanční podporu této diplomové práce v rámci grantového projektu GA UK 124307/C/2007.

Hradec Králové, 2008 Eduard Jirkovský

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Hradec Králové, 2008 Eduard Jirkovský

ABSTRAKT

Nedávné poznatky předpokládají zásadní roli oxidačního stresu v patogenezi mnoha závažných kardiovaskulárních nemocí. Hydroxylové radikály, které jsou tvořeny katalytickým působením volných iontů železa, patří mezi nejreaktivnější a nejtoxičtější formy reaktivních forem kyslíku (ROS). Chelátory železa proto mohou účinně předejít této produkci ROS. Tato studie se zabývá toxicitou (snížení buněčné viability hodnocené pomocí testu vychytávání neutrální červeně) peroxidu vodíku (H_2O_2) a *tert*-butylhydroperoxidu (t-BHP) na kardiomyoblastové potkaní buněčné linii H9c2 a studiem schopností chelátoru železa salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) předejít tomuto poškození.

24-hodinová inkubace H9c2 buněk s H_2O_2 (IC_{50}= 81,5 μM) nebo t-BHP (IC_{50}= 66,4 μM) vedla v závislosti na dávce k rozvoji změn buněčné morfologie, mitochondriální depolarizaci a buněčné smrti. Současná inkubace s chelátorem SIH v závislosti na dávce snížila nebo úplně odvrátila buněčné poškození a morfologické změny (EC_{50}= 1,2 μM pro toxicitu 100μM H_2O_2, EC_{50}= 5,7 μM pro 200μM H_2O_2, EC_{50}= 2,9 μM pro 100μM t-BHP, EC_{50}= 8,8 μM pro 200μM t-BHP). 100μM koncentrace SIH byla schopna úplně ochránit buňky vystavené tak vysokým koncentracím oxidačních činidel jako 300 μM H_2O_2 nebo t-BHP. Vlastní toxicita SIH po 24-hodinové inkubaci (10 - 600 μM) byla velmi nízká a nedosáhla ani hodnoty IC_{50}, 72-hodinová inkubace se SIH již vykázala toxicitu s hodnotou IC_{50}= 447,1 μM.

Tato studie potvrdila klíčovou roli volné buněčného železa v peroxidativním buněčném poškození a ukázala na významné protektivní schopnosti chelátoru železa SIH proti Fentonovu typu oxidačního stresu vyvolaného H_2O_2 a t-BHP.

ABSTRACT

Recent evidence suggests that oxidative stress plays a crucial role in the pathogenesis of many serious cardiovascular diseases. Hydroxyl radicals, which are formed by catalytic effect of free cellular iron, belong among the most reactive and toxic forms of reactive oxygen species (ROS). Iron chelation could therefore effectively prevent the ROS formation. This study deals with toxicity (reduction cell viability as determined by neutral red uptake assessment) of hydrogen peroxide (H_2O_2) and *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP) on H9c2 rat cardiomyoblast cell line and with capability of the iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to prevent this damage.

24-hour incubation with H_2O_2 (IC_{50}= 81.5 μM) or t-BHP (IC_{50}= 66.4 μM) dose-dependently resulted in pronounced change of cellular morphology, mitochondrial depolarization and cell death. Co-incubation with SIH dose-dependently reduced or abolished cell damage and morphological changes (EC_{50}= 1.2 μM for toxicity of 100μM H_2O_2, EC_{50}= 5.7 μM for 200μM H_2O_2 and EC_{50}= 2.9 μM for 100μM t-BHP, EC_{50}= 8.8 μM for 200μM t-BHP, respectively). 100μM SIH was able to completely protect cells exposed to as high as 300μM H_2O_2 or t-BHP concentrations. Own toxicity of SIH tested by 24-hour incubation (10 - 600 μM) was very low and did not reach the IC_{50} value, the 72-hour SIH incubation showed IC_{50}= 447.1 μM.

This study confirms key role of free cellular iron in peroxidative cell damage and points to significant protective ability of iron chelation with SIH against Fenton type of oxidative stress induced by both H_2O_2 and t-BHP.

OBSAH

1. Teoretická část 9

1.1. Volné radikály a ROS 9

1.1.1. Úvod do problematiky volných radikálů 9

1.1.2. Význam iontů železa 10

1.1.3. Metabolismus železa 11

1.1.4. Přehled ROS a reaktivita 13

1.1.5. Významné zdroje ROS *in vivo* 17

1.1.5.1. Fentonova a Haber-Weissova reakce 17

1.1.5.2. Enzymy produkující ROS *in vivo* 18

1.1.5.2.1. Elektron transportní řetězce mitochondrií a endoplasmatického retikula 18

1.1.5.2.2. Superoxid dismutáza 18

1.1.5.2.3. Xanthin oxidáza 19

1.1.5.3. Další zdroje ROS *in vivo* 19

1.1.5.3.1. Autooxidační reakce 19

1.1.6. Redoxní stav buňky 19

1.1.7. Fyziologický význam ROS *in vivo* 20

1.2. Antioxidační mechanismy v organismu 21

1.2.1. Antioxidační enzymy 21

1.2.2. Antioxidanty - nízkomolekulární antioxidační sloučeniny 24

1.2.3. Chelátory železa 24

1.3. Oxidační stres 31

1.3.1. Různé úrovně oxidačního stresu a význam adaptačních a reparačních mechanismů 31

1.3.2. Poškození DNA oxidačním stresem 31

1.3.3. Poškození lipidů oxidačním stresem 32

1.3.4. Poškození proteinů oxidačním stresem 32

1.3.5. Poškození buněčných funkcí oxidačním stresem 33

1.3.6. Poškození mitochondrií a endoplasmatického retikula oxidačním stresem ... 33
1.3.7. Buněčná smrt ... 34
2. Cíle diplomové práce ... 37
3. Metodická část ... 38
3.1. Přístrojové vybavení ... 38
3.1.1. Zařízení pro sterilní práci a kultivaci buněčné linie H9c2 ... 38
3.1.2. Invertovaný epifluorescenční mikroskop ... 38
3.1.3. Čtečka 96-jamkových mikrotitračních destiček ... 39
3.1.4. Ostatní laboratorní vybavení ... 39
3.2. *In vitro* cytotoxicitní experimenty ... 39
3.2.1. Buněčná linie H9c2 ... 39
3.2.2. Kultivační média a reagencie ... 39
3.2.3. Kultivace, pasážování a práce s buněčnou linií H9c2 ... 40
3.2.4. Rozmrazování nové generace H9c2 buněk ... 40
3.3. Reagencie a chemikálie ... 41
3.4. Uspořádání experimentů ... 42
3.5. Statistické analýzy a výpočty EC_{50} a IC_{50} ... 43
3.6. Stanovení toxicity oxidačně působících látek ... 43
3.7. Stanovení akutní i dlouhodobé toxicity chelátoru železa SIH ... 43
3.8. Studium protekce H9c2 buněk SIH před oxidačním poškozením v závislosti na dávce SIH ... 44
3.9. Studium protekce H9c2 buněk SIH před oxidačním poškozením v závislosti na zvyšující se koncentraci H_2O_2 a t-BHP ... 44
3.10. Stanovení počtu živých buněk počítáním v Bürkerově komůrce ... 44
3.11. Stanovení životaschopnosti buněk H9c2 pomocí vychytávání neutrální červeně ... 45
3.12. Fotografická dokumentace toxicitních a protektivních studií na buňkách H9c2 ... 46
3.12.1. Metody fotografické dokumentace ... 46
3.12.2. Inkubace H9c2 buněk s fluorescenční sondou JC-1 ... 46
4. Výsledky ... 47

4.1. Stanovení toxicity oxidačně působících látek 47
4.1.1. Fotografická dokumentace toxicity H_2O_2 a t-BHP na H9c2 buňkách v průběhu času 47
4.1.2. Stanovení toxicity H_2O_2 59
4.1.3. Stanovení toxicity t-BHP 60
4.1.4. Porovnání toxicity H_2O_2 a t-BHP 61
4.2. Studium protekce H9c2 buněk pomocí chelátoru železa SIH 62
4.2.1. Morfologické hodnocení protekce H9c2 buněk SIH před oxidačním poškozením H_2O_2 a t-BHP 62
4.2.2. Studium protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením H_2O_2 v závislosti na koncentraci SIH 64
4.2.3. Studium protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením t-BHP v závislosti na koncentraci SIH 65
4.2.4. Studium protekce H9c2 buněk pomocí SIH v závislosti na zvyšující se koncentraci H_2O_2 a t-BHP 66
4.2.5. Porovnání koncentrační závislosti toxicity H_2O_2 a t-BHP v závislosti na přítomnosti/absenci SIH 68
4.3. Stanovení akutní i dlouhodobé toxicity chelátoru železa SIH 70
4.3.1. Stanovení akutní toxicity chelátoru železa SIH 70
4.3.2. Stanovení dlouhodobé toxicity chelátoru železa SIH 71
5. Diskuze 72
6. Závěry 79
7. Použitá literatura 80
8. Přehled zkratek 89

1. Teoretická část

1.1. Volné radikály a ROS

1.1.1. Úvod do problematiky volných radikálů

Aerobní organismy už podle svého názvu jsou závislé na přítomnosti kyslíku (O_2). Ten je nezbytný pro energetický metabolismus, podílí se na biotransformaci a eliminaci mnoha eubiotik a xenobiotik, funkci imunitního systému a na přenosu buněčných signálů uvnitř a mezi buňkami. Na druhé straně ale může O_2 působit na organismy toxicky *(Halliwell et Gutteridge, 1999)*. Dříve se myslelo, že toxicita O_2 je způsobena jeho přímým inhibičním působením na některé buněčné enzymy *(Balentine, 1982),* ale míra tohoto inhibičního působení je příliš nízká. Teprve až Rebecca Gershmanová a Daniel L. Gilbert spolu poprvé v 50. letech 20. století vyslovili hypotézu, že za toxicitu O_2 jsou odpovědné volné kyslíkové radikály vzniklé v organismu). Tak vznikl termín reaktivní formy kyslíku (ROS) *(Gilbert et al, 1981).*

ROS vznikají přijetím jednoho nebo více elektronů do molekuly O_2. Za fyziologických podmínek je tvorba ROS v rovnováze s antioxidačními ochrannými mechanismy. Pokud je však tato rovnováha narušena, mohou volné radikály poškodit organely. V současné době se má za to, že působení ROS je významným patofyziologickým činitelem mnoha závažných nemocí (*Halliwell et Gutteridge, 1999; Valko et al., 2007).*

Podobně jako ROS se v organismu nacházejí i další reaktivní sloučeniny podobné ROS. Tak např. reaktivní formy dusíku (RNS), chlóru nebo síry. Nejvýznamnější jsou RNS, které hrají významnou roli v regulaci tonu hladkého svalu včetně endoteliálních funkcí (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Podle Barry Halliwella a Johna M.C. Gutteridge můžeme volné radikály definovat jako takové atomy, molekuly nebo jejich fragmenty, které mají ve své molekule nespárovaný elektron a jsou schopné samostatné existence (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

1.1.2. Význam iontů železa

Ionty přechodných kovů, kromě zinku, mají ve své molekule jeden nebo více nespárovaných elektronů (podle definice Halliwella a Gutteridge je tedy možné je považovat za volné radikály). Největší význam z nich mají ionty železa, v menší míře pak mědi, manganu nebo zinku. Jsou pro organismus nezbytné pro správný chod metabolických procesů. V organismu umožňují přenos elektronů v různých enzymových systémech (cyklooxygenázy, cytochromy, myeloperoxidáza, ribonukleotid reduktáza, specifické a nespecifické hydroxylázy, oxidázy a mnohé další) nebo se účastní transportu O_2 (hemoglobin a myoglobin). A právě tyto vlastnosti, které činí ionty železa tak nepostradatelnými pro správnou funkci organismu, je zároveň činí potenciálně velmi nebezpečnými. Pokud se totiž tyto ionty vyskytnou volně nebo labilně vázané, můžou participovat na tvorbě reaktivních sloučenin typu ROS prostřednictvím Fentonovy reakce (viz kapitola 1.1.5.1.) (*Halliwell et Gutteridge, 1992)*. Aby se organismus vyhnul tomuto nebezpečí, musí být neustále v organismu dodržována homeostáza železa *(Dunn et al., 2006)*.

O iontech zinku nebo hliníku se naopak soudí, že mohou inhibovat určité radikálové reakce *in vivo* tím, že nahrazují ionty železa nebo mědi v aktivních místech různých enzymů *(Berg et Shi, 1996)*.

Železo se v organismu vyskytuje hlavně ve vázané formě a to v hemových (hemoglobin, myoglobin, cytochromy a myeloperoxidáza) nebo nehemových strukturách (proteiny obsahující [Fe-S] skupinu, transferin a feritin). Přítomné je také železo nevázané či labilně vázané, které má největší toxický potenciál. Celkové množství železa v organismu je cca. 4,5-5 g u muže a u ženy cca. 2 g. Z tohoto celkového množství železa je u muže přibližně 2,5 g ve formě hemoglobinu, 1 g feritinu a 0,3 g v myoglobinech a 0,1 g v cytochromech. Denní ztráty železa představují 1 mg a jsou způsobeny např. krvácení a jsou kompenzovány příjmem z potravy *(Fleming et Bacon, 2005)*.

Pokud se železo vyskytuje ve formě rozpustných železnatých iontů (Fe^{2+}) se 4 nespárovanými elektrony, které jsou mnohem reaktivnější než běžněji se vyskytující ve vodě nerozpustné železité ionty (Fe^{3+}) s 5 nespárovanými elektrony. Redoxní potenciál železa je značně ovlivněn aktuálním spinovým stavem, který je určen jeho ligandy. Vyšší reaktivitu má Fe^{2+} ve stavu o vysokém spinu, tj. při neobsazeném 4s

orbitalu, ve kterém se snadno oxiduje například vzdušným O_2 ve vodném roztoku (1) (*Halliwell et Gutteridge, 1992).*

$$Fe^{2+} + O_2 \leftrightarrow [Fe^{2+}\text{-}O_2 \leftrightarrow Fe^{3+}\text{-}O_2^{\bullet-}] \leftrightarrow Fe^{(3+)} + O_2^{\bullet-} \quad (1)$$

Naopak redukční schopnost Fe^{2+} je omezena navázáním šesti ligandů, kdy dojde k narušení degenerace 3d orbitalu (jeden volný elektron obsadí 4s orbital). Mluví se pak o stavu s nízkým spinem. Fakt, že ligandy mohou významně ovlivňovat redukční potenciál Fe^{2+} má v organismu velký význam, protože umožňuje prostřednictvím jediného iontu vázaného v různém enzymu katalyzovat různé reakce. Fe^{2+} ve stavu o nízkém spinu se v organismu vyskytuje např. v hemových strukturách (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

1.1.3. Metabolismus železa

Železo je z potravy absorbováno prostřednictvím duodenálních enterocytů, kde jsou na apikální membráně nehemové Fe^{3+} ionty z potravy redukovány na Fe^{2+} ionty a následně aktivně transportován metalotransportním proteinem-1 (DMT-1). Z potravy je také možno získat hemové železo a to prostřednictvím endocytózy zprostředkované přenašečem pro hem (HCP-1), ze kterého je následně uvnitř enterocytu uvolněny Fe^{2+} ionty hem oxygenázou-1. Fe^{2+} ionty jsou transportovány ven z buňky feroportinem-1 (FPN-1); je to zatím jediný známý buněčný efluxní systém pro železo v organismu. V extracelulárním prostoru jsou znovu oxidovány ferroxidázou hephaestin na Fe^{3+} ionty nebo ceruloplasminem (ferroxidázou analogickou k hephaestinu, která navíc transportuje 90 % Cu v plasmě). Bez oxidace by se nemohlo železo reverzibilně navázat na transportní proteiny transferin nebo lactoferin (vždy po dvou iontech Fe^{3+}) *(Dunn et al., 2006).* Transferin není schopen vázat Fe^{3+} v kyselém pH, zatímco lactoferin ano. Ten je obsažen ve slinách, vaginálním sekretu, chámovodech, slzách, žluči, v mateřském mléce a dalších tělních tekutinách. Lactoferin je také produkován aktivovanými neutrofily při infekci (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Významnějším zdrojem železa pro organismus představuje fagocytóza starých a opotřebovaných erytrocytů makrofágy především ve slezině. Železo je uvnitř makrofágu uvolněno z hemové struktury podobně jako v enterocytech a

transportováno z buňky FPN-1 a v plasmě oxidováno ceruloplasminem na Fe^{3+} a následně navázáno na transferin *(Knutson et al., 2005).*

Příjem železa erytrocyty a ostatními buňkami je zprostředkován membránovým transferinovým receptorem-1 (TfR-1), který po navázání transferinu vytváří komplex, jež je internalizován a vlivem nízkého pH jsou z transferinu uvolněny Fe^{3+} ionty, zatímco dochází k protonaci vazebného místa pro železo na transferinu. Následuje redukce uvolněných Fe^{3+} iontů na Fe^{2+} ionty. Protonace vazebného místa pro transferin a redukce Fe^{3+} iontů je nezbytná pro transport železa přes endosomální membránu. Zatím byla popsána jen endosomální ferrireduktáza Steap3 v erytrocytech *(Ohgami et al., 2005).* Prostřednictvím DMT-1 je Fe^{2+} uvolněno z endozómu ve formě malých vezikul s transferinem a za asistence proteinu Sec15l1 jsou tyto vezikuly uloženy do mitochondrie, zatímco transferin je recyklován a transportován z buňky *(Zhang et al., 2006).* Jinou hypotézou je uvolnění Fe^{2+} prostřednictvím DMR-1 za tvorby labilně vázaných zásob železa tvořených nízkomolekulárními sloučeninami nebo chaperonovými proteiny *(Richardson et al., 1996)*.

Zásadní roli v metabolismu železa hrají mitochondrie. Přes membránu je železo transportováno prostřednictvím mitoferrinu *(Shaw et al., 2006).* Uvnitř mitochondrie jsou Fe^{2+} ionty využity pro tvorbu hemových struktur enzymem ferrochelatázou nebo [Fe-S] proteinových clusterů a následně transportovány ven z mitochondrie. Předpokládá se, že regulátorem mitochondriálního metabolismu železa je protein frataxin fungující jako přepínač mezi syntézou hemu a [Fe-S] clusterů *(Becker et al., 2002).* Nespotřebované železo je uloženo v mitochondriálním feritinu jako Fe^{2+} ionty (významnou zásobárnou železa ve formě feritinu jsou játra) *(Dunn et al., 2006).*

Hospodaření se železem kontroluje jaterní hormon hepcidin (*hepatic bactericidal protein*). Děje se tak hlavně na úrovni příjmu železa duodenálními enterocyty. Játra produkují hepcidin při vysoké hladině železa v krvi (zprostředkováno receptory TfR-2, HFE a HJV), nebo při infekci a zánětu prostřednictvím IL-6. Hepcidin se naváže na transportní protein FPN-1 na povrchu membrány makrofágů, enterocytů nebo hepatocytů a po internalizaci dojde k degradaci tohoto komplexu, což má za následek snížené uvolňovaní železa makrofágy a hepatocyty a k sníženému příjmu železa potravou. Hepcidin také negativní zpětnou vazbou inhibuje ferroxidázu hephaestin v enterocytech. Na druhou

stranu zvýšená erytropoéza při anémii nebo hypoxii vyvolává snížení exprese hepcidinu. Přesný mechanismus této kaskády však zůstává stále neobjasněný. Při nedostatku železa může být jeho hladina zvýšena post-transkripční modifikací m-RNA pro TfR-1 a feritinu prostřednictvím železo regulujících proteinů (IRP-1 a 2) *(Dunn et al., 2006; Nemeth et al., 2004).*

1.1.4. Přehled ROS a reaktivita

ROS je skupinový název zahrnující nejenom kyslíkové radikály, ale také některé neradikálové sloučeniny od O_2 odvozené. Nejvýznamnějšími zástupci ROS jsou superoxidový ($O_2^{\bullet-}$) a hydroxylový radikál ($OH^{\bullet}$). Dalšími radikálovými zástupci jsou peroxylový ($RO_2^{\bullet}$), alkoxylový ($RO^{\bullet}$), hydroperoxylový ($HO_2^{\bullet}$) radikál. Mezi neradikálové ROS patří peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík a ozón (O_3) (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Kyslík v základním stavu je v podstatě biradikál, protože má dva nespárované elektrony s paralelním spinem. Toto uspořádání představuje z hlediska reaktivity s neradikálovými sloučeninami značnou nevýhodu (spinovou restrikci), takže O_2 reaguje pomalu a pouze přijetím elektronu po jednom za vzniku jiných forem ROS (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Singletový kyslík představuje excitovaný stav molekuly O_2 v základním stavu. Excitací dochází ke změně spinu, a tím i k odstranění spinové restrikce. Vyskytuje se ve dvou formách a to buď jako biradikál s elektrony v opačném spinu nebo jako neradikálová molekula. K excitaci O_2 dochází v organismu nejčastěji přenesením energie při fotosenzitizační reakci za přítomnosti vhodného substrátu (např. porfyrinu nebo některých léčiv - např. profenů) (*Halliwell et Gutteridge, 1999; Foote et al., 1995).*

Singletový O_2 nejčastěji reaguje přenesením excitované energie na jinou molekulu a sám se vrací do základního stavu. Tato reakce je známá jako *quenching*. Při reakci s organickými sloučeninami s dvojnými vazbami mezi atomy uhlíku vznikají buď endoperoxidy či koncové hydroperoxidy (R-O-O-H) (*Foote et al., 1995).*

Superoxidový radikál představuje nejvýznamnějšího zástupce ROS jak fyziologickým významem, tak i mírou jeho produkce. V organismu je produkován v široké míře enzymatickou redukcí O_2 v různých enzymových systémech

(viz kapitola 1.1.7.). Může ovšem vznikat i neenzymatickou redukcí O_2, za účasti iontů přechodných kovů. Většina produkce $O_2^{\bullet-}$ je však nežádoucí, protože vede k produkci dalších, mnohem reaktivnějších forem ROS a následně k oxidačnímu poškození buňky (viz kapitola 1.3.). Reaktivita $O_2^{\bullet-}$ sama o sobě je velmi malá, přímé oxidační poškození $O_2^{\bullet-}$ je minimální. $O_2^{\bullet-}$ ve vodném prostředí a za fyziologického pH reaguje totiž s neradikálovými sloučeninami velmi neochotně. Jeho reaktivita se však značně zvýší v přítomnosti iontů přechodných kovů (viz kapitola 1.1.5.1.). $O_2^{\bullet-}$ může sám snižovat aktivitu některých antioxidačních enzymů (glutathion peroxidázy nebo katalázy) a enzymů energetického metabolismu (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy, pyruvát dehydrogenázy nebo α-ketoglutarát dehydrogenázy a fumarázy). Naopak s radikály $O_2^{\bullet-}$ reaguje snadno, příkladem je vznik $ONOO^-$ (viz dále). Nejvýznamnější reakcí $O_2^{\bullet-}$ je dismutace na H_2O_2. Tuto reakci fyziologicky zajišťuje enzym superoxid dismutáza (SOD) a představuje jeden z přirozených antioxidačních mechanismů buňky (viz kapitola 1.2.1). Dismutace ale může proběhnout i neenzymaticky, hlavně v kyselém prostředí (buňky makrofágů, blízko buněčné membrány), kdy dochází ve velké míře k protonizaci $O_2^{\bullet-}$ na **hydroperoxylový radikál**, který snadno reaguje s $O_2^{\bullet-}$ a H^+ (2). $HO_2^{\bullet}$ na rozdíl od $O_2^{\bullet-}$ je mnohem reaktivnější, může snadno prostupovat buněčnou membránou a podílet se tak na vzniku H_2O_2 i mimo místo svého vzniku *(Halliwell et Gutteridge, 1999; Foote et al., 1995; Sawyer et Valentine, 1981)*.

$$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (2)$$

Hydroxylový radikál představuje v organismu nejtoxičtější formu ROS. Jeho význam je hlavně patologický, kdy vyvolává typické znaky oxidačního poškození (viz kapitola 1.3.). Fyziologicky se v organismu uplatňuje v imunitním systému, kde v aktivovaných neutrofilech při fagocytóze poškozuje bakterie. V organismu vzniká z H_2O_2 a to buď za katalytického přispění iontů železa v Haber-Weissově reakci (viz kapitola 1.1.5.1.) nebo homolytickým štěpením vazby H_2O_2 vyskytující se např. při expozici UV záření, ionizujícího záření, ultrazvukovému vlnění při lithopsii *(Morgan et al., 1988)*. V aktivovaných neutrofilech je $OH^{\bullet}$ produkován reakcí HOCl s $O_2^{\bullet-}$ (3) *(Folkes et al., 1995)*. $OH^{\bullet}$ je nejreaktivnějším zástupce ROS. Díky své vysoké reaktivitě neprostupuje buněčnou membránou a po svém vzniku okamžitě reaguje s molekulami v nejbližším

okolí. Velmi ochotně reaguje s neradikálovými sloučeninami a to buď odtržením vodíku, adicí nebo přenosem elektronu. Podle substrátu tak vznikají nové, méně reaktivní sloučeniny jako alkylový radikál ($R^{\bullet}$), alkoxylový ($RO^{\bullet}$), peroxylový ($RO_2^{\bullet}$) nebo thiolový radikál ($RS^{\bullet}$). Pokud se setkají dva $OH^{\bullet}$ dimerizují za vzniku H_2O_2 (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

$$HOCl + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + Cl^- \qquad (3)$$

Peroxid vodíku je slabé oxidační činidlo a v porovnání s $OH^{\bullet}$ nebo $RO_2^{\bullet}$ radikálem je sám o sobě jen málo toxický. V organismu je využíván jednak při odstraňování $O_2^{\bullet-}$ enzymatickou dismutací prostřednictvím SOD (viz kapitola 1.3.) a jednak v aktivovaných neutrofilech, kde z něj vzniká vysoce reaktivní HOCl. H_2O_2 vzniká i neenzymaticky z $HO_2^{\bullet}$ podle reakce (2). Sám oxiduje některé enzymy (např. glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu) *(Brodie et Reed, 1987),* keto-kyseliny a degraduje hemové struktury za uvolnění iontů Fe *(Gutteridge, 1986)*. Navzdory své nízké reaktivitě ale působí toxicky a ve vyšších koncentracích i letálně. Jeho toxicita se totiž výrazně zvýší v přítomnosti iontů přechodných kovů (hlavně Fe a Cu), které prostřednictvím Haber-Weissovy reakce produkují vysoce reaktivní $OH^{\bullet}$ (viz kapitola 1.1.5.1.), který je zodpovědný za klasické projevy oxidačního poškození. Protože nemá náboj, může snadno procházet buněčnou membránou a působit tak toxicky i v jiných buňkách, než kde vznikl (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Peroxylové ($RO_2^{\bullet}$) a alkoxylové radikály ($RO^{\bullet}$) jsou po $OH^{\bullet}$ nejvýznamnějšími toxickými zástupci ROS. Vznikají hlavně působením $OH^{\bullet}$, který odtrhne vodík z různých organických sloučenin za vzniku alkylového radikálu ($R^{\bullet}$) a v přítomnosti O_2 za vzniku peroxylového radikálu. Dalším možným způsobem jejich vzniku je reakce $HO_2^{\bullet}$ s organickými peroxidy nebo jejich degradace (za katalytického působení iontů Fe, UV záření nebo tepla). Jsou to výborná oxidační činidla, v přítomnosti O_2 oxidují různé substráty (NADH, askorbová kyselina) za vzniku $O_2^{\bullet-}$. Reagují především odtržením vodíku; tímto mechanismem se významně podílí na peroxidaci lipidů v buněčné membráně (*Halliwell et Gutteridge, 1999; Sonntag, 1987).*

Peroxonitrilový anion je zástupcem RNS, který vzniká velmi snadno reakcí $O_2^{\bullet-}$ a $NO^{\bullet}$ (4). Tato reakce má fyziologický význam, protože při ní dochází k inhibici

vasodilatačního působení $NO^{\bullet}$ produkovaného cévním endotelem a soudí se, že zvýšená produkce $O_2^{\bullet-}$ cévním endotelem je jedním z faktorů způsobující hypertenzi *(Nakazono et al., 1991).* $ONOO^-$ je v alkalickém prostředí stabilní a málo reaktivní sloučeninou, ovšem za fyziologického pH se velmi ochotně protonuje za vzniku peroxonitrilové kyseliny (ONOOH). V přítomnosti iontů přechodných kovů se *cis* forma této kyseliny se degraduje na nitroniový kationt NO_2^+ a OH^- anion (5) a způsobuje hydroxylaci a nitraci aromatických sloučenin. *Trans* forma je silné oxidační činidlo, téměř tak silné jako $OH^{\bullet}$, a při reakci s různými molekulami (např. thioly) reagují odtržením vodíku za vzniku $R^{\bullet}$, OH^- a vysoce reaktivního $NO_2^{\bullet}$ radikálu, který nitruje aromatické sloučeniny, typickým produktem je 3-nitrotyrozin, který následné interferuje s transdukcí buněčných signálů prostřednictvím blokády tyrozin kinázového systému (6) (*Beckman et Koppenol, 1996; Merényi et lind, 1998).*

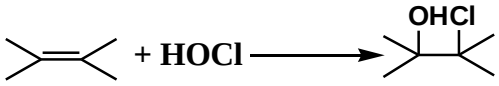
$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^- \qquad (4)$$

$$ONOOH \rightarrow Fe \rightarrow NO_2^+ + OH^- \qquad (5)$$

$$ONOOH \rightarrow NO_2^{\bullet} + OH^- + R^{\bullet} \qquad (6)$$

Chlorná kyselina představující zástupce reaktivních forem chlóru má velký význam v imunitním systému, kde stejně jako $OH^{\bullet}$ působí toxicky na bakterie. Vzniká v aktivovaných neutrofilech působením enzymu myeloperoxidázy (MPO) reakcí Cl^- a H_2O_2 (7). Odhaduje se, že velká část H_2O_2 vzniklá v aktivovaných neutrofilech je využita právě k produkci HOCl. HOCl je schopná produkovat $OH^{\bullet}$ buď při reakci s $O_2^{\bullet-}$ (3) nebo při reakci ionty Fe^{2+} (10) *(Folkes et al., 1995; Schraufstatter et al., 1990).* Je to velmi silné oxidační činidlo srovnatelné s $OH^{\bullet}$, které snadno oxiduje thioly, NAD(P)H nebo kyselinu askorbovou a vede k chloraci aromatických sloučenin. Při reakci s nenasycenými organickými sloučeninami vznikají chlorohydriny adicí na dvojnou vazbu (8) a při reakci s primárními aminy dochází k tvorbě chloraminů (9). Obě tyto sloučeniny jsou zodpovědné za interferenci s reparačními mechanismy DNA (*Pero et al., 1996).*

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MPO} HOCl + OH^- \quad (7)$$



(8)

$$R\text{-}NH_2 + HOCl \rightarrow RNHCl + H_2O \quad (9)$$

$$HOCl + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + Cl^- + OH^{\bullet} \quad (10)$$

1.1.5. Významné zdroje ROS *in vivo*

1.1.5.1. Fentonova a Haber-Weissova reakce

V produkci ROS hrají ionty přechodných kovů s nespárovanými elektrony významnou úlohu při přenosu elektronů a při vzniku ROS a volných radikálů vůbec. Ionty železa jsou v závislosti na typu ligandů, ve kterých se vyskytují v organismu, schopné redukovat nebo oxidovat molekulu O_2 podle reakce (1). Pokud je železo vázáno na transferin, feritin nebo lactoferin, vyskytuje se ve stavu o nízkém spinu a nemůže participovat na přenosu elektronu. Naopak, při vazbě železa v ATP, citrátu a dalších nízkomolekulárních sloučeninách (tzv. labilně vázaná zásoba železa) nebo v cytochromech se jedná o stav s vysokým spinem, kdy jsou ionty železa velmi reaktivní. Fe^{2+} ionty mohou být oxidovány také jinými ionty přechodných kovů, příkladem je Cu^{2+} ionty vázané v ceruloplasminu (*Halliwell et Gutteridge, 1999; Buettner, 1993).*

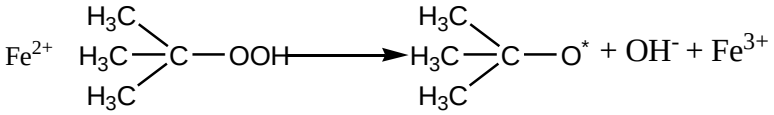
Důkazem výše uvedeného je Fentonova reakce (11), popsaná poprvé v roce 1876, při které dochází k oxidaci organické látky po přidání směsi H_2O_2 a soli Fe^{2+}. Průběh této reakce předpokládá vznik vysoce reaktivního OH. radikálu, meziprodukt není jasně popsán (*Halliwell et Gutteridge, 1992; Sutton et Winterbourn; 1989).*

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow \text{meziprodukt} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^- \quad (11)$$

V roce 1934-35 přišli Fritz Haber -Joseph Weiss s hypotézou vysvětlující vznik $OH^{\bullet}$ radikálu ve Fentonově reakci na základě redukce H_2O_2 prostřednictvím $O_2^{\bullet-}$, za katalytické účasti iontů přechodných kovů (zejména Fe a Cu) podle reakce (12) (*Halliwell et Gutteridge, 1990).*

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{Fe} O_2 + OH^{\bullet} + OH^- \quad (12)$$

Redoxní schopnosti iontů železa mají také význam při urychlení dekompozice ROS, při které mohou vznikat jiní zástupci ROS, jak je tomu v případě dekompozice organických hydroperoxidů, např. tert-butylhydroperoxidu (13), ze kterých vznikají alkoxylové radikály *(Halliwell et Gutteridge, 1999).*



(13)

1.1.5.2. Enzymy produkující ROS *in vivo*

1.1.5.2.1. Elektron transportní řetězce mitochondrií a endoplasmatického retikula

Tyto řetězce přítomné v mitochondriích nebo endoplasmatickém retikulu představují pravděpodobně nejvýznamnější zdroj $O_2^{\bullet-}$ *in vivo*. Děje se tak únikem elektronů z přenašeče v řetězci přímo na molekulu O_2 místo na další článek řetězce. Tento únik je minimalizován precizní organizací řetězce a nízkou mitochondriální koncentrací O_2. Denně tak vznikne $O_2^{\bullet-}$ přibližně z 1-3 % O_2 přítomného v mitochondriích. Předpokládá se, že nejvíce unikají elektrony z cytochromů a z radikálové (semichinonové) formy koenzymu Q a v endoplasmatickém retikulu z flavoproteinů (NADPH-P450-reduktáza) fungujících jako kofaktory jiných enzymových systémů jako např. desaturázy (*Goeptar et al., 1995; Turrens, 1997).*

Poškození struktury mitochondrií nebo endoplasmatického retikula může být následkem poškození oxidačním stresem (viz dále), látkami interferujícími s membránovým přenosem nebo vlivem mutací mitochondriální DNA, jejíž četnost se s přibývajícím věkem zvyšuje a mutace se v organismu kumulují. Mitochondriální DNA na rozdíl od jaderné není chráněna histony, takže je snadno náchylná k nejrůznějším mutacím (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

1.1.5.2.2. Superoxid dismutáza

Enzym SOD je jedním ze základních enzymů podílejících se na odstraňování ROS produkcí mnohem méně reaktivních sloučenin (viz kapitola 1.2.1) (*Fridovich, 1995).*

1.1.5.2.3. Xanthin oxidáza

Xanthin oxidáza je jedním z nejvíce studovaných enzymů produkujících $O_2^{\bullet-}$ *in vitro*. V organismu se normálně nevyskytuje, místo ní je přítomná xanthin dehydrogenáza, která přenáší elektron ze substrátu raději na NAD^+ než na O_2 za tvorby $O_2^{\bullet-}$. Xanthin dehydrogenáza se přemění na xanthin oxidázu buď během purifikace (vlivem proteolytických enzymů nebo oxidací thiolovými skupinami) nebo vlivem proteolytických a oxidačních enzymů uvolňujících se při tkáňovém poškození, charakteristicky při ischemicko-reperfuzním poškození (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

1.1.5.3. Další zdroje ROS *in vivo*

1.1.5.3.1. Autooxidační reakce

Některé biologicky významné molekuly jsou schopné tvorby ROS za katalýzy iontů přechodných kovů (Fe a Cu). Mezi tyto sloučeniny patří např. glyceraldehyd, $FMNH_2$, $FADH_2$, (nor)adrenalin, L-DOPA, dopamin, tetrahydropteridin a thiolové sloučeniny jako cystein. Dochází k redukci O_2 na $O_2^{\bullet-}$, který může následně oxidovat substrát a iniciovat vznik řetězové reakce (*Fridovich, 1995).*

Významnou autooxidační reakcí se oxidace hemových Fe^{2+} iontů na Fe^{3+} za vzniku $O_2^{\bullet-}$ a methemoglobinu neschopného vázat O_2. Předpokládá se, že takto jsou každý den přeměněna 3 % celkového O_2 (*Brantley et al., 1993).*

1.1.6. Redoxní stav buňky

ROS (a další formy volných radikálů) jsou za normálních okolností v nízké koncentraci přítomny v každé. Koncentraci ROS určuje rovnováha mezi mírou jejich produkce a mírou, s jakou jsou odstraňovány v organismu antioxidačními systémy. Tato rovnováha je často označovaná jako redoxní stav buňky, je udržována v úzkém rozmezí a fluktuace redoxního stavu buňky určuje buněčné funkce *(Schafer et Buettner, 2001)*. Největší význam při udržování redoxního stavu má redoxní pár glutathionu (GSH/GSSG) a thioredoxinu (TRX) *(Dröge, 2002)*. Každá buňka má svůj charakteristický redoxní stav, který udržuje v úzkém rozmezí a který zajišťuje správnou funkci ROS v buněčných dějích *(Valko et al., 2006).*

1.1.7. Fyziologický význam ROS *in vivo*

Mezi nejvíce zastoupené a patrně nejdůležitější funkce ROS patří účast na přenosu buněčných signálů. Dalšími ději, kde našly ROS své uplatnění, je například fungování imunitního systému a kyslíkové homeostázy. Z ROS se nejčastěji vyskytuje $O_2^{\bullet-}$ (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Největší význam mají ROS jako signální molekuly. Prostřednictvím intracelulárních signálních kaskád regulují mnohé buněčné děje a funkce. Často se také používá anglický termín "redox signalling". Stimulace buněk např. různými cytokiny (IL-1β, IL-6, IL-3), růstovými faktory (TNF-α, ANGII, PDGF, NGF, TGF-β1, GM-CSF, FGF-2), hormony či jinými látkami (trombin), vede k produkci ROS, které následně regulují různé buněčné signální kaskády. Buď vystupují sami jako druzí poslové nebo přes buněčné Ca^{2+} ionty aktivují či inaktivují různé cílové enzymové struktury *(Thannickal et Fanburg, 2000).*

NAD(P)H oxidáza v nefagocytujících buňkách jako jsou fibroblasty, buňky cévní hladké svaloviny, kardiomyocyty a endoteliální buňky produkuje ROS v míře dosahující zhruba 1/3 produkce ROS ve fagocytujících buňkách *(Jones et al., 1996).* Takto jsou regulovány na buněčné úrovni děje jako fosforylace proteinů, aktivace proteinových kináz, genová exprese, syntéza DNA a buněčný růst. Na úrovni tkání jde např. o regulaci funkci srdce a cév, tonu hladkých svalů včetně cévního, a exprese adhesivních molekul (důležité při embryogenezi, buněčném růstu, diferenciaci buněk, reparaci poškození tkání, adhezi leukocytů a dalších procesy) *(Griendling et al., 2000).*

Pravděpodobně nejvýznamnější efekt ROS v transdukci buněčných signálů byl pozorován v kaskádách proteinových kináz aktivovaných mitogeny (MAPK) odpovídající za aktivaci jaderných transkripčních faktorů, které kontrolují expresi protektivních genů opravující poškozenou DNA, aktivují imunitní systém, zastavují proliferaci poškozených buněk a indukují apoptózu (AP-1, NF-κB, p53, NFAT a HIF-1) *(Sun et Oberley, 1996).*

Imunitní systém je dalším místem, kde ROS hrají významnou roli. Jednak je to schopnost destrukce bakterií a patogenů prostřednictvím aktivovaných neutrofilů, kde dochází k masivní produkce ROS a dalších volných radikálů v zánětlivém prostředí do fagocytovaných vezikul s patogenem nebo uvolněním přímo do prostředí. Hlavní enzymy produkující ROS a ostatní oxidující látky je fagocytární

isoforma NAD(P)H oxidázy, myeloperoxidázy v neutrofilech (produkuje HOCl) a inducibilní syntháza oxidu dusnatého (produkující $NO^{\bullet}$ a následně $ONOO^{-}$), což slouží jako ochrana před bakteriemi a dalšími patogeny z okolního prostředí. V zánětlivém ložisku tak vzniká H_2O_2 dosahující koncentrace 10-100 μM. ROS dále mohou modulovat, posilovat imunologické odpovědi jak T buněk imunitního systému, tak i aktivity makrofágů *(Lamas et al., 1992).*

Kyslíková homeostáza je zajišťována prostřednictvím ROS. Předpokládá se, že změny v koncentraci kyslíku jsou okamžité rozpoznány určitými ROS produkujícími proteiny jako např. cytochromy-b obsažené v mitochondriích baroreceptorů („carotid bodies"), které přímo dráždí nervová zakončení stimulující dýchání a krevní oběh ve snaze se vyhnout hypoxii. Dalším mechanismem ochrany před hypoxií je zvýšení produkce hormonu erytropoetinu hlavně působením transkripčního faktoru HIF-1, dále pak VEGF nebo IGF-II *(Wang et al., 1995).*

1.2. Antioxidační mechanismy v organismu

Vlivem neustálé produkce ROS *in vivo* se musel organismus adaptovat na jeho přítomnost účinnou antioxidační ochranou, aby byl vůbec schopen přežít. Jednotlivé antioxidační mechanismy spolu musí kooperovat, jinak by antioxidační ochrana nebyla komplexní a jednotlivé složky by byly inhibovány přímo ROS. Antioxidační ochrana se liší v závislosti na typu buňky nebo tkáně a souvisí s redoxním potenciálem dané buňky či tkáně. Antioxidační enzymy působí na úrovni již vzniklých ROS, které odstraňují za tvorby nereaktivních sloučenin nebo mnohem méně reaktivních sloučenin. Antioxidanty neboli také zhášeče volných radikálů jsou schopné při reakci s ROS převzít volný elektron a následně se ho "nereaktivně" zbavit a ukončit tak řetězovou reakci. Poslední možností je přímo zamezení vzniku ROS a to odstraněním katalyticky schopného železa (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

1.2.1. Antioxidační enzymy

Základními antioxidačními enzymy je **rodina superoxid dismutáz (SOD)**. Tyto enzymy mají za úkol odstranit z těla potenciálně nebezpečný $O_2^{\bullet-}$ na mnohem méně nebezpečný H_2O_2, který následně odstraní peroxidázy a katalázy. V lidském organismu se vyskytují dvě formy, z nichž je nejvíce zastoupená **CuZnSOD**,

neobyčejně stabilní enzym zastoupený téměř ve všech buňkách (největší koncentrace v cytosolu, lysosomech, jádru a mezi mitochondriálními membránami; z orgánů to jsou játra, šedá hmota mozku, ledviny, varlata a srdeční tkáň). Druhou formou je méně stabilní **MnSOD**, která je lokalizovaná hlavně v mitochondriích. Obě tyto formy katalyzují stejnou reakci a to dismutaci $O_2^{\bullet-}$ naH_2O_2 a O_2 v základním stavu. Jako katalyzátory této reakce (14) slouží Cu^{2+} nebo Mn^{3+} ionty. Obě formy mají přibližně stejnou aktivitu za fyziologického pH, ale MnSOD nižší v zásaditějším prostředí Ionty zinku slouží pouze k stabilizaci enzymové struktury. SOD je zpětnovazebně inhibována vysokými koncentracemi H_2O_2 (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

$$SOD\text{-}Cu^{2+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow SOD\text{-}Cu^{+} + O_2$$
$$SOD\text{-}Cu^{+} + O_2^{\bullet-} + 2H^{+} \rightarrow SOD\text{-}Cu^{2+} + H_2O_2 \quad (14)$$

Mezi nejdůležitější antioxidační enzymy v organismu dále patří **rodina glutathion peroxidáz (GPx)** využívající ke své funkci tripeptid glutathion (GSH) - γ-glutamyl-cysteinyl-glycin. Jejich úlohou je odstraňovat z organismu nejrůznější peroxidy. Skládají se z několika podjednotek obsahujících v aktivním centru molekulu selenocysteinu. V těle se vyskytují čtyři různé isoformy GPx, které se liší jednak lokalizací, tak i substrátovou specifitou. Nejvíce zastoupená je tzv. **klasická glutathion peroxidáza (Se-GPx)** vyskytující se volně v cytoplasmě a v mitochondriích, která redukuje zejména H_2O_2 a ROOH na vodu nebo příslušné alkoholy (synergisticky v buňce působí kataláza v peroxisomech). Další formou je **fosfolipidová glutathion peroxidáza (PHGPx)**, vyskytující se jako membránový protein, který redukuje hlavně peroxidy esterifikovaných mastných kyselin a cholesterolu. V gastrointestinálním traktu se vyskytuje **Gi-GPx**, specializující se pravděpodobně na redukci peroxidů obsažených v potravě (*Halliwell et Gutteridge, 1999).* V plasmě a mateřském mléce se vyskytuje **Pl-GPx**, jejíž funkce není dosud plně objasněna *(Gérard-Monnier et Chaudiere, 1996).*

Glutathion peroxidázy odstraňují peroxidy redukcí na příslušné alkoholy (H_2O v případě H_2O_2) za pomocí redukované formy glutathionu (GSH) (15). Tato reakce je spřažena s regenerací oxidované formy glutathionu (GSSG) prostřednictvím enzymu **glutathion reduktázy**. Tento enzym obsahuje v aktivním centru na každé ze svých podjednotek molekulu FAD, který přenáší elektron

z kofaktoru NADPH na GSSG a regeneruje ho (16). GPx může být inhibována $ONOO^-$ iontem (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

$$GPx\text{-}Se^- + ROOH + H^+ \rightarrow GPx\text{-}Se\text{-}OH + ROH$$

$$GPx\text{-}Se\text{-}OH + GSH \rightarrow GPx\text{-}Se\text{-}SG + H_2O$$

$$GPx\text{-}Se\text{-}SG + GSH \rightarrow GPx\text{-}Se^- + H^+ + GSSG \qquad (15)$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+ \qquad (16)$$

Stejnou roli i význam jako GPx má i **kataláza**. Obsahuje na svých podjednotkách hemovou skupinu vázající Fe^{3+} ionty a na rozdíl od peroxidáz nepotřebuje žádný kofaktor omezující její aktivitu, takže je takřka nesaturovatelná. Reakce se uskutečňuje redukcí H_2O_2 přes zatím neidentifikovaný oxidovaný komplex I a následnou regenerací katalázového komplexu reakcí s další molekulou H_2O_2 podle reakce (17) (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

$$kataláza\text{-}Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow komplex\ I + H_2O$$

$$komplex\ I + H_2O_2 \rightarrow kataláza\text{-}Fe^{3+} + H_2O + O_2 \qquad (17)$$

Kataláza je obsažena hlavně v játrech a erytrocytech, kde dosahuje vysokých koncentrací. Je lokalizována především na jednoduchých membránách, peroxisomech, ale může se vyskytnout i volně v cytoplasmě a to po rozpadu peroxisomů. Kataláza může být inhibována $O_2^{\bullet -}$ tvorbou ferroxykatalázy (obsahuje hemově vázané Fe^{2+} ionty) (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Dalším velmi významným antioxidačním enzymem je polypeptid **thioredoxin** (TRX). Je široce rozšířen po celém těle a zvláště v endoplasmatickém retikulu, je ale i k nalezení na buněčném povrchu. Antioxidační působení je dáno schopností redukovat různé proteiny obsahující disulfidický můstek pomocí dithio-disulfidického seskupení v jeho aktivním centru (18) (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

$$thioredoxin\text{-}(SH)_2 + protein\text{-}S_2 \leftrightarrow thioredoxin\text{-}S_2 + protein\text{-}(SH)_2 \qquad (18)$$

Tato reakce je spřažena s recyklací oxidované formy thioredoxinu pomocí enzymu **thioredoxin reduktázy** využívající jako kofaktor redukovanou formu NADPH podle reakce (19) *(Mustacich et Powis, 2000).*

$$\text{thioredoxin-S}_2 + \text{NADPH+H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{thioredoxin-(SH)}_2 \qquad (19)$$

1.2.2. Antioxidanty - nízkomolekulární antioxidační sloučeniny

Jako antioxidanty se obecně označují nízkomolekulární sloučeniny, které jsou schopné vyvázat nebo také zhášet volné radikály, jako jsou ROS. Můžeme je rozdělit na skupinu vznikající *in vivo* a přijímané potravou. Antioxidační působení je u jednotlivých zástupců rozličné (dekarboxylace, oxidace, hydroxylace nebo rozštěpení struktury), ale vesměs dochází k tvorbě stabilních meziproduktů nebo radikálů, které jsou následně bezpečně odstraněny antioxidačními enzymy nebo recyklovány specifickými pochody (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Nejvýznamnější *in vivo* produkovaný antioxidant je již zmíněný GSH (viz kapitola 1.2.1.). Dalšími jsou **bilirubin, α-keto kyseliny (pyruvát a 2-oxoglutarát),** sexuální hormony jako **estradiol a jeho deriváty**, **koenzym Q**, hormony jako **serotonin** nebo **melatonin**, **kyselina močová** nebo pigment **melanin** (vzniklý oxidací a polymerací, tyrozinu, L-DOPA) (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Z potravy přijímáme celou řadu významných antioxidantů. Nejznámějším je **kyselina askorbová (vitamín C)**, **α-tokoferol (vitamín E)** (*Halliwell et Gutteridge, 1999)* a různé rostlinné **flavonoidy** *(Kaiserová et al., 2007)*.

1.2.3. Chelátory železa

Jelikož se železo nemůže eliminovat z organismu jinak než při krvácení, musí existovat způsob, jak nadbytečné a katalyticky reaktivní železo bezpečně uskladnit a udržovat tak neustále homeostázu železa. V organismu mají tuto funkci přirozené chelátory železa, transportní a zásobní proteiny transferin, lactoferin a feritin (viz kapitola 1.1.3.) *(Crichton et Charloteaux-Wauters, 1987)*. Chelatace železa má také význam při boji s infekcí, protože sekvestrace železa má významný bakteriostatický význam. Během zánětu dochází k snížení pH, a proto se jako chelátor uplatňuje hlavně lactoferin *(Halliwell et Gutteridge, Arch. Biochem Biophys, 1990)*. Je nutné

také zmínit, že některé bakterie také mohou chelatovat železo produkcí tzv. sideroforů schopných vyvázat železo z transferinu (*Drechsel et Winkelmann, 1997).*

Při různých patologických stavech dochází k přetížení organismu železem a jeho následným patologickým ukládáním nebo tvorbou ROS. Přirozené mechanismy nejsou schopné dostatečně udržet homeostázu železa, je tedy nutné přistoupit k terapeutickému podávání chelátorů železa. Během posledního desetiletí bylo publikováno mnoho studií používající chelátory železa v první řadě pro zmírnění přesycení železem, následně jako antivirové, antiproliferativní, antifibrotické a fotoprotektivní látky s antioxidačními vlastnostmi *(Tam et al., 2003).*

Atom železa má koordinační číslo 6, takže může koordinačně vázat 6 monodentálních ligandů. V praxi se vyskytují chelátory železa jako bidentální ligandy (poměr chelátor : železo - 3:1), tridentální (2:1) a hexadentální (1:1). Tyto cheláty mají mnohem větší stabilitu než monodentální cheláty. Nově vyvíjené látky jsou bi- nebo tridentální chelátory (lipofilnější látky), protože mají oproti hexadentálním chelátorů (silně hydrofilní povaha a velká molekula) mnohem větší biodostupnost a mohou se proto podávat perorálně. Vzniklé komplexy se železem jsou vyloučeny močí nebo stolicí. Optimální chelátor železa by měl tvořit pevné a stabilní komplexy se železem, mít malou strukturu, dobrou biodostupnost při perorální aplikaci a dobrou prostupnost biologickými membránami *(Tam et al., 2003).*

Nejstarší léčiva používaná a vyvíjená pro **léčbu β-thalassemie** mají původ v přírodních sideroforech. Léčivo první volby **desferoxamin (DFO**, obr. 1.1) je zástupce sideroforů s otevřenou hydroxymátovou strukturou, izolovaný z plísně *Sterptomyces pilous*. Je to hexadentální sloučenina, která velmi účinně váže extracelulární železo. Její nevýhodou je velká a hydrofilní molekula, tudíž se nejenom prakticky nevstřebává z per os a musí se podávat bolestivou dlouhodobou infúzí, ale i špatně prostupuje do buněk k intracelulárním zásobám železa. Navíc je DFO velmi rychle eliminován ledvinami, a proto jsou vyvíjeny nové modifikace formy s prodlouženým uvolňováním jako ICL-749B *(Galanello, 2001)* nebo DFO vázané na hydroyxethyl derivát škrobu (HES-DFO), které mají prodloužené uvolňování *(Hedlund et al., 1993).* Při předávkování se vyskytují závažné nežádoucí účinky jako ototoxicita *(Tam et al., 2003).*

V praxi nověji používaný chelátor železa **deferipron** (obr. 1.2) je zástupcem řady hydroxypyridinů, které jsou účinnými bidentálními chelátory registrovanými při léčbě β-thalassemie. Je to analog mimosinu, chelátoru izolovaného z lusku *Mimosa paduca*. Je perorálně účinný, ale podstupuje výraznou biotransformaci na nechelatující O-glukuronid. Proto byla vyvinuta druhá řada s methylamidovým substituentem (zástupci CP502 a CP363 jsou v preklinické fázi zkoušení) *(Liu et Hider, 2002).*

Dalším novějším chelátorem železa používaným již v praxi pro léčbu β-thalassemie je **deferasirox** (ICL670, obr. 1.3), derivát triazolu tridentálně vázající železo slaběji než DFO, který je na rozdíl od něj ale účinný per os *(Liu et Hider, 2002).*

Ve fázi (pre)klinického zkoušení v indikaci β-thalassemie je celá řada dalších potenciálních chelátorů železa. Například od *Streptomyces antibioticus DSM 1865* jsou odvozené orálně účinné látky jako **desferrithiocin (DFT)** (Na^+ sůl vykazuje nefrotoxicitu) a jeho analog **deferitin (GT56-252)**, který je ve fázi klinického zkoušení *(Bergeron et al., 1991; Marquis et al., 2002).* Jinou skupinou chelátorů jsou hydroxylované deriváty **N,N'-dibenzylethylendiamin-N,N'-dioctové kyseliny (DBED)**. Jsou to hexadentální sloučeniny, které jsou stejně jako DFO nejsou účinné per os. Novější derivát bez hydroxylových skupin **(DBED),** vykazujíce navíc schopnost vychytávat $OH^{\bullet}$ *(Galey et al., 1995).*

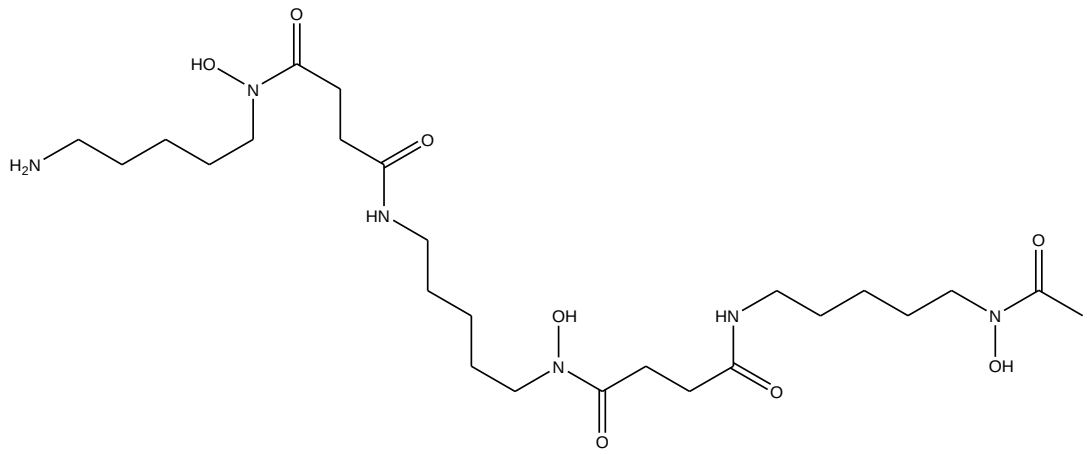
Velmi významnou skupinou chelátorů železa jsou deriváty aroylhydrazonů. Základní látkou je **pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH**, obr. 1.4) objevený v 70. letech v laboratoři dr. Poňky *(Ponka et al., 1979).* PIH a jeho analogy jako salicylaldehyd benzoyl hydrazon (SBH) a nejvýznamnější derivát **salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH**, obr. 1.5) mají významné chelatační schopnosti převyšující DFO s prokázanými významnými antioxidačními vlastnostmi. Jedná se o netoxické, tridentální specifické chelátory železa s malou lipofilní molekulou, které dobře prostupují buněčnou membránou a mohou sekvestrovat i intracelulární železo *(Ponka et al., 1974, 1994).* Jejich nevýhodou je labilní hydrazonová vazba, která se ve vodném prostředí velmi snadno rozkládá. Některé deriváty PIH mají významné antiproliferativní vlastnosti dané schopností inhibovat ribonukleotid reduktázu (Fe - dependentní enzym). Jedná se o naftalenový derivát **2-hydroxy-1-naftyl isonikotinoyl hydrazon (NIH**, obr. 1.6) nebo o thiosemikarbazonové deriváty *(Lovejoy et Richardson, 2002)*, ze kterých **triapin** (**3-aminopyridin-2-**

karboxaldehyd thiosemikarbazon) (obr. 1.7) je ve třetí fázi klinického zkoušení *(Richardson, 2002).*

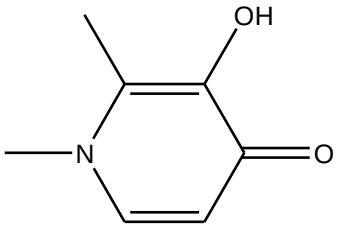
Ve snaze zabránit nežádoucí sekvestraci železa z biologicky významných reakcí při dlouhodobém podávání, byla vyvinuta řada prochelátorů železa SIH maskující aktivní fenolovou skupinu nezbytnou pro chelatační účinek. Deriváty borové kyseliny a SIH tvoří ester **BSIH** (obr. 1.8) hydrolyzující se na SIH až po reakci s H_2O_2 v zánětlivém ložisku *(Franz et al., 2007).* Další možností tvorby prochelátorů, hlavně pro prevenci oxidačního poškození kůže UVA paprsky, je tvorba fotolabilního 1-(2-nitrofenyl)ethylem etheru PIH nebo SIH (**2-NFE-SIH**, obr. 1.9) *(Yiakouki et al., 2006).*

Velmi zajímavým chelátorem železa je derivát bisdioxopiperazinu **dexrazoxan** (obr. 1.10), který je jako jediný chelátor železa používán v indikaci prevence chronické kardiotoxicity způsobené antracyklinovými chemoterapeutiky. Jedná se o proléčivo, které se v organismu štěpí na vlastní účinnou látku **ADR-925** (obr. 1.11) podobající se molekule EDTA. Na rozdíl od ostatních funguje jako nespecifický chelátor a přesný mechanismus působení není známý *(Hasinoff, 1998).* Dříve předpokládaná teorie o klíčovém významu oxidačního stresu v iniciaci chronické antracyklinové kardiotoxicity byla v posledních pracích zpochybněna *(Kaiserová et al., 2006).*

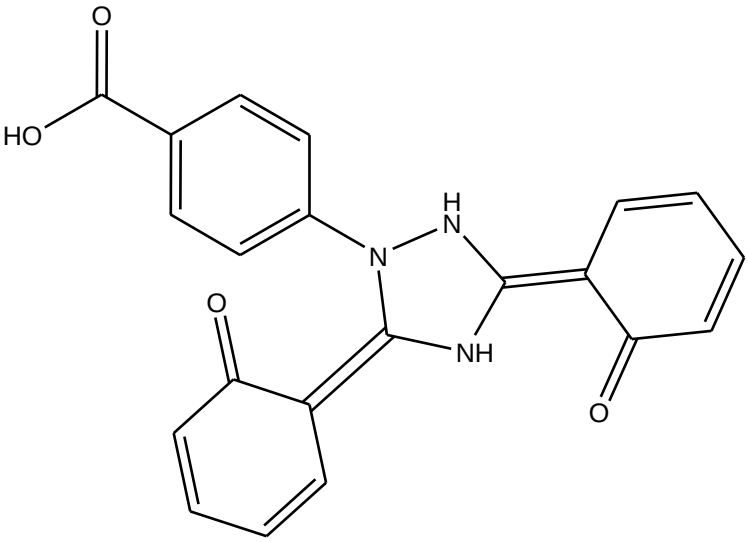
Mezi **fotoprotektivní** chelátory železa patří 2-furildioximy (FDO) a některé další jemu nepodobné sloučeniny jako kyselina kojová (5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-on) *(Mitani et al, 2001).* V současné době jsou používány v kosmetické jako topické přípravky v kombinaci s vitamínem E *(Tam et al., 2003).*



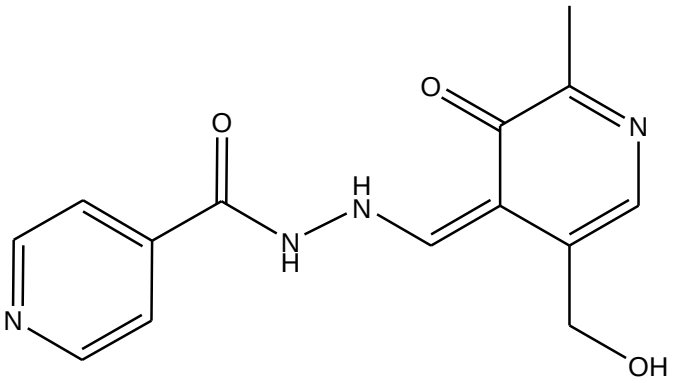
Obr. 1.1: Desferoxamin (DFO)



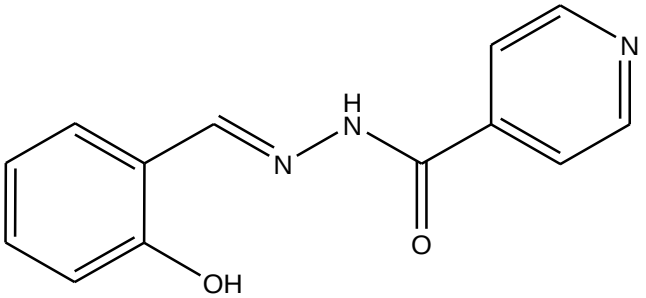
Obr. 1.2: Deferipron



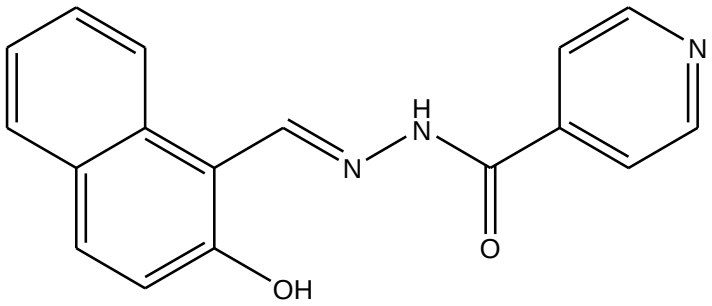
Obr. 1:3: Deferasirox (ICL670)



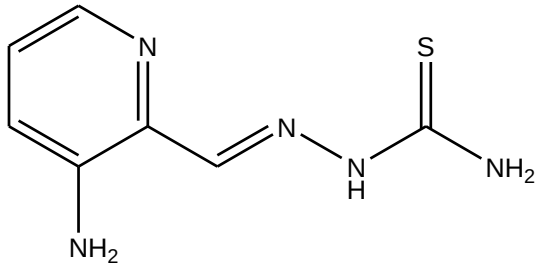
Obr. 1.4: PIH



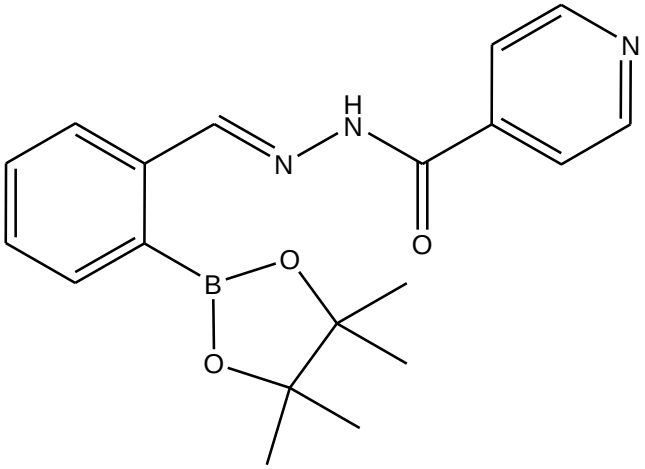
Obr. 1.5: SIH



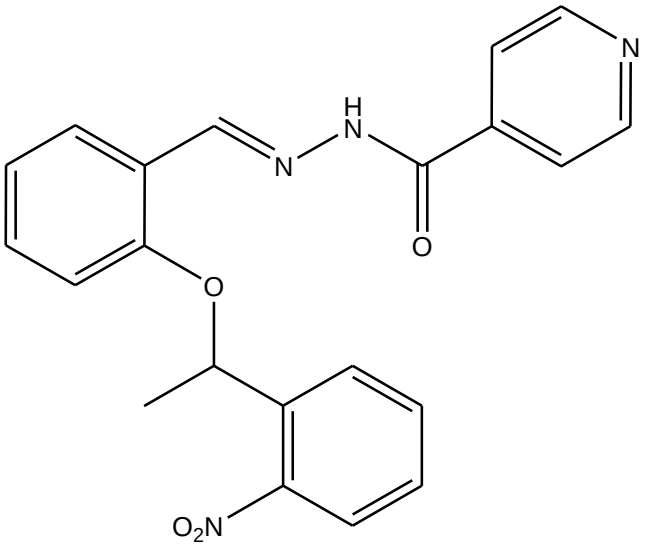
Obr. 1.6: NIH



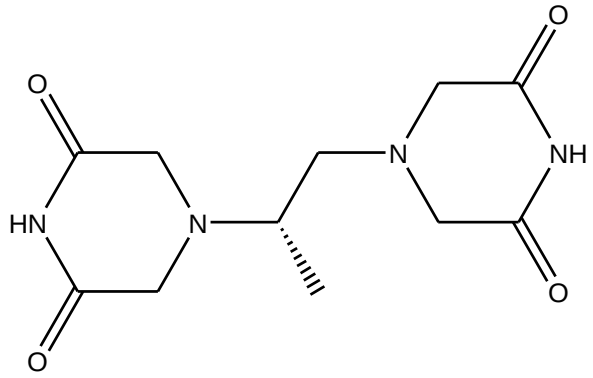
Obr. 1.7: Triapin



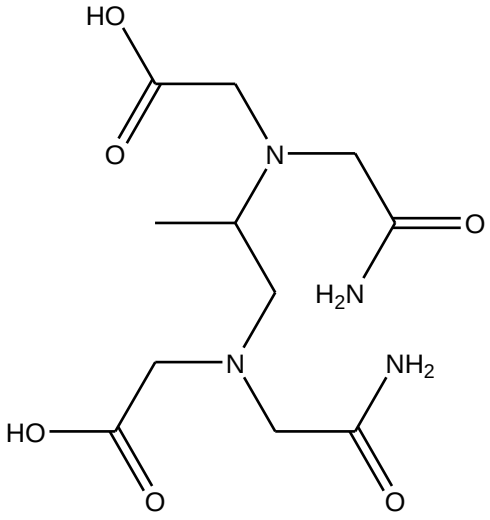
Obr. 1.8: BSIH



Obr. 1.9: 2-NFE-SIH



Obr. 1.10: Dexrazoxan



Obr. 1.11: ADR-925

1.3. Oxidační stres

1.3.1. Různé úrovně oxidačního stresu a význam adaptačních a reparačních mechanismů

Za fyziologických podmínek musí být v každé buňce produkce ROS vyrovnaná antioxidačním mechanismům. Pokud je poškozen antioxidační mechanismus a / nebo je zvýšená produkce ROS, dochází k stavu označovaného pojmem oxidační stres, což může mít za následek poškození buněčných součástí. Termín oxidační stres poprvé použil Sies v roce 1985 (*Sies, 1991).* Buněčné poškození může být různě závažné, záleží na množství produkovaných ROS a na adaptačních a reparačních schopnostech buňky (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Pokud je produkováno pouze malé množství ROS, dochází k **změně buněčné funkce**. Malé koncentrace H_2O_2 či jiných ROS (jednotky μM) stimulují proliferaci různých buněčných linií. ROS také mohou interferovat s transdukcí buněčných signálů a také s mezibuněčnou komunikací prostřednictvím "gap junctions" (*Halliwell et Gutteridge, 1999; Valko et al., 2007).*

Při větším oxidačním poškození jsou pro osud buňky rozhodující **adaptační a reparační mechanismy** zahrnují indukci antioxidačních systémů, produkci chaperonů (ochraňujících proteiny) nebo ubiquitinu (označuje poškozené proteiny a předurčuje je k zániku v proteasomu), zvýšení exprese genu kódujícího proteasom (multikatalytického proteazového komplexu) a např. aktivaci transkripčních faktorů ze skupiny MAPK (AP-1, NF-κB, p53). Pokud je rozsah buněčného poškození velký a neopravitelný, buňka podstupuje **buněčnou smrt** buď apoptózou nebo nekrózou (viz dále) (*Halliwell et Gutteridge, 1999; Pahl et Baeuerle, 1994).*

1.3.2. Poškození DNA oxidačním stresem

V poškození DNA mají kromě ROS také velký význam reaktivní formy dusíku a chlóru. Dochází k hydroxylaci, nitraci nebo chloraci a k deaminaci purinových a pyrimidinových bází (tvorba hypoxanthinu z uracilu nebo uracilu z cytosinu, tvorba hydroxy-, nitro- nebo chloro- derivátů guaninu v poloze 8). Nejvíce prostudovaným mechanismem poškození DNA je hydroxylace guaninu na 8-hydroxyguanin, způsobená $OH^{\bullet}$ radikálem. ROS mohou také poškozovat histony, štěpit řetězec DNA a vytvářet tak abnormální strukturu DNA, dále mohou

inhibovat a poškozovat enzymy účastnící se reparačních procesů v DNA (endonukleázy, ligázy apod.) *(Sancar, 1996).* Tyto změny mají za následek mutace projevující se expresí nefunkčních nebo abnormálně funkčních proteinů. Hromadění zlomů v DNA je spojováno s deplecí ATP a NAD^+ (deplece NAD^+ je způsobena poly(ADP-ribóza)polymerázou (PARP) štěpící NAD^+ a interferující se syntézou ATP) končící programovanou buněčnou smrtí *(Szábo et al., 1996).* Dlouhodobé vystavení DNA oxidačnímu stresu má významnou spojitost s kancerogenezí, teratogenezí nebo stárnutím (*Halliwell et Gutteridge, 1999.)*

1.3.3. Poškození lipidů oxidačním stresem

Dalším cílem buněčného poškození jsou lipidové struktury např. v buněčné membráně nebo LDL lipoproteinech. Membránový prostor představuje na rozdíl od cytosolu silně hydrofóbní prostředí, kde reaktivita ROS roste. Prakticky všechny ROS vznikající v organismu (primárně i sekundárně) napadají nenasycené mastné kyseliny obsahující dvojnou vazbu, s kterou reagují za tvorby endoperoxidu, prekurzoru malondialdehydu (MDA), charakteristického, ne však hlavního, konečného produktu. V mnohem větší míře je produkován 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) *(Marnett, 1999, Halliwell et Gutteridge, 1999).* Endoperoxidy mohou radikálově reagovat s dalšími molekulami lipidů a vytvářet tak C-C vazbu s přemostěním struktury za vzniku nefunkčních struktur *(Foote et al, 1995)* nebo ztráty semipermeabilního charakteru buněčné membrány nebo přímo jejím poškozením s následným nekontrolovatelným influxem plasmatického obsahu do buňky a naopak *(Halliwell et Gutterige, 1999).* Malondialdehyd představuje za fyziologického pH nereaktivní sloučeninu ve formě enolátu, ale v kyselém prostředí představuje velmi reaktivní sloučeninu, která snadno reaguje hlavně s aminokyselinami a purinovými a pyrimidinovými bázemi. Výsledkem je mutagenní působení (*Benamira et al, 1995).*

1.3.4. Poškození proteinů oxidačním stresem

Mechanismy zahrnující poškození proteinů ROS souvisí buď s hydroxylací aromatických zbytků aminokyselin v proteinech (vznik tyrozinu z fenylalaninu), oxidací aminokyselin obsahující thiolové skupiny (cystein a methionin) za tvorby

přemostění struktury proteinu prostřednictvím disulfidických můstků. Důsledkem těchto reakcí je poškození struktury proteinů, které nemůžou plnit svoji funkci. Příkladem je oxidace thiolových skupin enzymu ribonukleotid reduktázy (*Stadtman, 2004).*

1.3.5. Poškození buněčných funkcí oxidačním stresem

Poškození lipidů, proteinů a DNA znamená také poškození receptorů a transportních proteinů. Známé jsou poškozené β- a α_1-adrenergní receptory *(Kramer et al., 1986)*, membránové transportní systémy jako Ca^{2+}ATPáza, Ca^{2+}/Na^{+} výměníkový systém, K^{+} kanály a konečně i Na^{+}/K^{+-}ATPázový systém. Tyto změny vedou k porušení iontové homeostázy (Ca^{2+}, K^{+}) a k abnormální funkci především nervového a kardiovaskulárního systému. Změny v buněčné koncentraci iontů mají následně význam při změně buněčného objemu. H_2O_2 nebo tert-buthylhydroperoxid přidaný k *in vitro* buněčné linií vede k abnormálnímu otevírání K^{+} kanálu a úplnému vyplavení K^{+} z buňky (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Velký význam má poškození buněčné regulace Ca^{2+} koncentrace, která je za normálních okolností velmi nízká a je regulována skladováním Ca^{2+} v mitochondriích nebo endoplasmatickém retikulu (hlavní zásobárny Ca^{2+} v buňce). Ca^{2+} ionty mají význam jako druzí poslové, v depolarizaci buněčné membrány a regulaci mnohých buněčných funkcí (*Orrenius et Nicotera, 1994).*

1.3.6. Poškození mitochondrií a endoplasmatického retikula oxidačním stresem

Vlivem oxidačního stresu dochází k uvolnění Ca^{2+} poškozením mitochondrie $ONOO^{-}$ a endoplasmatického retikula peroxidy, a tím k nadměrné aktivaci proteinkinázy C, fosfolipázy A, syntázy NO, Ca^{2+}-dependentní endonukleázy (enzym fragmentující DNA, velmi důležitý při apoptóze) a calpainu (proteázy štěpící aktin). Tyto děje mají za následek poškození struktury cytoskeletu, oxidaci thiolových skupin a depleci ATP, což se běžně projevuje jako tzv. „cell blebbing“ (předstupeň vedoucí k tvorbě apoptotických tělísek) (*Orrenius et Nicotera, 1994).*

Poškození mitochondriální membrány ROS vede ke ztrátě neprostupnosti mitochondriální membrány pro většinu molekul. Tato neprostupnost je nezbytná

pro syntézu ATP v dýchacím řetězci. Mitochondriální membrána obsahuje póry spojující matrix s okolím. Tyto póry se mohou otevřít při zvýšené koncentraci Ca^{2+} a určitého indukčního činidla (účinnými látkami v tomto smyslu jsou $ONOO^-$ a $RO_2^{\bullet}$) *(Packer et Murphy, 1995)*. Dochází k zastavení produkce ATP a k úniku látek z matrix (enzymy, GSH, Ca^{2+}), následkem čehož je porušená osmotická rovnováha a mitochondrie bobtná (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Akao et al. Rozpoznal ve své práci tři různé fáze v rozvoji buněčné smrti zprostředkované mitochondriemi. Jedná se o fázi iniciální, kdy dochází k rozvoji morfologických změn podmíněných přesycením Ca^{2+} iontů, ovšem při zachovaném mitochondriálním potenciálu. Následuje fáze depolarizační, kdy dojde k náhlému zhroucení mitochondriálního potenciálu otevřením PTP a nakonec poslední fragmentační fáze, kdy dojde ke změnám na povrchu buněčné membrány vedoucí k eventuálnímu rozpadu na malé částice *(Akao et al., 2003).*

1.3.7. Buněčná smrt

Buněčná smrt nastává přirozeně dvěma mechanismy nekrózou a apoptózou, v závislosti na velikosti poškození a síle působící noxy. Nízké koncentrace ROS vedou spíše k apoptóze, zatímco vysoké k nekróze *(Hampton et Orrenius, 1997).* Apoptóza představuje programovanou buněčnou smrt a na rozdíl od nekrózy je dějem aktivním a přesně organizovaným, vyžadujícím energii ve formě ATP.

Buňka podstupuje apoptózu buď při ztrátě pozitivních signálů potřebných pro růst a přežití, nebo při přijetí negativního signálu (zvýšená hladina oxidantů v buňce nebo vystavení buněk záření o vysoké energii či chemoterapii apod. *(Hengartner et al. 2000).* Buněčnou sebevraždu může způsobit také nahromadění poškozené DNA (tvorba fragmentů) prostřednictvím PARP enzymového mechanismu *(Szabó et al., 1996)*, který je proto někdy označován jako sebevražedná odpověď (viz poškození DNA oxidačním stresem) (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Při **nekróze** dochází z morfologického hlediska k ztrátě buněčné integrity, flokulaci chromatinu, bobtnání buněčných organel (mitochondrie přestávají tvořit ATP) přechází v postupné zvětšování buněčného objemu s následnou rupturou buňky a uvolněním celého obsahu do okolí. Z biochemického hlediska představuje nekróza ztrátu schopnosti regulovat iontovou homeostázu. Dochází při ní k nahodilé degradaci DNA na mono- a oligonukleotidy (vyskytující se i opožděně po buněčné

smrti), která má za následek roztírání DNA po celém agarózovém gelu při elektroforéze. Nevyžaduje energii a může probíhat i při 4°C. Z hlediska fyziologického významu představuje nekróza smrt skupiny buněk. Vlivem buněčné ruptury a uvolnění buněčného obsahu (proteolytické, katalytické enzymy, enzymy produkující ROS, ionty železa, mědi a H^+, cytokiny a podobně fungující buněčné fragmenty) do okolí vyvolává nekróza imunitní zánětlivou reakci, která poškozuje i primární noxou nezasažené buňky. Zbytky jsou fagocytovány makrofágy (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Při **apoptóze** dochází z morfologického hlediska k smršťování buněčné membrány, je pozorovatelná tvorba bublin (tzv. „membrane blebs"), ale membrána zůstává neporušena. Uvnitř buňky se začínají tvořit apoptotická tělíska (tvorba nových membrán obalujících buněčný obsah ve formě intaktních vesikul), v jádře začíná agregovat chromatin, ale veškeré organely zůstávají funkční. Z biochemického hlediska je apoptóza přesně regulovaným procesem vyžadujícím aktivaci a koordinaci enzymatických procesů. Na rozdíl od nekrózy je apoptóza závislá na přísunu ATP z neporušených mitochondrií; buněčný mitochondriální systém je během apoptózy přestavován blíže k buněčnému jádru a jednotlivé mitochondrie jsou propojeny do tvaru popisovaného jako „obilný klas" *(Skulachev et al., 2004)*. Během apoptózy dochází k některým charakteristickým změnám, jako je vystavení fosfatidylserinu na plasmatické membráně, uvolnění cytochromu c z mitochondrie do cytoplasmy a k charakteristické fragmentaci DNA. Fragmentace DNA neprobíhá nahodile, vznikají proto úseky přesných délek a charakteristickým koncem, které při elektroforéze vytváří na agarózovém gelu „žebříček". Z fyziologického hlediska je apoptóza smrtí jediné buňky, vyvolané určitým fyziologickým nebo patologickým stimulem. Nedochází k zánětlivé reakci a okolní buňky zůstávají netknuté. Apoptotická tělíska jsou fagocytovány okolními buňkami nebo makrofágy (*Halliwell et Gutteridge, 1999).*

V literatuře byly popsány tři různé mechanismy, kterými je zajišťována apoptóza. Jedná se o zprostředkování vnitřními signály (přes mitochondrie), nebo přes externí signály zprostředkovaně přes tzv. „death receptors" Fas a konečně prostřednictvím apoptózu indukujícího faktoru (AIF) *(Hale et al., 1996).*

Zprostředkování apoptózy přes vnitřní signální cestu je důsledkem poškození buňky. Významným článkem této cesty jsou proteiny z rodiny Bcl-2, lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně, které jsou aktivovány také prostřednictvím

ROS a RNS *(Philchenkov et al., 2004).* Bcl-2 rodina se skládá ze tří skupin a to z anti-apoptoticky působících Bcl-2 proteinů vázajících se na pro-apoptoticky působící Bax proteiny (jejich expresi indukuje protein p53n) a z pro-apoptotických proteinů BH3, které se váží na Bcl-2 a znemožňují tak inhibici apoptózy *(Gogvadze et al., 2006).* Bax způsobuje tvorbu pórů v mitochondriální membráně a důsledkem je uvolnění cytochromu c do cytoplasmy. Cytochrom c vytváří komplex (spotřeba ATP) s proteinem Apaf-1. Agregace těchto komplexů vytváří apoptozómy vázající se na prokaspázu 9. *(Philchenkov et al., 2004).* Aktivovaná kaspáza-9 následně aktivuje další tzv. „exekuční" kaspázy 3 a 7, které vedou ve výsledku k rozštěpení strukturálních proteinů cytoplasmy, degradaci DNA a fagocytóze buňky *(Brüne et al., 1997).*

2. Cíle diplomové práce

- Ověření použitelnosti metody stanovení buněčné viability H9c2 buněk na 96-jamkové mikrotitrační destičce.
- Charakterizace toxicity H_2O_2 a t-BHP ve vzrůstajících koncentracích na buněčnou linii H9c2 po 24-hodinové inkubaci.
- Charakterizace toxicity 200 μM H_2O_2 a 200 μM t-BHP v časovém průběhu.
- Studium protektivních účinků v závislosti na dávce chelátoru železa salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) na H9c2 buněčné linii vystavené oxidačnímu stresu vyvolanému 100 μM a 200 μM H_2O_2 nebo t-BHP.
- Studium protektivních účinků 100 μM SIH na buněčné linii H9c2 vystavené vzrůstající koncentraci H_2O_2 nebo t-BHP.
- Charakterizace vlastní toxicity chelátoru železa SIH - akutní (24-hodinová inkubace) a dlouhodobé (72-hodinová inkubace).

3. Metodická část

3.1. Přístrojové vybavení

3.1.1. Zařízení pro sterilní práci a kultivaci buněčné linie H9c2

- box s laminárním prouděním Aura 2000 m.a.c. (BioAir, Itálie) s třídou biohazardu A
- buněčný inkubátor s termostatem a regulací koncentrace CO_2 Forma Scientific CO_2 incubator, model 311 (Forma Scientific, USA)
- laboratorní sklo sterilní (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- mikrozkumavky 0,5 a 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- pipetíky Eppendort easypet (Eppendorf, Německo) a BioHit midi plus (Biohit, Finsko)
- automatické pipety Eppendorf research různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- pipeta elektronická 8-kanálová e-PET Biohit 50-1200 µl (Biohit, Finko)
- plastové sterilní kultivační nádoby T75, Petriho misky 150mm, 6-jamkové destičky (TPP) a 96-jamkové mikrotitrační kultivační destičky s plochým dnem (Gama),sérologické sterilní pipety různého rozsahu (TPP)
- plastové sterilní zkumavky o různém objemu (TPP)
- špičky sterilní různého rozsahu (Eppendorf, Biohit)
- vodní lázeň Memmert WB 14 LV (Memmert, Německo)

3.1.2. Invertovaný epifluorescenční mikroskop

Pro mikroskopii ve fázovém rozhraní a pro fluorescenční mikroskopii byl používán invertovaný mikroskop Nikon Eclipse TS 100 s objektivem Nicon 10x/0,25. Pro pořízení fotografií byla použita kamera COOL-1300Q (VDS Vosskühler, Německo) se softwarem NIS-Elements AR 2.20 (Laboratory Imaging, Česká republika)

Pro fluorescenční mikroskopii byl použit zdroj UV Nikon S-CHG s rtuťovou lampou a filtry Texas Red (TxR), FITC a DAPI (Nikon).

3.1.3. Čtečka 96-jamkových mikrotitračních destiček

Pro spektrofotometrická stanovení byly použity čtečky Microplate reader model 550 (Bio-Rad; USA) s výměnnými optickými filtry a Infinite M 200 (Tecan; Rakousko) s optickým hranolem.

3.1.4. Ostatní laboratorní vybavení

- Analytické váhy ScalTec SBC 22
- Laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- Laboratorní třepačky vortex (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- Mikrozkumavky 0,5 a 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- automatické Pipety Eppendorf research různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- Plastové zkumavky o různém objemu (TPP, Švýcarsko)
- Špičky různého rozsahu (Eppendorf, Německo a Biohit, Finsko)

3.2.*In vitro* cytotoxicitní experimenty

3.2.1. Buněčná linie H9c2

Všechny pokusy byly prováděny s buněčnou linií H9c2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) odvozenou z embryonálních potkaních srdečních myoblastů. Jedná se o nenádorovou linii, která je mnoha laboratořemi stále častěji používána jako relevantní *in vitro* model srdeční tkáně. Její hlavní výhodou je pasážovatelnost a tedy i snadná dostupnost velkého množství buněk.

3.2.2. Kultivační média a reagencie

- Dulbeco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM; Lonza, BioWhitaker nebo Sigma)

- Fetální telecí sérum (FCS; Lonza)
- fosfátový pufr tablety (PBS, Sigma)
- HEPES roztok 1M (Sigma)
- penicilin-streptomycin roztok 100x koncentrovaný (P/S, používaný v koncentraci 10 000 jednotek/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu; Sigma)
- trypsin-EDTA roztok 10x koncentrovaný (používaný jako roztok 0,5 % trypsin a 0,02 % EDTA; Sigma)

Zásobní roztoky P/S a trypsin-EDTA byly před použitím naředěny PBS pufrem. Se všemi roztoky bylo zacházeno v aseptickém prostředí a byly uchovávány v chladu.

3.2.3. Kultivace, pasážování a práce s buněčnou linií H9c2

Aby si buňky zachovaly svoji morfologii, byly pasážovány pravidelně každý 3. – 4. den, kdy dosahovaly přibližně 80-90% konfluence. Buňky byly kultivovány ve sterilních plastových kultivačních nádobách T75 nebo na Petriho miskách. Kultivace buněk byla prováděna s DMEM obsahující pyruvát (Lonza nebo BioWhitaker) doplněném o 10 % FCS, 1 % HEPES a 1 % P/S. Buňky byly po celou dobu kultivace a experimentů uchovávány v termostatu při 37°C a směsi 95 % vzduchu a 5% CO_2. Na opláchnutí buněk před trypsinováním a na přípravu směsi trypsinu s EDTA a roztoku penicilin/streptomycinu byl používán PBS pufr.

Zbytková proliferace buněk H9c2 způsobená stimulačním vlivem růstových faktorů obsažených v FCS by mohla způsobit zkreslení výsledků kombinace cytotoxického a antiproliferativního působení studovaných látek. Proto byla 24 hodin po nasazení buněk nutná pre-inkubace v bezsérovém médiu (SFM) trvajících dalších 24 hodin. Složení SFM bylo DMEM neobsahující pyruvát (Sigma) s 1 % HEPES a 1 % P/S.

3.2.4. Rozmrazování nové generace H9c2 buněk

Kryozkumavku s 10 ml zamražené suspenze buněk v roztoku DMEM, 10 % FBS, 5 % DMSO a 1 % P/S jsme vyndali z tekutého dusíku, povolili uzávěr a

uchovávali na suchém ledu dokud jsme nezačali pracovat. Poté jsme kryozkumavku rychle rozehřáli v dlani nebo ve vodní lázni (37°C), při pomalém rozmrazování by mohly být buňky poškozeny DMSO. K rozmraženým buňkám bylo postupně přidáváno chladné médium (aby se předešlo osmotickému šoku při náhlém snížení koncentrace DMSO), a byla provedena centrifugace 7 min při 70 G. Supernatant jsme odsáli a peletu resuspendovali v 5 ml předehřátého média se sérem a přenesli do sterilní plastové kultivační nádoby, inkubovali přes noc a druhý den vyměnili médium.

3.3. Reagencie a chemikálie

- ADS pufr o pH 7,4 (NaCl 116 mM, KCl 5,3 mM, $MgSO_4.7H_2O$ 1,2 mM, 1,13 mM, HEPES 20 mM)
- dimetylsulfoxid ≥ 99,9% (DMSO; Sigma)
- etanol absolutní p.a. ≥ 99,9% (Penta)
- formaldehyd 36,3% (Penta)
- fosfátový pufr tablety (PBS; Sigma)
- fosforečnan sodný monohydrát p.a. ($NaH_2PO_4.H_2O$; Penta)
- D-glukóza monohydrát farma (Penta)
- hydroxid sodný p.a. (NaOH; Penta)
- chlorid draselný p.a. (KCl; Penta)
- chlorid sodný p.a. (NaCl; Penta)
- chlorid vápenatý hexahydrát ČL 2002 ($CaCl_2.6H_2O$; Penta)
- sonda JC-1 (Molecular Probes/Invitrogen)
- kyselina octová ledová p.a. ≥ 99,9% (Penta)
- neutrální červeň roztok 3,3g/L (Sigma)
- peroxid vodíku 3% roztok (H2O2; Fluka)
- salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH; prof. P. Ponka, McGill University, Kanada)
- síran hořečnatý heptahydrát ČL 2002($MgSO_4.7H_2O$; Penta)
- tert-butylhydroperoxid 70% roztok(t-BHP; Sigma)
- trypanová modř (Sigma)

- ultradestilovaná voda (MQ; přístroj Milli-Q RG, Millipore, Česká republika)

Na přípravu všech reagencií a pracovních roztoků byla použita ultradestilovaná voda, kromě zásobního roztoku SIH, který byl připravován v DMSO.

Všechny pracovní roztoky byly připravovány ad hoc. Zásobní roztoky SIH byly po přípravě dispenzarizovány po 100 µl a zamraženy, aby se předešlo kontaminaci vzdušnou vlhkostí.

3.4. Uspořádání experimentů

Pro stanovování toxicity nebo protekce buněk byly buňky 48 hodin před každým experimentem nasazeny na 96-jamkovou mikrotitrační kultivační destičku s plochým dnem v koncentraci 10 000 buněk na jamku ve 100 µl DMEM s 10 % FCS. Suspenze pro nasazení buněk na 96-jamkovou destičku byla získána zředěním základní suspenze, v které se stanovil počet buněk počítáním v Bürkerově komůrce. Po 24-hodinách od nasazení bylo buňkám vyměněno médium se sérem za 200 µl SFM a těsně před vlastním pokusem znovu vyměněno za 200 µl SFM, do kterého byly poté přidány stanovované látky. Inkubace se stanovovanou látkou trvaly 24 nebo 72 hodin a potom bylo následně prováděno stanovení buněčné životaschopnosti.

Pro fotografickou dokumentaci byly buňky nasazeny na 6 jamkovou kultivační destičku v koncentraci 180 000 buněk na jamku ve 2,5 ml média se sérem. Suspenze pro nasazení buněk byla opět získána zředěním základní suspenze, v které se stanovil počet buněk počítáním v Bürkerově komůrce. Po 24 hodinách bylo vyměněno médium za 2,5 ml SFM a za dalších 24 hodin za 2 ml spolu se stanovovanými látkami. Fotografie byly pořizovány buď po skončení 24-hodinové inkubace se stanovovanými látkami nebo přímo po jejich přidání pro sledování v čase. Pro experimenty s fluorescenční sondou JC-1, byla tato sonda přidána v den experimentu a místo SFM byl použit čirý a nefluoreskující ADS pufr doplněný o 1 mM $CaCl_2$ a 1g/l glukózy.

3.5.Statistické analýzy a výpočty EC_{50} a IC_{50}

Pro statistickou analýzu dat byl používán softwaru SigmaStat for Windows verze 3.0.1 (SPSS, USA). Pro analýzu variability dat byla použita metoda One Way ANOVA a pro soubor dat s nenormálním rozložením dat Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks.

Pro porovnání dvou skupin dat bya použita metoda t-testu a u souboru dat s nenormálním rozložením byla použita metoda Mann-Whitney Rank Sum Test.

Pro stanovení hodnot EC_{50} a IC_{50} byl použit software CalcuSyn verze 2.0 (Biosoft, UK).

Hodnoty v grafech uváděny jako výsledná hodnota ± standardní chybová hodnota.

3.6.Stanovení toxicity oxidačně působících látek

Stanovení toxicity peroxidu vodíku (H_2O_2) a tert-butylhydroperoxidu (t-BHP) bylo provedeno 24-hodinovou inkubací buněk se vzrůstající koncentrací těchto látek na 96-jamkové destičce podle zmíněného uspořádání. Pracovní roztoky H_2O_2 a t-BHP byly pipetovány do každé jamky zvlášť. Každý experiment se skládal z těchto skupin: slepý vzorek, 2 x kontrola a 2 x vzrůstající koncentrace H_2O_2 nebo t-BHP [μM]: 10; 30; 60; 80; 100; 200 (pouze u H_2O_2); 300; 600.

3.7.Stanovení akutní i dlouhodobé toxicity chelátoru železa SIH

Stanovení akutní toxicity SIH bylo provedeno 24-hodinovou inkubací buněk se vzrůstající koncentrací SIH na 96-jamkové destičce podle zmíněného schématu. Pracovní roztoky SIH byly přidávány k buňkám spolu se SFM a 0,6 % DMSO pro zlepšení rozpustnosti vysokých koncentrací SIH. Každý experiment se skládal z těchto skupin: slepý vzorek, 2 x kontrola, 2 x kontrola s 0,6 % DMSO a vzrůstající koncentrace SIH [μM]: 10; 30; 100; 300; 600.

Při stanovení dlouhodobé toxicity trvala inkubace 72 hodin, jinak bylo uspořádání pokusu analogické se stanovením akutní toxicity SIH.

3.8. Studium protekce H9c2 buněk SIH před oxidačním poškozením v závislosti na dávce SIH

Stanovení protekčního účinku jednotlivých koncentrací SIH bylo provedeno jejich 24- hodinovou ko-inkubací se vzrůstající koncentrací SIH a danou koncentraci H_2O_2 nebo t-BHP na 96-jamkové destičce podle zmíněného uspořádání. Pracovní roztoky SIH byly přidávány k buňkám spolu se SFM a 0,1 % DMSO a pracovní roztoky H_2O_2 nebo t-BHP byly pak pipetovány přímo do jednotlivých jamek. Každý experiment se skládal z těchto skupin: slepý vzorek, 3 x kontrola, 2 x 100 nebo 200 μM H_2O_2 nebo t-BHP a vzrůstající SIH [μM]: 0,3; 1; 3; 10; 30; 100.

3.9. Studium protekce H9c2 buněk SIH před oxidačním poškozením v závislosti na zvyšující se koncentraci H_2O_2 a t-BHP

Stanovení protekčního účinku SIH bylo prováděno 24-hodinovou ko-inkubací H9c2 buněk se 100 μM roztokem SIH a vzrůstající koncentrací H_2O_2 nebo t-BHP na 96-jamkové destičce podle zmíněného uspořádání. Pracovní roztok SIH byl přidáván k buňkám spolu se SFM a 0,1 % DMSO a pracovní vodné roztoky H_2O_2 nebo t-BHP byly pipetovány přímo do jednotlivých jamek. Každý experiment se skládal z těchto skupin: slepý vzorek, 2 x kontrola a vzrůstající koncentrace H_2O_2 nebo t-BHP [μM]: 100; 300; 600; 1000; 3000 v přítomnosti 100 μM SIH.

3.10. Stanovení počtu živých buněk počítáním v Bürkerově komůrce

Počet živých buněk byl stanoven počítáním buněk ve směsi s roztokem trypanové modři v Bürkerově komůrce. Tato metoda využívá schopnosti živých buněk aktivně odstraňovat trypanovou modř ze svého nitra, kam samovolně difundovala. Živé buňky proto zůstávají patrné jako jasně zářící světlé útvary oproti modravému pozadí. Mrtvé buňky jsou stejné barvy jako pozadí a dobře odlišitelné od buněk živých.

Buňky při stanovení byly inkubovány se stejným objemem 0,4% roztoku trypanové modři a po 5 minutách po 10 μl naneseny na obě počítací plochy

Bürkerovy komůrky. Výsledný součet buněk v 10 čtvercích vynásobený 2000 se rovná počtu buněk v 1 ml suspenze.

3.11. Stanovení životaschopnosti buněk H9c2 pomocí vychytávání neutrální červeně

Buněčná životaschopnost byla stanovována spektrofotometrickým měřením absorbance roztoku neutrální červeně na čtečce mikrotitračních destiček BioRad Microplate reader model 550 nebo Tecan Infinite M 200. Principem stanovení je fakt, že živé buňky aktivně vychytávají z média molekuly neutrální červeně, které jsou následně uloženy v kyselém prostředí lysosomů, zatímco mrtvé buňky nikoliv. Po lýze buněk se neutrální červeň uvolní z lysosomů do roztoku a její množství odpovídá počtu přeživších buněk.

Po ukončení 24- nebo 72-hodinové inkubace bylo buňkám odsáto 100 µl inkubačního média a přidáno 100 µl roztoku neutrální červeně (80 µg/ml), aby výsledná koncentrace neutrální červeně byla 40 µg/ml. Buňky byly poté 3 hodiny inkubovány v termostatu při 37° C ve směsi 95 % vzduchu a 5 % CO_2. Po této inkubaci bylo odstraněno veškeré médium a následovala 15 minutová inkubace se 100 µl fixačního roztoku (1 g chloridu vápenatého na 100 ml 0,5% formaldehydu) při pokojové teplotě. Po 15 minutách byl odsát veškerý fixační roztok a buňky dvakrát opláchnuty 50 µl PBS. Po opláchnutí byly buňky inkubovány s 200 µl lyzačního roztoku (1 % ledové kyseliny octové v 50% etanolu) při pokojové teplotě 15 minut a dalších 15 minut třepány na třepačce při pokojové teplotě. Poté byla odečtena absorbance při 540 nm. Výsledné hodnoty absorbance zmenšené o hodnotu slepého vzorku jsou vyjádřeny jako procenta kontroly (kontrola = 100 % životaschopných buněk). Slepý vzorek byl průměr jamek s buňkami inkubovanými se 3 mM peroxidu vodíku.

3.12. Fotografická dokumentace toxicitních a protektivních studií na buňkách H9c2

3.12.1. Metody fotografické dokumentace

Fotografická dokumentace byla pořizována při mikroskopii ve fázovém kontrastu viditelného světelného spektra a při fluorescenční mikroskopii se sondou JC-1 při 10ti-násobném zvětšení.

Pro tyto experimenty byly buňky uspořádány podle již zmíněného uspořádání a inkubovány 24 hodin se studovanou látkou nebo jejich směsmi.

Fotografie pro dokumentaci v průběhu času byly pořizovány na kontrolních buňkách, ke kterým bylo přidáno po inkubaci se sondou JC-1 (viz kapitola 3.12.2) 200 μM H_2O_2 nebo 200 μM t-BHP. Fotografie byly následně pořizovány v pravidelných 30-minutových intervalech po celkovou dobu 4,5 hodin.

Fluorescenční sonda JC-1 patří k potenciometrickým fluorescenčním sondám, často používaným v molekulární biologii pro znázornění organel s určitým elektrickým potenciálem na membráně. V buňce představují takovéto organely mitochondrie. Sonda JC-1 je aktivně kumulována právě v místech s vysokým elektrickým potenciálem a dosahuje tam tak vysokých koncentrací, při kterých dimerizuje za tvorby tzv. "J-agregátů", které fluoreskují jasně červeně. Při porušení mitochondriální membrány dochází k porušení elektrického potenciálu a sonda uniká do cytosolu, kde již nedosahuje takových koncentrací a "J-agregáty" již nevytváří a fluoreskuje jasně zeleně.

3.12.2. Inkubace H9c2 buněk s fluorescenční sondou JC-1

Podle výše zmíněného uspořádání experimentu bylo buňkám po 24-hodinové inkubaci se studovanou látkou odebráno médium a vyměněno za 2 ml předehřátého ADS pufru s 1 mM $CaCl_2$, 1 g/l glukózy a 0,5 μM roztokem sondy JC-1. V tomto pufru byly buňky inkubovány 30 minut při 37°C, poté dvakrát důkladně opláchnuty předehřátým ADS pufrem s 1 mM $CaCl_2$ a 1 g/l glukózy a ponechány 15-20 minut na tmavém místě při laboratorní teplotě před vlastním zahájením experimentu.

4. Výsledky

4.1. Stanovení toxicity oxidačně působících látek

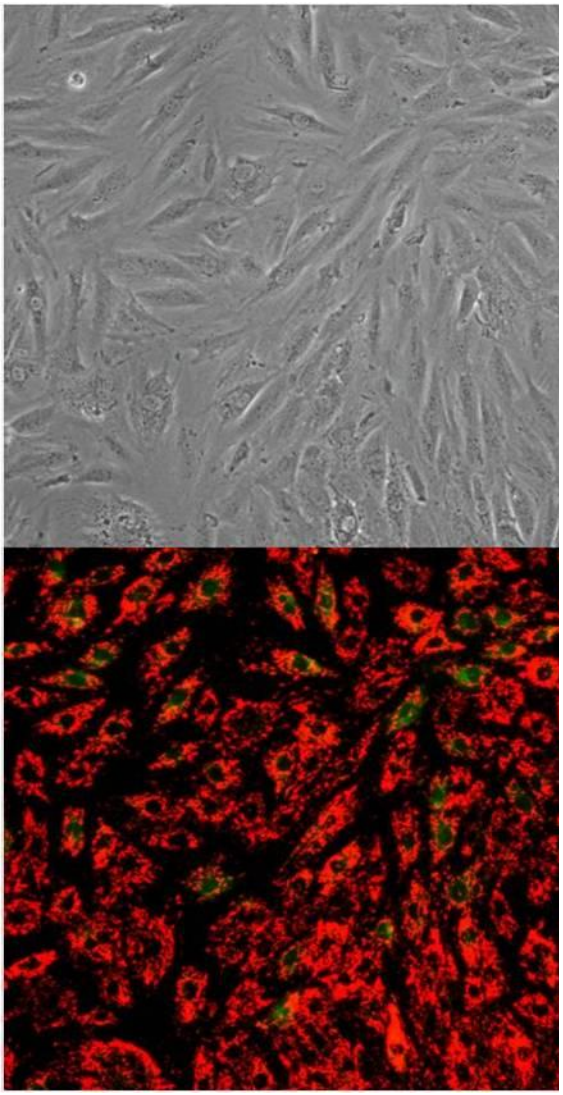
4.1.1. Fotografická dokumentace toxicity H_2O_2 a t-BHP na H9c2 buňkách v průběhu času

Během 4,5 hodinové inkubace H9c2 buněk s 200 μM H_2O_2 nebo 200 μM t-BHP byly pořízeny fotografie, na kterých je jasně patrná změna buněčné morfologie a postupná ztráta mitochondriálního elektrického potenciálu. Horní část obrázků ukazuje fotografie H9c2 buněk ve fázovém kontrastu a spodní část tytéž buňky v tmavém poli se sondou JC-1.

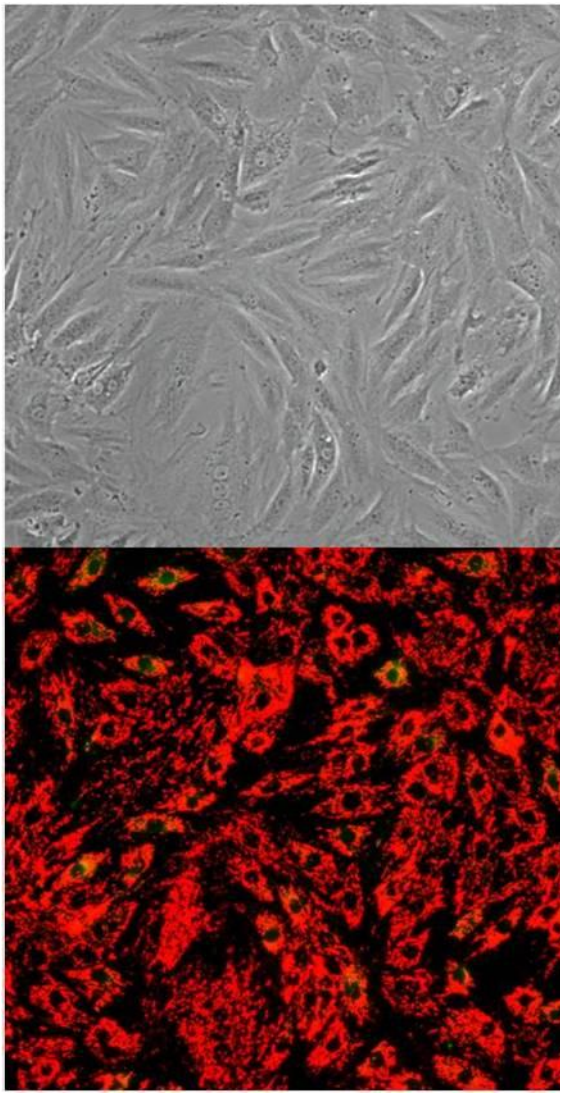
Na fotografiích jsou patrné morfologické změny, které byly při inkubaci s 200 μM H_2O_2 patrné od 30. minuty (obr. 4.1.c nahoře) pouze jako mírné zvětšení zrnitosti cytosolu a od 180. minuty (obr. 4.1.h nahoře) jako výraznější ztrátou buněčné morfologie a od 240. minuty (obr. 4.1.i nahoře) byla patrná fragmentace buněčných součástí lokalizovaná hlavně v okolí buněčného jádra. Podle fotografií se sondou JC-1 byla patrná rychlá depolarizace mitochondriální membrány charakterizovaná výrazným úbytkem červené fluorescence JC-1 sondy od 30. minuty (obr. 4.1.c dole), přičemž v 90. minutě (obr. 4.1.e dole) již byl poměr červené a zelené fluorescence vyrovnaný. Ztráta funkčních mitochondrií pokračovala až do 210. minuty (obr. 4.1.ch dole), kdy se již dále poměr neměnil.

Při inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP byly na rozdíl od H_2O_2 pozorovány od 30. minuty (obr. 4.2.c nahoře) výraznější změny v buněčné morfologii, postupné smršťování buněk včetně zvýšení denzity cytosolu a od 180. minuty (obr. 4.2.h nahoře) tvorba vesikul uvnitř buňky. Tvorba buněčných fragmentů lokalizovaných v blízkosti jádra nebyla na rozdíl od H_2O_2 pozorována. Podle fotografií se sondou JC-1 je patrné, že si buňky vystavené t-BHP zachovávají delší dobu funkční mitochondrie. Od 1. minuty (obr. 4.2.a dole) je patrný mírný nárůst zelené fluorescence do 120. minuty (obr. 4.2.f dole), kdy je poměr červené a zelené fluorescence zhruba vyrovnaný. Od 120. minuty (obr. 4.2.f dole) následuje postupná ztráta červené a výrazný přírůstek zelené fluorescence, svědčící o ztrátě funkčních mitochondrií. Ztráta funkčních mitochondrií pokračovala na rozdíl od H_2O_2 až do 270. minuty (obr. 4.2.j dole)

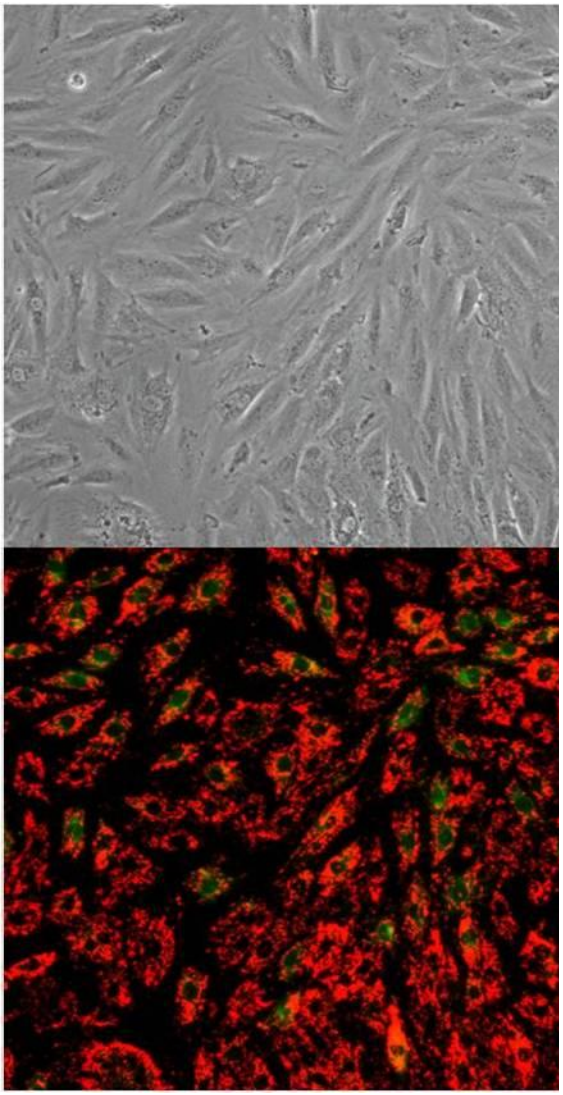
Obr. 4.1.a: H_2O_2 – 0 min.



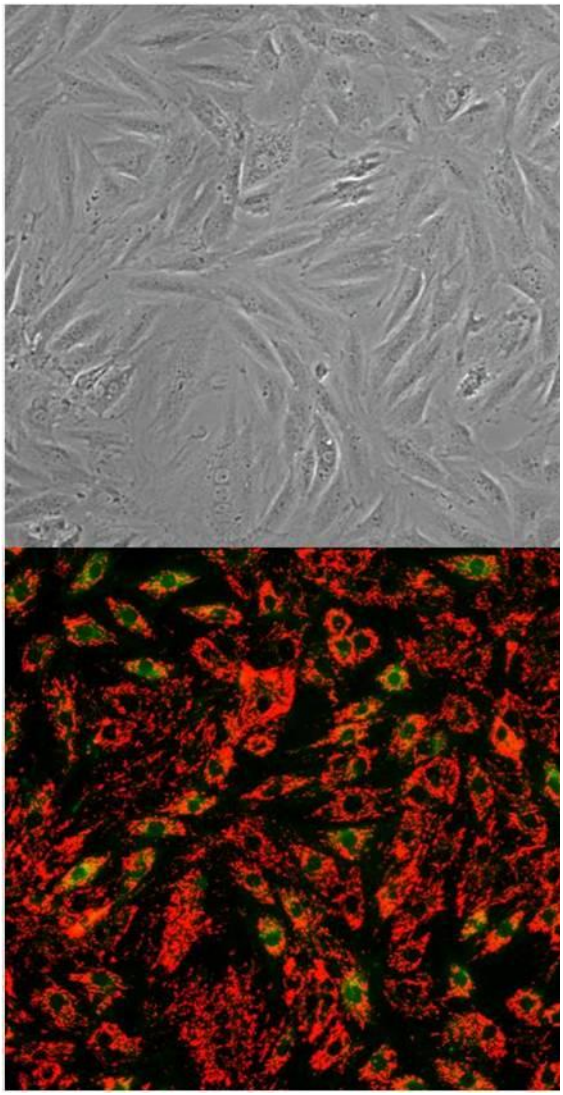
Obr. 4.2.a: t-BHP – 0 min.



Obr. 4.1.b: H_2O_2 – 1 min

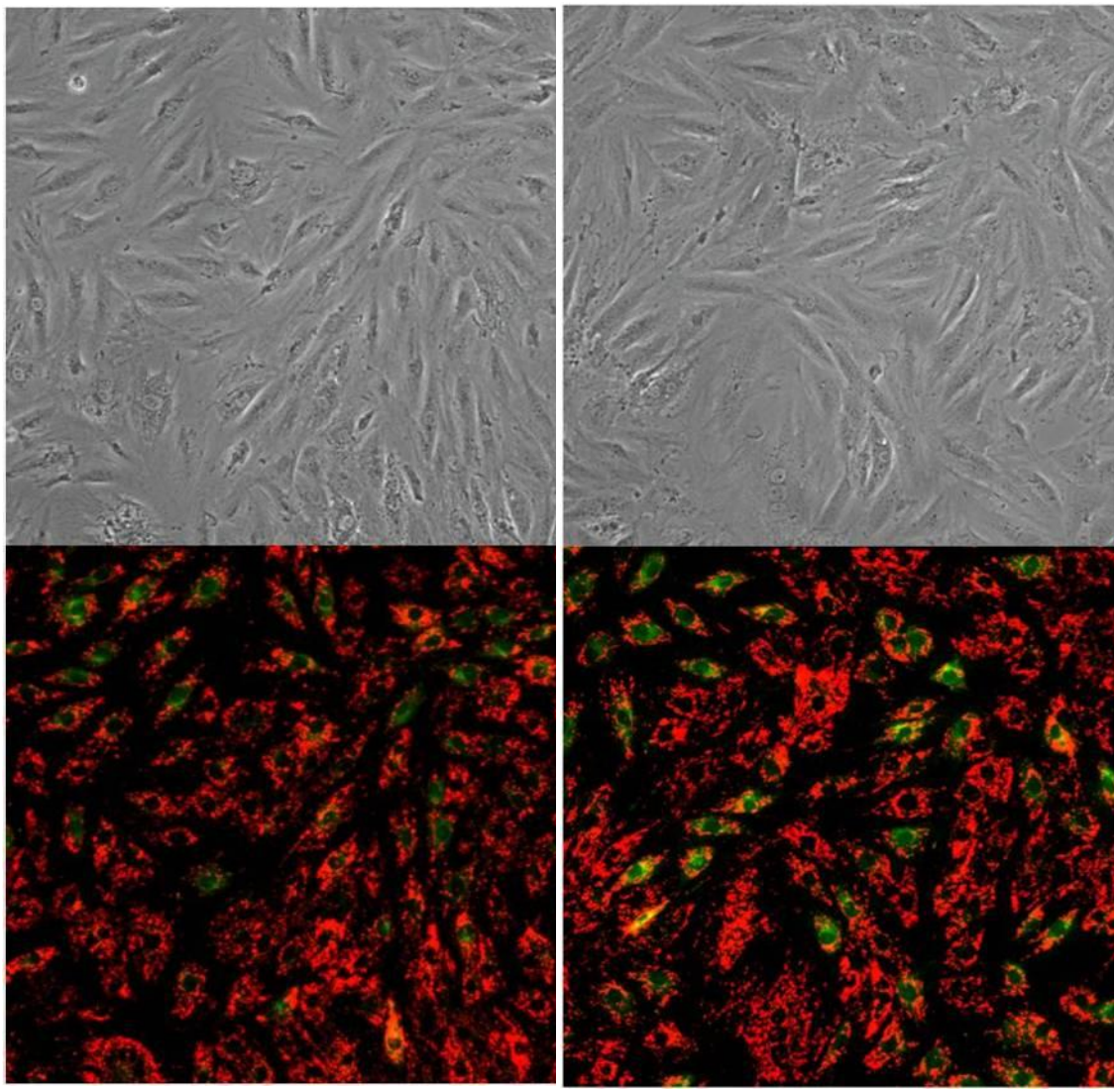


Obr. 4.2.b: t-BHP – 1 min

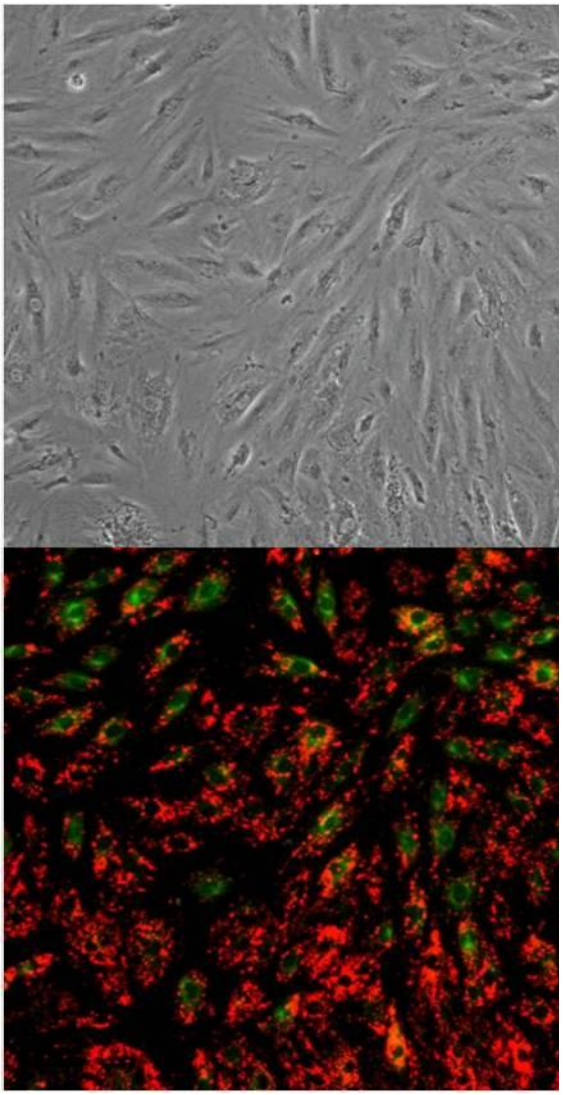


Obr. 4.1.c: H_2O_2 – 30 min

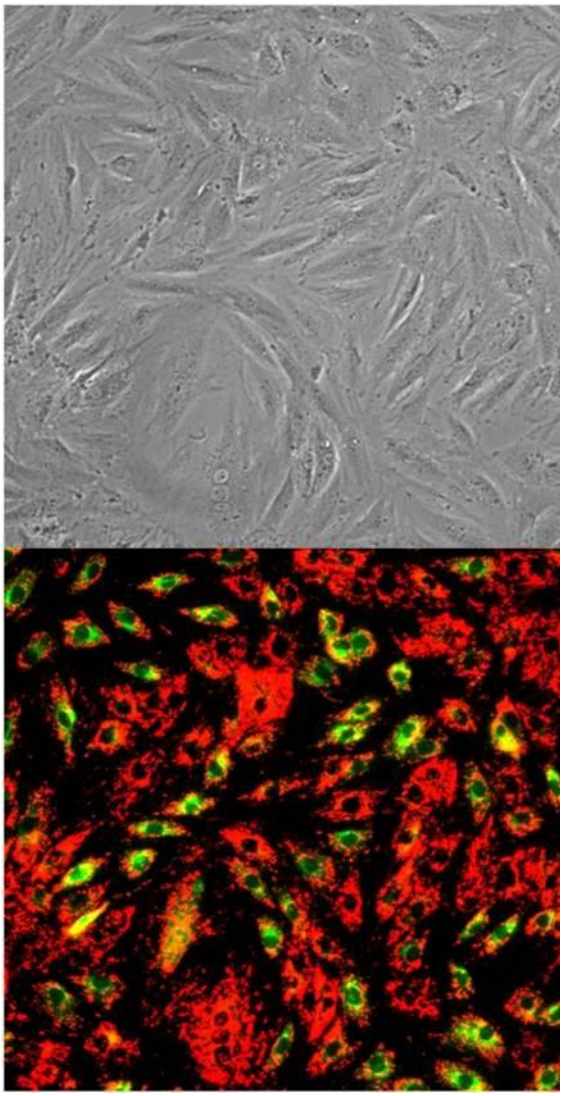
Obr. 4.2.c: t-BHP – 30 min



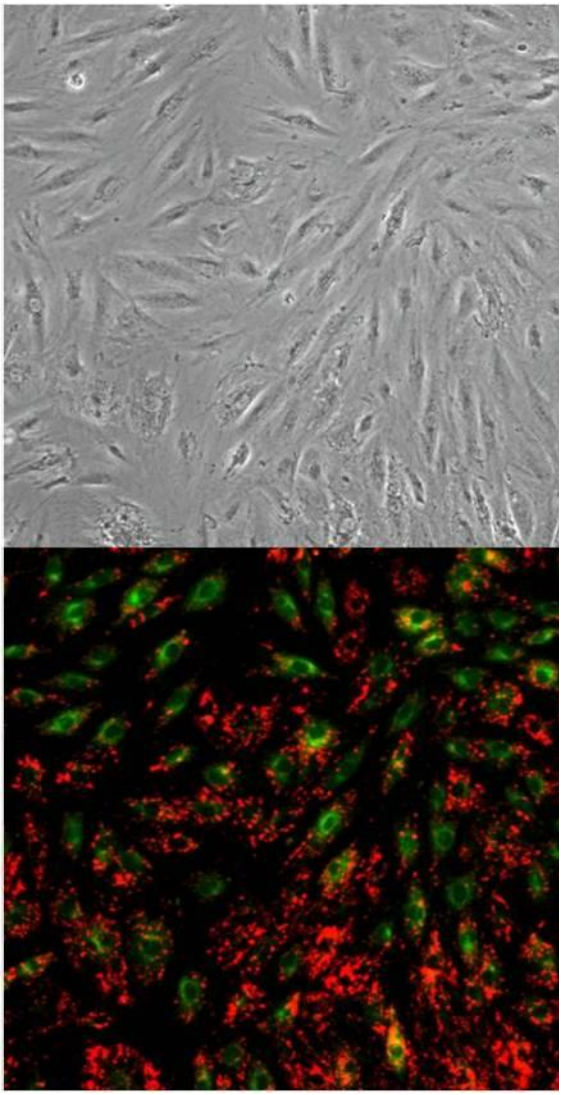
Obr. 4.1.d: H_2O_2 – 60 min



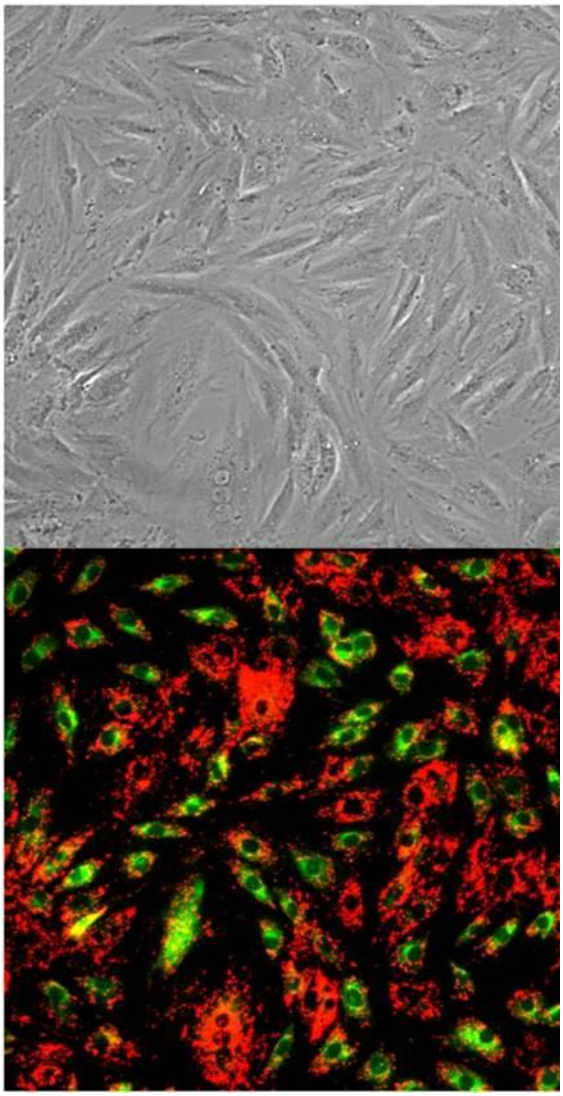
Obr. 4.2.d: t-BHP – 60 min



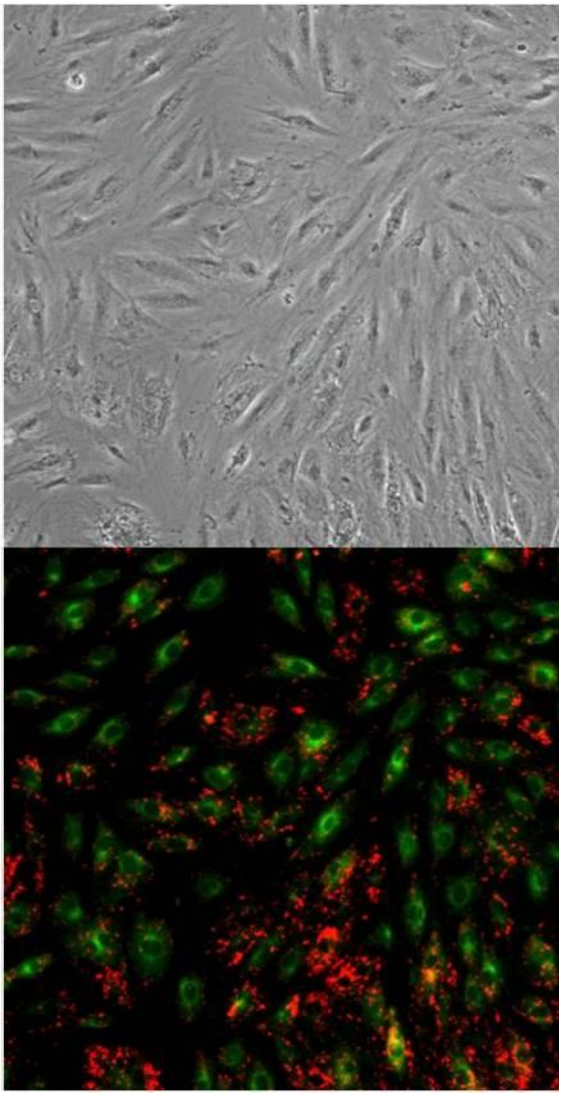
Obr. 4.1.e: H_2O_2 – 90 min



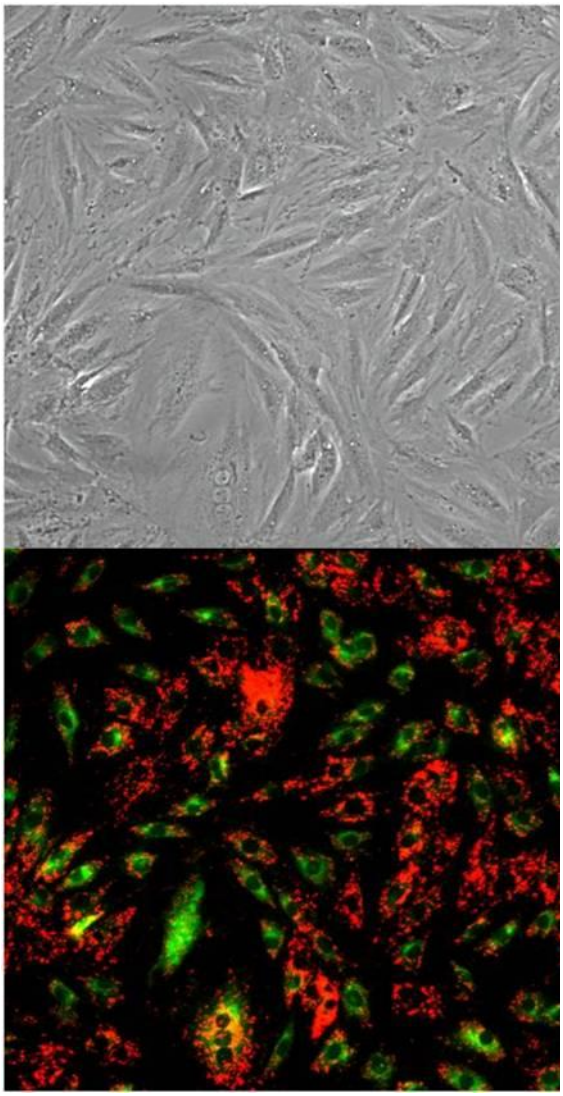
Obr. 4.2.e: t-BHP – 90 min



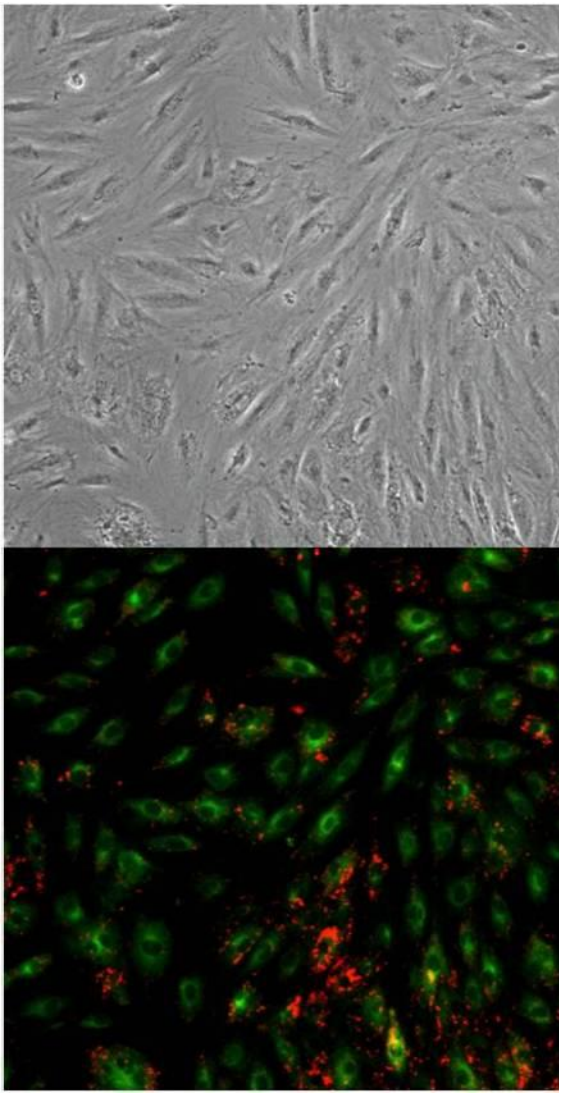
Obr. 4.1.f: H_2O_2 – 120 min



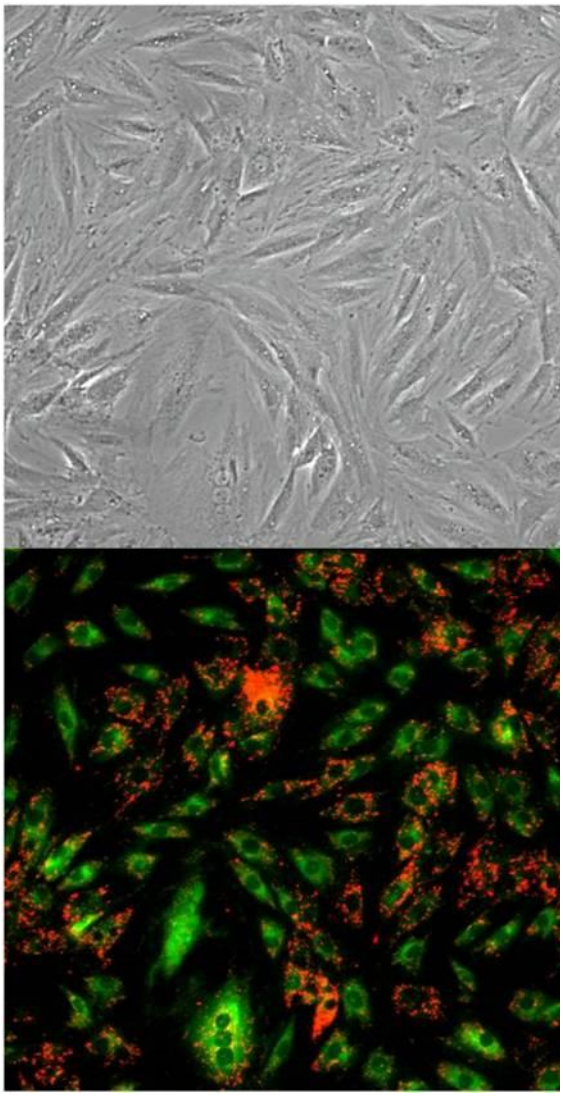
Obr. 4.1.f: t-BHP – 120 min



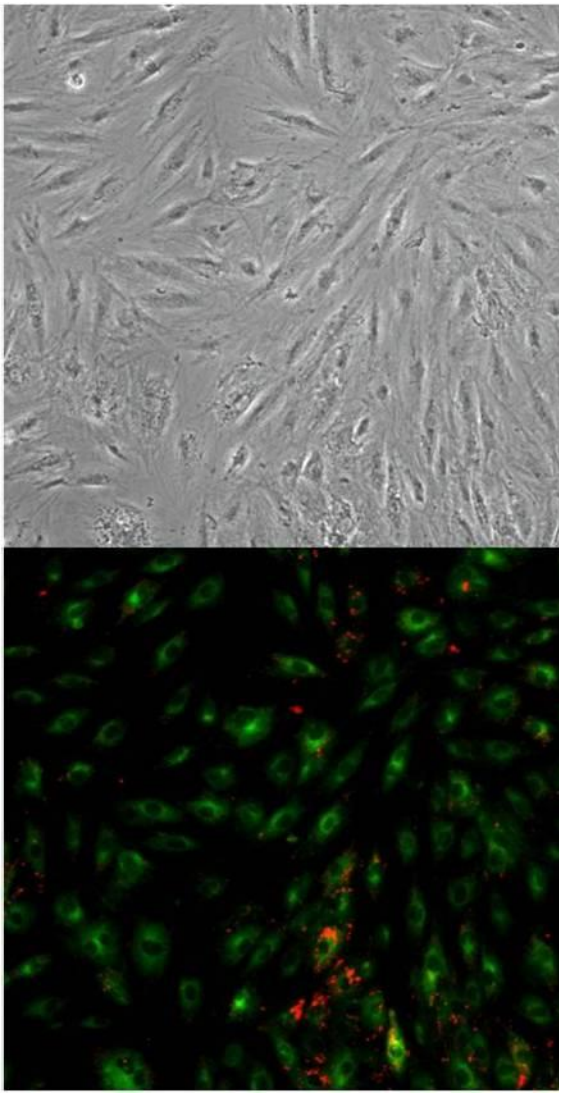
Obr. 4.1.g: H_2O_2 – 150 min



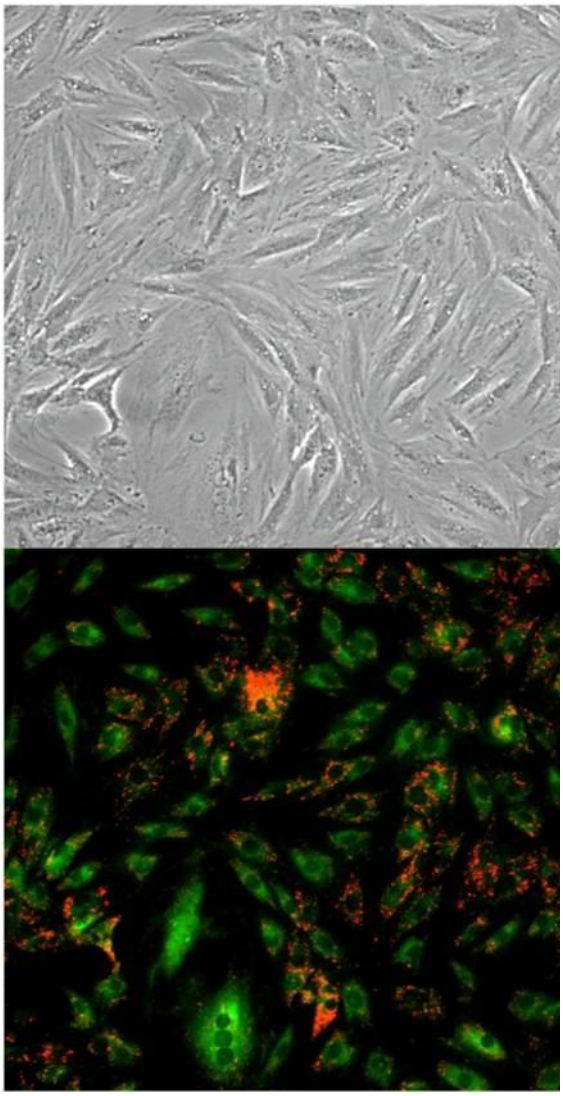
Obr. 4.2.g: t-BHP – 150 min



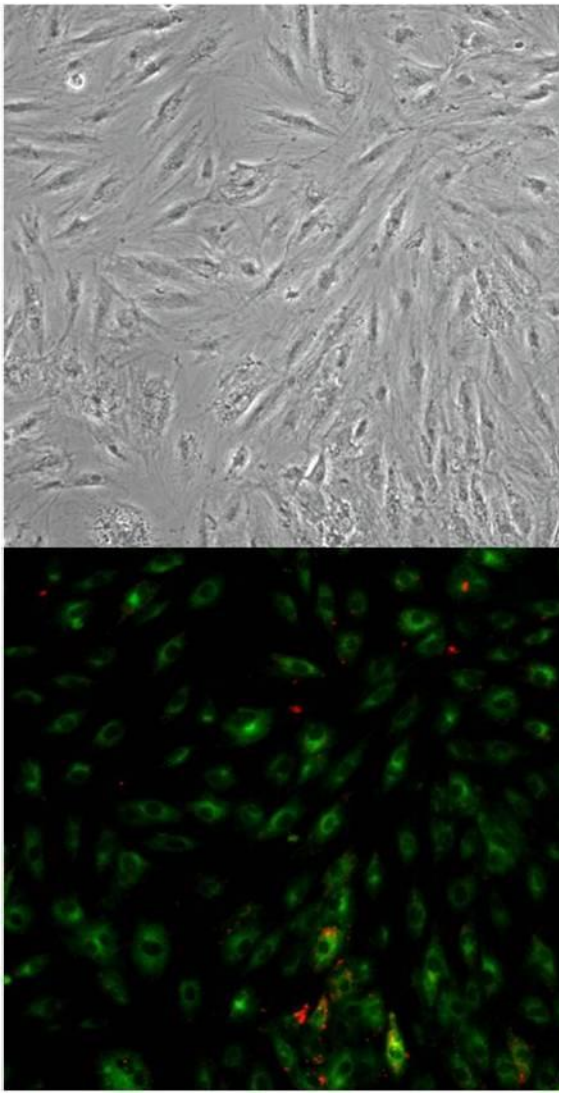
Obr. 4.1.h: H_2O_2 – 180 min



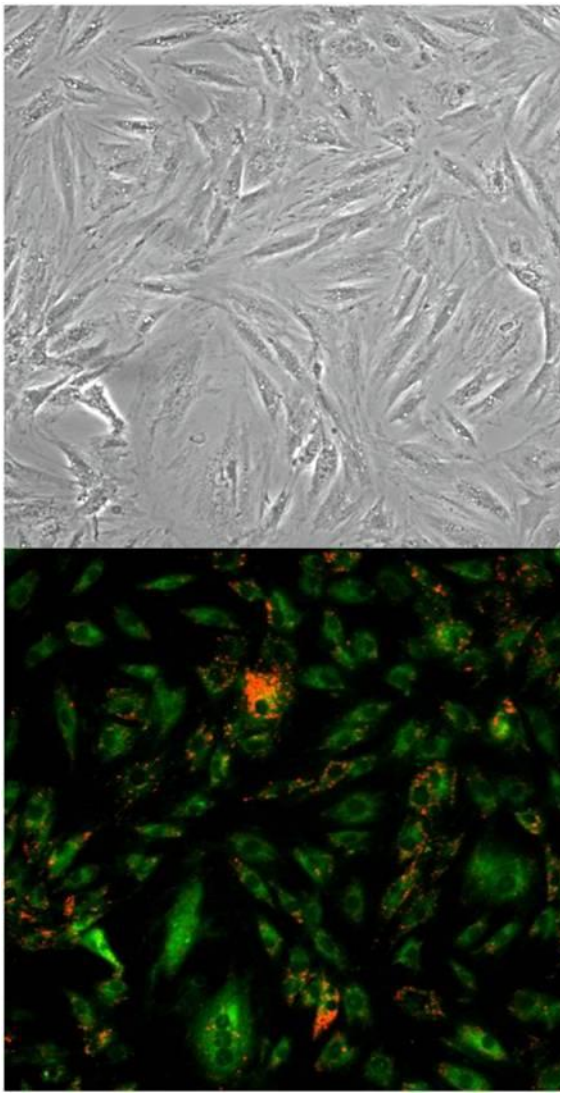
Obr. 4.2.h: t-BHP – 180 min



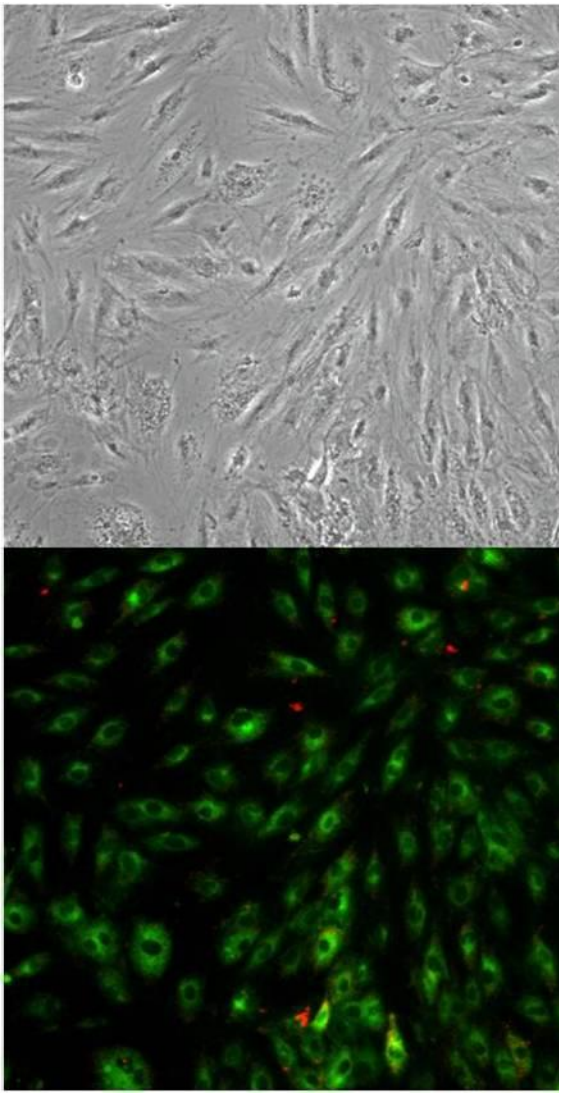
Obr. 4.1.ch: H_2O_2 – 210 min



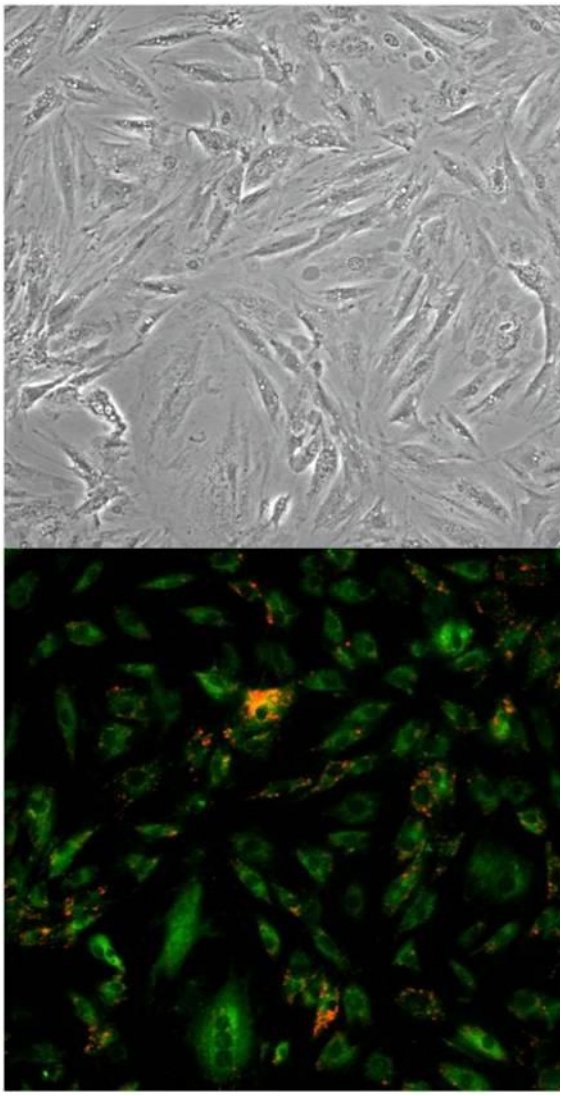
Obr. 4.2.ch: t-BHP – 210 min



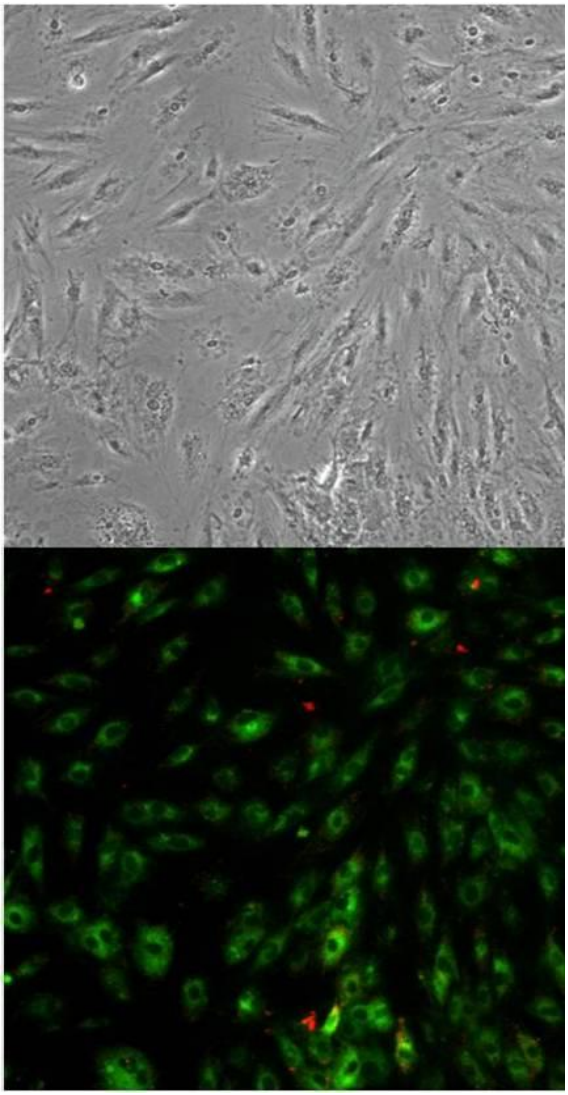
Obr. 4.1.i: H_2O_2 – 240 min



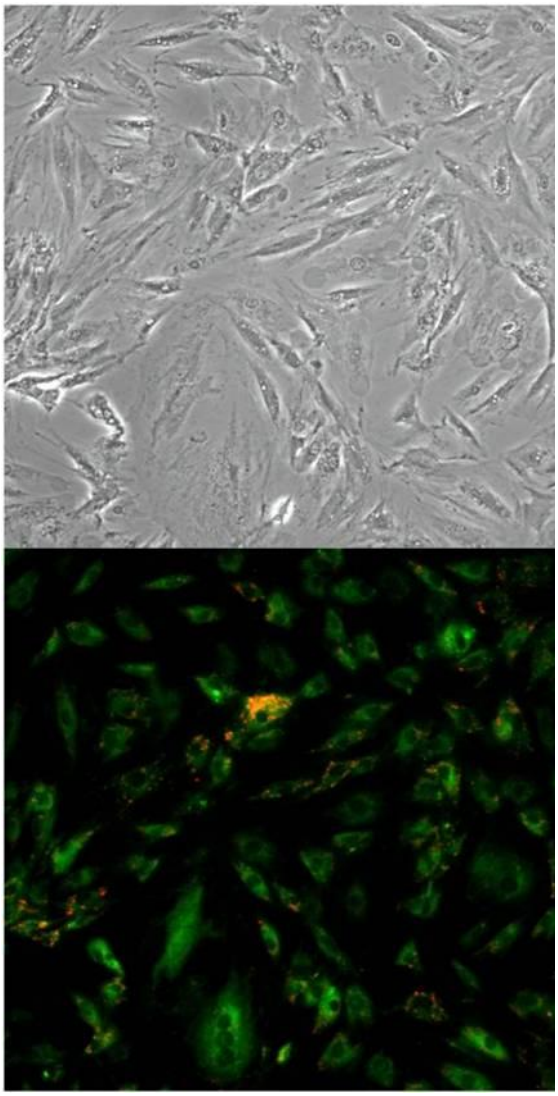
Obr. 4.2.i: t-BHP – 240 min



Obr. 4.1.j: H_2O_2 – 270 min

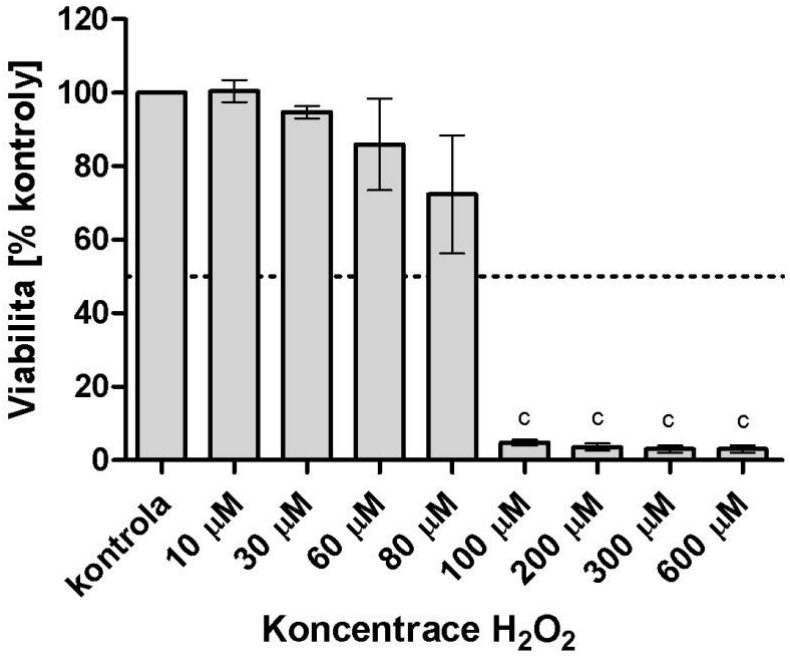


Obr. 4.2.j: t-BHP – 270 min



4.1.2. Stanovení toxicity H_2O_2

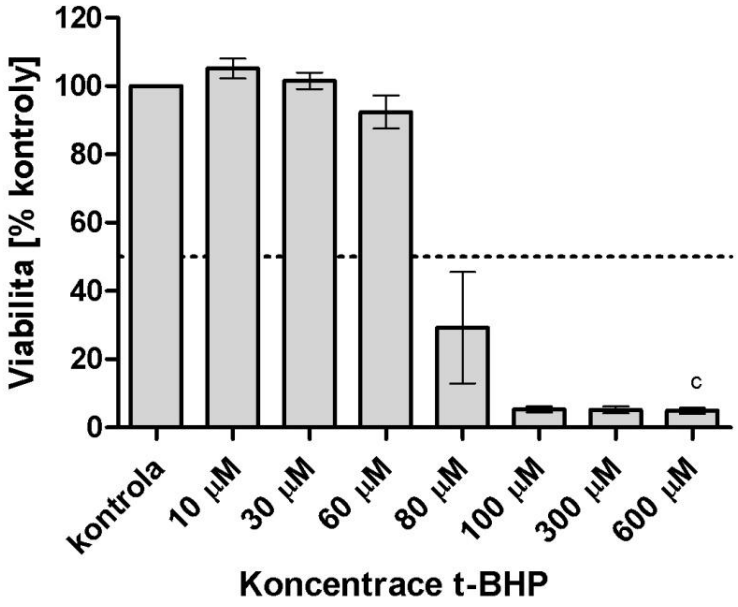
Po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací H_2O_2 bylo nejprve pozorováno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability od koncentrace 30 μM, což bylo následováno prudkým nárůstem toxicity při dosažení koncentrací 100 μM a vyšších. Hodnota IC_{50} (koncentrace H_2O_2, která způsobila snížení viability na 50% kontrolních hodnot) byla stanovena 81,5 μM. (obr. 4.3).



Obr.4.3: Viabilita H9c2 buněk 24 hodin po expozici H_2O_2. N= 5 experimentů. Statisticky významně odlišné výsledky oproti kontrole (ANOVA; $P<0,05$) jsou označeny písmenem *c*. Data uváděna jako výsledná hodnota se standardní chybou.

4.1.3. Stanovení toxicity t-BHP

Po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací t-BHP bylo nejprve pozorováno mírné a statisticky nevýznamné zvýšení buněčné viability při koncentracích 10 a 30 μM, což bylo následováno malým statisticky nevýznamným snížením buněčné viability při koncentraci 60 μM a následným prudkým nárůstem toxicity při dosažení koncentrací 80 μM a vyšších. Hodnota IC_{50} (koncentrace t-BHP, která způsobila snížení viability na 50% kontrolních hodnot) byla stanovena 66,4 μM. (obr. 4.4)



Obr. 4.4: Viabilita H9c2 buněk 24 hodin po expozici t-BHP. N= 5 experimentů. Statisticky významně odlišné výsledky oproti kontrole (ANOVA; P<0,05) jsou označeny písmenem *c*. Data uváděna jako výsledná hodnota se standardní chybou.

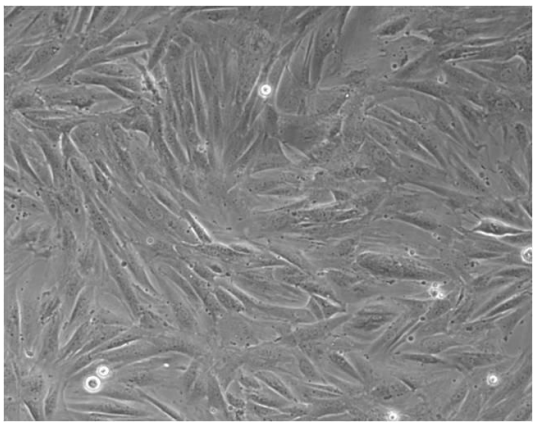
4.1.4. Porovnání toxicity H_2O_2 a t-BHP

H_2O_2 vykazoval určité odlišnosti v působení od t-BHP na H9c2 buňky. Chemicky je t-BHP jako terminální hydroperoxylový radikál stabilnější než H_2O_2, který se snadno rozkládá. U H_2O_2 byla oproti t-BHP pozorována nižší, statisticky nevýznamná toxicita (toxicita 80 μM t-BHP dosáhla 29,2% viability kontroly oproti stejné koncentrace H_2O_2, která dosáhla 72,3% viability kontroly) a během experimentů vykazoval H_2O_2 mnohem větší variabilitu výsledků (obr. 4.3 a 4.4). Dále byl patrný značný rozdíl v morfologii mrtvých buněk po 24-hodinové expozici H9c2 buněk H_2O_2 a t-BHP svědčící o odlišném mechanismu buněčné smrti (obr. 4.6.a, 4.7.a, 4.8.a, 4.9.a). Buňky vystavené 100 a 200 μM t-BHP vytváří po 24-hodinové inkubaci kompaktní oválné mrtvé buňky, kdežto po 24-hodinové inkubaci s H_2O_2 vytváří nekompaktní "roztrhané" útvary. K tomuto závěru přispívá i poznatek z pozorování se sondou JC-1, kdy si buňky inkubované se 100 μM t-BHP zachovávají po delší dobu neporušený mitochondriální potenciál oproti H_2O_2 (obr. 4.1.a-j, 4.2.a-j). Z těchto pozorování lze předpokládat, že v mechanismu buněčné smrti se u t-BHP objevuje spíše apoptóza, zatímco u H_2O_2 nekróza.

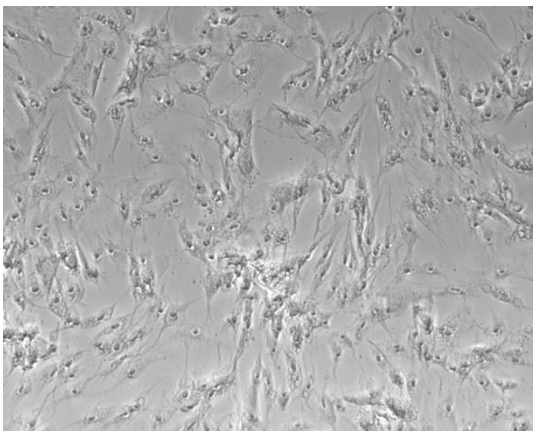
4.2.Studium protekce H9c2 buněk pomocí chelátoru železa SIH

4.2.1. Morfologické hodnocení protekce H9c2 buněk SIH před oxidačním poškozením H_2O_2 a t-BHP

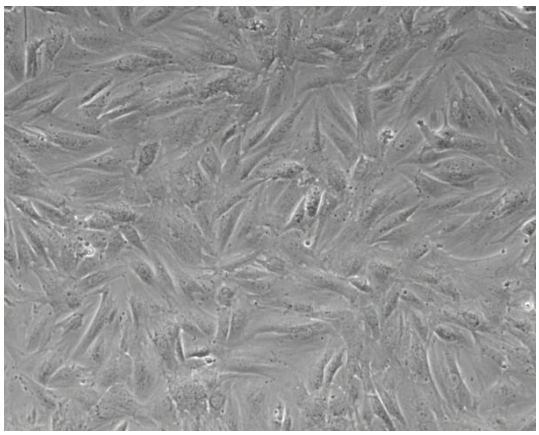
Na fotografiích pořízených po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk za kontrolních podmínek, s oxidačně působícími látkami (100 a 200 μM H_2O_2 a 100 a 200 μM t-BHP) samotnými nebo s chelátorem železa SIH byla zaznamenána, výrazná dávkově závislá ochrana buněk, která byla od koncentrace 10 μM SIH (obr. 4.6.b, 4.7.b, 4.8.b, 4.9.b) schopná zcela ochránit buňky a předejít tak buněčné smrti vyvolané oxidačním stresem (obr. 4.6.a, 4.7.a, 4.8.a, 4.9.a). Buněčná morfologie ochráněných buněk byla srovnatelná s morfologií buněk kontrolních (obr. 4.5).



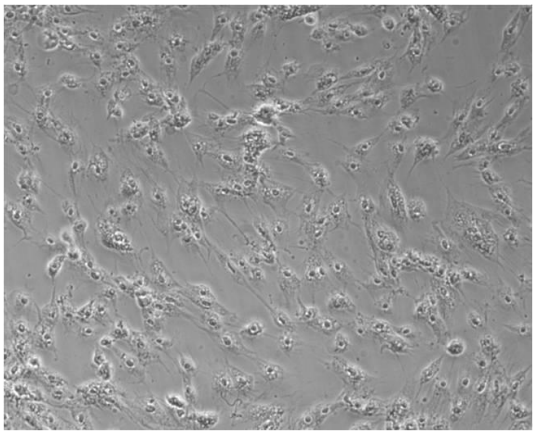
Obr. 4.5: Kontrolní H9c2 buňky po 24-hodinách.



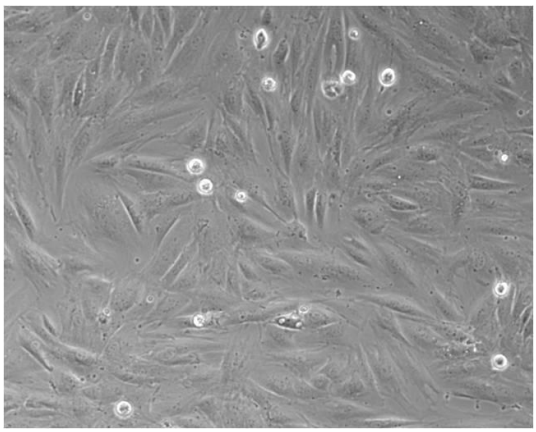
Obr. 4.6.a: H9c2 buňky inkubované 24 hodin se 100 μM H_2O_2



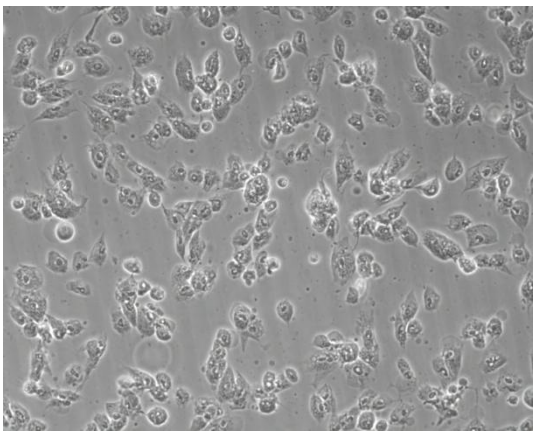
Obr. 4.6.b: H9c2 buňky koinkubované 24 hodin se 100 μM H_2O_2 a 10 μM SIH



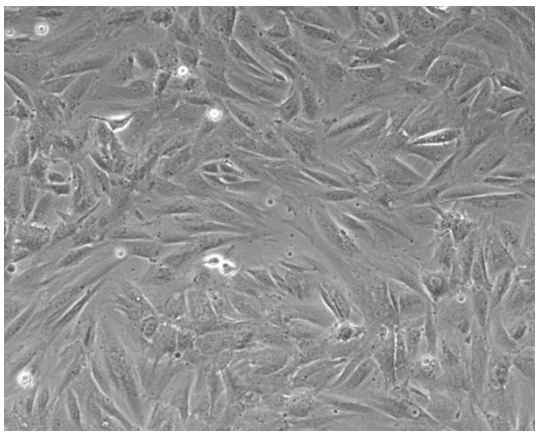
Obr. 4.7.a: H9c2 buňky inkubované 24 hodin s 200 μM H_2O_2



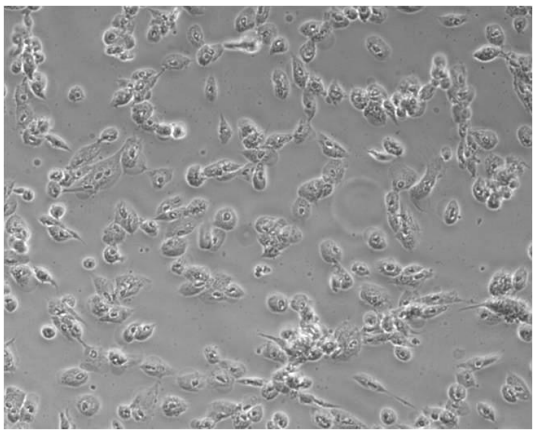
Obr. 4.7.b: H9c2 buňky koinkubované 24 hodin s 200 μM H_2O_2 a 10 μM SIH.



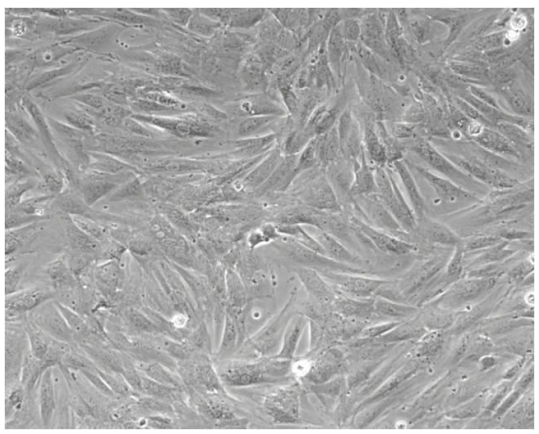
Obr. 4.8.a: H9c2 buňky inkubované 24 hodin s 100 μM t-BHP



Obr. 4.8.b: H9c2 buňky koinkubované 24 hod. s 100 μM t-BHP a 10 μM SIH.



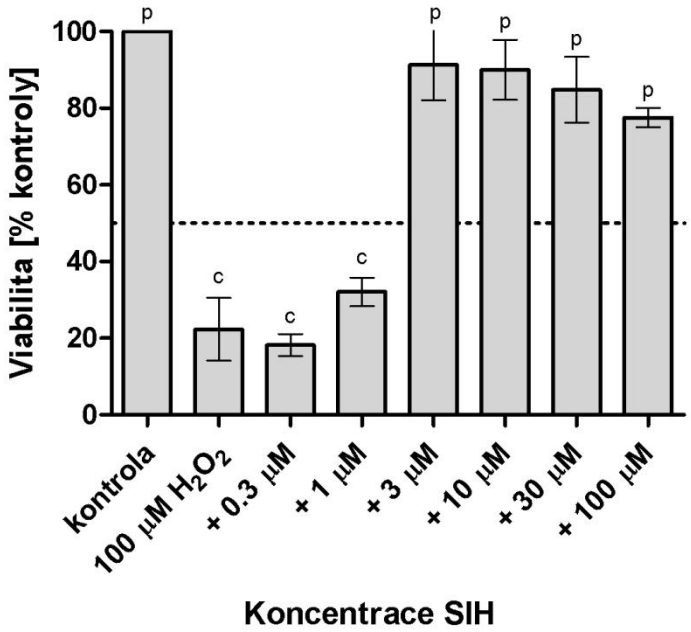
Obr. 4.9.a: H9c2 buňky inkubované 24 hodin s 200 μM t-BHP.



Obr. 4.9.b: H9c2 buňky koinkubované 24 hod. s 200 μM t-BHP a 10 μM SIH.

4.2.2. Studium protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením H_2O_2 v závislosti na koncentraci SIH

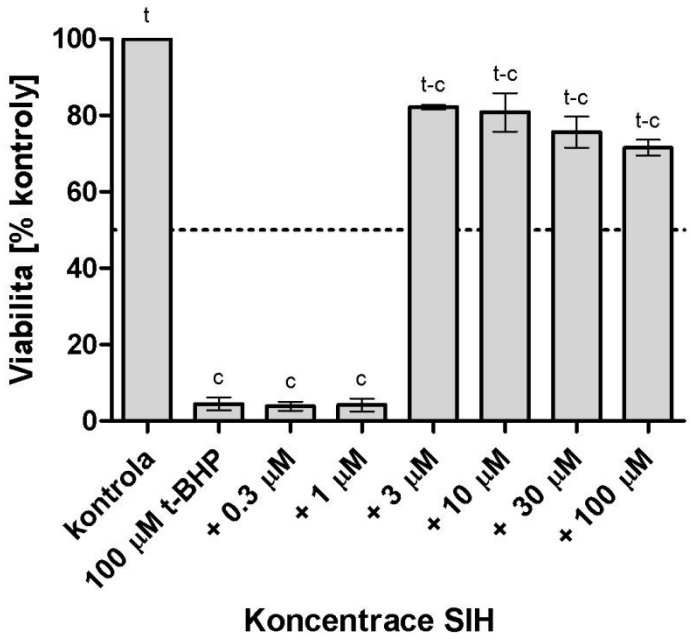
Po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk s dvěma koncentracemi H_2O_2 (100 a 200 μM) a vzrůstající koncentrací chelátoru železa SIH byla zjištěna statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením a následné buněčné smrti. 3μM koncentrace SIH byla schopná statisticky významně zvýšit buněčnou viabilitu pouze u buněk inkubovaných se 100 μM H_2O_2. Od 10μM koncentrace SIH bylo statisticky významné zvýšení buněčné viability pozorováno pro obě koncentrace H_2O_2. Pro 100 μM H_2O_2 byla hodnota EC_{50} (koncentrace SIH, která byla schopna snížit toxicitu H_2O_2 na 50%) stanovena 1,2 μM SIH (obr. 4.10.a) a pro 200 μM H_2O_2 byla EC_{50}= 5,7 μM SIH (obr. 4.10.b). Maximální protekce při vystavení buněk 100 μM H_2O_2 byla dosažena při použití koncentrace SIH 3 μM, kdy bylo dosaženo 91,3% viability kontrolních buněk (100%). Při vystavení buněk 200 μM H_2O_2 byla maximální protekce dosažena při použití koncentrace SIH 10 μM, kdy byla viabilita buněk stanovena na 77,2%.



Obr. 4.10.a: Viabilita H9c2 po 24-hodinové inkubaci 100 μM H_2O_2 se vzrůstající koncentrací SIH. N= 3 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; P<0,05) oproti kontrolní skupině jsou označeny písmenem *c* , oproti 100 μM H_2O_2 pak písmenem *p*. Data uváděna jako výsledná hodnota se standardní chybou.

4.2.3. Studium protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením t-BHP v závislosti na koncentraci SIH

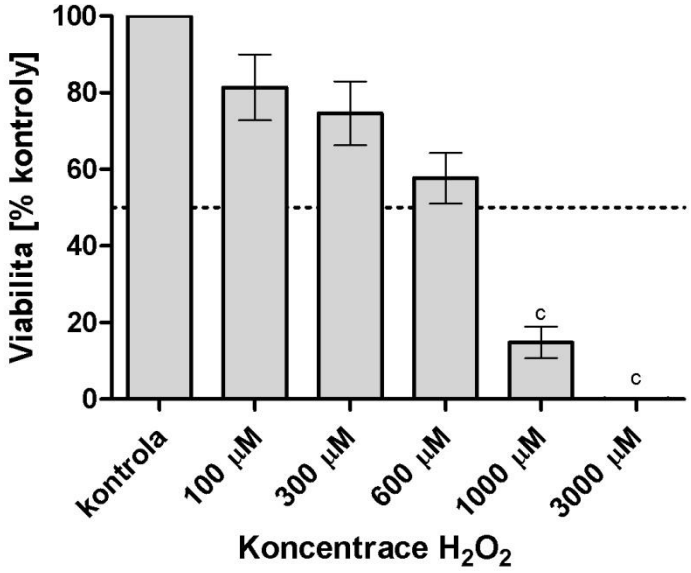
Po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk s dvěma koncentracemi t-BHP (100 a 200 μM) a vzrůstající koncentrací chelátoru železa SIH byla zjištěna statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením a následné buněčné smrti. 3μM koncentrace SIH byla schopná staticky významně zvýšit buněčnou viabilitu pouze u buněk inkubovaných se 100 μM t-BHP. Od 10μM koncentrace SIH bylo statisticky významné zvýšení buněčné viability pozorováno pro obě koncentrace t-BHP. Pro 100 μM t-BHP byla hodnota EC_{50} (koncentrace SIH, která byla schopna snížit toxicitu H_2O_2 na 50%) stanovena 2,9 μM SIH (obr. 4.11.a) a pro 200 μM H_2O_2 byla EC_{50}= 8,9 μM SIH (obr. 4.11.b). Maximální protekce při vystavení buněk 100 μM t-BHP byla dosažena při použití koncentrace SIH 3 μM, kdy bylo dosaženo 82,2% viability kontrolních buněk (100%). Při vystavení buněk 200 μM t-BHP byla maximální protekce dosažena při použití koncentrace SIH 10 μM, kdy byla viabilita buněk stanovena na 79,5%.



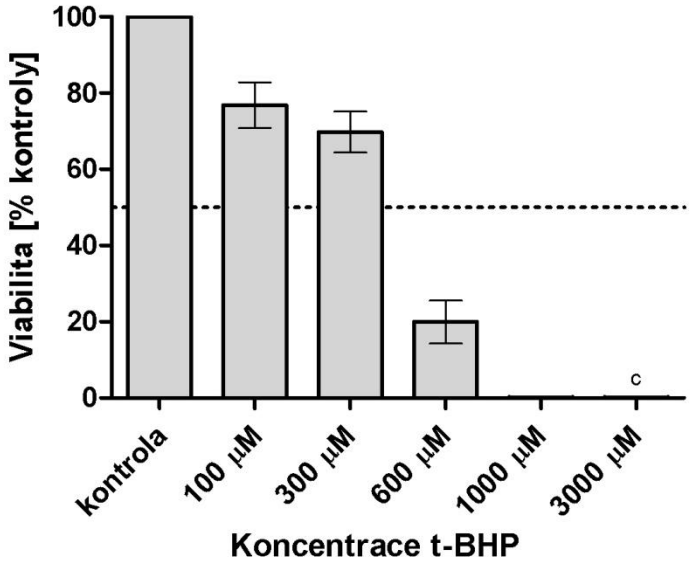
Obr. 4.11.a: Viabilita H9c2 po 24-hodinové inkubaci 100 μM t-BHP se vzrůstající koncentrací SIH. N=3 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; P<0,05) oproti kontrole jsou označeny písmenem *c*, 100 μM t-BHP jsou označeny písmenem *t*. Data uváděna jako výsledná hodnota se standardní chybou.

4.2.4. Studium protekce H9c2 buněk pomocí SIH v závislosti na zvyšující se koncentraci H_2O_2 a t-BHP

Po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk se 100 μM chelátoru železa SIH a vzrůstající koncentrací (100 - 3000 μM) oxidačně působících látek H_2O_2 a t-BHP byla zjištěna výrazná schopnost chelátoru železa SIH poskytnout částečnou ochranu i 1000 μM H_2O_2 (obr. 4.12) a 600 μM t-BHP, zatímco téměř kompletní ochranu 300μM koncentraci H_2O_2 a t-BHP (4.13).



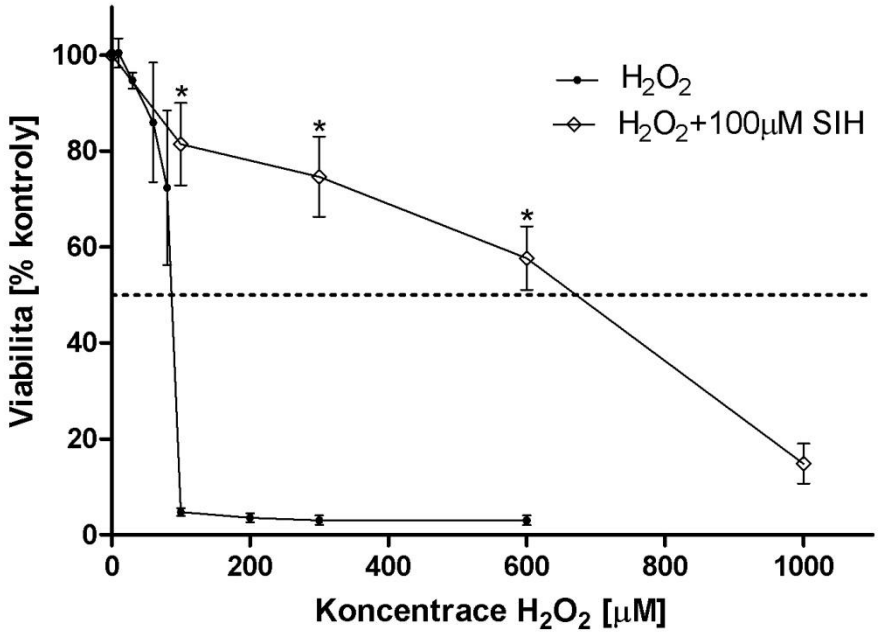
Obr. 4.12.: Viabilita H9c2 po 24-hodinové inkubaci 100 μM SIH se vzrůstající koncentrací H_2O_2. N=4 experimenty. Statisticky významné výsledky ($P<0,05$) oproti kontrole označeny písmenem *c*. Data uváděna jako výsledná hodnota se standardní chybou.



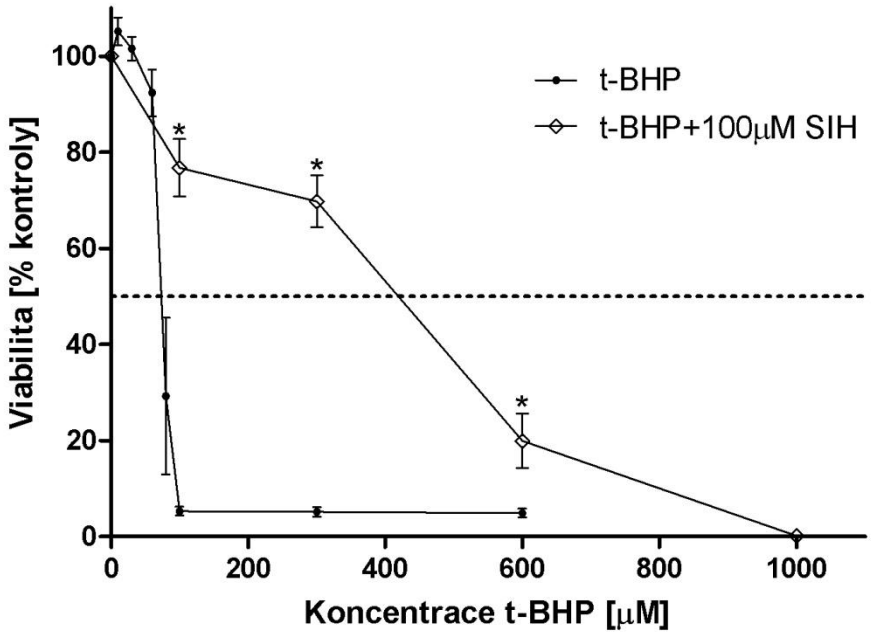
Obr. 4.13: Viabilita H9c2 po 24-hodinové inkubaci 100 μM SIH se vzrůstající koncentrací t-BHP. N= 4 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; $P<0,05$) oproti kontrole jsou označeny písmenem *c*. Data uváděna jako výsledná hodnota se standardní chybou.

4.2.5. Porovnání koncentrační závislosti toxicity H_2O_2 a t-BHP v závislosti na přítomnosti/absenci SIH

Porovnání výsledků cytotoxicitních studií oxidačně působících látek H_2O_2 a t-BHP s protekčními schopnostmi 100 μM chelátoru železa SIH, bylo provedeno statistickou analýzou dat a grafickým zpracováním. Porovnáním výsledků získaných z koncentrací 100 – 600 μM H_2O_2 (obr. 4.14) nebo t-BHP (obr. 4.15) ukazuje statisticky významnou, dávkově závislou protekci SIH proti toxicitě oxidačně působících látek v jinak letálních koncentracích. Pro zjištění statistické významnosti byly porovnávány data stejných koncentrací mezi jednotlivými skupinami (H_2O_2 s a bez 100 μM SIH).



Obr. 4.14: Porovnání viability H9c2 buněk po inkubaci pouze se vzrůstající koncentrací H_2O_2 a po obdobné inkubaci se 100 μM SIH. Statisticky významně odlišné výsledky (t-test, $P<0,05$) pro stejné koncentrace mezi skupinami jsou zvýrazněny *. Data uváděna jako výsledné hodnoty se standardní chybou.

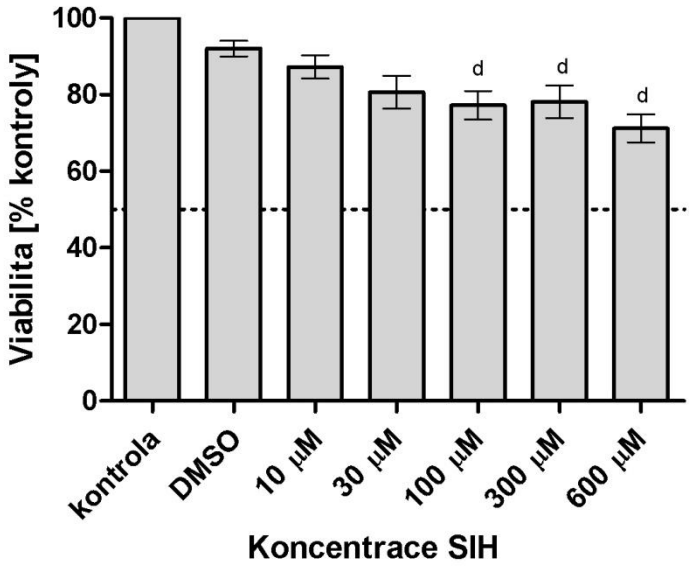


Obr. 4.15: Porovnání viability H9c2 buněk po inkubaci pouze se vzrůstající koncentrací t-BHP a po obdobné inkubaci se 100 μM SIH. Statisticky významně odlišné výsledky (t-test, $P<0,05$) pro stejné koncentrace mezi skupinami jsou zvýrazněny *. Data uváděna jako výsledné hodnoty se standardní chybou.

4.3.Stanovení akutní i dlouhodobé toxicity chelátoru železa SIH

4.3.1. Stanovení akutní toxicity chelátoru železa SIH

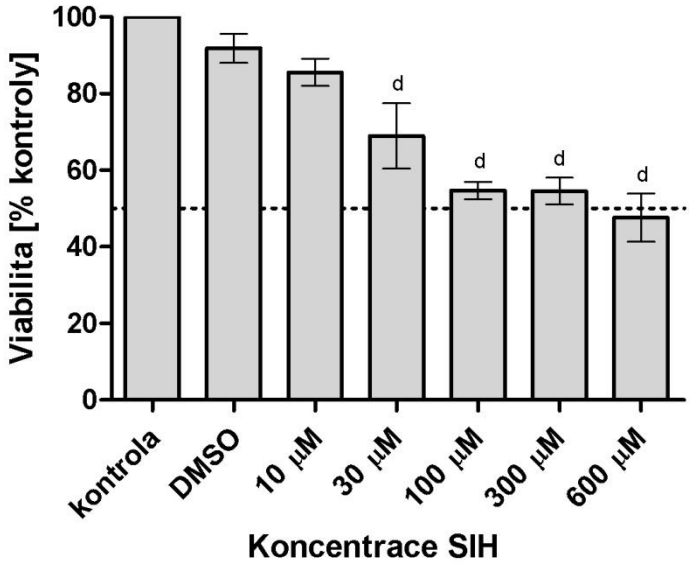
Po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací SIH bylo pozorováno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability při 10μM koncentraci SIH, následováno mírným, ale statisticky významným snížením viability při dosažení koncentrace SIH 30 μM a vyšších. Hodnota IC_{50} (koncentrace SIH, která by způsobila snížení viability na 50% kontrolních hodnot) nebyla vůbec dosažena. (obr. 4.16). Použité kosolvens, 0,6% roztok DMSO po 24-hodinové inkubaci vykázal nepatrné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability.



Obr. 4.16: Viabilita H9c2 buněk 24 hodin po expozici SIH. N= 4 experimentů. Statisticky významně odlišné výsledky oproti DMSO (ANOVA; P<0,05) jsou označeny písmenem *d*. Data uváděna jako výsledná hodnota se standardní chybou.

4.3.2. Stanovení dlouhodobé toxicity chelátoru železa SIH

Po 72-hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací SIH bylo pozorováno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability při 10μM koncentraci SIH a následně výrazné a statisticky významné snížení buněčné viability při dosažení koncentrace 30 μM a vyšších. Hodnota IC_{50} (koncentrace SIH, která způsobila snížení viability na 50% kontrolních hodnot) byla po 72-hodinách stanovena 447,1 μM. (obr. 4.17). Použité kosolvens, 0,6% roztok DMSO po 72-hodinové inkubaci vykázal pouze nepatrné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability.



Obr. 4.17: Viabilita H9c2 buněk 72 hodin po expozici vzrůstající koncentraci SIH. N=3 experimentů. Statisticky významně odlišné výsledky oproti DMSO (ANOVA; P<0,05) jsou označeny písmenem *d*. Data uváděna jako hodnota se standardní chybou.

5. Diskuze

Oxidační stres má velký význam v etiopatogenezi mnoha závažných onemocnění a představuje tak významný patologický fenomén. Oxidační stres způsobují reaktivní formy kyslíku (ROS), dusíku (RNS) a chlóru nebo síry. ROS se běžně vyskytují v buňkách jako produkt aerobního metabolismu a zastávají různé buněčné funkce Jejich hladina v organismu je pečlivě sledována a udržována antioxidačními buněčnými mechanismy. Pokud tyto mechanismy selhají nebo dojde k nadprodukci ROS, dochází k oxidačnímu stresu a buněčnému poškození. Nejtoxičtějším a nejreaktivnějším zástupcem ROS je hydroxylový radikál $OH^{\bullet}$, který reaguje okamžitě po vzniku s okolními molekulami proteinů, lipidů, cukrů a také DNA *(Halliwell et Gutteridge, 1999).*

Onemocnění způsobená oxidačním stresem je možné rozdělit do několika skupin. První skupina zahrnuje ve své patogenezi zvýšenou hladinu pro-oxidantů v buňce způsobenou disbalancí v redoxním stavu antioxidačních mechanismů (GSH, TRX) a zvýšenou glukózovou tolerancí, souhrnně nazývané jako „mitochondriální oxidační stres“, které mají význam při vzniku diabetu melitus a rakoviny. Druhá skupina zahrnuje ve své patogenezi zvýšené „zánětlivé oxidační podmínky“ se zvýšenou produkcí ROS způsobenou zvýšenou aktivitou buď některých NAD(P)H oxidáz, které vedou k chronickým zánětlivým stavům (také Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba) nebo k rozvoji aterosklerotických komplikací nebo prostřednictvím xanthin oxidázy, která se významně podílí na rozvoji ischemicko/reperfuzního poškození *(Dhalla et al., 2000; Jenner, 2003; Sayre et al., 2001).* Srdeční tkáň je obecně málo vybavená antioxidačními enzymy a antioxidanty (kataláza, SOD, GPx a GSH), takže je velmi náchylná k oxidačnímu poškození. Podle množství a reaktivity mohou ROS způsobit mnohočetné změny v buněčné struktuře a funkcích vedoucí k srdečnímu selhání *(Sawyer et al., 2002).*

V této práci jsme používali buněčnou linii H9c2, jenž je vhodným modelem srdeční tkáně *in vitro*, ačkoli nejde o "pravé" kardiomyocyty. H9c2 buněčná linie byla původně izolována z embryonálních potkaních kardiomyocytů levé komory a zachovává si většinu elektrofyziologických a biochemických znaků srdeční a z části i kosterní svalové tkáně *(Hescheler et al., 1991)*, jako je depolarizace plasmatické membrány vyvolaná acetylcholinem *(Kimes et Brandt, 1976)*, vstup iontů Ca^{2+} prostřednictvím pomalých L-typů Ca^{2+} kanálů *(Hescheler et al., 1991)* a dokonce i

expresi vysoce specifických srdečního troponinu T *(dr. Šimůnek, nepublikovaná data).*

Naše práce sledovala poškození srdečních buněk oxidačním stresem vyvolaným H_2O_2 a t-BHP, přičemž jsme prokázali významnou závislost zvyšující se dávky na snížení buněčné viability oproti kontrole. Během našich experimentů byl také patrný stimulující vliv velmi nízkých koncentrací H_2O_2 (10 μM) a t-BHP (10 – 30 μM) na buněčnou proliferaci, zatímco při vyšších koncentracích byl pozorován cytotoxický účinek. V literatuře publikované výsledky shodně ukazují, že vystavení kardiomyocytů izolovaných z dospělých potkanů (AVRM) nízkým a subtoxickým koncentracím ROS (10-30 μM H_2O_2) vede k zvýšení produkce proteinů v srdeční buňce a následně k hypertrofii bez vlivu na incidenci apoptózy, zatímco vystavení vyšším koncentracím H_2O_2 (100 – 300 μM) vede k výraznému zvýšení četnosti apoptózy a buněčné smrti *(Kwon et al., 2003).* Toto rozdílné působení je dáno aktivací specifických kinázových cest v závislosti na dávce ROS, jde hlavně o aktivaci ERK1/2, p38, AKT a JNK kinázových systémů (*Sugden et Clerk, 1998).* Nízké koncentrace H_2O_2 aktivují zejména ERK1/2 kinázu stimulující přes α-adrenergní receptory hypertrofii srdeční tkáně. Naopak za apoptózu zodpovídá aktivace JNK kinázy *(Kwon et al., 2003)*. Tyto poznatky potvrzuje i rozpoznaná stimulace tyrosin kinázy a následně ERK kinázy vedoucí k srdečnímu poškození během I/R poškození *(Bogoyevitch et al., 2000).*

Na charakteru toxicity ROS mají velký vliv jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a použitá koncentrace. V naší práci jsme používali osvědčené a dlouhodobě používané látky (H_2O_2 a t-BHP) způsobující oxidační poškození různých buněk *(Akao et al., 2003; Rush et al., 1985; Sardão et al., 2007)*. Zatímco je H_2O_2 ve vodném prostředí minimálně reaktivní a rychle se rozkládá, tak organické hydroperoxidy jsou díky chemické struktuře stabilnější a působí proto jako oxidační činidla. t-BHP se pozvolna rozkládá na alkoxylové radikály $RO^{\bullet}$, které významně akcelerují peroxidaci lipidů v buňce. Obě tyto reakce jsou usnadněny a probíhají ve větší míře v přítomnosti iontů železa *(Halliwell et Gutteridge, 1999).* V souladu s výše uvedeným jsme pozorovali výrazný, ale statisticky nevýznamný rozdíl v toxicitě 80 μM H_2O_2 oproti stejné koncentraci t-BHP. Také morfologické změny jsme pozorovali odlišné, svědčící o rozdílném mechanismu buněčné smrti po vystavení 100 nebo 200μM koncentraci těchto látek. Mnozí autoři popisovali nejen u H9c2, ale i ostatních buněk vystavených nízkým koncentracím H_2O_2 a t-BHP

(do 100 μM koncentrace) zvýšený výskyt apoptózy oproti nekróze, zatímco u vyšších koncentrací (300 μM a vyšší) spíše výskyt nekrózy než apoptózy *(Akao et al., 2003; Šimůnek et al., 2005; Sardão et al., 2007)*. Ačkoli naše experimenty nebyly prováděny se sofistikovanými metodami detekce apoptózy a nekrózy, usuzujeme podle pozorování změn v morfologických znacích a mitochondriálních funkcí (značení JC-1 sondou) na skutečnost, že se v toxicitě t-BHP se objevuje apoptóza ve větší míře než u H_2O_2; pro potvrzení těchto našich předpokladů bude ale potřeba provést další experimenty.

Během našich studií jsme také v několika pilotních experimentech potvrdili význam přesycení Ca^{2+} ionty na toxicitu oxidačně působících látek a buněčné smrti vůbec. Buňky inkubované po dobu 6 hodin s 200 μM H_2O_2 nebo t-BHP, kterým byla snížena hladina Ca^{2+} iontů v inkubačním roztoku, nevykazovaly do páté hodiny žádné známky buněčného poškození, ani poškození mitochondriálních funkcí (inkubace se sondou JC-1) *(nepublikovaná data)*. Tento pozorovaný význam Ca^{2+} iontů pro mediaci buněčného poškození souvisí s publikovanými poznatky, že zvýšená peroxidace lipidů buněčné membrány má mimo jiné za následek zvýšený influx Ca^{2+} iontů do buňky a aktivaci např. specifických proteinových kináz *(Halliwell et Gutteridge, 1999)*.

Na vzniku $OH^{\bullet}$ a $RO^{\bullet}$ radikálu, a tím na vzniku a propagaci oxidačního stresu, mají velký význam ionty přechodných kovů, zejména ionty železa (Fe^{2+}/Fe^{3+}). Pokud se tyto ionty vyskytnou ve volné nebo labilně vázané formě v buňce působící jako katalyzátory Fentonovy, resp. Haber-Weissovy reakce. Při těchto reakcí dochází vlivem velmi snadného přechodu Fe^{2+} na Fe^{3+} k redukci H_2O_2 a oxidaci $O_2^{\bullet}$ za vzniku vysoce reaktivního $OH^{\bullet}$ radikálu *(Halliwell et Gutteridge, 1992)*. Ačkoli je železo nepostradatelným prvkem v lidském organismu, představuje železem katalyzovaná produkce ROS prostřednictvím Haber-Weissovy reakce pomyslný velmi nebezpečný dvousečný meč. Železo je na jedné straně schopné např. účinně přenášet elektrony v dýchacím řetězci a tvořit tak energii, ale na druhé i způsobit závažné buněčné poškození tím, že umožní vzniknout tak nebezpečným a nežádoucím látkám, jakými je beze sporu hydroxylový radikál.

Proti oxidačnímu stresu můžeme obecně bojovat buď použitím antioxidantů odstraňujících již vzniklé ROS, nebo přímo zamezením jejich vzniku, což je obecně mnohem výhodnější a efektivnější přístup k dané problematice.

Jak již bylo zmíněno, nežádoucí redoxní vlastnosti iontů železa souvisí pouze s jejich nevázanou formou. Volné železo se dá efektivně odstranit za použití vhodného specifického chelátoru *(Chaston et Richardson, 2003)*, který v závislosti na své chemické struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech různou silou prokazatelně chelatují železo *(Glickstein et al., 2005)*.

V klinické praxi jsou již řadu let používané chelátory železa v indikaci léčba hemosiderózy (přesycení organismu železem) související zejména s β-thalassemii, s opakovanými krevními transfůzemi nebo při rhambdomyolýze *(Reeder et al., 2002)*, které způsobují nadměrné ukládání železa v různých tkáních a představují riziko rozvoje oxidačního poškození. Vzhledem k tomu, že tělo nemá mechanismus, jakým by se zbavilo nadměrného železa (kromě fyziologického krvácení u žen formou menstruace), představují chelátory železa u anemických pacientů jediný terapeuticky možný zásah.

Nejznámějšími chelátory železa jsou DFO, deferipron a některá novější analoga. Jejich klinické použití je bohužel spojeno s množstvím problémů jakými je např. u DFO nutnost podání dlouhotrvající a velmi často bolestivou infůzí (u novějších látek již p.o. apklikace), ale hlavně omezená prostupnost do buňky vzhledem k jejich hydrofilnímu charakteru molekuly *(Tim et al., 2003)*.

Antioxidační působení chelátorů železa však rozhodně nemusí souviset pouze se stavy s primárním přetížením železem. Je známou skutečností, že zánětlivá reakce vytvářející kyselé prostředí a ROS jako H_2O_2 mohou uvolnit železo z jeho vázané formy a to se pak může podílet na vzniku dalších ROS *(Halliwell et Gutteridge, 1999)*. Někteří autoři popisují i antioxidační účinky nezávislé na chelataci železa, vlastním oxidoredukčním působením DFO nebo deferipronu zabraňující oxidaci Fe2+ v hemoglobinu nebo myoglobinu a vzniku proteinového přemostění molekuly hemu („heme-to-protein cross linked“) *(Reeder et al., 2008)*.

Bohužel širokému uplatnění chelátorů železa typu DFO a dalších jako účinných antioxidačně působících látek brání jejich omezená prostupnost přes plasmatickou membránu a tudíž minimální schopnost zasáhnout do vnitrobuněčné produkce ROS. Zbytečně by tak chelatovaly železo z ostatních částí organismu a způsobovaly by tam nežádoucí nedostatek železa, zatímco by buňky umíraly důsledkem oxidačního poškození. Naopak v jiné velmi významné skupině chelátorů železa, derivátů aroylhydrazonů, se tento problém prakticky

nevyskytuje, a proto je pokládáme za velice slibnou skupinu železo chelatujících látek.

Prvním zástupcem ze skupiny aroylhydrazonů, je pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH), který byl objeven náhodou v 70. letech minulého století v pražské laboratoři dr. Ponky při studiu mobilizace železa z retikulocytů *(Ponka et al., 1979).* Vykazuje výrazné chelatační schopnosti srovnatelné s DFO *(Ponka et al., 1979)* a vykazují výborné antioxidační vlastnosti na různém stupni poškození, nezávislé na použitých buňkách *(Hermes-Lima et al., 1994; 1998; 2000).*

Z celé skupiny analogů PIH jsme se soustředili na salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH). Tato látka velmi snadno a rychle prostupuje do buňky a chelatuje tam cytoplazmatické železo *(Šimůnek et al., 2007)*. Byly u ní prokázané mohutné antioxidační schopnosti dané chelatací volného železa jak v *in vitro* podmínkách na buněčných liniích, včetně neonatálních spontánně bijících kardiomyocytů, tak i v *in vivo* na králících *(Šimůnek et al., 2005; Štěrba et al., 2007).* V souladu s těmito publikovanými daty je i tato naše práce, kde SIH v závislosti na dávce byl schopen zabránit oxidačnímu poškození nebo ho úplně zastavit. Jako nejvýhodnější koncentrace SIH proti různým koncentracím H_2O_2 nebo t-BHP byla pozorována 10 μM koncentrace při minimální toxicitě. Mohutnost antioxidačního působení demonstruje i pozorovaná částečná, ale statisticky významná ochrana 100 μM SIH proti 1000 μM H_2O_2 a 600 μM t-BHP (statisticky nevýznamná). V předchozí práci naší skupiny byla pro DFO stanovena hodnota EC_{5O}, poskytující stejnou protekci jako 0,8 μM SIH, při terapeuticky nedosažitelné hladině 1300 μM DFO *(Šimůnek et al., 2005)*.

Další nespornou výhodou SIH je jeho minimální toxicita, která je závislá na dávce a zřejmě vyplývá z chelatace nitrobuněčného železa potřebného pro fyziologické funkce. Během naší práce byla sledována jak akutní (po 24-hodinové inkubaci), která byla minimální a v daném limitu rozpustnosti nedosahovala hodnot IC_{50}, tak i dlouhodobá toxicita (po 72-hodinové inkubaci), která již hodnot IC_{50} dosáhla, ale při 447,1 μM SIH, která nemá v protekci před oxidačním stresem smysl.

Zajímavým trendem v toxicitě derivátů aroylhydrazonů je vliv způsobu podání při *in vivo* testech na dosažené cytotoxicitní výsledky. Zatímco při perorálním podávání byla hodnota IC_{50} v rozmezí 4,5 – 5,3 g /kg, tak po intraperitoneální podání byla IC_{50} rovna 1,0 – 1,2 g/kg. *(Sookanichsilp et al. 1991).* V pokusech *in vivo* na králících nebyly během 10-týdenního podávání SIH (dávka 50 mg/kg)

pozorovány žádné závažnější toxické účinky (úhyn zvířat, anemické a sideropénické stavy, poškození jater, ledvin, plic, svalu a tenkého střeva). Byl pozorován pouze pomalejší nárůst tělesné hmotnosti a ojedinělé a nekonzistentní změny v biochemických a hematologických parametrech bez zjevného vlivu na toxicitu *(Klimtová et al., 2003)*.

Mezi hlavní mechanismy toxicity chelátorů železa patří inhibice ribonukleotid reduktázy (železo dependentní enzym katalytující syntézu DNA), čehož se dá ovšem elegantně využít v protinádorové terapii, kde chelátory železa NIH a triapin vykazují výbornou antiproliferativní účinnost *(Richardson, 2002)*.

Ve snaze předejít toxicitě, byly během několika posledních let od SIH vyvinuty prochelátory, které poskytují aktivní chelátor až po kontaktu s H_2O_2 *(Franz et al., 2007)* v místě oxidačního inzultu nebo až po vystavení UVA záření v pokožce *(Yiakouki et al., 2006)*.

Výsledky naší práce tedy potvrdily a značně rozšířily již dříve publikované poznatky *(Šimůnek et al., 2005; Kurz et al., 2006)* o antioxidačních a kardioprotektivních schopnostech chelátoru železa SIH proti poškození srdečních buněk oxidačním stresem při jeho velmi nízké vlastní toxicitě. Deriváty aroylhydrazonů proto podle našeho názoru zasluhují další studium u patologických stavů se známou nebo předpokládanou účastí volných kyslíkových radikálů vznikajících za katalytické účasti železa.

V druhé polovině roku 2007 byl v naší laboratoři zahájen projekt zaměřený na možnost využití chelátorů železa pro prevenci poškození srdečních buněk katecholaminy, resp. jejich oxidačními produkty - aminochromy. Naše první výsledky naznačují zajímavý protektivní potenciál aroylhydrazonových chelátorů *(dr. Šimůnek, ústní sdělení)*.

Dalším logickou indikací pro zhodnocení potenciálu aroylhydrazonových chelátorů je ischemicko/reperfuzní poškození myokardu, kde se také předpokládá výrazná patofyziologická role oxidačního stresu. Například práce Dobšáka *et al*. (2002) prokázala protektivní účinek deferoxaminu na apoptózu buněk myokardu při ischémii/reperfuzi. Jsme přesvědčeni, že lipofilní chelátory železa s dobrou intracelulární prostupností by mohly být ještě vhodnějšími látkami.

Určitým omezením aroylhydrazonových chelátorů odvozených od aromatických aldehydů je nestabilita hydrazonové vazby. V současné době proto v rámci projektu Grantové agentury UK pracujeme na syntéze a hodnocení nových

chelátorů se zvýšenou odolností vůči hydrolýze, např. hydrazonů aromatických hydroxyketonů s isoniazidem, u kterých by se jejich farmakokinetické parametry mohly zlepšit.

6. Závěry

- Použití 96-jamkových mikrotitračních destiček pro buněčné kultivace a stanovení buněčné viability H9c2 buněk je vhodné a přináší řadu výhod jako malá spotřeba reagencií, kultivačních médií, buněk H9c2 a zejména možnost získání velkého počtu dat.
- Zjistili jsme statisticky významnou, dávkově závislou toxicitu H_2O_2 a t-BHP na H9c2 buněčné linii po 24-hodinové inkubaci a určili hodnoty IC_{50} 81,5 μM pro H_2O_2 a 66,4 μM pro t-BHP. T-BHP shledáváme vhodnějším modelem oxidačního stresu vzhledem k větší chemické stabilitě a koherentnosti získaných výsledků.
- Pozorovali jsme rozdílný sled morfologických změn vedoucí k změně buněčného tvaru, fragmentaci buněčného obsahu, kondenzaci jádra a ztrátě mitochondriálního potenciálu v průběhu 4,5-hodinové expozici H9c2 buněk s 200 μM H_2O_2 a t-BHP s předpokládanou účastí apoptózy.
- Potvrdili a rozšířili jsme nálezy předchozích studií prokazujících výrazný a statisticky významný protektivní potenciál chelátoru železa SIH pro ochranu H9c2 buněk před toxicitou H_2O_2 a t-BHP. 10 μM SIH bylo schopno poskytnout úplnou ochranu proti 200 μM H_2O_2 a t-BHP. Hodnoty EC_{50} byly zjištěny1,2 μM pro 100 μM H_2O_2, 5,7 μM pro 200 μM H_2O_2 a 2,9 μM pro 100 μM t-BHP, 8,8 μM pro 200 μM t-BHP.
- Chelátor železa SIH v koncentraci 100 μM byl schopen poskytnout statisticky významnou, dávkově závislou ochranu H9c2 buněk před oxidačním poškozením ještě 1000 μM H_2O_2 a 600 μM t-BHP.
- Zjistili jsme statisticky významnou a dávkově závislou minimální akutní toxicitu (hodnota IC_{50} nebyla vůbec dosažena) chelátoru železa SIH po 24-hodinové inkubaci, avšak již výraznější, opět statisticky významnou dlouhodobou toxicitu v závislosti na dávce po 72-hodinové inkubaci, kdy hodnota IC_{50} byla rovna 447,1 μM SIH. Koncentrace 10 μM SIH nevykazovala statisticky nevýznamnou akutní i dlouhodobou toxicitu.
- Jako optimální protekční koncentraci proti oxidačnímu poškození H_2O_2 a t-BHP považujeme vzhledem k vysoké protekční účinnosti a minimální akutní i dlouhodobé toxicitě 10 μM SIH.

7. Použitá literatura

- *Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, Seharaseyon J, Marbán E. Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes. Circ Res. 2003;92(2):186-94.*
- *Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.*
- *Becker EM, Greer JM, Ponka P, Richardson DR. Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization. Blood. 2002;99(10):3813-22.*
- *Benamira M, Johnson K, Chaudhary A, Bruner K, Tibbetts C, Marnett LJ. Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in Escherichia coli: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. Carcinogenesis. 1995;16(1):93-9.*
- *Bergeron RJ, Wiegand J, Dionis JB, Egli-Karmakka M, Frei J, Huxley-Tencer A, Peter HH. Evaluation of desferrithiocin and its synthetic analogues as orally effective iron chelators. J Med Chem. 1991;34(7):2072-8.*
- *Bogoyevitch MA, Ng DC, Court NW, Draper KA, Dhillon A, Abas L. Intact mitochondrial electron transport function is essential for signalling by hydrogen peroxide in cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2000;32(8):1469-80.*
- *Brantley RE Jr, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS. The mechanism of autooxidation of myoglobin. J Biol Chem. 1993;268(10):6995-7010.*
- *Berg JM, Shi Y,. The Galvanization of Biology: A Growing Appreciation for the Roles of Zinc ; Science 1996;271: 1081-1085.*
- *Brodie AE, Reed DJ. Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. Biochem Biophys Res Commun. 1987;148(1):120-5.*

- *Buss JL, Hermes-Lima M, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues. Adv Exp Med Biol. 2002;509:205-29.*
- *Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. Arch Biochem Biophys. 1993;300(2):535-43.*
- *Crichton RR, Charloteaux-Wauters M. Iron transport and storage. Eur J Biochem. 1987;164(3):485-506.*
- *Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. J Hypertens. 2000;18(6):655-73.*
- *Drechsel H et Winkelmann G., Iron chelation and siderophores. In Transition Metals in Microbial Metabolism, pp. 1-49. Harwood Academic, Amsterdam, 1997*
- *Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. Trends Cell Biol. 2007;17(2):93-100.*
- *Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. N Engl J Med. 2005;352(17):1741-4.*
- *Folkes LK, Candeias LP, Wardman P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. Arch Biochem Biophys. 1995;323(1):120-6.*
- *Foote CS et al.. Active Oxygen in Chemistry (Structure Energetics and Reactivity in Chemistry); vol.2. Blackie Academic & Professional; 1995; pp.342; ISBN: 0751402923.*
- *Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem. 1995;64:97-112.Gérard-Monnier D, Chaudiere J. Metabolism and antioxidant function of glutathione. Pathol Biol (Paris). 1996;44(1):77-85.*
- *Galanello R Iron chelation: new therapies. Semin Hematol. 2001;38(1 Suppl 1):73-6.*
- *Galey JB, Dumats J, Beck I, Fernandez B, Hocquaux M. N,N'-bis-dibenzyl ethylenediaminediacetic acid (DBED): a site-specific hydroxyl radical scavenger acting as an "oxidative stress activatable" iron chelator in vitro. Free Radic Res. 1995;22(1):67-86.*
- *Gilbert DL. Oxygen and Living Processes: an Inter-disciplinary Approach. Springer, New York, 1981.*

- *Glickstein H, El RB, Shvartsman M, Cabantchik ZI. Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. Blood. 2005 Nov 1;106(9):3242-50.*
- *Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. Crit Rev Toxicol. 1995;25(1):25-65.*
- *Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(10):2175-83.*
- *Gutteridge JMC. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. FEBS Lett. 1986;201(2):291-5.*
- *Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 1990;280(1):1-8.*
- *Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol. 1990;186:1-85.*
- *Halliwell B, Gutteridge JMC.; Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. ; FEBS Lett. 1992;307(1):108-12.*
- *Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York 1999; 3rd edition, ISBN 0198500459.*
- *Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Lett. 1997;414(3):552-6.*
- *Hasinoff BB. Chemistry of dexrazoxane and analogues. Semin Oncol. 1998;25(4 Suppl 10):3-9.*
- *Hedlund BE, Hallaway PE. High-dose systemic iron chelation attenuates reperfusion injury. Biochem Soc Trans. 1993;21(2):340-3.*
- *Hermes-Lima M, Wang EM, Schulman HM, Storey KB, Ponka P. Deoxyribose degradation catalyzed by Fe(III)-EDTA: kinetic aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements. Mol Cell Biochem. 1994;137(1):65-73.*
- *Hermes-Lima M, Nagy E, Ponka P, Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA*

*against *OH-mediated strand breaks. Free Radic Biol Med. 1998;25(8):875-80.*

- *Hermes-Lima M, Ponka P, Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. Biochim Biophys Acta. 2000;1523(2-3):154-60.*
- *Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. Circ Res. 1991;69(6):1476-86.*
- *Charkoudian LK, Pham DM, Kwon AM, Vangeloff AD, Franz KJ. Modifications of boronic ester pro-chelators triggered by hydrogen peroxide tune reactivity to inhibit metal-promoted oxidative stress. Dalton Trans. 2007;(43):5031-42.*
- *Chaston TB, Richardson DR. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity, and toxicity. Am J Hematol. 2003;73(3):200-10.*
- *Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. Ann Neurol. 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8.*
- *Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. Am J Physiol. 1996;271(4 Pt 2):H1626-34.*
- *Kaiserová H, den Hartog GJ, Šimůnek T, Schröterová L, Kvasničková E, Bast A.; Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin.; Br J Pharmacol. 2006;149(7):920-30.*
- *Kaiserová H, Šimůnek T, van der Vijgh WJ, Bast A, Kvasničková E. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. Biochim Biophys Acta. 2007;1772(9):1065-74.*
- *Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. Exp Cell Res. 1976 15;98(2):367-81.*
- *Klimtová I, Simůnek T, Mazurová Y, Kaplanová J, Sterba M, Hrdina R, Gersl V, Adamcová M, Ponka P. A study of potential toxic effects after repeated*

10-week administration of a new iron chelator--salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to rabbits. Acta Medica (Hradec Kralove). 2003;46(4):163-70.

- *Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin ; Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(5):1324-8.*
- *Kovaríková P, Mrkvicková Z, Klimes J. Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material. J Pharm Biomed Anal. 2008;47(2):360-70.*
- *Kramer K, Rademaker B, Rozendal WH, Timmerman H, Bast A. Influence of lipid peroxidation on beta-adrenoceptors. FEBS Lett. 1986;198(1):80-4.*
- *Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. FEBS J. 2006;273(13):3106-17.*
- *Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H(2)O(2) regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. J Mol Cell Cardiol. 2003;35(6):615-21.*
- *Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(14):6348-52.*
- *Lovejoy DB, Richardson DR. Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells. Blood. 2002;100(2):666-76.*
- *Liu ZD, Hider RC. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. Med Res Rev. 2002;22(1):26-64.*
- *Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res. 1999;424(1-2):83-95.*
- *Marquis JK, Bree M, Appelqvist T. Bioavailability and Pharmacokinetic Properties of GT56-252, A Novel Orally Available Iron Chelator. Presentation (P1) at the 12th International conference on Oral Chelation*

in the Treatment of Thalassaemia and Other Diseases, Santorini, Greece, 2002.

- *Merényi Merényi G, Lind J. Free radical formation in the peroxynitrous acid (ONOOH)/peroxynitrite (ONOO-) system. Chem Res Toxicol. 1998;11(4):243-6.*
- *Mitani H, Koshiishi I, Sumita T, Imanari T. Prevention of the photodamage in the hairless mouse dorsal skin by kojic acid as an iron chelator. Eur J Pharmacol. 2001;411(1-2):169-174.*
- *Morgan TR, Laudone VP, Heston WD, Zeitz L, Fair WR. Free radical production by high energy shock waves--comparison with ionizing irradiation. J Urol. 1988;139(1):186-9.*
- *Mustacich D, Powis G. "Thioredoxin reductase". Biochem J. 2000;346 Pt 1:1-8.*
- *Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(22):10045-8.*
- *Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization Science. 2004;306(5704):2090-3.*
- *Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Sharp JJ, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. Nat Genet. 2005;37(11):1264-9.*
- *Orrenius S, Nicotera P. The calcium ion and cell death. J Neural Transm Suppl. 1994;43:1-11.*
- *Packer MA, Murphy MP. Peroxynitrite formed by simultaneous nitric oxide and superoxide generation causes cyclosporin-A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarisation. Eur J Biochem. 1995;234(1):231-9.*
- *Pahl HL, Baeuerle PA. Oxygen and the control of gene expression. Bioessays. 1994;16(7):497-502.*

- *Pero RW, Sheng Y, Olsson A, Bryngelsson C, Lund-Pero M. Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors. Carcinogenesis. 1996;17(1):13-8.*
- *Philchenkov A, Zavelevich M, Kroczak TJ, Los M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. Exp Oncol. 2004;26(2):82-97.*
- *Ponka P, Borová J, Neuwirt J, Fuchs O, Necas E. A study of intracellular iron metabolism using pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and other synthetic chelating agents. Biochim Biophys Acta. 1979;586(2):278-97.*
- *Ponka P, Borova J, Neuwirt J, Fuchs O. Mobilization of iron from reticulocytes.Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. FEBS Lett. 1979;97;317-321*
- *Ponka P, Richardson DR, Edward JT, Chubb FL. Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class. Relationship of the lipophilicity of the apochelator to its ability to mobilise iron from reticulocytes in vitro. Can J Physiol Pharmacol. 1994;72:659–666*
- *Reeder BJ, Sharpe MA, Kay AD, Kerr M, Moore K, Wilson MT. Toxicity of myoglobin and haemoglobin: oxidative stress in patients with rhabdomyolysis and subarachnoid haemorrhage. Biochem Soc Trans. 2002;30(4):745-8.*
- *Reeder BJ, Hider RC, Wilson MT. Iron chelators can protect against oxidative stress through ferryl heme reduction. Free Radic Biol Med.2008;44(3):264-73.*
- *Richardson DR, Ponka P, Vyoral D. Distribution of iron in reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone: examination of the intermediates involved in iron metabolism. Blood. 1996;87(8):3477-88.*
- *Richardson DR. Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2002;42(3):267-81.*
- *Rush GF, Gorski JR, Ripple MG, Sowinski J, Bugelski P, Hewitt WR. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 1985;78(3):473-83.*
- *Sancar A. DNA excision repair. Annu Rev Biochem. 1996;65:43-81.*

- *Santos MA, Gama S, Gil M, Gano L. A new approach for potential combined chelation therapy using mono- and bis-hydroxypyridinones. Hemoglobin. 2008;32(1-2):147-56.*
- *Sawyer DT, Valentine JS. How Super is Superoxide? J. S. Acc. Chem. Res., 1981, 14, 393-400.*
- *Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. J Mol Cell Cardiol. 2002;34(4):379-88.*
- *Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. Curr Med Chem. 2001;8(7):721-38.*
- *Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, Gwynn B, Lambert AJ, Wingert RA, Traver D, Trede NS, Barut BA, Zhou Y, Minet E, Donovan A, Brownlie A, Balzan R, Weiss MJ, Peters LL, Kaplan J, Zon LI, Paw BH. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. Nature. 2006;440(7080):96-100.*
- *Schraufstätter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH, Quehenberger O, Cochrane CG. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. J Clin Invest. 1990;85(2):554-62.*
- *Sies H, 1991, Oxidative stress II. Oxidants and antioxidants; Introduction to 2nd ed., academic press, London*
- *Sookvanichsilp N, Nakornchai S, Weerapradist W. Toxicological study of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone: acute and subchronic toxicity. Drug Chem Toxicol. 1991;14(4):395-403.*
- *Sonntag C von. Chemical Basis of Radiation Biology. Taylor & Francis, London, 1987, ISBN 9780850663532.*
- *Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. Curr Med Chem. 2004;11(9):1105-12.*
- *Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. Circ Res. 1998;83(4):345-52.*
- *Sutton HC, Winterbourn CC. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. Free Radic Biol Med. 1989;6(1):53-60.*

- *Šimůnek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Štěrba M, Geršl V, Hrdina R, Ponka P, de Lange JJ, Paulus WJ, Musters RJ. SIH--a novel lipophilic iron chelator--protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. J Mol Cell Cardiol. 2005;39(2):345-54.*
- *Tam TF, Leung-Toung R, Li W, Wang Y, Karimian K, Spino M. Iron chelator research: past, present, and future. Curr Med Chem. 2003;10(12):983-95.*
- *Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000;279(6):L1005-28.*
- *Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosci Rep. 1997;17(1):3-8.*
- *Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals asnd antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.*
- *Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(12):5510-4.*
- *Yiakouvaki A, Savović J, Al-Qenaei A, Dowden J, Pourzand C. Caged-iron chelators a novel approach towards protecting skin cells against UVA-induced necrotic cell death. J Invest Dermatol. 2006;126(10):2287-95.*
- *Zhang AS, Sheftel AD, Ponka P. The anemia of ''haemoglobin-deficit'' (hbd/hbd) mice is caused by a defect in transferrin cycling. Exp Hematol. 2006;34(5):593-8.*

8. Přehled zkratek

AIF - apoptózu indukující faktor 1

Akt - protein kinases B

ANGII - angiopoetin II

ANOVA - analysis of variance

AP-1 - activator protein 1

Apaf-1 - apoptotic protease activating factor 1

AVRM - adult rat ventricular myocytes

BSIH - isonicotinoyl acid benzyl idene-hydrazide

CuZnSOD - měď-zinková superoxid dismutáza

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DBED - N,N'-dibenzylethylendiamin-N,N'-dioctové kyseliny

DFO - desferrioxamin

DFT - desferrithiocin

DMEM - Dulbecco´s Modiefied Eagle´s Medium

DMSO - dimethyl sulfoxid

DMT-1 - divalent metal transporter gene

EDTA - ethylen diamin tetraaoctová kyselina

ERK1/2 - extracellular signal-regulated kinases 1/2

$FADH_2$ - flavin adenine dinucleotide (redukovaná forma)

FDO - 2-furildioximy

FGF-2 - fibroblast growth factor 2

FITC - fluorescein isothiokyanát

FMN_2H - flavin mononucleotide (redukovaná forma)

FPN-1 - feroportin 1

Gi-GPx - gastrointestinální glutathion peroxidáza

GM-CSF - granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GPx - glutathion peroxidáza

GSH/GSSG - glutahion (redukovaná / oxidovaná forma)

HCP-1 - hem carrier protein 1

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HFE - hemochromatosis

HIF-1 - Hypoxia-inducible factor 1

HJV - hemojuvelin

HNE - 4-hydroxy-2-nonenal

IGF-II - insulin-like growth factor II

IL - interleukiny

IRP 1(2) - iron regulated protein 1(2)

JNK - C-Jun N-terminal kinases

MAPK - mitogen-activated protein kinases

MDA - malondialdehyd

MnSOD - manganová superoxid dismutáza

MOP - myeloperoxidáza

NADH - nicotinamide adenine dinucleotide (redukovaná forma)

NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (redukovaná forma)

NF-χB - nuclear factor-kappa B

2-NFE-SIH - 2-nitrofenylethyl salicyladehyd isonikotionyl hydrazonu

NGF - nerve growth factor

NIH - 2-hydroxy-1-naftyl isonikotinoyl hydrazonu

PAPR - 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase

PDGF - platelet-derived growth factor

PHGPx - fosfolipidová glutathion peroxidáza

PIH - pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu

Pl-GPx - plasmatická glutathion peroxidáza

ROS - reaktivní formy kyslíku

RNS - reaktivní formy dusíku

Se-GPx - klasicá glutathion peroxidáza

SIH - salicyladehyd isonikotinoyl hydrazonu

SOD - superoxid dismutáza

t-BHP - tert-butylhydroperoxide

TfR-1(2) - transferinový receptor 1(2)

TGF-β_1 - transforming growth factor (tumor growth factor) β_1

TNF-α - tumor necrosis factor α

TRX - thioredoxin

TxR - Texas Red

VEGF - vascular endothelial growth factor