

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

**STUDIUM NOVÝCH CHELÁTORŮ ŽELEZA
PRO PREVENCI POŠKOZENÍ SRDEČNÍCH BUNĚK
OXIDAČNÍM STRESEM**

Diplomová práce

Petra Bendová

Školitel: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Hradec Králové, 2009

Tímto bych chtěla poděkovat mému školiteli Tomáši Šimůnkovi, Ph.D. za obrovskou trpělivost, ochotu, inspiraci a rady, které mi poskytoval při práci a tím mi pomohl k vypracování této diplomové práce. Děkuji kolegům z řad studentů i ostatním pracovníkům Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za jejich ochotu a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt 124307/C/2007).

Hradec Králové, 2009

Petra Bendová

Prohlašuji, že tuto práci jsem vypracovala samostatně, je tedy mým původním autorským dílem. Veškeré literární a další zdroje, ze kterých jsem během práce čerpala, jsou v textu řádně citovány a uvedeny v seznamu literatury.

Hradec Králové, 2009

Petra Bendová

Abstrakt

Výsledky řady studií dokazují, že na patogenezi mnoha onemocnění včetně kardiovaskulárních chorob má významný vliv oxidační stres. Ústřední roli v rozvoji oxidačního poškození hrají ionty volného železa, které katalyzují tvorbu hydroxylových radikálů. Ty patří mezi nejreaktivnější a nejtoxičtější formy reaktivních sloučenin kyslíku (ROS). Jako prevence proti rozvoji oxidačního poškození tkání mohou být použity chelátory železa. Tato studie se zabývá potvrzením schopností chelátoru železa salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) tomuto poškození předcházet a studiem vlastností nových aroylhydrazonových chelátorů od SIH odvozených. Protektivní účinnosti před modelových oxidačním stresem i vlastní toxicity jednotlivých látek byly hodnoceny *in vitro* s využitím potkaní kardiomyoblastové buněčné linie H9c2, viabilita buněk byla hodnocena pomocí testu vychytávání neutrální červeně.

24-hodinová inkubace H9c2 buněk s 200 μM tert-butyl hydroperoxidu (t-BHP) navodila dramatické změny buněčné morfologie a následnou buněčnou smrt. Současná inkubace se všemi chelátory v závislosti na dávce snížila nebo úplně potlačila buněčné poškození. Náhrada salicylaldehydu ve struktuře SIH metylketonem vedla k zesílení protektivních vlastností ligandu, tímto chelátorem je 1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden isonikotinoylhydrazon - 2-HAF-INH (SIH: $\text{EC}_{50} = 18,2 \mu\text{M}$; 2-HAF-INH: $\text{EC}_{50} = 11,4 \mu\text{M}$). Ve srovnání se SIH, kdy došlo po 24 hodinové inkubaci ke snížení viability buněk o 45%, nevykazoval 100 μM 2-HAF-INH žádnou akutní toxicitu. Při 72 hodinové inkubaci však 100 μM 2-HAF-INH vykázal toxicitu vyšší (88% snížení viability buněk) než SIH (68%). Hodnota IC_{50} byla stanovena pro SIH 29,7 μM , pro 2-HAF-INH 12,2 μM . Ze série dalších osmi různě substituovaných aroylhydrazonů vykázal nejlepší poměr cytoprotektivních a toxických vlastností 1- (2- hydroxy- 7-oxo- 7,8-dihydronafthalen- 1-yl) ethyliden isonikotinoyl hydrazon (AHC-INH).

Tato studie potvrdila klíčovou roli volného železa v peroxidativním poškození buněk i významné protektivní schopnosti nových originálních aroylhydrazonových chelátorů železa, které proto zasluhují další studium.

Abstract

Results of many studies demonstrate a significant role of oxidative stress in the pathogenesis of many illnesses including cardiovascular diseases. Free cellular iron plays significant role in development of oxidative cell damage; it catalyzes formation of hydroxyl radicals. Hydroxyl radicals belong among the most reactive and toxic forms of reactive oxygen species (ROS). Hence, iron chelators can be used as preventive agents against the development of oxidative damage of tissues. This study deals with confirmation of ability of the iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to prevent this damage and with the study of properties of new aroylhydrazone chelators derived from SIH. Protective effects against a model oxidative stress and own toxicities of individual agents were evaluated *in vitro* using rat cardiomyoblast cell line H9c2, the viability of cells was determined by neutral red uptake assay.

A 24-hour incubation of H9c2 cells with 200 μM tert-buthyl hydroperoxide (t-BHP) evoked dramatic changes of cellular morphology and was followed by cell death. Co-incubation with all chelators dose-dependently reduced or abolished cell damage. The replacement of salicyl aldehyde in SIH with a methyl ketone led to an amplification of protective properties of this ligand, this chelator is (1-(2-hydroxyphenyl)ethylidene) isonicotinohydrazide - 2-HAF-INH (SIH: $\text{EC}_{50} = 18.2 \mu\text{M}$; 2-HAF-INH: $\text{EC}_{50} = 11.4 \mu\text{M}$). In comparison with SIH, where following a 24-hour incubation a 45% reduction of cell viability was observed, 100 μM 2-HAF-INH did not show any acute toxicity. After 72-hour incubation the toxicity of 2-HAF-INH was higher (88% reduction of cell viability) than SIH (68%). The IC_{50} value was determined as 29.7 μM for SIH and 12.2 μM 2-HAF-INH. From the series of other eight differently substituted aroylhydrazones, the best ratio of cytoprotective and toxic properties showed 1-(2-hydroxy-7-oxo-7,8-dihydronaphthalen-1-yl)ethylidene) isonicotinohydrazide (AHC-INH).

This study confirms a key role of free cellular iron in peroxidative cell damage and significant protective ability of new original aroylhydrazone iron chelators, which deserve further investigation.

Obsah

1. Teoretická část	10
1.1. Úvod.....	11
1.1.1. Kyslík – jeho biologické vlastnosti.....	11
1.1.2. Mitochondrie.....	11
1.1.3. Cytochromy P 450	12
1.2. ROS a volné radikály	12
1.2.1. Úvod do problematiky	12
1.2.2. Přehled zástupců ROS a jejich vlastnosti	13
1.2.2.1. Kyslík v základním stavu (O ₂).....	13
1.2.2.2. Singletový kyslík (O).....	14
1.2.2.3. Superoxidový radikál (O ₂ ^{•-})	14
1.2.2.4. Hydroxylový radikál (OH [•]).....	14
1.2.2.5. Peroxylový a alkoxylový radikál (RO ₂ [•] , RO [•])	15
1.2.2.6. Peroxynitril (ONOO ⁻)	15
1.2.2.7. Peroxid vodíku (H ₂ O ₂).....	16
1.2.2.8. Kyselina chlorná (HOCl).....	17
1.2.2.9. Ozon (O ₃).....	17
1.2.3. Přejídné kovy a jejich význam	17
1.2.3.1. Železo (Fe).....	18
1.2.3.2. Měď (Cu)	19
1.2.3.3. Mangan (Mn)	20
1.2.4. Významné zdroje ROS <i>in vivo</i>	20
1.2.4.1. Fentonova a Haber-Weissova reakce.....	20
1.2.4.2. Enzymy produkující ROS <i>in vivo</i>	22
1.2.4.2.1. Transportní řetězec elektronů na membránách.....	22
1.2.4.2.2. Xanthin-oxidáza.....	22
1.2.4.2.3. Superoxid-dismutáza	22
1.2.4.3. Další zdroje ROS	22
1.2.4.3.1. Autooxidační reakce	22

1.2.4.3.2. Ostatní zdroje	23
1.2.5. Redoxní stav buňky	23
1.2.6. ROS a jejich fyziologický význam	24
1.3. Antioxidační mechanismy v organismu	25
1.3.1. Antioxidační enzymy	25
1.3.2. Neenzymatické antioxidanty.....	27
1.3.3. Chelátory železa.....	28
1.3.3.1. Siderofory	28
1.3.3.2. Syntetické chelátory železa.....	29
1.4. Oxidační stres	32
1.4.1. Poškození DNA	32
1.4.2. Poškození proteinů.....	33
1.4.3. Poškození lipidů.....	33
1.4.4. Poruchy metabolismu iontů v buňkách.....	33
1.4.5. Poškození mitochondrií a endoplazmatického retikula	34
1.4.6. Buněčná smrt	35
3. Metodická část	39
3.1. Přístrojové vybavení	40
3.1.1. Zařízení pro sterilní práci a kultivaci buněčné linie H9c2.....	40
3.1.2. Invertovaný epifluorescenční mikroskop.....	40
3.1.3. Čtečka 96-jamkových mikrotitračních destiček	40
3.1.4. Ostatní laboratorní vybavení.....	41
3.2. Reagencie a chemikálie	41
3.3. In vitro cytotoxicitní experimenty	44
3.3.1. Buněčná linie H9c2.....	44
3.3.2. Reagencie a kultivační média	44
3.3.3. Kultivace, pasážování a práce s buněčnou linií H9c2	44
3.3.4. Stanovení počtu živých buněk počítáním na Bürkerově komůrce	45
3.4. Uspořádání pokusů	45
3.5. Statistické analýza a výpočty hodnot EC ₅₀ a IC ₅₀	46
3.6. Studium protekce buněk H9c2 novými chelátory železa před modelovým oxidačním poškozením	46
3.7. Stanovení vlastní toxicity nových chelátorů železa.....	46
3.8. Stanovení životaschopnosti buněk H9c2 pomocí vychytávání neutrální červeně.....	47

3.9. Fotografická dokumentace protektivních účinků chelátorů na buňkách H9c2.....	48
3.9.1. Metody fotografické dokumentace	48
3.9.2. Inkubace H9c2 buněk s fluorescenčními sondami Hoechst 33342 a PI.....	48
4. Výsledky	49
4.1. Fotografická dokumentace.....	50
4.2. Studium účinků chelátoru železa SIH.....	52
4.2.1. Protekce před toxicitou t-BHP	52
4.2.2. Hodnocení vlastní toxicity	53
4.3. Studium účinků chelátoru železa 2-HAF-INH	54
4.3.1. Protekce před toxicitou t-BHP	54
4.3.2. Hodnocení vlastní toxicity	55
4.4. Studium účinků chelátoru železa 2,4-DHAF-INH	56
4.4.1. Protekce před toxicitou t-BHP	56
4.4.2. Hodnocení vlastní toxicity	57
4.5. Studium účinků chelátoru železa 2,6-DHAF-INH	58
4.5.1. Protekce před toxicitou t-BHP	58
4.5.2. Hodnocení vlastní toxicity	59
4.6. Studium účinků chelátoru železa HMAF-INH	60
4.6.1. Protekce před toxicitou t-BHP	60
4.6.2. Hodnocení vlastní toxicity	61
4.7. Studium účinků chelátoru železa HNAF-INH.....	62
4.7.1. Protekce před toxicitou t-BHP	62
4.7.2. Hodnocení vlastní toxicity	63
4.8. Studium účinků chelátoru železa 4,6-DAR-INH.....	64
4.8.1. Protekce před toxicitou t-BHP	64
4.8.2. Hodnocení vlastní toxicity	65
4.9. Studium účinků chelátoru železa 2-HPF-INH	66
4.9.1. Protekce před toxicitou t-BHP	66
4.9.2. Hodnocení vlastní toxicity	67
4.10. Studium účinků chelátoru železa 2-HAF-INH	68
4.10.1. Protekce před toxicitou t-BHP	68
4.10.2. Hodnocení vlastní toxicity	69
4.11. Studium účinků chelátoru železa CAF-INH.....	70
4.11.1. Protekce před toxicitou t-BHP	70

4.11.2. Hodnocení vlastní toxicity	71
5. Diskuze	72
6. Závěry	88
7. Použitá literatura	90
8. Přehled zkratk	96

1. Teoretická část

1.1. Úvod

1.1.1. Kyslík – jeho biologické vlastnosti

Prvek kyslík (chemický symbol O) nás obklopuje ve formě molekuly tvořené dvěma atomy, O₂. Přes 99 % atmosférického kyslíku je izotopem kyslíku 16, ale nalezneme zde i stopy kyslíku 17 a 18. Kromě některých anaerobních a aerotolerantních druhů, vyžadují všechny organismy O₂ pro produkci energie (*Lane, 2002*).

První živé organismy na Zemi žily v atmosféře obsahující velké množství N₂ a CO₂, ale velmi málo O₂. Anaerobní mikroorganismy stále existují, ale obvykle je po expozici 21 % O₂ jejich růst inhibován nebo dochází k jejich zániku, nalezneme je tak v prostředí, do kterého O₂ neproniká. Jiné organismy si vytvořily systém obsahující antioxidanty (produkce nových molekul s novou funkcí) k ochraně před toxicitou O₂. Organismy s tolerancí O₂ tento systém využívají k metabolickým pochodům, které jsou katalyzovány oxidázami a hydroxylázami.

Využití O₂ v transportním řetězci elektronů usnadnilo produkci energie ve formě **ATP**. Zvýšená produkce energie umožnila rozvoj mnohobuněčných organismů, ty ale potřebují systém zajišťující distribuci O₂ do celého těla. Převážná většina kyslíku je přenášena pomocí **hemoglobinu**, kde se kyslík váže reverzibilně na Fe²⁺ hemové skupiny. Svalová tkáň využívá pro uskladnění O₂ **myoglobin** a intracelulární pO₂ v neuronech pomáhá regulovat **neuroglobin**. (*Halliwel et Gutteridge, 2007*)

Škodlivý efekt O₂ na anaerobní organismy je způsoben oxidací základních složek buňky (*Morris, 1976*). **Oxidace** esenciálních biomolekul, jako jsou thioley, proteiny s vazbou Fe-S nebo redukované pteridiny, vyvolaná O₂ může způsobit selhání metabolismu. Tato oxidace je často doprovázena současnou redukcí O₂ na volné radikály kyslíku („oxygen free radicals“) a jiné toxické reaktivní sloučeniny kyslíku („reactive oxygen species“, ROS) (*Halliwel et Gutteridge, 2007*).

1.1.2. Mitochondrie

Mitochondrie jsou obvykle objemově nejrozsáhlejším kompartmentem buňky. Hlavní součástí mitochondrie jsou enzymy dýchacího řetězce a enzymový komplex ATP syntáz, dále zde nalezneme řadu transportních proteinů. V matrix je uložena mitochondriální DNA, ribozomy, tRNA, proteosyntetické enzymy, enzymy Krebsova cyklu (cyklu kyseliny citronové) a enzymy metabolizující lipidy (β-oxidace mastných kyselin) (*Nečas et al., 2000*).

Mitochondrie jsou hlavním zdrojem ATP. Využívají asi 80 % O₂. Produkce energie během metabolismu je v podstatě jednoduchá: molekuly jsou oxidovány, ztrácí elektrony, které jsou vycytávány přenašeči. Nejdůležitějšími přenašeči jsou nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺), a flaviny (flavin mononukleotid (FMN) a flavin adenin dinukleotid (FAD)). Ty přechází na redukované formy (NADH, FMNH₂ a FADH₂) a poté jsou reoxidovány kyslíkem, tím je produkováno velké množství energie ve formě ATP. Oxidace je v různých stupních katalyzována tak, aby se energie uvolňovala postupně, čehož je dosaženo díky transportnímu řetězci elektronů. Hlavním oxidačním enzymem části transportního řetězce elektronů, kdy je využíván O₂, je **cytochrom oxidáza** (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.1.3. Cytochromy P 450

Endoplasmatické retikulum (ER) a často i jiné orgány mnoha živočišných i rostlinných tkání obsahují cytochromy známé pod souhrnným označením cytochromy P 450 (CYP 450). Cytochromy P 450 se podílí na metabolismu léčiv a jiných xenobiotik, arachidonových kyselin, eikosanoidů, cholesterolu a vitamínu D₃. Jsou tvořené jedním polypeptidovým řetězcem obsahujícím hemové proteiny. Jako CYP 450 byly pojmenovány proto, že redukovaná forma CYP absorbuje záření o vlnové délce 450 nm.

CYP katalyzují oxidaci substrátu kyslíkem. Jeden kyslík se váže na substrát a druhý tvoří vodu, tato reakce je známá jako monooxygenázová reakce (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

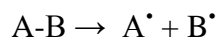
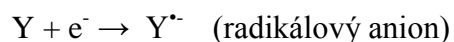
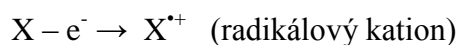
1.2. ROS a volné radikály

1.2.1. Úvod do problematiky

Pojmem „volné radikály“ („free radicals“) označujeme jakýkoliv druh látky schopné samostatné existence (vyjádřeno pojmem „volný“ („free“)), která obsahuje jeden nebo více nepárových elektronů. Nepárový elektron je ten, který obsazuje jako jediný orbital atomu či molekuly (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Nepárové elektrony obvykle poskytují radikálům značný stupeň reaktivity (*Valko et al., 2007*).

Označení „volné radikály“ bylo v biologii použito poprvé roku 1956 D. Harmanem, který se zabýval myšlenkou, že volné radikály hrají roli v procesu stárnutí. Jeho práce spustila intenzivní výzkum na poli volných radikálů v biologických systémech (*Harman, 1956*).

Mohou vznikat ztrátou jednoho elektronu z „neradikálů nebo naopak jeho přijetím, případně rozštěpením molekuly (Halliwell et Gutteridge, 2007).



Nejvýznamnější skupinu radikálů vznikajících v živých organismech představují radikály odvozené od kyslíku. Molekula kyslíku má jedinečnou elektronovou konfiguraci a je sama o sobě radikálem (Valko et al., 2007). Radikály kyslíku zahrnujeme společně s některými neradikály odvozenými od O₂ (např. H₂O₂, HOCl, O₃) do skupiny látek označovaných jako reaktivní formy kyslíku, ROS (reactive oxygen species) (Halliwell et Gutteridge, 2007). ROS se podílejí na biologických procesech, a to od embryogeneze po proces stárnutí, jak v normální zdravé tkáni tak při řadě nemocí. Regulují významné kroky transdukční kaskády signálů a ovlivňují řadu důležitých vlastností buňky, jako např. fosforylace proteinů, genová exprese, aktivace transkripčních faktorů, syntéza DNA nebo proliferace buněk (Hoidal, 2001).

K produkci ROS dochází především v mitochondriích (Cadenas et Sies, 1998). Transportní řetězec elektronů je hlavním zdrojem ATP a je nezbytný pro život. Během tohoto procesu se malé množství elektronů váže přednostně na kyslík a vznikají tak superoxidové radikály, které mohou dále reagovat za vzniku ostatních ROS (Valko et al., 2007).

1.2.2. Přehled zástupců ROS a jejich vlastnosti

Jak již bylo řečeno, ROS je označením skupiny látek odvozených od kyslíku, ať už se jedná o radikály či nikoliv (Hoidal, 2001). Širší význam má pojem RS („reactive species“), ten zahrnuje i reaktivní sloučeniny dusíku, chloru, bromu a síry (Halliwell et Gutteridge, 2007).

1.2.2.1. Kyslík v základním stavu (O₂)

Díky přítomnosti dvou nepárových elektronů můžeme molekulu kyslíku označit za volný radikál (mohl by být označen i jako O₂[•]). Oba elektrony mají stejný spin (označovaný také jako paralelní spin). V tomto stavu je kyslík nejstabilnější (základní stav). S neradikály

reaguje velmi pomalu a to tak, že přijímá elektrony po jednom (uplatňuje se tzv. spinová restrikce - oba elektrony přijímané kyslíkem musí mít opačný spin), oproti tomu s radikály, u kterých nalezneme pouze 1 elektron, reaguje rychleji.

1.2.2.2. Singletový kyslík (O)

Singletový kyslík patří do skupiny neradikálů (nemá nepárové elektrony). Vzniká z O₂ dodáním energie. Je to reaktivnější forma kyslíku než O₂, nedochází totiž ke spinové restrikci.

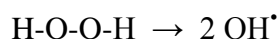
1.2.2.3. Superoxidový radikál (O₂^{•-})

Elektron přijatý molekulou O₂ v základním stavu vstupuje do π* antivazebného orbitalu, produkt této reakce označujeme jako superoxidový radikál (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Superoxidy jsou produkovány komplexem I a III transportního řetězce elektronů, přičemž superoxidy závislé na komplexu I jsou produkovány do mitochondriální matrix, superoxidy komplexu III přímo do extramitochondriálního prostoru (*Muller et al., 2004, Valko et al., 2007*).

Díky přítomnosti jednoho nepárového elektronu je superoxid slabším radikálem než O₂. Přijetím dalšího elektronu vzniká O₂²⁻, tedy peroxidový ion. Dodáním dalších dvou elektronů se pak vazba mezi atomy rozpadá a vznikají dva ionty kyslíku (O²⁻) (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

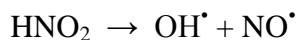
1.2.2.4. Hydroxylový radikál (OH[•])

Hydroxylový radikál, OH[•], je neutrální formou hydroxidového iontu (*Valko et al., 2007*). Může být produkován reakcí iontů přechodných kovů s H₂O₂ nebo homolytickým rozštěpením vazby O-O v H₂O₂ vyvolaným působením UV záření.



K této reakci dochází například v pokožce vystavené slunečnímu záření. Hydroxylové radikály vznikají také z ozonu a peroxyinitrilu. Mezi další zdroje můžeme také zařadit: ionizační reakce, reakce O₂^{•-} s kyselinou chlornou, ultrazvuk, rozklad N-hydroxythiopyridonů nebo produkce z chinonů (chinony a semichinony mohou tvořit OH[•] z H₂O₂ redoxní reakcí využívající ionty železa).

V troposféře se vyskytuje OH[•] v plynném stavu. Zde vzniká fotolýzou atmosferické kyseliny dusité.



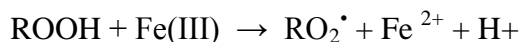
(Halliwell et Gutteridge, 2007)

Hydroxylový radikál je vysoce reaktivní. Reakcemi vznikají velmi nebezpečné radikály s krátkým poločasem (Pastor et al., 2000). Reakce OH[•] můžeme rozdělit do 3 základních typů: odstranění vodíku, adice a přenos elektronů (Halliwell et Gutteridge, 2007.).

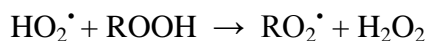
1.2.2.5. Peroxylový a alkoxylový radikál (RO₂[•], RO[•])

Peroxylový (RO₂[•]) a alkoxylový (RO[•]) radikál jsou většinou velmi dobře oxidovatelné molekuly, které mají vysokou pozitivní E°. Aromatické alkoxylové a peroxylové radikály jsou méně reaktivní než alifatické, protože mají elektrony delokalizované v benzenovém kruhu.

Tyto radikály vznikají reakcí uhlíkatých radikálů s O₂ (vznik RO₂[•]), rozkladem organických peroxidů (ROOH) (vznik RO₂[•] i RO[•]) a také mohou být produkovány substituovanými N-hydroxypyridony. Většina peroxidů je stabilní za pokojové teploty, ale rozkládá se zahříváním, působením UV záření nebo adicí či tranzicí iontů kovů, např.



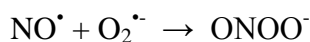
Tato reakce patří mezi zdroje peroxidace lipidů železem. Zatímco peroxidy proteinů jsou ionty kovů rozkládány, peroxidy lipidů mohou reagovat s HO₂[•] za vzniku RO₂[•].



(Halliwell et Gutteridge, 2007)

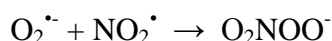
1.2.2.6. Peroxynitril (ONOO⁻)

Peroxynitril vzniká z NO[•] a O₂^{-•} nebo častěji kombinací NO₂[•] a O₂^{-•}.



Adice ONOO⁻ do buněk, tkání či tělních tekutin vede k jeho rychlé peptonizaci, která je následována snížením počtu –SH skupin a antioxidantů, oxidací a nitrací lipidů, poškození DNA nitrací a deaminací bází DNA, nitrací aromatických zbytků aminokyselin v proteinech, oxidací cysteinu, methioninu a dalších.

Tak jako reaguje O₂^{•-} s NO[•], může reagovat také s NO₂[•], vzniká tak velmi nebezpečná sloučenina, peroxyinitrát.



(Halliwell et Gutteridge, 2007)

1.2.2.7. Peroxid vodíku (H₂O₂)

Peroxid vodíku je kovalentní, viskózní kapalina s bodem varu 150°C. Pro řadu buněk je toxický v rozmezí 10 až 100 μM, vyvolává apoptózu. V nižších dávkách naopak může podporovat proliferaci některých buněk, v dávkách vysokých pak potlačuje apoptózu a vyvolává nekrózu.

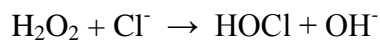
H₂O₂ je mísitelný s vodou, může difundovat do buněk nebo mezi ně *in vivo* a to mimo jiné i s využitím aquaporinů.

Vzniká působením enzymů, např. xantinu, koproporfyryinogenu III, glukóza-, lyzyl-a monoamin-oxidáz. Substrátem oxidace je nejčastěji askorbát nebo některé flavonoidy. K jeho produkci může docházet také fotochemickými reakcemi. Řada tkání, i když ne všechny, produkuje H₂O₂ nepřetržitě. Významným zdrojem přispívajícím k tvorbě jsou mitochondrie, které jsou současně i jeho konzumentem.

H₂O₂ je jen slabé oxidační a redukční činidlo a je tedy slabě reaktivní, např. při inkubaci DNA, lipidů nebo proteinů s nízkým množstvím peroxidu (v řádu mM) nepůsobí H₂O₂ žádnou oxidací. Je však schopný inaktivovat řadu enzymů, obvykle na hyperaktivních –SH vazbách nezbytných pro katalytické reakce, čímž buňky přímo poškozuje. Přidání H₂O₂ ve vyšším množství vede k oxidaci lipidů, DNA a proteinů, ta však není výsledkem působení H₂O₂ samotného. Peroxid totiž prostupuje buněčnou membránou a reaguje s železem, případně mědí, a tvoří tak mnohem nebezpečnější sloučeniny jako je OH[•]. Někdy může expozice buněk peroxidu vodíku zvýšit produkci O₂^{•-} a to díky aktivaci NADPH-oxidázy *(Halliwell et Gutteridge, 2007)*.

1.2.2.8. Kyselina chlorná (HOCl)

Kyselina chlorná vzniká působením enzymu myeloperoxidázy (MPO):



Je to slabá kyselina, která je za $\text{pH} = 7$ z 50 % ionizovaná. Při nízkých hodnotách pH prostředí se rozkládá za současného uvolnění plynného chloru (Cl_2):



HOCl je silné oxidační činidlo, které má v živém systému řadu cílů. Prostupuje membránami, způsobuje zde poškození membránových proteinů a lipidů a ničí i intracelulární složky buňky. Vyvolává oxidaci thiolů, askorbátu, NAD(P)H nebo DNA. Způsobuje poškození postranních řetězců, fragmentaci a agregaci proteinů, účastní se také tvorby singletového kyslíku a nitrilchloridu a oxidace NO_2^- na NO_3^- . Reakce s $\text{O}_2^{\cdot-}$ nebo Fe^{2+} vede ke vzniku OH^{\cdot} nebo sloučenin se srovnatelnou reaktivitou (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.2.2.9. Ozon (O_3)

Ozon patří mezi neradikály. Je to dráždivý plyn málo rozpustný ve vodě, tvořený 3 atomy kyslíku. O_3 zajišťuje základní „antioxidační“ funkci v nejvyšších vrstvách atmosféry, kde brání prostupu UV záření. Právě zde ozon vzniká fotodisociací O_2 na kyslíkové atomy, které se pak váží na molekuly O_2 . Problém nastává, když se začne tvořit v nižších vrstvách atmosféry. K jeho tvorbě dochází fotochemickou reakcí mezi oxidy dusíku a uhlovodíky.

Jedná se o silné oxidační činidlo, oxidující lipidy a proteiny. Ve vodných roztocích se O_3 rozkládá za vzniku OH^{\cdot} . Reakce O_3 s řadou biomolekul, např. NADH, NADPH nebo albuminem, vede k uvolnění O_2 , což může vyústit v řadu dalších oxidačních reakcí.

Běžně je ozon řazen mezi exogenní toxiny, ale může vznikat také *in vivo* (př. produkty ozonolýzy cholesterolu v aterosklerotických lézích) (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.2.3. Přechodné kovy a jejich význam

Většina kovů prvního řádku části d periodické soustavy prvků obsahuje v atomu a/nebo iontu nepárový elektron, díky tomu je můžeme řadit mezi volné radikály. Řada jejich

biologických vlastností, ať už prospěšných (syntéza proteinů účastnících se dýchání, transportu O₂, tvorby NO[•], součástí antioxidačního systému) či škodlivých, vyplývá ze schopnosti přijímat nebo poskytovat nepárový elektron do reakce. Přenos nepárových elektronů přechodných kovů podporuje možnost překonat spinovou restrikcí v reakci O₂ s neradikály. Nebezpečné je, že mohou katalyzovat reakce volných radikálů, jako je autooxidace a tvorba OH[•]. Tyto kovy se tak stávají potencionálními prooxidanty (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.2.3.1. Železo (Fe)

1) Vlastnosti

Železo se běžně vyskytuje ve dvou elektronových konfiguracích v oxidačním čísle Fe(II) a Fe(III), mnohem méně často pak Fe(IV), Fe(V) a Fe(VI). Ve sloučeninách je v přítomnosti kyslíku stabilní formou oxidační stav Fe(III). Pokud je sloučenina ve formě soli (např. FeSO₄) vystavena působení kyslíku, oxiduje se železo pomalu do stavu Fe(III). Fe²⁺ zde prochází jednoelektronovou oxidací:



(*Halliwell et Gutteridge, 2007*)

Železo je esenciální prvek metabolických procesů, které jsou nezbytné pro život. Účastní se syntézy DNA, dýchání a klíčových metabolických reakcí. Hladina Fe v buňce musí být velmi dobře regulována, dosahuje se toho transportem, skladováním a působením regulačních proteinů. Zatížení organismu vyšším množstvím tohoto kovu vede k poškození volnými radikály vznikajícími v průběhu Fentonovy reakce (viz. 1.2.4.1.) (*Dunn et al., 2006*).

2) Metabolismus

Většina anorganického železa se ve stravě vyskytuje ve formě Fe(III) (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Před vlastní absorpcí musí být Fe(III) redukováno na Fe(II). K tomu dochází na apikálním povrchu enterocytů díky Fe(III)-redukčnímu duodenálnímu cytochromu b (Dcytb) (*Dunn et al., 2006*). Fe(II) je vychytáváno přenašečem dvojmocných iontů Nramp2 (také DMT1 nebo DCT1) (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Dalším zdrojem železa ve stravě je hem, molekula tvořená protoporfyrinem, na kterém je vázáno železo. Hem se uvolňuje po rozkladu hemoglobinu a myoglobinu masa. Vstřebává se po vazbě na HCP1 (heme carrier

protein 1) v duodenu, díky receptorem zprostředkované endocytóze. Vzniklé endozomální vesikuly migrují do endoplasmatického retikula, kde se z hemu působením hem-oxygenázy 1 (HO1) uvolňuje železo (Dunn et al., 2006).

Do intersticiálního prostoru je Fe(II) exportováno přes bazolaterální membránu ve vazbě na FPN1 a oxidováno ferooxidačním hephaestinem (Hp). Železo se poté s vysokou afinitou váže v séru na transportní protein **transferin** (Tf) a tak přechází do krevního oběhu (Dunn et al., 2006). Transferin přijímá i železo uvolněné po rozkladu starých červených krvinek a přenáší je do kostní dřeně. Pro dlouhodobější uskladnění železa je využíván **feritin**.

V organismu se setkáváme s dalšími proteiny velice podobnými transferinu: **laktoferinem**, **ovotransferinem** (též conalbumin), **melanotransferinem** a **uteroferinem**.

Buňky, které využívají železo, mají na svém povrchu receptory pro transferin. Na ně se váže plazmatický transferin a vzniklý komplex prostupuje endocytózou do buňky, kde přechází do cytoplazmy vakuol. Fe se uvolní z vazby, je redukováno a transportováno z vakuoly díky Nramp2. Transferin, ze kterého se železo uvolnilo (apotransferin) je vylučován z buňky a opětovně využíván k novému přenosu (Halliwell et Gutteridge, 2007).

Pro metabolismus železa jsou nezbytné mitochondrie. Dochází zde k syntéze hemu a je to také významné místo biosyntézy skupin [Fe-S].

Hladina železa v organismu je ovlivňována **hepcidinem**, hormonem a negativním regulátorem metabolismu Fe, a nepřímo také proteiny HJV, TfR2 či HFE, které ovlivňují expresi hepcidinu. Hecpidin je antimikrobiální peptid a mediátor přirozené imunity, který vzniká především v játrech. Hlavním místem jeho regulace je duodenum, respektive DMT1 a Dcytb, kde dochází k přímé či nepřímé interakci mezi hepcidinem a transportními proteiny (Dunn et al., 2006).

1.2.3.2. Měď (Cu)

1) Vlastnosti

Měď se běžně vyskytuje ve dvou oxidačních stavech, Cu(I) a Cu(II). Rozdíl jednoho elektronu mezi Cu^+ a Cu^{2+} nebo Cu^{2+} a Cu(III) poskytuje mědi schopnost podporovat reakce radikálů. Díky změně oxidačního čísla může katalyzovat konverzi dvou radikálů $\text{O}_2^{\cdot-}$ a dvou H^+ iontů na H_2O_2 a O_2 (Halliwell et Gutteridge, 2007).



2) Metabolismus

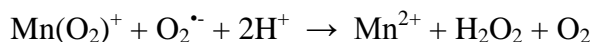
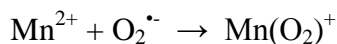
Ionty mědi jsou ve srovnání se železem velmi silnými katalyzátory oxidačního poškození. Dochází ke katalýze oxidačního poškození DNA a stimulaci peroxidace LDL cholesterolu. Nejen nadbytek ale také nedostatek mědi může vyvolat oxidační stres.

Cu se vstřebává v duodenu ve formě chelátu s aminokyselinami nebo malými peptidy. Část mědi vstupující do mukózy trávicích buněk nepřechází do krve, ale je stejně jako železo v těchto buňkách ukládána. Zbytek se uvolňuje do krve, kde se váže na transcuprein a na albumin. Měď je vychytávána játry s využitím Ctr1 a vstupuje do buněk ve formě Cu^+ . Část Cu se v játrech váže na protein ceruloplasmin, v této formě je pak uvolňována do plazmy.

Ceruloplasmin přenáší měď do buněk. V buňce se měď doručená díky Ctr1 váže na transportní proteiny, tzv. Cu-chaperony (CCS). Některé CCS přenáší Cu na CuZnSOD, jiné do Golgiho aparátu, kde je Cu zabudována do uvolňovaných proteinů a další předávají Cu mitochondriím, kde je inkorporována do cytochrom-oxidázy (*Prohazka et Gybina, 2004; Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.2.3.3. Mangan (Mn)

Mangan je ve vodných roztocích nejstabilnější v oxidačním stavu Mn^{2+} . Můžeme se s ním setkat také ve formě Mn(III), Mn(IV) nebo Mn(VII). Mn^{2+} je schopen interakce s $\text{O}_2^{\cdot-}$:



Stejně jako měď je Mn schopný katalyzovat dismutaci $\text{O}_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 . Ve srovnání s Fe^{2+} a Cu^+ se nechelatovaný Mn^{2+} neobjevuje v reakci s H_2O_2 , při které vzniká OH^{\cdot} (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.2.4. Významné zdroje ROS *in vivo*

1.2.4.1. Fentonova a Haber-Weissova reakce

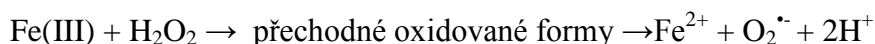
Fentonova reakce je základním příkladem poškozování organismu reakcí volných radikálů za katalýzy přechodnými kovy. Tento proces byl poprvé popsán Fentonem v roce 1876 takto: Směs H_2O_2 a solí Fe^{2+} způsobuje oxidaci řady různých organických molekul.



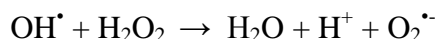
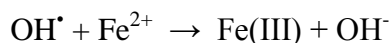
(Halliwell et Gutteridge, 2007)

Za fyziologických podmínek je zajištěna taková hladina železa, při které v organismu nenalezneme téměř žádné „volné intracelulární železo“. Za stresu však nadbytek superoxidu zvýší hladinu volného železa, to se uvolňuje z molekul obsahujících Fe (Liochew et Fridowich, 2002). Zvýšené množství Fe^{2+} se poté podílí na Fentonově reakci, za které vzniká vysoce reaktivní hydroxylový radikál (Valko et al., 2007). Identita ani vlastnosti ostatních reaktivních produktů (meziproduktů) vznikajících v průběhu reakce nejsou známy (Halliwell et Gutteridge, 2007).

Fe(III) navázané na stejné ligandy může také reagovat s H_2O_2 , tato reakce je však ve srovnání s Fe(II) obvykle pomalejší. Tvorba OH^\bullet s využitím směsi Fe(III) a H_2O_2 vede současně ke vzniku $\text{O}_2^{\bullet-}$, reakce je inhibována superoxid-dismutázou (SOD) (viz. 1.3.1.)

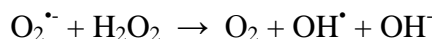


Ve Fentonově systému se můžeme setkat (v závislosti na podmínkách) s řadou dalších reakcí:

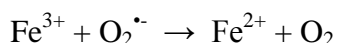


(Halliwell et Gutteridge, 2007)

Superoxidový radikál se podílí také na **Haber-Weissově reakci**:



Tato reakce kombinuje Fentonovu reakci a redukci Fe^{3+} díky superoxidu a poskytuje výtěžek Fe^{2+} a kyslíku.



(Liochew et Fridowich, 2002; Valko et al., 2007)

1.2.4.2. Enzymy produkující ROS *in vivo*

1.2.4.2.1. Transportní řetězec elektronů na membránách

Jak již bylo řečeno v kapitole 1.2., transportní řetězec elektronů v mitochondriích, případně v endoplazmatickém retikulu je hlavním zdrojem ATP a je tedy nezbytný pro životaschopnost organismu (Valko *et al.*, 2007). Současně je také významným zdrojem ROS. Tvorba ROS v nefagocytujících buňkách je často považována za nepodstatný vedlejší produkt dýchacího řetězce mitochondrií (Hoidal, 2001). Během přenosu energie se malé množství elektronů přednostně navazuje na kyslík, což vede ke vzniku superoxidového radikálu (Valko *et al.*, 2007). K úniku elektronů za vzniku $O_2^{\cdot-}$ může dojít u složek komplexu I a III a, za určitých okolností i u komplexu II a koenzymu Q.

Endoplazmatické retikulum (mikrozomální frakce) produkuje velké množství $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Halliwell *et Gutteridge*, 2007).

1.2.4.2.2. Xanthin-oxidáza

Ve zdravé tkáni se běžně vyskytuje xanthin-dehydrogenáza (XDH) Ta zajišťuje přenos elektronu na NAD^+ , ne na O_2 . V poškozených tkáních může XDH přejít oxidací –SH skupiny nebo částečnou pyrolýzou na xantin-oxidázu (XO). Následný nedostatek ATP v hypoxické tkáni způsobuje akumulaci hypoxantinu, ten může být oxidován xanthin-oxidázou za vzniku velkého množství $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Halliwell *et Gutteridge*, 2007).

1.2.4.2.3. Superoxid-dismutáza

Superoxid-dismutázy (SOD) představují *in vivo* zřejmě nejdůležitější faktor chránící před oxidačním stresem. SOD dismutují superoxid za vzniku H_2O_2 a O_2 (tedy méně reaktivní ROS) (více v kapitole 1.3.1.) (Ledvina *et al.*, 2005).



1.2.4.3. Další zdroje ROS

1.2.4.3.1. Autooxidační reakce

Řada významných biomolekul podléhá oxidaci kyslíkem, přičemž se uvolňuje $O_2^{\cdot-}$. Mezi tyto molekuly patří např. glycerinaldehyd, FMNH₂, FADH₂, adrenalin a noradrenalin, L-DOPA, dopamin, různé tetrahydropteridiny a triolové sloučeniny jako cystein.

Oxidace začíná pomalu, ale první uvolněný $O_2^{\bullet -}$ může dále oxidovat sloučeninu. Začíná tak řetězová reakce, jejímž produktem je poměrně velké množství $O_2^{\bullet -}$. Jelikož je O_2 málo reaktivní, je reakce zesilována přidávkem přechodných kovů, nejčastěji ionty Mn, Cu a Fe (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.2.4.3.2. Ostatní zdroje

Fagocytující buňky produkují velké množství volných radikálů, během fagocytózy se spotřebuje vysoký počet molekul kyslíku, což je označováno jako „oxidační vzplanutí“.

Velké množství ROS vzniká také ve vnějším prostředí. Působením záření o vysoké energii vzniká ROS ze smogu, výfukových plynů či cigaretového kouře (*Ledvina et al., 2005*).

1.2.5. Redoxní stav buňky

Volné radikály a reaktivní diamagnetické sloučeniny odvozené od radikálů jsou zastoupeny v buňkách v malých, ale měřitelných koncentracích. Každá buňka má charakteristickou koncentraci elektronů uložených v různých kompartmentech (= redoxní stav), tento stav a jeho oscilace určují funkce buněk. Redoxní stav buňky je udržován za normálních podmínek v úzkém rozmezí. Za patologických podmínek se redoxní stav přesunuje do nižších nebo vyšších oblastí (*Schafer et Buettner, 2001*). Intracelulární redoxní homeostáza je primárně zajišťována glutathionem (GSH) a thioredoxinem (TRX). Glutathion (pár GSH/GSSG) představuje hlavní buněčný redoxní nárazníkový systém a je tedy indikátorem redoxního prostředí v buňce (*Dröge, 2002; Schafer et Buettner, 2001*). Oba redoxní nárazníkové systémy, tedy GSH a TRX, působí proti nitrobuněčnému oxidačnímu stresu, mají tedy antioxidační funkci (*Dröge, 2002*). Kromě nich zde jsou další antioxidanty s nízkou relativní molekulovou hmotností, které mohou přispívat k odstraňování ROS, pokud jsou přítomné ve vyšších koncentracích (*Sies, 1993*).

Buněčný cyklus je charakterizován kolísáním redoxního prostředí v buňce, zvláště pak intracelulárními změnami v koncentraci glutathionu (*Arrigo, 1999*). Jak se ukázalo, GSH hraje významnou roli v ochraně buňky před apoptózou. Nedostatek GSH se projeví jako přechod buněčného prostředí do oxidovanějšího stavu, což je spojeno právě s náparem apoptózy nebo nekrózy. Zatímco apoptóza je způsobena středně silnými oxidačními stimuly, nekróza je spojena se stimuly velmi intenzivními (*Cai et Jones, 1998*).

1.2.6. ROS a jejich fyziologický význam

ROS se účastní řady biologických procesů, a to od embryogeneze po stárnutí, ve zdravých tkáních stejně jako u řady onemocnění. Podílí se na regulaci důležitých kroků signalizačních kaskád a důležitých buněčných procesů (*Hoidal, 2001*). Řada fyziologických funkcí je tedy kontrolována redoxními signalizačními drahami (*Dröge, 2002*). Patří sem například:

Redoxním systémem regulovaná produkce oxidu dusnatého (NO), který je v tkáních produkován specifickými NO-syntázami (NOS), ty existují ve třech isoformách: neuronální NOS (nNOS), indukovatelná NOS (iNOS) a endoteliální NOS (eNOS) (*Bredt et al., 1991*).

Produkce ROS fagocytární NAD(P)H-oxidázou (oxidační vzplanutí). Oxidační vzplanutí je charakterizováno masivní produkcí ROS v místě zánětu a má klíčovou roli v ochraně proti patogenům z vnějšího prostředí (*Keisari et al., 1983*).

Produkce ROS NAD(P)H-oxidázou v nefagocytujících buňkách. Různé typy nefagocytujících buněk, jako např. fibroblasty, buňky hladké svaloviny cév, kardiomyocy a endoteliální buňky, jsou schopné tvořit díky NAD(P)H-oxidáze ROS, které jsou dále využívány v regulačních intracelulárních signalizačních kaskádách (*Jones et al., 1996*). Tyto ROS mají důležitou roli v regulaci funkce srdečních a cévních buněk (*Valko et al., 2007*).

Regulace cévního tonu a další regulační funkce NO[•]. Regulaci cévního tonu zajišťuje cGMP. Vznik cGMP vyvolává enzym rozpustná guanylát-cykláza (sGC) a je známo, že sGC je aktivována peroxidem vodíku nebo NO[•] radikálem (*Valko et al., 2007*).

Redoxní regulace adheze buněk. Buněčná adheze má významnou roli v embryogenezi, buněčném růstu, diferenciaci, reparaci poškození atd. Adheze leukocytů na buňky je vyvolána působením ROS (*Valko et al., 2007*). Změny adhezivních vlastností buněk a tkání jsou regulovány redoxním systémem (*Albelda et al., 1994*).

Redoxní regulace imunitní odpovědi. Imunitní reakce je proces regulovaný redoxním systémem. Aktivace T-lymfocytů se významně zvyšuje působením ROS nebo změnou redoxního stavu intracelulárního glutathionu. Významné fyziologické koncentrace superoxidového radikálu a peroxidu vodíku mohou vyvolat např. i produkci interleukinu 2, což je produkt T-buněk (*Los et al., 1995; Valko et al., 2007*).

ROS-vyvolaná apoptóza. Programovaná buněčná smrt (apoptóza) je nezbytná pro správný vývoj i pro odstranění buněk, které představují hrozbu pro zachování integrity organismu. Existují tři různé mechanismy, které může buňka využít k apoptóze:

- a) spuštění interním signálem (vnitřní neboli mitochondriální dráha) – ROS, radiace...
- b) spuštění externím signálem (vnější dráha neboli receptorová smrt)
- c) spuštění apoptózu indukujícím faktorem (AIF) (Valko *et al.*, 2007).

1.3. Antioxidační mechanismy v organismu

Expozice organismu volným radikálům z různých zdrojů vedla v průběhu evoluce k rozvoji řady obranných mechanismů (Cadenas, 1997). Produkce ROS mitochondriemi je nedílnou součástí jak apoptózy tak nekrózy. Za fyziologických podmínek je životnost a funkčnost buňky silně závislá na udržení rovnováhy mezi tvorbou a inaktivací ROS v mitochondrii (Ott *et al.*, 2007). Obranné mechanismy proti oxidačnímu stresu způsobeného volnými radikály zahrnují: mechanismy preventivní, mechanismy opravné, fyzikální ochranu a ochranu antioxidační (Valko *et al.*, 2007).

Ochranu před RS zajišťují antioxidační enzymy a neenzymatické antioxidanty. Významnou funkci mají také chelátory železa (Halliwell *et Gutteridge*, 2007).

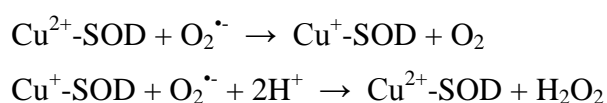
1.3.1. Antioxidační enzymy

Oxidační stres může vést k vyplavení většího množství železa (případně také mědi). To také vysvětluje, proč buňky spoléhají na antioxidační enzymy, které odstraňují $O_2^{\cdot-}$ (SOD) a peroxidy (katalázy, peroxiredoxiny, GPx). Je totiž nezbytné minimalizovat hladinu $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 dříve než se dostanou do kontaktu s přechodnými kovy a vzniknou nebezpečnější formy ROS (Halliwell *et Gutteridge*, 2007).

Zřejmě nejdůležitější faktor, který chrání tělo před oxidačním stresem *in vivo* představují **superoxid-dismutázy (SOD)**. SOD jsou u aerobů všudypřítomné a zdá se, že střední délka života všech druhů savců závisí na poměru aktivity SOD a koncentrace O_2 (Ledvina *et al.*, 2005). Superoxid-dismutázy přeměňují vysoce reaktivní a superoxidové radikály, na ionty méně reaktivní. Tyto ionty jsou poté přeměňovány dvěma dalšími enzymy. Reakce se SOD je označována jako dismutace

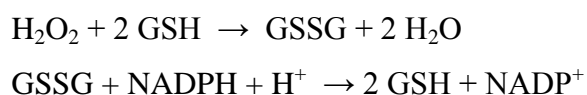
Existuje více forem SOD: jedná se o proteiny spojené s mědí a zinkem, manganem nebo železem, tedy metaloproteiny. Cu-Zn-SOD je obsažena v cytozolu všech eukaryotních buněk. V mitochondriích člověka a u různých bakterií se setkáme s formou SOD obsahující mangan (Mn-SOD). Řada dalších bakterií obsahuje enzym s navázaným železem (Fe-SOD), u některých bakterií dokonce nalezneme obě formy, tedy Mn-SOD i Fe-SOD (*Muth et al., 2004*).

SOD přeměňuje superoxidový radikál v průběhu dismutační reakce za vzniku peroxidu vodíku a molekuly kyslíku (*Carbone et al., 2003*). Typickou reakci metaloproteinu Cu-Zn-SOD můžeme vyjádřit:

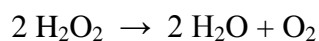


Dalším významným antioxidačním enzymem je **glutathion-peroxidáza (GPx)**. Jako jediný enzym v těle obsahuje jinak velmi toxický selen (*Ledvina et al., 2005*). Nachází se především v erythrocytech, kde chrání před oxidací jak lipidy membrán, tak hemoglobin, dále ji můžeme najít také zabudovanou ve spermiích, které tak chrání před oxidací (*Ledvina et al., 2005*).

Glutathion-peroxidáza redukuje H_2O_2 na H_2O za současné oxidace glutathionu (GSH). Následná redukce oxidované formy glutathionu (GSSG) je katalyzována glutathion-reduktázou.



Stejnou funkci jako glutathion-peroxidáza má **kataláza (CAT)**. Tento enzym nalezneme ve většině buněk živočišné tkáně. Kataláza je přítomná ve všech orgánech těla, největší koncentrace dosahuje v játrech a erythrocytech, v podstatně menším množství ji nalezneme v mozku, srdci či příčně pruhované svalovině (*Štípek, 2001*). CAT katalyzuje dismutaci dvou molekul H_2O_2 na vodu a O_2 v případě vysoké koncentrace peroxidu.



Při nízkých koncentracích peroxidu vodíku v buňkách se enzym chová stejně jako peroxidáza a O₂ se neuvolňuje (*Ledvina et al., 2005*).

Mezi antioxidační enzymy řadíme také **thioredoxin (TRX)** endoplasmatického retikula (viz. 1.2.5.).

1.3.2. Neenzymatické antioxidanty

Jedním z nejvýznamnějších antioxidantů této skupiny je *in vivo* vznikající tripeptid **glutathion (GSH)**, který se podílí na tvorbě redoxního nárazníkového systému buňky. Oxidovanou formou glutathionu je GSSG, glutathiondisulfid. GSH je přítomen ve vysoké koncentraci v cytosolu (1-11 mM), buněčném jádře (3-15 mM) a v mitochondriích (5-11 mM) a je hlavním rozpustným antioxidantem těchto kompartmentů. Syntetizován je v cytosolu pomocí glutamátcystein-ligázy a glutathion-syntázy, do mitochondrií se dostává transportem přes vnitřní membránu (*Valko et al., 2007*). Oxidovaný glutathion se kumuluje uvnitř buněk a poměr GSH/GSSG je dobrým měřítkem oxidačního stresu organismu (*Jones et al., 2000*). Příliš velká koncentrace GSSG může poškodit oxidací řadu enzymů.

Glutathion je kofaktorem různých detoxikačních enzymů chránících organismus proti oxidačnímu stresu, podílí se na transportu aminokyselin plasmatickou membránou, odklízí hydroxylové radikály a singletový kyslík, detoxifikuje peroxid vodíku a peroxidy lipidů za současné katalýzy glutathion-peroxidázy a je také schopný regenerovat významné antioxidanty, vitaminy C a E, zpět na aktivní formu (*Valko et al., 2007*).

Významnou skupinu neenzymatických antioxidantů představují i vitamíny:

Vitamín E (α -tokoferol) je hlavním v tucích rozpustným antioxidantem, který se v buňkách nachází. Jeho absorpce je spojena se vstřebáváním tuků ve střevě (absorbuje se asi 40 % celkového množství). Tokoferol je ovšem také schopen redukovat Fe³⁺ na Fe²⁺, tzn. může vystupovat i jako prooxidant.

Vitamin C (kyselina askorbová) je ve vodě rozpustná esenciální molekula. Jako antioxidant odstraňuje ROS. Ve srovnání s tokoferolem je silnějším inhibitorem oxidace LDL cholesterolu. Kyselina askorbová také může vystupovat jako prooxidant nebo jako redukční agens v reakcích s Cu nebo Fe solemi.

β karoten je prekurzor vitamínu A (retinolu) tvořený dvěma molekulami tohoto vitamínu. Antioxidační funkce β karotenu je dána schopností odstraňovat singletový kyslík, odklízet

volné radikály a chránit lipidy buněčné membrány před oxidačním poškozením (*Štípek, 2001*).

1.3.3. Chelátory železa

Obsah železa v těle je určován tím, kolik ho je absorbováno gastrointestinálním traktem (GIT). Jakmile jednou vstoupí do krve, neexistuje žádný fyziologický mechanismus, který by jej odstranil. Jedinou možností tak zůstává krvácení, nejčastěji se jedná o krvácení menstruační. Neschopnost odstranit nadbytek železa se může projevit jako „přetížení“. Přečasná nadměra železa doprovází řadu nemocí, můžeme se ale setkat i s přetížením chronickým. Přetížení železem se může objevit také jako vedlejší projev léčby jiného onemocnění, např. thalasemie (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

V minulosti byla provedena řada pokusů inhibovat oxidační poškození závislé na přítomnosti železa nebo mědi použitím různých komplexotvorných látek, chelátorů. Ty mohou působit různými mechanismy, Jednoduše lze říci, že přidání chelátoru snižuje množství OH^\bullet , což lze sledovat ve směsi ionty kovů- H_2O_2 .

Prvním chelatačním agens, o kterém se zjistilo, že je schopno snížit podíl tvorby OH^\bullet závislé na přítomnosti O_2^\bullet *in vitro*, byl **DETAPAC** (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

Při výzkumu účinných chelátorů železa byla snaha zabývat se třemi hlavními podmínkami, tedy způsobem podání, efektivitou chelatace železa a toxicitou daného ligandu. Ideální látka by byla aktivní po perorálním podání, ekonomická, vysoce specifická a bez nebezpečných vedlejších účinků (*Kalinowski et Richardson, 2005*).

1.3.3.1. Siderofory

Siderofory jsou přirozeně se vyskytující chelátory železa produkované mikroorganismy (*Kalinowski et Richardson, 2005*).

Deferoxamin (desferioxamin, DFO, obr. 1) je silným chelátorem Fe(III) produkovaný *Streptomyces pilosus* (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Tento chelátor se již několik desetiletí používá jako prevence přetížení železem a také pro léčbu předávkování železem u pacientů, kteří požíli toxickou orální dávku soli železa nebo podstupují opakovaně transfúze krve, např. při léčbě β -talasemie (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Pozitivní terapeutický efekt je často podpořen schopností DFO předcházet Fentonově reakci vyvolané „volným“ železem (*Reeder et al., 2007*). Infuzí lze zvířatům i člověku aplikovat velkou dávku DFO (50 mg/kg váhy za den). Tyto vysoké dávky mohou přechodně vyvolat sluchové a

zrakové potíže a také stoupá riziko vážných infekcí. DFO je vysoce (ale ne absolutně) specifický pro Fe(III). Komplex Fe(III)-DFO (ferioxamin) je obtížně redukován nejen $O_2^{\cdot-}$ ale i silnějšími redukčními činidly.

Kromě chelatace DFO navíc reaguje přímo s různými RS, jako je $RO_2^{\cdot-}$, pomalu s $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} nebo $HOCl$. Nevýhodou DFO je jeho silná hydrofilita, která ztěžuje vstup do buněk přes buněčnou membránu. Nevstřebává se z GIT a musí být tedy podáván intravenózní nebo subkutánní infuzí (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Tato aplikace je však velice bolestivá (*Kalinowski et Richardson, 2005*).

Dalším sideroforem je **desferithiocin (DFT)**, 2-(3-hydroxypyridin-2-yl)-4-methyl-4,5-dihydrothiazol-4-karboxylová kyselina, produkuje jej *Streptomyces antibioticus*. DFT patří mezi první objevené siderofory aktivní po orální aplikaci (*Tam et al., 2003*). Stinnou stránkou však zůstává, že může působit neurotoxicky. Kvůli vysoké orální aktivitě pokračoval výzkum obměn struktury DFT pro získání výhodnějších produktů. Analog DFT, (S)-desmetyldesferithiocin (DMDFT) si zachovává chelatační aktivitu a došlo u něj k významnému snížení toxicity po orální aplikaci (*Bergeron et al., 1999*). Kromě studií zabývajících se DFT jako chelátorem v léčbě onemocnění s předávkováním Fe, byly provedeny také studie antiproliferativní aktivity tohoto ligandu *in vitro*. Tento výzkum ukázal, že DFT je ve srovnání s DFO v této inhibici účinnější (*Kalinowski et Richardson, 2005*).

Posledním zástupcem této skupiny je **desferiexochelin (D-Exo)**. D-Exo je produkován *Mycobacterium tuberculosis*. Díky rovnováze mezi lipo- a hydrofilitou snadno prostupuje do buněk a tvoří zde komplexy se železem. U desferiexochelinu nebyla zaznamenána významnější toxicita. Ve srovnání s DFO je lepším antiproliferativním agens (*Pahl et al., 2001*).

1.3.3.2. Syntetické chelátory železa

Ve srovnání se siderofory, které se v přírodě vyskytují přirozeně, byly syntetické chelátory navrženy a syntetizovány tak, aby bylo dosaženo výhodnějších vlastností (*Kalinowski et Richardson, 2005*).

Dosud byla provedena řada studií zabývajících se právě těmito syntetickými chelátory železa (obr. 1). Mezi tyto látky řadíme:

Tridentální chelátor **ICL670A (deferasirox)** aplikovaný perorálně při léčbě thalasemie (*Nick et al., 2003*). Velkým kladem tohoto chelátoru je selektivní vazba Fe(II) a/nebo Fe(III) (*Heinz et al., 1999*).

Bidentální chelátor Fe **deferipron (L1, CP20)**, 1,2-dimetyl-3-hydroxypyridin-4-on). Jeho analog **CP94** je hydrofobnější a má vyšší chelatační efekt pro železo než samotný deferipron. Novou generaci tvoří deriváty deferipronu ve formě poléčiv (*Kalinowski et Richardson, 2005*).

Tachpyridin je hexadentální chelátor. Jeho nedostatkem je neselektivnost k Fe (*Kalinowski et Richardson, 2005*).

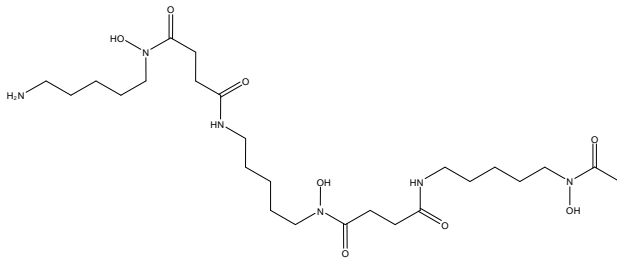
Významnou skupinu představují **aroylhydrazony: pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) a jeho další analogy** (série 100). PIH je orálně aktivní, tridentální chelátor (*Ponka et al., 1979*). Ve srovnání s DFO má PIH vysokou afinitu k Fe(III). Byla také prokázána jeho afinita k Fe(II), ta je však mnohem menší (*Vitolo et al., 1990*). PIH velmi dobře prostupuje do plazmy a přes mitochondriální membrány, kde chelatuje železo (*Ponka et al., 1979*).

Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) a jeho analogy (série 200). *In vitro* studie prokázaly stejnou či vyšší aktivitu mobilizovat Fe než PIH a jeho analogy. Byla prokázána také antiproliferativní aktivita SIH a jeho analogů proti různým typům nádorových buněk (*Richardson et al., 1995*).

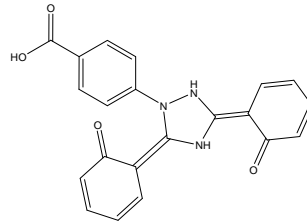
Série 300 má vyšší lipofilitu než série 100 a 200 díky inkorporaci 2-hydroxy-1-naftaldehydové skupiny (*Kalinowski et Richardson, 2005*) a nejlepší antiproliferativní aktivitu (*Richardson et al., 2005*).

Informace získané studiem biologické aktivity sérií těchto ligandů jsou využívány ve tvorbě řady nových chelátorů s potenciálem pro léčbu onemocnění s vysokou hladinou železa i rakoviny. Jsou to například: **analogy 2-pyridylkarboxaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (PCIH)** nebo **analogy di-2-pyridylketon isonikotinoyl hydrazonu (PKIH)** (*Kalinowski et Richardson, 2005*).

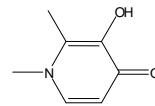
Posledním ze syntetických chelátorů, který byl popsán v literatuře, jsou **thiosemikarbazony**. Patří mezi první chelátory použité jako protinádorové látky. Tyto tridentální ligandy mají vysokou afinitu pro železo a další ionty jako je Cu(II), Ga(III), Co(II) a Zn(II). Komplexy s kovy mají často lepší aktivitu než volný chelátor. Nejlépe prostudovaným zástupcem je **triapin**. Neustále také probíhá výzkum chelátorů odvozených od thiosemikarbazonů a aroylhydrazonů (*Kalinowski et Richardson, 2005*).



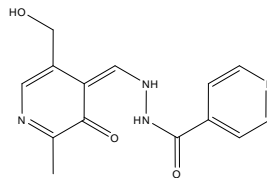
Deferoxamin (DFO)



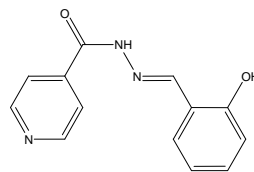
Deferasirox (ICL670A)



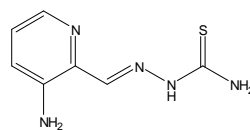
Deferipron (L1)



Pyridoxal isonikotinoyl hydrazone (PIH)



Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazone (SIH)



Triapin

Obr. 1: Chemické struktury nejdůležitějších chelátorů železa

1.4. Oxidační stres

Oxidační stres je definován jako nerovnováha, ve které převáží produkce ROS nad antioxidační ochranou (*Ott et al., 2007*). Patří mezi jednu z příčin podílejících se na rozvoji mnoha patologických změn v organismu, např. kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, diabetu, ischemicko-reperfuzního poškození tkání a řady dalších nemocí a také stárnutí (*Valko et al., 2007*). ROS jsou ale nezbytné i pro řadu procesů, ke kterým v buňkách dochází za fyziologických podmínek. Citlivost k oxidačnímu poškození může být proměnlivá. Po různě dlouhou dobu může buňka fungovat i za pozměněného redoxního stavu, aniž by došlo k poškození, a postupně se vrátí do stavu „normálního“. Příčiny změn redoxního stavu mohou působit pouze krátký čas nebo se vyskytují trvale. Nízká hladina oxidačního stresoru vede ke změnám buněčné proliferace, navíc může oxidační stres ovlivnit intracelulární komunikaci prostřednictvím „gap junctions“ (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Ve vysokých koncentracích se však ROS stává významným mediátorem poškození buněčné struktury (*Valko et al., 2007*). Často není možné určit prvotní cíl, protože se mechanismy vzájemně překrývají a doplňují. Prvotní cíl oxidačního stresu se liší i v závislosti na typu buňky, typu stresu a jeho síle (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.4.1. Poškození DNA

Oxidační poškození DNA způsobuje modifikaci purinových a pyrimidinových bází, deoxyribózové kostry nebo propojení s jinou molekulou („cross-linking“). Pozměněná struktura DNA se stává potenciálním mutagenem, přispívá ke vzniku rakoviny, k předčasnému stárnutí a k rozvoji degenerativních onemocnění (*Ott et al., 2007*).

Významným cílem ROS je mitochondriální DNA (mtDNA), která kóduje 13 polypeptidů, 22 transferových RNA (tRNA) a 2 ribozomální RNA (rRNA), které jsou všechny nezbytné pro transport elektronů a tvorbu ATP oxidační fosforylací. Projevuje se tak nedostatek ATP a NAD^+ (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Oxidační poškození vyvolané ROS je pravděpodobně hlavním zdrojem nestability mitochondriálního genomu, což vede v buňkách k respirační dysfunkci a také podpoře stárnutí (*Ott et al., 2007*).

1.4.2. Poškození proteinů

Hlavním mechanismem toxicity $O_2^{\cdot-}$ je přímá oxidace a inaktivace Fe-S proteinů, např. akonitázy, a současné zvýšení hladiny železa v daném kompartmentu. Vznik inaktivní skupiny $[3Fe-4S^+]$ způsobuje současný nárůst Fe^{2+} a H_2O_2 . Produkce Fe^{2+} a H_2O_2 , součástí Fentonovy a Haber-Weissovy reakce, tak vede k tvorbě silných hydroxylových radikálů, které mohou následně také oxidovat mitochondriální proteiny, DNA a lipidy a tím zesilují oxidační poškození vyvolané $O_2^{\cdot-}$. Mitochondriální akonitáza má klíčovou roli v Krebsově cyklu, katalyzuje přeměnu citrátu na isocitrát. Její inhibice tak vede k dysfunkci Krebsova cyklu a má vliv na produkci energie a životaschopnost buňky.

$O_2^{\cdot-}$ může inaktivovat i jiné Fe-S proteiny, jako NADH-dehydrogenázu komplexu I. Oxidované proteiny jsou rozpoznávány proteázami a následně degradovány. (*Ott et al., 2007*).

1.4.3. Poškození lipidů

Tvorba ROS a stimulace peroxidace lipidů v mitochondrii může vést až k zastavení jejího metabolismu. Peroxidy lipidů ovlivňují životní funkce mitochondrií, např. respiraci, oxidační fosforylaci, vlastnosti vnitřní membrány, udržování membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$) a kapacitu Ca^{2+} nárazníkového systému. Produkty peroxidace lipidů mohou měnit i ochranou bariérovou funkci membrán interakcí s jejími proteiny přímo nebo nepřímo interakcí s lipidy membrány (*Ott et al., 2007*).

Extrémně citlivé k oxidaci jsou polynenasycené mastné kyseliny residuí fosfolipidů. Vznikající peroxylové radikály (ROO^{\cdot}) se mění cyklizační reakcí na endoperoxidy (prekurzory malondialdehydu) a výsledným produktem peroxidace je malondialdehyd (MDA). Dalším významným produktem peroxidace lipidů je 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). MDA je mutagenní. HNE je mutagenní jen slabě, ale zřejmě hlavním toxickým produktem peroxidace lipidů (*Valko et al., 2007*).

1.4.4. Poruchy metabolismu iontů v buňkách

ROS mohou poškodit pohyb iontů různými způsoby:

- 1) ovlivněním redoxní regulace genů kódujících proteiny iontových kanálů,

- 2) ovlivněním redoxní regulace proteinů iontových kanálů samotných, např. oxidace nebo redukce thiolových skupin nebo nitrace tyroxinu modulující funkci kanálů,
- 3) sekundárním efektem, kdy změna aktivity jednoho iontového kanálu může způsobit otevření nebo uzavření jiného kanálu v důsledku nerovnováhy iontů a/nebo změn membránového potenciálu.

Oxidační stres může poškodit proteiny podílející se na udržení iontového gradientu mezi buňkami a extracelulárním prostředím. Na^+ , K^+ -ATPázový systém (též sodíková pumpa) plazmatické membrány využívá energii vznikající hydrolýzou ATP pro export Na^+ a import K^+ . Tento enzym obsahuje základní katalytické skupiny $-\text{SH}$, které jsou citlivé k oxidačnímu ataku, a je tak přímo inaktivován ROS. Draslíkové kanály jsou napadány RS a aldehydy produkovanými během peroxidace lipidů. K^+ kanály jsou nezbytné pro elektrickou aktivitu neuronů a srdečních buněk, nezbytné jsou i pro další buňky, např. T-lymfocyty, příčně pruhované svalstvo a buňky epitelu. Efekt ROS se liší v závislosti na kanálu i na konkrétním ROS, někdy se K^+ kanál otevře, jindy je jeho funkce inhibována.

Změna iontové rovnováhy buňky může způsobit i změny buněčného objemu, které vedou k poruchám funkce. Významným iontem je zde především vápník. Za normálních okolností je intracelulární hladina volného Ca^{2+} nízká. Vápník je uskladněn v mitochondriích a endoplasmatickém retikulu nebo navázán na proteiny cytoplazmy. Přechodné zvýšení hladiny volného Ca^{2+} reguluje řadu fyziologických procesů, jako je buněčná proliferace a uvolňování neurotransmiterů. Neregulovatelný růst intracelulární hladiny Ca^{2+} však vede k poškození buňky a jejímu zániku (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.4.5. Poškození mitochondrií a endoplasmatického retikula

Mitochondrie jsou považovány za hlavní intracelulární zdroj ROS a stávají se tak také primárním cílem ničivých efektů ROS (*Ott et al., 2007*).

Působením oxidačního stresu je poškozena regulace metabolismu Ca^{2+} , což vede ke zvýšení jeho hladiny. ROS poškozují systém vychytávání Ca^{2+} endoplasmatickým retikulem a oxidací $-\text{SH}$ skupin membránových kanálů zasahují do pohybu Ca^{2+} přes plazmatickou membránu (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). Nárůst mitochondriálního Ca^{2+} stimuluje další tvorbu ROS. Přímo nebo zvýšením oxidace NAD(P)H se tak zesilují signály podporující změnu permeability membrány (tzv. mitochondrial permeability transition - MPT). Za fyziologických podmínek je MPT vratný děj, díky kterému se mitochondrie stává volně

propustnou pro sloučeniny o molekulové hmotnosti větší než 1500 Da (*Lemasters et al., 1999*). MPT vede k otevření pórů vnitřní membrány a porušení membránového potenciálu. Když se sloučeniny (jako např. mitochondriální GSH a Ca^{2+}) uvolní póry z matrix, dochází k porušení osmotické rovnováhy a mitochondrie bobtná. Při MPT se zastaví syntéza ATP a celý proces vede k buněčné smrti (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

1.4.6. Buněčná smrt

Jestliže se buňka vyskytuje v prostředí, které je neslučitelné s její existencí, pak zaniká. Běžně se setkáváme se dvěma základními typy buněčné smrti, tedy smrtí katastrofickou či neprogramovanou (nekróza) a smrtí cílenou neboli programovanou (apoptóza) (*Nečas et al., 2000*). Zatímco nejčastějším induktorem apoptózy je slabý oxidační stres, vysoké hladiny ROS vedou k nekróze (*Hoidal, 2001*).

K **nekróze** dochází, pokud se současně projeví různé akutní formy poškození buňky. Jednou z prvních změn při nedostatku kyslíku nebo při inhibici metabolismu je tvorba výčnělků plasmatické membrány, označovaných v angličtině jako blebs. Tyto „bleby“ obsahují cytosol a endoplazmatické retikulum, ale neobsahují větší orgány, jako jsou mitochondrie.

Až do tohoto okamžiku je buněčné poškození reverzibilní. Ireverzibilním se stává v okamžiku, kdy výčnělek plasmatické membrány praskne. Dochází k poruše permeability plasmatické membrány, k uvolnění intracelulárních enzymů a metabolitů a ke kolapsu elektrického a iontového gradientu membrány (*Lemasters et al., 1999*). Konečným procesem bývá nejčastěji rozložení buněčných struktur a makromolekul enzymy, které se uvolní z lysozomů (autolýza buňky) (*Nečas et al., 2000*). K ruptuře membrány hepatocytů, myocytů a sinusoidálních buněk endotelu dochází až po přechodu do metastabilního stavu (*Lemasters et al., 1999*).

Dochází-li k nekróze buněk v mnohobuněčném organismu, reaguje okolní tkáň zpravidla zánětlivou reakcí (*Nečas et al., 2000*).

Apoptóza, aktivní, geneticky regulovaná forma buněčné smrti, je součástí buněčného zániku během organogeneze i kontroly buněčné proliferace a diferenciace v již hotové tkáni, stejně jako během patogeneze různých onemocnění (*Gogvadze et al., 2006*). Apoptóza není narozdíl od nekrózy doprovázena zánětem, jizvením a uvolňováním buněčného obsahu

(*Lemasters et al., 1999*). Tato forma buněčné smrti je závislá na ATP, který je za normálních aerobních podmínek tvořen v mitochondriích (*Sardao et al., 2007*).

Během apoptózy se jednotlivé buňky izolují od svého nejbližšího okolí a poté je zahájen charakteristický sled strukturních a biochemických změn. Ty zahrnují buněčné smršťování, změny lipidů plazmatické membrány, kondenzaci chromatinu, degradaci internukleozomální DNA a uvolňování na membránu navázaných částic cytoplazmy obsahujících ultrastrukturální organely a chromatin. Apoptotická tělíska jsou vychytávána sousedními buňkami a makrofágy.

Také v procesu apoptózy se uplatňuje MPT. Narozdíl od nekrózy, kdy dochází při silném náporu MPT k nedostatku ATP, se apoptóza rozvíjí za situace, kdy je MPT přítomno bez vyčerpání ATP (*Lemasters et al., 1999*).

Klíčovou rolí v regulaci apoptózy hrají mitochondrie. Přesněji, uvolňování různých proapoptotických proteinů, které jsou za normálních okolností přítomné v intermembránovém prostoru těchto organel, bylo pozorováno v časných stádiích apoptózy. Mezi tyto proteiny patří složka mitochondriálního řetězce, cytochrom c, ten interaguje s molekulou Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), což vede k řetězci dalších reakcí končících apoptózou (*Gogvadze et al., 2006*).

Ve tkáních poškozených ischemií, toxickými chemikáliemi nebo virovou infekcí se často současně objevuje jak apoptóza tak nekróza. Bylo zjištěno, že přítomnost obou typů buněčné smrti se nemusí projevit jen ve stejné tkáni, ale dokonce i v jedné buňce. Nový pojem, **nekroptóza**, byl použit pro zdůraznění procesu, který začíná běžným signálem nebo toxickým stresem, pokračuje dílčími drahami a vrcholí lýzou buňky (nekrozou) nebo programovanou resorpcí (apoptózou) v závislosti na modifikujících faktorech (*Lemasters et al., 1999*).

2. Cíle diplomové práce

- Studium potenciálních protektivních účinků nové série chelátorů železa odvozených od salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) na buněčné linii potkaních embryonálních kardiomyoblastů H9c2 vystavené oxidačnímu stresu vyvolaného působením 200 μ M t-BHP
- Charakterizace vlastní cytotoxicity této série nových látek při krátkodobé (24 hodin) a dlouhodobé (72 hodin) inkubaci H9c2 buněk
- Porovnání a rozbor protektivních a toxických vlastností nové série chelátorů železa a jejich srovnání s vlastnostmi referenční látky - SIH

3. Metodická část

3.1. Přístrojové vybavení

3.1.1. Zařízení pro sterilní práci a kultivaci buněčné linie H9c2

- vodní lázeň Memmert WB 14 LV (Memmert, Německo)
- box s laminárním prouděním Aura 2000 m.a.c. s třídou biohazardu A (BioAir, Itálie)
- buněčný inkubátor s termostatem a regulací koncentrace CO₂ Forma Scientific CO₂ incubator, model 311 (Forma Scientific, USA)
- plastové sterilní kultivační nádoby T75, Petriho misky 150 mm, 96-jamkové a 12-jamkové mikrotitrační kultivační destičky s plochým dnem (Gama, Česká republika)
- laboratorní sklo sterilní (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- plastové sterilní zkumavky o různém objemu (TPP, Švýcarsko)
- mikrozkušavky 0,5 a 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- pipetky Eppendorf easypet (Eppendorf, Německo) a BioHit midi plus (Biohit, Finsko)
- sérologické sterilní pipety různého rozsahu (TPP, Švýcarsko)
- automatické pipety Eppendorf research různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- pipeta elektronická 8-kanálová e-PET BioHit 50-1200 µl (Biohit, Finsko)
- sterilní špičky různého rozsahu (Memmert, Německo)

3.1.2. Invertovaný epifluorescenční mikroskop

Pro mikroskopii na fázovém rozhraní a fluorescenční mikroskopii byl použit invertovaný mikroskop Nikon Eclipse TS 100 s objektivem Nikon 10x/0,25 (Nikon, Japonsko). Fotografie byly pořízeny kamerou COOL-1300Q (VDS Vosskuhler, Německo) se softwarem NIS-Elements AR 2.20 (Laboratory Imaging, Česká republika) a se zdrojem UV Nikon S-CHG se rtuťovou lampou a filtry Texas Red (TxR), FITC a DAPI (Nikon, Japonsko).

3.1.3. Čtečka 96-jamkových mikrotitračních destiček

Pro spektrofotometrická stanovení byla použita čtečka Infinite M 200 s optickým hranolem (Tecan, Rakousko).

3.1.4. Ostatní laboratorní vybavení

- analytické váhy ScalTec SBC 22
- laboratorní třepačky vortex (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- plastové zkumavky o různém objemu (TPP, Švýcarsko)
- mikrozukavky 0,5 a 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- automatické pipety Eppendorf research různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- špičky různého objemu (Eppendorf, Německo; BioHit, Finsko)

3.2. Reagencie a chemikálie

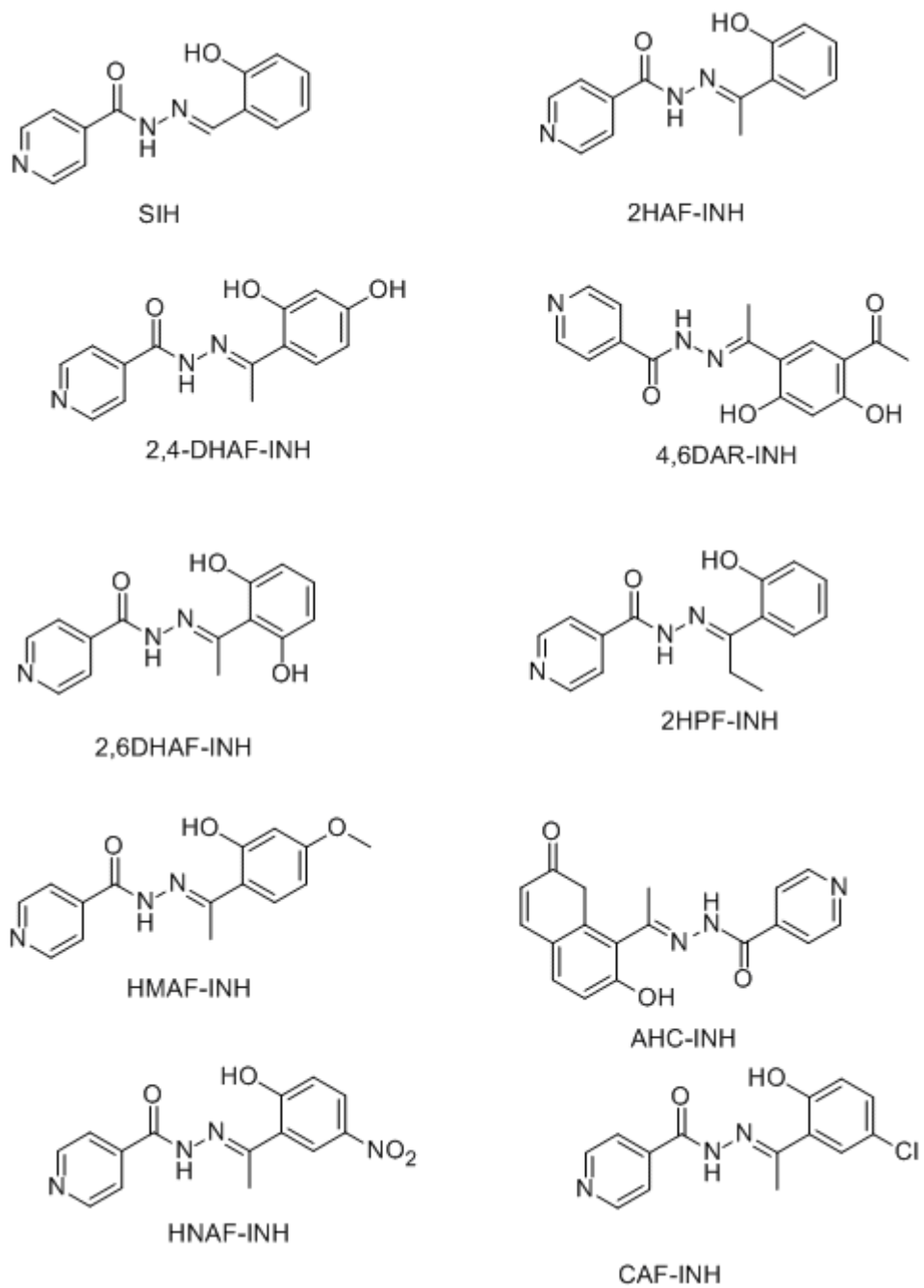
- ADS pufr o pH 7,4 (NaCl 116 mM, KCl 5,3 mM, MgSO₄·7 H₂O 1,2 mM, 1,13 mM, HEPES 20 mM)
- dimethylsulfoxid ≥ 99,9% (DMSO, Sigma)
- etanol absolutní p.a. ≥ 99,9% (Penta, Česká republika)
- formaldehyd 36,3% (Penta)
- Fosfátový pufr tablety (PBS, Sigma)
- kyselina octová ledová p.a. ≥ 99,9% (Penta)
- neutrální červeň roztok 3,3 g/l (Sigma)
- peroxid vodíku 3% roztok (H₂O₂, Fluka)
- salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH, prof. P. Ponka, McGill University, Kanada)
- Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
- propidium iodid (PI, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
- tert-buthylhydroperoxid 70% roztok (t-BHP, Sigma)
- trypanová modř (Sigma)
- ultradestilovaná voda (MQ, přístroj Milli-Q RG, Millipore, Česká republika)
- (E)-N`-(1-(2-hydroxy-7-oxo-7,8-dihydronaftalen-1-yl)ethyliden)isonikotinohydrazid (AHC-INH, katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (E)-N`-(1-(5-chloro-2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid (CAF-INH, katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)

- (E)-N`-(1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid (2-HAF-INH, katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (E)-N`-(1-(2-hydroxyfenyl)propyliden)isonikotinohydrazid (2-HPF-INH, katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova))
- (E)-N`-(1-(2,4-dihydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid (2,4-DHAF-INH, katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (E)-N`-(2,6-dihydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid (2,6-DHAF-INH, katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (E)-N`-(1-(5-acetyl-2,4-dihydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid (4,6-DAR-INH, katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (E)-N`-(1-(2-hydroxy-4-methoxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid (HMAF-INH, katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (E)-N`-(1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid (HNAF-INH, katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)

Struktura a čistota látek připravených na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty byla potvrzena ^1H a ^{13}C NMR spektry (Varian Mercury-Vx BB 300) a infračervenými spektry (Nicolet Impact 4), teploty tání byly měřeny pomocí přístroje Büchi B-545.

Pro přípravu všech reagentů a pracovních roztoků byla použita ultradestilovaná voda, výjimkou jsou zásobní roztoky chelátorů železa (AHC-INH, CAF-INH, 2-HAF-INH, 2-HPF-INH, 2,4-DHAF-INH, 2,6-DHAF-INH, 4,6-DAR-INH, HMAF-INH, HNAF-INH a SIH), které byly připraveny v DMSO.

Všechny pracovní roztoky byly připravovány ad hoc. Zásobní roztoky chelátorů byly po přípravě zamrazeny (-25°C), aby se předešlo kontaminaci vzdušnou vlhkostí z prostředí.



Obr 2: Chemické struktury salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) a od něj odvozených nových aroylhydrazonových chelátorů železa.

3.3. In vitro cytotoxicitní experimenty

3.3.1. Buněčná linie H9c2

Veškeré pokusy byly prováděny s použitím buněčné linie H9c2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), která byla odvozena z embryonálních potkaních srdečních myoblastů. H9c2 je nenádorová linie, kterou stále častěji používá řada laboratoří jako relevantní *in vitro* model srdeční tkáně. Její hlavní výhodou je pasážovatelnost a tím i snadná dostupnost velkého počtu buněk.

3.3.2. Reagencie a kultivační média

- Dulbecco Modified Eagle`s Medium (DMEM, BioWhitaker nebo Sigma)
- fetální bovinní sérum (FBS, Lonza, Belgie)
- fosfátový pufr tablety (PBS, Sigma)
- HEPES roztok 1M (Sigma)
- penicilin-streptomycin 100x koncentrovaný roztok (P/S, používaný v koncentraci 10 000 jednotek/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu, Lonza)
- trypsin-EDTA 10x koncentrovaný roztok (používaný jako 0,5% trypsin a 0,02%EDTA roztok, Lonza)

Zásobní roztoky P/S a trypsin-EDTA byly před použitím naředěny PBS. Všechny roztoky byly uchovávány v chladu a pracovalo se s nimi v aseptickém prostředí.

3.3.3. Kultivace, pasážování a práce s buněčnou linií H9c2

Buňky byly kultivovány ve sterilních plastových kultivačních nádobách T75 nebo na Petriho miskách. Kultivace byla prováděna s DMEM obsahujícím pyruvát (BioWhitaker), ke kterému bylo přidáno 10% FBS, 1% HEPES a 1% P/S. Pro oplach buněk před pasážováním byl používán PBS pufr. Kultivační nádoby s buňkami byly po celou dobu uchovávány v termostatu při 37°C a v prostředí tvořeném z 95% vzduchem a 5% CO₂. Pro zachování morfologických vlastností buněk se pravidelně každý 3. -4. den, kdy bylo dosaženo asi 80 - 90% konfluence, prováděla pasáž.

Buňky byly nasazovány na 96-jamkové kultivační destičky v počtu 10 000 na jamku. 24 hodin po nasazení bylo nutné provést výměnu média s obsahem FBS za médium bezsérové (SFM), tvořeného DMEM neobsahujícím pyruvát (Sigma), 1% HEPES a 1% P/S. Výměna byla provedena z toho důvodu, že růstové faktory obsažené v FBS stimulují proliferaci buněk H9c2 a tím by mohlo dojít ke zkreslení výsledků kombinací cytotoxického a antiproliferativního působení studovaných látek. Takto byly buňky před vlastními experimenty inkubovány dalších 24 hodin.

3.3.4. Stanovení počtu živých buněk počítáním na Bürkerově komůrce

Počet živých buněk byl zjišťován počítáním na Bürkerově komůrce, na kterou byla aplikována směs buněk v 0,2 % roztoku trypanové modři. Využívá se zde schopnosti živých buněk odstraňovat ze svého nitra trypanovou modř, která sem samovolně prostoupila. Na modrém pozadí tak v mikroskopu jasně vidíme světlé kulovité útvary - živé buňky. Mrtvé buňky mají barvu stejnou jako pozadí, a proto je lze snadno odlišit.

Buňky byly před vlastním stanovením inkubovány po dobu pěti minut se stejným objemem 0,4% roztoku trypanové modři. Na obě počítací plochy Bürkerovy komůrky se tato směs nanasla v množství 10 μ l. Výsledný součet v 10 čtvercích vynásobený 2000 se rovnal počtu buněk v 1 ml suspenze.

3.4. Uspořádání pokusů

Pro vlastní pokusy, tedy stanovení protekce nebo toxicity, byly buňky nasazeny na 96-jamkovou destičku s plochým dnem v koncentraci 10 000 buněk na jamku ve 100 μ l DMEM s 10% FBS vždy 48 hodin před vlastním experimentem. Suspenze pro nasazení na 96-jamkovou destičku byla získána ředěním základní suspenze, u které se stanovil počet buněk na Bürkerově komůrce.

Médium se sérem bylo vyměněno 24 hodin po nasazení za 200 μ l SFM a totéž se opakovalo i před vlastním pokusem. Inkubace s touto směsí trvala 24 nebo 72 hodin, poté následovalo stanovení buněčné životaschopnosti.

Pro fotografickou dokumentaci byly buňky nasazeny na 12 jamkovou kultivační destičku v koncentraci 75 000 buněk na jamku v 1 ml sérového média. Suspenzi pro nasazení na 12 jamkovou destičku jsme opět získali zředěním základní suspenze po určení počtu buněk

na Bürkerově komůrce. Po 24 hodinách bylo médium vyměněno za 1 ml SFM a po dalších 24 hodinách za 1 ml SFM se stanovovanými látkami. Fotografie byly pořízeny po ukončení 24-hodinové inkubace se stanovovanými látkami. Fluorescenční sondy byly k buňkám přidány v době experimentu, kdy bylo SFM vyměněno za čirý a nefluoreskující ADS pufr.

3.5. Statistické analýza a výpočty hodnot EC_{50} a IC_{50}

Pro statistickou analýzu dat byl použit software SigmaStat for Windows verze 3.0.1. (SPSS, USA). Pro analýzu variability dat byla použita metoda One Way ANOVA.

Pro stanovení hodnot IC_{50} (koncentrace studovaného chelátoru, při které dochází k 50% snížení buněčné životaschopnosti oproti kontrole) a EC_{50} (koncentrace studovaného chelátoru, při které dochází k protekci na 50% kontrolních hodnot) a byl použit software CalcuSyn verze 2.0 (Biosoft, Velká Británie).

3.6. Studium protekce buněk H9c2 novými chelátory železa před modelovým oxidačním poškozením

Stanovení protektivního účinku jednotlivých koncentrací chelátorů bylo provedeno po 24-hodinové koinkubaci buněk se vzrůstající koncentrací chelátoru a 200 μ M t-BHP na 96-jamkové destičce s plochým dnem. Pracovní roztoky chelátorů (100, 10 a 1 mM roztoky v DMSO) byly k buňkám přidány společně se SFM a dodržení 0,1% finální koncentrace DMSO u všech experimentálních i kontrolních skupin. Pracovní roztok t-BHP byl poté pipetován do jednotlivých jamek přímo.

Schéma pokusu: 1x slepý vzorek (negativní kontrola viability - buňky inkubované s 3 mM H_2O_2), 4x kontrola (100% viabilita), 1x 200 μ l t-BHP a vzrůstající koncentrace chelátorů (μ M): 0,3; 1; 3; 10; 30; 100.

3.7. Stanovení vlastní toxicity nových chelátorů železa

Stanovení vlastní toxicity studovaných látek bylo prováděno po 24- a 72-hodinových inkubacích buněk s chelátory na 96-jamkových destičkách. Pracovní roztoky chelátorů se přidávaly k buňkám spolu se SFM a DMSO (0,1 %). Pro hodnocení toxicity za 24 hodin byly všechny chelátory aplikovány v jednotné koncentraci 100 μ M (maximální dosažitelná

koncentrace pro rozpuštění všech chelátorů) a tyto experimenty byly prováděny současně s hodnocením cytoprotekce.

Pro zhodnocení dlouhodobé toxicity (inkubace 72 h) byla použita řada zvyšujících se koncentrací chelátorů. Schéma pokusu: 1x slepý vzorek, 5x kontrola a vzrůstající koncentrace chelátoru (μM): 0,3; 1; 3; 10; 30; 100.

3.8. Stanovení životaschopnosti buněk H9c2 pomocí vychytávání neutrální červeně

Životaschopnost buněk byla stanovována spektrofotometrickým měřením absorbance roztoku neutrální červeně na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M 200. Princip stanovení je založen na skutečnosti, že živé buňky vychytávají neutrální červeně z média do lysozomů, zatímco mrtvé buňky nikoliv. Po lýze buněk se neutrální červeně uvolňuje do roztoku a její množství tak odpovídá počtu živých buněk.

Po ukončení inkubace (24 nebo 72 hodin), bylo z jamek mikrotitrační destičky odsáto 100 μl média a přidáno 100 μl roztoku neutrální červeně (80 $\mu\text{g/ml}$), tak aby výsledná koncentrace neutrální červeně byla 40 $\mu\text{g/ml}$. Následovala tříhodinová inkubace v termostatu při 37°C v prostředí 95% vzduchu a 5% CO_2 . Po třech hodinách bylo odstraněno veškeré médium a do jamek bylo přidáno 100 μl fixačního roztoku (1% roztok CaCl_2 v 0,5% formaldehydu). Inkubace s fixačním roztokem při pokojové teplotě trvala 15 minut. Po uplynutí dané doby byl roztok odstraněn a buňky byly dvakrát opláchnuty 50 μl PBS. Následně byly buňky inkubovány s 200 μl lyzačního roztoku (1% ledové kyseliny octové v 50% etanolu) 15 minut při pokojové teplotě a dalších 15 minut třepány na třepáče při teplotě 25°C. Poté byla odečtena absorbance při 540 nm. Od naměřených hodnot absorbance byla odečtena hodnota slepého vzorku. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta kontroly (kontrola = 100% životaschopných buněk). Slepý vzorek byl průměrem hodnot absorbance naměřených v jamkách, do kterých byl k buňkám přidán roztok H_2O_2 (finální koncentrace 3 mM).

3.9. Fotografická dokumentace protektivních účinků chelátorů na buňkách H9c2

3.9.1. Metody fotografické dokumentace

Fotografická dokumentace byla pořízena za pomoci fluorescenční mikroskopie se sondami Hoechst 33342 a propidium jodidem s použitím 10x objektivu.

Buňky pro dokumentaci byly připraveny podle již zmíněného schématu a inkubovány po dobu 24 hodin se studovanou látkou.

Hoechst 33342 je modře fluorescenční sonda ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$), která barví buněčná jádra. Pomocí této sondy lze identifikovat i apoptotické buňky, u kterých došlo ke kondenzaci chromatinu a právě kondenzovaný chromatin vykazuje intenzivnější zbarvení. Propidium jodid (PI) je červené barvivo vážící se na DNA ($\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 630 \text{ nm}$). PI není schopen prostupovat plazmatickou membránou živých buněk, ale prochází do nekrotických, případně pozdně apoptotických buněk a barví jejich jádra, což se projeví jako červená fluorescence.

3.9.2. Inkubace H9c2 buněk s fluorescenčními sondami Hoechst 33342 a PI

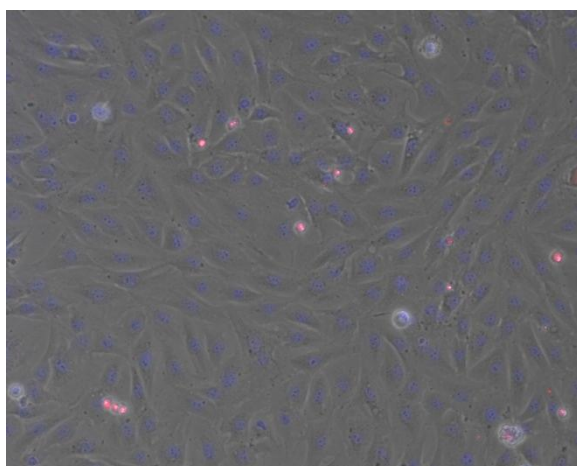
Po 24 hodinové inkubaci se studovanou látkou bylo buňkám odebráno SFM a vyměněno za 1 ml ADS pufru s $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Hoechst 33342 a $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PI. S touto směsí byly buňky inkubovány 15 minut při pokojové teplotě.

4. Výsledky

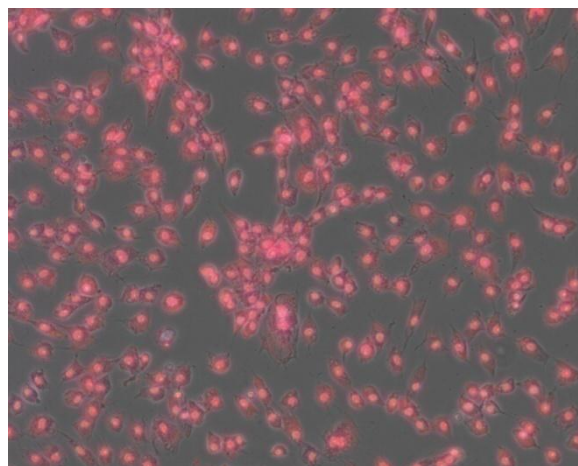
4.1. Fotografická dokumentace

Porovnání protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením 200 μM t-BHP pomocí SIH a 2-HAF-INH

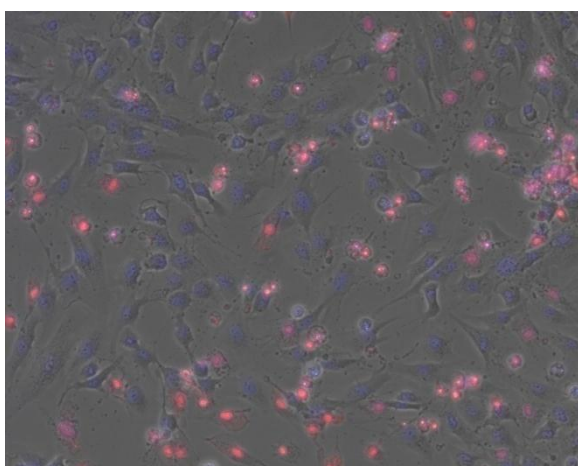
Na fotografiích buněk značených sondami Hoechst 33342 (modrá fluorescence) a PI (červená fluorescence) pořízených po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s oxidačně působícím t-BHP a 10 a 30 μM koncentracemi chelátorů železa SIH a 2-HAF-INH je jasně viditelná dávkově závislá ochrana buněk. Fotografie ukazují ochranu buněk při použití již dříve testovaného chelátoru železa SIH a nového chelátoru železa 2-HAF-INH, u kterého byly ve srovnání se SIH prokázány lepší protektivní účinky před oxidačním poškozením. Tmavě modrou fluorescenci vykazuje chromatin v jádrech živých buněk, světle modré kulovité útvary představují buňky v časném stádiu apoptózy, červená fluorescence naopak označuje jádra buněk nekrotických, případně pozdně apoptotických. Chelátor železa 2-HAF-INH měl v koncentraci 10 μM (obr. 4.3.b) zřetelně vyšší protektivní účinky než SIH (obr. 4.3.a), u koncentrace 30 μM použitého chelátoru jsou již výsledky protekce obou látek srovnatelné (obr. 4.4.a, 4.4.b) Pro srovnání výsledků protekce byly použity fotografie kontrolních buněk (bez přidaných látek) (obr. 4.1.) a buněk inkubovaných se samotným t-BHP (obr. 4.2.).



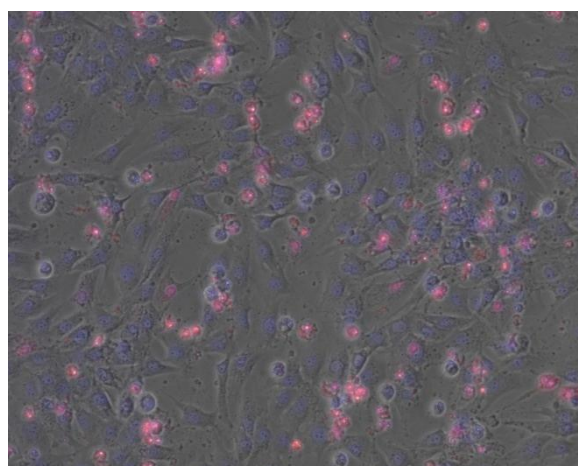
Obr. 4.1.: Kontrolní buňky po 24 hodinách.



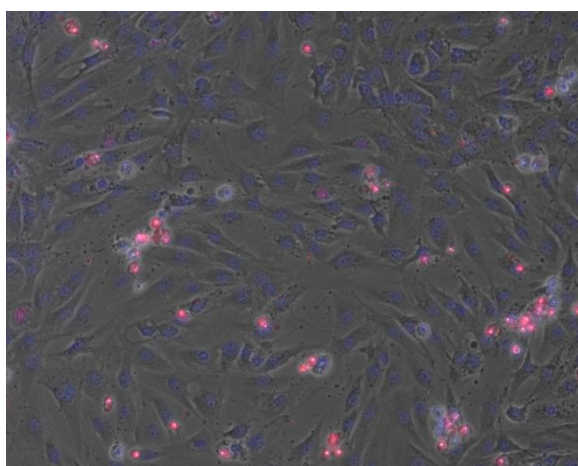
Obr. 4.2.: H9c2 buňky inkubované 24 hodin s 200 μM t-BHP



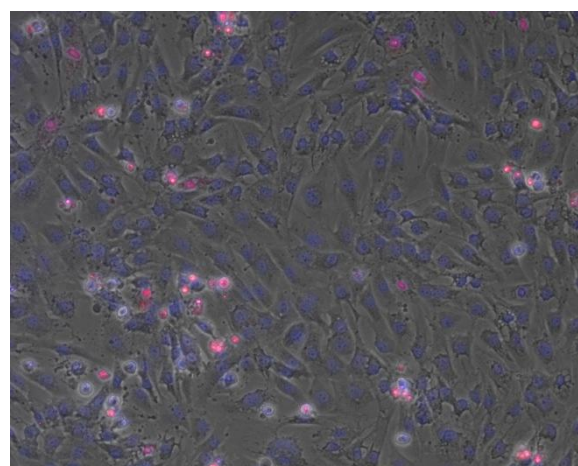
Obr. 4.3.a: H9c2 buňky koinkubované
24 hodin s 200 μM t-BHP a 10 μM SIH
INH



Obr. 4.3.b: H9c2 buňky koinkubované
24 hodin s 200 μM t-BHP a 10 μM 2-HAF-
INH



Obr. 4.4.a: H9c2c buňky koinkubované
24 hodin s 200 μM t-BHP a 30 μM SIH

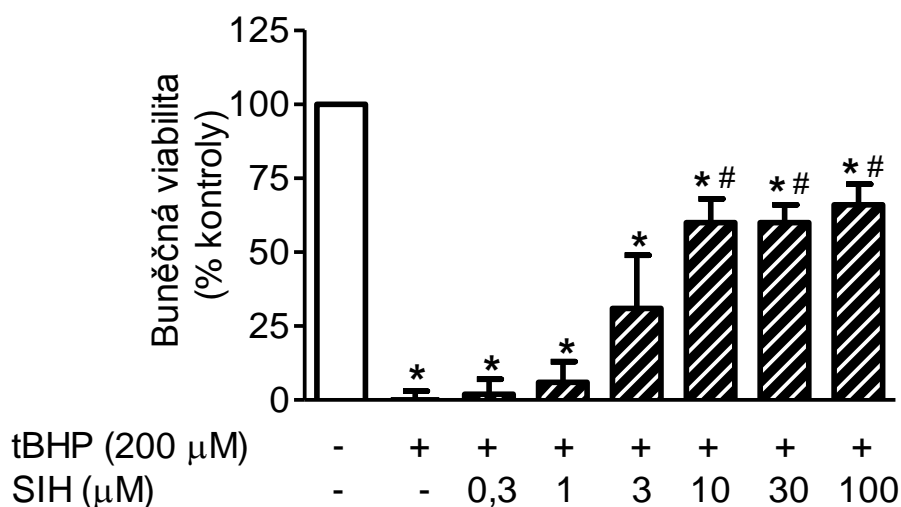


Obr. 4.4.b: H9c2 buňky koinkubované 24
hodin s 200 μM t-BHP a 30 μM 2-HAF-INH

4.2. Studium účinků chelátoru železa SIH

4.2.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP a vzrůstající koncentrací chelátoru železa SIH byla za použití testu vychytávání neutrální červeně zjištěna statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením a následnou buněčnou smrtí. Statisticky významné zvýšení buněčné viability bylo pozorováno od koncentrace 10 μM SIH. Hodnota EC_{50} (koncentrace SIH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla vypočtena 18,2 μM (tab. 5.1.). Maximální protekce při vystavení buněk 200 μM t-BHP bylo dosaženo při použití nejvyšší koncentrace SIH (100 μM), kdy bylo dosaženo 66% úrovně viability kontrolních buněk (100%).

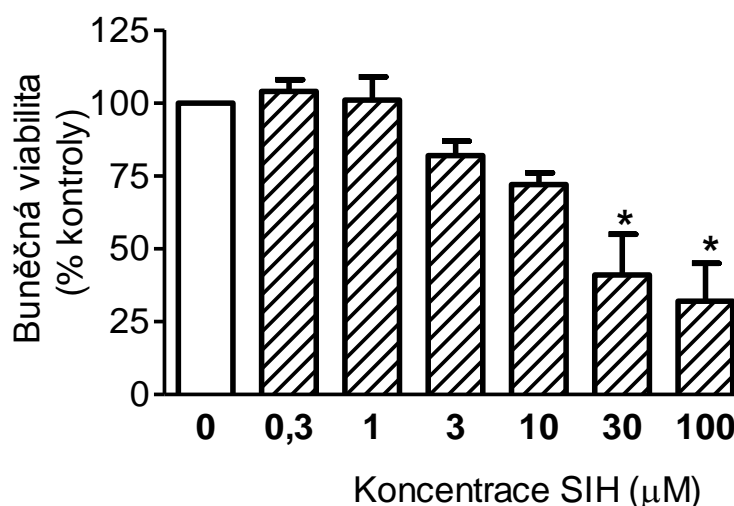


Obr. 4.5.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací SIH (0,3 - 100 μM).

N = 6 experimentů. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP pak symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.2.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s chelátorem SIH v koncentraci 100 μM byl pozorován statisticky významný pokles viability na 55% kontrolních hodnot (obr. 5.2.). Po 72 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací SIH bylo pozorováno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability při 3 μM a 10 μM koncentraci SIH. Následovalo výrazné a statisticky významné snížení viability buněk při použití koncentrací 30 μM a 100 μM . Hodnota IC_{50} (koncentrace SIH, která způsobila snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla stanovena 29,7 μM (tab. 5.1.).



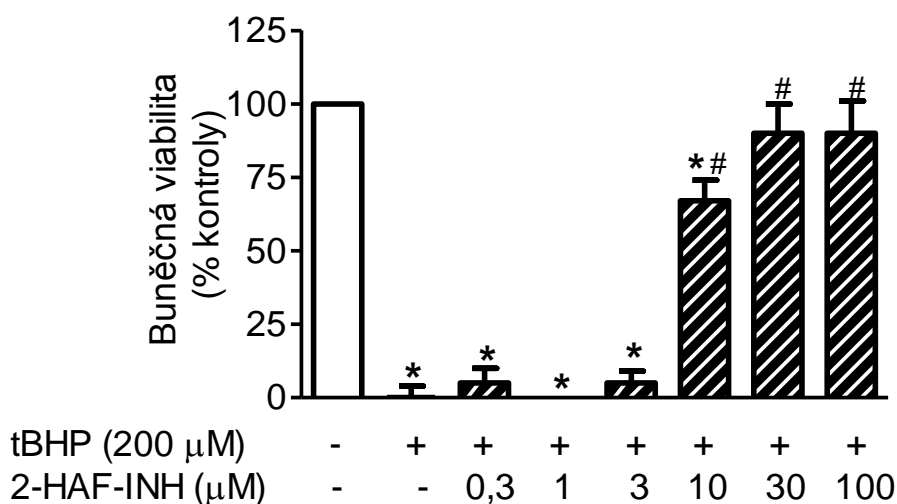
Obr. 4.6.: Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím SIH

N = 5 experimentů. Statisticky významně odlišné výsledky oproti kontrolní skupině (ANOVA, $P < 0,01$) jsou označeny symbolem *. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.3. Studium účinků chelátoru železa 2-HAF-INH

4.3.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Za použití testu vychytávání neutrální červeně byla po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP a vzrůstající koncentrací chelátoru železa 2-HAF-INH zaznamenána statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením následovaným buněčnou smrtí. Od koncentrace 10 μM 2-HAF-INH bylo pozorováno statisticky významné zvýšení viability. Hodnota EC_{50} (koncentrace 2-HAF-INH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla vypočtena 11,4 μM (tab. 5.1.). Maximální protekce při působení 200 μM t-BHP bylo dosaženo při použití koncentrace 2-HAF-INH 30 μM , kdy bylo dosaženo 90% úrovně viability kontrolních buněk (100%).

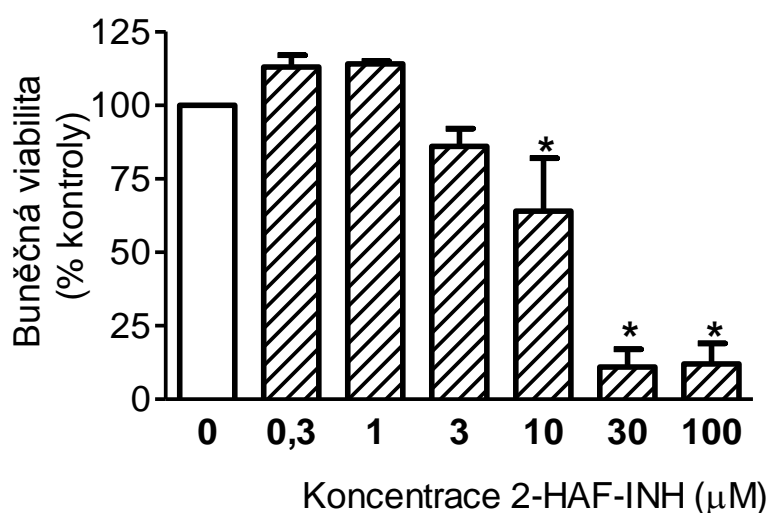


Obr. 4.7.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací 2-HAF-INH (0,3 - 100 μM).

N = 3 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP pak symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.3.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s chelátorem 2-HAF-INH o koncentraci 100 μM nebyl pozorován žádný pokles viability (obr. 5.2.). Po ukončení 72 hodinové inkubace H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací 2-HAF-INH bylo zjištěno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability při 3 μM koncentraci 2-HAF-INH. Následovalo statisticky významné snížení viability buněk při použití koncentrace 10 μM a k výraznému poklesu viability došlo po použití 30 μM a 100 μM 2-HAF-INH. Hodnota IC_{50} (koncentrace 2-HAF-INH, která způsobila snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla stanovena 12,2 μM (tab. 5.1.).



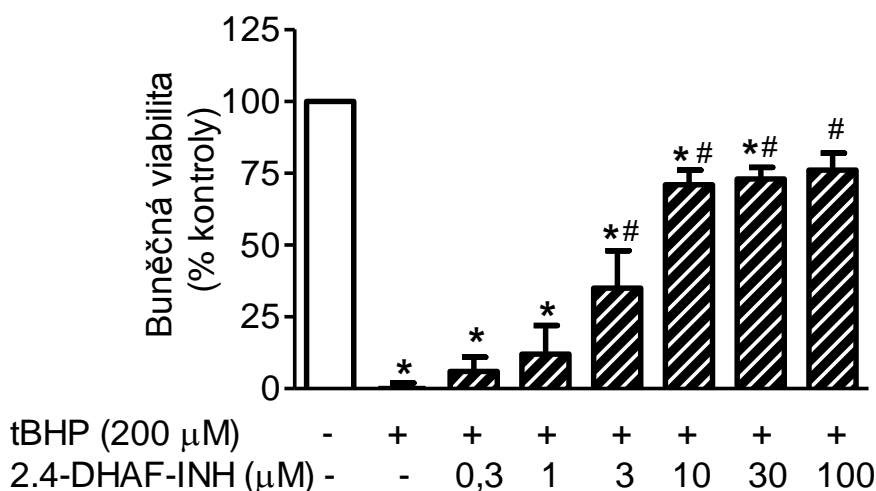
Obr. 4.8.: Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím 2-HAF-INN

N = 3 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA, $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.4. Studium účinků chelátoru železa 2,4-DHAF-INH

4.4.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Za použití testu vychytávání neutrální červeně byla potvrzena statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením a následnou buněčnou smrtí po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP a vzrůstající koncentrací chelátoru železa 2,4-DHAF-INH. Statisticky významné zvýšení buněčné viability bylo pozorováno od koncentrace 3 μM 2,4-DHAF-INH. Hodnota EC_{50} (koncentrace 2,4-DHAF-INH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla stanovena 9,2 μM (tab. 5.1.). Maximální protekce při vystavení buněk 200 μM t-BHP bylo dosaženo při použití nejvyšší koncentrace 2,4-DHAF-INH (100 μM), kdy bylo dosaženo 76% úrovně viability kontrolních buněk (100%).

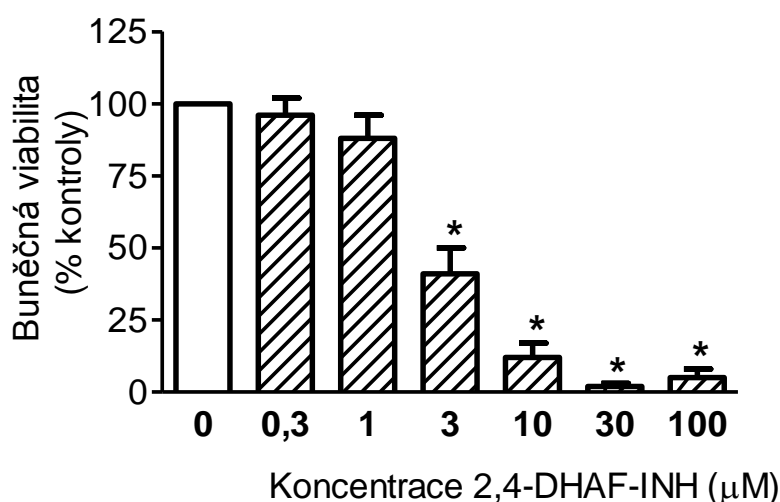


Obr. 4.9.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací 2,4-DHAF-INH (0,3 - 100 μM).

N = 5 experimentů. Statisticky významně odlišné výsledky oproti kontrolní skupině (ANOVA; $P < 0,01$) jsou vyznačeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP potom symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.4.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s chelátorem železa 2,4-DHAF-INH o koncentraci 100 μM došlo k poklesu viability na 77% kontrolních hodnot, nejedná se o statisticky významné snížení. Mírného a statisticky nevýznamného snížení buněčné viability po 72 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací 2,4-DHAF-INH bylo dosaženo při 1 μM koncentraci 2,4-DHAF-INH, výrazné a statisticky významné snížení viability buněk bylo zaznamenáno při použití 3 μM 2,4-DHAF-INH a koncentrací vyšších. Hodnota IC_{50} (koncentrace 2,4-DHAF-INH, která způsobila snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla stanovena 2,6 μM (tab. 5.1.).



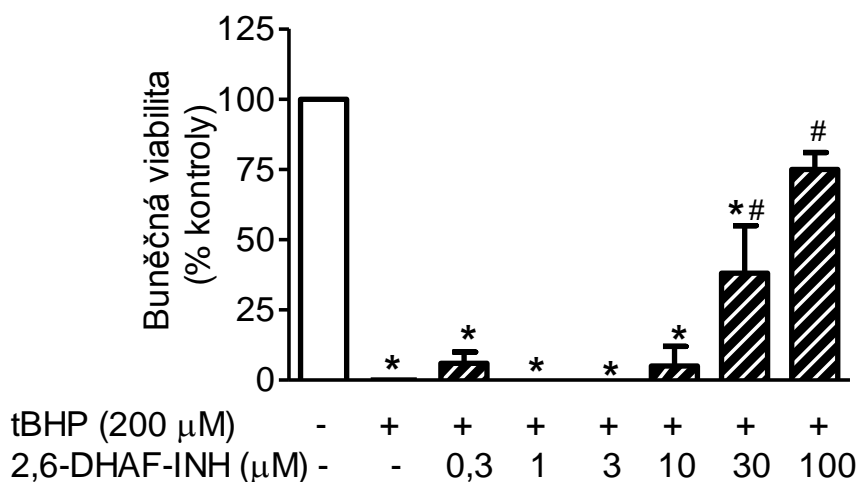
Obr. 4.10.: Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím 2,4-DHAF-INH

N = 3 experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou. Statisticky významně odlišné výsledky oproti kontrolní skupině (ANOVA, $P < 0,01$) jsou označeny symbolem *.

4.5. Studium účinků chelátoru železa 2,6-DHAF-INH

4.5.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací chelátoru železa 2,6-DHAF-INH a s 200 μM t-BHP byla za použití testu vychytávání neutrální červeně zjištěna statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením následovaným buněčnou smrtí. Statisticky významné zvýšení viability bylo pozorováno od koncentrace 30 μM 2,6-DHAF-INH. Hodnota EC_{50} (koncentrace 2,6-DHAF-INH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla stanovena 48,3 μM (tab. 5.1.). Maximální protekce při působení 200 μM t-BHP bylo dosaženo při použití nejvyšší koncentrace 2-HAF-INH 100 μM , kdy bylo dosaženo 75% úrovně viability kontrolních buněk (100%).

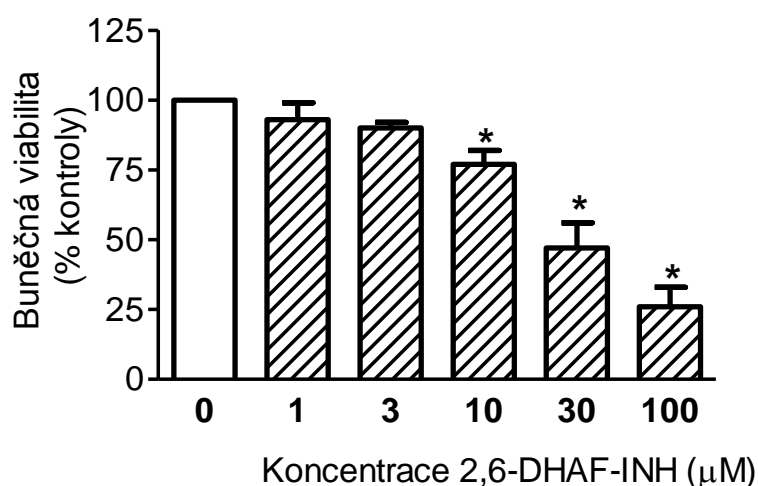


Obr. 4.11.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací 2,6-DHAF-INH (0,3 - 100 μM).

N = 5 experimentů. Statisticky významně odlišné výsledky oproti kontrolní skupině (ANOVA; $P < 0,01$) jsou vyznačeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP potom symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.5.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s chelátorem 2,6-DHAF-INH v koncentraci 100 μM byl pozorován statisticky nevýznamný pokles viability na 79% kontrolních hodnot (obr. 5.2.). Po 72 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací 2,6-DHAF-INH bylo zjištěno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability při koncentraci 2,6-DHAF-INH 1 μM a 3 μM . Výrazného a statisticky významného snížení viability buněk bylo dosaženo při použití 10 μM 2,6-DHAF-INH a koncentrací vyšších. Hodnota IC_{50} (koncentrace 2,6-DHAF-INH, která způsobila snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla stanovena 31,2 μM (tab. 5.1.).



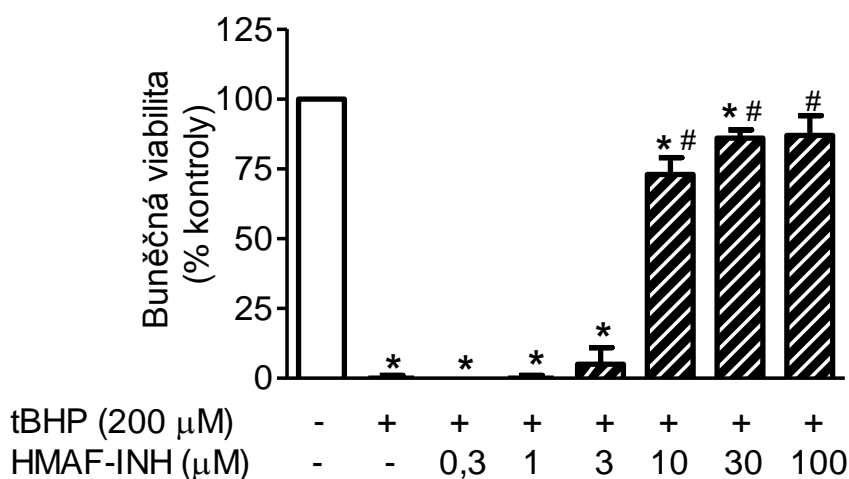
Obr. 4.12.: **Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím 2,6-DHAF-INH**

N = 4 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA, $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.6. Studium účinků chelátoru železa HMAF-INH

4.6.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP a vzrůstající koncentrací chelátoru železa HMAF-INH byla zaznamenána statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením, které je následováno buněčnou smrtí. Pro hodnocení byl použit test vychytávání neutrální červeně. Statisticky významného zvýšení viability bylo dosaženo od koncentrace 10 μM HMAF-INH. Hodnota EC_{50} (koncentrace HMAF-INH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla vypočtena 21,2 μM (tab. 5.1.). Maximální protekce při působení 200 μM t-BHP bylo dosaženo při použití nejvyšší koncentrace HMAF-INH, tedy 100 μM , kdy bylo dosaženo 87% úrovně viability kontrolních buněk (100%).

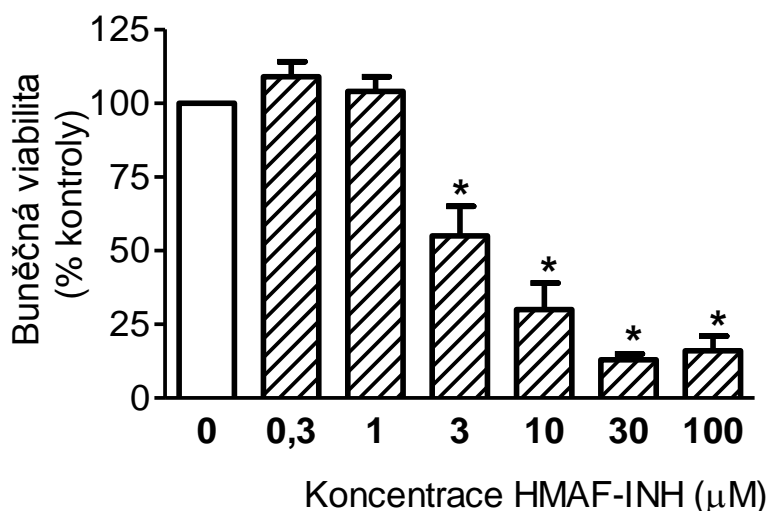


Obr. 4.13.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací HMAF-INH (0,3 - 100 μM).

N = 5 experimentů. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP pak symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.6.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s chelátorem HMAF-INH v koncentraci 100 μM byl pozorován pokles viability na 85% kontrolních hodnot (obr. 5.2.). K mírnému a statisticky nevýznamnému snížení buněčné viability po 72 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací HMAF-INH došlo u 1 μM koncentrace HMAF-INH, výrazné a statisticky významné snížení viability buněk bylo zaznamenáno při použití 3 μM HMAF-INH a koncentrací vyšších. Hodnota IC_{50} (koncentrace HMAF-INH, která způsobila snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla stanovena 9,5 μM (tab. 5.1.).



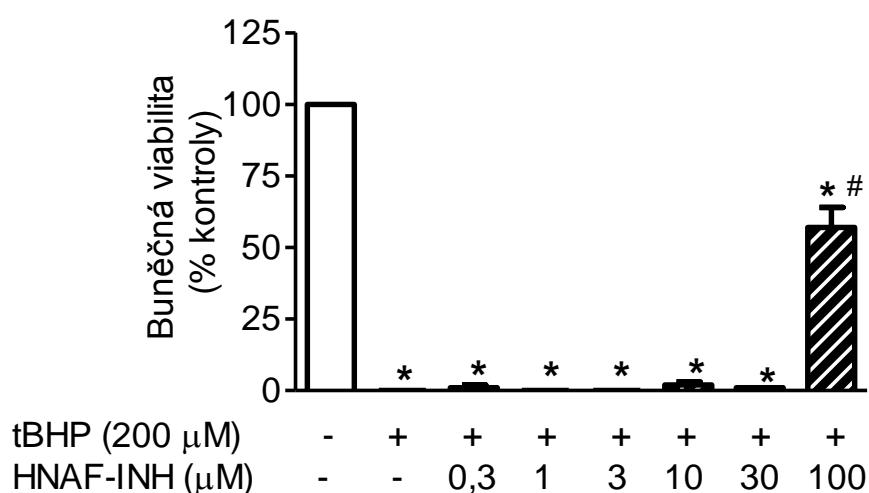
Obr. 4.14.: Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím HMAF-INH

N = 4 experimenty. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou. Výsledky, které jsou statisticky významně odlišné oproti kontrolní skupině (ANOVA, $P < 0,01$), jsou označeny symbolem *.

4.7. Studium účinků chelátoru železa HNAF-INH

4.7.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP a vzrůstající koncentrací chelátoru železa HNAF-INH byla zjištěna za použití testu vychytávání neutrální červeně statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením a následnou buněčnou smrtí. Statisticky významné zvýšení buněčné viability bylo pozorováno u nejvyšší koncentrace, tedy 100 μM HNAF-INH, kdy bylo dosaženo 57% úrovně viability kontrolních buněk (100%). Hodnota EC_{50} (koncentrace HNAF-INH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla vypočtena 68,5 μM (tab. 5.1.).

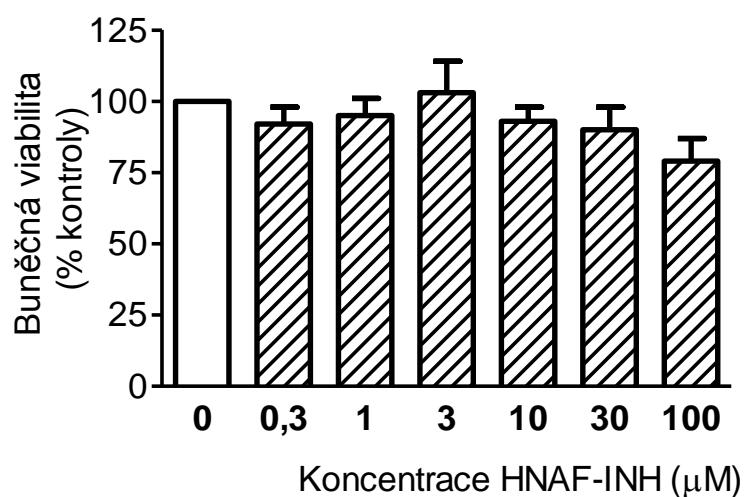


Obr. 4.15.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací HNAF-INH (0,3 - 100 μM).

N = 3 experimenty. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou. Statisticky významně odlišné výsledky oproti kontrolní skupině (ANOVA; $P < 0,01$) jsou vyznačeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP potom symbolem #.

4.7.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s chelátorem HNAF-INH v koncentraci 100 μM byl pozorován statisticky nevýznamný pokles viability na 90% kontrolních hodnot (obr. 5.2.). Po 72 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací HNAF-INH bylo pozorováno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability. Statisticky významného snížení viability buněk nebylo dosaženo při žádné s použitých koncentrací HNAF-INH. Hodnota IC_{50} (koncentrace HNAF-INH, která způsobí snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla teoreticky stanovena 109,3 μM (tab. 5.1.).



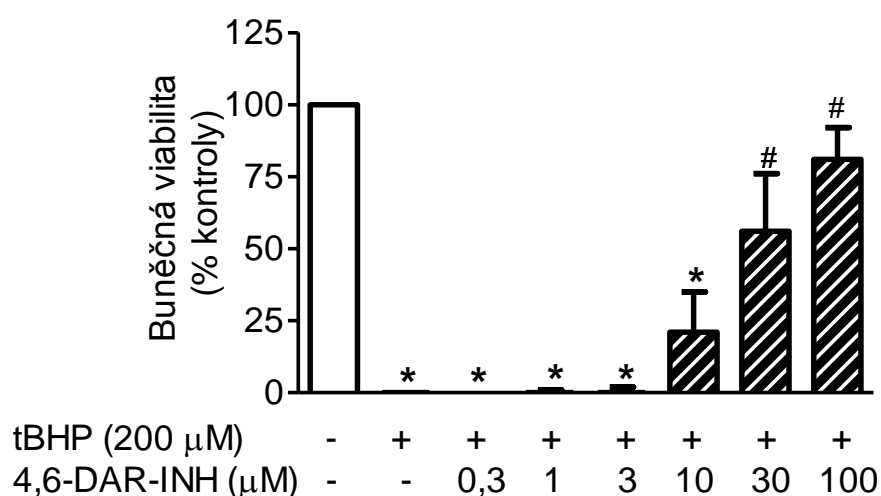
Obr. 4.16.: Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím HNAF-INH

N = 3 experimenty. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA, $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem * (statisticky významně odlišných výsledky nebylo dosaženo).

4.8. Studium účinků chelátoru železa 4,6-DAR-INH

4.8.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Za použití testu vychytávání neutrální červeně byla potvrzena statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením a následnou buněčnou smrtí po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP a vzrůstající koncentrací chelátoru železa 4,6-DAR-INH. Statisticky významné zvýšení buněčné viability bylo pozorováno od koncentrace 30 μM 4,6-DAR-INH. Hodnota EC_{50} (koncentrace 4,6-DAR-INH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla stanovena 39,9 μM (tab. 5.1.). Maximální protekce při vystavení buněk 200 μM t-BHP bylo dosaženo při použití nejvyšší testované koncentrace 4,6-DAR-INH (100 μM), kdy bylo dosaženo 81% úrovně viability kontrolních buněk (100%).

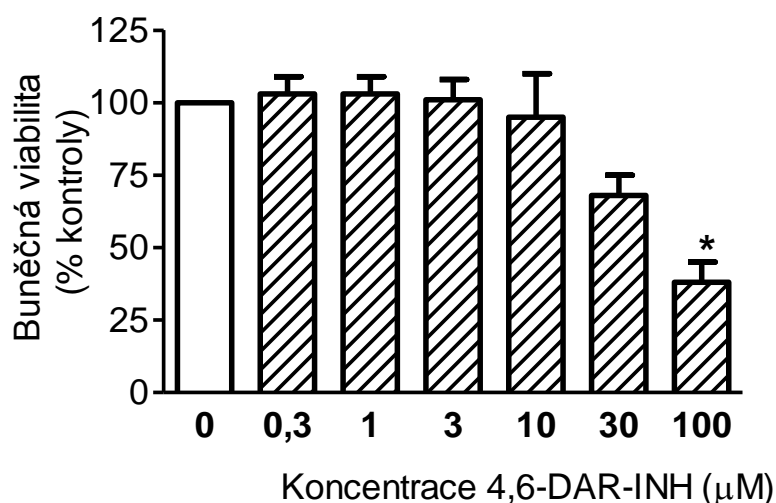


Obr. 4.17.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací 4,6-DAR-INH (0,3 - 100 μM).

N = 4 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP pak symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.8.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s chelátorem 4,6-DAR-INH v koncentraci 100 μM došlo k poklesu viability na 91% kontrolních hodnot (obr. 5.2.). Po 72 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací 4,6-DAR-INH bylo zjištěno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability při koncentraci 4,6-DAR-INH 10 μM a 30 μM . Výrazného a statisticky významného snížení viability buněk bylo dosaženo při použití 100 μM , tedy nejvyšší koncentrace 4,6-DAR-INH. Hodnota IC_{50} (koncentrace 4,6-DAR-INH, která způsobila snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla stanovena 73,3 μM (tab. 5.1.).



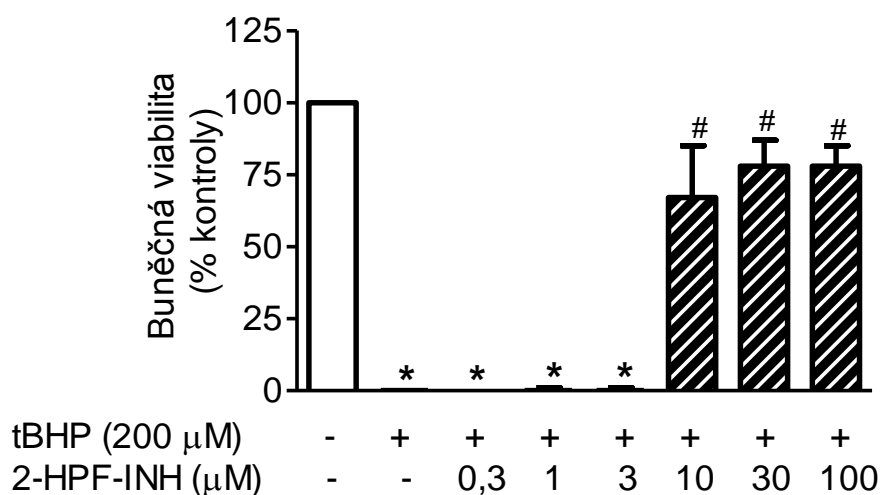
Obr. 4.18.: Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím 4,6-DAR-INH

N = 4 experimenty. Výsledky, které jsou statisticky významně odlišné oproti kontrolní skupině (ANOVA, $P < 0,01$), jsou označeny symbolem *. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.9. Studium účinků chelátoru železa 2-HPF-INH

4.9.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací chelátoru železa 2-HPF-INH a s 200 μM t-BHP byla za použití testu vychytávání neutrální červeně zjištěna statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením s následnou buněčnou smrtí. Statisticky významné zvýšení viability bylo pozorováno od koncentrace 10 μM 2-HPF-INH. Hodnota EC_{50} (koncentrace 2-HPF-INH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla stanovena 17,8 μM (tab. 5.1.). Maximální protekce při působení 200 μM t-BHP bylo dosaženo při použití koncentrace 2-HPF-INH 30 μM , stejně jako u koncentrace nejvyšší (100 μM), v obou případech bylo dosaženo 78% úrovně viability kontrolních buněk (100%).

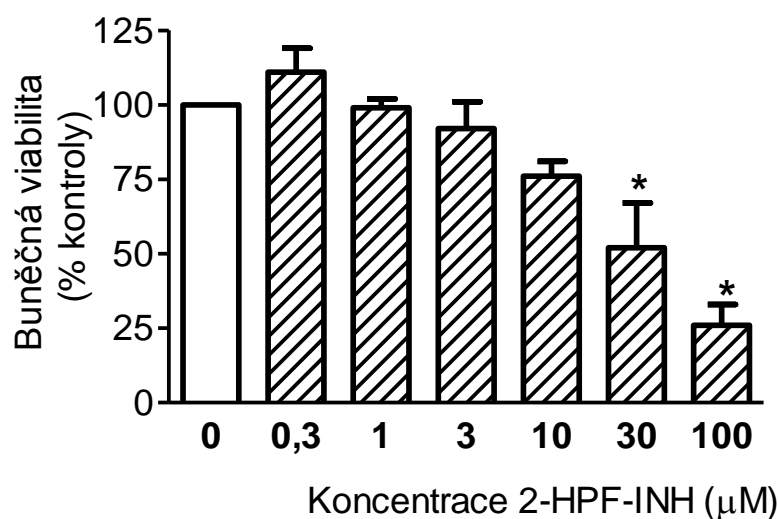


Obr. 4.19.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací 2-HPF-INH (0,3 - 100 μM).

N = 4 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP pak symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.9.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk se 100 μM chelátoru 2-HPF-INH byl pozorován statisticky nevýznamný pokles viability na 80% kontrolních hodnot (obr. 5.2.). Po ukončení 72 hodinové inkubace H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací 2-HPF-INH bylo zjištěno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability při 1 μM , 3 μM a 10 μM koncentraci 2-HPF-INH. K výraznému statisticky významné snížení viability došlo po použití 30 μM a 100 μM 2-HPF-INH. Hodnota IC_{50} (koncentrace 2-HPF-INH, která způsobila snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla stanovena 29,2 μM (tab. 5.1.).



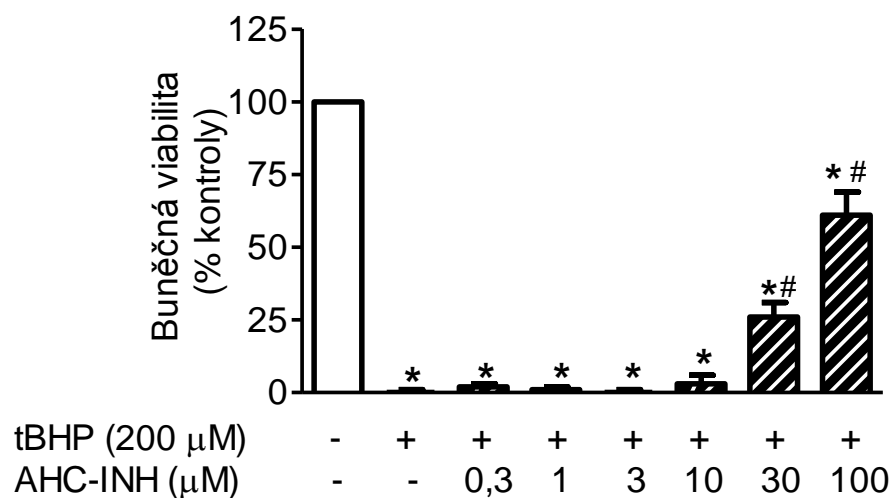
Obr. 4.20.: Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím 2-HPF-INH

N = 3 experimenty. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou. Výsledky, které jsou statisticky významně odlišné oproti kontrolní skupině (ANOVA, $P < 0,01$), jsou označeny symbolem *.

4.10. Studium účinků chelátoru železa 2-HAF-INH

4.10.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP a vzrůstající koncentrací chelátoru železa AHC-INH bylo dosaženo statisticky významné, dávkově závislé protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením následovaným buněčnou smrtí. Pro získání výsledků bylo použito testu vychytávání neutrální červeně. Statisticky významné zvýšení viability bylo pozorováno od koncentrace 30 μM AHC-INH. Hodnota EC_{50} (koncentrace AHC-INH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla vypočtena 56,3 μM (tab. 5.1.). Maximální protekce při působení 200 μM t-BHP bylo dosaženo při použití nejvyšší stanovované koncentrace AHC-INH (100 μM), kdy bylo dosaženo 61% úrovně viability kontrolních buněk (100%).

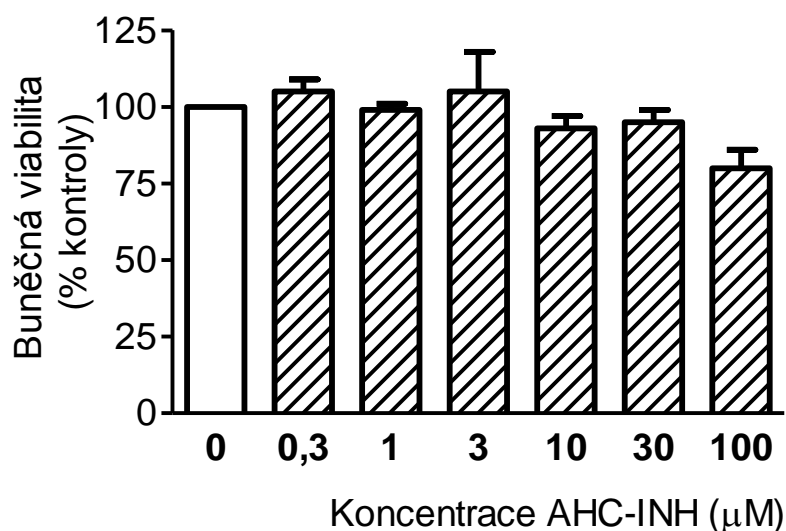


Obr. 4.21.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací AHC-INH (0,3 - 100 μM).

N = 4 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP pak symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.10.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s chelátorem AHC-INH v koncentraci 100 μM byl pozorován pokles viability na 83% kontrolních hodnot (obr. 5.2.). Po 72 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací AHC-INH bylo zjištěno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability u všech testovaných koncentrací AHC-INH. Výrazného a statisticky významného snížení viability buněk dosaženo nebylo. Hodnota IC_{50} (koncentrace AHC-INH, která by způsobila snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla teoreticky stanovena 129,2 μM (tab. 5.1.).



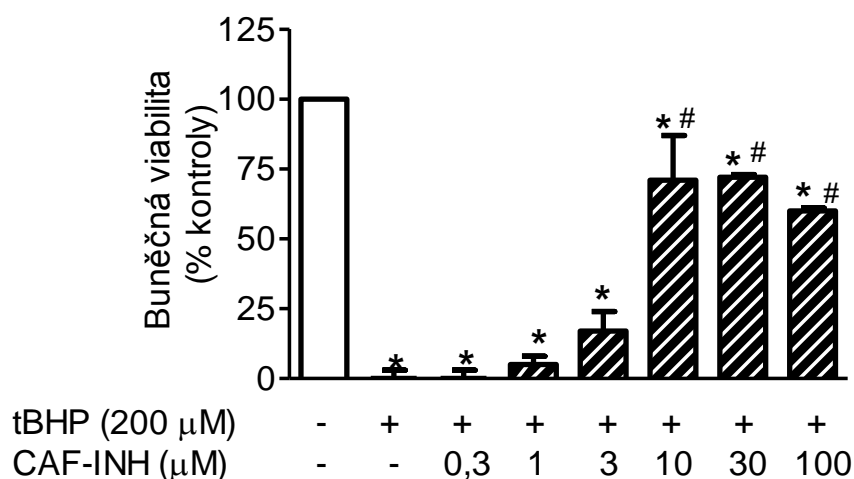
Obr. 4.22.: Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím AHC-INH

N = 3 experimenty. Statisticky významně odlišných výsledků oproti kontrolní skupině (ANOVA, $P < 0,01$) nebylo dosaženo, byly by označeny symbolem *. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.11. Studium účinků chelátoru železa CAF-INH

4.11.1. Protekce před toxicitou t-BHP

Za použití testu vychytávání neutrální červeně byla potvrzena statisticky významná, dávkově závislá protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením a následnou buněčnou smrtí po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP a vzrůstající koncentrací chelátoru železa CAF-INH. Statisticky významné zvýšení buněčné viability bylo pozorováno od koncentrace 10 μM CAF-INH. Hodnota EC_{50} (koncentrace CAF-INH, která byla schopna snížit toxicitu t-BHP na 50%) byla stanovena 9,5 μM (tab. 5.1.). Maximální protekce při vystavení buněk 200 μM t-BHP bylo dosaženo při použití 30 μM CAF-INH, kdy bylo dosaženo 72% úrovně viability kontrolních buněk (100%).

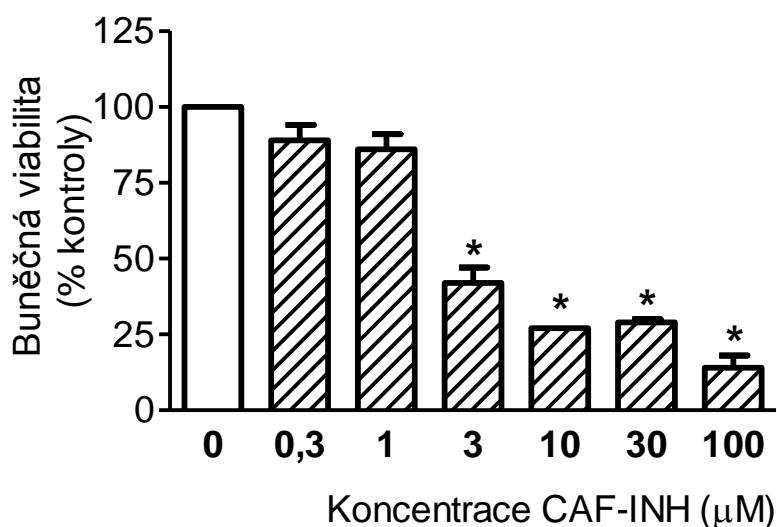


Obr. 4.23.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se vzrůstající koncentrací CAF-INH (0,3 - 100 μM).

N = 3 experimenty. Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP pak symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

4.11.2. Hodnocení vlastní toxicity

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk s chelátorem CAF-INH v koncentraci 100 μM byl pozorován statisticky významný pokles viability na 56% kontrolních hodnot (obr. 5.2.). Po 72 hodinové inkubaci H9c2 buněk se vzrůstající koncentrací CAF-INH bylo zjištěno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability při koncentraci CAF-INH 0,3 μM a 10 μM . Výrazného a statisticky významného snížení viability buněk bylo dosaženo při použití 3 μM CAF-INH a koncentrací vyšších. Hodnota IC_{50} (koncentrace CAF-INH, která způsobila snížení viability na 50% kontrolní hodnoty) byla stanovena 4,8 μM (tab. 5.1.).



Obr. 4.24.: Viabilita buněk H9c2 72 hodin po expozici vzrůstajícím koncentracím CAF-INH

N = 2 experimenty. Výsledky, které jsou statisticky významně odlišné oproti kontrolní skupině (ANOVA, $P < 0,01$), jsou označeny symbolem *. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

5. Diskuze

Nerovnováha železa v organismu hraje ústřední roli při oxidačním poškození, které je spojeno s řadou patologických stavů (*Galey, 2001*).

Železo je jedním z iontů kovů, které v buňkách velmi často nacházíme, což odráží jeho zásadní roli v redoxních reakcích (*Richardson, 1998*). Je kofaktorem základních životních procesů, jako např. transportu kyslíku, syntézy DNA nebo buněčné respirace (*Buss et Ponka, 2003*). Buňky však musí udržovat hladinu volného železa vždy tak nízko, jak jen to je možné, aby zabránily jeho interakcím s O₂ a dalšími ROS, což by vyvolalo toxickou reakci. Železo je totiž silným katalyzátorem nekontrolovatelného oxidačního poškození struktury DNA, proteinů a lipidů. V přítomnosti látek s redukčními vlastnostmi může u železa docházet k redoxní cyklizační reakci, kdy Fe přechází mezi dvěma oxidačními stavy a tím se také kontinuálně tvoří vysoce reaktivní sloučeniny kyslíku (*Miller et al., 1990*).

Hladina železa v organismu je kontrolována transportem a ukládáním proteinů, na které je železo navázáno, tak, aby došlo k minimalizaci rizika reakcí s volnými radikály. Nicméně, za určitých podmínek může být rovnováha narušena, a to buď pouze v určitém místě nebo v celém systému. Tělo má totiž jen omezenou schopnost odstraňovat nadbytek železa, a proto může k přetížení dojít například při prodloužené hyperabsorpci železa ze stravy, podání nadbytku Fe parenterálně (krevní transfuzí a podobně) nebo při kombinaci těchto dvou procesů (*Buss et Ponka, 2003*). Systémové přetížení železem je spojeno s řadou onemocnění, mezi které patří hereditární hemochromatóza či β -thalasemie (*Galey, 2001*). Tato hereditární onemocnění doprovázená nadbytkem železa jsou způsobena mutací genů pro regulaci a využití železa. Opačný problém pak představuje nedostatek železa v organismu, při kterém dochází k rozvoji anemického stavu (*Charkoudian et al., 2008*).

V organismu průměrného dospělého muže se nachází asi 4,5 g železa. Hlavním místem, kde jej nalezneme, je hemoglobin. Další významná zásobní místa představují játra, kosterní svalstvo či makrofágy (*Halliwell et Gutteridge, 2007*). V myoglobinu, cytochromech a dalších Fe obsahujících enzymech se nachází asi 10% celkového železa, 20-30% nalezneme ve feritinu a jeho degradačním produktu hemosiderinu, transferin obsahuje jen asi 0,1-0,2% tělesného železa (*Galey, 2001*). Ze stravy se denně do těla absorbují 1-2 mg Fe a stejné množství se pro zachování rovnováhy vylučuje. Železo je vylučováno v potu, stolici, moči, krvi (především menstruační) a malé množství také plicemi při expektoraci hlenu (*Halliwell et Gutteridge, 2007*).

Ztráty železa jsou kompenzovány absorpcí ze stravy přes enterocyty duodena (*Dunn et al., 2006*). Absorbované železo je přenášeno na transferin, který má dvě vazebná místa

s vysokou afinitou k železu. Za normálního stavu je plazmatický transferin nasycen jen z 20-30%. Buněčná homeostáza Fe je udržována koordinovanou regulací exprese receptorů pro transferin a exprese feritinu na posttranskripční úrovni. Expese těchto proteinů je navíc regulována i hladinou železa v buňkách, a to díky interakci Fe s proteiny vážícími železo (IRPs) (Galey, 2001).

Za určitých podmínek dochází k uvolnění železa z vazby na proteiny a vzniklé „volné železo“ („free iron“) (často se setkáváme i s označením „nízkomolekulární železo“, „low molecular weight iron pool“) podporuje tvorbu toxického hydroxylového radikálu (OH[•]) (Horackova et al., 2000). Tento jev označujeme jako již zmíněnou Fentonovu reakci. Fentonova reakce je významným dějem, který zesiluje poškození oxidačním stresem. Uvolnění železa z feritinu vyžaduje redukcí v přítomnosti akceptoru Fe²⁺ (Jacobs et al., 1989). Fyziologická redukční agens, jako je vitamín C nebo glutathion, nejsou schopny uvolnit Fe z feritinu v potřebném množství, zatímco superoxidový radikál je významným mediátorem této reakce. Uvolňování Fe z feritinu je pozorováno u některých patologických stavů. Proteolytická degradace feritinu při oxidačním stresu tak silně přispívá k uvolnění železa (Pourzand et al., 1999). Železo pak podporuje vznik většího množství OH[•] prostřednictvím Haber-Weissovy reakce. Z toho vyplývá, že se železo přímo podílí na rozvoji oxidačního poškození.

Oxidační stres je definován jako nerovnováha, ve které převáží produkce ROS nad antioxidační ochranou (Ott et al., 2007). Vystavení buněčné linie působení vzrůstajícího oxidačního stresu spouští řadu reakcí, v závislosti na typu buňky může zahrnovat zvýšení proliferace nebo zastavení růstu, poškození DNA, oxidaci proteinů a lipidů, apoptózu a nakonec i nekrózu (Kurz et al., 2006). Základním cílem oxidačního poškození jsou především „kyselé vakuolární útvary“ bohaté na nízkomolekulární železo (Petrat et al., 2001). Mezi tyto útvary patří lysozomy a endozomy, což jsou hlavní buněčné struktury, které zajišťují autofagické odstranění nefunkčních či starých organel a proteinů (Baird et al., 2006; Abas et al., 2000). Tyto organely odstraňují také materiál s obsahem železa, např. feritin či cytochromy, což vysvětluje přítomnost aktivního nízkomolekulárního železa v jejich struktuře (Tenopoulou et al., 2007). Za normálních podmínek je poté železo přenášeno ven z lysozomu a využíváno v anabolických procesech. Při oxidačním poškození tak může dojít k prasknutí lysozomu, uvolnění jeho obsahu včetně železa do cytozolu buňky a jejímu následnému poškození, které vede k apoptóze nebo nekróze (Yuan et al., 2000).

Oxidační stres se podílí na řadě patologických stavů zahrnujících kardiovaskulární onemocnění, rakovinu, neurologické potíže, diabetes, ischemii, stárnutí a řadu dalších potíží.

(Valko *et al.*, 2007). Mezi poruchy spojené se zvýšenou hladinou volného železa řadíme především:

Zánětlivá onemocnění. Při zánětu neutrofilů a makrofágy prostupující do postiženého místa produkují velké množství superoxidu a NO. Toto „oxidační vzplanutí“ vyvolává uvolnění železa z feritinu. Přítomnost volného železa pak způsobuje tvorbu hydroxylového radikálu, který se účastní poškozování postižené tkáně. Příkladem takového onemocnění může být revmatoidní artritida (Galey, 2001), což je autoimunitní onemocnění, které způsobuje chronický zánět kloubů a okolních tkání s infiltrací makrofágů a aktivovaných T buněk (Bauerova *et Bezek*, 1999).

Studie zabývající se léčbou zánětlivých onemocnění prokázaly, že chelátory železa redukují chronickou fázi zánětu, ale nejsou schopny předcházet rozvoji akutní fáze. Léčba pomocí DFO má ale řadu nežádoucích vedlejších účinků, např. rozvoj anémie nebo toxických účinků na CNS (Galey, 2001).

Ischémie/reperfuze. Jedná se o klinický problém projevující se zastavením zásobování tkáně živinami a kyslíkem, které je následováno obnovou krevního oběhu (Becker, 2004). Ischemicko-reperfuzní poškození srdce a mozku (akutní infarkt myokardu a mozková mrtvice) patří meziphlavní příčiny úmrtí ve světě. Hypoxické nebo ischemické tkáně jsou schopné přežít po různě dlouhou dobu a to v závislosti na druhu tkáně a její funkci. Na nedostatek O₂ reagují různým způsobem. Časná reakce obvykle zahrnuje zvýšené odbourávání glykogenu a glykolýzu, což vede k produkci laktátu a rozvoji acidózy. Může dojít k poklesu hladiny ATP a poruchám iontové rovnováhy. Pokud nedostatek kyslíku netrvá tak dlouho, aby došlo k nevratnému poškození tkáně, může být buněčná struktura zachráněna reperfuzí krve, přívodem živin a O₂. Reperfuze je samozřejmě nezbytná, ale ukázalo se, že obnova přívodu kyslíku do ischemické tkáně vede k jejímu poškození, na němž nese hlavní vinu vzplanutí produkce ROS. Reperfuze mrtvé nebo zanikající tkáně navíc zvyšuje možnost uvolňování toxických látek do cirkulace, jedná se například o xantin-oxidázu (XO), oxidované biologicky aktivní lipidy a přechodné kovy. Tyto látky pak způsobují poškození a potíže v jiných tkáních organismu, což může vést až k syndromu multiorgánového selhání (MODS, multiple organ dysfunction syndrome) (Halliwell *et Gutteridge*, 2007). Hladina intracelulárního železa prudce vzrůstá během ischémie pravděpodobně kvůli akumulaci redukujících látek a rozvoji acidózy (Voogt *et al.*, 1992). Když je parciální tlak kyslíku během reperfuze náhle obnoven, volné železo katalyzuje produkci hydroxylového radikálu.

Pro snížení následného poškození ischemických tkání lze využít chelátorů železa. Výsledky řady studií s DFO nebo L1 ukazují, že chelátory by mohly být užitečné právě v léčbě

mozkové mrtvice a infarktu myokardu. Určitý přínos lze očekávat při jejich použití při operacích, jako jsou různé transplantace či kardiopulmonární bypassy, při kterých hrozí ischemické poškození tkání (*Galey, 2001*). Právě tímto směrem byl zaměřen náš výzkum.

Ateroskleróza. Ateroskleróza je onemocnění velkých a středních tepen. Na stěně cév jsou pozorovány nažloutlé proužky nebo skvrny, tzv. lipidní skvrny, které postupně přecházejí ve fibrózní pláty, dochází k jejich kalcifikaci a následuje vznik ateromových plátů. Ve stěně cévní se nachází kašovitá hmota tvořená množstvím lipidů a rozpadlých buněk. Aterosklerotické změny vedou k zúžení cévního průsvitu, nasedající trombóze, případně ke krvácení plátu. To vyvolává ischemické změny v orgánech, které cévy zásobují kyslíkem (*Mačák et Mačáková, 2004*). Významnou roli v rozvoji aterosklerózy hrají oxidované nízkomolekulární lipoproteiny. Význam mědi a železa v oxidativní modifikaci LDL cholesterolu, která zvyšuje jeho afinitu pro subendoteliální makrofágy a také jeho aterogenicitu, je velmi dobře znám. Není ale zatím jasné, jakého původu a v jaké formě je železo, které celý proces katalyzuje (*Galey, 2001*).

V 50. a 60. letech minulého století probíhaly studie zaměřené na využití EDTA v terapii aterosklerózy, tyto studie však neprokázaly prakticky žádný pozitivní efekt. Dnes se výzkum zabývá řadou nových specifických chelátorů, u kterých by mohlo být dosaženo lepších výsledků (*Galey, 2001*).

Neurodegenerativní onemocnění. Různé oblasti lidského mozku obsahují velké množství železa navázaného na proteiny, naopak cerebrospinální tekutina obsahuje jen malé množství transferinu, SOD a glutathion-peroxidázy (*Double et al., 1998*). Mozek je navíc velmi bohatý na polynenasycené mastné kyseliny a stává se tak velmi citlivým k oxidačnímu poškození, které je závislé na přítomnosti železa. Ischemické nebo traumatické poškození mozku vzniká často jako následek vzrůstajících katalytických schopností železa, které vedou k zesílení peroxidace lipidů. Velmi citlivé ke změnám metabolismu železa jsou především oblasti bohaté na dopamin, a to proto, že dopamin má schopnost pevně vázat železo a může tak podléhat redoxní cyklizaci a díky tomu produkovat redukované sloučeniny kyslíku (*Galey, 2001*). Oxidační stres spojený s poruchou regulace železa je jedním z faktorů na věku závislých degenerativních onemocnění, jako je např. Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba (*Charkoudian et al., 2008*).

Mozek pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (AD) vykazuje silné oxidační poškození spojené s akumulací amyloid- β peptidu (A β) (*Butterfield et al., 2002*). A β je peptid obsahující 39-42 aminokyselin, odvozený od většího amyloid- β prekurzorového proteinu (APP). A β i APP obsahují vazebná místa s vysokou afinitou k mědi, případně k železu a

zinku. Vykazují také silnou redukční aktivitu, čímž podporují vznik peroxidu vodíku a dalších produktů (Valko *et al.*, 2007).

Parkinsonova choroba (PD) je doprovázena ztrátou neuronů v oblasti mozku označované jako substantia nigra (Sayre *et al.*, 2007). Buňky substantia nigra užívají pro komunikaci s buňkami jiné části mozku, striatem, dopamin. Pokles dopaminu v substantia nigra vede současně k poklesu hladiny dopaminu v corpus striatum, což je považováno za hlavní příčinu symptomů PD (Jenner, 2003). Poškození dopaminergních buněk je spojováno s oxidačním stresem, na počátku těchto změn stojí patrně nedostatek glutathionu v oblasti substantia nigra (Valko *et al.*, 2007).

I u těchto onemocnění lze očekávat pozitivní vliv chelátorů na léčbu, hlavním problémem zůstává transport těchto látek přes hematoencefalickou bariéru. Studie provedené s DFO a L1 prokázaly schopnost těchto chelátorů snižovat hladinu Fe v mozku, současně však došlo i ke snížení hladiny dopaminu.

Hladinu volného železa mohou zvyšovat také xenobiotika. Různá xenobiotika mohou totiž v organismu podléhat redoxní cyklizaci a mají navíc i schopnost produkovat superoxid, čímž uvolňují železo z vazby na feritin a to vše vede k poškození tkání. Mezi tyto látky patří například herbicid paraquat nebo antracyklinová cytostatika (Galey, 2001).

Při naší práci jsme používali buněčnou linii H9c2, která představuje vhodný model srdeční tkáně *in vitro*. O kardiomyocyty v pravém smyslu se však nejedná, buňky jsou morfologicky shodné s nezralými kardiomyocyty a vykazují řadu jim odpovídajících vlastností (Turner *et al.*, 1998; Hescheler *et al.*, 1991). Tato buněčná linie je odvozená z embryonálních komorových buněk potkana (American Type Culture Collection) (Turner *et al.*, 1998; Šimůnek *et al.*, 2005), vykazuje elektrofyziologické a biochemické vlastnosti jak kosterní tak srdeční tkáně, jako je např. depolarizace v závislosti na acetylcholinu či aktivace proudění vápníku do buňky přes kanály typu L. Zajímavou vlastností H9c2 buněk je schopnost diferenciovat se z jednojaderného myoblastu. Během tohoto procesu si buňky ponechávají složky elektrické a hormonální signální dráhy srdečních buněk (Sãrdao *et al.*, 2007). Hlavní výhodou linie H9c2 je snadná pasážovatelnost a tedy i snadná dostupnost velkého množství buněk. Výhodnost jejich používání v laboratorních podmínkách prokázal v roce 2001 tým L'Ecuyera, který H9c2 buňky používal ke studiu produkce volných radikálů, ke studiu citlivosti molekul k oxidačnímu poškození a k expresi genů v kontrolovatelném množství (L'Ecuyer *et al.*, 2001; Sãrdao *et al.*, 2007).

Modelové poškození srdečních buněk oxidačním stresem bylo vyvoláno působením tert-butylhydrogenperoxidu (t-BHP). t-BHP je organický hydroperoxid s krátkým řetězcem

(*Lemasters et al., 1999*), který prostupuje buněčnou membránou, používaný jako model pro studium účinků oxidačního stresu na funkce buněk a průběh smrti v různých buněčných liniích (*Särdao et al., 2007*). Jakmile se dostane do nitra buňky, tvoří t-BHP tert-butoxy radikály, které se účastní různých patologických změn spojených s následným snížením buněčné životaschopnosti následkem apoptózy a nekrózy. Efekt, který t-BHP vyvolává, závisí na použité buněčné linii, kulturním typu buněk, koncentraci prooxidantu a také na době expozice. Nejčastěji dochází k peroxidaci lipidů, modifikaci thiolových skupin proteinů (*Särdao et al., 2007*), oxidaci GSH a NAD(P)H (*Lemasters et al., 1999*). Hladina GSH klesá i díky snížení aktivity glutathion-reduktázy a zvýšení aktivity glutathion-peroxidázy (*Kim et al., 1999*). V průběhu našich pokusů jsme používali t-BHP v koncentraci 200 μM . Toto množství jsme zvolili na základě výsledků experimentů, které na katedře biochemických věd proběhly v minulých letech (*Jirkovský, 2008*). Koncentrace 200 μM t-BHP totiž zajišťuje prokazatelné poškození buněk linie H9c2 oxidačním stresem a stává se tak vhodným vzorkem prostředí pro studium protektivních vlastností námi testovaných chelátorů (*Jirkovský, 2008*).

Obecně můžeme říci, že proti oxidačnímu stresu lze bojovat pomocí antioxidantů, tedy látek, které odstraňují již vzniklé ROS nebo brání další oxidaci substrátu (*Balcerczyk et al., 2007*) nebo přímo zamezením tvorby ROS. Jak již bylo řečeno, přítomnost oxidačního poškození přímo souvisí s výskytem volného železa v dané tkáni. Farmakologicky lze zabránit účasti železa na tvorbě OH^\bullet pomocí speciálních komplexotvorných látek – tzv. chelátorů železa. V současnosti klinicky užívaná chelatační terapie zahrnuje použití látek silně vázících Fe v léčbě potenciálně nebezpečných onemocnění, především nemocí spojených s nadbytkem železa a v poslední době také v léčbě rakoviny. Jedná se o ligandy, které podporují vylučování a částečný nedostatek tohoto přechodného kovu v biologických systémech. Tyto Fe-vázící látky jsou tvořeny řadou bidentálních, tridentálních a hexadentálních ligandů, ve kterých je 2, 3 nebo 6 atomů schopno reagovat s železem za vzniku oktahedrálního komplexu (*Kalinowski et Richardson, 2005*). Aby mohly být považovány za klinicky významné, musí chelátory vykazovat vysokou afinitu k železu, a to především oproti ostatním přechodným kovům, snadný vstup tkáněmi, vhodný metabolismus a dostupnost po orální aplikaci (*Galey, 2001*).

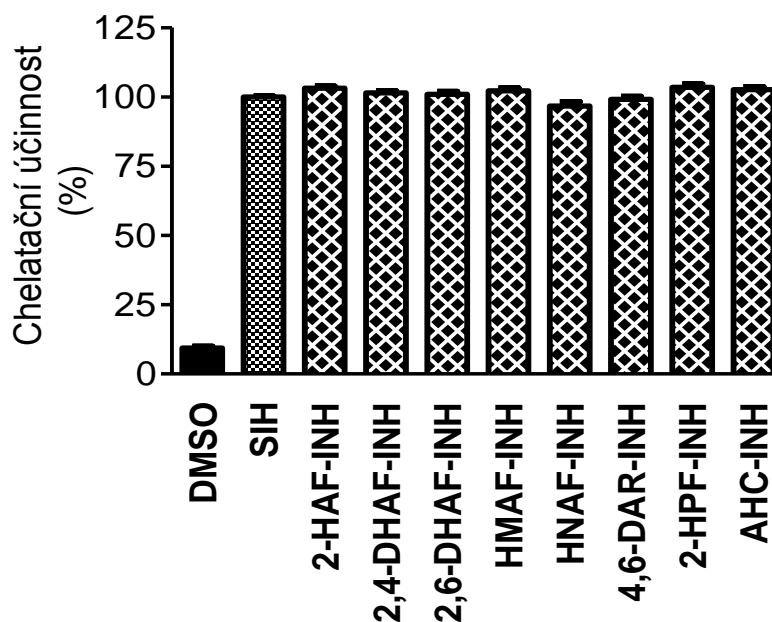
V klinické praxi jsou chelátory využívány již dlouhou dobu, a to nejen u přetížení organismu železem nebo jako prevence oxidačního poškození. K typickému využití těchto látek patří také léčba otrav těžkými kovy, odstranění nadměrného množství mědi u Wilsonovy choroby a samozřejmě železa při hemochromatóze. V laboratorních podmínkách je chelatace využívána pro zabránění srážení krve (EDTA odstraňuje z krve Ca^{2+} ionty) (*Vokurka et Hugo,*

2002). Nový výzkum ukazuje i na možnost využití chelatačních vlastností v terapii HIV. Replikace viru HIV-1 je totiž podmíněna dostatkem Fe v jeho struktuře a chelatace tohoto železa pak proliferaci buněk brzdí či zcela zastaví (*Debebe et al., 2007*).

Základním problémem většiny známých ligandů tak zůstává schopnost vyvazovat železo z proteinů a základních enzymů. Silné chelátory mohou dokonce zasahovat do procesu inkorporace železa do hemové skupiny. Jako následek nedostatku Fe se rozvíjí anémie, dochází k poruchám neurologických funkcí, imunitního systému a epitelálních tkání (*Galey, 2001*). Obecně lze říci, že silně hydrofilní chelátory vážou jen extracelulární železo, ke kterému mají přístup, některé se ale díky specifickému transportu mohou dostat i k Fe v cytosolu. Relativně lipofilní chelátory mohou vázat intracelulární volné železo a bohužel i Fe z intracelulárních proteinů (*Weiss et al., 1997*).

Z tohoto důvodu neustále pokračuje výzkum nových chelátorů železa s nízkou toxicitou. Velké naděje jsou vkládány do derivátů aroylhydrazonu. V 70. letech 20. století byl skupinou dr. Poňky objeven tridentální chelátor železa pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) s vysokou afinitou pro Fe(III), ale nízkou pro jiné biologicky významné kationty, jako je Ca(II) nebo Mg(II) (*Richardson, 1998*). Od struktury PIH byla poté odvozena celá řada analogů, u kterých jsou studovány vlastnosti a možnosti budoucího využití. Na katedře biochemických věd FaF UK byl již dříve zahájen výzkum, který byl zaměřen na salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH). Tento ligand velmi snadno prostupuje do buňky a chelatuje zde železo (*Šimůnek et al., 2005*). U SIH a jeho analogů byla prokázána antiproliferativní aktivita *in vitro*, předpokládá se, že je způsobena schopností chelátorů inhibovat ribonukleotidovou reduktázu (*Richardson, 1995*). Také touto schopností aroylhydrazonů se naše pracovní skupina dále zabývá.

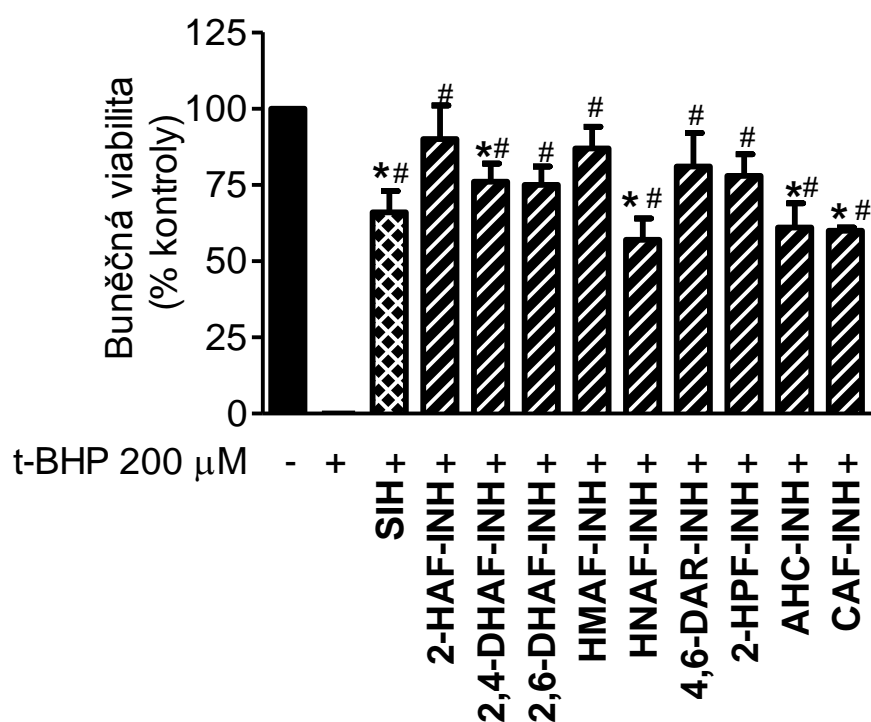
Cílem naší práce bylo potvrzení protektivních vlastností aroylhydrazonu SIH *in vitro* a porovnání těchto výsledků s vlastnostmi nově syntetizovaných chelátorů od struktury SIH odvozených. Chelátory nové struktury byly připraveny na katedře anorganické a organické chemie FaF UK (K. Hrušková, Dr. K. Vávrová). U každé strukturní obměny byla předpokládána změna ve vlastnostech chelátoru, které bylo třeba potvrdit či vyvrátit studiem *in vitro*. U všech těchto látek byla naší pracovní skupinou potvrzena vysoká chelatační aktivita srovnatelná s "mateřskou" látkou SIH (obr. 5.1).



Obr. 5.1.: **Porovnání chelatační účinnosti nově syntetizovaných chelátorů železa vůči SIH** Chelatační aktivita byla hodnocena fluorimetricky pomocí sledování schopnosti látky vyvézt železo z komplexu s calceinem. (Mgr. P. Hašková, katedra biochemických věd FaF UK, 2008, dosud nepublikovaná data)

Hlavním cílem této diplomové práce pak bylo srovnat sérii těchto látek z hlediska jejich schopnosti omezit poškození buněčné linie kardiomyoblastů H9c2 modelovým oxidačním insultem a zároveň zhodnotit vlastní toxicitu chelátorů vůči těmto buňkám.

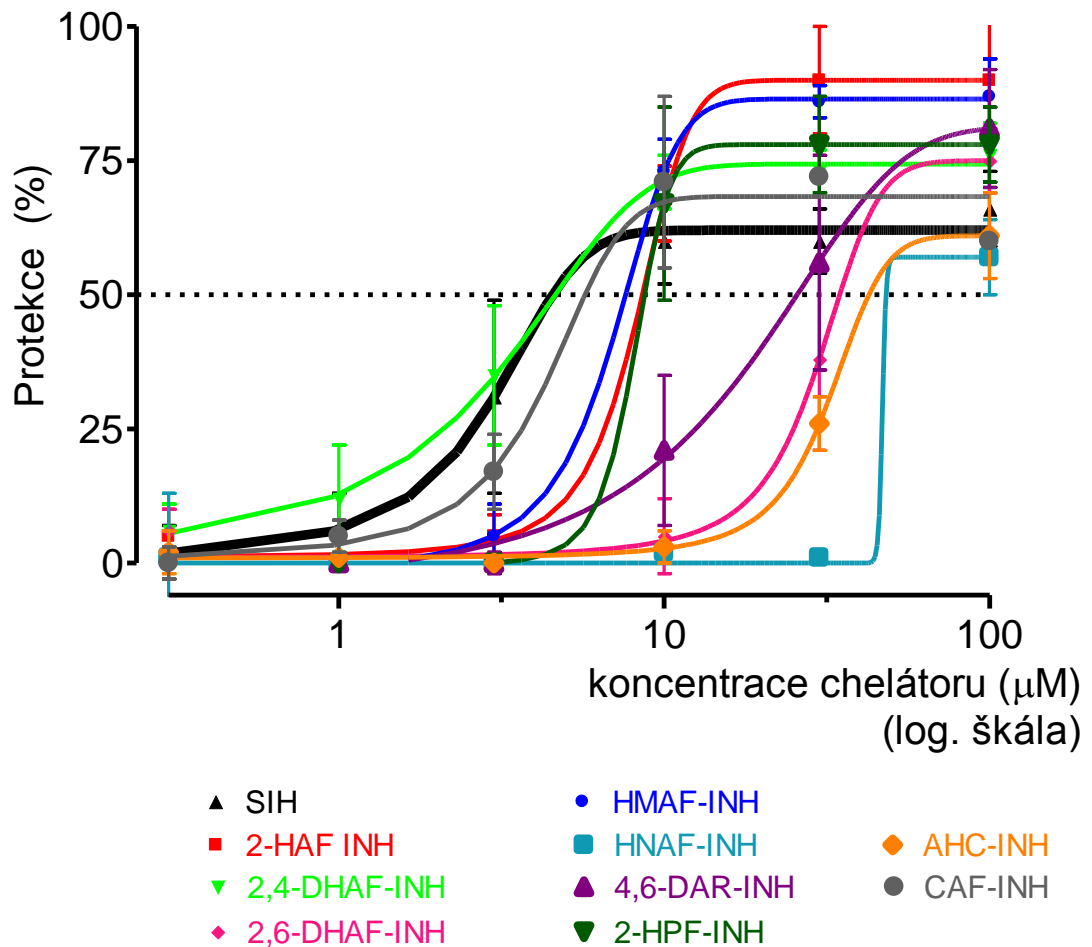
U každého chelátoru byly testovány antioxidační schopnosti po 24 hodinové expozici 200 μM t-BHP. Po inkubaci H9c2 buněk s 200 μM t-BHP a 100 μM koncentrací chelátorů železa byla potvrzena statisticky významná protekce H9c2 buněk před oxidačním poškozením a následnou buněčnou smrtí u všech testovaných chelátorů. Při použití 100 μM SIH bylo dosaženo 66% úrovně viability kontrolních buněk. Lepších avšak statisticky nevýznamně vyšších výsledků bylo ve srovnání s chelátorem SIH dosaženo u 2-HAF-INH (o 24% lepší výsledek), 2,4-DHAF-INH (o 10%), 2,6-DHAF-INH (o 9%), HMAF-INH (o 21%), 4,6-DAR-INH (o 15%) a u 2-HPF-INH (o 12%). Maximální protekce při vystavení buněk 200 μM t-BHP byla pozorována u chelátoru 2-HAF-INH, kdy bylo dosaženo 90% úrovně viability kontrolních buněk (100%).



Obr. 5.2.: Viabilita H9c2 buněk po 24 hodinové inkubaci s 200 μM t-BHP a v kombinaci t-BHP se 100 μM koncentracemi jednotlivých chelátorů železa.

Statisticky významně odlišné výsledky (ANOVA; $P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 200 μM t-BHP pak symbolem #. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

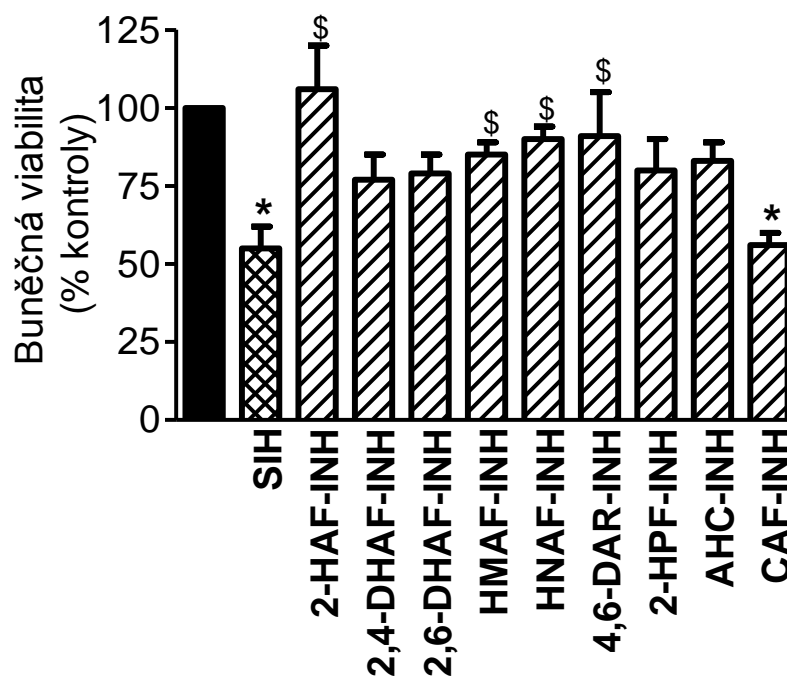
Dále jsme s využitím software CalcuSyn hledali takové koncentrace chelátorů, při které je daný ligand schopen omezit toxicitu 200 μM t-BHP o 50 % - tj. určit medián efektivní koncentrace, hodnotu EC_{50} . Z námi získaných výsledků vyplývá, že EC_{50} SIH bylo dosaženo při použití koncentrace 18,2 μM. Lepších výsledků (nižší EC_{50}) ve srovnání se SIH bylo dosaženo u nově syntetizovaných chelátorů 2-HAF-INH, 2,4-DHAF-INH, 2-HPF-INH a CAF-INH (obr. 5.3.)



Obr. 5.3.: Porovnání viabilit H9c2 buněk po 24h inkubacích s kombinací 200 μM t-BHP a zvyšujících se koncentrací jednotlivých chelátorů

Jak již bylo zmíněno výše, minimální vlastní toxicita (případně její úplná absence) je nezbytným (i když samozřejmě nikoliv postačujícím) předpokladem potenciálního klinického využití každého nového chelátoru. V průběhu naší práce jsme proto také hodnotili toxicity jednotlivých chelátorů, a to akutní (po 24 hodinové inkubaci) a dlouhodobou (po 72 hodinové inkubaci). Pro porovnání antioxidačních a toxických vlastností (a tím stanovení období terapeutického indexu) by bylo ideální srovnávat hodnoty IC_{50} a EC_{50} získané po shodně dlouhých experimentech. Při 24h inkubaci ale toxicita žádné z testovaných látek nedosáhla 50% (obr. 5.4.) a další eskalace koncentrací nad hodnotu 100 μM nebyla u většiny látek možné vzhledem k omezené rozpustnosti vysoce lipofilních chelátorů ve vodě. Provedli jsme proto srovnání toxicit všech látek v jednotné koncentraci 100 μM (obr. 5.4.).

Po 24 hodinové inkubaci H9c2 buněk se 100 μM koncentrací chelátorů železa bylo pozorováno mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability u všech testovaných chelátorů kromě SIH a CAF-INH. Při použití 100 μM SIH došlo k signifikantnímu snížení viability buněk o 45% oproti viabilitě kontrolních buněk. Nižší akutní toxicitu ve srovnání s chelátorem SIH vykazaly všechny nové chelátory. Statisticky významně lepších výsledků bylo dosaženo u 2-HAF-INH (nedošlo ke snížení viability), HMAF-INH (snížení viability o 15%), HNAF-INH (o 10%) a u 4,6-DAR-INH (o 9%). Nulová toxicita po 24 hodinové inkubaci byla pozorována u chelátoru 2-HAF-INH, kdy bylo dosaženo 106% úrovně viability kontrolních buněk (100%).



Obr. 5.4.: Viabilita buněk H9c2 24 hodin po expozici 100 μM jednotlivých chelátorů železa.

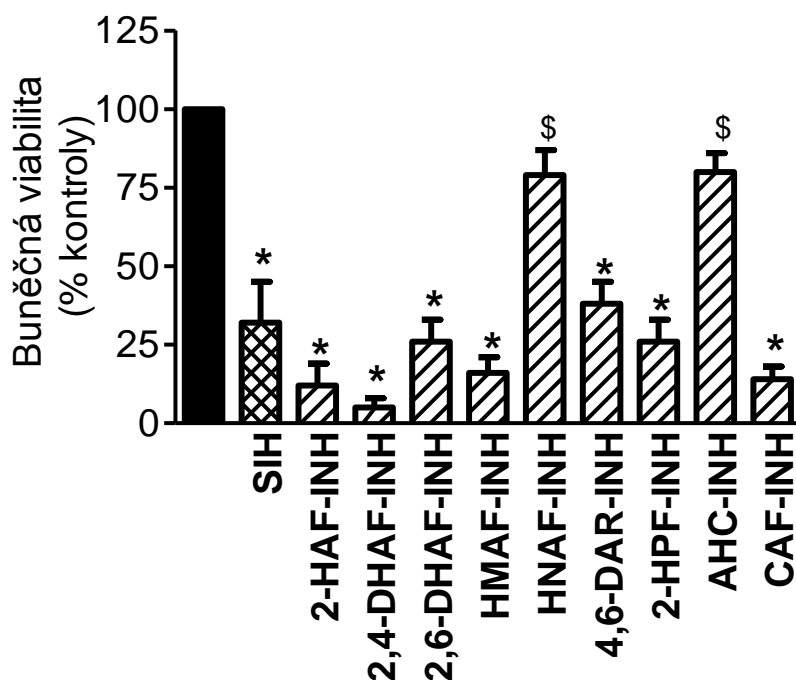
Výsledky, které jsou statisticky významně odlišné oproti kontrolní skupině (ANOVA, $P < 0,01$), jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 100 μM SIH pak symbolem \$. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota se standardní chybou.

Po 72-hodinové inkubaci byla hodnota IC_{50} dosažena u všech látek kromě AHC-INH a HNAF-INH, zde byly hodnoty vypočítány programem CalcuSyn metodou interpolace. Poměry EC_{50} (24h) a IC_{50} (72h) shrnuté v tabulce 5.1., proto zdánlivě podhodnocují potenciál

těchto látek (zvýrazněním jejich toxicity), pro náš účel - tj. srovnání jednotlivých nových chelátorů s mateřskou látkou SIH - se ale použít mohou.

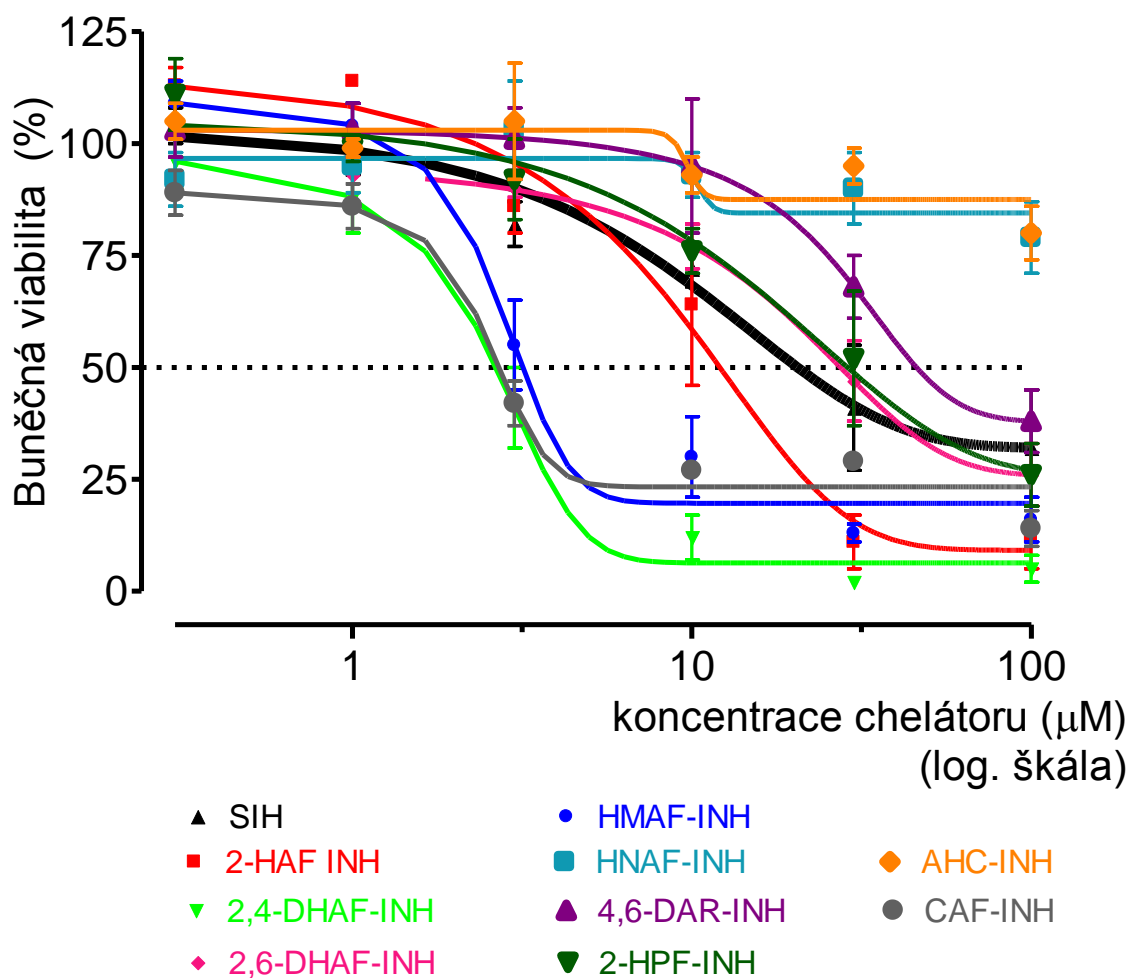
Pro SIH byla po 72h inkubaci stanovena hodnota IC_{50} 29,7 μ M, nižší toxicita (tedy vyšší hodnoty IC_{50}) byly zjištěny u HNAF-INH, 4,6-DAR-INH a AHC-INH. Naopak vyšší toxicita byla zaznamenána v případě chelátorů CAF-INH, 2,4-DHAF-INH, HMAF-INH a 2-HAF-INH. Látky 2-HPF-INH a 2,6-DHAF-INH vykazaly obdobnou míru toxického působení jako SIH (obr.5.5., 5.6., tab. 5.1.)

Mírné a statisticky nevýznamné snížení buněčné viability po 72 hodinové inkubaci H9c2 buněk se 100 μ M chelátorů železa bylo pozorováno u chelátoru HNAF-INH a AHC-INH. Při použití 100 μ M SIH došlo ke snížení viability buněk o 68% oproti kontrolní skupině. Statisticky významně nižší dlouhodobá toxicita oproti SIH byla pozorována u chelátorů HNAF-INH (snížení viability buněk o 21 % oproti kontrole) a AHC-INH (o 20%). U těchto dvou látek také nedosáhlo snížení viability oproti kontrolním hodnotám statistické významnosti (obr. 5.5.).



Obr. 5.5.: Viabilita buněk H9c2 po 72 hodinové expozici 100 μ M jednotlivých chelátorů železa.

Statisticky významně odlišné výsledky oproti kontrolní skupině (ANOVA, $P < 0,01$), jsou označeny symbolem *, oproti skupině inkubované s 100 μ M SIH pak symbolem \$. Data jsou uváděna jako průměrné hodnoty se standardní chybou.



Obr. 5.6.: Porovnání viabilit H9c2 buněk po 72 hodinové inkubaci se zvyšujícími se koncentracemi jednotlivých chelátorů.

Poměry antioxidačních aktivit (vyjádřených jako EC_{50}) a vlastních toxicit (IC_{50}) jsou pro jednotlivé látky shrnuty v tab. 5.1. Velmi obdobné hodnoty EC_{50} a IC_{50} jako u modelového chelátoru SIH (a tím i jejich poměr) byly zaznamenány i u 2-HPF-INH. Poměr EC_{50}/IC_{50} je v porovnání se SIH dále srovnatelný u HNAF-INH, kde se rovným dílem snížila jak protektivní aktivita tak toxicita. Zajímavých výsledků bylo dosaženo u nově syntetizovaného chelátoru 2-HAF-INH, nejbližšího analogu SIH. 100 μ M koncentrace tohoto agens zajistila 90% ochranu proti působení t-BHP, zatímco SIH 66% (obr. 5.2.). Zatímco 2-HAF-INH nevykázal žádnou akutní toxicitu, SIH snížil počet buněk o 45%, při testování po dobu 72 hodin nicméně byla již toxicita vyšší než u SIH, došlo ke snížení viability o 88%, zatímco u SIH o 68% (obr. 5.4.). Poměr $EC_{50}(24h)/IC_{50}(72h)$ je tak u 2-HAF INH mírně horší než u SIH. Lepší poměr EC_{50}/IC_{50} byl dosažen u dvou látek - AHC-INH a 4,6-DAR

INH. V obou případech byl pokles protekce před toxicitou t-BHP doprovázen ještě výraznějším snížením vlastní toxicity látek. U čtyř zbývajících látek byl index EC_{50} / IC_{50} v porovnání se SIH horší a to i přes to, že u 2,4-DHAF-INH a CAF-INH byla zdvojnásobena jejich protektivní účinnost (dosaženy poloviční hodnoty EC_{50} oproti chelátoru SIH). Toxicita zde ale byla při 72h (ale nikoliv 24h) inkubaci vyšší než u SIH. HMAF-INH vykázal srovnatelnou protektivní účinnost, ale vyšší toxicitu (po 72h inkubaci) než SIH; u 2,6-DHAF-INH byla naopak srovnatelná toxicita, ale nižší protekce (tab. 5.1.).

Ani po důkladné analýze nelze z dat, které máme v současné chvíli k dispozici, vyvodit jednoznačné závěry o vztazích mezi chemickou strukturou, protektivní účinností a toxicitou těchto nových látek. Je zřejmé, že ani jedna z těchto vlastností přímo nekoreluje s prostou schopností vázat trojmocné železo, která je u všech těchto látek prakticky totožná (obr. 5.1.). Jejich studium proto dále pokračuje. V nejbližší době by měly být na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv FaF UK dokončeny studie stability těchto látek v biologickém prostředí (králičí plasma). Snadná hydrolýza hydrazonové vazby má za následek rozpad chelátorů na isoniazid a příslušný aromatický aldehyd (salicylaldehyd v případě SIH) nebo keton (nové chelátory). Rychlost a míra tohoto rozpadu by mohly ovlivnit jak antioxidační aktivitu, tak toxicitu, která je podle našich představ primárně navozena odnětím železa z pro buňku životně důležitých proteinů. Bylo by proto vhodné otestovat toxicity (i případné antioxidační aktivity) těchto rozkladných produktů. Zajímavé by také bylo provést experimenty s komplexy (cheláty) zkoumaných látek s železem, což by mělo odlišit toxicitu způsobenou deplecí železa od jejich "vlastní" toxicity. Všechny tyto látky jsou v současnosti také na katedře biochemických věd FaF UK testovány jako potenciální antiproliferativní agens. Hodnoceny jsou účinky na proliferaci dvou nádorových linií, HL-60 (odvozené z buněk humánní promyelocytární leukémie) a MCF-7 (adenokarcinom prsu), které reprezentují jak hematologické malignity, tak i solidní nádory. Důležitá pak bude míra selektivity toxicity chelátorů vůči nádorovým buňkám v porovnání s nenádorovými.

	EC₅₀[μM] (24 h)	IC₅₀[μM] (72 h)	EC₅₀/IC₅₀
SIH	18,2	29,7	0,61
2-HAF-INH	11,4	12,2	0,93
2,4-DHAF-INH	9,2	2,7	3,45
2,6-DHAF-INH	48,3	31,2	1,55
HMAF-INH	21,2	9,5	2,22
HNAF-INH	68,5	> 100 109,3	0,63
4,6-DAR-INH	39,9	73,3	0,54
2-HPF-INH	17,8	29,2	0,61
AHC-INH	56,3	> 100 (129,2)	0,44
CAF-INH	9,5	4,8	1,97

Tab. 5.1.: Přehled a porovnání hodnot EC₅₀ (koncentrace chelátorů, které o 50% snížily toxicitu navozenou 24h inkubací H9c2 buněk s 200 μM tBHP) a IC₅₀ (koncentrace chelátorů, které při 72h inkubaci snížily viabilitu H9c2 buněk na 50% kontrolních hodnot)

6. Závěry

- Potvrdili jsme výsledky předchozích studií prokazující výrazné a statisticky významné protektivní vlastnosti chelátoru železa SIH pro ochranu buněk H9c2 před toxickým působením t-BHP. Hodnota EC_{50} byla při použití 200 μM t-BHP stanovena 18,2 μM .
- Protekce buněk před oxidačním poškozením byla potvrzena u všech nových aroylhydrazonových chelátorů železa odvozených od struktury SIH.
- Zjistili jsme, že obměny ve struktuře SIH mohou ovlivnit protektivní vlastnosti chelátoru železa. K významnému zesílení protektivních vlastností došlo náhradou salicylaldehydu metylketonem (chelátor 2-HAF-INH), kdy bylo dosaženo hodnoty EC_{50} 11,4 μM . Naopak nejhorších výsledků bylo dosaženo po včlenění nitroskupiny do základní struktury (chelátor HNAF-INH), tato látka měla EC_{50} 68,5 μM .
- Statisticky významná akutní (24h) toxicita nebyla ve srovnání se SIH zjištěna u žádného nového chelátoru s výjimkou chlorovaného analogu CAF-INH.
- Toxické vlastnosti po 72 hodinové inkubaci (dlouhodobá toxicita) byly pozorovány u všech testovaných chelátorů. Hodnota IC_{50} SIH odpovídá koncentraci 29,7 μM . Toxičtější než SIH byla po dlouhodobé inkubaci většina chelátorů, výjimku tvoří HNAF-INH a AHC-INH, u kterých nedošlo ke statisticky významnému snížení viability buněk u žádné z testovaných koncentrací (≤ 100 μM).
- Jako antioxidačně nejúčinnější chelátor železa byl z celé skupiny nových aroylhydrazonů vyhodnocen 2-HAF-INH. Ten měl ve srovnání se SIH nižší hodnotu EC_{50} (11,4 μM), akutní toxicita nebyla u tohoto chelátoru vůbec pozorována. Vyšší hodnotu toxicity po dlouhodobé inkubaci ($IC_{50} = 12,2$ μM) lze zřejmě přičítat výraznějším schopnostem tohoto ligandu vyvazovat železo z životně důležitých proteinů buněk.
- Chelátor s nejvýhodnějším poměrem cytoprotektivních a toxických vlastností při dlouhodobé (72h) inkubaci je AHC-INH, kde pokles protekce před t-BHP byl doprovázen ještě výraznějším snížením toxicity.

7. Použitá literatura

- Abas L, Bogoyevitch MA, Guppy M.: Mitochondrial ATP production is necessary for activation of the extracellular-signal-regulated kinases during ischaemia/reperfusion in rat myocyte-derived H9c2 cells. *Biochem J.* 2000; 349:119-26
- Albelda SM, Smith CW, Ward PA.: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 1994; 8(8):504-12.
- Arrigo AP.: Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(9- 10):936-44.
- Baird SK, Kurz T, Brunk UT.: Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem J.* 2006; 394:275-83.
- Balcerczyk A, Sowa K, Bartosz G.: Metal chelators react also with reactive oxygen and nitrogen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 352(2):522-5.
- Bauerová K, Bezek A.: Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys.* 1999; 18:15-20.
- Becker LB.: New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res.* 2004; 61(3):461-70.
- Bergeron RJ, Wiegand J, McManis JS, McCosar BH, Weimar WR, Brittenham GM, Smith RE.: Effects of C-4 stereochemistry and C-4' hydroxylation on the iron clearing efficiency and toxicity of desferrithiocin analogues. *J Med Chem.* 1999; 42(13):243-240 .
- Brecht DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH.: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 1991; 351(6329):714-8.
- Buss JL, Ponka P.: Hydrolysis of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1619(2):177-86.
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J.: Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging.* 2002; 23(5):655-64.
- Cadenas E.: Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997; 6(4):391-7.

- Cadenas E, Sies H.: The lag phase. *Free Radic Res.* 1998; 28(6):601-9.
- Cai J, Jones DP.: Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem.* 1998; 273(19):11401-4.
- Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F.: Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9(11):639-43.
- Debebe Z, Ammosova T, Jerebtsova M, Kurantsin-Mills J, Niu X, Charles S, Richardson DR, Ray PE, Gordeuk VR, Nekhai S.: Iron chelators ICL670 and 311 inhibit HIV-1 transcription. *Virology.* 2007; 367(2):324-33.
- Double KL, Maywald M, Schmittel M, Riederer P, Gerlach M.: In vitro studies of ferritin iron release and neurotoxicity. *J Neurochem.* 1998; 70(6):2492-9.
- Dröge W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1):47-95.
- Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR.: Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 2007; 17(2):93-100.
- Galey JB.: Recent advances in the design of iron chelators against oxidative damage. *Mini Rev Med Chem.* 2001; 1(3):233-42.
- Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine.* 2007. Oxford University Press
- Harman D.: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956; 11(3):298-300.
- Heinz U, Hegetschweiler K, Acklin P, Faller B, Lattmann R, Schnebli HP.: 4-[3.5-bis-(2-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl]-benzoic acid: a novel efficient and selective iron(III) complexing agent. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1999; 38(17):2568-2570.
- 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.
- Hoidal JR.: Reactive oxygen species and cell signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 25(6):661-3.
- Horackova M, Ponka P, Byczko Z.: The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H₂O₂ injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2000; 47(3):529-36.
- Charkoudian LK, Dentchev T, Lukinova N, Wolkow N, Dunaief JL, Franz KJ.: Iron prochelator BSIH protects retinal pigment epithelial cells against cell death induced by hydrogen peroxide. *J Inorg Biochem.* 2008; 102(12):2130-5.

- Jacobs DL, Watt GD, Frankel RB, Papaefthymiou GC.: Redox reactions associated with iron release from mammalian ferritin. *Biochemistry*. 1989; 28(4):1650-5.
- Jenner P.: Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003; 53:S26-36.
- Jirkovský E.: Studium chelátoru železa salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) pro prevenci poškození srdečních buněk oxidačním stresem. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2008.
- Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P.: Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(4):625-35.
- 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:H1626-34.
- Kalinowski DS, Richardson DR.: The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev*. 2005; 57(4):547-83.
- Keisari Y, Braun L, Flescher E.: The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology*. 1983; 165(1):78-89.
- Kim JA, Kang YS, Kim YO, Lee SH, Lee YS.: Role of Ca²⁺ influx in the tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 human hepatoblastoma cells. *Exp Mol Med*. 1998; 30(3):137-44.
- Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT.: Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J*. 2006; 273(13):3106-17.
- Lane N.: *Oxygen, the molecule that made the world*. 2002. Oxford University Press
- L'Ecuyer T, Horenstein MS, Thomas R, Vander Heide R.: Anthracycline-induced cardiac injury using a cardiac cell line: potential for gene therapy studies. *Mol Genet Metab*. 2001; 74(3):370-9.
- Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J: *Biochemie pro studující medicíny*. 2005. Karolinum
- Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL, Herman B. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr*. 1999; 31(4):305-19.
- Liochev SI, Fridovich I.: The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep*. 2002; 7(1):55-7.
- Los M, Dröge W, Stricker K, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K.: Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol*. 1995; 25(1):159-65.

- Mačák J, Mačáková J.: Patologie. 2004. Grada Publishing
- Miller DM, Buettner GR, Aust SD.: Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8(1):95-108.
- Morris JG.: Fifth Stenhouse-Williams memorial lecture. Oxygen and the obligate anaerobe. *J Appl Bacteriol.* 1976; 40(3):229-44.
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H.: Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004; 279(47):49064-73.
- Muth CM, Glenz Y, Klaus M, Radermacher P, Speit G, Leverve X.: Influence of an orally effective SOD on hyperbaric oxygen-related cell damage. *Free Radic Res.* 2004; 38(9):927-32.
- Nečas O, Svoboda A, Hejtmánek M, Janisch R, Červinka M, Lenhart K, Kolář Z: *Obecná biologie.* 2000. H&H
- Nick H, Acklin P, Lattmann R, Buehlmayer P, Hauffe S, Schupp J, Alberti D.: Development of tridentate iron chelators: from desferrithiocin to ICL670. *Curr Med Chem.* 2003; 10(12):1065-76.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B.: Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007; 12(5):913-22.
- Pahl PM, Horwitz MA, Horwitz KB, Horwitz LD.: Desferri-exochelin induces death by apoptosis in human breast cancer cells but does not kill normal breast cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2001; 69(1):69-79.
- Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M.: A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.* 2000; 304(1):55-68.
- Petrat F, de Groot H, Rauen U.: Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem J.* 2001; 356:61-9.
- Planalp RP, Przyborowska AM, Park G, Ye N, Lu FH, Rogers RD, Broker GA, Torti SV, Brechbiel MW.: Novel cytotoxic chelators that bind iron(II) selectively over zinc(II) under aqueous aerobic conditions. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30(4):758-62.
- 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.
- Pourzand C, Watkin RD, Brown JE, Tyrrell RM.: Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(12):6751-6.

- Prohaska JR, Gybina AA.: Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr.* 2004; 134(5):1003-6.
- 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.: Analogues of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) as potential iron chelators for the treatment of neoplasia. *Leuk Lymphoma.* 1998; 31(1-2):47-60.
- Richardson DR, Tran EH, Ponka P.: The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood.* 1995; 86(11):4295-306.
- Sardão VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB.: Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide--characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biol.* 2007; 8:11.
- Sayre LM, Smith MA, Perry G.: Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem.* 2001; 8(7):721-38.
- Schafer FQ, Buettner GR.: Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30(11):1191-212.
- Schraufstatter 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.: Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993; 215(2):213-9.
- Šimůnek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Sterba M, Gersl 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.
- Štípek S et al.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci.* 2000. Grada Publishing
- 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.
- Tenopoulou M, Kurz T, Doulias PT, Galaris D, Brunk UT.: Does the calcein-AM method assay the total cellular 'labile iron pool' or only a fraction of it? *Biochem J.* 2007; 403(2):261-6.
- Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY.: Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase J pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *Mol Cell Cardiol.* 1998; 30(9):1789-801.

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84.
- Vitolo ML, Clare BW, Hefter GT, Webb J.: Chemical studies of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone relevant to its clinical evaluation. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1988; 23(5B):71-9.
- Vokurka M, Hugo J.: *Velký lékařský slovník.* 2002. Maxdorf
- Von Sonntag C: *The chemical basis of radiation biology.* 1987. Taylor and Francis.
- Voogd A, Sluiter W, van Eijk HG, Koster JF.: Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. *J Clin Invest.* 1992; 90(5):2050-5.
- Weiss G, Kastner S, Brock J, Thaler J, Grünewald K.: Modulation of transferrin receptor expression by dexrazoxane (ICRF-187) via activation of iron regulatory protein. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53(10):1419-24.
- Yuan XM, Li W, Brunk UT, Dalen H, Chang YH, Sevanian A.: Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(2):208-18.

8. Přehled zkratek

A β	amyloid- β peptid	HC 1	hem-oxygenáza
AD	Alzheimerova choroba	HCP 1	hem přenášející protein
AIF	apoptózu indukující faktor	HFE	gen hemochromatózy
Apaf-1	faktor aktivující apoptotickou proteázu 1	HJV	homojuvelin
APP	amyloid- β prekurzorový peptid	HNE	4-hydroxy-2-nonenal
ATP	adenosin trifosfát	Hp	ferooxidační hephaestin
CAT	kataláza	ICL670A	deferasirox
cGMP	cyklický guanosin monofosfát	L1	deferipron
CP21	deferipron	iNOS	indukovatelná NO-syntáza
CYP 450	cytochrom P450	MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
DCT 1	protein vyvolávající přírozenou rezistenci makrofágů	MDA	malondialdehyd
Dcytb	duodenální cytochrom b	mDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
DFO	desferoxamin	MODS	syndrom multiorgánového selhání
DFT	desferithiocin	MPO	myeloperoxidáza
DMT 1	přenašeč bivalentních kovů 1	MPT	změna permeability membrány
DNA	deoxyribonukleová kyselina	NAD ⁺ /NADH	nikotinamid dinukleotid
ER	endoplazmatické retikulum	nNOS	neuronální NO-syntáza
eNOS	endoteliální NO-syntáza	NOS	NO-syntáza
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina	Nramp2	protein vyvolávající přírozenou rezistenci makrofágů
FAD/FADH ₂	flavin adenin dinukleotid	PARP 1	poly(ADP- ribóza)polymeráza 1
FMN/FMNH ₂	flavin mononukleotid	PCIH	2-pyridylcarboxaldehyd isonicotinoyl hydrazon
FPN 1	feroportin 1	PD	Parkinsonova choroba
GIT	gastrointestinální trakt	PIH	pyridoxal isonicotinoyl hydrazon
GPx	glutathion-peroxidáza		
GSH	glutathion		

PKIH	di-2-pyridylketon isonicotinoyl hydrazon
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
RS	reaktivní sloučeniny
sGC	rozpustná guanylát-cykláza
SIH	salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazon
SOD	superoxid-dismutáza
Tf	transferin
TfR 2	receptor pro transferin 2
TNF	tumor nekrotizující faktor
t-BHP	tert-buthylhydroperoxid
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TRX	thioredoxin
XDH	xanthin-dehydrogenáza
XO	xanthin-oxidáza

