

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



**VLIV SERCA INHIBITORŮ NA PRODUKCI OXIDU
DUSNATÉHO A SEKRECI CYTOKINŮ
V MAKROFÁGÁCH**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.

Praha 2011

Eva Vandasová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla vyžita k získání jiného nebo stejného titulu.

Děkuji Doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc. za odborné vedení diplomové práce a poskytnutí odborných materiálů a Doc. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za cenné připomínky.

Obsah

Abstrakt	6
Zkratky	8
1. Úvod	10
2. Současný stav řešené problematiky	11
2.1 <i>Ca²⁺-ATPáza sarko/endoplazmatického retikula (SERCA)</i>	11
2.1.1 Popis a základní vlastnosti.....	11
2.1.2 Nemoci SERCA.....	15
2.1.3 Regulace SERCA.....	18
2.1.4 Farmakologické ovlivnění SERCA.....	20
2.2 <i>Oxid dusnatý</i>	30
3. Zadání práce	33
4. Experimentální část	34
4.1 <i>Zvířata a buněčné modely</i>	34
4.2 <i>Chemikálie</i>	35
4.3 <i>Použité metody</i>	35
5. Výsledky	37
5.1 <i>Produkce NO</i>	37
5.2 <i>Viabilita buněk</i>	40
5.3 <i>Produkce NO v přítomnosti modulátorů SERCA</i>	42
5.4 <i>Produkce IFN-γ</i>	43
5.5 <i>Produkce TNF-α</i>	45
6. Diskuze	46
7. Shrnutí závěrů práce	50
8. Literatura	51

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Eva Vandasová

Školitel: Doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.,

Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv SERCA inhibitorů na produkci oxidu dusnatého a sekreci cytokinů v makrofágách

Seskviterpenové laktony rostlinného původu thapsigargin (TG) a trilobolid (TB) jsou silnými inhibitory Ca^{2+} -ATPázy sarko/endoplazmatického retikula (SERCA), zvyšují tak koncentraci intracelulárního vápníku. Navíc bylo zjištěno, že TG projevuje určité imunoterapeutické vlastnosti. Ničí pomalu proliferující a neproliferující buňky a inhibuje replikaci virů. Cílem práce bylo sledování imunomodulačního potenciálu těchto látek a látek chemicky rozdílných od seskviterpenických laktonů TG a TB, např. klotrimazolu, artemisininu, dihydroartemisininu a kurkuminu. Tato léčiva jsou rovněž spojena s inhibicí SERCA. Účinek byl analyzován na kulturách potkaních a myších residentních peritoneálních makrofágů. Produkce oxidu dusnatého (NO) zvířecími makrofágy byla stanovena pomocí Grisseova činidla po 24hodinové kultivaci. Hladiny cytokinů v supernatantu byly určeny metodou ELISA po 5-24hodinové kultivaci. Potkaní peritoneální makrofágy produkovaly vysoké množství NO po stimulaci TG a TB bez jakéhokoli imunitního stimulu (lipopolysacharid) v porovnání s ostatními testovanými SERCA inhibitory. Inhibiční účinky některých látek (kurkumin, klotrimazol) na produkci NO jsou spojeny s jejich cytotoxicitou. Sloučeniny, které jsou schopné stimulovat syntézu NO, jsou schopné vyvolat sekreci cytokinů (IFN- γ , TNF- α). Takový potenciál projevoval TG a TB. Produkce NO zůstala nezměněna v přítomnosti chelátoru vápníku TMB-8 a inhibitoru uvolňování vápníku ze sarko/endoplazmatického retikula dantrolenu. Závěr této diplomové práce je, že imunostimulační účinek je strukturně spojený se seskviterpeno-vými laktony a zdá se, že přímo nesouvisí se zvýšením intracelulárního vápníku vyvolaném TG a TB.

Práce byla podporována grantem GAČR 305/07/0061.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Eva Vandasová

Supervisor: Doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.

Doc. Pharm.Dr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of diploma thesis: The influence of SERCA inhibitors on production of nitric oxide and secretion of cytokines in macrophages

Sesquiterpene lactones of plant origin such as thapsigargin (TG) and trilobolide (TB) are potent inhibitors of sarco/endoplasmic Ca^{2+} -ATPase (SERCA), enhancing thus concentration of intracellular calcium. TG has been found to exhibit prospective immunotherapeutic properties. It inhibits growth of slowly proliferating and non-proliferating cells, and inhibits replication of viruses. The aim of present work was to investigate immunomodulatory potential of these compounds and compounds chemically different from sesquiterpene lactone TG, i.e. clotrimazole, artemisinin, dihydroartemisinin, curcumin. All these drugs are related to SERCA inhibition. The effects were analyzed in cultures of rat and mouse resident peritoneal cells. Production of nitric oxide (NO) by animal macrophages was assayed using the Griess reagent after 24hour's culture. Supernatant levels of cytokines were determined by ELISA after 5-24hour's of culture. The rat peritoneal macrophages produced high amounts of NO upon stimulation with TG and TB without any other immune stimulus (lipopolysaccharide) in comparison to other test SERCA inhibitors. The inhibitory effects of some drugs (curcumin, clotrimazole) on NO production are mainly due to their cytotoxicity. The compounds which are able to stimulate NO synthesis were able to induce secretion of cytokines (IFN- γ , TNF- α). Such potential was possessed by TG and TB. Production of NO remained unchanged in the presence of calcium chelating agents TMB-8 and the inhibitor of calcium release from sarco/endoplasmic reticulum dantrolen. It can be concluded that the immuno-stimulatory mode of action is structurally-related to sesquiterpene lactones and is unlikely the consequence of the intracellular calcium, which is enhanced by TG and TB.

Acknowledgements. The work was supported by the grant GAČR 305/07/0061.

Zkratky

ATF3	activating transcription factor 3
AP-1	activator protein-1
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CLT	klotrimazol
CPA	cyklopiazonová kyselina
CRP	C-reaktivní protein
COX	cyklooxygenáza
DHA	dihydroartemisinin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBV	virus Epstein-Baarové
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
ER	endoplazmatické retikulum
GFR	grow factor receptors
HIV	human immunodeficiency virus
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IFN	interferon
I κ B	inhibitor NF- κ B
IL	interleukin
IP ₃	inositol trifosfát
LOX	lipoxygenáza
LPS	lipopolysacharid
PMCA	Ca ²⁺ -ATPáza plazmatické membrány
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NO	oxid dusnatý

NOS	syntáza oxidu dusnatého
PAF	platelet activating factor
PLB	fosfolamdan
PPAR γ	proliferator-activated receptor γ
PSA	prostatický specifický antigen
RANKL	receptor activator for NF- κ B ligand
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SERCA	Ca ²⁺ -ATPáza sarko/endoplazmatického retikula
SLN	sarkolipin
SP-1	specifity protein-1
SR	sarkoplazmatické retikulum
STAT-3	signal transducers and activators of transcription protein-3
uPA	urokinase plasminogen activator
tBHQ	2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydrochinon
TB	trilobolid
TG	thapsigargin
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Úvod

Thapsigargin (TG) je seskviterpenový lakton s prokázanou protinádorovou a protivirovou aktivitou. TG patří do skupiny SERCA inhibitorů. Do této skupiny patří i artemisinin, léčivo používané k terapii malárie, dihydroartemisinin (DHA), klotrimazol, látka s antimykotickými vlastnostmi, a kurkumin, hlavní sloučenina obsažená v kari koření.

Jednou z efektorových molekul kontrolující replikaci virů je oxid dusný (NO). Bylo zjištěno, že TG sám nebo v kombinaci s lipopolysacharidem (LPS) stimuluje biosyntézu NO v myších a potkaních peritoneálních makrofágách. Biosyntéza NO je stimulována řadou cytokinů (např. IFN- γ , TNF- α), často v synergických kombinacích.

V této práci chci s využitím spektrofotometrické metody studovat imunomodulační potenciál daných látek a léčiv. V *in vitro* podmínkách bude sledována produkce NO a sekrece cytokinů na modelu peritoneálních potkaních a myších makrofágů.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Ca^{2+} -ATPáza sarko/endoplazmatického retikula (SERCA)

2.1.1 Popis a základní vlastnosti

SERCA je jednou ze tří Ca^{2+} -ATPáz, které byly popsány u vyšších živočichů. Jak již z názvu vyplývá, SERCA jsou umístěny v membránách sarko(endoplazmatického) retikula. Avšak i membrána buněčného jádra a membrány Golgiho aparátu obsahují SERCA (Brini a Carafoli 2009).

Ca^{2+} -ATPázy (pumpy) hrají klíčovou roli při regulaci Ca^{2+} iontů v eukaryotických buňkách, a tedy jsou nezbytné pro správné fungování celého buněčného systému. Mají vysokou afinitu k Ca^{2+} iontům a efektivně udržují jeho homeostázu.

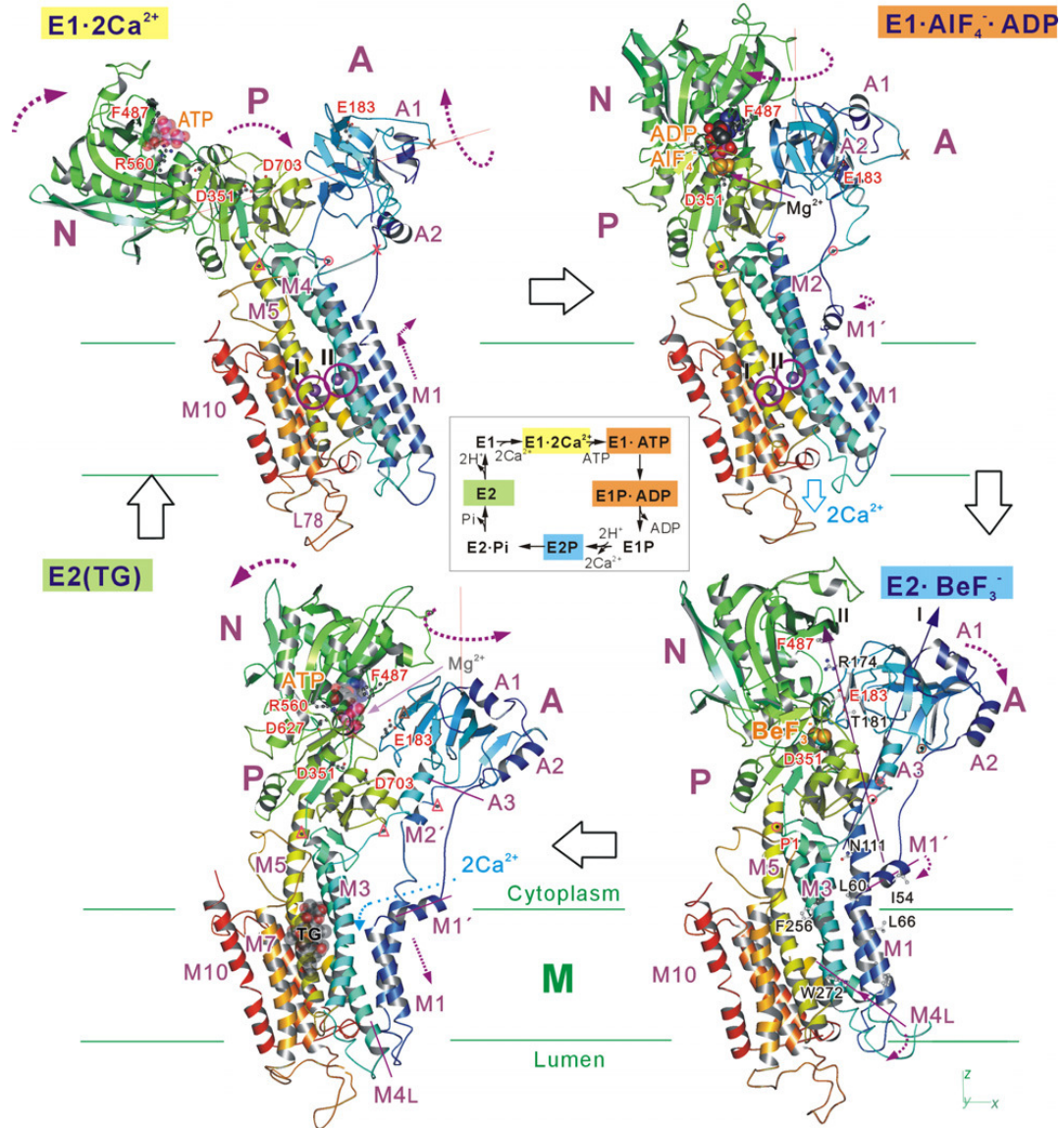
Je velmi dobře známo, že Ca^{2+} ionty se uplatňují jako molekulové signály v mnohých fyziologických i patofyziologických drahách, jako jsou genová transkripce, svalová kontrakce, sekrece (včetně neurotransmiterů) a produkce energie v různých metabolických drahách. Ca^{2+} ionty regulují širokou škálu základních funkcí, od vzniku nové buňky při oplodnění až po její zánik při procesu programované buněčné smrti (Carafoli 2003). SERCA pumpy kontrolují IP_3 – zprostředkovanou Ca^{2+} signalizaci (Camacho a Lechleiter 1993).

Hlavní zásobárnou intracelulárního Ca^{2+} je endoplazmatické retikulum (ER), kde koncentrace volného Ca^{2+} je o 3-4 řády vyšší než v cytosolu. Právě tento gradient je tvořen a udržován pomocí SERCA (Berridge 2002). Ve svalových buňkách hraje intracelulární transportní membránový systém SR centrální úlohu ve skladování a uvolnění Ca^{2+} během cyklu kontrakce a relaxace. Po excitaci myocyty je Ca^{2+} uvolněn ze SR přes ryanodine receptor- Ca^{2+} kanál a dochází ke kontrakci. Následná svalová relaxace se objeví po návratu Ca^{2+} zpět do lumen SR pomocí SERCA (Snajdrova a kol. 1998).

SERCA byla objevena jako první ATP-řízený transportní systém Ca^{2+} v letech 1961-1962 ve frakci kosterního svalu (Hasselbach a Makinose 1961, Ebashi F. a Ebashi S. 1962). Během několika let byla vyčištěna a identifikována jako protein o přibližně 110 kDa (MacLennan 1970). Enzym je tvořen jednoduchým polypeptidovým řetězcem organizovaným do 4 hlavních domén, jedné transmembránové domény (M) a třech cytosolických domén (viz. obrázek 1). Transmembránová doména je složena z 10 transmembránových helixů (M1-M10). Dvě cytosolické domény, doména A (actuator) a doména P (phosphorylation), jsou spojeny s M doménou. Funkce domény A je regulace navázání a uvolnění Ca^{2+} . Třetí cytosolická doména N (nukleotide-binding) je spojena s P doménou. SERCA má 2 vysoce afinní vazebná místa (místo I a místo II) pro Ca^{2+} v M doméně. Obě Ca^{2+} vazebná místa jsou lokalizována blízko cytosolickému povrchu lipidové dvojvrstvy. Místo I je lokalizováno mezi M8 a M5 a místo II mezi M6 a M4. Na obou místech Ca^{2+} koordinuje se sedmi kyslíky zbytků v M4, M5, M6 a M8 (Toyoshima 2008).

Tři geny (*ATP2A1-3*) kódují 3 hlavní SERCA proteiny. Každý ze tří transkriptů dále podstupuje tkáňově-specifický alternativní sestřih, což zvyšuje počet variant SERCA, lišících se v oblasti C-konce. Každá izoforma má tkáňově-specifický výskyt a je přizpůsobena ke specifickým funkcím. SERCA1a a SERCA1b jsou exprimovány v rychlých vláknech kosterních svalů. SERCA2a je syntetizována převážně v pomalých vláknech kosterních svalů a v srdeční svalovině, zatímco SERCA2b se vyskytuje v mnoha typech buněk. SERCA3 je exprimována v nesvalových buňkách, ve větší míře v tlustém a tenkém střevu, thymu a v mozečku a v menší míře v lymfatických uzlinách a plicích. SERCA3 se hojně nachází v izolovaných lymfocytech potkaní sleziny, v různých myších lymfoidních buněčných liniích a v základních kultivovaných mikrovaskulárních endoteliálních buňkách (Wu a kol. 1995). Byla také nalezena v krevních destičkách (Treiman a kol. 1998) a v beta-buňkách pankreatu (Arredouani a kol. 2002). U lidí bylo popsáno 6 možných variant SERCA3 (a-f), generovaných díky alternativnímu sestřihu dvou exonů (Brini a Carafoli 2009). SERCA3 má zřejmou výrazně nižší afinitu k Ca^{2+} než ostatní základní izoformy. Zdá se, že je specializována ke kontrole relaxace vaskulární a tracheální hladké svaloviny. Nízká afinita k Ca^{2+} naznačuje, že SERCA3 pumpa se aktivuje, jen když cytosolická koncentrace Ca^{2+} dosáhne abnormálně vysokých hladin, např. při masivní buněčné stimulaci agonisty. Je

zajímavé, že je skoro vždy koexprimována s všudypřítomnou SERCA2b a po odstranění genu nenásledují žádné obvyklé patologické fenotypy (Liu a kol. 1997).



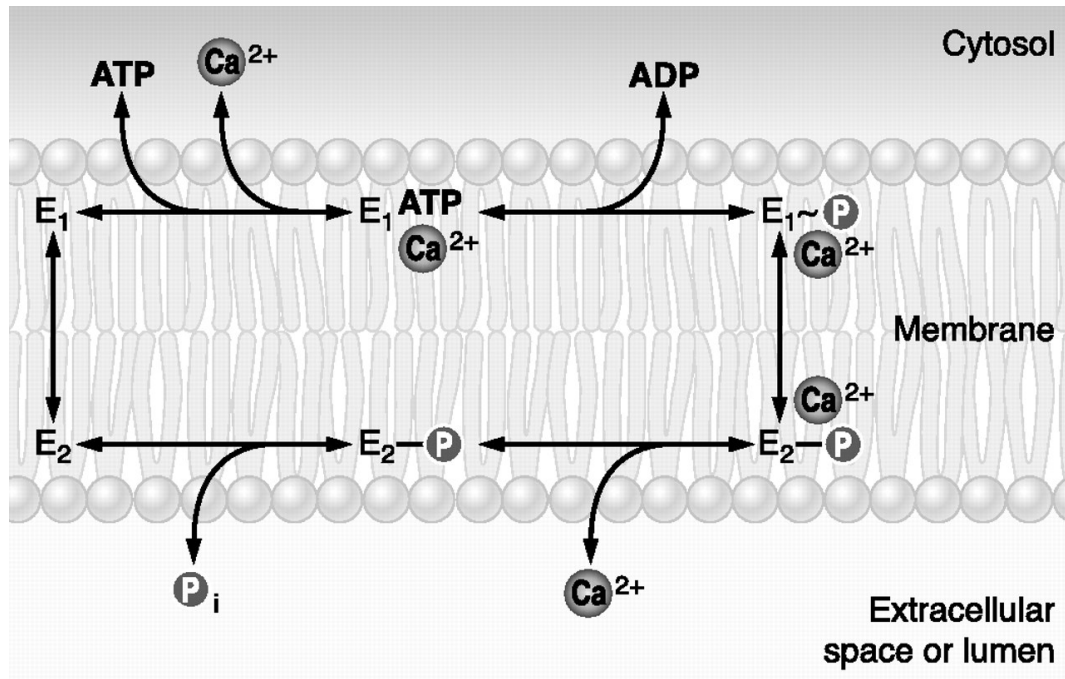
Obrázek 1 Struktura Ca²⁺-ATPázy ve 4 různých stavech a zjednodušené reakční schéma transportního cyklu Ca²⁺-ATPázy

Na obrázku jsou znázorněny tři cytosolické domény A, N a P a trasmembránová doména M. Barva koresponduje se strukturou pumpy, postupně se mění od amino konce (modrá) ke karboxylovému konci (červená). Fialové kroužky představují navázaný Ca²⁺. Obrázek převzat z práce Toyoshima (2008).

Lytton a spolupracovníci (1992) ukázali, že všechny SERCA pumpy jsou aktivovány zvýšenou cytosolickou koncentrací Ca^{2+} a že izoformy se liší v sensitivitě k Ca^{2+} . SERCA3 má nejnižší senzitivitu k Ca^{2+} ($K_d \approx 1 \mu\text{M}$), zatímco SERCA1 má střední senzitivitu ($K_d \approx 400 \text{ nM}$). Dva produkty alternativního sestřihu SERCA2 genu se liší kromě tkáňově specifického výskytu v senzitivě k Ca^{2+} , rychlosti transportu Ca^{2+} a ATP hydrolyzy. SERCA2a má střední senzitivitu k cytosolickému Ca^{2+} ($K_d \approx 400 \text{ nM}$) a je funkčně nerozeznatelná od SERCA1. Naopak SERCA2b má nejvyšší citlivost pro Ca^{2+} ($K_d \approx 200 \text{ nM}$) a nejnižší transportní kapacitu ze všech SERCA pump (John a kol. 1998).

Zpočátku byl transportní proces studován na sarkoplazmatickém retikulu (SR) kosterní a srdeční svaloviny, ale práce byly později rozšířeny na ER všech buněk. Nicméně SR zůstává preferovaným předmětem výzkumu, díky hojnému zastoupení transportních pump v jeho membráně (až 90 % ze všech proteinů), což usnadňuje jeho izolaci a čištění. SERCA transportuje Ca^{2+} z cytosolu do ER. Jedná se o aktivní transport proti koncentračnímu gradientu, který vyžaduje energii ve formě ATP. Zjednodušený transportní proces je znázorněn na obrázku 1 a 2. Pumpy existují ve 2 hlavních konformačních stavech: E_1 stav, ve kterém má enzym vysokou afinitu a interaguje s Ca^{2+} na cytosolické straně membrány, a E_2 stav, ve kterém nízká afinita k Ca^{2+} vede k uvolnění na lumenální straně membrány. Katalytický cyklus vyžaduje 1 molekulu ATP, která se naváže na enzym za vzniku fosforylovaného intermediátu. Na rozdíl od ostatních Ca^{2+} -ATPáz dojde k navázání a translokaci 2 iontů Ca^{2+} (Brini a Carafoli 2009). Katalytický cyklus SERCA vyžaduje počáteční aktivaci navázáním 2 molů Ca^{2+} a 1 molu Mg^{2+} -ATP na enzym ve stavu E_1 z cytosolické strany, následuje hydrolyza ATP pro vytvoření fosforylovaného intermediátu $E_1\text{PCa}^{2+}$ a konformační změna na $E_2\text{PCa}^{2+}$ s nízkou afinitou pro Ca^{2+} ionty. Vazebná místa pro Ca^{2+} se obrátí směrem do lumen ER a Ca^{2+} disociují do lumen ER. Cyklus se uzavírá hydrolytickým štěpením fosfoenzymu $E_2\text{P}$, kde P_i se uvolňuje do cytoplazmy a forma E_2 izomeruje na E_1 (Snajdrova a kol. 1998).

Všechny tři živočišné Ca^{2+} pumpy patří do rodiny P-tyt ATPázy, které jsou charakterizovány dočasným uchováním energie ATP ve formě fosforylovaného intermediátu enzymu (Brini a Carafoli 2009).



Obrázek 2 Zjednodušené reakční schéma transportního cyklu SERCA

Schéma zahrnuje 2 konformační stavy pumpy: E₁ stav, ve kterém má enzym vysokou afinitu a interaguje s Ca²⁺ na cytosolické straně membrány, a E₂ stav, ve kterém nízká afinita k Ca²⁺ vede k uvolnění na lumenální straně membrány. Obrázek převzat z práce Brini a Carafoli (2009).

2.1.2 Nemoci SERCA

Dosud byly popsány 2 genetické choroby spojené s mutací genů SERCA, Brodyho choroba a Darierova choroba. Avšak genové inaktivační studie na myších odhalily další patologické fenotypy, rozdílné od těchto lidských nemocí.

Brodyho choroba je vzácné dědičné onemocnění kosterních svalů, charakterizované poškozenou relaxací, bezbolestnými křečemi a ztuhlostí po cvičení, které se nejvíce projevuje v nohách, pažích a očních víčkách (Brody 1969). Klinická diagnóza je obtížná, poněvadž symptomy jsou spíše heterogenní a nespecifické. Byla hlášena snížená aktivita SERCA1 v biopsiích čtyřhlavého svalu a v kultivovaných svalových buňkách. V některých případech byla zpozorována snížená exprese SERCA1 v rychlých svalových vláknech (Benders a kol. 1994). Při hledání mutací v genu kódující SERCA1 u sedmi rodin s Brodyho chorobou byly identifikovány čtyři mutace u třech postižených

rodin vykazující autozomálně recesivní dědičnost. Všechny čtyři mutace zkracují SERCA1, dochází k chybění nezbytné domény a k poruše funkce SERCA1. Mutace nebyly přítomny v *ATP2A1* genu u třech rodin s dominantní dědičností nemoci a v jedné rodině s recesivní dědičností Brodyho choroby (Odermatt a kol. 1996, 1997). Později byly identifikovány tři další mutace vedoucí k předčasným stop kodonům a inaktivačním missence mutacím u čtyř rodin s recesivní dědičností. Pacienti přesto mohli relaxovat rychlá svalová vlákna i když ve významně snížené míře. To naznačuje, že kompenzace ektopickou expresí SERCA2 nebo SERCA3 a/nebo odstraněním Ca^{2+} z cytosolu pomocí Ca^{2+} -ATPáz plazmatické membrány (PMCA) a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníku může omezit defekt činnosti SR (Odermatt a kol. 2000).

Darierova choroba (nebo **Darierova-Whitova choroba**) je vzácná autozomálně dominantní kožní porucha charakterizovaná ztrátou adheze mezi buňkami epidermis a abnormální keratinizací (dyskeratosis). Nemoc je typická výskytem keratických papul v seborrhoických oblastech kůže a v kožních záhybech, které pak mohou vytvořit souvislé plaky. První léze se často objevují během puberty, mají chronický průběh s relapsy a jsou zhoršeny slunečními paprsky nebo ultrafialovým ozářením, horkem, pocením, třením a infekcí. U některých pacientů byly zpozorovány symptomy jako potíže s chováním a učením, které jsou pravděpodobně sekundární. U lidí s Darierovou chorobou bylo hlášeno více než 130 mutací v genu pro SERCA2. Mutace jsou rozmístěny po celé molekule pumpy, bez náznaku shlukování nebo mutace v jednom oblíbeném místě. U většiny pacientů se mutace skrývají v oblasti společné pro izoformy 2a a 2b. Důvod rozmístění klinických symptomů Darierovy choroby na epidermis a určité oblasti kůže není jasný. Pravděpodobně je to spojeno s faktem, že SERCA3, jež je koexprimována se SERCA2b v celé řadě buněk, není exprimována v epidermis a může tedy selhat kompenzace v kožních tkáních (Brini a Carafoli 2009).

Byly popsány i jiné nemoci spojené se změnou exprese SERCA. SERCA pumpy jsou funkčně sníženy u skoro všech modelů srdečního selhání a snížený SR transport a obsah v SR byl zjištěn u zvířecích modelů srdečního selhání. Ačkoli byla zaznamenána heterogenita v úrovních exprese SERCA v selhávajících srdcích, je obecně přijato, že snížení hladiny proteinu SERCA2a (a/nebo aktivity) hraje roli v objevení stavu selhání. Překvapivě pouze jedna zpráva popisuje přirozeně se vyskytující mutaci v lidském genu

pro SERCA2, která může predisponovat k srdečnímu selhání. Četné studie na myších ukazují, že redukce aktivity nebo exprese SERCA2a může přispět k rozvoji srdečního onemocnění. Studie fyziologie srdce byly prováděny na heterozygotních mutantech, kteří projevovali 65% snížení hladiny proteinu SERCA2a. Navzdory kompenzačním mechanismům, například upregulací $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníku a zvýšenou fosforylací regulačního proteinu fosfolambdanu (PLB), mutanti vykazovali deficit v relaxaci a kontraktilitě (Brini a Carafoli 2009).

Vztah mezi **rakovinou** a dysfunkcí SERCA byl opakovaně dokumentován. Hromadící se důkazy svědčí, že změněná homeostáza Ca^{2+} v buňce může být spojena s abnormální buněčnou proliferací, která je známkou maligní transformace. Situace je zdánlivě paradoxní. Na jedné straně zvýšená cytosolická koncentrace Ca^{2+} podporuje buněčnou proliferaci, na druhou stranu přetížení buňky Ca^{2+} spouští apoptózu. Z toho důvodu nádorové buňky regulují buněčnou signalizaci k podnícení vlastní proliferace a zároveň se ochraňují před apoptózou. Předpokládá se, že změněná exprese a/nebo funkce regulátorů jako Ca^{2+} pump může hrát roli v procesu tumorogeneze. Několik odborných sdělení ukázalo, že mutace v genu *ATP2A2* (SERCA2) může být zodpovědná za vývoj rakoviny u lidí. Třináct změn v genu bylo nalezeno u pacientů s rakovinou střeva a plic. U pacientů byla také detekována ztráta nebo snížení exprese SERCA2 (Brini a Carafoli 2009). Chami a kol. (2001) prokázali, že DNA viru lidské hepatitidy B (HBV) se integruje do genu pro SERCA1 v lidském hepatocelulárním karcinomu, cis-aktivuje 2 chimérické HBV X/SERCA1 transkripty kódující chimérické proteiny, které se následně hromadí v nádorových buňkách. Mutace genu SERCA1 se selektivně vyskytuje v nádorové tkáni a ne v přilehlé, nenádorové jaterní tkáni. Při srovnání struktury se SERCA1, HBV X/SERCA1 proteiny postrádají Ca^{2+} vázající zbytky a doménu N, a proto jsou neschopné transportovat Ca^{2+} . Exprese těchto mutovaných proteinů způsobuje vyčerpání Ca^{2+} v ER a apoptózu. Mechanismus inzertní mutagenese je považován za vzácný případ lidské rakoviny jater.

SERCA3 je exprimována v pankreatických beta buňkách a hraje důležitou úlohu v glukózou aktivované Ca^{2+} signalizaci, která reguluje sekreci inzulínu. Na zvířecích modelech **diabetu** byla ukázána poškozená exprese nebo funkce SERCA v Langerhansových ostrůvcích a byla také spojena s apoptózou beta-buněk. Narušená

aktivita SERCA3 může být zapojena do deregulace Ca^{2+} vedoucí k objevení diabetu a může přispívat ke genetické náchylnosti k diabetu typu II (Varadi a kol. 1999).

2.1.3 Regulace SERCA

Nejnámějším regulačním proteinem je fosfolamdan (PLB), který byl objeven a popsán před téměř 40 lety v SR membráně srdečních buněk. PLB je malý integrální fosfoprotein skládající se z 52 aminokyselin, může vytvářet pentamerickou strukturu a je přítomný převážně v srdeční a hladké svalovině a v pomalých vláknech kosterní svaloviny. PLB byl uznán jako klíčový regulátor SERCA2 a srdeční kontraktility. Jeho regulační efekt byl studován především v srdeční svalovině. PLB v defosforylované formě působí jako reverzibilní inhibitor srdečního Ca^{2+} transportu SR a fosforylace zpravuje PLB inhibičního efektu. Defosforylovaný PLB se váže na pumpu a inhibuje ji snížením její afinity k Ca^{2+} . *In vitro* studie s izolovanými SR membránami ukázaly, že PLB může být fosforylován na 3 odlišných místech různými protein kinázami (protein kinázou C, cAMP- nebo cGMP-dependentní protein kinázou, Ca^{2+} -kalmodulin-dependentní protein kinázou). Na základě těchto pozorování se zpočátku předpokládalo, že fosforylovaný PLB funguje jako aktivátor srdeční Ca^{2+} -ATPázy SR (SERCA2). PLB je také fosforylován *in situ* během β -adrenergní stimulace v odpovědi na zvýšení hladiny cAMP. Fosforylace PLB je doprovázena zvýšením aktivity srdečního Ca^{2+} transportního systému SR a zvýšenou mírou relaxace myokardu. Zvýšený stupeň vychytávání Ca^{2+} vede k zesílené akumulaci Ca^{2+} v srdečním SR. Ca^{2+} je následně dostupný k další kontrakci a to se zvýšenou kontrakční silou. Role PLB v regulaci kontraktility myokardu byla objasněna studií na myších s chybějícím PLB. Tyto myši vykazovaly hyperdynamickou srdeční funkci, zahrnující zvýšenou systolickou funkci, zvýšený stupeň relaxace levé srdeční komory a zvýšené plnění srdeční komory. Srdce s chybějícím PLB nejen že relaxovaly rychleji než kontrolní, ale také vykazovaly zvýšené inotropní parametry. Afinita Ca^{2+} pumpy k Ca^{2+} byla významně zvýšena a toto bylo spojeno se zvýšeným intraluminálním obsahem Ca^{2+} v SR srdečních buněk v srdcích s chybějícím PLB v porovnání s kontrolními srdci. Další studie se zaměřila na práci se srdci s overexpresí PLB. Byla zjištěna snížená afinita Ca^{2+} -ATPázy k Ca^{2+} , která byla spojena s poklesem kontrakčních parametrů v porovnání s kontrolními srdci.

PLB je produkt jediného genu a je v různé míře exprimován v různých tkáních, od vysoké úrovně exprese ve ventrikulárním svalu přes střední úroveň v atriálním a pulmonálním myokardiálním svalu až k nízké ale funkčně významné úrovni exprese v hladkém svalu aorty (Koss a Kranias 1996). Nízká úroveň exprese PLB byla také detekovaná v pomalých svalových vláknech, v cévním endotelu, hladkých svalech a v nesvalové tkáni, i když role PLB v těchto tkáních není v současné době dobře charakterizována. Předpokládá se, že přibližně 40 % Ca^{2+} pump SR je funkčně regulováno PLB *in vivo* v přirozených myších membránách SR (Brittsan a kol. 2000). PLB interaguje nejen se SERCA2, ale i se SERCA1, nikoli se SERCA3 (Asahi a kol. 1999).

V rychlých svalových vláknech je regulátorem malý transmembránový proteolipid sarkolipin (SLN), skládající se z 31 aminokyselin. Transmembránové helixy SLN a PLB se vyznačují viditelnou homologií. Avšak není žádná známka že SLN tvoří oligomerní strukturu. Exprese SLN je svalově specifická a komplementární k PLB. SLN je exprimován nejvíce v rychlých svalových vláknech, v menší míře (desetkrát méně) v pomalých svalových vláknech a v ještě nižší míře v srdečním svalu, napodobuje expresi SERCA1, se kterou interaguje, jako PLB napodobuje expresní vzor SERCA2. Interakce SLN se SERCA1 může být porovnána k interakci PLB se SERCA2. SLN má dvojitý efekt na Ca^{2+} transport. Jako PLB inhibuje Ca^{2+} vychytávání ER snížením afinity SERCA1 k Ca^{2+} při nízké koncentraci Ca^{2+} , avšak na rozdíl od PLB SLN při vysoké koncentraci Ca^{2+} má jasný stimulační efekt na maximální stupeň vychytávání Ca^{2+} , zvyšuje tedy aktivitu SERCA1. Při pokusech se SERCA1 s chybějícím SLN poměr translokace Ca^{2+} k hydrolýze ATP se zvýšil více jak pětinašobně. Na rozdíl od PLB regulace SLN vypadá, že není modulovaná fosforylací cytoplasmatické domény. Oba regulační proteiny jsou schopny regulovat SERCA1 i SERCA2 shodným způsobem, pravděpodobně protože SLN a PLN vykazují sekvenční homologii a SERCA1 i SERCA2 mají tak vysokou sekvenční totožnost v kritických transmembránových helixech. Nicméně se ukazuje, že se SLN a PLB neváží na stejné sekvence SERCA1, protože jejich inhibiční efekt je aditivní (Odermatt a kol. 1998).

Studie na oocytech *Xenopus laevis* ukázaly, že chaperony ER kalnexin a kalretikulin regulují aktivitu SERCA2b pumpy z lumen na základě svých lektinových vlastností.

Funkční interakce mezi kalretikulinem a glykosylovaným zbytkem typickým pro SERCA2b určuje nižší transportní kapacitu této Ca^{2+} -ATPázy pro Ca^{2+} (John a kol. 1998).

Nedávno bylo odhaleno, že aktivita SERCA pumpy je fyziologicky regulovaná interakcí s presenilinem, vnitřním vysoce konzervativním integrálním proteinem, umístěným převážně v membráně ER. Presenilin je nezbytný pro správné fungování SERCA a fyziologické udržení buněčné Ca^{2+} homeostázy. Zdá se, že přispívá jak k aktivnímu plnění ER zásob, tak k jejich vyprázdnění. Presenilin je integrální část multienzymatického komplexu γ -sekretázy, která je zodpovědná za vznik β -amyloidu. Mutace v genu pro presenilin, která způsobuje autozomálně dominantní časnou Alzheimerovu chorobu, narušuje několik buněčných cest včetně změněného štěpení prekursoru β -amyloidu γ -sekretázou a narušení intracelulární Ca^{2+} homeostázy. Narušení Ca^{2+} signalizace se projevuje zvýšeným plněním ER ionty vápníku, útlumem kapacitního vstupu Ca^{2+} a přehnaným uvolňováním Ca^{2+} z ER pomocí druhého posla inositol-1,4,5-trisfosfátu. Zjištění, že modulace aktivity SERCA by mohla změnit produkci β -amyloidu, naznačuje možnou roli SERCA pumpy v patogenezi Alzheimerovi choroby. Zvýšená hladina SERCA2b způsobila zřetelný vzestup produkce β -amyloidu, naopak snížení exprese SERCA2b způsobilo významný pokles v produkci β -amyloidu. Farmakologická inhibice SERCA2b thapsigarginem rychle redukovala vznik β -amyloidu (Green a kol. 2008).

Mezi regulátory SERCA aktivity patří i oxid dusnatý (NO), který může aktivovat pumpu cGMP-independentním způsobem, a tak potencovat relaxaci vaskulární hladké svaloviny, srdeční a kosterní svaloviny. Tento efekt závisí na modifikaci reaktivních thiolových skupin SERCA proteinu a zdá se, že vyžaduje přítomnost reaktivních forem kyslíku (ROS) (Brini a Carafoli 2009).

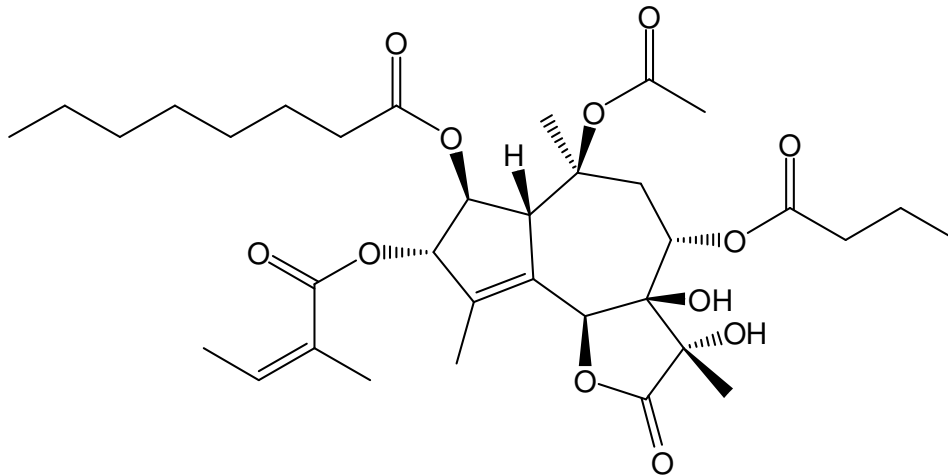
2.1.4 Farmakologické ovlivnění SERCA

Mezi nejznámější modulátory SERCA pumpy patří selektivní inhibitory thapsigargin (TG), trilobolid (TB), cyklopiazonová kyselina (CPA) a 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydrochinon (tBHQ). Z méně známých látek ovlivňujících aktivitu SERCA bych uvedla

kurkumin, artemisinin, dihydroartemisinin (DHA), klotrimazol (CLT), ivermektin a cyklosporin A.

Thapsigargin

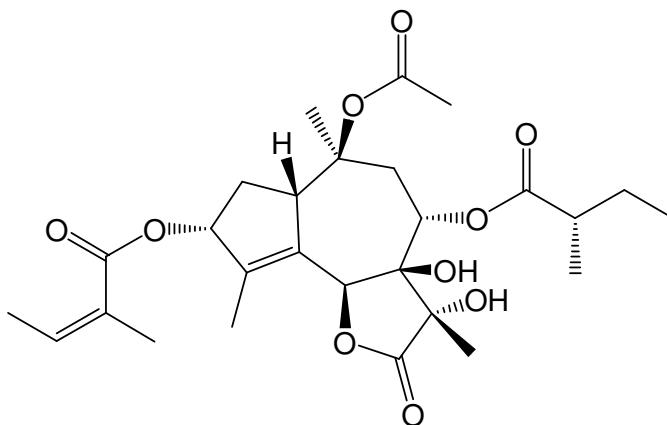
Thapsigargin je seskviterpenový lakton (obr. 3), je to přírodní produkt původně izolovaný na konci sedmdesátých let z kořene středozezemské rostliny *Thapsia garganica* Rasmussenem a kol. (1978), byl objeven na základě své schopnosti uvolňovat histamin z mastocytů přítomných v kůži. Je široce experimentálně využíván jako silný a selektivní inhibitor SERCA, s vynikajícím průnikem přes biologické membrány díky své dobré rozpustnosti v tucích (Treiman a kol. 1998). Vzhledem k jeho vysoké specifitě a afinitě se TG stal nejužívanějším nástrojem studia pro sledování změn intracelulárního Ca^{2+} a s ním spojených signalizačních drah. Po navázání vyvolá konformační změny SERCA vedoucí ke snížené afinitě pro Ca^{2+} i ATP, dochází k posunu v E1/E2 rovnováze ATPázy směrem k E2 (Sagara a kol. 1992). Stechiometrie navázání TG na ATPázu je 1:1 (Wictome a kol. 1995).



Obrázek 3 Thapsigargin

TG inhibuje všechny izoformy SERCA v subnanomolárních koncentracích (Christensen a kol. 1993), ale nemá žádný účinek na PMCA nebo ostatní P-typy ATPáz (Wictome a kol. 1995).

Inhibice SERCA vede k vyčerpání zásob Ca^{2+} v ER a ke zvýšení cytoplasmatického Ca^{2+} , což může spustit apoptózu. TG se vyznačuje několika farmakologicky zajímavými vlastnostmi. Vyvolává aktivaci apoptotických drah v ER a mitochondriích a je schopen zabíjet pomalu se množící buňky i nemnožící se buňky. Proto byl navržen jako nové léčivo pro terapii rakoviny prostaty, která se vyznačuje pozoruhodnou pomalou proliferací, což může částečně vysvětlit její relativní neodpovídání na konvenční antiproliferativní chemoterapii. SERCA je však všudypřítomný protein a TG je neselektivní cytotoxická látka, a proto by samozřejmě mohl působit toxicky i na normální buňky, proto musí být selektivně cílen do oblasti nádoru. Problém s toxicitou byl eliminován metodou párování TG s peptidovým nosičem. Takto vznikne inaktivní proléčivo, které se aktivuje v prostředí maligních buněk prostaty. Prostatické nádorové buňky produkují specifický antigen (PSA), který je serin-threonin proteáza. Peptidový nosič je substrátem pro PSA proteázu, může být efektivně rozštěpen a následně TG uvolněn v nádorových buňkách prostaty, kde je PSA hojně přítomna. Toto proléčivo je ve fázi preklinického zkoušení a přináší slibné výsledky (Denmeade a Isaacs 2005). TG působí virostaticky, inhibuje produkci infekčních virionů cytomegaloviru (Isler a kol.), replikaci viru hepatitidy C (Nakagawa a kol. 2005) a herpes simplex viru (Cheschenko a kol. 2003).



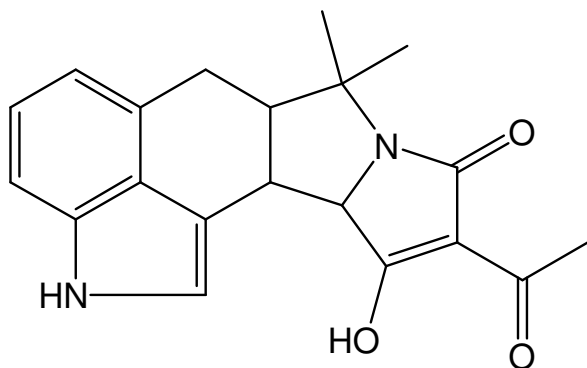
Obrázek 4 Trilobolid

Trilobolid

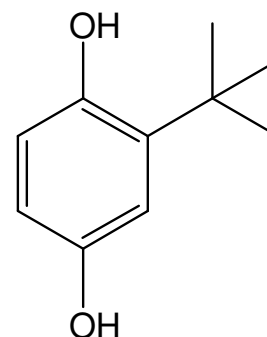
Stejně jako TG je TB seskviterpenovým laktonem (obr. 4) a specifickým inhibitorem SERCA s vysokou afinitou. Je extrahován z rostliny *Laser trilobum*. TB má nižší afinitu k enzymu než TG (Wictome a kol. 1995).

Cyklopiazová kyselina a tBHQ

CPA (obr. 5) je mykotoxin produkovaný určitými kmeny *Penicillium cyclopium* a *Aspergillus flavus*. Může být přírodním kontaminantem některých celozrnných výrobků a plísňových sýrů. Podobně jako TG CPA nemá afinitu k ostatním ATPázám (Seidler a kol. 1989). Inhibiční mechanismus tBHQ (obr. 6) je podobný TG. Oba stabilizují kompaktní konformaci ATPázy a interferují s vazbou Ca^{2+} a tvorbou fosfoenzymu (Inesi a kol. 2005). Na rozdíl od tBHQ, který inhibuje pouze SERCA3, inhibuje CPA všechny typy SERCA pump (Suplat a kol. 2004).



Obrázek 5 Cyklopiazová kyselina

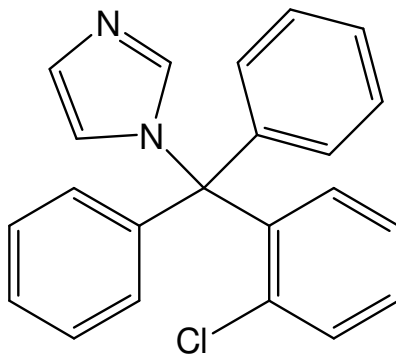


Obrázek 6 tBHQ

Klotrimazol

CLT je derivát imidazolu (obr. 7) s antimykotickou aktivitou, užívaný k léčbě kvasinkových infekcí. Antimykotický efekt je způsoben inhibicí cytochromu P450, enzymu účastnícího se biosyntézy ergosterolu. CLT inhibuje proliferaci některých normálních i nádorových buněk *in vitro* i *in vivo* a zasahuje do buněčné homeostázy

Ca²⁺. CLT inhibuje SERCA2, získanou z mikrosomální frakce srdečního svalu, i SERCA1, získanou z mikrosomálních vezikulů kosterní svaloviny. Inhibuje počáteční navázání Ca²⁺ na enzym, hydrolytickou aktivitu ATPázy i tvorbu fosfoenzymu (Bartolommei a kol. 2006).



Obrázek 7 Klotrimazol

CLT snižuje afinitu Ca²⁺-ATPázy pro vápenaté ionty, pravděpodobně je to způsobeno změnou ve funkčních vlastnostech vazebných míst pro Ca²⁺. Inhibiční efekt CLT není zvrácen zvýšenou koncentrací volných Ca²⁺ iontů, inhibice CLT je tedy nekompetitivní. Inhibice CLT je ireverzibilní (Snajdrova a kol. 1998).

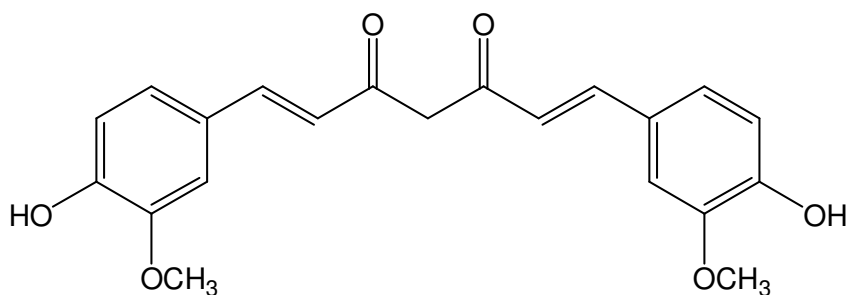
Kurkumin

Kurkumin (diferuloylmethan) je žlutá aktivní složka koření kurkumy, která je získávána z oddenků rostliny *Curcuma longa L.*, zástupci čeledi Zingiberaceae, široce rostoucí v Číně, Indii, Indonézii a v ostatních asijských zemích. Kurkuma byla používána v tradiční indické medicíně (Ajurveda) k léčení různých běžných onemocnění jako jsou žaludeční potíže, nadýmání, úplavice, vředy, žloutenka, artritida, vymknutí, akné, zranění, kožní infekce a infekce oka (Singh 2007).

Na rozdíl od ostatních SERCA inhibitorů inhibice kurkuminem vede ke zvýšení stupně Ca²⁺ akumulace ATPázou (Logan-Smith a kol. 2001).

Kurkumin byl poprvé izolován roku 1815 Vogelem a Pelletierem. J. Milobedzka a V. Lampe (Německo) v roce 1910 zjistili jeho chemickou strukturu (obr. 8). Mnoho studií hlásí, že kurkumin vykazuje spoustu farmakologických vlastností. Má antioxidační,

antibakteriální, antifungální, antivirotickou, protizánětlivou, antiproliferativní a proapoptotickou aktivitu. Mezi cíle, se kterými kurkumin přímo interaguje, patří například cyklooxygenáza (COX)-2, lipoxygenáza (LOX), glykogen syntáza kináza-3 β , fosforyláza-3 kináza, xantinoxidáza, N-aminopeptidáza, amyloid protein, DNA polymeráza, glutathion, albumin, P-glykoprotein, tubulin a topoizomeráza II. Ukázalo se, že kurkumin aktivuje různé transkripční faktory, patří mezi ně PPAR γ (proliferator-activated receptor γ), p53 a ATF3 (activating transcription factor 3). Naopak snižuje expresi jiných transkripčních faktorů, například NF- κ B (nuclear factor- κ B), AP-1 (activator protein-1), STAT-3 (signal transducers and activators of transcription protein-3) a SP-1 (specifity protein-1). Dále snižuje expresi protein kináz, GFR (grow factor receptors), chemokinů, receptorů pro chemokiny, antiapoptotických proteinů (např. IAP [inhibitor of apoptosis protein], Bcl-2 a Bcl-xL), expresi regulačních proteinů buněčného cyklu (např. cyklin D1, cyklin E a c-myc), biomarkerů invaze a angiogeneze (např. VEGF [vascular endothelial growth factor] a uPA [urokinase plasminogen activator]) a biomarkerů zánětu (např. TNF [tumor necrosis factor], IL [interleukin]-1, IL-6, COX-2, 5-LOX, PSA a CRP [C-reaktivní protein]). Na základě těchto cílů je možno si představit, jak kurkumin zprostředkovává protizánětlivou, proapoptotickou a antiproliferativní aktivitu (Aggarwal a Sung 2009).



Obrázek 8 Kurkumin

Kurkumin podstupuje preklinické zkoušení pro svou protinádorovou a protizánětlivou aktivitu (Fahey a kol. 2007). Kurkumin inhibuje množení a přežití skoro všech typů nádorových buněk. Snížení exprese AP-1, cyklinu D1 a cyklinu E a zvýšení exprese p21, p27 a p53 bývá spojeno s antiproliferativním efektem kurkuminu (Goel a kol. 2008). Ukázalo se, že kurkumin je selektivně toxický pro nádorové buňky a ne pro normální, protože je mnohem více vychytáván nádorovými buňkami než normálními

(Kunwar a kol. 2008). Kurkumin je také silný chemosenzitivizér a radiosenzitivizér. Snížení exprese NF- κ B a genových produktů regulovaných NF- κ B kurkuminem je zapojeno v senzitivizaci nádorových buněk k chemoterapeutikům a ke γ záření (Garg a kol. 2005).

Kurkumin zabraňuje srdeční hypertrofii a srdečnímu selhání (Li a kol. 2008, Morimoto a kol. 2008) a zlepšuje symptomy spojené s diabetem typu 2 (Weisberg a kol. 2008). Je dobře známo, že TNF- α je klíčový prozánětlivý cytokin v patogenezi různých zánětlivých nemocí (Liang a kol. 2008). Kurkumin jako inhibitor TNF- α má silný léčebný účinek proti Crohnově nemoci, psoriáze a revmatickým onemocněním (Khanna a kol. 2007). Vykazuje též aktivitu proti Alzheimerově chorobě, má totiž schopnost snižovat tvorbu β amyloidu (Yang a kol. 2005). Kurkumin má imunomodulační efekt (Jagetia a Aggarwal 2007) a snižuje replikaci viru HIV-1, díky inhibici HIV integrázy a HIV-1 proteázy (Li a kol. 1993). Osteoklastogeneze, proces ztráty kostní hmoty, jenž je urychlen některými prozánětlivými cytokiny jako RANKL (receptor activator for NF- κ B ligand) a nádorovými buňkami, je inhibován kurkuminem (Bharti a kol. 2004).

První fáze klinického zkoušení ukázala, že kurkumin je bezpečný u lidí i při vysokých dávkách (12 g/den). Jedno z nejdůležitějších omezení v jeho použití je nízká biologická dostupnost. Hlavní důvody přispívající k nízké plazmatické a tkáňové koncentraci se zdají být špatné vstřebávání, rychlý metabolismus a rychlá systémová eliminace (Anand a kol. 2007).

Kurkumin prokázal prospěšné vlastnosti při různých experimentálních modelech poškození jater. Zabraňuje jaternímu poškození způsobenému aflatoxiny, předávkováním železem, ethanolem a akutní nebo chronickou intoxikací thioacetamidem. Kurkumin chrání před toxicitou alkoholu nejen játra, ale i ledviny a mozek, pomáhá udržovat strukturu, integritu a funkci membrán (Rivera-Espinoza a Muriel 2009).

Artemisinin

Artemisin a jeho deriváty jsou v současné době nejrychleji působící antimalarika, která přejímají stále více a více důležitější roli v celosvětovém boji proti malárii (Toovey a kol. 2008). Ačkoli jejich doporučené užití je pro terapii infekce způsobené

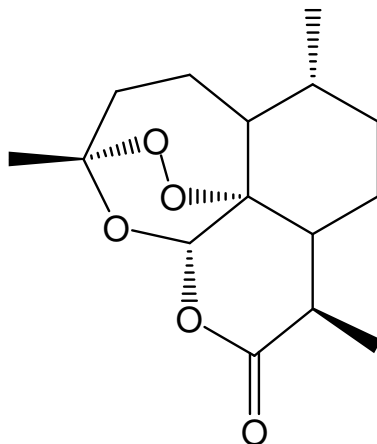
prvokem *Plasmodium falciparum*, tato léčiva jsou účinná i proti ostatním parazitům, stejně jako proti nádorovým buňkám (Golenser a kol. 2006).

Mechanismus působení artemisininu zahrnuje zásah do biologických pochodů parazita, do transportu proteinů a do funkce mitochondrií, modulaci imunitního systému hostitele, inhibici angiogeneze a inhibici endocytózy parazitem. K účinku artemisininu proti původci malárie přispívá zvýšená koncentrace artemisininu v napadených erythrocytech. Ve zdravých buňkách se konstantně nacházelo 35 % až 40 % celkového množství artemisininu, díky pasivní difúzi hydrofóbního léčiva přes buněčnou membránu červených krvinek. Avšak množství artemisininu v infikovaných erythrocytech se zvyšovalo až na hladinu 55 % až 60 % (Golenser a kol. 2006). Gu a kol. (1984) ve své pilotní studii s dihydroartemisininem (DHA) popsal stopadesátinásobné zvýšení akumulace léčiva v infikovaných erythrocytech oproti neinfikovaným červeným krvinkám.

Eckstein-Ludwig a kol. (2003) identifikovali molekulový cíl artemisininu uvnitř malarického parazita. Jde o plasmodiální enzym PfATP6. Tento enzym je SERCA a je to ortolog savčího enzymu. PfATP6 je specificky inhibován nanomolární koncentrací artemisininu, když je exprimován v oocytech *Xenopus laevis*. Hubící efekt artemisininu na parazity je antagonizován TG. Na základě těchto výsledků se předpokládá, že obě látky mají stejný cíl, tedy že se artemisinin váže na stejné místo enzymu jako se váže TG. Vazba artemisininu na protein je pomocí hydrofobních interakcí. Zatímco artemisinin sám neinhibuje savčí SERCA ani v mikromolární koncentraci, TG je silným inhibitorem obou, savčí i plasmodiální SERCA (Toovey a kol 2008).

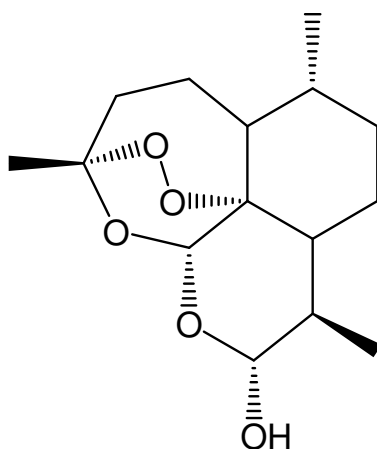
Artemisinin byl poprvé izolován z rostliny *Artemisia annua* L. roku 1972 a jeho struktura, která je jedinečná mezi antimalariky, byla určena o sedm let později. Artemisinin je strukturně podobný TG. Je to seskviterpenový trioxanový laktón (obr. 9), obsahující endoperoxidový můstek, nezbytný pro jeho účinek. Artemisinin je málo rozpustný ve vodě i v tucích, a proto může být podáván pouze perorálně. Tento způsob podání je praktický, nicméně pro pacienty s těžkou malárií je často nemožný. Problém se vyřešil přípravou semisyntetických derivátů. Patří mezi ně ve vodě rozpustný artesunát a artelinát a v tucích rozpustný artemether a arteether. Kromě perorálního podání je lze podat i parenterální nebo rektální cestou. Zatímco artemisinin je

metabolizován primárně na inaktivní metabolity, jeho deriváty artensunat, artelinat, artemether a arteether jsou konvertovány na DHA (obr. 10), jenž má klinickou účinnost minimálně shodnou se svou parentní látkou (Golenser a kol. 2006).



Obrázek 9 Artemisinin

Nejkritičtější problém limitující současnou terapii malárie je vznik a šíření rezistence parazita na většinu používaných antimalarických léčiv. Výhodou artemisininu a jeho derivátů je, že se na ně dosud neobjevila klinická rezistence a jsou účinné i proti multirezistentním kmenům *Plasmodium falciparum*. Artemisinin vykazuje rychlý nástup účinku a vysokou účinnost proti krevním stádiím prvoka, včetně nejmladších vývojových stádií. Ukázal snížení počtu gametocytů v krvi a také snížení infekčnosti přežitých gametocytů (Golenser a kol. 2006).



Obrázek 10 Dihydroartemisinin

Na rozdíl od většiny antimalarik nebyly během léčby artemisininem nebo jeho deriváty hlášeny žádné závažné nežádoucí účinky. Metaanalýza 108 publikovaných i nepublikovaných klinických studií (celkem 9 241 pacientů) prováděných s artemisininem a s jeho deriváty uzavřela tyto sloučeniny jako bezpečné a dobře tolerované. Mezi jednotlivými deriváty nebyly nalezeny žádné rozdíly v bezpečnosti nebo toleranci. Nicméně mírné nežádoucí účinky se objevily, nejčastější byly gastrointestinální (nevolnost, zvracení a průjem), avšak všechny jsou také charakteristické pro akutní fázi malárie. Příležitostně byly hlášeny neutropenie (1,3 %), retikulocytopenie (0,6 %) a zvýšení jaterních enzymů (0,9 %). Přibližně u 1,1 % sledovaných pacientů se objevila přechodná bradykardie a prodloužený QT interval (Ribeiro a Olliaro 1998).

Je známo, že několik seskviterpenových laktonů ovlivňuje imunitní systém narušením aktivity transkripčního faktoru NF- κ B jeho alkylací nebo zabráněním degradace jeho inhibičního proteinu I κ B (Aldieri a kol. 2003). NF- κ B je důležitým regulátorem imunitní odpovědi, kontroluje expresi přes 150 genů majících vztah k produkci zánětlivých cytokinů, chemokinů, imunoreceptorů, molekul buněčné adheze a apoptóze. NF- κ B je mimo jiné aktivován různými bakteriemi a viry, proto je často označován „centrálním mediátorem lidské imunitní odpovědi“. Ve většině buněk je NF- κ B přítomen v cytoplazmě v neaktivním stavu, navázaný na proteinový inhibitor I κ B. Po expozici cytokinů, UV světlu, ROS nebo bakteriálním či virovým toxinům se spustí aktivační kaskáda, která vede k odstranění I κ B a k translokaci NF- κ B do jádra, kde se naváže na enhancer nebo promotor cílových genů a reguluje jejich transkripci. Mezi induktory NF- κ B patří například virus hepatitidy B, virus Epstein-Barrové (EBV), virus lidské imunodeficiency (HIV-1), *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, endotoxin Staphylokokka, anafylatoxin, paklitaxel, vinkristin, vinblastin, lidský růstový hormon, insulin, angiotensin II, bradykinin, hemoglobin, PAF (platelet activating factor) a TG (Pahl 1999).

NF- κ B reguluje také gen indukibilní syntázy oxidu dusnatého (iNOS). Inducibilní NOS produkuje oxid dusnatý (NO), molekulu, která hraje důležitou roli v zánětu a imunitní odpovědi (viz níže). Aldieri a kol. (2003) zjistili, že artemisinin je schopný potlačit LPS/cytokiny-indukovaný vzestup aktivity NOS. Inhibice syntézy NO je na transkripční úrovni. Další experimenty naznačily, že artemisinin zabraňuje LPS-induko-

vané proteolytické degradaci I κ B a následné aktivaci a translokaci NF- κ B do jádra, která by jinak vedla ke zvýšení exprese genu iNOS a syntéze NO. Artemisinin tedy pravděpodobně sdílí s ostatními seskviterpenovými laktony schopnost inhibovat aktivitu NF- κ B .

Bylo prokázáno, že DHA inhibuje navázání VEGF na své receptory a snižuje expresi receptorů pro VEGF, zapříčiňující inhibici angiogeneze (Golenser a kol. 2006). Toovey a kol. (2008) pozorovali u DHA významnou inhibici savčí SERCA (~39%) při koncentraci 1 a 5 μ M, při koncentraci 10 μ M došlo naopak ke zvýšení aktivity SERCA. U artemetheru (1, 5 a 10 μ M) a artemisininu (10 μ M) nebyla zaznamenána žádná výrazná inhibice savčí SERCA.

2.2 Oxid dusnatý

NO je plynný, elektricky nabitý, volný bioaktivní radikál. Kvůli svým chemickým vlastnostem snadno prohází přes buněčné membrány a mezi buňkami. Takto působí jako intracelulární a intercelulární signální molekula. Biologická aktivita NO byla poprvé popsána v roce 1980, kdy Furchgott a Zawadski (1980) oznámili existenci endoteliálního relaxačního faktoru pro hladké svaly (EDRF, endothelium-derived relaxing factor), který byl identifikován o sedm let později jako NO (Ignaro a kol. 1987).

NO je rozpustný ve vodě i v lipidech, reaguje ve vodě s kyslíkem a jeho reaktivními intermediáty za tvorby dalších radikálů (např. NO₂), nepříliš stabilních aniontů (NO₂⁻), velmi stabilních aniontů (NO₃⁻), nestabilních vyšších oxidů (např. N₂O₃) a nestabilních peroxidů (např. ONOO⁻). Při nízkém pH nahromaděný dusitan (NO₂⁻) může být protonován na dusitou kyselinu, která se může znovu přeměnit na NO. NO může reagovat s thioley za tvorby zásobních forem (RSNO), které mohou uvolňovat elektron-deficientní nitrosoniový kation (NO⁺). V biologických systémech se pravděpodobně většina těchto forem objevuje během několika sekund po aktivaci NOS (MacMicking a kol. 1997).

NO je v buňkách tvořen katalyticky z aminokyseliny L-argininu syntázou oxidu dusnatého (NOS, EC 1.14.13.39) za přítomnosti nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH). NOS katalyzuje přeměnu L-argininu na NO a L-citrulin (Nathan 1992). Jsou známy 3 izoformy NOS, neuronální (nNOS, NOS I), endoteliální (eNOS, NOS III) a indukibilní (iNOS, NOS II). Předpokládá se, že všechny tři savčí izoformy NOS katalyzují produkci NO stejnou biochemickou cestou, skládající se ze dvou postupných monooxygenázových reakcí (MacMicking a kol. 1997).

Enzymy nNOS a eNOS jsou konstitutivní formy, jsou závislé na zvýšeném intracelulárním Ca^{2+} , a proto jsou klasifikovány jako cNOS (MacMicking a kol. 1997). Izoforma nNOS (160 kDa) je převážně exprimována v neuronech centrálního i periferního nervového systému. Normálně produkuje nízkou hladinu NO pro intracelulární signalizaci a modulaci synaptické plasticity v nervovém systému. Avšak nadměrně aktivní nNOS je příčinou např. ischemie, bolesti a některých neurodegenerativních onemocnění. Enzym eNOS (135 kDa) také generuje malé množství NO. Nachází se převážně v mozku, mozkové tkáni, neuroblastomu, kosterní svalovině, vaskulárních endoteliálních buňkách a beta-buňkách pankreatu. NO produkovaný eNOS relaxuje cévy, inhibuje adhezi, agregaci krevních destiček a udržuje normální krevní tlak. Třetí izoforma NOS je indukovatelná a Ca^{2+} /kalmulin independentní. Původně byla iNOS (130 kDa) popsána jako enzym, který je exprimován aktivovanými makrofágy, a tak přispívá ke kontrole replikace nebo zabití intracelulárních mikrobiálních patogenů. Je exprimována v odpověď na endotoxiny a zánětlivé cytokiny. Malé množství NO syntetizovaného iNOS je rozhodující pro přenos signálu během infekce (Nahrevanian 2009). Schopnost iNOS produkovat NO je řádově vyšší než ostatních izoform (MacMicking a kol. 1997).

Mnoho cytokinů a mikrobiálních produktů, často v synergických kombinacích, stimuluje expresi iNOS. Účinná látka nebo kombinace závisí na typu buňky a živočišném druhu. U myších peritoneálních makrofágů se ukázal jako jediný efektivní $IFN-\gamma$, když byl testován sám. Důležitá je zejména synergická kombinace TNF s libovolnými interferony, protože pohlcení mikrobů vyvolává autokrinní produkci TNF a $IFN-\alpha/\beta$. Jiný významný příklad synergismu je mezi $IFN-\gamma$ a LPS. LPS také povzbuzuje makrofágy k produkci TNF a $IFN-\alpha/\beta$ (MacMicking a kol. 1997).

NO je důležitý pro řadu fyziologických procesů. Reguluje řadu buněčných funkcí a působí jako prostředník v signalizačních drahách. NO je účinný imunomodulátor, který má různé role během zánětu, infekce a rejekce transplantátu, podílí se na nespecifické obraně organismu. NO je syntetizován mnoha buňkami, patří mezi ně makrofágy, neutrofilny, Kupfferovy buňky, lymfocyty a hepatocyty (Nahrevanian 2009).

NO vykazuje cytostatické a cytotoxické vlastnosti proti virům, bakteriím, prvokům, červům a nádorovým buňkám. Právě vytrvalá produkce NO umožňuje makrofágům zabít patogeny a nádorové buňky. Antimikrobiální a cytotoxická aktivita NO je posílena ostatními produkty makrofágů jako je kyselina, cystein, glutation, peroxid vodíku nebo superoxid (MacMicking a kol. 1997). Mezi patogeny, kde bylo dokázáno zapojení NO do mikrobicidní aktivity makrofágů, patří například intracelulární parazité *Leishmania major*, *Toxoplasma gonii*, *Trypanosoma cruzii*, patogenní bakterie *Mycobacterium leprae*, kvasinka *Candida albicans* a virus *Herpes simplex* (Nahrevanian 2009).

Ačkoli NO syntetizovaný iNOS chrání hostitele před infekcí, má supresivní účinek na proliferaci lymfocytů a může způsobovat poškození ostatních normálních tkání hostitele (MacMicking a kol. 1997).

3. Zadání práce

Cílem této diplomové práce je studium imunomodulačního potenciálu thapsigarginu, trilobolidu, artemisininu, dihydroartemisininu, klotrimazolu a kurkuminu, tj. SERCA inhibitorů na potkaních a myších peritoneálních makrofágách. V experimentální práci je využito poznatku, že na základě produkce NO na modelu imunitních buněk můžeme predikovat schopnost látky stimulovat buňky k sekreci cytokinů. Na pracovišti ÚEM AV ČR (Ústav experimentální medicíny Akademie věd ČR) bylo nedávno tímto způsobem zjištěno, že látka přírodního původu, thapsigargin má imunostimulační účinky. Tento seskviterpenový lakton je znám jako SERCA inhibitor.

Konkrétní úkoly jsou tyto:

1) Vyšetřit produkci NO u látek a porovnat ji s produkcí NO u thapsigarginu.

Současně bude testována cytotoxicita látek.

2) Zjistit, zda látky, které mají schopnost syntézy NO, budou stimulovat sekreci cytokinů (IFN- γ , TNF- α).

3) Zjistit, zda případná stimulace NO a cytokinů je ovlivněna modulací intracelulárního vápníku.

Experimentální výsledky této diplomové práce by měly přispět k nalezení terapeuticky perspektivních látek, např. pro léčbu infekčních chorob, zánětů nebo protinádorovou léčbu.

4. Experimentální část

4.1. Zvířata a buněčné modely

Imunobiologické aktivity byly určeny za podmínek *in vitro* s použitím potkaních a myších peritoneálních makrofágů. K experimentům byly použity samice potkana inbredního kmene WISTAR s váhou 165-180 g a myší samice inbredního kmene C57BL/6 8-10 týdnů staré. Zvířata byla nakoupena z Charles River Deutschland (Sulzfeld, Německo) a chována ve skupinách po pěti v laminárním boxu na ustájení zvířat (ESI Flufrance, Wissous, Francie). Světelný režim byl nastavený od 6–18 h a teplota v místnosti na 22 °C.

Všechny protokoly pokusů na zvířatech byly řádně schváleny etickou komisí Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR.

Izolace a kultivace peritoneálních makrofágů

Zvířata byla usmrčena cervikální dislokací a následně jim bylo intraperitoneálně podáno 16 ml (potkan) nebo 8 ml (myš) sterilního fyziologického roztoku. Odsáté peritoneální makrofágy byly stejnou injekční stříkačkou přeneseny do sterilních zkumavek a buňky byly 3x promyty fyziologickým roztokem. V případě potřeby se provedla lyze přítomných erytrocytů (Red blood cell lysing buffer, Sigma, Praha, ČR). Makrofágy se resuspendovaly v kompletním RPMI-1640 médiu obsahujícím 10 % inaktivovaného fetálního bovinního séra, 2 mM L-glutaminu, 50 µg/ml gentamicinu a 5×10^{-5} M 2-merkptoethanolu (vše Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Buňky byly nasazeny na 96 jamkovou destičku s kulatým dnem (Costar, Cambridge, UK) v množství 2×10^6 buněk/ml ve finálním objemu 100 µl. Makrofágy byly kultivovány v přítomnosti nebo nepřítomnosti sledovaných látek při 37 °C, 5% CO₂ v inkubátoru (Heraeus, Německo).

4.2 Chemikálie

Lipopolysacharid

Ve většině experimentů se jako pozitivní kontrola, tj. látka se známou silnou imunostimulační aktivitou, používá bakteriální lipopolysacharid z *E. coli* O55:B5 (BioWhittaker, Praha, ČR). LPS se přidával do kultivačního média v koncentracích 100 – 1000 pg/ml.

Interferon- γ

Rekombinantní potkaní a myší interferon- γ (R&D Systems, Minneapolis, USA) se používal jako známá imunostimulační látka samostatně nebo v kombinaci s LPS jako pozitivní kontrola. V kultivačním médiu byl IFN- γ ve výsledných koncentracích 5000 pg/ml.

Experimentální látky

Byly použity tyto látky: artemisinin a dihydroartemisinin (PhytoLab), dantrolen, klotrimazol, kurkumin, TMB-8, thapsigargin a triton X-100 (Sigma ČR). Trilobolid byl laskavě poskytnut Ing. J. Harmathou z ÚOCHB AV ČR. Byly připraveny zásobní roztoky těchto látek v DMSO.

4.3 Použité metody

Stanovení oxidu dusnatého

Měřená koncentrace nitritů je mírou produkce NO. Buňky byly inkubovány po 24 hodin. Produkce NO u makrofágů byla stanovena spektrofotometricky. Z každého vzorku bylo odebráno 50 μ l bezbuněčného vzorku (supernatantu) a přidáno alikvotní množství Griessova reagens (1% sulphanilamid, 0,1% naphtylendiamin a 2,5% H_3PO_4). Následovala pětiminutová inkubace při pokojové teplotě. Absorbance se měřila na spektrofotometru TECAN microplate reader (Tecan, Groedig, Rakousko) při vlnové

délce 540 nm. Pro převedení absorbance na μM nitritů byla použita kalibrační křivka pro nitrity.

Stanovení cytokinů (ELISA)

Produkce jednotlivých cytokinů (IFN- γ , TNF- α) byla stanovena pomocí techniky ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Byly použity kompletní kity Quantikine Immunoassay (RD Systems, Minneapolis, USA), přičemž se postupovalo podle pokynů daných výrobcem. Výsledky se získaly spektrofotometricky (microplate reader TECAN, Groedig, Rakousko). Doba kultivace buněk se lišila v závislosti na testovaném cytokinu (5-24 h).

Měření viability buněk

Viabilita potkaních makrofágů byla stanovena kolorimetricky po kultivaci buněk v přítomnosti tetrazoliové soli WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Principem testu je schopnost živých buněk štěpit tuto sloučeninu mitochondriálními dehydrogenázami. Makrofágy ($1 \times 10^6/\text{ml}$) byly kultivovány s testovanými látkami 24 hodin, jak je popsáno výš. Následně byl do kultivačních destiček přikapán roztok WST-1 a buňky byly dále inkubovány. Po 3 hodinách byla měřena optická densita při vlnové délce 450-690 nm na přístroji Tecan. Hodnoty naměřené u buněk kultivovaných v přítomnosti látek se srovnávají s hodnotami absorbance u čistých buněk (životnost 100 %) a u buněk mrtvých, kultivovaných v 5% roztoku Tritonu-X100.

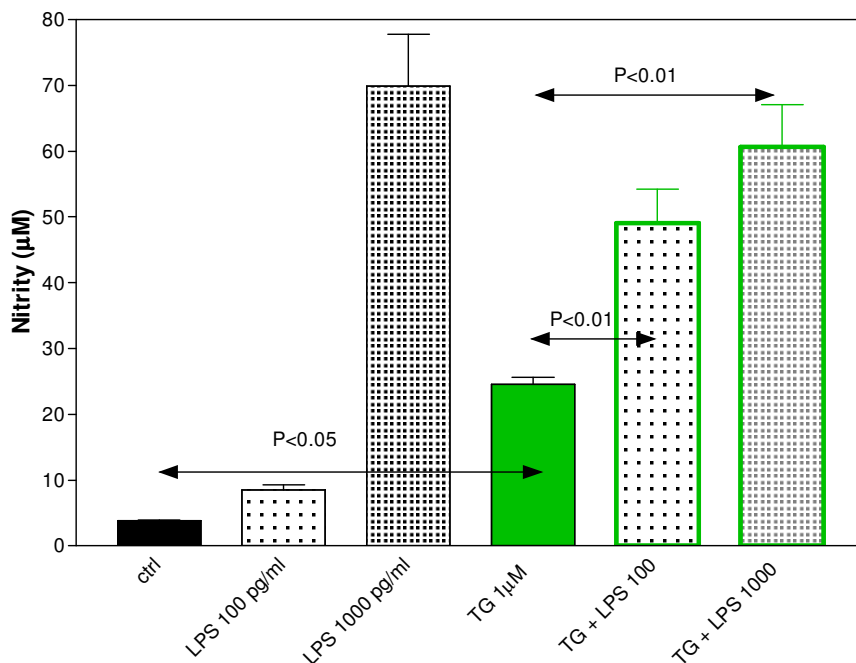
Statistické zpracování dat

Údaje se statisticky vyhodnocovali metodou ANOVA (analysis of variance) s následným Bonferroni testem na určení statistické významnosti mezi testovaným vzorkem a kontrolou. Ke statistickému vyhodnocení dat a grafickému zobrazení výsledků byl použit program GraphPrism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Hodnoty v grafech jsou zobrazeny jako průměr \pm S.E.M.

5. Výsledky

5.1 Produkce NO

V prvním experimentu jsem testovala reaktivitu potkaních peritoneálních makrofágů v přítomnosti samotného TG v koncentraci 1 μM , samotného LPS v koncentraci 100 pg/ml a 1000 pg/ml a kombinaci TG s LPS v obou koncentracích (obr. 11).

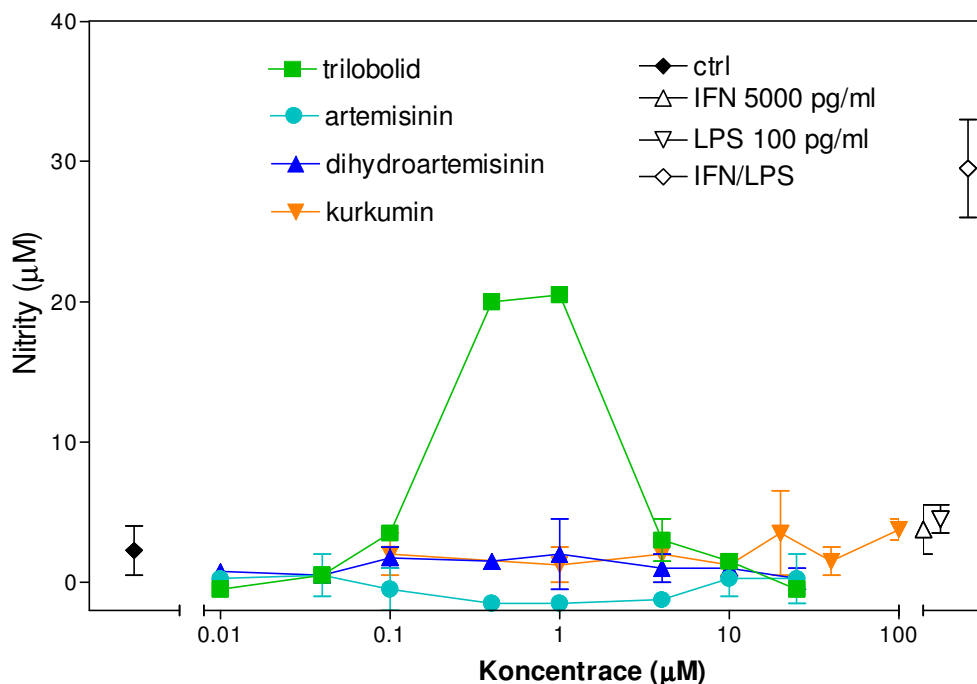


Obrázek 11 Reaktivita peritoneálních makrofágů potkna

Produkce NO potkaních makrofágů byla detekována po 24h kultivaci v přítomnosti nebo nepřítomnosti testovaných látek po přidání Grisseova činidla pomocí spektrofotometru. Ctrl = samotné buňky. Data představují průměr \pm S.E.M ze 3 identických experimentů.

Produkce NO v přítomnosti LPS 100 pg/ml byla jen mírně zvýšena, zatímco v přítomnosti LPS 1000 pg/ml byla výrazná. TG samotný zvyšoval produkci NO signifikantně v porovnání s kontrolou (samotné buňky). Produkce NO v přítomnosti TG byla signifikantně umocněna přítomností LPS, jeho nižší (100 pg/ml) i vyšší (1000 pg/ml) koncentrací.

V dalším experimentu jsem měřila produkci NO v závislosti na zvyšující se koncentraci artemisininu, dihydroartemisininu, kurkuminu a trilobolidu. Jako kontrolu reaktivity buněk jsem použila IFN- γ , LPS a kombinaci IFN/LPS (obr. 12).



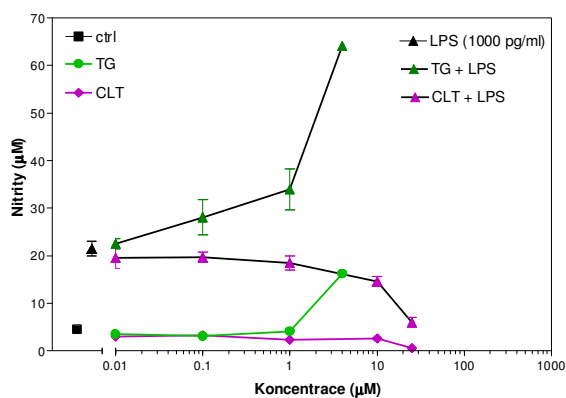
Obrázek 12 Koncentrační závislost inhibitorů SERCA na produkci NO

Potkaní makrofágy byly kultivovány 24 h v přítomnosti zvyšující se koncentraci jednotlivých látek bez kombinace LPS nebo IFN. TB, artemisinin a DHA v koncentracích 0,01;0,04; 0,1; 0,4; 1; 4; 10 a 25 µM a kurkumin v koncentracích 0,1; 1; 4; 10; 20; 40 a 100 µM, ctrl = kontrola. Produkce NO byla detekována po přidání Grisseova činidla pomocí spektrofotometru. Každý bod je průměr \pm S.E.M ze 2 identických experimentů.

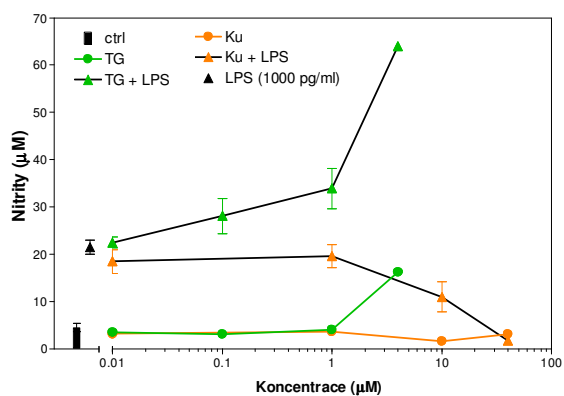
Artemisinin, DHA a kurkumin po 24 h kultivaci nezvyšovaly produkci NO v makrofágách potkana. Výrazně ji nezvýšil ani IFN- γ a LPS. Nejvíce byly buňky nastimulovány kombinací IFN/LPS. V přítomnosti TB došlo k výraznému zvýšení množství NO, počínaje koncentrací 0,1 µM, dosáhlo maxima v koncentraci 1 µM a poté rychle produkce NO poklesla.

Předmětem dalšího experimentu byla produkce NO v přítomnosti klotrimazolu, kurkuminu a artemisininu a modelového SERCA inhibitoru TG (obr. 13). Produkci NO jsem sledovala na potkaních makrofágách.

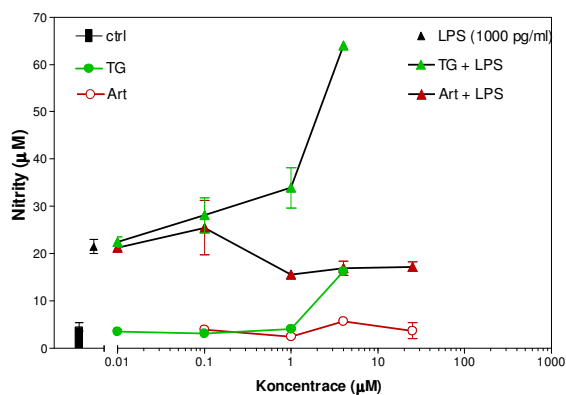
A



B



C



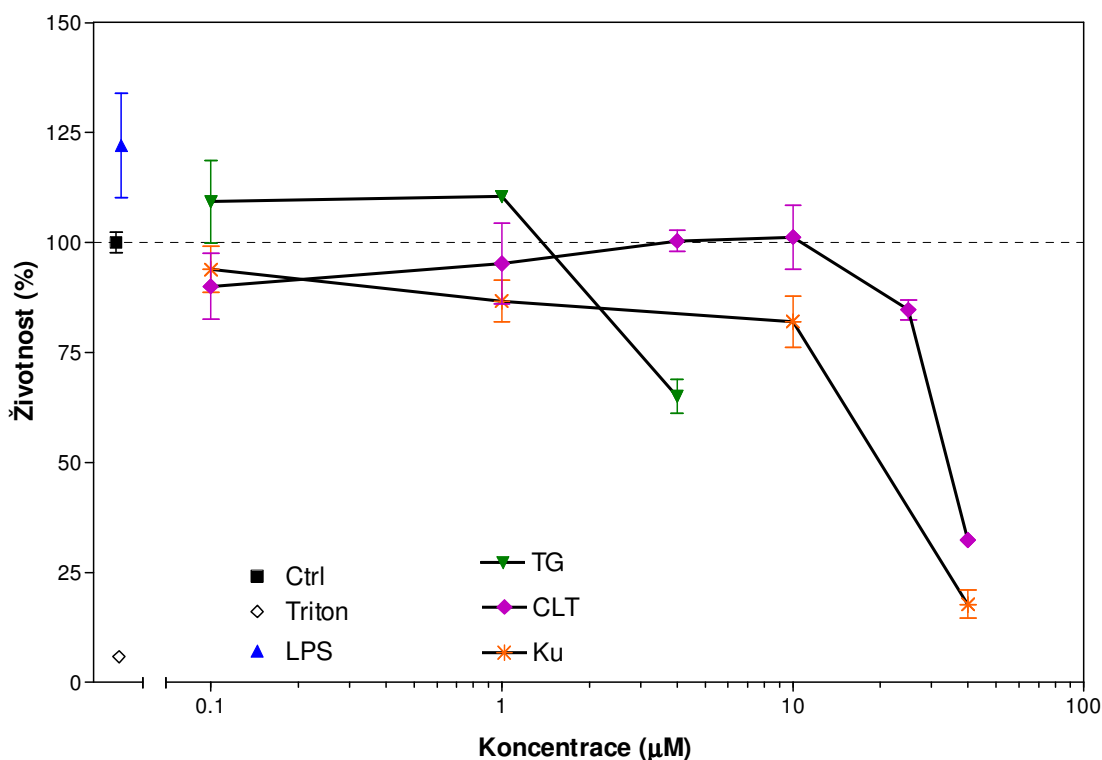
Obrázek 13 Vliv thapsigarginu, klotrimazolu, kurkuminu a artemisininu na produkci NO

Množství NO bylo měřeno po 24h kultivaci potkaních makrofágů v přítomnosti zvyšující se koncentraci samotných látek nebo v kombinaci s LPS. TG v koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 4 μM, ctrl = kontrola, Ku=kurkumin, Art=artemisinin. Každý bod je průměr ± S.E.M ze 2 identických experimentů.

TG se zvyšující se koncentrací (0,01-4 μM) zvyšoval produkci NO a to jak sám tak v kombinaci s LPS (1000 pg/ml), kde došlo k synergickému působení. Produkce NO výrazně stoupala v tomto experimentu od koncentrace 1 μM (obr. 13 A, B, C). Samotný klotrimazol (obr. 13 A), kurkumin (obr. 13 B) a artemisinin (obr. 13 C) produkci NO neovlivnily. Klotrimazol a kurkumin ve vyšší koncentraci v kombinaci s LPS způsobily pokles produkce NO.

5.2 Viabilita buněk

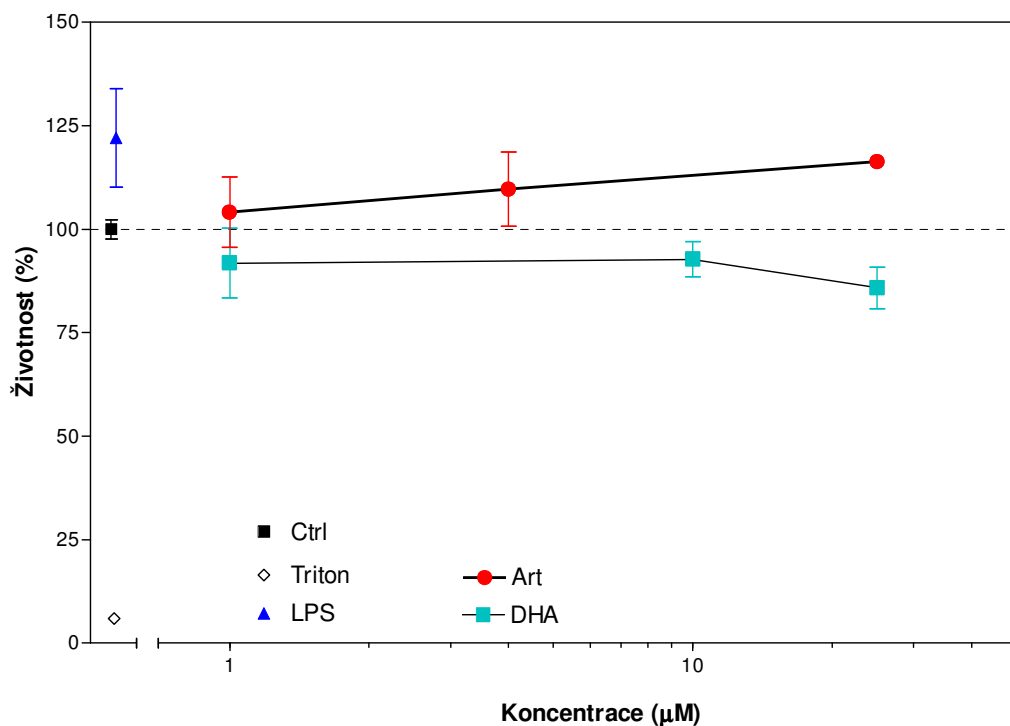
Chemické látky mohou působit na buňky toxicky. Schopnost testovaných látek působit cytotoxicky jsem ověřovala testem viability. Testovala jsem jednotlivé látky ve zvyšující se koncentraci, kurkumin a TG samotné i spolu s modulátory intracelulárního Ca^{2+} . Triton X-100 byl přidán jako negativní kontrola. Jako hodnota 100 % jsou buňky bez přidané látky. Jejich optická denzita je $352,00 \pm 4,15$ (obr. 14-16).



Obrázek 14 Viabilita makrofágů v přítomnosti thapsigarginu, klotrimazolu a kurkuminu

Potkaní makrofágy byly s testovanými látkami kultivovány 24 h, poté k nim byla přidána tetrazoliová sůl WST-1 a po 3 h byla měřena optická denzita. Ku=kurkumin. Každý bod je průměrem \pm S.E.M z 1 experimentu prováděném v tripletu.

Životnost buněk v přítomnosti TG od koncentrace 1 μM klesá. Výrazná úmrtnost buněk nastala po expozici vyšší koncentraci CLT nebo kurkuminu. Křivka CLT a kurkuminu strmě klesá od koncentrace 10 μM .



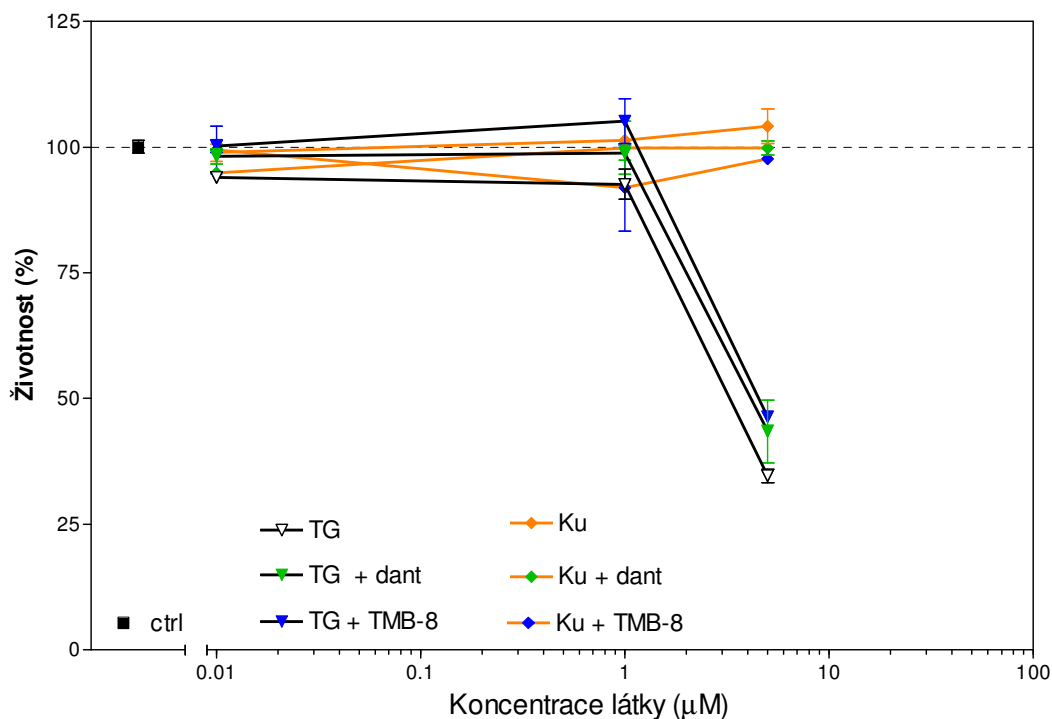
Obrázek 15 Viabilita potkaních makrofágů v přítomnosti artemisininu a dihydroartemisininu

Potkaní makrofágy byly kultivovány 24 h v přítomnosti artemisininu (Art) nebo DHA, poté k nim byla přidána tetrazoliová sůl WST-1 a po 3 h byla měřena optická denzita. Každý bod je průměrem \pm S.E.M z 1 experimentu prováděném v tripletu.

Artemisinin a DHA v koncentracích 1-25 μM výrazně neovlivňují životnost buněk (obr. 15). Ve sledovaných koncentracích nepůsobí tedy cytotoxicky.

Mezi modulátory intracelulárního Ca^{2+} patří dantrolen, inhibitor uvolňování kalcia ze SR, a TMB-8 (8-(N,N-diethylamino)oktyl-(3,4,5-trimethoxy)benzoát hydrochlorid), chelátor intracelulárního Ca^{2+} . Buňky byly kultivovány v přítomnosti zvyšující se koncentrace TG nebo kurkuminu a v kombinaci TG nebo kurkuminu s 30 μM dantrolenem nebo s 15 μM TMB-8 (obr. 16). Modulátory nemění životnost buněk v přítomnosti TG a kurkuminu, tj. SERCA inhibitorů. Stejně jako v předchozím pokusu (obr. 14) došlo u

TG k poklesu viability buněk počínaje koncentrací 1 μM . Kurkumin do koncentrace 5 μM není toxický.

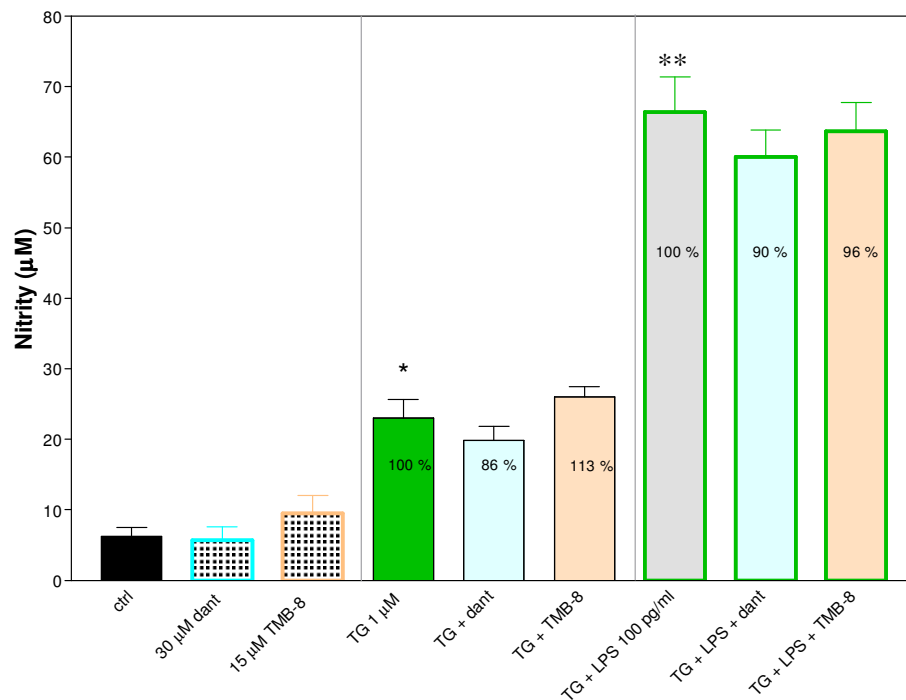


Obrázek 16 Viabilita potkaních makrofágů v přítomnosti modulátorů SERCA

Potkaní makrofágy byly kultivovány 24 h v přítomnosti TG nebo kurkuminu (Ku) nebo s testovanou látkou v přítomnosti 30 μM dantrolenu (dant) či 15 μM TMB-8, poté k nim byla přidána tetrazoliová sůl WST-1 a po 3 h byla měřena optická densita. Koncentrace testovaných látek byla 0,01; 1 a 5 μM . Každý bod je průměrem \pm S.E.M z 1 experimentu prováděném v tripletu.

5.3 Produkce NO v přítomnosti modulátorů SERCA

V dalším experimentu jsem sledovala vliv modulátorů SERCA na produkci NO za přítomnosti TG nebo TG v kombinaci s LPS. Modulátory nemají vliv na produkci NO, mírně nesignifikantně snižují produkci NO vyvolanou TG nebo TG v kombinaci s LPS, mimo kombinaci TG s TMB-8, kde došlo k mírnému zvýšení oproti samotnému TG (obr. 17).



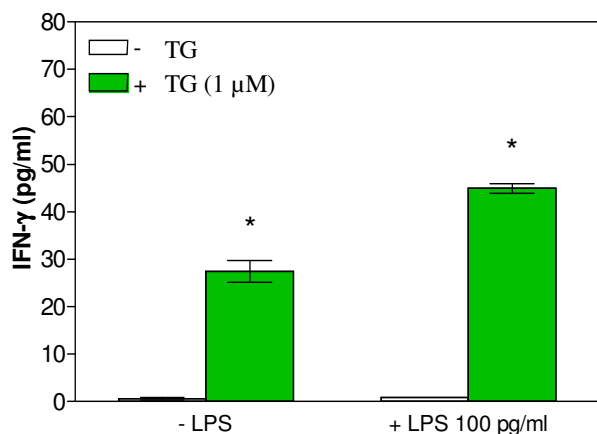
Obrázek 17 Vliv modulátorů SERCA na produkci NO indukovanou thapsigarginem

Produkce NO potkaních makrofágů byla detekována po 24h kultivaci v přítomnosti 1µM TG, 30µM dantrolenu (dant) a 15µM TMB-8, dále v kombinaci TG s dant nebo s TMB-8 a ještě v kombinaci TG s LPS a TG s LPS s modulátorem. Po přidání Griseova činidla bylo určeno množství nesyntetizovaného NO pomocí spektrofotometru. Data představují průměr ± S.E.M ze 2 identických experimentů. *P<0,05, **P<0,001.

5.4 Produkce IFN-γ

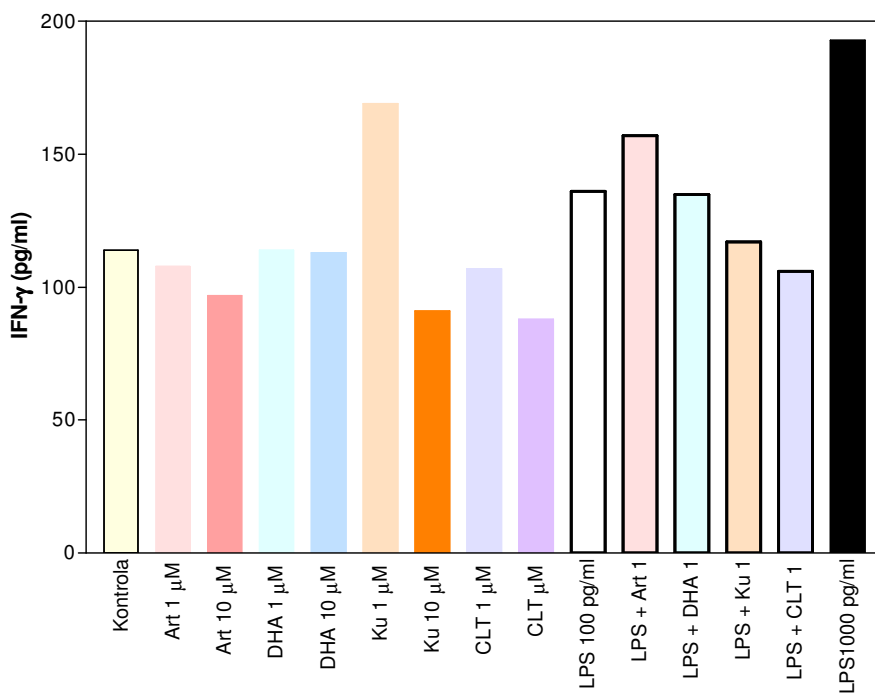
Sekreci IFN-γ jsme sledovali na myších a potkaních makrofágách. TG byl testován na myších makrofágách v koncentraci 1 µM. Artemisinin, DHA, CLT a kurkumin byly zkoušeny v koncentracích 1 µM a 10 µM na potkaních makrofágách. Produkci IFN-γ jsme měřili i v kombinaci jednotlivých látek s LPS 100 pg/ml (obr. 18 a 19).

TG vyvolal signifikantní sekreci IFN-γ v makrofágách myší. Tento efekt byl ještě výraznější po stimulaci buněk LPS (pravé sloupce). Samotný LPS v koncentraci 100 pg/ml produkci IFN-γ nevyvolal.



Obrázek 18 Sekrece IFN- γ myšími peritoneálními makrofágy

Produkce IFN- γ buňkami byla detekována po 7 h kultivace metodou ELISA. Levé sloupce představují čisté buňky a buňky inkubované s TG, pravé sloupce buňky s LPS a buňky s kombinací LPS a TG. Data představují průměr \pm S.E.M ze 3 identických experimentů. *P<0,001



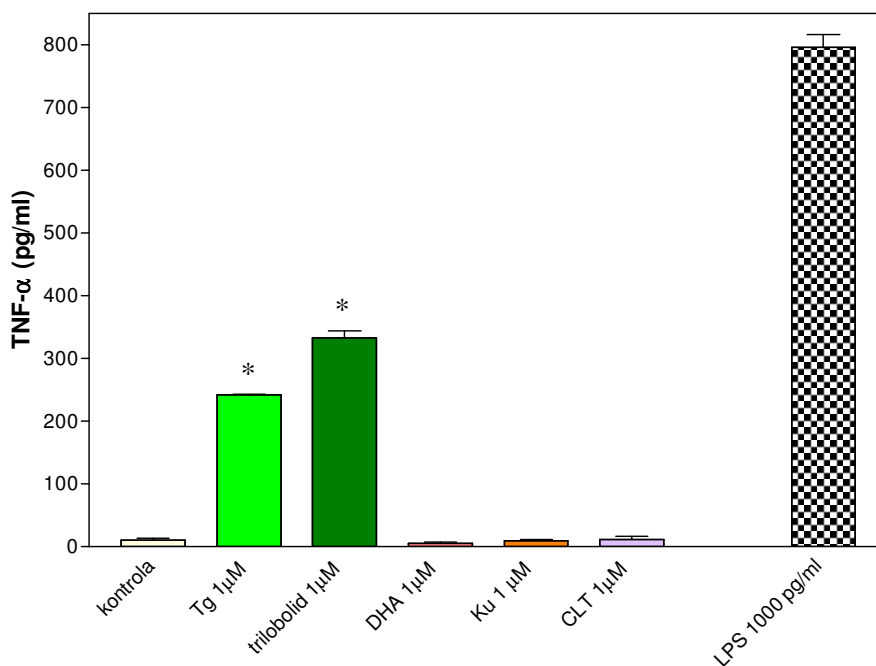
Obrázek 19 Sekrece IFN- γ potkaními makrofágy

Produkce IFN- γ buňkami byla detekována po 6 h kultivace metodou ELISA. Buňky byly inkubovány s testovanými látkami v koncentracích 1 μ M a 10 μ M, s LPS 100pg/ml a 1000 pg/ml. Dále v kombinaci testovaná látka v koncentraci 1 μ M s LPS 100 pg/ml. Provedeno pouze 1 měření.

V makrofágách potkanů artemisinin, DHA ani CLT samy nemají výrazný účinek na sekreci IFN- γ . Ani v přítomnosti LPS nedošlo k synergickému působení látek na sekreci daného cytokinu. V tomto experimentu vyvolával nejvyšší sekreci LPS (1000 pg/ml) 1,69 x více a dále kurkumin 1,48 x více v porovnání s kontrolou.

5.5 Produkce TNF- α

Sekreci TNF- α jsem sledovala na potkaních makrofágách (obr. 20). TG a TB vyvolaly signifikantně sekreci cytokinu, zatímco DHA, CLT a kurkumin sekreci TNF- α neovlivnily. Nejvíce makrofágy stimuloval LPS (1000 pg/ml).



Obrázek 20 Sekrece TNF- α

Produkce TNF- α potkaními makrofágy byla detekována po 5 h kultivace metodou ELISA. Koncentrace testovaných látek byla 1 μ M a LPS 1000 pg/ml. Data představují průměr \pm S.E.M ze 2 identických experimentů. *P<0,05

6. Diskuze

Seskviterpenový lakton a SERCA inhibitor TG projevuje určité imunoterapeutické vlastnosti. Cílem práce bylo ukázat, zda i další látky/léčiva, které jsou fyziologicky popsány jako inhibitory SERCA, mají imunomodulační účinky. Zároveň byl sledován vztah mezi strukturou a imunomodulační aktivitou těchto látek. Testovala jsem strukturně blízký seskviterpenový lakton TB, seskviterpenové laktony podobné struktury artemisinin a DHA a chemicky odlišné látky kurkumin a CLT. Látky byly testovány v koncentracích nM- μ M, které odpovídají na základě studované literatury inhibici SERCA.

Důležitou látkou imunitního systému je NO, který se podílí na nespecifické obraně organismu, má cytotoxické a cytostatické účinky. Měření produkce NO residentními peritoneálními potkaními nebo myšími makrofágy se ukázalo jako spolehlivý a výhodný ekonomický nástroj v primárním testování imunomodulační aktivity látek (Kmoníčková a kol. 2007). Po primárním stanovení produkce NO u sledovaných látek jsem ověřovala sekreci cytokinů (IFN- γ , TNF- α) a zároveň sledovala eventuelní cytotoxicitu látek.

TG je nejznámější SERCA inhibitor, využívaný ke zvýšení intracelulárního vápníku a jako modelový příklad byl použit i v předkládané diplomové práci. TG sám v koncentraci 1 μ M signifikantně stimuloval produkci NO v peritoneálních potkaních makrofágách. Kombinace TG s již nízkou dávkou LPS (100 pg/ml) má synergický účinek. Produkci NO může ovlivnit mnoho cytokinů. Avšak rozhodující funkci má IFN- γ , který spouští sám syntézu NO v různých typech buněk a za různých experimentálních podmínek (Stuehr a Marletta 1987). Zjistila jsem, že TG sám vyvolal sekreci IFN- γ myšími makrofágy, v kombinaci s LPS byla sekrece ještě výraznější. Tyto výsledky jsou ve shodě se zjištěním Kmoníčkové a kol. (2008), kteří dokumentovali v myších, potkaních peritoneálních makrofágách a lidských PBMC (mononukleární buňky periferní krve) indukci IFN- γ v závislosti na koncentraci. Ačkoliv jsou myši na produkci NO méně citlivé než potkani, našla jsem signifikantní sekreci IFN- γ u myší již při 7hodinové kultivaci s TG.

Seskviterpenový lakton TB izolovaný z *Laser trilobum* je strukturně velmi blízký TG. Liší se pouze substitucí tricyklu v polohách 2 a 8. Sledovala jsem produkci NO v závislosti na zvyšující se koncentraci TB. Stejně jako TG je TB v koncentracích 0,1-4,0 μM významným stimulatorem zvláště při srovnání s maximální stimulací produkce NO dosaženou kombinací IFN- γ + LPS. Obdobné hodnoty koncentrační závislosti získali Kmoníčková a kol. (2010), když srovnávali působení samotného TB na myši a potkaní makrofágy. Jedinou doposud popsanou vlastností TB byla inhibice SERCA (viz literární přehled). Ojedinělá vlastnost stimulovat sekreci IFN- γ seskviterpenovými laktony guaianolidového typu byla nedávno zmíněnými autory nově popsána. Vzhledem k cytokinové síti se nedá ovšem předpokládat, že bude indukován pouze 1 cytokin. Analyzovala jsem produkci TNF- α a našla jsem, že TG i TB stimulovaly sekreci TNF- α . Tento cytokin bývá považován za prozánětlivý, i když např. v hepatocytech může mít při jaterním poškození, konkrétně při částečné hepatektomii protektivní – antiapoptotický účinek (Diehl 2000).

Artemisinin a DHA jsou TG strukturně podobné seskviterpenové laktony, které se vážou na SERCA parazita *Plasmodium falciparum* ve stejné oblasti jako TG. Produkci NO však neovlivnily. Efekt artemisininu na produkci NO studovali i Aldieri a kol. (2003) na lidské linii astrocytů T67. Buňky byly inkubovány po 24 hodin se samotným artemisininem (10 μM) nebo v kombinaci 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10 ng/ml IL-1 β + 100 ng/ml IFN- γ + 50 ng/ml TNF- α nebo ve směsi spolu s 10 μM artemisininu. Při inkubaci buněk se samotným artemisininem nedošlo v médiu ke změně hladiny NO, zatímco v samotné směsi se hladina NO výrazně zvýšila. Přidání artemisininu do směsi vrátilo zvýšení NO vyvolané směsí LPS a cytokinů na kontrolní hodnoty nestimulovaných buněk. Autoři interpretují efekt artemisininu jako inhibiční působení na produkci NO, resp. NF- κB . V mých experimentech na potkaních makrofágách artemisinin a DHA (obě látky 0,01-25 μM) nevyvolaly indukci NO a v kombinaci s LPS (1000 pg/ml) vyvolal artemisinin jen nevýznamný pokles produkce NO v koncentracích 1, 4 a 25 μM . Artemisinin ani DHA nemají vliv na produkci IFN- γ a nejsou ani v koncentraci 25 μM pro potkaní makrofágy toxické. Na rozdíl od TG a TB nebyla pozorována ani sekrece TNF- α . Z literatury je známo několik modelových situací malárie na myších. Ve všech případech byla zjištěna *in vivo* produkce TNF- α . DHA podaný v průběhu onemocnění

nebo i protektivně snižuje hladinu tohoto cytokinu a zlepšuje průběh onemocnění (Hunt a kol. 2006, Golenser a kol. 2006).

Z literárních údajů vyplývá, že pro látky, které inhibují SERCA je nutná přítomnost -OH skupin. Takto byl objeven i kurkumin jako látka, která inhibuje tento enzym (Logan-Smith a kol. 2001). Kurkumin je spojen s inhibicí mnoha buněčných mediátorů – transkripčních faktorů, protein kináz, enzymů, cytokinů a chemokinů atd. Na různých modelech onemocnění na úrovni buněk i *in vivo* byla pozorována po aplikaci kurkuminu inhibice NF- κ B a TNF- α a jsou tak vysvětlovány jeho protizánětlivé účinky (pro přehled Aggarwal a Sung, 2009). V modelu hepatitidy vyvolané thioacetamidem inhiboval kurkumin expresi iNOS (také lipidovou peroxidaci a aktivaci NF- κ B, Shapiro a kol. 2006). Fahey a kol. (2007) studovali vliv kurkuminu na sekreci cytokinů IFN- γ a IL-10 v T buňkách zdravých dárců a u pacientů s roztroušenou sklerózou. V obou skupinách buněk byla exprese a sekrece cytokinů modulována kurkuminem tak, že kurkumin inhiboval sekreci (prozánětlivého) IFN- γ vyvolanou IL-12 a stimuloval sekreci (protizánětlivého) IL-10 vyvolanou TGF- β . Nenašla jsem literaturu, která by se týkala přímo peritoneálních makrofágů a jejich ovlivnění kurkuminem. V experimentech jsem nepozorovala vliv samotného kurkuminu (0,01-100 μ M) na produkci NO na rozdíl od TG a TB. V kombinaci s LPS, který indukuje tvorbu NO, jsem pozorovala snížení NO při koncentraci kurkuminu vyšší než 1 μ M. To by odpovídalo celkovému inhibičnímu působení kurkuminu na prozánětlivé mediátory. Posléze jsem ale analyzovala životnost buněk a zjistila, že kurkumin samotný (bez LPS) prudce snižuje viabilitu, zejména od koncentrace 10 μ M. Tento nálezn může jednoduše vysvětlit mnohé v literatuře popisované inhibiční účinky kurkuminu, alespoň v *in vitro* experimentálním uspořádání. Pozorované rozdíly ve viabilitě se odrážejí i v naměřené sekreci IFN- γ v přítomnosti 1 a 10 μ M kurkuminu, ačkoliv se pohybují na úrovni kontrolních hodnot.

Ačkoliv molekula CLT nemá ani -OH skupiny, o kterých je známo, že jsou nutné k inhibici SERCA, přesto inhibuje účinně tuto ATPázu a to změnou konformace E2. Tím znemožňuje přechod do konformace E1 a navázání vápníkových iontů. Z hlediska imunomodulačního působení je CLT znám jako inhibitor proliferace nádorových buněk a vaskulárních endotelových buněk (Khalid a kol. 2005). CLT 1-10 μ M inhibuje expresi chemokinů IL-8, MCP-1, a dále VCAM-1 a částečně aktivaci NF- κ B. Podílí se tak na

inhibici angiogeneze (Thapa a kol. 2009) a potlačuje chronické střevní záněty (Kobayashi a kol. 2007). Jak jsem zjistila, toto imidazolové antimykotikum nestimuluje produkci NO aplikovaného samostatně ani v kombinaci s LPS nebo LPS/IFN- γ . CLT ale signifikantně snižuje životnost buněk, počínaje koncentrací 10 μ M. Podobně jako u kurkuminu, koreluje snížená viabilita s poklesem tvorby NO, která byla nastimulována LPS. CLT v koncentracích, kdy životnost není ještě snížena, nevyvolal sekreci IFN- γ , a to ani v kombinaci s LPS.

Jak kurkumin, tak CLT nevyvolaly na rozdíl od TG a TB sekreci TNF- α .

Abych zjistila, zda ovlivňování intracelulárního vápníku souvisí s tvorbou NO, podrobila jsem stejnému pokusu TG nebo kurkumin spolu se dvěma modulátory intracelulárního vápníku, s TMB-8 a dantrolenem. Ty snižují, i když rozdílným mechanismem, volné ionty vápníku v cytosolu. Ani jedna z látek neměla vliv na produkci NO ani na životnost buněk v přítomnosti TG nebo kurkuminu. V laboratoři ÚEM bylo zjištěno, že chelátor intracelulárního vápníku BAPTA/AM (1,2-bis(2-aminofenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina/acetoxymethyl ester) snižuje produkci NO vyvolanou TG a TB pouze částečně a nemá vůbec vliv na sekreci IFN- γ . Zdá se, že imunostimulační účinek přímo nesouvisí se zvýšením intracelulárního vápníku vyvolaném SERCA inhibitory, ale se strukturou seskviterpenových laktonů strukturně blízkým TG.

7. Shrnutí závěrů práce

Studovala jsem látky, které jsou známé jako SERCA inhibitory: thapsigargin, trilobolid, kurkumin, klotrimazol, artemisinin a dihydroartemisinin. Thapsigargin, prototyp těchto látek, má významné imunomodulační vlastnosti, jak bylo nedávno zjištěno.

Na modelu potkaních a myších makrofágů jsem zjistila, že

- 1) V porovnání s thapsigarginem stimuluje signifikantně produkci NO pouze strukturálně blízký analog trilobolid. Klotrimazol a kurkumin jeví v testovaných koncentracích výraznou toxicitu.
- 2) Pouze thapsigargin a trilobolid stimuluji významně sekreci IFN- γ a TNF- α .
- 3) Produkce NO není ovlivněna modulací intracelulárního vápníku vyvolanou chelátorem TMB-8 a dantrolenem.

Na základě literárních údajů a provedených experimentů lze uzavřít, že:

- Imunostimulační aktivita SERCA inhibitorů se vztahuje pouze k seskviterpenovým laktonům guaianolidového typu.
- Produkce NO a sekrece cytokinů nejsou u těchto látek ovlivněné manipulací s koncentrací intracelulárního vápníku. Nelze vyloučit, že imunomodulační účinky nesouvisí přímo s aktivitou SERCA.

8. Literatura

- Aggarwal B. B. a Sung B. (2009) Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 85-94
- Aldieri E., Atragene D., Bergandi L., Riganti C., Costamagna C., Bosia A. a Ghigo D. (2003) Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF- κ B activation. *FEBS Lett.* 552, 141-144
- Anand P., Kunnumakkara A. B., Newman R. A. a Aggarwal B. B. (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 4, 807-818
- Arredouani A., Guiot Y., Jonas J. C., Liu L. H., Nenquin M., Pertusa J. A., Rahier J., Rolland J. F., Shull G. E., Stevens M., Wuytack F., Henquin J. C. a Gilon P. (2002) SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) pumps for Ca(2+) homeostasis in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 51, 3245-3253
- Asahi M., Kimura Y., Kurzydowski K., Tada M. a MacLennan D. H. (1999) Transmembrane helix M6 in sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase forms a functional interaction site with phospholamban. Evidence for physical interactions at other sites. *J. Biol. Chem.* 274, 32855-32862
- Bartolommei G., Tadini-Buoninsegni F., Hua S., Moncelli M. R., Inesi G. a Guidelli R. (2006) Clotrimazole inhibits the Ca²⁺-ATPase (SERCA) by interfering with Ca²⁺ binding and favoring the E2 conformation. *J. Biol. Chem.* 281, 9547-9551
- Benders A. A., Veerkamp J. H., Oosterhof A., Jongen P. J., Bindels R. J., Smit L. M., Busch H. F. a Wevers R. A. (1994) Ca²⁺ homeostasis in Brody's disease. A study in skeletal muscle and cultured muscle cells and the effects of dantrolene an verapamil. *J. Clin. Invest.* 94, 741-748
- Berridge M. J. (2002) The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 32, 235-249
- Bharti A. C., Takada Y. a Aggarwal B. B. (2004) Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF- κ B ligand-induced NF- κ B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *J. Immunol.* 172, 5940-5947
- Brini M. a Carafoli E. (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* 89, 1341-1378
- Brittsan A. G., Carr A. N., Schmidt A. G. a Kranias E. G. (2000) Maximal inhibition of SERCA2 Ca(2+) affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban. *J. Biol. Chem.* 275, 12129-12135
- Brody I. A. (1969) Muscle contracture induced by exercise. A syndrome attributable to decreased relaxing factor. *N. Engl. J. Med.* 281, 187-192
- Camacho P. a Lechleiter J. D. (1993) Increased frequency of calcium waves of *Xenopus laevis* oocytes that express calcium-ATPase. *Science* 260, 226-229

- Carafoli E. (2003) The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 326-322
- Denmeade S. R. a Isaacs J. T. (2005) The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.* 4, 14-22
- Diehl A. M. (2000) Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* 174, 160-171
- Ebashi F. a Ebashi S. (1962) Removal of calcium and relaxation in actomyosin systems. *Nature* 194, 378-379
- Eckstein-Ludwig U., Webb R. J., Van Goethem I. D., East J. M., Lee A. G., Kimura M., O'Neill P. M., Bray P. G., Ward S. A. a Krishna S. (2003) Artemisinin target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 424, 957-961
- Fahey A. J., Adrian Robins R. a Constantinescu C. S. (2007) Curcumin modulation of IFN-beta and IL-12 signalling and cytokine induction in human T cells. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 1129-1137
- Furchgott R. F. a Zawadzki J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376
- Garg A. K., Buchholz T. A. a Aggarwal B. B. (2005) Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 1630-1647
- Goel A., Kunnumakkara A. B. a Aggarwal B. B. (2008) Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem. Pharmacol.* 75, 787-809
- Golenser J., Waknine J. H., Krugliak M., Hunt N. H. a Grau G. E. (2006) Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int. J. Parasitol.* 36, 1427-1441
- Green K. N., Demuro A., Akbari Y., Hitt B. D., Smith I. F., Parker I. a LaFerla F. M. (2008) SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production. *J. Gen. Physiol.* 132, 1107-1116
- Gu H. M., Warhurst D. C. a Peters W. (1984) Uptake of [3H] dihydroartemisinin by erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 265-270
- Hasselbach W. a Makinose M. (1961) The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting. *Biochem. Z.* 333, 518-528
- Hunt N. H., Golenser J., Chan-Ling T., Parekh S., Rae C., Potter S., Medana I. M., Miu J. a Ball H. J. (2006) Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* 36, 569-582
- Chami M., Gozuacik D., Lagorce D., Brini M., Falson P., Peaucellier G., Pinton P., Lecoeur H., Gougeon M. L., le Maire M., Rizzuto R., Bréchet C. a Paterlini-Bréchet P. (2001) SERCA1 truncated proteins unable to pump calcium reduce the endoplasmic reticulum calcium concentration and induce apoptosis. *J. Cell Biol.* 153, 1301-1314

- Cheshenko N., Del Rosario B., Woda C., Marcellino D., Satlin L. M. a Herold B. C. (2003) Herpes simplex virus triggers activation of calcium-signaling pathways. *J. Cell Biol.* 16, 283-293
- Christensen S. B., Andersen A., Poulsen J. C. a Treiman M. (1993) Derivatives of thapsigargin as probes of its binding site on endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. Stereoselectivity and important functional groups. *FEBS Lett.* 335, 345-348
- Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrns R. E. a Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 9265-9269
- Inesi G., Hua S., Xu C., Ma H., Seth M., Prasad A. M. a Sumbilla C. (2005) Studies of Ca²⁺ ATPase (SERCA) inhibition. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 365-368
- Isler J. A., Maguire T. G. a Alwine J. C. (2005) Production of infectious human cytomegalovirus virions is inhibited by drugs that disrupt calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 79, 15388-15397
- Jagetia G. C. a Aggarwal B. B. (2007) "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J. Clin. Immunol.* 27, 19-35
- John L. M., Lechleiter J. D. a Camacho P. (1998) Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J. Cell Biol.* 142, 963-973
- Khalid M. H., Tokunaga Y., Caputy A. J. a Walters E. (2005) Inhibition of tumor growth and prolonged survival of rats with intracranial gliomas following administration of clotrimazole. *J. Neurosurg.* 103, 79-86
- Khanna D., Sethi G., Ahn K. S., Pandey M. K., Kunnumakkara A. B., Sung B., Aggarwal A. a Aggarwal B. B. (2007) Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 344-351
- Kmoníčková E., Melkusová P., Farghali H., Holý A. a Zídek Z. (2007) Nitric oxide production in mouse and rat macrophages: a rapid and efficient assay for screening of drugs immunostimulatory effects in human cells. *Nitric Oxide* 17, 160-169
- Kmoníčková E., Melkusová P., Harmatha J., Vokáč K., Farghali H. a Zídek Z. (2008) Inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase thapsigargin stimulates production of nitric oxide and secretion of interferon-gamma. *Eur. J. Pharmacol.* 24, 85-92
- Kmoníčková E., Harmatha J., Vokáč K., Kostecká P., Farghali H. a Zídek Z. (2010) Sesquiterpene lactone trilobolide activates production of interferon- γ and nitric oxide. *Fitoterapia* 81, 1213-1219
- Kobayashi H., Boelte K. C. a Lin P. C. (2007) Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr. Med. Chem.* 14, 377-386
- Koss K. L. a Kranias E. G. (1996) Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ. Res.* 79, 1059-1063

- Kunwar A., Barik A., Mishra B., Rathinasamy K., Pandey R. a Priyadarsini K. I. (2008) Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 673-679
- Li C. J., Zhang L. J., Dezube B. J., Crumpacker C. S. a Pardee A. B. (1993) Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1839-1842
- Li H. L., Liu C., de Couto G., Ouzounian M., Sun M., Wang A. B., Huang Y., He C. W., Shi Y., Chen X., Nghiem M. P., Liu Y., Chen M., Dawood F., Fukuoka M., Maekawa Y., Zhang L., Leask A., Ghosh A. K., Kirshenbaum L. A. a Liu P. P. (2008) Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 118, 879-893
- Liang G., Li X., Chen L., Yang S., Wu X., Studer E., Gurley E., Hylemon P. B., Ye F., Li Y. a Zhou H. (2008) Synthesis and anti-inflammatory activities of mono-carbonyl analogues of curcumin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 1525-1529
- Liu L. H., Paul R. J., Sutliff R. L., Miller M. L., Lorenz J. N., Pun R. Y., Duffy J. J., Doetschman T., Kimura Y., MacLennan D. H., Hoying J. B., Shull G. E. (1997) Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca^{2+} signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform 3. *J. Biol. Chem.* 272, 30538-30545
- Logan-Smith M. J., Lockyer P. J., East J. M. a Lee A. G. (2001) Curcumin, a molecule that inhibits the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum but increases the rate of accumulation of Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 276, 46905-46911
- Lytton J., Westlin M., Burk S. E., Shull G. E. a MacLennan D. H. (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 267, 14483-14489
- MacLennan D. H. (1970) Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 245, 4508-4518
- MacMicking J., Xie Q. W. a Nathan C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-350
- Morimoto T., Sunagawa Y., Kawamura T., Takaya T., Wada H., Nagasawa A., Komeda M., Fujita M., Shimatsu A., Kita T. a Hasegawa K. (2008) The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J. Clin. Invest.* 118, 868-878
- Nahrevanian H. (2009) Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. *Braz. J. Infect. Dis.* 13, 440-448
- Nakagawa M., Sakamoto N., Tanabe Y., Koyama T., Itsui Y., Takeda Y., Chen C. H., Kakinuma S., Oooka S., Maekawa S., Enomoto N. a Watanabe M. (2005) Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 129, 1031-1041

- Nathan C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064
- Odermatt A., Taschner P. E., Khanna V. K., Busch H. F., Karpati G., Jablecki C. K., Breuning M. H. a MacLennan D. H. (1996) Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nat. Genet.* 14, 191-194
- Odermatt A., Taschner P. E., Scherer S. W., Beatty B., Khanna V. K., Cornblath D. R., Chaudhry V., Yee W. C., Schrank B., Karpati G., Breuning M. H., Knoers N. a MacLennan D.H. (1997) Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease. *Genomics* 45, 541-553
- Odermatt A., Becker S., Khanna V. K., Kurzydowski K., Leisner E., Pette D. a MacLennan D. H. (1998) Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273, 12360-12369
- Odermatt A., Barton K., Khanna V. K., Mathieu J., Escolar D., Kuntzer T., Karpati G. a MacLennan D. H. (2000) The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum. Genet.* 106, 482-491
- Pahl H. L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866
- Rasmussen U., Brøgger Christensen S. a Sandberg F. (1978) Thapsigargin and thapsigarginine, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. *Acta Pharm. Suec.* 15, 133-140
- Ribeiro I. R. a Olliaro P. (1998) Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials. *Med. Trop.* 58, 50-53
- Rivera-Espinoza Y. a Muriel P. (2009) Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. *Liver Int.* 29, 1457-1466
- Sagara Y., Fernandez-Belda F., de Meis L. a Inesi G. (1992) Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin. *J. Biol. Chem.* 267 12606-12613
- Seidler N. W., Jona I., Vegh M. a Martonosi A. (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264, 17816-17823
- Shapiro H., Askhenazi M., Weizman N. (2006) Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 358-366
- Singh S. (2007) From exotic spice to modern drug? *Cell* 130, 765-768
- Snajdrova L., Xu A. a Narayanan N. (1998). Clotrimazole, an antimycotic drug, inhibits the sarcoplasmic reticulum calcium pump and contractile function in heart muscle. *J. Biol. Chem.* 273, 28032-28039
- Stuehr D. J. a Marletta M. A. (1987) Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res.* 47, 5590-5594

- Supłat D., Targos B., Sabała P., Barańska J. a Pomorski P. (2004) Differentiation of answer of glioma C6 cells to SERCA pump inhibitors by actin disorganization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 870-875
- Thapa D., Lee S. J., Park M. A., Cho M. Y., Choi H. G., Jeong Ch. T. a Kim J. A. (2009) Inhibitory effects of clotrimazole on TNF- α - induced adhesion molecule expression and angiogenesis. *Arch. Pharm. Res.* 32, 593-603
- Toovey S., Bustamante L. Y., Uhlemann A. C., East J. M. a Krishna S. (2008) Effect of artemisinins and amino alcohol partner antimalarials on mammalian sarcoendoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase activity. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 209-213
- Toyoshima C. (2008) Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 3-11
- Treiman M., Caspersen C. a Christensen S. B. (1998) A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 131-135
- Varadi A., Lebel L., Hashim Y., Mehta Z., Ashcroft S. J. a Turner R. (1999) Sequence variants of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48). *Diabetologia* 42, 1240-1243
- Weisberg S. P., Leibel R. a Tortoriello D. V. (2008) Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes. *Endocrinology* 149, 3549-3558
- Wictome M, Khan Y. M., East J. M. a Lee A. G. (1995) Binding of sesquiterpene lactone inhibitors to the Ca(2+)-ATPase. *Biochem. J.* 310, 859-868
- Wu K. D., Lee W. S., Wey J., Bungard D. a Lytton J. (1995) Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. *Am. J. Physiol.* 269, 775-784
- Yang F., Lim G. P., Begum A. N., Ubeda O. J., Simmons M. R., Ambegaokar S. S., Chen P. P., Kayed R., Glabe C. G., Frautschy S. A. a Cole G. M. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 280, 5892-5901

Chemické vzorce byly vytvořeny programem ChemDraw Std 8.0.