

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**IN VITRO ŠTÚDIUM NOVO SYNTETIZOVANÝCH
POTENCIÁLNE KARDIOPROTEKTÍVNYCH LIEČIV**

Diplomová práca

Vedúca diplomovej práce: RNDr. Pavlína Hašková, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Lucie Liptáková

Ďakujem svojej školiteľke RNDr. Pavlíne Haškovej, Ph.D. za vedenie, trpezlivosť a pomoc v priebehu experimentov a za neoceniteľné rady pri písaní tejto práce. Taktiež ďakujem Katedre organickej chémie za poskytnuté chelátory a kolektívu Katedry biochemických vied, za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri vypracovávaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného, alebo rovnakého titulu.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Lucie Liptáková

Školitel: RNDr. Pavlína Hašková, Ph.D.

Názov diplomovej práce: In vitro štúdium novo syntetizovaných potenciálne kardioprotektívnych liečiv

Reaktívne formy kyslíka (ROS) a dusíka (RNS) sú v organizme produkované za normálnych i patologických podmienok. Organizmus disponuje antioxidačnými mechanizmami, ktoré ho chránia pred ich škodlivými účinkami. V prípade nerovnováhy medzi produkciou ROS/RNS a antioxidačnými mechanizmami, dochádza k oxidačnému stresu, ktorý pôsobí v patogenéze mnohých ochorení vrátane kardiovaskulárnych. Z dôvodu prítomnosti veľkého množstva mitochondrií a nižšieho množstva prítomných antioxidantov sú kardiomyocyty obzvlášť citlivé k oxidačnému stresu. Železo, sa katalyzovaním radikálových reakcií významnou mierou podieľa na vzniku a rozvoji oxidačného stresu. Odstránenie voľného železa pomocou chelátorov železa je jednou z možností, ako oxidačnému stresu predchádzať, alebo ho mierniť.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo štúdium kardioprotektívnych účinkov v prostredí H_2O_2 i vlastných kardiotoxických vlastností novo syntetizovaných aroylhydrazónových chelátorov železa (H21, H22, H23, H24, H25 a H26), na línii potkaních embryonálnych kardiomyoblastov H9c2.

Protektívne i toxické vlastnosti skúšaných chelátorov, boli vyhodnotené na základe viability buniek testom vychytávania neutrálnej červene živými bunkami. Fotografická dokumentácia bola vyhotovená fluorescenčnou mikroskopiou za použitia mitochondriálnej sondy JC-1.

Všetky študované látky sa prejavili ako relatívne veľmi málo toxické voči bunkám H9c2, zároveň však (s výnimkou látky H24) neboli vôbec schopné bunky ochrániť v prostredí 200 μ M peroxidu vodíka. Chelátor H24 ako jediný z pomedzi testovaných látok preukázal schopnosť chrániť bunky pred oxidačným stresom

spôsobeným H_2O_2 . Avšak zo všetkých skúšaných látok vykazoval i najvyššiu vlastnú toxicitu po 24 i 72 hodinách.

Táto práca nepriniesla očakávané výsledky, avšak je zdrojom cenných informácií pre ďalšiu syntézu a štúdium nových látok chelatujúcich železo s potenciálne kardioprotektívnymi vlastnosťami.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Lucie Liptáková
Supervisor: RNDr. Pavlína Hašková, Ph.D.
Title of master thesis: In vitro study of newly synthesized potential cardioprotective drugs

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are in an organism generated under normal or pathological conditions. There are antioxidant mechanisms, which protects the organism from their harmful effect. In case of imbalance between ROS/RNS production and antioxidant mechanisms, an oxidative stress is initiated. The oxidative stress is involved in the pathogenesis of many diseases, including cardiovascular disease. In consequence of higher presence of mitochondria and lower presence of antioxidants cardiomyocytes are more sensitive to the oxidative stress. Iron, by catalysing radical's reactions, significantly participates on formation and development of oxidative stress. Elimination of the free iron by iron chelators is one option how to prevent or moderate oxidative stress.

The aim of this master theses was to study cardioprotective effect in presence of H₂O₂ and own toxicity of newly synthesized aroylhydrazone iron chelators (H21, H22, H23, H24, H25 and H26) on rat embryotic cardiomyoblasts H9c2.

Protective and toxic properties of studied chelators were evaluated by cell viability assay based on neutral red uptake by living cells. Photographic documentation was made out by fluorescent microscopy of cells stained by mitochondrial probe JC-1.

All studied substances showed relatively low toxicity against H9c2 cells. Although, they were not able (with the exception of H24) to protect cells in a presence of 200µM hydrogen peroxide. From all tested substances, only chelator H24 showed ability to protect cells from oxidative stress caused by H₂O₂. However, chelator H24 showed the highest own toxicity after 24 and 72 hours.

Even though my data haven't showed expected results, they remain a source of important information for the next synthesis and study of new iron chelators with potentially cardioprotective properties.

Obsah

1	Úvod	11
2	Súčasný stav riešenej problematiky.....	12
2.1	Kyslík	12
2.2	ROS	13
2.2.1	Voľné radikály	14
2.2.2	Neradikálové zlúčeniny	16
2.3	RNS	18
2.3.1	Oxid dusnatý (NO [•])	18
2.3.2	Peroxynitrit (ONOO ⁻).....	19
2.4	Oxidačný stres	20
2.4.1	Fentonova a Haber-Weisova reakcia	21
2.5	Železo	23
2.5.1	Metabolizmus železa.....	24
2.5.2	Preťaženie organizmu železom.....	30
2.5.3	Kardiotoxicita železa	31
2.6	Antioxidačné mechanizmy.....	32
2.6.1	Antioxidačné enzýmy	33
2.6.2	Neenzýmové antioxidanty	34
2.7	Chelátory železa	37
2.7.1	Vlastnosti a štruktúra chelátorov	38
2.7.2	Klinicky používané chelátory železa	39
2.7.3	Perspektívne chelátory	42
3	Ciele práce	47
4	Materiál.....	48
4.1	Prístrojové vybavenie.....	48
4.2	Spotrebný materiál	48

4.3	Chemikálie	49
4.3.1	Skúšané látky	49
4.3.2	Bunková línia H9c2	50
5	Metodika.....	51
5.1	Manipulácia s bunkovou líniou.....	51
5.1.1	Kultivácia.....	51
5.1.2	Pasážovanie.....	51
5.1.3	Počítanie buniek.....	52
5.1.4	Nasadzovanie buniek na pokus.....	53
5.2	Štúdium kardioprotektívnych a kardiotoxických vlastností testovaných látok	54
5.2.1	Príprava zásobných roztokov	54
5.2.2	Príprava skúšaných roztokov pre test na kardiotoxické vlastnosti testovaných látok	54
5.2.3	Príprava skúšaných roztokov pre test na kardioprotektívne vlastnosti testovaných látok	55
5.2.4	Experiment.....	55
5.3	Vyhodnotenie pokusov.....	56
5.3.1	Test vychytávania neutrálnej červene.....	56
5.3.2	Roztoky potrebné k testu vychytávania neutrálnej červene.....	56
5.3.3	Prevedenie testu na vychytávanie neutrálnej červene.....	56
5.3.4	Štatistické spracovanie výsledkov	57
5.4	Zhotovenie fotodokumentácie.....	57
5.4.1	Fluorescenčné farbenie mitochondrií.....	58
5.4.2	Fotenie buniek.....	58
6	Výsledky.....	59
6.1	H21 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti	59
6.2	H22 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti	61
6.3	H23 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti	63

6.4	H24 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti	65
6.5	H25 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti	67
6.6	H26 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti	69
6.7	Fotodokumentácia	71
7	Diskusia	74
8	Závery	78
9	Zoznam skratiek	79
10	Literatúra	81

1 Úvod

V organizmoch, ktoré sa nachádzajú v prostredí bohatom na kyslík, ktorý využívajú k produkcii ATP, neustále dochádza aj k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré svojim pôsobením bunky poškodzujú. Tie sa tomu bránia pomocou antioxidantných mechanizmov, ktoré ROS odstraňujú. Keď produkcia ROS prevýši nad kapacitou antioxidantnej ochrany, dochádza k rozvoju oxidačného stresu.

ROS zohrávajú úlohu v patogenéze mnohých ochorení, ako sú napríklad ateroskleróza, kardiomyopatia, rakovina, alebo ischemicko-reperfúzne poškodenia po infarkte myokardu, mozgovej príhode a ďalšie.

Na vzniku a rozvoji oxidačného stresu sa významne podieľa voľné, slabo viazané železo, ktoré účast'ou vo Fentonovej a Haber-Weissovej reakcii, napomáha tvorbe reaktívneho hydroxylového radikálu. Preto odstránenie prebytočného železa pomocou jeho chelatacie, sa javí ako vhodný spôsob ako predchádzať, alebo mierniť oxidačný stres, a zabrániť tak následkom jeho pôsobenia.

V súčasnosti sú klinicky používané tri látky s chelatačným účinkom, desferioxamín, deferiprón a deferasirox. Neustále, v snahe nájsť chelátory s výhodnejšími vlastnosťami sa syntetizujú a skúšajú nové látky s chelatačným účinkom.

Sľubnou skupinou sú deriváty aroylhydrazónu, do ktorej patrí aj SIH, ktorý sa prejavil ako účinný chelátor, avšak v plazme je veľmi rýchlo hydrolyzovaný. V snahe nájsť stabilnejší a prinajmenšom rovnako účinný chelátor ako samotný SIH, sa skúšajú jeho rôzne deriváty. Táto diplomová práca sa venovala štúdiu potenciálnych kardioprotektívnych a kariotoxických vlastností niektorých z týchto derivátov.

2 Súčasný stav riešenej problematiky

2.1 Kyslík

V súčasnosti je kyslík najrozšírenejším prvkom zemskej kôry. Je súčasťou atmosféry (21%), litosféry a hydrosféry (pri 10°C dosahuje koncentráciu 0,284 mmol/l) (1, 2). Avšak na začiatku, keď vznikali prvé živé organizmy, kyslík na Zemi nebol. Väčšina dráh intermediárneho metabolizmu organizmov, ktoré poznáme (glykolýza, syntéza a oxidácia mastných kyselín, Krebsov cyklus a mnohé iné), sa vyvinuli za týchto anaeróbných podmienok. Kyslík sa objavil až omnoho neskôr, cca pred 2,4 miliardami rokov. Začali ho produkovať fotosyntetizujúce cyanobaktérie, až dosiahol podiel v atmosfére 2-4 %, čo zodpovedá tlaku 15-30 Torr. Tento tlak je približne rovnaký, ako hodnota parciálneho tlaku kyslíka na konci kapilár vo väčšine tkanív cicavcov (3).

S výnimkou niektorých anaeróbných a kyslík tolerantných jednobunkovcov, v súčasnosti všetky organizmy využívajú kyslík k efektívnej produkcii energie pomocou prenosu elektrónov (1). A je pre ich život nevyhnutný (4).

U mnohobunkových organizmov je zabezpečená dodávka kyslíka pre všetky bunky, pomocou hemoglobínu a myoglobínu (1). Až 90 % O₂ privedeného do organizmu, je u cicavcov spotrebovaných mitochondriami, hlavnými producentami ATP. Základným princípom je oxidácia substrátov, ktoré strácajú elektróny, ktoré sú akceptované elektrónovými nosičmi (NAD, FMN, FAD), za vzniku ich redukovaných foriem (NADH, FMNH₂, FADH₂). Tie, sú následne reoxidované kyslíkom za produkcie veľkého množstva ATP (až 32 molekúl ATP z jednej molekuly O₂). V tomto procese je kyslík redukovaný na vodu (1, 5).

Väčšina zvyšného kyslíku, ktorý nebol spotrebovaný mitochondriami, je využitá enzýmami, ako oxydázy a oxygenázy, alebo sa zúčastňuje na neenzymatických oxidačných reakciách (1).

Vzhľadom na to, že kyslík je toxický, mutagenický plyn, sa u aeróbných organizmov vytvoril systém antioxidačnej ochrany (1). Jeho toxicita sa pripisuje produkcii voľných kyslíkových radikálov (4). Vzhľadom na svoju elektrónovú konfiguráciu sú atómy kyslíka pri bežných podmienkach nestále. Kyslík má vysokú elektronegativitu, a je teda silným oxidovadlom (2).

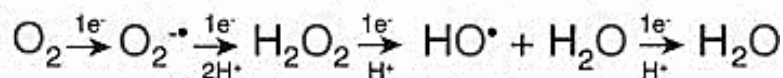
2.2 ROS

ROS, čiže reaktívne kyslíkové častice, je spoločný termín zahŕňajúci kyslíkové radikály, ale aj neradikálové deriváty O₂, z ktorých ale radikály môžu vznikať (viď Tab. 2.1) (1, 4).

radikály		neradikály	
Superoxid	O ₂ • ⁻	Peroxid vodíka	H ₂ O ₂
Hydroxylový radikál	•OH	Kyselina chlórna	HOCl
Peroxylový	RO ₂ •	Ozón	O ₃
Alkoxylový	RO•	Singletový kyslík	¹ O ₂
Hydroperoxylový	HO ₂ •		

Tab. 2.1 Prehľad ROS (1)

Jednoelektrónovou redukciou kyslíka vzniká superoxid. Ten sa môže protonizovať na hydroperoxylový radikál, alebo prijatím ďalšieho elektrónu a dvoch protónov vznikne peroxid vodíka. Ten v prítomnosti ešte jedného elektrónu a protónu sa rozpadá na vodu a hydroxylový radikál. Excitáciou molekuly kyslíka vzniká singletový kyslík (4).



Obr. 2.1 Postupná redukcia kyslíka na vodu (5).

ROS sú prirodzeným produktom aeróbného metabolizmu (6). Vznikajú v mnohých enzýmových i neenzýmových reakciách (4). Za patologických podmienok môžu byť produkované vo zvýšenej miere a spôsobovať tak oxidačný stres (6).

ROS zastávajú v organizme určité biologické funkcie, ale v nadmernom množstve sú škodlivé. Sú súčasťou mnohých signalizačných dráh. Svoju úlohu zohrávajú aj pri obrane organizmu proti infekčným agens, pri takzvanom respiračnom vzplanutí. Naopak, vo vyšších koncentráciách poškodzujú rôzne bunkové štruktúry ako sú lipidy, membrány, proteíny alebo nukleové kyseliny (4, 7).

2.2.1 Voľné radikály

Voľný radikál, je akákoľvek molekula, atóm, alebo ión s nepárovým elektrónom vo valenčnej sfére, schopný aspoň krátkodobej samostatnej existencie (8).

Voľné radikály vznikajú prijatím, alebo odovzdaním jedného elektrónu z neradikálovej častice. K tomuto dochádza napríklad pri homolytickom štiepení kovalentnej väzby, pričom potrebná energia sa získa z tepla, alebo elektromagnetického žiarenia (1).

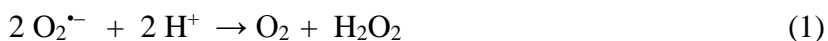
Voľné radikály sú často veľmi reaktívne zlúčeniny a ich reakciou s neradikálovými zlúčeninami vznikajú ďalšie radikály (reťazová reakcia), ktoré môžu byť viac, rovnako, alebo menej reaktívne ako pôvodný radikál (1).

2.2.1.1 Superoxid ($O_2^{\cdot-}$)

Superoxid vzniká prijatím jedného elektrónu molekulou kyslíka v základnom stave do jeho π^* antiorbitalu (1).

V organizme je superoxid tvorený prirodzene, aktivovanými fagocytmi počas zápalu pomocou NADPH oxidázy (8), enzýmami ako xantínoxidáza, peroxidáza a ďalšie. Tvorí sa aj pri oxidácii mnohých biologicky dôležitých molekúl, ako sú glyceraldehyd, adrenalín, noradrenalín, L-dopa, dopamín a iné. Najviac superoxidu je produkovaného v dýchacom reťazci, v ktorom dochádza k stratám elektrónov pri ich prenose v rámci reťazca, čo opäť vedie k produkcii $O_2^{\cdot-}$ (1). Väčšina superoxidu zostáva uväznená v mitochondriách. Avšak napriek tomu je schopný do určitej miery prestúpiť vonkajšiu mitochondriálnu membránu (9).

$O_2^{\cdot-}$ je nestabilný a spontánne (reakciou nazývanou dismutácia, ktorá je veľmi pomalá, $k \sim 0,2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (10)), alebo za účasti superoxidodismutázy sa premieňa na peroxid vodíka, ktorý je sám o sebe stabilný (8, 9). Nekatalyzovaná dismutácia je pomalá a výrazne závislá na pH. Zatiaľ čo reakcia v prítomnosti SOD je omnoho rýchlejšia a na pH v rozmedzí 5,3 - 9,5 v podstate nezávislá (1).



Superoxid sa zúčastňuje na Haber-Weissovej reakcii za vzniku hydroxylového radikálu (viď kap. 2.4.1). Avšak má schopnosť nie len s kovmi reagovať, ale dokáže aj uvoľňovať železo zo molekúl obsahujúcich železo ako napríklad feritín, alebo enzýmy obsahujúce klaster [4Fe-4S] (14).

2.2.1.2 Hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$)

Hydroxylový radikál je tvorený v mnohých reakciách v organizme. Jednou z nich je aj Fentonova reakcia (viď kap. 2.4.1). Vzniká aj v pokožke vystavenej slnečnému žiareniu, kde vplyvom UV žiarenia dochádza k rozkladu H_2O_2 . Ďalšími zdrojmi $\cdot\text{OH}$ je ionizujúce žiarenie, reakcia kyseliny chlórnej a superoxidu, alebo kyseliny chlórnej s chelátmi železa:



Hydroxylový radikál existuje extrémne krátky čas (10^{-9} s) (5). Reaguje veľmi rýchlo s takmer všetkými typmi molekúl nachádzajúcich sa v živom organizme: cukry, aminokyseliny, fosfolipidy a iné. Sám dokáže iniciovať oxidáciu mastných kyselín. Je to najreaktívnejší kyslíkový radikál s vysokým redukčným potenciálom (1).

2.2.1.3 Peroxylový a alkoxylový radikál

Peroxylový (RO_2^\cdot) a alkoxylový (RO^\cdot) radikál sú dobrými oxidačnými činidlami (1). Ich reaktivita závisí na R skupine (7). Obidva tieto typy radikálov sú schopné odtrhnúť z iných molekúl atóm vodíka, čo je dôležitá reakcia prebiehajúca pri oxidácii tukov (1).

2.2.2 Neradikálové zlúčeniny

2.2.2.1 Peroxid vodíka (H₂O₂)

Peroxid vodíka je bezfarebná kvapalina neobmedzene miesiteľná s vodou. Pre väčšinu buniek je toxický v rozmedzí 10-100 μM. Má slabé oxidačné a redukčné vlastnosti a je pomerne málo reaktívny (1).

In vivo je produkovaný niektorými enzýmami ako xantín a urát oxidázy. Taktiež vzniká pri dismutácii molekuly superoxidu (viď kap. 2.2.1.1.) (1).

Molekula peroxidu vodíka je pomocou katalázy, alebo glutationperoxidázy rozkladaná na kyslík a vodu.



Vďaka svojej nízkej reaktivite je sám osebe schopný inaktivovať iba niektoré enzýmy, ale nedochádza k priamej oxidácii DNA, lipidov, ani väčšiny proteínov. Za prítomnosti kovov (železo a meď), vznikajú reaktívne voľné radikály, ako hydroxylový radikál, ktoré následne spôsobujú oveľa závažnejšie poškodenia bunky (1).

2.2.2.2 Kyselina chlórna (HOCl)

Kyselina chlórna je produkovaná enzýmom myeloperoxidázou v aktivovaných neutrofiloch (1).



Je to slabá kyselina (pK_a ≈ 7,5), vysoko reaktívna, schopná poškodzovať biomolekuly. Je silným dvojelektónovým oxidačným činidlom. HOCl je schopná chlorácie DNA bází, môže oxidovať tioly, kyselinu askorbovú, alebo NAD(P)H (1).

2.2.2.3 Ozón (O₃)

Ozón je trojatómový, bezfarebný plyn. Je dôležitým ochranným štítom pred radiačným žiarením z vesmíru. Nie je voľným radikálom, ale je silnejším oxidačným činidlom, než molekulárny kyslík. Produkovaný je fotodisociáciou molekulárneho kyslíka na atóm kyslíka, ktorý potom reaguje s ďalšou molekulou kyslíka (1).



V nižších vrstvách atmosféry je tvorený ako výsledok fotochemických reakcií prebiehajúcich v prítomnosti polútantov vo vzduchu (1).

2.2.2.4 Singletový kyslík (¹O₂)

Singletový kyslík vzniká prijatím energie molekulou kyslíka v základnom stave, od ktorého sa líši konfiguráciou elektrónov. Na rozdiel od molekuly kyslíka nemá, žiadne nespárované elektróny, ale obidva tieto elektróny okupujú jeden orbital. Pri čom druhý orbital zostáva prázdny, pripravený na reakciu. Preto je singletový kyslík, v porovnaní s kyslíkom v základnom stave, omnoho reaktívnejší a môže viesť k významnejšiemu poškodeniu biomolekúl (5).

In vivo vzniká vo fotosenzitívnych reakciách, kde molekula (napr. bilirubín, retinal, riboflavín, porfyríny) osvetlená svetlom určitej vlnovej dĺžky absorbuje energiu, dostane sa do excitovaného stavu a následne túto energiu prenesie na kyslík (1).

2.3 RNS

Reaktívne formy dusíka majú podobný význam ako reaktívne formy kyslíka. Vznikajú z aminokyseliny L-arginínu pomocou NO-syntázy produkujúcej oxidy dusíka, medzi ktoré patrí oxid dusnatý (NO), nitrosónium (NO⁺), nitrozyl (NO⁻), alebo peroxynitrit (ONOO⁻) (4).

2.3.1 Oxid dusnatý (NO[•])

Oxid dusnatý je, vďaka jednému nepárovému elektrónu, radikál. Lahko prechádza cez lipidovú dvojvrstvu. Na základe svojej radikálovej povahy má krátky biologický polčas, takže je aj rýchlo odstraňovaný (66).

NO[•] je dôležitým intracelulárnym poslom (5).

Jeho funkcia spočíva v stimulácii cGMP, a tak schopnosti ovplyvňovať hladinu vápnika v hladkom svalstve, vyvolávať tak svalovú relaxáciu, inhibovať agregáciu doštičiek a ovplyvňovať neurotransmisiu (4).

NO[•] je schopný reagovať so superoxidom, alebo kyslíkom, za vzniku ďalších radikálov, ako peroxynitrit (11).



Je schopný redukovať ióny voľných kovov, alebo oxidovať kovy v proteínových komplexoch, napríklad v hemoglobíne, za vzniku metenoglobínu a NO₃ (4, 11). Inhibuje cytochróm P450, akonitázu, aj katalázu. Na druhej strane NO reakciou s hemoglobínom zabezpečuje NAD⁺ pre potreby glykolýzy v podmienkach hypoxie (11).

2.3.2 Peroxynitrit (ONOO^-)

Peroxynitrit nie je radikálom. Nemá žiadny nepárový elektrón (12).

Reaguje s oxidom uhličítým za vzniku vysoko reaktívneho nitrosoperoxykarbonátu. Obidve tieto zlúčeniny sa následne podieľajú na produkcii ďalších, ešte reaktívnejších ROS (5). S peroxidom vodíka reaguje ONOO^- za vzniku singletového kyslíka (1).

Peroxynitrit oxiduje tiolové skupiny proteínov a vytvára disulfidy, alebo nitruje tyrosylové skupiny (5). Je schopný nitrácie alebo deaminácie DNA báz (1). Taktiež reaguje s nenasýtenými mastnými kyselinami obsiahnutými v membránach (5).

2.4 Oxidačný stres

Pojem oxidačný stres bol prvýkrát definovaný v roku 1991, ako „narušenie rovnováhy medzi prooxidačnými a antioxidantnými mechanizmami“ (13). Je to stav, keď zvýšená produkcia voľných radikálov (viď kap. 2.2) preváži nad antioxidantnou ochranou tela (10).

V zdravom organizme je produkcia ROS a RNS viac-menej vyvážená antioxidantným systémom. Aj napriek udržiavaniu tejto rovnováhy, sú biomolekuly v organizme priebežne tvorenými voľnými radikálmi poškodzované a musia byť opravované, alebo nahradzované (1).

Oxidačný stres môže vznikáť na základe:

- 1) zníženej antioxidantnej ochrany, napríklad z dôvodu mutácií antioxidantných enzýmov, alebo nedostatočným príjmom antioxidantov v potrave (1).
- 2) Zvýšenej produkcie ROS/RNS, v prípade vystavenia organizmu väčšiemu množstvu kyslíka, za prítomnosti toxínov, pri nadmernej aktivácii prirodzených ROS/RNS systémov v organizme (zápal, zvýšená aktivácia fagocytov) (1).

Reaktívnym formám kyslíka sa pripisuje účasť na patogeneze mnohých ochorení, ako sú napríklad rakovina, diabetes, kardiovaskulárne ochorenia, ateroskleróza, neurologické choroby (Alzheimerova, Parkinsonova choroba), alebo chronický zápal (10). Bunky totiž dokážu tolerovať oxidačný stres len do určitej miery, najmä pomocou stimulácie antioxidantných systémov. Sú schopné sa adaptovať. Avšak prílišný oxidačný stres môže viesť až k bunkovej smrti (1).

Radikály, ako superoxid a peroxid vodíka, sa vyznačujú schopnosťou reagovať v prítomnosti prechodných kovov ako železo, chróm, meď, alebo kobalt, za vzniku ďalších radikálov, príkladom je Fentonova, alebo Haber-Weissova reakcia (10) (viď kap. 2.4.1).

Práve vďaka účasti v reakciách produkujúcich voľné radikály, preťaženie organizmu železom prispieva k rozvoju oxidačného stresu (14), a preto je hladina voľného i celkového železa v organizme za normálnych podmienok veľmi prísne regulovaná (viď kap. 2.5.1.4).

Samotný oxidačný stres zvyšuje niekoľkými mechanizmami hladinu kovov, ktoré následne môžu katalyzovať reakcie už spomínané vyššie: 1) Mŕtve bunky uvoľňujú železo, pôvodne obsiahnuté v nich do okolia. 2) Superoxid je schopný uvoľniť železo z feritínu a FeS - proteínov. 3) Peroxid prispieva k uvoľneniu železa na základe poškodzovania hemových proteínov. 4) Peroxynitrit dokáže uvoľniť železo z FeS-proteínov (1).

2.4.1 Fentonova a Haber-Weisova reakcia

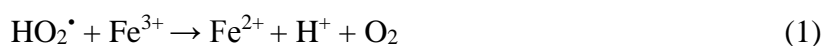
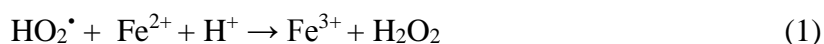
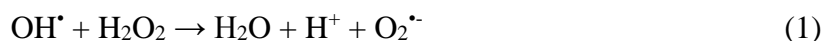
Za normálnych okolností sa v organizme nenachádza takmer žiadne voľné železo. Pod týmto pojmom je myslené železo, ktoré má aspoň jeden valenčný elektrón voľný, alebo ním viaže slabo viazaný ligand (napr. železo viazané na ADP, ATP, EDTA, fosfát, citrát, alebo iný chelátor) (9, 15).

Voľné železo (ale i iné prechodné prvky) sa podieľa na reakciách produkujúcich voľné radikály. Typickým príkladom je Fentonova reakcia, ktorej výsledkom je hydroxylový radikál (9).



Superoxidový radikál konvertuje trojmocný ión železa na ión dvojmocný, ktorý následne reaguje s pomerne stabilným a nie až tak škodlivým peroxidom vodíka, za vzniku vysoko reaktívneho hydroxylového radikálu (9).

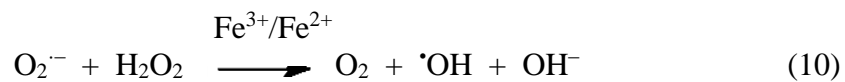
V rámci Fentonovho systému môže prebiehať niekoľko ďalších reakcií (1):



Mnohé železnaté cheláty katalyzujú Fentonovu reakciu, ale cheláty železité musia byť redukovateľné, aby mohli pôsobiť ako katalyzátory tejto reakcie. Zároveň, sa

rôzne cheláty navzájom líšia vo svojej schopnosti katalyzovať reakciu a modifikujú tým jej priebeh (15).

Haber-Weissova reakcia je kombináciou Fentonovej reakcie a redukcie železitého iónu pomocou superoxidu. V tomto prípade superoxid reaguje s peroxidom vodíka za vzniku hydroxylového radikálu. Reakcia je katalyzovaná železom (10).



2.5 Železo

Železo je biogénny stopový prvok (16), esenciálny prakticky pre všetky žijúce bunky. Bez neho by nemohli prebiehať mnohé životne dôležité procesy, ako napríklad transport kyslíka, produkcia ATP, alebo DNA syntéza (17). Železo je totiž obsiahnuté v heme, v molekulách hemoglobínu, myoglobínu, cytochrómov a iných enzýmoch. Uplatňuje sa aj vo funkciách imunitného systému, kde je súčasťou NADPH-oxidázy potrebnej k obrane proti mikróbom. Má význam aj pre bunkovú proliferáciu, diferenciáciu a pre reguláciu génovej expície. (16) Nedostatok železa zastavuje rast buniek a vedie až k ich smrti (17).

V prostredí bohatom na kyslík, čiže prostredí, v ktorom sa vyvíjali ľudia i ďalšie cicavce, je nedostatok železa bežný, aj napriek tomu, že je to jeden z najrozšírenejších prvkov na zemskom povrchu. Tento paradox vyplýva práve zo skutočnosti, že v prítomnosti kyslíka za fyziologického pH sa železo nachádza v jeho veľmi zle rozpustnej oxidovanej forme, ako železitý ión. Cez bunkovú membránu môže byť železo prenášané len ako lepšie rozpustný železnatý ión, ktorý je ale nestabilný a rýchlo oxidovaný znovu na Fe^{3+} . Preto sa vyvinuli mechanizmy pre efektívnu konzerváciu a vnútornú recykláciu železa v organizme (18, 19).

Za normálnych okolností, sa v tele dospelého muža nachádza 35-45 mg/kg železa. V dôsledku pravidelných strát krvi počas menštruácie, majú ženy pred menopauzou zásoby železa menšie. Až 80% celkového železa je súčasťou hemoglobínu. 10-15 % železa je prítomných v myoglobíne a v ostatných tkanivách (cytochrómy a enzýmy) (20).

Biologická dôležitosť železa je založená na jeho chemických vlastnostiach ako prechodného prvku. Ľahko sa zapája do jednoelektrónových oxidačných reakcií, v ktorých prechádza medzi svojou železitou (Fe^{3+}) a železnatou (Fe^{2+}) formou (21).

Zároveň, tie isté chemické vlastnosti sú príčinou toxických vlastností voľného železa pri jeho nadbytku (4). Voľné železo totiž môže poškodzovať tkanivo katalyzovaním premeny superoxidu a hydrogén peroxidu v Haber-Weissovej reakcii na voľné radikály, ktoré následne môžu poškodiť bunkové membrány, proteíny a DNA (20).

Podieľaním sa na Haber-Weissovej reakcii voľné železo zohráva zásadnú úlohu v oxidačnom strese, obzvlášť v prípade pri jeho prebytku, alebo v prípade nadprodukcie superoxidu, napríklad pri zápalových reakciách . Aby sa zabránilo rozvoju oxidačného stresu, železo cirkulujúce v plazme je naviazané na transferín a v bunkách sa kumuluje vo forme feritínu (20).

Práve preto, že nadbytok železa na jednej strane a jeho nedostatok na strane druhej, spôsobujú bunkovú smrť, musí byť hladina reaktívneho železa veľmi prísne regulovaná (21).

2.5.1 Metabolizmus železa

2.5.1.1 Absorpcia

Vzhľadom na to, že okrem exfoliácie enterocytov (cyklus enterocytov je 35 hodín) a pravidelných strát krvi pri menštruácii, neexistuje žiadny fyziologický spôsob exkrécie železa z ľudského organizmu (20), zohráva absorpcia v enterocytoch kľúčovú úlohu v kompenzácii denných strát železa a určuje tak jeho hladinu v organizme. Tieto straty bežne činia 1-2 mg/deň, ale môže to byť až 6 mg/deň (17, 22). Základným cieľom absorpcie je uspokojiť potrebu železa pre erytropoézu (20).

Kontrolné mechanizmy pre absorpciu železa sa musia vysporiadať s rôznou biodostupnosťou železa z rôznych zdrojov potravy, a to v rozsahu od 5-12 % vo vegetariánskej strave, do 14-18 % v zmiešanej potrave. Železo sa nachádza vo forme hemu, feritínu, alebo ako železité ióny. Zjavne existujú odlišné mechanizmy pre absorpciu hemového a nehemového železa a je možné, že existuje aj odlišný spôsob vstrebávania feritínu (17, 18).

Absorpcia prebieha v absorpčných vilách v blízkosti gastro-duodenálneho spojenia, kde je pH žalúdočného efluxátu ešte stále nízke, čo spolu s pôsobením tráviacich enzýmov napomáha naviazaniu železa na rozpustné zlúčeniny, ako napríklad amíny, aminokyseliny a cukry. Tieto podmienky sú nevyhnutné pre jeho biodostupnosť. Preto napríklad dlhotrvajúca achlórhydria vedie k deficitu železa v organizme (17, 23).

Anorganické, nehemové železo predstavuje 90 % železa nachádzajúceho sa v potrave (23). Aby železo mohlo byť absorbované, musí byť najprv redukované

na železnaté (Fe^{2+}) ióny (22). Táto premena prebieha na apikálnej membráne enterocytov za pomoci duodenálneho cytochrómu b (Dcytb). Expresia Dcytb je stimulovaná hypoxiou, deficitom železa, alebo hypotransferinémiou, a naopak potlačovaná nadbytkom železa (17). Pravdepodobne existuje ešte ďalší mechanizmus redukcie železa, pretože experimenty na myšiach s porušeným Dcytb neukázali významné ovplyvnenie zásob železa v tele (23).

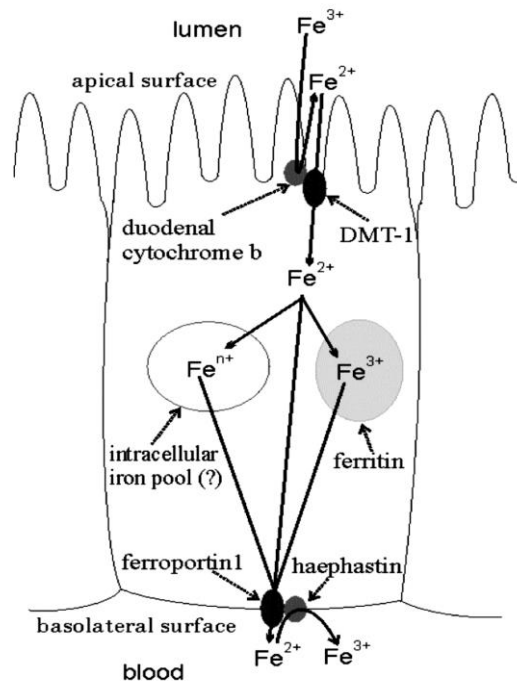
Železnaté ióny následne môžu byť transportované cez apikálnu membránu pomocou transportéru divalentných kovov 1 (DMT-1). Ďalšími substrátmi pre DMT-1, okrem Fe^{2+} , sú aj ďalšie divalentné ióny ako Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} a Pb^{2+} . Ide o aktívny symport závislý na membránovom potenciáli (17,24). DMT-1 je prítomný nie len v proximálnom duodenu, ale je taktiež aj intracelulárnym transportérom (17).

Hemové železo v potrave, je výsledkom rozloženia hemoglobínu a myoglobínu nachádzajúcich sa v mäsitej strave. Do buniek sa dostáva receptorom sprostredkovanou endocytózou pomocou prenášača pre hem, ktorý je vo veľkej miere exprimovaný v duodenu. Endozomálny vezikul migruje do endoplazmatického retikula, kde je železo uvoľnené z hemu pomocou hemoxygenázy-1 (24). Alebo, je hem transportovaný cez apikálnu membránu priamo a exportovaný cez bazolaterálnu membránu enterocytu pomocou FLVCR (feline leukemia virus) a v plazme následne viazaný na cirkulujúci hemopexín. Avšak mechanizmus vstrebávania hemového železa ešte stále nie je plne pochopený (23).

Železo uvoľnené z hemu, alebo importované pomocou DMT1 sa môže stať súčasťou hypotetického „labilného“ poolu, môže byť inkorporované do feritínu, alebo prenesené k bazolaterálnej membráne a uvoľnené do krvi (24). Labilný pool označuje slabo chelatované železo naviazané na nízkomolekulárne zlúčeniny, ako napríklad citrát, fosfát, nukleotidy a iné (25). Zvažuje sa aj účasť chaperónov, transcytóza, alebo vezikulárny transport (23).

Cez bazolaterálnu membránu enterocytu je železo prenášané pomocou transmembránového proteínu feroportínu 1 (FPN-1), ktorý je pravdepodobne zároveň aj reductázou. Aby železo mohlo byť cez membránu transportované, musí byť redukované opäť na železnatý ión. Po prenesení je opäť oxidované na ión železitý pomocou transmembránového proteínu s feroxidázovou aktivitou hefaestínu (17, 24). Železitý ión sa s vysokou afinitou v plazme viaže na transportný proteín transferín (24).

FPN1 je negatívne regulovaný hormónom hepcidínom. Je kľúčovým bunkovým exportérom železa a zároveň jediným známym mechanizmom pre efflux železa (17).



Obr. 2.2 Schematická ilustrácia absorpcie železa prebiehajúca v lumen tenkého čreva. Železité ióny sú pomocou duodenálneho cytochrómu b redukované na ióny železnaté, následne sú transportované cez membránu enterocytu pomocou transportéru pre divalentné ióny (DMT-1). V enterocyte železo: 1) je inkorporované do feritínu, 2) sa stáva súčasťou labilného poolu, 3) prechádza priamo do krvi pomocou FPN1 (17).

2.5.1.2 Distribúcia

Z celkového množstva železa v organizme (3-5g), jeho viac ako dve tretiny sú inkorporované v hemoglobíne. Zvyšné železo sa nachádza prevažne v hepatocytoch (1000mg), alebo v retikuloendoteliálnych makrofágoch (600mg). Ďalej sa v menšom množstve nachádza vo svaloch, v myoglobíne (300mg). Zvyšné železo (8mg) sa nachádza v ostatných tkanivách, ako súčasť niektorých proteínov a enzýmov (23).

Po prestupe železa z enterocytu do cirkulácie, je železo distribuované do tkanív pomocou transportného proteínu, transferínu (Tf), na ktorý sa viaže okamžite po vstupe do krvi. Tf obsahuje dve väzbové miesta pre železité ióny, ktoré viaže s vysokou afinitou, na rozdiel od iónov železnatých, ku ktorým je jeho afinita naopak veľmi nízka.

Napriek neustálym zmenám vo využití železa, je jeho plazmatická koncentrácia pomerne stabilná. Za normálnych okolností, iba 30 % transferínu je saturovaného železom (2-3 mg). Plazmatická hladina železa neviazaného na transportný proteín (NTBI), t. j. železa viazaného na iné proteíny, ako napríklad feritín, albumín, alebo na zlúčeniny ako citrát, je veľmi nízka. Zvyčajne nepresahuje 1 $\mu\text{mol/l}$ a často je pod detekovateľným limitom (17, 18). Saturácia Tf pod 16 % naznačuje deficit železa, zatiaľ čo nad 45 % je príznakom jeho nadbytku. Keď saturácia presiahne 60 %, NTBI sa začne akumulovať v cirkulácii a poškodzovať parenchymatické bunky (26).

Chelatácia železa transferínom má v podstate tri základné účely: 1) Vďaka nemu sú železité ióny rozpustené v plazme za fyziologických podmienok. 2) Zúčastňuje sa na procesoch transportu a vychytávania železa bunkami. 3) Udržiava Fe^{3+} v redoxne neaktívnom stave, čím predchádza tvorbe voľných radikálov (23).

Denne plazmou precirkuluje cca 20-25 mg železa. To je potom vychytávané najmä prekursorami erytrocytov a využívané na tvorbu hemoglobínu (23).

2.5.1.3 Skladovanie

Železo je skladované v bunkách (prevažne v hepatocytoch a retikuloendoteliálnych makrofágoch - v slezine a pečeni) pomocou feritínu. Feritín dokáže absorbovať veľké množstvo železa vo forme železitých iónov, ktoré sú tak potom netoxické. Je tvorený apoproteínom (445kD), ktorý môže byť obklopený až 4500 atómami železa. Syntéza feritínu prebieha vo všetkých bunkách, primárne však v hepatocytoch a makrofágoch. Je tvorený 24 podjednotkami, dvoch typov. H-typ a L-typ. Kombináciou týchto podjednotiek vznikajú rôzne izoformy feritínu, typické pre rôzne tkanivá (20). Pomer podjednotiek závisí na type tkaniva, fyziologickej funkcii a zmenách v dôsledku zápalu alebo infekcie (21). H-podjednotka má feroxidázovú aktivitu, čo pomáha v boji proti oxidačnému stresu (20).

Úloha makrofágov v skladovaní železa spočíva v ich schopnosti fagocytovať (predovšetkým v slezine) staré erytrocyty. Následne je hemoglobín a hem degradovaný pomocou hemoxygenázy. Voľné železo je potom vychytávané molekulami feritínu, alebo uvoľňované do cirkulácie, kde sa viaže na transferín (20).

Pečeň je hlavný orgán, kde sa skladuje železo. Veľmi ľahko dokáže vychytávať cirkulujúce železo. Hepatocyty majú receptory ako pre transferín, tak aj pre feritín, hemoglobín, haptoglobín, alebo hem (20).

2.5.1.4 Regulácia

2.5.1.4.1 Regulácia na systémovej úrovni

Základom udržiavania hladiny železa na systémovej úrovni a prevencie tak jeho deficitu, alebo nadbytku, je regulácia jeho absorpcie. Táto regulácia je zabezpečovaná pomocou peptidového hormónu hepcidínu (25 aminokyselín), produkovaného najmä v hepatocytoch, ktorý je vylučovaný do plazmy, kde cirkuluje voľný, alebo naviazaný na α 2-makroglobulín (23, 18). Vylučovaný je ľadvinami (18).

Hepcidín vykonáva svoju funkciu viazaním sa na feroportín a jeho degradáciou. Feroportín, exportér železa, je vysoko exprimovaný na bazolaterálnej membráne enterocytov a na bunkovej membráne makrofágov. Týmto spôsobom sa znižuje membránová koncentrácia feroportínu, a tak i množstvo železa, ktoré sa dostane do plazmy, kde by sa viazalo na transferín (27). Hepcidín je teda negatívnym regulátorom absorpcie železa a jeho uvoľňovania (23).

Expresia hepcidínu závisí na mnohých podmienkach, charakterizovaných zvýšenou potrebou železa pre erytroidy a zvýšeným množstvom erytropoetínu. Ovplyňovaná je napríklad deficitom železa, hypoxiou, alebo zvýšenou erytropoézou (27). Vplyv môže mať aj prítomnosť zápalu (18). Expresia hepcidínu je pravdepodobne regulovaná ako zásobou železa v pečeni, tak aj jeho cirkulujúcou hladinou (18, 27).

2.5.1.4.2 Regulácia na úrovni buniek

Udržiavanie hladiny železa na bunkovej úrovni je založené na koordinácii jeho vychytávania, skladovania a exkrécii, tak aby sa zabezpečilo jeho dostatočné množstvo pre bunku, ale zároveň, aby sa zabránilo jeho toxickým účinkom (26).

Hlavným zdrojom železa pre bunky je železo naviazané na transferín, ktoré je vychytávané pomocou transferínového receptora (TfR1) (26). Celý komplex Tf-TfR1 je endocytovaný. Endozóm je pomocou na ATP závislej protónovej pumpe okyslený (17), čo vedie k zmene konformácie transferínu i receptora a má za následok uvoľnenie železa (26). Tieto železité ióny sú redukované na ióny železnaté, ktoré môžu byť následne prenesené pomocou DMT-1 z endozómu do cytoplazmy (21).

V cytoplazme môže byť železo skladované vo forme feritínu, prechádzať do mitochondrií, alebo sa stať súčasťou LIP (21). Predpokladá sa, že hladina LIP odráža množstvo železa v bunke (28).

V niektorých bunkách, ako v placentе, čreve, makrofágoch a hepatocytoch je exprimovaný feroportín, exportér železa z bunky (29).

Celý metabolizmus železa je na molekulovej úrovni kontrolovaný posttranskripčnou reguláciou za pomoci IRE (iron responsive element) / IRP (iron responsive protein) systému. IRE sú 30 nukleotidov dlhé štruktúry v mRNA, ktoré predstavujú špecifické miesta na naviazanie IRP1 a IRP2. Po naviazaní IRP na IRE, tento systém inhibuje transláciu mRNA kódujúcej feritín, feroportín, mitochondriálnu ákonitázu, a naopak stabilizuje mRNA pre transferín a DMT-1 (23, 26).

2.5.2 Preťaženie organizmu železom

K preťaženiu organizmu železom môže dochádzať z rôznych príčin, vrodených (primárnych), alebo získaných (sekundárnych) (prehľad vid' Tab. 2.2) (30).

Ochorenia spojené s preťažením organizmu železom
1. Primárna hemochromatóza a) Typ 1 - mutácia HFE génu b) Typ 2 - mutácia génu pre hemojuvelín c) Typ 3 - mutácia génu pre TfR2 d) Typ 4 - mutácia génu pre feroportín
2. Sekundárne príčiny a) Hemoglobínopatie (talasémia) b) Sideroblastická anémia c) Myelodysplastický syndróm d) Myelofibtóza e) Aplastická anémia f) Intravenózna suplementácia železa pri chronickom zlyhávaní obličiek g) Friedreichova ataxia h) Zvýšený prísun železa v potravu i) Chronické ochorenie pečene

Tab. 2.2 Prehľad ochorení spojených s preťažením organizmu železom (30)

Najčastejším ochorením vedúcim k preťaženiu organizmu železom je hereditárna hemochromatóza, charakterizovaná progresívnou akumuláciou železa vo väčšine tkanív (najmä srdce, pečeň a pankreas), čo má za následok poškodzovanie buniek a tkanív (10, 28, 31). Na základe genetických, biochemických a klinických znakov sú klasifikované štyri typy hereditárnej hemochromatózy (vid' Tab. 2.2).

Nadbytok železa má škodlivý vplyv aj v mozgu, kde je vysoká koncentrácia kyslíka, čo vedie k zvýšenej produkcii ROS. Vyššia hladina železa bola pozorovaná u Parkinsonovej a Alzheimerovej choroby (32).

Okrem vyššie menovaných a v tabuľke uvedených ochorení, železo má svoj podiel aj v patogenéze mnohých iných ochorení ako napr. Huntingtonova choroba, mozgová príhoda, roztrúsená skleróza a iné (33).

2.5.3 Kardiotoxicita železa

V kardiomyocytoch sa nachádza viac mitochondrií a menej antioxidantov v porovnaní s inými bunkami, preto sú viac citlivé na zvýšenú hladinu železa v organizme (30).

Pri zvýšenom množstve železa v tele dochádza k saturácii transferínu, a tak k zvýšenej hladine železa neviazaného na transferín v plazme (30). Za normálnych podmienok prijímajú kardiomyocyty železo prísne regulovaným transportom pomocou transferínového receptoru. Avšak voľné železo do nich ľahko vstupuje prostredníctvom L-typu kalciových kanálov vo forme železnatých iónov a zvyšuje tak hladinu intracelulárneho železa (34). V bunke sa viaže na feritín. Pri presýtení tohto skladovacieho proteínu sa intracelulárne začne nachádzať železo vo forme LIP, ktoré je schopné podieľať sa na Fentonovej reakcii. Vzniknuté ROS spôsobujú oxidačný stres a vedú k peroxidácii lipidov, poškodzovaniu mitochondrií, poruchám membrány až k smrti myocytov (30, 35).

Železo sa v srdcovom tkanive kumuluje a tvorí depozity. Množstvo železa v tkanive koreluje s mierou srdcovej dysfunkcie (30).

2.6 Antioxidačné mechanizmy

Aeróbne organizmy žijúce v prostredí bohatom na kyslík si museli vyvinúť antioxidačný systém, ktorý ich chráni pred oxidačnými vlastnosťami kyslíka, jeho reaktívnymi derivátmi (ROS) i pred reaktívnymi formami dusíka (1).

Pre prežitie buniek je dôležitá rovnováha medzi produkciou ROS/RNS a antioxidačnou ochranou (36). V opačnom prípade vzniká oxidačný stres, ktorý vedie k poškodzovaniu buniek (viď kap.2.4).

Antioxidant môžeme definovať ako akúkoľvek substanciu, prítomnú v oveľa nižšej koncentrácii ako oxidovateľný substrát, ktorá výrazne zabraňuje oxidácii tohto substrátu. Pri čom termín oxidovateľný substrát zahŕňa všetky typy molekúl nachádzajúce sa in vivo (1).

Niektoré antioxidanty sú účinné v hydrofilnom, niektoré v lipofilnom prostredí a iné plnia svoju úlohu v oboch prostrediach. Určité antioxidačne pôsobiace molekuly sú schopné obnovovať funkciu iných antioxidantov, regenerovať ich, čomu sa hovorí „antioxidačná sieť“ (7).

Antioxidačný systém pozostáva z:

- 1) Mechanizmov prevencie: proteíny, ktoré minimalizujú dostupnosť pro-oxidantov, ako sú napr. železo a meď (transferín, cerulopazmín) (1, 36).
- 2) Fyziologickej ochrany (36). Napríklad umiestnenie dýchacieho reťazca v kompartmente mitochondrií, alebo oveľa nižšia koncentrácia kyslíka nachádzajúceho sa intracelulárne, obzvlášť v mitochondriách, v porovnaní s jeho koncentráciou v okolí (1).
- 3) Antioxidačnej obrany, ktorá pozostáva: a) z enzýmov, ktoré odstraňujú voľné radikály (superoxiddismutáza, kataláza, peroxidáza, tiol-špecifické antioxidanty), b) nízkomolekulárnych zlúčenín, ktoré „zametajú“ ROS a RNS (glutatión, tokoferol, kyselina askorbová a ďalšie) c) proteínov, ktoré ochraňujú biomolekuly pred poškodením (napríklad heat shock proteins) (1, 36).
- 4) Reparačných mechanizmov (36).

2.6.1 Antioxidačné enzýmy

2.6.1.1 Superoxiddismutáza (SOD)

Superoxiddismutázy sú proteíny obsahujúce kov, odstraňujúce superoxidový radikál, za vzniku menej reaktívneho peroxidu vodíka ako finálneho produktu dismutácie (37). SOD významne urýchľujú tento proces (viď kap. 2.2.1.1).

V eukaryotických bunkách boli identifikované tri izoformy enzýmu, a to cytozolová zinkovo-meďnatá SOD (ZnCu-SOD), mitochondriálna mangánová SOD (Mn-SOD) a mimobunková SOD (EC-SOD) (7).

ZnCu-SOD sa v eukaryotických bunkách nachádza prevažne v cytozóle, ale prítomná je i v jadre, peroxizómoch, alebo medzi vnútornou a vonkajšou mitochondriálnou membránou. Tvoria ju dve podjednotky. Meďnaté ióny sa podieľajú na katalytickej funkcii SOD, zatiaľ čo zinočnaté ióny enzým stabilizujú (1).

Mn-SOD je tetramér, kde každá podjednotka obsahuje jeden atóm mangánu. Mangán prechádza medzi oxidačnými stavmi Mn(III) a Mn(II). Táto SOD je jedným z najúčinnějších antioxidačných enzýmov, ktorý vykazuje protinádorovú aktivitu (7).

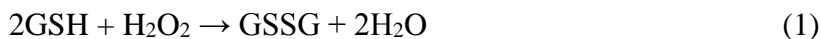
2.6.1.2 Kataláza (KAT)

Kataláza je enzým, ktorý sa podieľa na rozklade peroxidu vodíka, za vzniku vody a kyslíka (viď kap. 2.2.1.1). Jedna molekula dokáže za minútu rozložiť až šesť miliónov molekúl peroxidu vodíka (7).

Enzým je tvorený štyrmi podjednotkami, z ktorých každá obsahuje hemovú skupinu obsahujúcu železitý ión. KAT je lokalizovaná v bunke, v peroxizómoch. Z toho vyplýva, že peroxid vodíka nemôže byť odstránený inde ako v peroxizóme (1).

2.6.1.3 Glutationperoxidáza (GPx)

Glutationperoxidáza odstraňuje peroxid vodíka, alebo organické peroxidy, tak že ich redukuje za súčasnej oxidácie tripeptidu glutatiónu (1).



GPx súťaží o H_2O_2 , ako o substrát s katalázou (7). GPx je zložená zo štyroch podjednotiek, z ktorých každá obsahuje jeden atóm selénu (1).

2.6.2 Neenzýmové antioxidanty

Okrem vyššie spomínaných enzýmov sa do antioxidantnej ochrany zapájajú i iné molekuly, niektoré sú tvorené in vivo, iné prijímané v potrave. Takýmito zlúčeninami sú napr. nižšie spomínaný glutatión, vitamín C a E, karotenoidy, ale i niekoľko ďalších (1).

2.6.2.1 Glutatión (GSH)

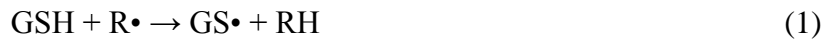
Glutatión je tripeptid, zložený z aminokyselín glutamínu, cysteínu a glycínu. V milimolárnych koncentráciách sa nachádza v cytozóle, jadre a mitochondriách. Produkovaný je cytozólom, a do mitochondrií je prenášaný aktívnym transportom (1).

Protektívne vlastnosti GSH proti oxidačnému stresu spočívajú v:

- 1) GSH je kofaktorom niektorých enzýmov ako GPx (36).
- 2) Podieľa sa na transporte aminokyselín cez membránu (36).
- 3) Priamo odstraňuje hydroxylový radikál a singletový kyslík. Spolu s GPx odstraňuje peroxid vodíka a lipidové peroxidy (36).
- 4) Je schopný regenerovať iné antioxidanty, napríklad vitamín C a E (36).
- 5) Je schopný chelatovať meď, a tak zabraňovať tvorbe voľných radikálov (1).

Vo všeobecnosti antioxidantné vlastnosti tiolových zlúčenín, sú založené na atóme síry, ktorý sa dokáže ľahko vyrovnáť so stratou jedného elektrónu. Počas takto

vzniknutého radikálu, je dlhší než polčas akéhokoľvek iného radikálu vzniknutého počas oxidačného stresu (1).



Vznikajúci oxidovaný glutatión je naspäť redukovaný pomocou glutatiónreduktázy (1).

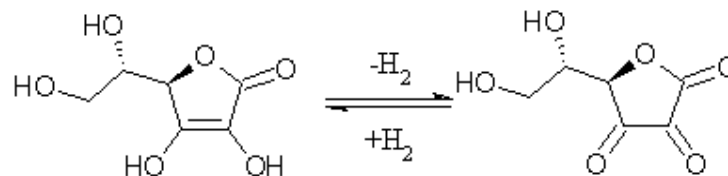


2.6.2.2 Vitamín C

Vitamín C, známy aj ako kyselina askorbová, je významným antioxidantom hydrofilnej povahy. Obsahuje dve ionizovateľné hydroxylové skupiny. Za fyziologického pH sa 99 % kyseliny nachádza vo forme semihydroaskorbátu (SHA) (7).

SHA pri reakcii s ROS/RNS prijíma jeden elektrón, čo vedie k vzniku semidehydroaskorbátového radikálu. Jeho disproportionáciou vzniká askorbát a dehydroaskorbát (DHA). DHA sa rozpadá na oxalát, treonát, a iné produkty. Niektoré bunky sú schopné vychytávať DHA a konvertovať ho späť na askorbát (1, 7).

In vivo kyselina askorbová chráni rôzne biomolekuly proti oxidačnému poškodeniu spôsobeného ROS i RNS. Zvýšený prísun vitamínu C je spojený so zníženým výskytom rakoviny a kardiovaskulárnych ochorení, práve z dôvodu jeho antioxidačnej aktivity (38).

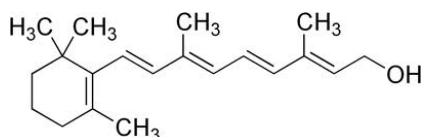


Obr. 2.3 Oxidovaná a redukovaná forma kyseliny askorbovej (39).

2.6.2.3 Vitamín E

Vitamín E je v tukoch rozpustný vitamín patriaci medzi významné antioxidanty. Jeho hlavnou funkciou je odstraňovanie peroxylových radikálov, ktoré sa zapájajú do reťazovej reakcie, čím inhibuje lipidovú peroxidáciu, čím chráni polynenasýtené mastné kyseliny v membránach (40, 41).

Zatiaľ čo kyselina askorbová pracuje v hydrofilnom prostredí, vitamín E uplatňuje svoju funkciu v prostredí lipofilnom. V priebehu antioxidačnej reakcie α -tokoferol sa mení na tokoferolový radikál, ten je následne za pomoci askorbátu redukovaný na pôvodný α -tokoferol (7). Tokoferolový radikál, nie je úplne nereaktívny, ale je menej reaktívny ako radikál peroxylový (41), s ktorým môže reagovať za vzniku neradikálovej zlúčeniny (1).



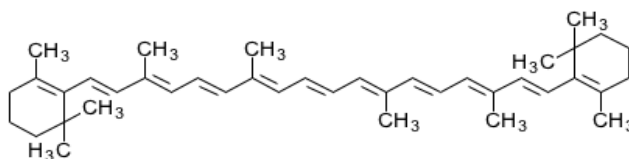
Obr. č. 2.4 Chemický vzorec vitamínu E (α -tokoferol).

2.6.2.4 Karotenoidy

Karotenoidy sú skupinou farebných pigmentov, zvyčajne žltej, alebo oranžovej farby, vyskytujúce sa v rastlinných tkanivách (1).

Ich štruktúra je tvorená dlhým systémom striedajúcich sa jednoduchých a dvojítých väzieb. Čo má vplyv na ich schopnosť absorbovať viditeľné svetlo (1).

Dokážu inaktivovať excitované molekuly. Príkladom takejto molekuly je singletový kyslík (40).



Obr. č. 2.5 Príklad štruktúry karotenoidu - β -karotén.

2.7 Chelátory železa

Vzhľadom na to, že nedostatok železa, rovnako ako aj nadbytok, sú pre organizmus škodlivé, je udržiavanie železa v rovnováhe nevyhnutné. Avšak, ako vyplýva z predchádzajúcej kapitoly, v organizme sa pre železo nenachádza žiadny exkrečný mechanizmus (14).

Z klinického hľadiska je deficit železa ľahko liečiteľný jeho suplementáciou. V prípade nadbytku, je liečba, práve z dôvodu neschopnosti organizmu železo vylučovať, omnoho komplikovanejšia (14).

Jednou z možností ako riešiť situáciu prebytku železa v organizme sú chelátory železa, látky, ktoré koordinačne viažu extracelulárne aj intracelulárne železo, a tak podporujú jeho exkréciu vo forme koordinačnej zlúčeniny, čím znižujú jeho dostupnosť v biologickom systéme (42). Zároveň menia redoxný potenciál železa, a tým aj jeho schopnosť katalyzovať reakcie, ktorými sú produkované ROS (15).

Základným zdrojom pre chelatáciu je tzv. „voľné železo“, viazané na nízko molekulárne zlúčeniny, ako sú aminokyseliny, citrát, ATP, GTP, ADP, askorbát a iné. (14). Za normálnych okolností je väčšina železa pre chelatáciu nedostupná, viazaná na transferín. Prítomnosť chelatovatelného „voľného“ železa, je dokumentovaná len u pacientov so závažným preťažením železom, kedy je transferín saturovaný (20).

Látky schopné chelatovať železo sa úspešne používajú v klinickej praxi, kde podporujú vylučovanie železa za podmienok preťaženia organizmu železom (37). Ich terapeutický potenciál je založený na:

- a) Odstránení prebytočného železa za účelom prevencie tvorby ROS a zabráneniu tak poškodeniu tkanív. Napr. u talasémie major, neurodegeneratívnych ochoreníach, Friedrichovej ataxii, prevencia antracyklínami vyvolanej kardiotoxicity, prevencia ototoxicity vyvolanej aminoglykosidovými antibiotikami a ďalšie (14).
- b) Odstránení železa z nehemových železo obsahujúcich enzýmov, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu v danom ochorení. Uplatnenie nachádzajú v liečbe HIV, astmy, malárie a iných (14).

2.7.1 Vlastnosti a štruktúra chelátorov

Ideálny chelátor by mal disponovať vlastnosťami ako napríklad možnosť podania orálne, schopnosť prestupovať biologické membrány, vysoká afinita k železitým iónom a nízka toxicita (10).

Chelátor aby mohol plniť svoju funkciu, musí byť schopný sa dostať v dostatočnej koncentrácii na miesto účinku (43). Žiadanou vlastnosťou je aj biodostupnosť po perorálnom podaní, čo je spojené s dobrou membránovou permeabilitou (14). Priestupnosť látok cez membrány závisí najmä na lipofilite, ionizácii a veľkosti molekuly (43). Podľa Lipinského pravidiel, sa očakáva dobrá biodostupnosť u molekúl s $\log P < 5$, s množstvom OH a NH skupín menším ako 5, celkovým obsahom atómov dusíka a kyslíka nepresahujúcim počet 10 a s molekulovou hmotnosťou menšou ako 500 (14).

Chelátory by mali uprednostňovať železité ióny pred železnatými. Tie, ktoré vykazujú afinitu k Fe^{3+} viažu aj iné trojmocné ióny, zatiaľ čo chelátory s afinitou k Fe^{2+} chelatujú aj dvojmocné ióny. Trojmocné ióny (Al^{3+} , Ga^{3+}) však nie sú pre žijúce bunky esenciálne, na rozdiel od iónov dvojmocných (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} a iné) (14).

Preferencia železitých iónov pred iónmi železnatými je spojená s prítomnosťou molekúl kyslíka ako ligandov, prítomnosť atómov dusíka posúva afinitu chelátoru smerom k iónom dvojmocným (43). Afinita k Fe^{3+} iónom sa vyjadruje ako pFe^{3+} , definované ako záporný logaritmus koncentrácie voľného železa v roztoku. Čím vyššia je hodnota pFe^{3+} , tým je chelátor silnejší (14).

Toxicita chelátorov železa súvisí s ich, už vyššie spomínanou, selektivitou ku kovu. Nedostatočná selektivita môže viesť k nedostatku niektorých kovov (napr. zinok) v organizme, alebo k redoxnej cyklizácii komplexov železa medzi Fe^{2+} a Fe^{3+} a následnej produkcii ROS (43).

Vyššia saturácia koordinačných strán železa je spojená s jeho nižšou katalytickou aktivitou. Maximálne koordinačné číslo železa je 6, takže hexadentálne chelátory dokážu kompletne saturovať väzbové miesta železa a tak ho kompletne deaktivovať (10). Avšak problémom je biodostupnosť po perorálnom podaní, vzhľadom na ich veľkú molekulovú hmotnosť (500-900) (14, 43).

2.7.2 Klinicky používané chelátory železa

V súčasnosti sa v klinickej praxi na liečbu nadbytku železa v organizme používajú tri chelátory: desferioxamín, deferiprión a deferasirox (42).

Hlavnou indikáciou je terapia chronického nadbytku železa, napríklad potransfúzna hemosideróza, ktorá sa vyskytuje pri talasémii maior, sideroblastickej anémii, autoimúnnej hemolytickej anémii a pri iných chronických anémiách (42).

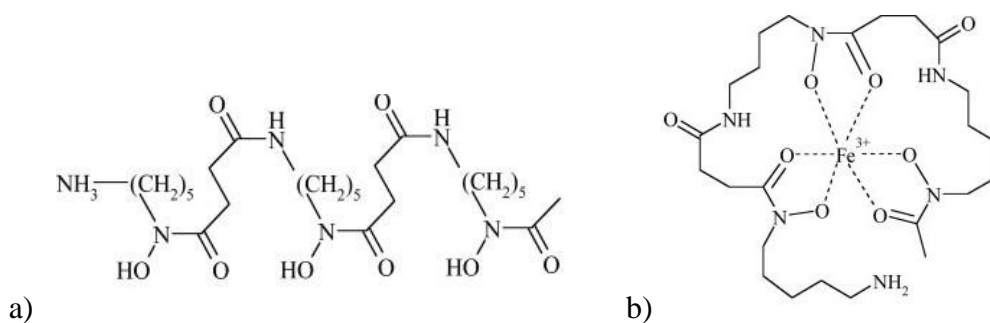
2.7.2.1 Desferioxamín (DFO, Desferal®)

Desferioxamín (Obr. 2.6) bol prvým klinicky používaným chelátorom železa. Je hexadentálnym siderofórom, pochádzajúcim zo *Streptomyces pilosus*. Čiže je prírodným chelátorom. Keďže železo je za fyziologických podmienok zle rozpustné, úlohou siderofórov je selektívne tvoriť komplexy so železom a uchovávať ho tak v rozpustnej forme, aby mohlo byť prijaté pomocou špecifického transportného systému (42).

DFO obsahuje tri amidové funkčné skupiny, ktoré tvoria, s vysokou afinitou k železitým iónom, stabilný ferioxamínový komplex v pomere 1:1 (Obr. 2.6), ktorý je z organizmu vylučovaný prevažne močom (14).

V terapeuticky relevantných koncentráciách (20-100 μM) môže inhibovať bunkovú proliferáciu in vitro, aj in vivo (1).

DFO sa vyznačuje nízkou biodostupnosťou po perorálnom podaní, v dôsledku jeho veľkej molekulovej hmotnosti (44) a hydrofilnej povahy. Biologický polčas desferioxamínu je veľmi krátky, 5-10 min. V dôsledku čoho musí byť podávaný subkutánne 10-12 hodín. Preto má aj napriek vysokej účinnosti veľmi nízku compliance. Nedostatkom je aj častá hypersenzitivita pacientov k liečivu a vysoká cena (45).



Obr. 2.6 a) desferioxamín (DFO), b) ferioxamínový komplex (42).

2.7.2.2 Deferiprón (L1, Ferriprox®)

Deferiprón (Obr. 2.8) je v porovnaní s DFO malá lipofilná molekula, s dobrou bio dostupnosťou po perorálnom podaní. Na základe jeho lipofilnej povahy je deferiprón distribuovaný do rôznych tkanív, pravdepodobne vďaka čomu je schopný odstraňovať prebytočné železo aj z kardiomyocytov (14).

Je to bidentálny chelátor, zo skupiny hydroxypyridínov, ktorý tvorí so železom komplexy v pomere 1:3. Biologický polčas má kratší ako dve hodiny. Vyznačuje sa lepšou compliance než DFO a nízkou cenou (14, 42).

Jeho nevýhodou je vysoký „first-pass“ efekt, prostredníctvom glukuronidácie a výskyt nežiadúcich účinkov ako agranulocytóza a GIT diskomfort (14).

Syntetizujú sa analógy deferiprónu v snahe zmenšiť first-pass efekt, a tým znížiť dávkovanie a výskyt nežiadúcich účinkov (viď kap. 2.7.3) (42).

2.7.2.3 Kombinačná terapia deferiprónu a desferioxamínu

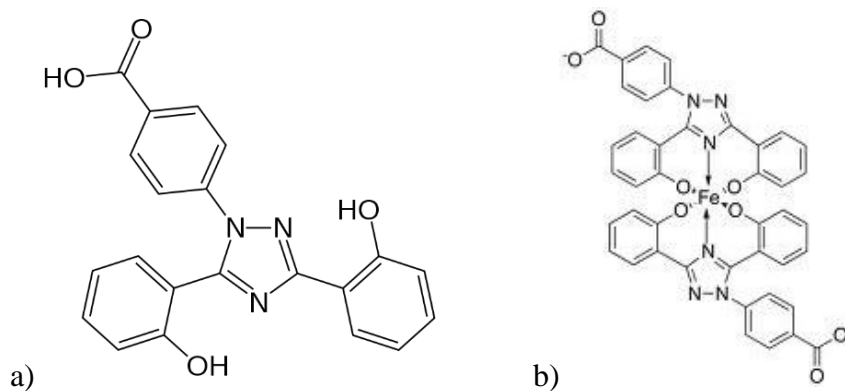
V terapii deferiprónom v kombinácii s desferioxamínom je vylúčené množstvo železa až dvakrát vyššie než v prípade monoterapie, čo vedie k znižovaniu dávok jednotlivých liečiv, a tak k nižšiemu výskytu nežiadúcich účinkov (42).

Predpokladá sa, že malá a lipofilná molekula deferiprónu preniká do bunky, kde tvorí komplexy so železom, prenáša ho do plazmy, kde ho odovzdáva extracelulárnemu desferioxamínu (42), ktorý má vyššiu väzbovú kapacitu. Čím sa uvoľnia molekuly deferiprónu, ktoré môžu opäť chelatovať železo v tkanivách (14).

2.7.2.4 Deferasirox (ICL670A, Exjade®)

Deferasirox (obr. 2.7) je ďalším perorálne používaným tridentálnym chelátorom v klinickej praxi. So železom tvorí komplex 2:1. Jeho výhodou je schopnosť penetrovať do srdečného tkaniva a odstraňovať z neho nadbytočné železo. Vďaka nízkym terapeutickým dávkam (20-30 mg/kg/deň) má lepšiu compliance než deferiprón (14).

Nežiadúce účinky sú podobné ako u deferiprónu, a to najmä agranulocytóza, gastrointestinálny diskomfort a kožné vyrážky. Nevýhodou je i jeho vysoká cena (14).

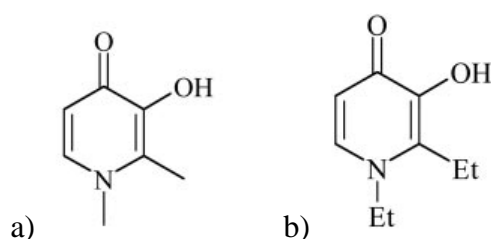


Obr. 2.7 a) Deferasirox, b) Komplex deferasiroxu s Fe v pomere 1:2.

2.7.3 Perspektívne chelátory

2.7.3.1 Hydroxypyridinónové deriváty

V snahe vylepšiť vlastnosti deferiprónu, boli syntetizované jeho deriváty. Jedným z nich je CP94 (Obr. 2.8). Pri pokusoch na hlodavcoch u neho bola pozorovaná takmer 6x vyššia účinnosť než u pôvodného deferiprónu, avšak pri podaní pacientom s talasémiou sa tento efekt neprejavil (42).



Obr. 2.8 Chemická štruktúra: a) deferiprón, b) CP94 (42)

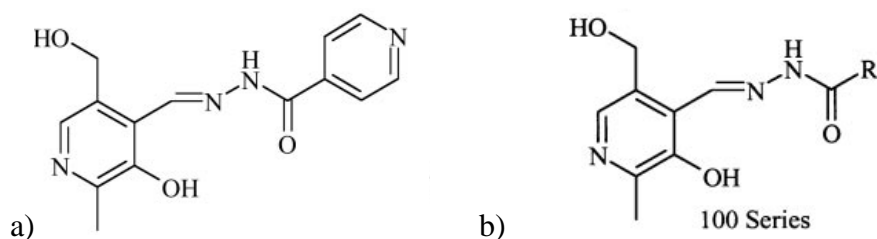
Ďalším typom obmien molekuly bolo syntetizovanie esterových proliečiv. Tie prejavili vyššiu účinnosť a nižšiu toxicitu, než pôvodná molekula deferiprónu. Inou možnosťou je syntéza hexadentálnych hydroxypyridinónových analógov, ktoré vykazujú vyššiu účinnosť pri nižších koncentráciách ligandu (42).

2.7.3.2 Aroylhydrazónové deriváty

Skupina aroylhydrazónových derivátov bola vytvorená v snahe nájsť orálne aktívny chelátor v liečbe preťaženia organizmu železom (32).

2.7.3.2.1 Analógy série 100

Prvou molekulou tohto typu bol pyridoxalisonikotinoylhydrazón (PIH). PIH (Obr. 2.9) je možné podávať orálne a patrí medzi tridentálne ligandy, tvoriace komplex so železom v pomere 2:1, prostredníctvom imínového dusíka a karbonylového a fenolického kyslíka. Syntéza prebieha prostredníctvom kondenzácie Schiffových báz z pyridoxalu a hydrazidu kyseliny isonikotínovej. Vyznačuje sa vysokou afinitou k Fe^{3+} , je relatívne lipofilný (42). In vivo, preukázal schopnosť chrániť retinu pred ischemicko-reperfúznym poškodením (32).

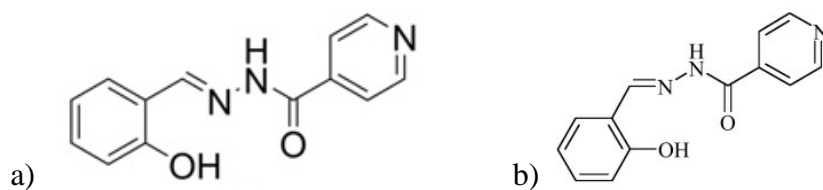


Obr. 2.9 a) Chemická štruktúra PIH, b) všeobecný vzorec pre sériu 100.

2.7.3.2.2 Analógy série 200

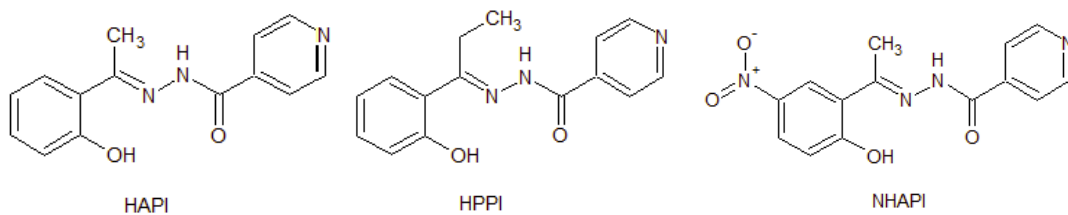
Nahradením pyridoxalu za viac hydrofóbnu salicylaldehydovú skupinu vznikli deriváty patriace do série 200 (42).

Základnou molekulou skupiny je salicylaldehydisonikotinoylhydrazón (SIH) (42). SIH (Obr. 2.10) je tridentálny chelátor s nízkou molekulovou hmotnosťou a optimálnou lipofilitou, ľahko vstupuje do buniek, kde veľmi efektívne blokuje na železe závislú produkciu hydroxylových radikálov. Ukázal sa byť veľmi efektívny v protekcii buniek H9c2 (bunková línia odvodená od kardiomyoblastov potkana), ale i iných, pred poškodením navodeným peroxidom vodíka, terc-butyhydroperoxidom (t-BHP), alebo antracyklínom daunorubicínom (46, 47). Sám je málo toxický. Nanešťastie sa SIH vyznačuje relatívne krátkym biologickým polčasom, najmä z dôvodu hydrolýzy hydrazidovej väzby (47).



Obr. 2.10 a) chemická štruktúra SIH, b) všeobecný vzorec látok zo série 200.

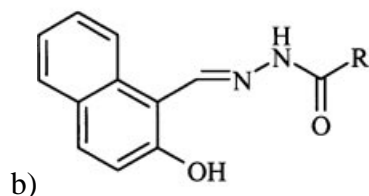
Látky zo série 200, sa vyznačujú vyššou lipofilitou, cytotoxicitou a antiproliferatívnym efektom v porovnaní s látkami zo skupiny 100 (98). Zároveň sa nahradením aldimínového protónu elektrón donorovou skupinou a/alebo pridaním elektrón akceptorových skupín, ktoré znižujú nukleofilný atak vody na hydrazónovú väzbu, podarilo dosiahnuť vyššiu stabilitu v porovnaní so SIH (46, 47). Takto vznikli napríklad HAPI, HPPI, NHAPI a iné (názvy vid' zoznam skratiek, chemická štruktúra vid' Obr. 2.10) (47).



Obr. 2.11 Chemické štruktúry niektorých aroylhydrazónových chelátorov zo série 200.

2.7.3.2.3 Analógy série 300

Inkorporovaním 2-hydroxy-1-naftaldehydovej skupiny do molekuly, vznikla ešte lipofilnejšia séria analógov označovaná číslom 300. Sú nie len najlipofilnejšie, ale vykazujú aj najvyššiu antiproliferačnú aktivitu (42).

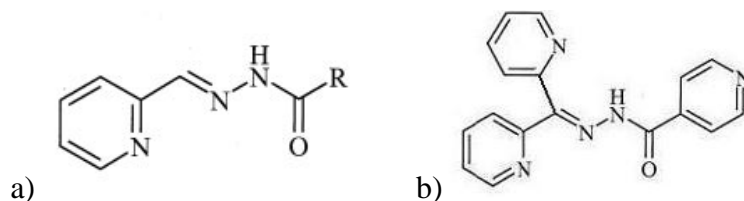


Obr. 2.12 Všeobecný chemický vzorec látok zo série 300.

2.7.3.2.4 Analógy PCIH a PKIH

Ďalšou skupinou sú látky s 2-pyridylkarboxaldehydisonikotinoyl-hydrazónom v molekule (PCIH) (Obr. 2.13). Vzhľadom na antitumoróznú aktivitu tiosemikarbazónov (viď kap. 2.7.3.3), sa zavedením 2-pyridylkarboxaldehydu do molekuly očakával ten istý typ účinku. Tento typ látok naopak preukázal prekvapujúco nízku antiproliferačnú aktivitu, zato však vykazujú výraznú schopnosť mobilizovať intracelulárne železo. Majú teda potenciál, najmä 2-pyridylkarboxaldehydtiofenkarboxaldehydbenzoylhydrazón (PCTH), nahradiť DFO v liečbe ochorení z preťaženia železom (42).

V snahe vytvoriť chelátory s vyššou antiproliferačnou aktivitou boli syntetizované deriváty di-2-pyridylketónisonikotinoylhydrazónu (PKIH) (Obr. 2.13), ktoré sa naozaj preukázali ako vysoko cytotoxické (42).



Obr. 2.13 Chemická štruktúra b) PKIH.

2.7.3.3 Tiosemikarbazóny

Tiosemikarbazóny sú tridentálne chelátory, podobne ako analógy PIH s antikanceróznou aktivitou. Vyznačujú sa vysokou afinitou k železu, ale i k iným iónom ako Cu_2 , Ga_2 , Co_2 a Zn_2 . Ich komplexy s kovmi majú často vyššiu protinádorovú aktivitu než samotný chelátor. Staršie tiosemikarbazóny podliehali glukuronidácii a boli z organizmu rýchlo vylučované. U novších molekúl je tento nedostatok odstránený (42).

Jedným zo zástupcov tejto skupiny je triapín, ktorý prejavil selektívnu antitumorovú aktivitu (42).

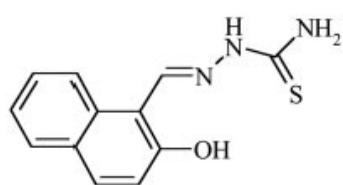
2.7.3.4 Hybridné chelátory

Kombináciou analógov PCIH a 2-pyridylkarboxaldehydu z tiosemikarbazidov, vznikla skupina látok, ktoré podobne ako PCIH vykazovali nízku antiproliferačnú, ale vysokú chelatačnú účinnosť. To naznačuje, že tiosemikarbazidová skupina, je pre antiproliferačný efekt tiosemikarbazónov nevyhnutná (42).

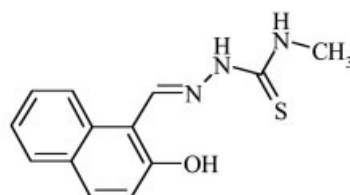
Ďalší typ hybridov vznikol spojením 2-hydroxy-1-naftylaldehydu z PIH analógov a tiosemikarbazidu. Základnou molekulou sa stal 2-hydroxy-1-naftylaldehyd-3-tiosemikarbazón (NT). V skupine označovanej aj ako NT séria, sa nachádzajú chelátory ako N4mT a N44mT, ktoré majú veľmi vysokú antiproliferačnú aktivitu (Obr. 2.14) (42).

Séria DpT vznikla obmenou semikarbazónu za tiosemikarbazón v skupine PKIH analógov. Skupina sa vyznačuje antiproliferačnými vlastnosťami. Jednou z najúčinnjších je di-2-pyridylketón-4,4-dimetyl-3-tiosemikarbazón (Dp44mT) (42). Dp44mT (Obr. 2.14) je vysoko efektívny v ochrane buniek pred t-BHP indukovanou

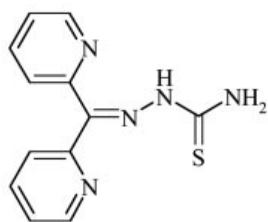
toxicitou. Vo vyšších koncentráciách začína prevládať jeho cytotoxický efekt, ktorý vychádza z jeho schopnosti viazať Fe, ktoré je esenciálne pre viabilitu buniek (48).



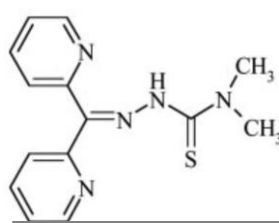
NT



N4mT



DpT



Dp44mT

Obr. 2.14 Chemické štruktúry niektorých hybridných chelátorov.

3 Ciele práce

In vitro štúdium novo syntetizovaných chelátorov železa H21, H22, H23, H24, H25 a H26, zo skupiny aroylhydrazónových derivátov odvodených od SIH zo série 200, na línii kardiomyoblastov H9c2 z potkana:

- Štúdium kardioprotektívnych účinkov chelátorov železa H21 až H26 v závislosti na dávke, v prostredí 200 μM peroxidu vodíka - protekcia po 24 a 72 hodinách.
- Štúdium vlastného toxického pôsobenia chelátorov železa H21 až H26 v závislosti na dávke - toxicita po 24 a 72 hodinách.
- Stanovenie koncentrácií vedúcich k ochrane 50 % buniek pred toxickým pôsobením 200 μM H_2O_2 (EC_{50}) a koncentrácií vedúcich k usmrteniu 50 % buniek oproti kontrole (TC_{50}).
- Vzájomné porovnanie dosiahnutých výsledkov.

4 Materiál

4.1 Prístrojové vybavenie

- bunkový inkubátor s termostatom a reguláciou koncentrácie CO₂, Sanyo CO₂ Inkubator MCO-19AIC, (Panasonic Healthcare, Holandsko)
- box s laminárnym prúdením Bio Air Topsafe 1.2 (EuroClone S.p.A, Taliansko)
- vodný kúpeľ Memmert WB 14 LV (Mettler, Nemecko)
- Invertovaný epifluorescenčný mikroskop Nikon Eclipse TS 100 s objektívom Nikon 10x/0,25 (Nikon, Japonsko), kamerou CCD-COOL-13Q (VDS Vosskühler GmbH, Nemecko), UV zdrojom Nikon S-CHG s ortuťovou lampou (Nikon, Japonsko) a filtre: červený Texas Red (TxR) a zelený FITC (Nikon, Nemecko)
- čítačka 96-jamkových doštičiek Infinite M 200 PRO s optickým hranolom (Tecan, Rakúsko)
- dosková trepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Nemecko)
- analytické váhy Sartorius CP2225D (Sartorius AG, Nemecko)
- laboratórne trepačky Vortex IKA MS3 basic (IKA, Nemecko)
- pipetky BioHit midi plus (Biohit, Fínsko)
- automatické pipety Eppendorf research rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- pipeta elektronická multikanálová - e-PET Biohit 50-1200 µl a 5-100 µl (Biohit, Fínsko)

4.2 Spotrebný materiál

- sterilné kultivačné nádoby T75
- 96 - jamkové a 12 jamkové mikrotitračné doštičky s plochým
- sérologické pipety 5 ml a 10 ml (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné špičky rôzneho objemu (Mettler, Nemecko)
- mikroskúmavky 0,5; 1,5 a 2 ml (Eppendorf, Nemecko)
- Bürkerova komôrka (Brand, Nemecko)
- laboratórne sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká Republika)

4.3 Chemikálie

- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza, Belgicko)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma, Nemecko)
- Fetálne bovinné sérum (FBS; Lonza, Belgicko)
- fosfátový pufoer v tabletách (PBS, Sigma, Nemecko)
- HEPES roztok 1M (N-(2-hydroxyethyl)piperazín-N'-(2-ethansulfonová kyselina)) (Sigma, Nemecko)
- roztok penicilínu-streptomycínu (P/S, 10 000 jednotiek/ml penicilínu a 10 mg/ml streptomycínu; Sigma, Nemecko)

- trypsín-EDTA (roztok 0,5% trypsínu a 0,02% EDTA) (Lonza, Belgicko)
- dimetylsulfoxid $\geq 99,9\%$ (DMSO) (Sigma, Nemecko)
- roztok neutrálnej červene 3,3 g/l (Sigma, Nemecko)
- peroxid vodíka 3% roztok (Sigma, Nemecko)
- tympanová modrá (Sigma, Nemecko)

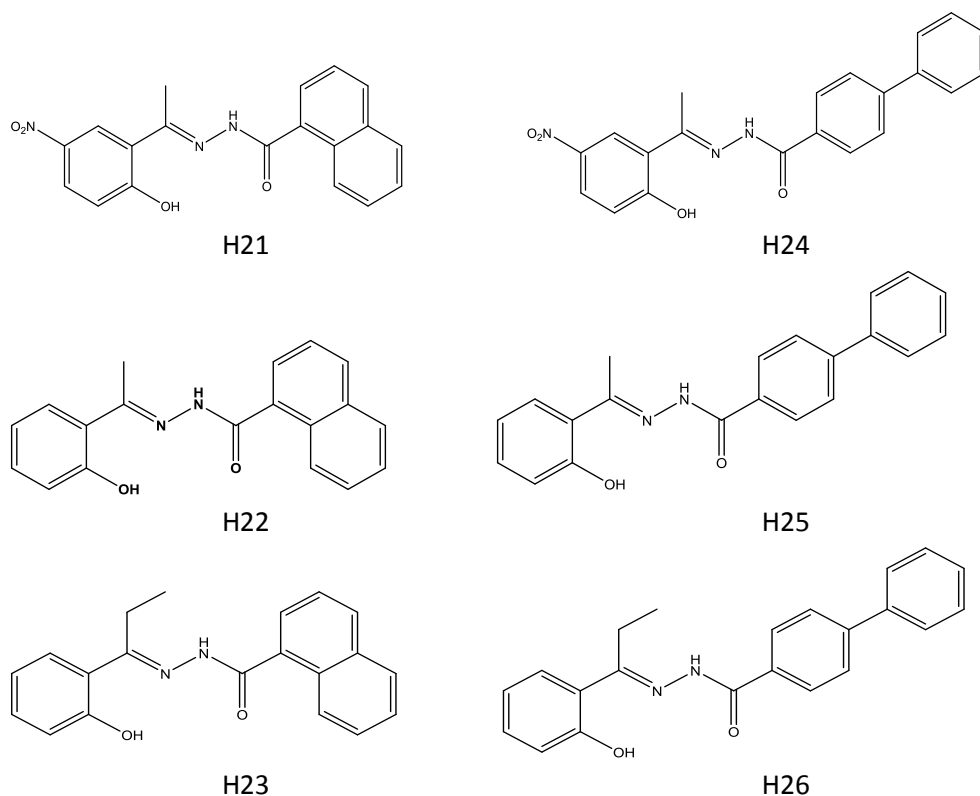
- formaldehyd 36,3% (Penta, Česká republika)
- chlorid vápenatý (Penta, Česká republika)
- etanol p.a. $\geq 99,9\%$ (Penta, Česká republika)
- kyselina octová ľadová p.a. $\geq 99,9\%$ (Penta, Česká republika)
- ADS pufoer o pH 7,4 (NaCl 116 mM; KCl 5,3 mM; MgSO₄·7H₂O 1,2 mM, HEPES 20 mM)
- fluorescenčná mitochondriálna sonda JC-1 (Molecular Probes, USA)

4.3.1 Skúšané látky

Všetky skúšané látky boli poskytnuté katedrou organickej a anorganickej chémie:

- H21: (*E*)-*N'*-[1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)ethyliden]-1-naftohydrazid
- H22: (*E*)-*N'*-[1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden]-1-naftohydrazid naftohydrazid
- H23: (*E*)-*N'*-[1-(2-hydroxyfenyl)propyliden]-1-naftohydrazid naftohydrazid
- H24: (*E*)-*N'*-[1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)ethyliden]-(1,1'-bifenyl)-4-karbohydrazid

- H25: (*E*)-*N'*-[1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden]-(1,1'-bifenyl)-4-karbohydrazid
- H26: (*E*)-*N'*-[1-(2-hydroxyfenyl)propyliden]-(1,1'-bifenyl)-4-karbohydrazid



Obr. 4.1 Chemické vzorce látok skúšaných v rámci tejto diplomovej práce.

4.3.2 Bunková línia H9c2

Vo všetkých pokusoch bola používaná línia buniek H9c2 izolovaná z nenádorových embryonálnych kardiomyoblastov z potkana z kmeňa BD1X (*Rattus norvegicus*), z americkej banky bunkových líní (American Type Culture Collection; Rockville, MD, USA).

Bunky H9c2 sa používajú ako in vitro model kostrového aj srdcového svalu, vzhľadom na to, že vykazujú elektrochemické a biochemické vlastnosti oboch týchto svalov. Expresia špecifických podjednotiek L-typu kalciových kanálov typických pre kostrový alebo srdcový sval je závislá na okolitých podmienkach (zloženie média, cytokíny, množstvo živín, rastové faktory) (49).

5 Metodika

5.1 Manipulácia s bunkovou líniou

5.1.1 Kultivácia

Bunky boli kultivované v sterilných kultivačných nádobách s plochou dna 75 cm² za prítomnosti kompletného kultivačného média (CCM), pozostávajúceho z DMEM Lonza obsahujúceho 10 % tepelne inaktivovaného FBS, 1% HEPES pufru (pH 7,4) a 1% roztoku penicilínu/streptomycínu.

Podmienky v inkubátore, v ktorom boli bunky po celý čas uchovávané, boli nastavené tak, aby čo najlepšie simulovali situáciu v organizme. Inkubátor udržiaval teplotu 37°C a 5 % oxidu uhličitého v atmosfére.

Akákoľvek manipulácia s bunkami bola vykonávaná v boxe s laminárnym prúdením za sterilných podmienok.

Bunky boli každý deň, maximálne každý druhý, kontrolované pod mikroskopom (zväčšenie 10x). Takto bol neustále sledovaný ich stav, kondícia, konfluencia a prípadná prítomnosť kontaminácie mohla byť včas odhalená.

5.1.2 Pasážovanie

Pasážovanie bolo vykonávané 2x týždenne, každý tretí až štvrtý deň, keď bunky v kultivačnej nádobe dosiahli konfluenciu 80-90 %. Pasážovací pomer odpovedal rýchlosti rozmnožovania buniek, tak aby do ďalšieho pasážovania opäť dosiahli konfluenciu 80-90 %.

Proces pasážovania sa zahájil odobraním starého média z kultivačnej nádoby. Ďalej sa bunky opláchli 2x v cca 5 ml fosfátového pufru (PBS), čím sa odstránili zvyšky kultivačného média, ktoré by inaktivovali trypsín použitý v nasledujúcom kroku. Trypsín, ktorý bol používaný na uvoľnenie buniek od dna kultivačnej nádoby, bol pridávaný v objeme 1 ml, rozprestretý po celej ploche dna kultivačnej nádoby

a ponechaný v inkubátore v prítomnosti buniek 4-5 minút. Po uplynutí tejto doby sa kultivačná nádoba s trypsínom a bunkami vybrala z inkubátoru, zľahka sa pobúchalo po stranách, aby sa uvoľnili všetky bunky a vizuálne sa skontrolovala pod mikroskopom. Uvoľnené bunky bolo možné ľahko určiť ich zaguľateného tvaru a voľného pohybu v médiu, ktorý bolo možné pozorovať pod mikroskopom. Trypsín bol inaktivovaný pridaním čerstvého kultivačného média, v ktorom sa bunky pomocou pipety dôkladne resuspendovali. Na záver sa preniesol potrebný diel bunkovej suspenzie do novej kultivačnej nádoby obsahujúcej čerstvé kultivačné médium, tak aby výsledný objem tekutiny v nádobe nebol viac ako 20 ml.

5.1.3 Počítanie buniek

Pred každým nasadzovaním buniek na pokus do 96-jamkovej TPP doštičky, sa bunky získané z kultivačnej nádoby spočítali a následne sa pridaním vhodného množstva čerstvého kultivačného média vytvorila suspenzia o koncentrácii $100 \cdot 10^3$ buniek v 1 ml.

Počítanie buniek bolo nasledujúcim krokom po zpasáňovaní buniek (viď kap. 5.1.2), čím sa stanovil počet buniek v suspenzii, ktorá vznikla po uvoľnení buniek pomocou trypsínu a pridaním CCM. Pokiaľ boli používané bunky z viacerých kultivačných nádob, tak boli premiestnené do jednej nádoby a poriadne premiešané, aby sa vytvorila homogénna suspenzia.

Z tejto dôkladne resuspendovanej suspenzie buniek bolo odobraných 100 μ l do 0,5 ml mikroskúmaviek a pripipetovaných 100 μ l trypanovej modrej. Poriadne sa to premiešalo a nechalo sa to spolu cca 5 minút pri laboratórnej teplote.

Počítanie živých buniek je založené na vstupovaní trypanovej modrej do mŕtvych buniek, zatiaľ čo do živých buniek s neporušenou membránou nepreniká. Poškodené bunky sú potom pri pozorovaní pod mikroskopom sfarbené do modra. Takýmto spôsobom je možné nie len určiť počet živých buniek, ale na základe pomeru medzi živými a mŕtvymi bunkami je možné stanoviť ich vitalitu.

Po uplynutí 5 minút sa suspenzia opäť dôkladne premiešala a nanieslo sa 10 μ l do každej polovice Bürkerovej komôrky. Následne sa pod mikroskopom pri zväčšení 10x spočítali živé (nezafarbené) bunky, ktoré sa nachádzali v piatich štvorcoch

z deviatich v hornej i dolnej polovici Bürkerovej komôrky. Započítaná bola každá bunka ležiaca vo vnútri počítaného štvorca a všetky bunky dotýkajúce sa jeho ľavej alebo hornej ohraničujúcej čiary. Týmto postupom sa zabezpečilo, že žiadna bunka nebola počítaná dvakrát.

Získaný počet buniek bol vynásobený 2krát, čím sa zobralo do úvahy riedenie suspenzie vzniknuté pridaním trypanovej modrej. Týmto postupom sme získali informáciu o množstve buniek v 1 μ l suspenzie.

5.1.4 Nasadzovanie buniek na pokus

Na základe výsledku počítania buniek bola riedením s CCM pripravená suspenzia o koncentrácii $100 \cdot 10^3$ buniek/ml. Týmto opatrením bola snaha zabezpečiť optimálne a zároveň rovnaké množstvo buniek v každej jamke pri všetkých replikáciách pokusu.

Do každej jamky 96-jamkovej doštičky sa pipetovalo 100 μ l pripravenej suspenzie, čo predstavuje 10 000 buniek v každej jamke.

Bunky sa nechali inkubovať 24 hodín, čím sa bunkám doprial čas na zrehabilitovanie sa. Po uplynutí tejto doby bolo kultivačné médium vymenené za médium bez séra (SFM), aby sa zastavila proliferácia buniek. SFM pozostávalo z DMEM Sigma neobsahujúceho pyruvát, 1 % HEPES pufru (pH 7,4) a 1 % roztoku penicilínu/streptomycínu. Bunky sa inkubovali v prítomnosti SFM najmenej ďalších 24 hodín.

5.2 Štúdium kardioprotektívnych a kardiotoxických vlastností testovaných látok

5.2.1 Príprava zásobných roztokov

Bunky H9c2 boli kultivované v prítomnosti skúšaných látok v médiu o rôznych koncentráciách. V prvom rade sa pripravili zásobné roztoky testovaných látok v DMSO, v ktorom sú pomerne dobre rozpustné, o koncentráciách 1000-krát vyšších než plánované výsledné koncentrácie.

Rozpustením kryštalických látok H21, H22, H23, H24, H25 a H26 sa pripravili ich roztoky o koncentrácii 100 mM o objeme cca 100 μ l.

Z týchto predpripravených roztokov látok H21, H25 a H26 sa ďalej riedením v DMSO pripravili ešte roztoky o koncentráciách 0,1 mM, 1 mM, 10 mM a 30 mM.

Zásobné roztoky boli počas celého obdobia vykonávania experimentov uchovávané v chlade pri -20°C .

5.2.2 Príprava skúšaných roztokov pre test na kardiotoxické vlastnosti testovaných látok

V experimentoch boli bunky H9c2 kultivované po dobu 24 alebo 72 hodín v prítomnosti skúšaných roztokov pozostávajúcich z SFM, do ktorých boli pridané potrebné množstvá zásobných roztokov.

Takto boli pripravené skúšané roztoky chelátorov o požadovaných výsledných koncentráciách 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 30 μ M a 100 μ M.

Pri každom pokuse bola prítomná kontrola a slepý roztok (blank).

Roztok pre kontrolu pozostával iba z SFM a DMSO. DMSO bolo pridané v objeme rovnakom ako objemy zásobných roztokov pridaných k SFM pri príprave skúšaných roztokov.

Roztokom použitým pre blank bol 200 μ M roztok peroxidu vodíka v SFM s prídavkom DMSO, opäť v rovnakom objeme ako pri príprave vyššie uvedených roztokov.

5.2.3 Príprava skúšaných roztokov pre test na kardioprotektívne vlastnosti testovaných látok

V tomto type testov boli bunky H9c2 taktiež kultivované po dobu 24 a 72 hodín v prítomnosti skúšaných roztokov testovaných látok, pozostávajúcich zo skúšaných látok rozpustených v 200 μ M roztoku peroxidu vodíka v SFM.

Roztok pre kontrolu a roztok pre blank boli pripravené rovnakým spôsobom a zložením ako pri testoch na kardiotoxicitu (viď kap. 5.2.2).

5.2.4 Experiment

Samotné experimenty boli vykonané na vopred predpripravených bunkách na 96- jamkovej doštičke (viď kap. 5.1.4).

Z každej jamky bolo odstránené SFM a namiesto toho boli do jamiek napipetované skúšané roztoky v objeme 200 μ l. (viď kap. 5.2.1 a 5.2.2).

Bunky sa nechali inkubovať v prítomnosti skúšaných roztokov v inkubátore (37°C, 5% CO₂) plánovaných 24 alebo 72 hodín. Po uplynutí stanovenej doby sa vykonal test vychytávania neutrálnej červene.

5.3 Vyhodnotenie pokusov

5.3.1 Test vychytávania neutrálnej červene

Test vychytávania neutrálnej červene (NR test) poskytuje odhad množstva žijúcich buniek v kultúre. Je jedným z najviac používaných testov na cytotoxicitu založený na schopnosti žijúcich buniek inkorporovať a viazať supravitálne kationaktívne farbivo, neutrálnu červeň, v lyzozómoch (49).

Neutrálna červeň, ľahko prechádza bunkovou membránou. U mŕtvych buniek dochádza k zmene bunkového povrchu aj na lyzozomálnej membráne, takže bunky nedokážu v sebe toto farbivo kumulovať a viazať. Množstvo zadržaného farbiva je teda priamo úmerné množstvu žijúcich buniek (50).

5.3.2 Roztoky potrebné k testu vychytávania neutrálnej červene

Pre test na vychytávanie neutrálnej červene boli používané roztoky:

Fixačný roztok: 0,5 % roztok formaldehydu v 1 % roztoku chloridu vápenatého.

Lyzačný roztok: 1 % roztok kyseliny octovej v 50 % etanole.

5.3.3 Prevedenie testu na vychytávanie neutrálnej červene

Z každej jamky na testovanej 96-jamkovej doštičke, sa odobralo 100 μ l skúšaného média a nahradilo sa 100 μ l roztoku neutrálnej červene v DMEM (80 μ g/ml). Čím sa vytvorila výsledná koncentrácia farbiva 40 μ g/ml v každej jamke. Spoločne sa to ponechalo inkubovať 3 hodiny v prostredí inkubátoru.

Po uplynutí 3 hodín sa odsátím média a pridaním 100 μ l fixačného roztoku na 15 minút pri laboratórnej teplote bunky zafixovali na dne jamiek. Zvyšky fixačného roztoku a neutrálnej červene boli 2x vypláchnuté použitím 100 μ l PBS. Následne sa pridalo do každej jamky 200 μ l lyzačného roztoku a nechalo sa to 30 minút trepať na trepačke pri laboratórnej teplote.

Samotné meranie absorbancie prebehlo na spektrofotometri TECAN pri vlnovej dĺžke 540 nm.

5.3.4 Štatistické spracovanie výsledkov

Štatistická analýza výsledkov bola vykonaná pomocou programu SigmaStat 3.0 (SPSS, USA). Pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) boli určené signifikantne odlišné hodnoty ($p < 0,05$) vzhľadom ku kontrole (v grafoch označené symbolom *) a k blanku (v grafoch označené symbolom #). Odľahlé hodnoty boli vylúčené pomocou Grubbsovho testu.

Výsledky sú uvedené ako priemerné hodnoty počtu ($n = 3-4$) meraní so štandardnými odchýlkami (\pm SD).

Pre výpočet TC50 (molárna koncentrácia študovanej látky, ktorá zabije na 50 % buniek v porovnaní s kontrolou) a EC50 (molárna koncentrácia študovanej látky, ktorá ochráni 50 % buniek v porovnaní s kontrolou) bol použitý software CalcuSyn 2.0 (Biosoft, Veľká Británia).

5.4 Zhotovenie fotodokumentácie

Vytvorenie fotodokumentácie je založené na farbení mitochondrií pomocou fluorescenčnej sondy JC-1 (5,5',6,6'-tetrachlór-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-karbocyanín jodid). Ide o farbivo ktoré sa v závislosti na potenciáli kumuluje v mitochondriách (majú vysoký elektrický potenciál). Následne v závislosti na koncentrácii (v miestach s vysokou koncentráciou) sa tvoria tzv. J-agregáty, čo spôsobí zmenu zafarbenia zo zelenej na červenú (51).

Poškodené mitochondrie v mŕtvych bunkách, majú zmenený membránový potenciál, čiže následne nedochádza ku kumulácii JC-1, tvorbe J-agregátov a zmene farby, takže ostávajú zelené (51).

5.4.1 Fluorescenčné farbenie mitochondrií

S bunkami bolo zaobchádzané spôsobom opísaným v kapitole 5.1. Rozdiel spočíval v nasadení buniek do 12-jamkových doštičiek, v objeme 750 μ l suspenzie buniek (viď kap. 5.1.4) na jednu jamku. Počet buniek v jednej jamke predstavoval $75 \cdot 10^3$ buniek.

Následne boli k bunkám pridané skúšané látky postupom opísaným v kapitole 5.1.4. až na to, že do každej jamky bol pipetovaný 1 ml skúšaných roztokov.

Po uplynutí 24 alebo 72 hodín bolo do každej jamky pridaných 5 μ l 0,5M JC-1 a necháných inkubovať 10 minút. Následne bolo skúšané médium so sondou odobrané a bunky 2x omyté 1 ml SFM. Do každej jamky sa pridalo 0,5 ml SFM. V tomto množstve bezsérového média boli bunky fotené.

5.4.2 Fotenie buniek

Fotky boli vyhotovené pomocou invertovaného epifluorescenčného mikroskopu (viď. kap. 4.1.1). Zhotovené fotografie boli spracované v programe NIS-elements AR 3.10 (Laboratory Imaging, Česká republika).

6 Výsledky

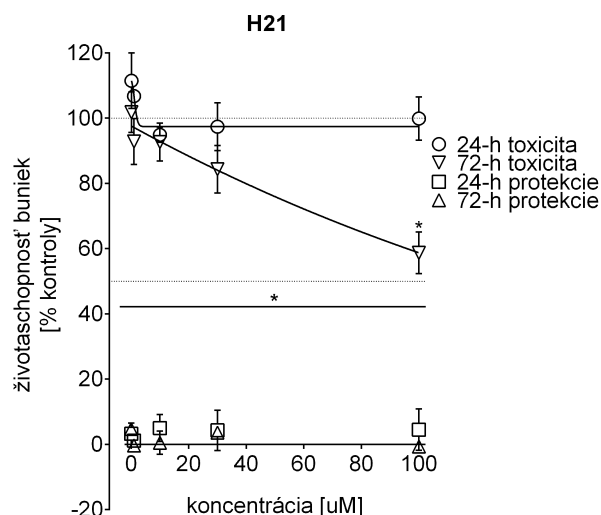
6.1 H21 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti

V teste vychytávania neutrálnej červene po 24hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H21 (koncentrácie: 0,1; 1; 10; 30; 100 μM) nebolo zaznamenané štatisticky významné zníženie viability buniek. Najnižšia viabilita (94,92 % životaschopných buniek oproti kontrole) bola nameraná pri koncentrácii chelátoru 10 μM . Na základe výsledkov v rozmedzí testovaných koncentrácií nebolo možné vypočítať TC_{50} .

Po 72hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H21 (koncentrácie: 0,1; 1; 10; 30; 100 μM) bolo v teste vychytávania neutrálnej červene pozorované signifikantné zníženie viability buniek na 58,72 % pri najvyššej použitej koncentrácii 100 μM . Vypočítané TC_{50} zodpovedá 153,9 μM .

Pri inkubácii buniek po dobu 24 hodín s testovanou látkou (1; 10; 30; 100 μM) v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nebola preukázaná štatisticky významná protekcia. Najvyššia viabilita 5,02 % bola nameraná pri koncentrácii 10 μM . EC_{50} nebolo možné z nameraných dát vypočítať.

Ani po 72hodinovej inkubácii v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nebola pozorovaná žiadna protekcia. Viabilita buniek dokonca v porovnaní s blankom bola nižšia. EC_{50} nebolo možné vypočítať.



Obr. 6.1 Viabilita buniek v teste vychytávania neutrálnej červene po inkubácii buniek 24 a 72 hodín s chelátorom H21 (toxicita) a v prostredí s chelátorom a 200 μM H_2O_2 (protekcia). $N \geq 3$. Štatisticky významne odlišné hodnoty od kontroly ($p < 0,05$) sú označené symbolom *. Štatisticky významne odlišné hodnoty od samotného 200 μM H_2O_2 ($p < 0,05$) sú označené symbolom # (len u protekcie).

		H21					
	c (μM)	0	0.1	1	10	30	100
T24	\emptyset	100.00%	111.46%	106.78%	94.92%	97.41%	99.89%
	SD	0.00%	8.50%	1.03%	2.34%	7.34%	6.64%
	TC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					
T72	\emptyset	100.00%	101.82%	92.86%	92.71%	84.34%	58.72%
	SD	0.00%	6.20%	7.06%	5.81%	7.28%	6.40%
	TC ₅₀	> 100 μM (= 153,9 μM)					
P24	\emptyset	100.00%	3.27%	1.17%	5.02%	4.31%	4.52%
	SD	0.00%	3.28%	1.85%	4.15%	6.19%	6.34%
	EC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					
P72	\emptyset	100.00%	4.72%	-0.34%	0.51%	3.62%	-0.63%
	SD	0.00%	0.94%	1.18%	3.57%	1.09%	1.10%
	EC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					

Tab. 6.1 Prehľad výsledkov pre látku H21. V tabuľke sa nachádzajú priemerné hodnoty viability buniek (\emptyset) z počtu ($n = 3-4$) meraní toxicity a protekcie v prostredí 200 μM H_2O_2 po 24 (T24, P24) a 72 (T72, P72) hodinách testom vychytávania neutrálnej červene živými bunkami) a štandardné odchýlky (SD). Uvedené sú TC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá usmrť 50 % buniek oproti kontrole) a EC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá ochráni 50 % buniek v porovnaní s kontrolou) látok.

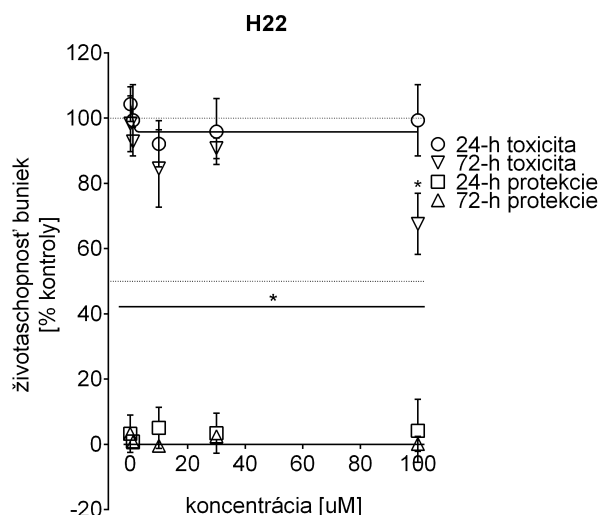
6.2 H22 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti

V teste vychytávania neutrálnej červene po 24hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H22 (koncentrácie: 0,1; 1; 10; 30; 100 μM) nebolo zaznamenané štatisticky významné zníženie viability buniek. Najnižšia viabilita (92,12 % životaschopných buniek oproti kontrole) bola nameraná pri koncentrácii chelátoru 10 μM . Na základe výsledkov v rozmedzí testovaných koncentrácií nebolo možné vypočítať TC_{50} .

Po 72hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H22 (koncentrácie: 0,1; 1; 10; 30; 100 μM) test vychytávania neutrálnej červene preukázal signifikantné zníženie viability buniek na 67,59 % pri najvyššej použitej koncentrácii 100 μM . Vypočítané TC_{50} zodpovedá 393,9 μM .

Pri inkubácii buniek po dobu 24 hodín s testovanou látkou (1; 10; 30; 100 μM) v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nebola zaznamenaná štatisticky významná protekcia. Najvyššia viabilita 5,09 % bola nameraná pri koncentrácii 10 μM . EC_{50} nebolo možné z nameraných hodnôt vypočítať.

Ani po 72hodinovej inkubácii v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nebola pozorovaná žiadna protekcia. Viabilita buniek bola dokonca nižšia než u samotného blanku. EC_{50} nebolo možné vypočítať.



Obr. 6.2 Viabilita buniek v teste vychytávania neutrálnej červene po inkubácii buniek 24 a 72 hodín s chelátorom H22 (toxicita) a v prostredí s chelátorom a 200 μM H_2O_2 (proteckia). $N \geq 3$. Štatisticky významne odlišné hodnoty od kontroly ($p < 0,05$) sú označené symbolom *. Štatisticky významne odlišné hodnoty od samotného 200 μM H_2O_2 ($p < 0,05$) sú označené symbolom # (len u protekcie).

H22							
	c (μM)	0	0.1	1	10	30	100
T24	Ø	100.00%	104.33%	99.36%	92.12%	95.89%	99.36%
	SD	0.00%	5.34%	10.92%	7.07%	10.10%	10.92%
	TC₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					
T72	Ø	100.00%	98.28%	92.85%	84.58%	90.79%	67.59%
	SD	0.00%	8.55%	4.42%	11.86%	3.16%	9.37%
	TC₅₀	TC50 > 100uM (= 393,9uM)					
P24	Ø	100.00%	3.26%	0.87%	5.09%	3.43%	4.20%
	SD	0.00%	5.73%	1.83%	6.29%	6.15%	9.67%
	EC₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					
P72	Ø	100.00%	3.27%	0.67%	-0.42%	2.48%	0.13%
	SD	0.00%	0.29%	0.94%	1.48%	0.81%	2.29%
	EC₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					

Tab. 6.2 Prehľad výsledkov pre látku H22. V tabuľke sa nachádzajú priemerné hodnoty viability buniek (\emptyset) z počtu ($n = 3-4$) meraní toxicity a protekcie v prostredí 200 μM H_2O_2 po 24 (T24, P24) a 72 (T72, P72) hodinách testom vychytávania neutrálnej červene živými bunkami) a štandardné odchýlky (SD). Uvedené sú TC_{50} (molárna koncentrácia látky, ktorá usmrť 50 % buniek oproti kontrole) a EC_{50} (molárna koncentrácia látky, ktorá ochráni 50 % buniek v porovnaní s kontrolou) látok.

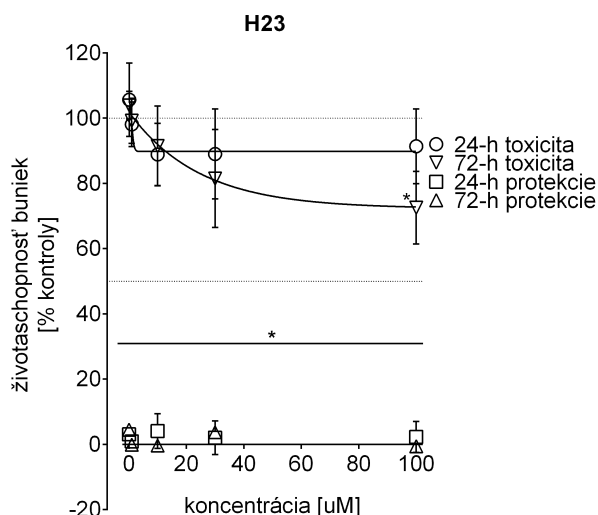
6.3 H23 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti

V teste vychytávania neutrálnej červene po 24 hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H23 (koncentrácie: 0,1; 1; 10; 30; 100 μM) nebolo zaznamenané štatisticky významné zníženie viability buniek. Najnižšia viabilita (88,90 % životaschopných buniek oproti kontrole) bola nameraná pri koncentrácii chelátoru 10 μM . Na základe výsledkov v rozmedzí testovaných koncentrácií nebolo možné vypočítať TC_{50} .

Po 72hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H23 (koncentrácie: 0,1; 1; 10; 30; 100 μM) test vychytávania neutrálnej červene preukázal signifikantné zníženie viability buniek na 72,58 % pri najvyššej použitej koncentrácii 100 μM . Vypočítané TC_{50} zodpovedá 435,9 μM .

Pri inkubácii buniek po dobu 24 hodín s testovanou látkou (1; 10; 30; 100 μM) v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nebola zaznamenaná žiadna protekcia buniek. Pri všetkých použitých koncentráciách s výnimkou 10 μM poklesla životaschopnosť buniek pod hodnoty blanku (3,08 %). EC_{50} nebolo možné z nameraných hodnôt vypočítať.

Taktiež po 72hodinovej inkubácii v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nebola pozorovaná žiadna protekcia. EC_{50} nebolo možné vypočítať.



Obr. 6.3 Viabilita buniek v teste vychytávania neutrálnej červene po inkubácii buniek 24 a 72 hodín s chelátorom H23 (toxická) a v prostredí s chelátorom a 200 μM H_2O_2 (protektia). $N \geq 3$. Štatisticky významne odlišné hodnoty od kontroly ($p < 0,05$) sú označené symbolom *. Štatisticky významne odlišné hodnoty od samotného 200 μM H_2O_2 ($p < 0,05$) sú označené symbolom # (len u protekcie).

H23							
	c (μM)	0	0.1	1	10	30	100
T24	$\bar{\emptyset}$	100.00%	105.67%	98.10%	88.90%	89.04%	91.40%
	SD	0.00%	11.26%	6.81%	9.55%	13.81%	11.47%
	TC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					
T72	$\bar{\emptyset}$	100.00%	103.89%	99.21%	91.46%	81.50%	72.58%
	SD	0.00%	4.32%	6.92%	12.24%	15.03%	11.13%
	TC ₅₀	TC50 > 100uM (= 435,9uM)					
P24	$\bar{\emptyset}$	100.00%	3.08%	0.94%	4.13%	2.06%	2.29%
	SD	0.00%	0.40%	1.83%	5.32%	5.17%	4.76%
	EC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					
P72	$\bar{\emptyset}$	100.00%	4.53%	-0.12%	-0.34%	3.74%	-0.53%
	SD	0.00%	1.06%	0.59%	1.15%	0.77%	1.80%
	EC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					

Tab. 6.3 Prehľad výsledkov pre látku H23. V tabuľke sa nachádzajú priemerné hodnoty viability buniek ($\bar{\emptyset}$) z počtu ($n = 3-4$) meraní toxicity a protekcie v prostredí 200 μM H_2O_2 po 24 (T24, P24) a 72 (T72, P72) hodinách testom vychytávania neutrálnej červene živými bunkami) a štandardné odchýlky (SD). Uvedené sú TC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá usmrť 50 % buniek oproti kontrole) a EC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá ochráni 50 % buniek v porovnaní s kontrolou) látok.

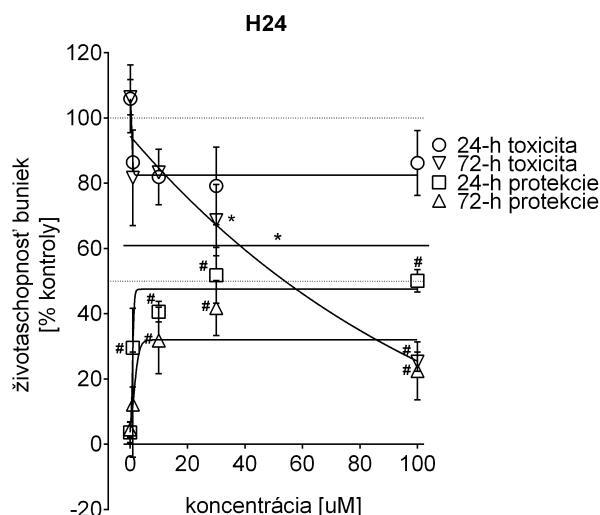
6.4 H24 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti

V teste vychytávania neutrálnej červene po 24 hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H24 (koncentrácie: 0,1; 1; 10; 30; 100 μM) nebolo zaznamenané štatisticky významné zníženie viability buniek. Najnižšia viabilita (79,21 % životaschopných buniek oproti kontrole) bola nameraná pri koncentrácii chelátoru 30 μM . Na základe výsledkov v rozmedzí testovaných koncentrácií nebolo možné vypočítať TC_{50} .

Po 72hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H24 (koncentrácie: 0,1; 1; 10; 30; 100 μM) bolo v teste vychytávania neutrálnej červene pozorované signifikantné zníženie viability buniek pri koncentráciách 30 a 100 μM na 68,69 % a 25,29 %. Vypočítané TC_{50} zodpovedá 45,0 μM .

Pri inkubácii buniek po dobu 24 hodín s testovanou látkou (1; 10; 30; 100 μM) v prostredí 200 μM peroxidu vodíka bola preukázaná štatisticky významná protekcia oproti blanku pri všetkých použitých koncentráciách. Najvyššia viabilita buniek 51,80 % bola nameraná pri koncentrácii 30 μM . EC_{50} zodpovedá koncentrácii 22,8 μM .

Po 72hodinovej inkubácii v prostredí 200 μM peroxidu vodíka bola pozorovaná štatisticky významná protekcia buniek pred oxidačným pôsobením H_2O_2 v prítomnosti koncentrácií chelátoru 10, 30 a 100 μM , pri ktorých viabilita buniek predstavovala 31,80 %, 41,79 % a 22,47. EC_{50} nebolo z nameraných hodnôt možné vypočítať.



Obr. 6.4 Viabilita buniek v teste vychytávania neutrálnej červene po inkubácii buniek 24 a 72 hodín s chelátorom H24 (toxicita) a v prostredí s chelátorom a 200 µM H₂O₂ (proteckia). N_≥3. Štatisticky významne odlišné hodnoty od kontroly (p<0,05) sú označené symbolom *. Štatisticky významne odlišné hodnoty od samotného 200 µM H₂O₂ (p<0,05) sú označené symbolom # (len u protekcie).

H24							
	c (µM)	0	0.1	1	10	30	100
T24	Ø	100.00%	105.91%	86.46%	81.95%	79.21%	86.26%
	SD	0.00%	10.40%	1.07%	8.51%	11.90%	9.95%
	TC ₅₀	> 100 µM (nedá sa vypočítať)					
T72	Ø	100.00%	106.39%	81.66%	83.31%	68.69%	25.29%
	SD	0.00%	5.40%	14.66%	0.65%	10.92%	2.97%
	TC ₅₀	45,0 µM					
P24	Ø	100.00%	3.63%	29.59%	40.64%	51.80%	50.14%
	SD	0.00%	3.11%	12.06%	3.14%	8.56%	3.44%
	EC ₅₀	22,8 µM					
P72	Ø	100.00%	4.50%	12.17%	31.80%	41.79%	22.47%
	SD	0.00%	2.44%	16.13%	10.18%	8.43%	8.87%
	EC ₅₀	> 100 µM (nedá sa vypočítať)					

Tab. 6.4 Prehľad výsledkov pre látku H24. V tabuľke sa nachádzajú priemerné hodnoty viability buniek (Ø) z počtu (n= 3-4) meraní toxicity a protekcie v prostredí 200 µM H₂O₂ po 24 (T24, P24) a 72 (T72, P72) hodinách testom vychytávania neutrálnej červene živými bunkami) a štandardné odchýlky (SD). Uvedené sú TC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá usmrť 50 % buniek oproti kontrole) a EC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá ochráni 50 % buniek v porovnaní s kontrolou) látok.

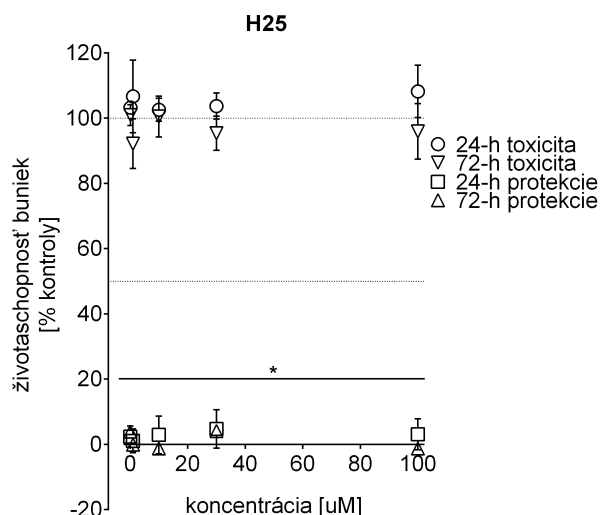
6.5 H25 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti

V teste vychytávania neutrálnej červene po 24hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H25 (koncentrácie: 0,1; 3; 10; 30; 100 μM) nebolo zaznamenané zníženie viability buniek. Najnižšia viabilita (101,53 % životaschopných buniek oproti kontrole) bola nameraná pri koncentrácii chelátoru 3 μM . Na základe výsledkov v rozmedzí testovaných koncentrácií nebolo možné vypočítať TC_{50} .

Po 72hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H25 (koncentrácie: 0,1; 3; 10; 30; 100 μM) test vychytávania neutrálnej červene nepreukázal signifikantné zníženie viability buniek. Najmenej buniek (88,26 %) preživalo pri koncentrácii chelátoru 3 μM . TC_{50} nebolo možné vypočítať.

Pri inkubácii buniek so skúšanou látkou (3; 10; 30; 100 μM) po dobu 24 hodín v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nebola zaznamenaná štatisticky významná protekcia. Najvyššia viabilita 4,78 % bola nameraná pri koncentrácii 30 μM . EC_{50} nebolo možné z nameraných hodnôt vypočítať.

Ani po 72hodinovej inkubácii s chelátorom H25 v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nebola pozorovaná žiadna protekcia. EC_{50} nebolo možné vypočítať.



Obr. 6.5 Viabilita buniek v teste vychytávania neutrálnej červene po inkubácii buniek 24 a 72 hodín s chelátorom H25 (toxicita) a v prostredí s chelátorom a 200 μM H_2O_2 (proteckia). $N \geq 3$. Štatisticky významne odlišné hodnoty od kontroly ($p < 0,05$) sú označené symbolom *. Štatisticky významne odlišné hodnoty od samotného 200 μM H_2O_2 ($p < 0,05$) sú označené symbolom # (len u protekcie).

H25							
	c (μM)	0	0.1	3	10	30	100
T24	\emptyset	0.00%	103.24%	101.53%	102.58%	103.70%	108.20%
	SD	100.00%	1.05%	5.68%	3.53%	4.01%	8.03%
	TC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					
T72	\emptyset	0.00%	100.95%	88.26%	100.51%	95.39%	95.95%
	SD	100.00%	3.22%	1.57%	6.26%	5.25%	8.53%
	TC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					
P24	\emptyset	0.00%	2.36%	4.63%	2.92%	4.78%	3.14%
	SD	100.00%	3.29%	8.25%	5.79%	5.91%	4.77%
	EC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					
P72	\emptyset	0.00%	3.96%	3.81%	-1.27%	4.10%	-1.23%
	SD	100.00%	1.07%	1.26%	1.12%	0.16%	1.83%
	EC ₅₀	> 100 μM (nedá sa vypočítať)					

Tab. 6.5 Prehľad výsledkov pre látku H25. V tabuľke sa nachádzajú priemerné hodnoty viability buniek (\emptyset) z počtu ($n = 3-4$) meraní toxicity a protekcie v prostredí 200 μM H_2O_2 po 24 (T24, P24) a 72 (T72, P72) hodinách testom vychytávania neutrálnej červene živými bunkami) a štandardné odchýlky (SD). Uvedené sú TC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá usmrť 50 % buniek oproti kontrole) a EC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá ochráni 50 % buniek v porovnaní s kontrolou) látok.

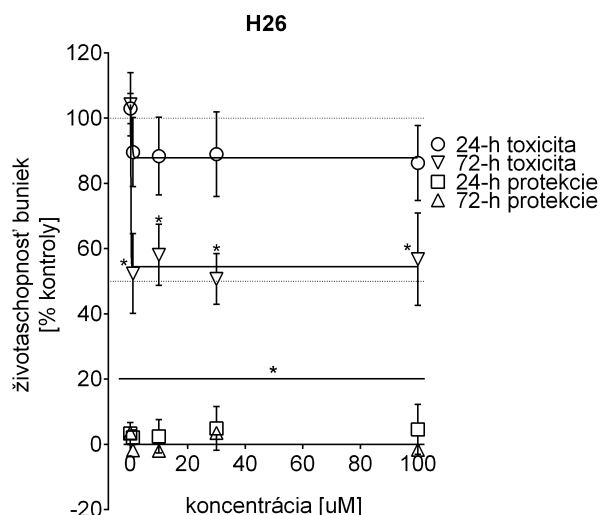
6.6 H26 - kardioprotektívne a kardiotoxické vlastnosti

V teste vychytávania neutrálnej červene po 24hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H26 (koncentrácie: 0,1; 1; 10; 30; 100 μM) nebolo zaznamenané štatisticky významné zníženie viability buniek. Najnižšia viabilita (86,29 % životaschopných buniek oproti kontrole) bola nameraná pri koncentrácii chelátoru 100 μM . Na základe výsledkov v rozmedzí testovaných koncentrácií nebolo možné vypočítať TC_{50} .

Po 72hodinovej inkubácii buniek H9c2 s chelátorom H23 (0,1; 1; 10; 30; 100 μM) test vychytávania neutrálnej červene preukázal signifikantné zníženie viability (50,69 % až 58,11 %) buniek u všetkých použitých koncentrácií. Vypočítané TC_{50} sa nedalo vypočítať.

Pri inkubácii buniek po dobu 24 hodín s chelátorom H26 v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nebola zaznamenaná žiadna protekcia buniek. Životaschopnosť buniek sa významne neodlišovala od blanku. EC_{50} nebolo možné z nameraných hodnôt vypočítať.

Protekcia buniek nebola zaznamenaná ani po 72hodinovej inkubácii buniek s testovaným chelátorom v prostredí 200 μM peroxidu vodíka.. EC_{50} nebolo možné vypočítať.

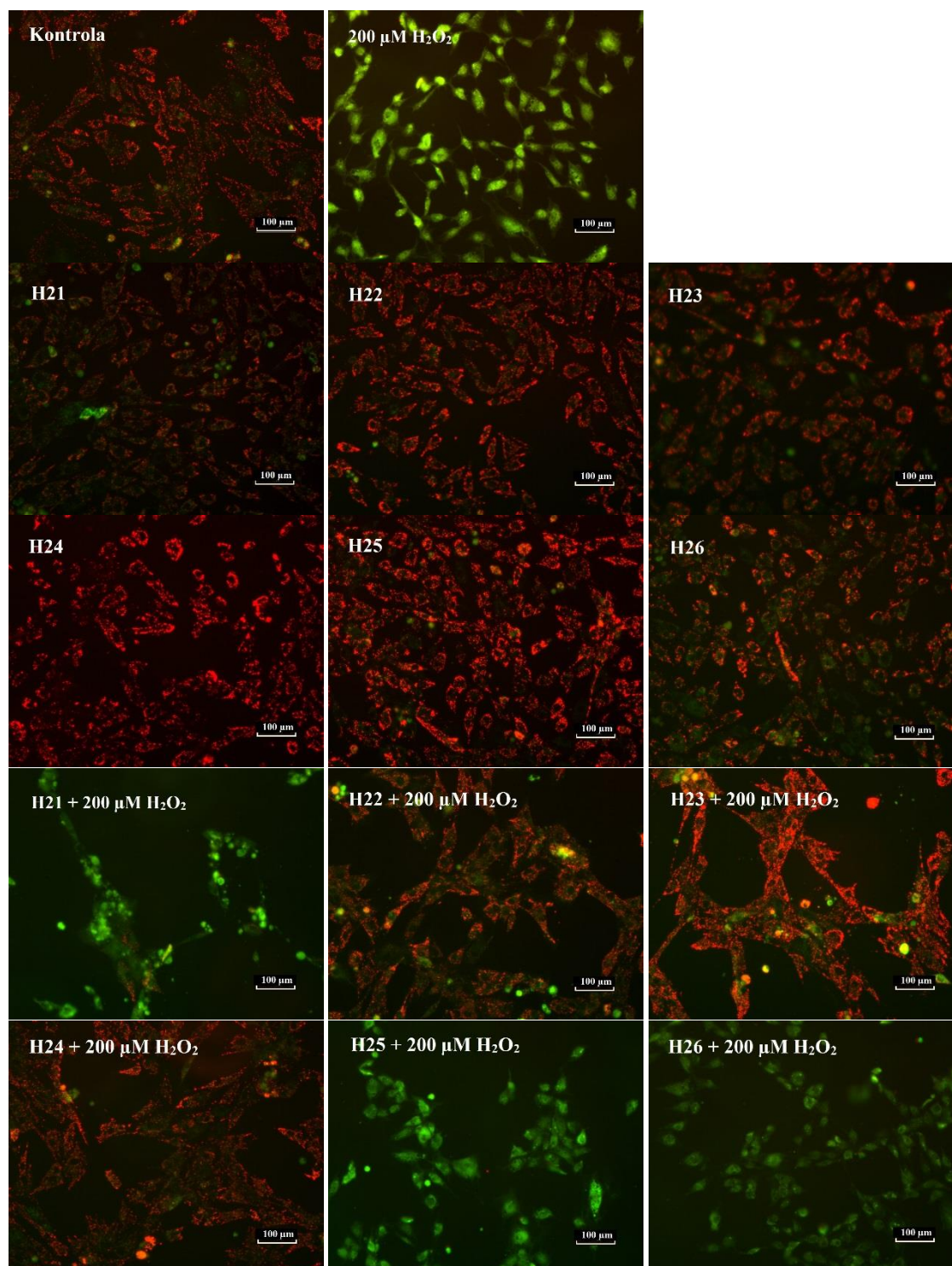


Obr. 6.6 Viabilita buniek v teste vychytávania neutrálnej červene po inkubácii buniek 24 a 72 hodín s chelátorom H26 (toxicita) a v prostredí s chelátorom a 200 µM H₂O₂ (protekcia). N_≥3. Štatisticky významne odlišné hodnoty od kontroly (p<0,05) sú označené symbolom *. Štatisticky významne odlišné hodnoty od samotného 200 µM H₂O₂ (p<0,05) sú označené symbolom # (len u protekcie).

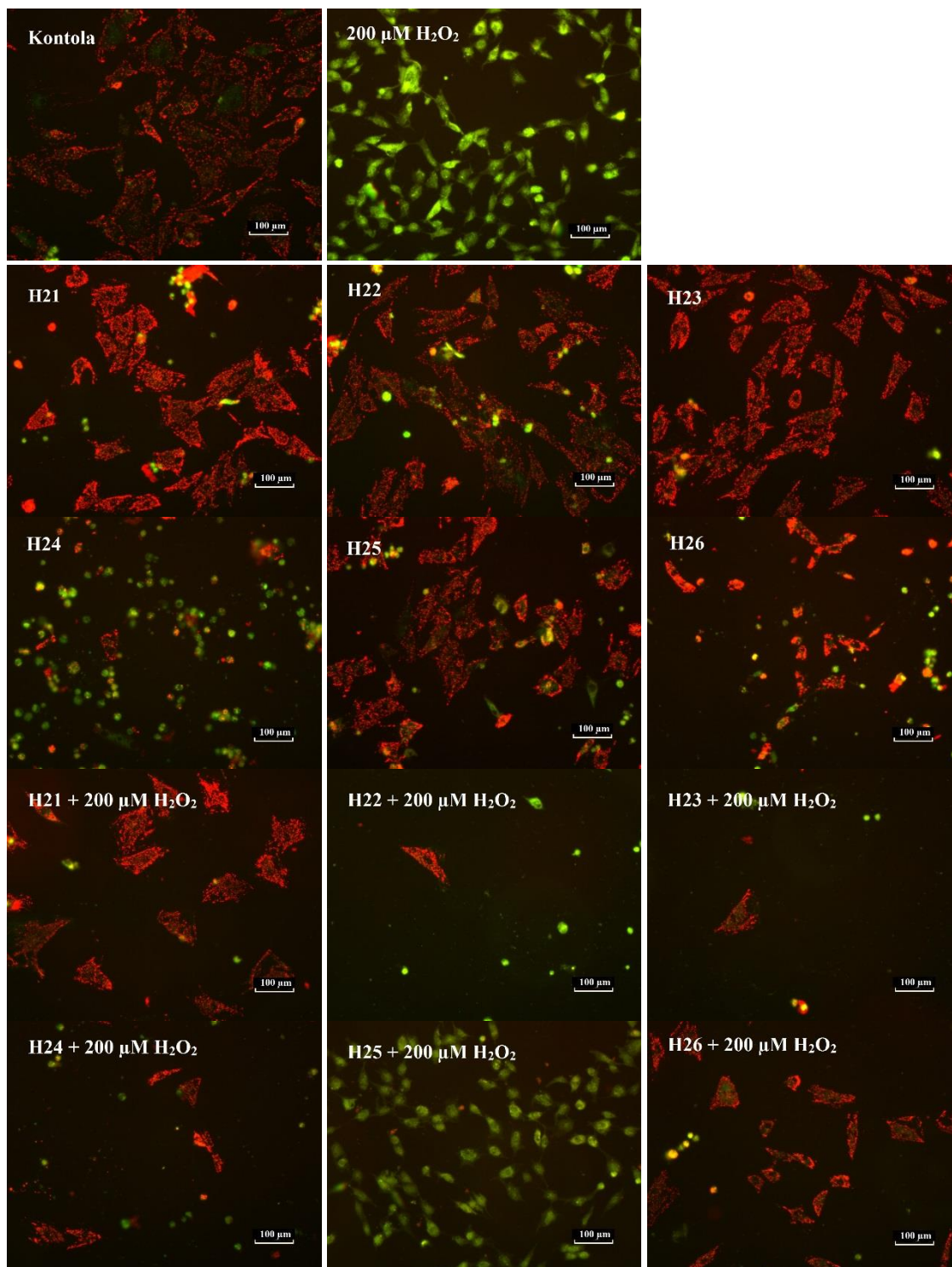
H26							
	c (µM)	0	0.1	1	10	30	100
T24	Ø	0.00%	102.97%	89.59%	88.37%	89.00%	86.29%
	SD	100.00%	4.61%	10.61%	11.91%	12.99%	11.51%
	TC ₅₀	> 100 µM (nedá sa vypočítať)					
T72	Ø	0.00%	104.23%	52.39%	58.11%	50.69%	56.79%
	SD	100.00%	9.70%	12.25%	9.38%	7.78%	14.16%
	TC ₅₀	> 100 µM (nedá sa vypočítať)					
P24	Ø	0.00%	3.33%	2.13%	2.48%	4.87%	4.62%
	SD	100.00%	3.40%	2.27%	5.14%	6.71%	7.66%
	EC ₅₀	> 100 µM (nedá sa vypočítať)					
P72	Ø	0.00%	3.56%	-1.80%	-1.94%	3.53%	-1.66%
	SD	100.00%	0.60%	0.87%	1.13%	1.02%	1.30%
	EC ₅₀	> 100 µM (nedá sa vypočítať)					

Tab. 6. Prehľad výsledkov pre látku H26. V tabuľke sa nachádzajú priemerné hodnoty viability buniek (Ø) z počtu (n= 3-4) meraní toxicity a protekcie v prostredí 200 µM H₂O₂ po 24 (T24, P24) a 72 (T72, P72) hodinách testom vychytávania neutrálnej červene živými bunkami) a štandardné odchýlky (SD). Uvedené sú TC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá usmrť 50 % buniek oproti kontrole) a EC₅₀ (molárna koncentrácia látky, ktorá ochráni 50 % buniek v porovnaní s kontrolou) látok.

6.7 Fotodokumentácia



Obr. 6.7 Toxicita študovaných látok a ich protekcie proti oxidačnému pôsobení 200 μM peroxidu vodíka po 24 hodinovej inkubácii. Viability buniek H9c2 bola zviditeľnená farbením mitochondriálnou fluorescenčnou sondou JC-1, ktorá sa akumuluje živých mitochondriách a tvorí červenofluoreskujúci J-agregáty. Pri poškodení mitochondrií JC-1 sonda netvorí J-agregáty a výsledkom je na fotografiách viditeľná zelená fluorescencia. Vo všetkých prípadoch bola použitá koncentrácia chelátorov (H21, H22, H23, H24, H25 a H26) 10 μM.



Obr. 6.7 Toxicita študovaných látok a ich protekcie proti oxidačnému pôsobení 200 μM peroxidu vodíka po 72hodinovej inkubácii. Viability buniek H9c2 bola zviditeľnená farbením mitochondriálnou fluorescenčnou sondou JC-1, ktorá sa akumuluje v živých mitochondriách a tvorí červeno fluoreskujúce J-agregáty. Pri poškodení mitochondrií dochádza k narušeniu potenciálu, JC-1 sonda netvorí J-agregáty a výsledkom je na fotografiách viditeľná zelená fluorescencia. Vo všetkých prípadoch bola použitá koncentrácia chelátorov (H21, H22, H23, H24, H25 a H26) 10 μM .

Na fotografiách vyhotovených po inkubácii buniek 24, alebo 72 hodín so skúšanými chelátormi v prostredí 200 μM peroxidu vodíka nie sú, v očakávanom množstve, prítomné zeleno fluoreskujúce mitochondrie, označujúce mŕtve bunky, ktoré zvyčajne po pôsobení samotného 200 μM peroxidu vodíka ostávajú prilepené na dne doštičky. Zároveň, však je na obrázkoch možné pozorovať menšie množstvo prítomných buniek ako na fotografiách kontroly a blanku.

Je možné, že chelátory síce bunky nedokážu ochrániť, ale dokážu proces usmrtenia spomaliť a bunky namiesto toho, aby zostali prilepené na dne, sa uvoľnia, tak ako je u nich bežné pri prirodzenom umieraní, a tak sú v procese farbenia vymyté a vo chvíli zhotovovania fotografií, už nie sú na doštičke prítomné.

7 Diskusia

Všetky aeróbne organizmy, vrátane človeka, žijú v prostredí bohatom na kyslík, ktorý využívajú k získavaniu energie. V rámci jeho metabolizmu, ale i v priebehu iných procesov z neho vznikajú jeho reaktívne formy, ROS, ktoré reakciami s biomolekulami spôsobujú poškodenie, až bunkovú smrť. Do určitej miery sú bunky schopné sa pred ROS chrániť pomocou antioxidačných mechanizmov. Pri prekonaní tejto miery sú bunky vystavované oxidačnému stresu (1).

Vzhľadom na to, že reaktívnym formám kyslíka sa pripisuje účasť na patogenéze mnohých ochorení, napríklad rakovina, diabetes, kardiovaskulárne ochorenia, ateroskleróza, neurologické choroby (Alzheimerova, Parkinsonova choroba), alebo chronický zápal (10) a zároveň prítomné voľné železo účasťou v niektorých reakciách ako Fentonova alebo Haber-Weissova reakcia prispieva k produkcii vysoko reaktívnych ROS, a tým k zhoršovaniu oxidačného stresu (1), je chelatácia železa jednou z možností terapie stavov, v ktorých zohráva úlohu voľné železo a ním vyvolaný oxidačný stres (42).

Bunky srdca sú obzvlášť citlivé na oxidačný stres, čo sa vysvetľuje prítomnosťou veľkého množstva mitochondrií a naopak nízkou prítomnosťou antioxidantov v týchto bunkách (30). Preto sa veľa pozornosti venuje práve protekcii srdcových buniek a snahe nájsť chelátor s nízkou toxicitou, vysokou afinitou k železitým iónom a možnosťou orálneho podávania (10).

V súčasnosti sú v klinickej praxi v prípadoch preťaženia organizmu železom používané tri chelátory: desferioxamín (desferal®), deferasirox (exjade®) a deferiprón (ferriprox®) (42). Avšak koncept chelatácie železa je účinný nie len v prítomnosti prebytočného železa, ale chráni i pred zhoršením oxidačného stresu sprostredkovaného železom (48).

Desferioxamín pre jeho nízku biodostupnosť nie je možné podávať orálne, ťažko prestupuje membrány a málo preniká do buniek vrátane buniek srdca, čo môže byť vysvetlením jeho limitovanej účinnosti (52). Nevýhodou deferasiroxu je prítomnosť nežiadúcich účinkov ako agranulocytóza a gastrointestinálny dyskomfort, taktiež je pomerne drahý. Deferiprón je možno podávať perorálne, vyznačuje sa dobrou

compliance, avšak je u neho vysoký efekt prvého priechodu pečeňou, takže je ho nutné podávať vo vyšších dávkach (14).

Vzhľadom na nedostatky týchto klinicky dostupných chelátorov je snaha nájsť látku s výhodnejšími vlastnosťami. Perspektívnou skupinou látok s chelatačným účinkom sú deriváty aroylhydrazónu. Základnou molekulou tejto skupiny je PIH, z ktorého nahradením pyridoxalu hydrofóbnou salicylaldehydovou skupinou vznikol SIH (42).

SIH preukázal potenciál chrániť pred poškodeniami spôsobenými ROS in vitro aj in vivo. Šimůnek et al. (2005) porovnali schopnosť SIH a DFO chrániť bunky H9c2 v prostredí 100 μ M peroxidu vodíka. V tejto štúdii SIH prejavil výrazne lepšie protektívne vlastnosti v porovnaní s DFO, ktorého bola potrebná viac ako 1000x vyššia koncentrácia, aby sa dosiahla porovnateľná protekcia, čiže koncentrácia, ktorú nie je možné klinicky dosiahnuť (53). Avšak významný problém pre jeho aplikáciu in vivo predstavuje rýchla plazmatická hydrolýza hydrazónovej väzby, ktorá zapríčiňuje jeho veľmi krátky biologický polčas (47).

Za účelom zvýšenia plazmatickej stability boli Hruškovou et al. (2011) nasyntetizované a študované metylketónové (HAPI, NHAPI) a etylketónové (HPPI) deriváty SIHu. Ďalšími modifikáciami boli nahradené substituenty na fenylovom kruhu za elektrónakceptorové skupiny, čo sa prejavilo ďalším zvýšením stability týchto látok. Tieto deriváty naozaj preukázali zvýšenú stabilitu v porovnaní so SIH a zároveň boli schopné chrániť srdcové bunky pred železom sprostredkovaným oxidačným poškodením navodeným 200 μ M t-BHP. Takmer všetky tieto deriváty po 24hodinovej inkubácii s bunkami H9c2 nepreukázali výraznú vlastnú toxicitu. Najtoxickjšie sa zo skúšaných látok prejavil SIH. TC_{50} väčšiny látok po 72hodinovej inkubácii sa pohybovalo v rozpätí od 2,7 μ M do 31,2 μ M. Pričom TC_{50} SIHu bolo stanovené na 29,7 μ M (47, 54).

V snahe nájsť chelátor s čo najlepšimi vlastnosťami boli nasyntetizované ďalšie deriváty odvodené od SIH. Redukciou hydrazónovej väzby vznikli redukované formy látok SIH, HAPI a HPPI, z ktorých ani jedna nedokázala ochrániť bunky pred oxidačným poškodením navodeným 200 μ M peroxidom vodíka. Testované boli aj analógy s atómom brómu v molekule (BHAPI, BPPI), látky s predĺženým postranným alkylovým reťazcom (H16, H18), alebo s nahradenou hydroxylovou skupinou

za pyrimidínový dusík v ketonickej časti molekuly. Pri porovnaní pomeru vlastnej toxicity látok a ich kardioprotektívnych vlastností, ani jeden z nich nepreukázal lepší pomer vlastností než SIH (52).

U novo syntetizovaných molekúl musia byť zachované železo chelatačné, antioxidantné a cytoprotektívne vlastnosti (47). Vzhľadom na to, že každá zmena štruktúry môže zmeniť vlastnosti chelátoru, je potrebné ich otestovať. V tejto diplomovej práci boli skúšané ďalšie metylketónové (H21, H22, H24 a H25) a etylketónové (H23, H26) deriváty SIHu. Cieľom bolo preskúšať in vitro vlastnú toxicitu novo nasyntetizovaných derivátov SIH (H21, H2, H23, H24, H25, H26) a ich schopnosť chrániť bunky pred oxidačným stresom spôsobeným peroxidom vodíka po dobu 24 a 72 hodín.

Pre testovanie boli zvolené bunky H9c2, embryonálne kardiomyoblasty z potkana, ktoré predstavovali model buniek srdca. Oxidačný stres v testoch skúšajúcich schopnosť chelátorov chrániť bunky bol navodzovaný pomocou 200 μM peroxidu vodíka. Táto koncentrácia H_2O_2 je schopná usmrtiť takmer 100 % buniek. Peroxid vodíka je v prítomnosti železa a iných prechodných prvkov zdrojom ďalších ROS, napríklad aj vysoko reaktívneho hydroxylového radikálu, ktoré svojim pôsobením spôsobujú smrť buniek (1).

Všetky testované látky prejavili veľmi nízku vlastnú toxicitu po 24 i 72 hodinách. TC_{50} po 72hodinovej inkubácii všetkých látok presahovalo hodnotu 100 μM s výnimkou látky H24, ktorá vykazuje najvyššiu toxicitu s $\text{TC}_{50} = 45,0 \mu\text{M}$. Všetky skúšané látky tak preukázali nižšiu toxicitu ako SIH.

Zo skúšaných chelátorov sa kardioprotektívne účinky prejavili len u látky H24. Po 24 hodinovej inkubácii v prostredí 200 μM peroxidu vodíka bolo stanovené EC_{50} chelátoru H24 na 22,8 μM . Ide o hodnotu porovnateľnú so SIH, ktorého EC_{50} bolo stanovené v rovnakých testovacích podmienkach Pravčíkovou K. (2013) na $17,63 \pm 1,38 \mu\text{M}$ (55).

Po 72hodinovej inkubácii v prostredí 200 μM peroxidu vodíka opäť žiadna z testovaných látok s výnimkou H24 neprejavila schopnosť bunky chrániť pred oxidačným stresom. Látka H24 prejavila klesajúcu účinnosť so zvyšujúcou sa

koncentráciou, čo je možné vysvetliť vlastným toxickým pôsobením chelátoru pri tak vysokých koncentráciách.

Na základe výsledkov je možné vidieť, že testované látky s naftylom v molekule (H21, H22, H23) neprejavili žiadne kardioprotektívne vlastnosti. Z ďalších troch skúšaných látok, u ktorých bol naftyl nahradený bifenyloľ sa kardioprotektívne vlastnosť prejavili len u chelátoru H24 s prítomnou NO₂ skupinou v polohe 4 na fenylovom kruhu. Chelátor H25 sa od H24 odlišuje len neprítomnosťou NO₂ skupiny v molekule, napriek tomu došlo k vymiznutiu protektívneho účinku a zároveň k výraznému zníženiu toxicity. Prítomnosť etylu v molekule (H23, H26) sa neprejavila významnou zmenou vlastností oproti metylovaným derivátom (H22, H25).

Zo skúšaných chelátorov sa perspektívnou javí iba látka H24. Avšak namerané dáta poskytli ďalšie dôležité informácie o vzťahu štruktúry molekúl chelátorov k ich kardioprotektívnym a kardiotoxickým vlastnostiam.

8 Závery

- Schopnosť chrániť bunky pred oxidačným stresom vyvolaným 200 μM peroxidom vodíka, porovnateľná so SIH, sa prejavila len u látky H24.
- Látka H24 vykazuje najvyššiu toxicitu voči bunkám H9c2 v porovnaní s ostatnými testovanými látkami. TC_{50} po 72hodinovej inkubácii (45 μM) je porovnateľné s toxicitou SIHu.
- Odstránením NO_2 skupiny z molekuly H24 dochádza u chelátoru H25 k vymiznutiu protektívnych vlastností a zároveň k výraznému zníženiu vlastnej toxicity.
- Všetky skúšané látky s výnimkou H24 prejavili nízku krátkodobú (24 hodín) aj dlhodobú (72 hodín) toxicitu. TC_{50} po 24 hodinách bolo u všetkých vyššie ako 100 μM .

9 Zoznam skratiek

ATP	adenosíntrifosfát
CCM	kompletné kultivačné medium (complete cultivation medium)
cGMP	cyklický guanozínmonofosfát
Dcytb	duodenálny cytochróm b
DFO	desferioxamín
DHA	dehydroaskorbát
DMEM	Dulbecco`s modified Eagla`s medium
DMSO	dimetylsulfoxid
DMT-1	transportér divalentných iónov 1, (divalent metal transporter)
Dp44mT	di-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazón
DpT	di-2-pyridylketonthiosemikarbazón
EC ₅₀	molárna koncentrácia, ktorá ochráni 50 % buniek oproti kontrole
EDTA	kyselina ethyléndiamintetraoctová
FAD	flavínadenín dinukleotid
FADH ₂	redukovaný flavínadenín dinukleotid
FBS	fetálne bovinné serum, (foetal bovine serum)
FMN	flavínadenín mononukleotid
FMNH ₂	redukovaný flavínadenín mononukleotid
FPN-1	feroportínový transporter 1
GPx	glutatiónpoxidáza
GSH	glutatión
H21	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)ethyliden]-1-naftohydrazid
H22	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden]-1-naftohydrazid naftohydrazid
H23	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[1-(2-hydroxyfenyl)propyliden]-1-naftohydrazid naftohydrazid
H24	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)ethyliden]-(1,1'-bifenyl)-4-karbohydrazid naftohydrazid
H25	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden]-(1,1'-bifenyl)-4-karbohydrazid naftohydrazid
H26	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[1-(2-hydroxyfenyl)propyliden]-(1,1'-bifenyl)-4-karbohydrazid naftohydrazid
H ₂ O ₂	peroxid vodíka

HAPI	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid
HO-1	hemoxygenáza
HPPI	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)propyliden)isonikotinoylhydrazid
KAT	kataláza
LIP	zásoba slabo viazaného železa (labile iron pool)
N4mT	2-hydroxy-1.naphthaldehyde-4-methyl-3-thiosemicarbazone
N44mT	di-2-pyridylketón-4,4-dimetyl-3-tiosemikarbazón
NAD	nikotínamidadenín dinukleotid
NR-test	test vychýtavania neutrálnej červene
NT	2-hydroxy-1-naftylaldehyd-3-tiosemikarbazón
NTBI	železo neviazané na transferín, (non transferrin bound iron)
PBS	fosfátový pufor
PCIH	2-pyridylkarboxaldehydisonikotinoylhydrazón
PCTH	2-pyridylcarboxaldehydtiofenkarboxaldehydbenzoylhydrazón
PIH	pyridoxalisonikotinoylhydrazon
PKIH	di-2-pyridylketónisonikotinoylhydrazón
RNS	reaktívne dusíkové častice
ROS	reaktívne kyslíkové častice
SFM	bezsérové médium
SHA	semihydroaskorbát
SIH	salicylaldehydisonikotinoylhydrazón
SOD	superoxiddismutáza
t-BHP	<i>terc</i> -butylhydroperoxid
TC ₅₀	molárna koncentrácia, ktorá usmrtí 50 % buniek oproti kontrole
Tf	transferín
TfR1	transferínový receptor 1

10Literatúra

1. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999.
2. Vacík J., Antala M., Čtrnáctková H., et al. CHÉMIA PRE 1. ROČNÍK GYMNÁZIA. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 1984.
3. Naviaux R. K. Oxidative Shielding or Oxidative Stress? THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS 2012; 342: 608–618.
4. Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. Biochemie pro studující medicíny. Hradec Králové: Karolinum, 2005.
5. Kalyanaram B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. Redox biology 2013; 244-257.
6. Sies H. OXIDATIVE STRESS: OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS. Experimental Physiology 1997; 82: 91-95.
7. Valko M., Rhodes C. J., Monco J., et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions 2006; 160: 1-40.
8. Pláteník J. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. Interní medicína pro praxi. 2009; 11(1): 30–33.
9. Liochev S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. Free Radical Biology and Medicine 2013; 60: 1–4.
10. Jomova K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology 2011; 283: 65–87.
11. Blokhina O., Fagersted K. V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. Plant Physiology and Biochemistry 2010; 48: 359-373.
12. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutritio reviews. 70(5): 257–265.
13. Warner D. S., Sheng H., Batinic - Haberle I. Review Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. The Journal of Experimental Biology 2004; 207: 3221-3231.
14. Heli H., Mirtorabi S., Karimian K. Advances in iron chelation: an update. Expert Opinion Ther. Patents 2011; 21(6): 819-856.

15. Winterbourn Ch. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 1995; 82/83: 969-974.
16. Sedláčková T., Racek J. Metabolismus železa a jeho regulace. *Klin. Biochem. Metab.* 2009; 17(38): 17–23.
17. Mladěnka P., et al. THE FATE OF IRON IN THE ORGANISM AND ITS REGULATORY PATHWAYS. *Acta Medica*, 2005; 48(3-4): 127-135.
18. Ganz T. SYSTEMIC IRON HOMEOSTASIS. *Physiol. Rev.* 2013; 93: 1721-1741. (
19. McKie A. T., Barrow D., Latunde-Dada G. O., et al. An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. *SCIENCE* 2001; 291: 1755- 1759.
20. Emerit J., Beaumont C., Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* 2001; 55: 333-9.
21. Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Andrews N.C.: Balancing acts: Molecular control of Mammalian iron Metabolism, *Cell* 2004; 117: 285-297.
22. Frazer D. M., Anderson G. J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocyte receive their cues? *Blood cells, Molecules, and diseases* 2003; 30: 288-297.
23. Gkouvatsos K., Papanikolaou G., Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochemica et Biophysica Acta* 2012; 1820: 188-202.
24. Dunn L. L., Rahmanto Y. S., Richardson R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *TRENDS in Cell Biology* 2006; 17(2): 93-100.
25. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research* 200; 531: 81–92.
26. Hentze M. W., et al. Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* 2010; 142: 24- 38.
27. Cmaschella C. Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. *Hematology* 2013; 2013(1): 1-8.
28. Papanikolaou G., Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and applied Pharmacology* 2005; 202: 199-211.
29. Donovan A., et al. The iron exporter ferroportin/Slc41a1 is essential for iron homeostasis. *Cell metabolism* 2005; 1: 191-200.

30. Gulati V., Harikrishnan P., Palaniswamy Ch., et al. Cardiac Involvement in Hemochromatosis. *Cardiology in Review* 2014; 22: 56–68.
31. Anderson G. J., Powell L. W. Haemochromatosis and control of intestinal iron absorption. *THE LANCET*; 353: 2089- 2090.
32. Mackenzie E. L., Iwasaki K., Tsuji Y. Intracellular Iron Transport and Storage: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* 2008;
33. Kell D. B. Towards a unifying, system biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinsons, Huntingtons, alzheimers, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch Toxicol* 2010; 84: 825- 889.
34. Wood J. C. Cardiac iron across different transfusion-dependent disease. *Blood Reviews* 2008; 22(2): 513- 521.
35. Hahalis G., Alexopoulos D., Kremastinos D. T., et al. Heart failure in β -thalassemia syndromes: A decade of progress. *The American Journal of Medicine* 2005; 118: 957-967.
36. Valko M., Leibfritz D., Moncola J., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39: 44– 84.
37. Limón-Pacheco J., Gonsbatt M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 2009; 674: 137– 147.
38. Sram R. J., Binkova B., Rossner P. Jr. Vitamin C for DNA damage prevention. *Mutation Research* 2012; 733: 39– 49.
39. Gammella E., Maccarinelli F., Buratti P., et al. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5: 1-6.
40. Mascio P., Murphy M. E., Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1991; 53: 194S-2005S.
41. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews* 1994; 52: 253.
42. Kalinowski D. S., Richardson R. The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacological Reviews* 2005; 57:547–583.

43. Zhou T., Ma Y., Kong X., et al. Design of iron chelators with therapeutic application. *Dalton Transactions* 2012; 41: 6371–6389.
44. Pervaiz S., Clement M.-V. Superoxide anion: Oncogenic reactive oxygen species? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007, 39: 1297–1304.
45. Chen H., Attieh Z. K., Su T., et al. Hephaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice. *Blood* 2004; 103: 3933- 3939. (14)
46. Kovacevic Z., Yu Y., Richardson D. R. Chelators to the Rescue: Different Horses for different Courses. *Chemical Research in Toxicology* 2011; 24: 279-282.
47. Hruskova K., Kovarikova P., Bendova P., et al. Synthesis and Initial in Vitro Evaluations of Novel Antioxidant Aroylhydrazone Iron chelators with Increased Stability against Plasma Hydrolysis. *Chemical Research in Toxicology* 2011; 24: 290-302.
48. Šimůnek T., Štěřba M., Ppelová O., et al. anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *British Journal of Pharmacology* 2008; 155: 138- 148.
49. Pagano M., Naaviglio S., Spina A., et al. Differentiation of H9c2 Cardiomyoblasts: The Role of Adenylate Cyclase system. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY* 2004; 198: 408-416.
50. Repetto G., Peso A., Zurita J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* 2008; 3: 1125 – 1131.
51. URL: <http://www.lifetechnologies.com/sk/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/cell-health-and-viability-assays-for-flow-cytometry/apoptosis-assays-for-flow-cytometry/jc-1-dye-mitochondrial-membrane-potential-probe.html> [cit. 2014-05-01]
52. Hašková P., Koubková L., Várová A., et al. comparison of various iron chelators used in clinical practice as protecting agents against catecholamine-induced oxidative injury and cardiotoxicity. *Toxicology* 2011; 289: 122-131.
53. Šimůnek T., Boer Ch., Bouwman R.A., et al. SIH—a novel lipophilic iron chelator—protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005; 39: 345–354. (D1)

54. Macková E., Hrušková K., Bendová P. et al. Methyl and ethyl ketone analogs of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: Novel iron chelators with selective antiproliferative action. *Chemico-Biological Interaction* 2012; 197: 69-79.
55. Pravidíková K. Studium protektivních vlastností série nových aroylhydrazonových chelátorů iontů železa před poškozením srdečních buněk oxidačním stresem. Hradec Králové: Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta. Katedra biochemických věd, 2013. 91s. Vedoucí diplomové práce Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.