

## PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE  
Ročník LV – Číslo 3 – KVĚTEN 2006

### SKRÍNING CYTOTOXICITY *IN VITRO* A MECHANIZMUS PÔSOBENIA PRÍRODNÝCH A SYNTETICKY PRIPRAVENÝCH LÁTKO VYUŽITELNÝCH V CHEMOTERAPII NÁDOROV

LETAŠIOVÁ S.<sup>1</sup>, JANTOVÁ S.<sup>1</sup>, MILATA V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakulta chemickej a potravinárskej technológie Bratislava, Katedra biochémie a mikrobiológie

<sup>2</sup>Slovenská technická univerzita Bratislava, Katedra organickej chémie

#### SÚHRN

**Skríning cytotoxicity *in vitro* a mechanizmus pôsobenia prírodných a synteticky pripravených látok využiteľných v chemoterapii nádorov**

Cieľom práce je poskytnúť stručný prehľad o aktuálnej situácii v oblasti skríningu cytotoxického účinku a mechanizmu pôsobenia prírodných a syntetických látok využiteľných v chemoterapii nádorov. Medzi v súčasnosti najčastejšie sa vyskytujúce a najzávažnejšie ochorenia patria onkologické ochorenia, ktoré predstavujú pre človeka život ohrozujúce riziko. Vážnou komplikáciou protinádorovej terapie je neadekvátna terapeutická odpoveď, ktorá je zapríčinená rezistenciou ľudského organizmu na používané liečivá, chemoterapeutiká. A práve rezistencia je jednou z hnacích síl, ktoré nás neustále nútia vyhľadávať nové protinádorovo účinné liečivá, či už prírodného alebo syntetického pôvodu. Dnes sa bežne a rutinne používa na vyhľadávanie nových potenciálnych cytostatík primárny skríning *in vitro*, pri ktorom sa rôznymi metódami sleduje citlivosť nádorových buniek rastúcich *in vitro* na cytotoxické látky. Vlastnosti potenciálnej protinádorovej zlúčeniny sú charakterizované rôznymi parametrami, medzi ktoré patrí antiproliferačná aktivita, sledovanie štrukturálnych a funkčných zmien cytoplazmovej membrány, zmien v obsahu bunkových proteínov, resp. nukleových kyselín, zmien metabolizmu buniek, zmien bunkového cyklu, indukcia apoptózy, enzýmová aktivita (dihydrofolátreduktázy, proteínáz, proteinkináz, topoizomeráz, tymidylátsyntetázy), vplyv na mitochondrie, cytoskelet bunky, telomerázová aktivita atď. Sledovaním týchto parametrov súčasne sledujeme aj mechanizmus účinku cytotoxicky účinnej látky.

**Kľúčové slová:** nádorová transformácia buniek – cytotoxicita – smrť bunky – bunkový cyklus – cytoskelet

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 99–109

#### SUMMARY

**Cytotoxicity Screening and Mode of Action of Natural and Synthetically Prepared Compounds Usable in Tumour Chemotherapy**

The paper reviews the current approaches to cytotoxic effect screening and mode of action of natural and synthetic compounds usable in tumour chemotherapy. Oncological diseases belong to the most frequently occurring and the most serious diseases that threaten millions of human lives. A serious complication of anticancer therapy is an inadequate therapeutic answer which is caused by the resistance of the human organism to the employed drugs, chemotherapeutic agents. Therefore the resistance is one of the driving forces which constantly force us to search for new anticancer effective drugs of natural or synthetic origin. Primary screening *in vitro*, in which by different methods the sensitivity of cancer cells growing *in vitro* to cytotoxic compounds is monitored, is commonly and routinely used for searching for new potential cytostatics today. The properties of a potential anticancer compound are characterized by different parameters, which include antiproliferative activity, monitoring of structural and functional changes in the cytoplasmic membrane, changes in cell proteins and nucleic acids content, cell metabolism changes, cell cycle changes, induction of apoptosis, enzymatic activity (dihydrofolate reductase, proteinases, proteinkinases, topoisomerases, thymidylate synthetase), effect on mitochondria, cell cytoskeleton, telomerase activity, etc. By monitoring these parameters, the mode of action of a cytotoxically effective compound can be followed up.

**Key words:** cancer cell transformation – cytotoxicity – cell death – cell cycle – cytoskeleton

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 99–109

Má

Medzi v súčasnosti najčastejšie sa vyskytujúce a najzávažnejšie ochorenia patria onkologické ochorenia, ktoré predstavujú pre človeka život ohrozujúce riziko. Vážnou komplikáciou protinádorovej terapie je neadekvátna terapeutická odpoveď, ktorá je zapríčinená rezistenciou ľudského organizmu na používané liečivá, chemoterapeutiká. A práve rezistencia je jednou z hnacích síl, ktoré nás neustále nútia vyhľadávať nové protinádorovo účinné liečivá, či už prírodného alebo syntetického pôvodu.

V rámci stratégie vyhľadávania nových protinádorových látok sa výskum sústreďuje na dva hlavné prístupy, na zlepšenie farmakologických a terapeutických vlastností klasických cytostatík a vývoj nových účinných látok zasahujúcich do bunkovej proliferácie, signálnych dráh, regulačných procesov, procesov metastázovania atď. Vlastnosti potenciálnej protinádorovej zlúčeniny sú charakterizované rôznymi parametrami, medzi ktoré patrí antiproliferačná aktivita, sledovanie štrukturálnych a funkčných zmien cytoplazmovej membrány, zmien v obsahu bunkových proteínov, resp. nukleových kyselín, zmien metabolizmu buniek, zmien bunkového cyklu, indukcia apoptózy, enzýmová aktivita (dihydrofolátreduktázy, proteínáz, proteínkináz, topoizomeráz, tymidylátsyntetázy), vplyv na mitochondrie, cytoskelet bunky, telomerázová aktivita atď. Sledovaním týchto parametrov súčasne sledujeme aj mechanizmus účinku cytotoxicky účinnej látky.

Nové cytotoxické a biologické látky s rôznymi mechanizmami účinku sa vyznačujú protinádorovou aktivitou tak, že zasahujú molekulové dráhy a mechanizmy „prežitia“ nádorovej bunky. A práve v posledných rokoch je jednou z hlavných tém výskumu bunkovej a molekulovej biológie, ako aj experimentálnej onkológie programovaná smrť bunky – apoptóza. Lepšie porozumenie mechanizmom apoptózy môže prispieť k vývoju nových prístupov v nádorovej terapii.

### Nádorová transformácia buniek

Na živý organizmus neustále pôsobia chemické, fyzikálne a biologické účinky, ktoré môžu viesť k mutačným zmenám v jeho bunkách. Akumulácia mutácií v génoch kontrolujúcich rast bunky môže viesť k jej aktivácii – iniciácii. Za vhodných okolností sa iniciovaná bunka v dôsledku promócie môže zmeniť na prvý stupeň nádorovej bunky, ktorý je charakterizovaný preneoplastickými léziami. V dôsledku genetických zmien sa vznikajúca neoplastická bunka stáva nesmrteľnou a sebastačnou v neobmedzenom raste. Súčasne ovplyvňuje svoje okolie vo svoj prospech a stáva sa rezistentnou k normálnym homeostatickým regulačným mechanizmom organizmu. Ďalším stupňom vo vývoji preneoplastickej bunky je premena na malígnu bunku. Proces vzniku nádorovej bunky je stupňovitý, pričom v prvých fázach je zvrtný, ale so zvyšujúcim sa počtom mutácií v somatickej bunke sa šanca na spätný zvrat nádorovej bunky na normálnu zmenšuje. Hlavnú úlohu pri primárnom vzniku nádorovej bunky zohrávajú zmeny spôsobené poškodením génov, a to aktiváciou protoonkogénov na nádorové onkogény, inaktíváciou nádorových supresorových génov (antionkogénov) a mutáciou v génoch zodpoved-

ných za opravu DNA, v dôsledku čoho nastáva deregulácia bunkového cyklu a apoptózy a rozvíjajú sa ďalšie znaky nádorového fenotypu ako napríklad narušenie opravy DNA, chromozómová instabilita, narušenie medzibunkovej komunikácie a interakcií medzi bunkami a extracelulárnym substrátom, inhibícia diferenciácie a replikatívnej senescencie, zmeny v metabolizme, podpora angiogenézy a zmena migračných vlastností buniek). V konečnom dôsledku sa to prejaví nekontrolovaným rastom a delením nádorových buniek, čiže ich **nádorovou transformáciou** <sup>1-5)</sup>.

Na detekciu mutácií v génoch sa používa **polymerázová reťazová reakcia** (PCR), prepis RNA na DNA a následná PCR (RT-PCR), hybridizácia podľa Southerna, detekcia polymorfizmu jednoreťazovej DNA alebo dvojzvitnicovej DNA a sekvenovanie DNA <sup>1, 2)</sup>. PCR je metóda s veľmi širokým použitím, pričom môže odhaliť jednu malígnu bunku na 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> normálnych buniek <sup>6)</sup>. Mutácia génu, ktorá vedie k expresii proteínu rozdielnej veľkosti, sa dá odhaliť pomocou testu na poškodený proteín. Ak mutácia spôsobí tvorbu nového restrikčného miesta v DNA získanej polymerázovou reťazovou reakciou, detekcia mutácie sa dá uskutočniť štiepením príslušnou restrikčnou endonukleázou. Nasleduje gélová elektroforéza, ktorá umožňuje detekciu poškodeného génu <sup>1, 7)</sup>.

Nádorová transformácia buniek vzniká postupným nahromadením genetických zmien, pri ktorej dochádza k aktivácii alebo inaktívácii signálnych dráh kontrolujúcich bunkový cyklus delenia, apoptózu, replikačnú schopnosť, mobilizáciu zdrojov substrátov, angiogenézu atď. **Jadrové hormonálne receptory** predstavujú skupinu signálnych molekúl nachádzajúcich sa v jadre. Sú to malé lipofilné molekuly. Ligandy týchto receptorov sú napr. steroidné hormóny, tyreoidálne hormóny a kyselina retinová. Aktivovaný receptor sa viaže na DNA v oblasti promótoru, a tak priamo reguluje transkripciu príslušných génov <sup>5)</sup>. Medzi jadrové hormonálne receptory patrí aj množstvo v nedávnej dobe objavených proteínov, ktorých aminokyselinová sekvencia má rôznu stupeň príbuznosti a ktoré nemajú známe ligandy – „orphan“ receptory. Medzi „orphan“ receptory patria proliferátorom peroxizómov aktivované receptory (PPaRs), pečeneňové receptory X (LXR), pregnanovaný receptor X (PXR), konštitutívny androstanový receptor (CAR) a farnozoidný receptor X (FXR). Ukázalo sa, že týmito hormónmi sprostredkované signálne dráhy zasahujú do regulácie metabolizmu glukózy, lipidov a rôznych liekov <sup>8, 9)</sup>. Proliferátorom peroxizómov aktivované receptory (PPaRs  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ) je skupina jadrových hormonálnych receptorov s funkciou transkripčného faktora, ktorý reguluje expresiu génov zainteresovaných v množení peroxizómov, metabolizme lipidov, raste buniek, ich diferenciácii alebo proliferácii a v zápalových procesoch. PPaR sa významne podieľajú na bunkovej diferenciácii, keď ovplyvnením tohto receptoru spojeného s receptorom kyseliny 9-cis-retinovej (RXR) pri heterodimerizácii PPaRs s RXR dochádza k väzbe na DNA <sup>5, 10-12)</sup>.

Inou cestou k nádorovej transformácii je **blokovanie apoptózy alteráciou proteínov apoptotickej kaskády**, napr. mitochondriálneho proteínu Bcl-2, ktorý inhibuje

apoptózu, ak je nadmerne alebo neprimerane exprimovaný<sup>5, 10, 13-15</sup>).

Transformované bunky vykazujú zvýšené vychytávanie glukózy pre vyššiu afinitu glukózového transportéru v membráne (nižšia  $K_M$ ). Ďalej u nich chýba povrchový fibronektín, ktorý majú kľudové bunky a ktorý udržuje ich tvar. Zmeny cytoskeletových elementov (aktínové mikrofilamenty nie sú difúzne rozptýlené, ale sa koncentrujú pri povrchu) sú príčinou zvýšenej mobility povrchových proteínov. Ďalším znakom nádorových buniek je neprimeraná sekrécia **transformujúcich rastových faktorov**  $\alpha$  a  $\beta$  (TGF  $\alpha$  a  $\beta$ ) a ďalších rastových faktorov, ktoré riadia normálny vývoj embryonálnych buniek. TGF  $\alpha$  sa považuje za autokrinný mitogén niektorých nádorov, ktorý stimuluje syntézu DNA a má angiogénne účinky. Ide o analóg epidermálneho rastového faktoru (EGF), ktorý je secerňovaný nádorovými bunkami a ktorý sa viaže na EGF-receptor a navodí tak jeho trvalú stimuláciu. TGF  $\beta$  inhibuje proliferáciu, migráciu endoteliálnych buniek a stimuluje tvorbu inhibítorov proteáz. Nádorové bunky tiež produkujú plazminogénový aktivátor, čo je proteáza premieňajúca plazminogén na plazmín. Vysoká tvorba plazmínu nádorovou bunkou pomáha penetráciou cez bazálnu lamínu. Mikroprostredie (stroma), v ktorom sa nádorové bunky nachádzajú, má taktiež vplyv na progresiu. Bolo dokázané, že **metalo-proteinázy stromálneho proteínového matrixu** (MMP) hrajú významnú úlohu v bunkovej proliferácii, diferenciácii, remodelácii extracelulárneho matrixu, pri angiogénzii a bunkovej migrácii. Mechanizmy pôsobenia MMP zahŕňajú proteolytické štiepenie rastových faktorov, ktoré sa stávajú dostupnými pre bunky, degradáciu extracelulárneho matrixu umožňujúceho pohyb buniek tkanivami a štiepenie signálnych receptorov potrebných pre bunkovú migráciu<sup>5, 16</sup>.

Pre dodávku živín a transport produktov metabolizmu nádorov potrebujú nádory vlastnú vaskularizáciu. Angiogenéza vzniká pučaním a inváziou endoteliálnych buniek z existujúcich ciev ako odpoveď na mnohé extracelulárne signály – ako **vaskulárny endoteliálny rastový faktor** (VEGF) a fibroblastový rastový faktor (FGF-1 a -2). VEGF je angiogenetickým faktorom, endoteliálnym bunkovo špecifickým mitogénom a vaskulárnym permeabilným faktorom. VEGF ako multifunkčný mitogén až 50 000-násobne viac zvyšuje mikrovaskulárnu permeabilitu ako histamín. Priamo stimuluje endoteliálny rast a angiogenézu a predpokladá sa, že jeho zvýšená produkcia ovplyvňuje v dôsledku zvýšenej vaskulárnej permeability angiogenézu, tumorogénzu, metastázovanie ako aj tvorbu malígnych efúzií<sup>1</sup>.

Zistilo sa, že nádorové bunky obsahujú enzým charakteru ribonukleoproteínu – **telomerázu**, ktorá je schopná predlžovať teloméry, a tým umožňuje bunkám vyšší alebo neobmedzený počet delení. V tkanive benígnych nádorov a v normálnom tkanive sú hodnoty telomerázy nízke až nulové. Neprítomnosť telomerázy spôsobuje starnutie bunky, zastavenie jej proliferačnej aktivity a jej zaniknutie. Zvýšená aktivita telomerázy je naopak zárukou trvalej proliferačnej aktivity a spôsobuje „nesmrteľnosť nádorovej bunky“<sup>6, 10</sup>.

Za kľúčový regulačný faktor, tzv. „strážca genómu

bunky“, sa považuje **nádorový – supresorový gén p53**, ktorý monitoruje poškodenie DNA a indukuje zastavenie bunkového cyklu vo fáze  $G_1$  alebo navodenie apoptózy. Proteín p53 sa nachádza na chromozóme 17. Produkt génu proteínu p53 sa viaže na DNA, čím stimuluje ďalší gén, ktorého produkt proteín p21 sa viaže s cyklín – dependentnou kinázou 2 (cdk2), ktorá stimuluje bunkové delenie. Ak proteín p21 utvorí komplex s cdk2, bunka nie je schopná pokračovať v ďalšom kroku bunkového delenia, a tým sa zablokuje oprava poškodenej DNA alebo apoptóza. Takto sa hromadia chyby v genetickom materiále bunky. Mutáciou zmenený proteín p53 nie je schopný efektívne sa viazať na DNA, v dôsledku čoho proteín p21 nie je k dispozícii na zastavenie bunkového delenia. Týmto spôsobom sa bunky dostávajú mimo kontroly bunkového delenia, čo má za následok vznik nádorovej bunky<sup>1, 5, 10</sup>.

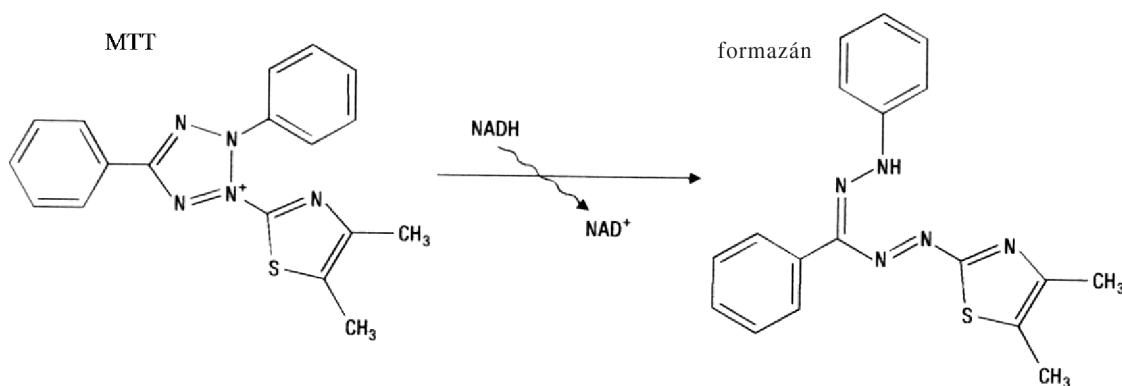
Na **testovanie ovplyvnených nádorových bunkových kultúr** v médiách sa používa ľudská nádorová kolónová metóda (metóda klonogénnych alebo nádorových kmeňových buniek, HTCA), ktorá skúma rast a chemosenzitivitu klonogénnych nádorových buniek. Kolóny rastúce v HTCA sú zložené z nádorových buniek a klonogénne bunky v nádorových kolóniách majú vlastnosť samoobnovy. Ďalej sa používa inhibičné testovanie populácií a receptorové štúdie adhézných signálnych molekúl, medzi ktoré patrí kadherín. Kadherín je transmembránový proteín, ktorý sa zúčastňuje bunkovej adhézie. Hrá veľmi dôležitú úlohu pri udržaní integrity multicelulárnych organizmov, pri diferenciácii buniek a vytváraní štruktúr<sup>5, 17</sup>.

Častou komplikáciou pri nádorových ochoreniach je **mnohopočetná lieková rezistencia** (MDR). Jej výskyt sa najčastejšie spája s prítomnosťou transmembránového P-glykoproteínu (P-gp), ktorý má schopnosť prenášať xenobiotiká von z bunky. Výsledkom tejto aktivity je nedostatočná vnútrobunková koncentrácia niektorých liečiv používaných pri chemoterapii. P-gp patrí do rodiny ABC (ATP-viažúce proteíny) transportných proteínov podobne ako aj proteín príbuzný s mnohopočetnou liekovou rezistenciou (MRP). Keďže množstvo týchto proteínov je na povrchu buniek pomerne nízke, používajú sa cytometrické testy, ktoré umožňujú stanovenie ich funkčnej aktivity. Využívajú sa fluorescenčné substráty, ako napríklad JC-1 alebo R123 v kombinácii s inhibítormi aktivity cyklosporínu A alebo PSC833 (pre P-gp) a probenecidom (pre MRP). Meria sa rozdiel bunkovej koncentrácie substrátu bez a v prítomnosti inhibítora<sup>1, 5</sup>.

#### Cytotoxický účinok prírodných a syntetických látok

Predklinický skrining protinádorovo účinných látok na *in vivo* systémoch je nielen zložitý, časovo a ekonomicky náročný, ale ako testovací model používa živé zvieratá. Preto sa bežne na vyhľadávanie nových potenciálnych cytostatík používa primárny biologický, resp. **biochemický skrining in vitro**, pri ktorom sa sleduje citlivosť nádorových buniek rastúcich *in vitro* na cytotoxické látky.

**Cytotoxicita** predstavuje reverzibilné poškodenie bunky, ktoré sa stráca po uplynutí určitého času od prerušenia expozície toxickou látkou alebo ireverzibilné poško-



Obr. 1. Molekulárna štruktúra MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid) a jeho príslušný reakčný produkt – formazán <sup>21)</sup>

denie dôležitých funkcií, ktoré môže viesť k trvalým nežiadúcim následkom až k smrti <sup>18)</sup>.

Cytotoxicitu delíme na bazálnu (všeobecnú), orgánovošpecifickú a organizačnú cytotoxicitu. Bazálna cytotoxicita predstavuje vplyv na základné procesy, ktoré zahŕňajú štruktúry a funkcie (integrita bunkovej membrány, mitochondriálna aktivita, syntéza DNA a proteínov) spoločné pre všetky bunky v organizme vrátane bunkových membrán, mitochondrií, chromozómov, ribozómov a lyzozómov. Za látku s bazálnym cytotoxickým účinkom sa považuje látka, ktorá už pri nízkych alebo stredných koncentráciách inhibuje bunkovú proliferáciu. Orgánovošpecifická cytotoxicita predstavuje účinok látky na špecializovanú funkciu charakteristickú pre určitý bunkový typ. Látky, ktoré interferujú s produktami metabolizmu alebo sekrécie, taktiež interferujú s orgánovošpecifickými a organizačnými funkciami. Na štúdium bazálnej cytotoxicity sa používajú nediferencované bunkové línie, zatiaľ čo orgánovošpecifická toxicita sa študuje v primárnych kultúrach s diferencovanými bunkami z rôznych orgánov a organizačná toxicita sa študuje nepriamo v bunkových kultúrach skúmaním substrátov alebo produktov metabolizmu <sup>19)</sup>.

Predklinický skrining cytotoxicity umožňuje hodnotenie veľkého počtu chemicky rozličných látok, rýchle vyraduje neúčinné látky, odhaľuje látky s najväčšou účinnosťou a zároveň umožňuje štúdium mechanizmu účinku cytotoxicky účinnej látky.

Na sledovanie cytotoxického účinku látok *in vitro* sa používajú rôzne bunkové modely, rôzne koncové body a rôzne metódy.

Ako **bunkové modely** sa na sledovanie cytotoxických účinkov používajú bunkové línie izolované z nádorov zvierat a ľudí. Zo zvierat sa na izoláciu buniek používajú myš, potkan, škrečok, králik, pes, opica atď. Z orgánov sa na získavanie bunkových kultúr najčastejšie používajú pľúca, pečeň, obličky, srdce, sval, nervové a retikuloendotelové systémy.

Medzi **koncové body** používané na charakterizáciu cytotoxicity študovaných zlúčenín patrí vitalita buniek, bunková morfológia, proliferácia buniek, poškodenie membrány, syntéza nukleových kyselín a proteínov, metabolické účinky <sup>20)</sup>.

Výber **metód** na sledovanie vitality a cytotoxicity závi-

sí od testovanej látky, od povahy bunkovej odpovede a terčových buniek. Metódy delíme na **krátkodobé testy** vitality, ku ktorým patrí vitálne a supravitálne farbenie, uvoľňovanie <sup>51</sup>Cr a metabolické testy (sledovanie zmien v glykolýze, respirácii, inkorporácii rádioaktívne značených prekursorov na sledovanie množstva DNA, RNA a proteínov); **dlhodobé testy** vitality, ktoré sledujú proliferáciu aktivitu nárastom počtu buniek (rastová krivka) alebo schopnosťou syntézy DNA a bielkovín a analýza bunkovej proliferácie (značenie jadrovej DNA proliferujúcich buniek 5-bromo-2'-deoxy-uridínom (BrdU) v prietokovej cytometrii, chemiluminiscencii a kolorimetrii); a mikrotitračné metódy. **Mikrotitračné metódy** sú ekonomicky výhodné a rýchle skriningové metódy využívajúce 96-jamkové platničky, založené na stanovení určitých biochemických parametrov. Jednou z často používaných mikrotitračných metód je MTT test, ktorý je založený na schopnosti mitochondriálnych sukcinátdehydrogenáz redukovať rozpustnú tetrazóliovú soľ – MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid) – žltej farby na formazánový produkt tmavomodrej farby (obr. 1). Produkt sa akumuluje vo vnútri bunky, pretože nemôže preniknúť cez cytoplazmovú membránu. Poskytuje nám informácie o integrite a aktivite mitochondrií a umožňuje určiť mieru životaschopnosti alebo počtu buniek. Fotometricky určená absorbancia formazánu zodpovedá množstvu vitálnych buniek. Mŕtve bunky MTT na formazán nemenia <sup>22)</sup>. Ďalej sa používa NR test založený na meraní absorpcie a akumulácie neutrálnej červenovej (NR) lyzozómami a vakuolami živých buniek; KB test založený na meraní množstva naviazaného farbiva kenacidovej modrej (KB) na proteíny nelyzovaných buniek; uridínový test založený na meraní inkorporácie uridínu pri biosyntéze makromolekúl <sup>20, 23)</sup>.

Vlastnosti potenciálnej protinádorovej látky sú charakterizované rôznymi parametrami, medzi ktoré patrí antiproliferačná aktivita, sledovanie štrukturálnych a funkčných zmien cytoplazmovej membrány, zmien v obsahu bunkových proteínov, resp. nukleových kyselín, zmien metabolizmu buniek, zmien bunkového cyklu, indukcia apoptózy, enzýmová aktivita, vplyv na mitochondrie, cytoskelet bunky, telomerázová aktivita atď. Sledovaním týchto parametrov súčasne sledujeme aj mechanizmus pôsobenia cytotoxicky účinnej látky <sup>23)</sup>.



Tab. 1. Rozdielne znaky a význam nekrózy a apoptózy <sup>21)</sup>

	nekróza	apoptóza
morfologické znaky	<ul style="list-style-type: none"> <li>- strata membránovej integrity</li> <li>- začína napučaním cytoplazmy a mitochondrií</li> <li>- končí úplnou lýzou bunky</li> <li>- nedochádza k tvorbe váčkov</li> <li>- rozpad (napučanie) organel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- výbežky plazmatickej membrány, ale nedochádza k strate integrity membrány</li> <li>- hromadenie chromatínu pri jadrovej membráne</li> <li>- začína zmršťovaním cytoplazmy a kondenzáciou jadra</li> <li>- končí fragmentáciou bunky na menšie telieska</li> <li>- tvorba membránovo viazaných váčkov (apoptických teliesok)</li> <li>- porušenie mitochondrií spôsobené tvorbou pórov spojených s proteínmi Bcl-2 rodiny</li> </ul>
biochemické znaky	<ul style="list-style-type: none"> <li>- strata regulácie iónovej homeostázy</li> <li>- nepotrebuje žiadnu energiu (pasívny proces, prebieha tiež pri teplote 4 °C)</li> <li>- náhodné štiepenie DNA (DNA škrvna po agarózovej gélovej elektroforéze)</li> <li>- postlytická DNA fragmentácia (= neskorý prípad smrti)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prísne regulovaný proces spojený s aktiváciou a enzýmovými krokmi</li> <li>- proces závislý na energii (ATP) (aktívny proces, neprebieha pri teplote 4 °C)</li> <li>- nenáhodná mono- a oligonukleozomálna fragmentácia DNA (rebrík po agarózovej gélovej elektroforéze)</li> <li>- prelytická DNA fragmentácia</li> <li>- uvoľnenie rôznych faktorov (cytochróm c, AIF) mitochondriami do cytoplazmy</li> <li>- aktivácia kaspázovej kaskády</li> <li>- zmeny v membránovej asymetrii (napr. premiestnenie fosfatidylserínu z cytoplazmovej na vonkajšiu stranu membrány)</li> </ul>
fyziológický význam	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ovplyvňuje skupinu susediacich buniek</li> <li>- vyvolaná nefyziológickými poruchami (atak komplementu, lytické vírusy, hypotermia, hypoxia, ischémia, metabolické jedy)</li> <li>- fagocytóza makrofágmi</li> <li>- významná zápalová reakcia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ovplyvňuje jednotlivé bunky</li> <li>- vyvolaná fyziológickými podnetmi (nedostatok rastových faktorov, zmeny v hormonálnom prostredí)</li> <li>- fagocytóza susednými bunkami alebo makrofágmi</li> <li>- žiadna zápalová reakcia</li> </ul>

Antiproliferačný účinok látky na nádorovú bunku rastúcu v kultúre sa sleduje jej pridaním do kultivačného média a určením jej stupňa cytotoxicity. **Miera účinku** sa vyjadruje hodnotami **inhibičnej koncentrácie**, ktorá spôsobí 20, 50, 80, 90 a 100 % inhibíciu rastu buniek ( $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{80}$ ,  $IC_{90}$  a  $IC_{100}$ ) <sup>23)</sup>. Hodnota  $IC_{50}$  menšia ako 4  $\mu\text{g/ml}$  je limitom stanoveným Národným onkologickým inštitútom (NCI) v USA na zaradenie zlúčeniny ako potenciálneho protinádorového liečiva <sup>24)</sup>.

Cytotoxický účinok môže byť spôsobený rôznym mechanizmom účinku xenobiotík, ktoré môžu atakovať

bunku v závislosti od koncentrácie, času pôsobenia a druhu bunkovej línie. Miestom zásahu xenobiotík v bunke môže byť bunková organela, bunková membrána, molekula, enzým, receptor, signálna dráha, biochemický proces, bunková proliferácia a regulačný proces. Xenobiotiká sa podľa zásahového – „terčového“ miesta delia na „jednoterčové“ látky, ktoré zasahujú do jedného miesta („terča“) až na „multiterčové“ látky s viacerými zásahovými miestami.

Hlavnými mechanizmami cytotoxického účinku látok na úrovni bunky je poškodenie bunkových membrán,

interakcia medzi receptorom a ligandom, väzba na makromolekuly, interferencia s tvorbou bunkovej energie, poškodenie homeostázy vápnika, zásah do bunkového cyklu a zmeny v jadre <sup>25</sup>). Tieto zmeny môžu viesť na úrovni bunkových kultúr k inhibícii proliferácie a až k bunkovej smrti.

### Smrť bunky

Ak sa bunka ocitne v prostredí, ktoré je nezlúčiteľné s jej existenciou, zomrie. Smrť bunky môže byť fyziologická – smrť starnutím, patologická – smrť poškodením a programovaná – smrť samovraždou <sup>26</sup>). Bunky, ktoré sú poškodené, napr. mechanickým poškodením alebo vystavením toxickým látkam, podstupujú zmeny charakterizované napučaním buniek a ich organel, únikom bunkového obsahu a zápalom okolitých tkanív. Bunky zomierajú nekrotickou <sup>27</sup>). Na rozdiel od nekrózy, apoptóza predstavuje organizovaný, na energii závislý proces, ktorý vedie k bunkovej smrti. Je charakterizovaná organizovaným kolapsom bunky s tvorbou vakovitých výbežkov, celkovým zvrátením bunky, kondenzáciou chromatinu, fragmentáciou DNA a absenciou zápalovej reakcie. Tento spôsob bunkovej smrti je fyziologický, geneticky riadený a má základný význam pre vývoj tkanív a homeostázu <sup>28</sup>).

Nekrotické a apoptické bunky sú charakterizované rôznymi morfológickými a biochemickými prejavmi (tab. 1).

### Nekróza – poškodenie cytoplazmovej membrány pri nekróze

Cytoplazmová membrána nádorových buniek je veľmi dôležitým miestom pre selektívny chemoterapeutický zásah, ktorý spôsobuje poškodenie bunky vedúce k bunkovej smrti. Podľa použitej metódy sledovania sa bunkové poškodenie delí do troch skupín: odchýlky od normálnej bunkovej morfológie, poškodenie normálnej bunkovej funkcie a zvýšenie permeability cytoplazmovej membrány <sup>23</sup>).

Odchýlky od normálnej bunkovej morfológie sa sledujú mikroskopicky pomocou **svetelného** alebo **elektrónového mikroskopu**. Najčastejšie sa pozoruje zmena veľkosti a tvaru bunky, ako aj zmeny chromatinu a jadra (pyknóza, hyperchromatóza, karyorexa, karyotexa, karyolýza), vznik intracelulárnych inklúzných teliesok, vakuolizácia cytoplazmy, zmena objemu cytoplazmy, kondenzácia mitochondrií, zmeny v počte organel a tvorba pórov v membráne <sup>29</sup>). Pri takýchto pozorovaniach sa používajú rôzne spôsoby kontrastného farbenia. Novou metódou na detekciu zmien bunkovej morfológie je **digitálna 3D-mikroskopia**, ktorá umožňuje sledovať veľkosť a povrch bunky bez predošlého farbenia počas samotného procesu zmien v bunkovej morfológii <sup>30</sup>). Iným spôsobom na odlíšenie zmenenej bunky od pôvodného stavu je sledovanie zmenenej bunkovej deformability, ktorá je spôsobená zmenami v cytoskelete bunky. Osobitnú skupinu tvoria pozorovania jadier a jadriek, pričom sa sleduje ich počet, tvar, veľkosť a tvorba deformácií (zvlneenie, vrúbkovanie, tvorba lalokov) <sup>31</sup>).

Zmeny permeability cytoplazmovej membrány vedú

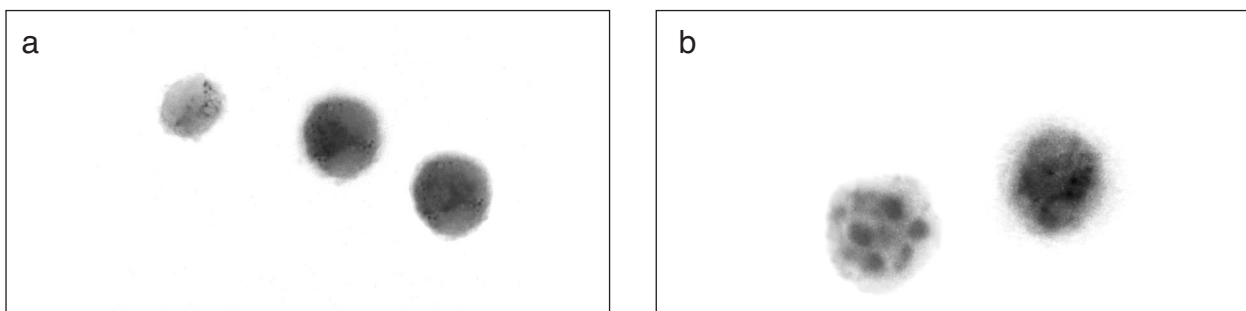
k porušeniu integrity (celistvosti), čo je jednou z charakteristík bunkovej smrti – **nekrozy**. K patologickej smrti (nekroze) dochádza pôsobením extrémnych podmienok odlišných od fyziologického stavu. K nekroze dochádza pri hypotaxii, hypoxii, ischémii, ataku komplementu, pôsobením toxínov, inhibítorov iónových púmp, inhibítorov metabolizmu a lytických vírusov. V prvom štádiu sa znižuje schopnosť udržiavať homeostázu, čo vedie k influxu vody a extracelulárnych iónov, predovšetkým Ca<sup>2+</sup>. Bunka zväčšuje svoj objem, bunkové organely napučávajú a dochádza k úbytku glykogénových zásob. V posledných štádiách sa bunkové organely a cytoplazmová membrána rozpadajú, bunkový obsah sa vylieva do okolitého prostredia a spôsobuje zápalovú reakciu <sup>32</sup>).

Zvýšenú permeabilitu cytoplazmovej membrány možno sledovať priamo alebo nepriamo. Priamou metódou je pozorovanie **tvorby membránových pórov** elektrónovým mikroskopom <sup>33</sup>). Nepriame sledovania sú založené na **meraní signálu vnikajúcich** extracelulárnych **molekúl** alebo unikajúcich intracelulárnych molekúl, ktoré sa cez cytoplazmovú membránu za normálnych okolností netransportujú. Z extracelulárnych molekúl, ktoré vstupujú do bunky pri zvýšenej permeabilite, sa využívajú napr. trypanová modrá, neutrálna červená, fluoresceín alebo <sup>51</sup>Cr. Jedným z najpoužívanejších spôsobov zisťovania poškodenia integrity biologických membrán je uvoľňovanie „markerového enzýmu“ laktátdehydrogenázy (LDH, EC 1.1.1.27), resp. cytoplazmatických enzýmov z bunky do extracelulárneho prostredia. LDH je enzým široko rozšírený v živočíšnej a rastlinnej ríši. Tento enzým má dôležitú úlohu v glykolytickom metabolizme <sup>32</sup>).

### Apoptóza

Apoptóza je spôsob bunkovej smrti, ktorá sa vyskytuje za normálnych fyziologických podmienok. Pri apoptóze dochádza k odstraňovaniu nadbytočných, nežiadúcich a poškodených buniek; spontánne vzniká v nádorových bunkách <sup>28</sup>). Môže byť indukovaná reaktívnymi kyslíkovými druhmi, chemoterapeutickými liečivami, UV žiarením, zvýšením teploty, odstránením rastových faktorov, hormónmi. Pri apoptóze dochádza k scvrknutiu bunky, kondenzácii cytoplazmy a chromatinu, fragmentácii nukleárnej DNA a k tvorbe výbežkov plazmatickej membrány <sup>21, 34</sup>), čo následne vedie k tvorbe apoptických teliesok, membránovo viazaných mechúrikov líšiacich sa veľkosťou a zložením <sup>27</sup>). Apoptózne telieska sú pohltané makrofágmi alebo susednými bunkami bez účasti zápalovej reakcie. Apoptóza je spojená so zmenami plazmatickej membrány (premiestnenie fosfatidylserínu z vnútornej strany plazmatickej membrány na vonkajšiu vrstvu), cytoplazmy, mitochondrií (strata membránového potenciálu, uvoľnenie špecifických proteázových aktivátorov apoptózy, cytochrómu c, faktora indukujúceho apoptózu (AIF) do cytoplazmy), proteínovej syntézy a internukleozómovým štiepením DNA katalyzovaným endonukleázami <sup>21, 27, 35</sup>).

Na základe charakteristických apoptických zmien sa na detekciu alebo kvantifikáciu apoptických buniek používajú rôzne metódy, medzi ktoré patria farbenie fluores-



Obr. 2. Živé (a) a apoptotické – mŕtve (b) myšacie leukemické L1210 bunky detekované fluorescenčnou mikroskopiou po značení fluorescenčnými farbivami Hoechstom 33342 a propídium jodidom<sup>37)</sup>

cenčnými farbivami, DNA gélová elektroforéza, annexín-V väzba, kaspázová enzýmová aktivita, TUNEL (terminálna deoxynukleotidylová transferáza (TdT) spojená s dUTP nick koncovým značením) metóda.

Živé a mŕtve bunky môžu byť rozlíšené aj na základe farbenia rôznymi **fluorescenčnými farbivami**, ktoré sa viažu na DNA. Bunky s poškodenou permeabilitou plazmatickej membrány sa zafarbia, zatiaľ čo nepoškodené (živé) bunky sa nefarbia farbivami, ktoré nepreniknú do plazmatickej membrány. Najčastejšie používané farbivá na fluorescenčnú mikroskopiú a prietokovú cytometriú sú akridínová oranž, Hoechst 33342, Hoechst 33258, DAPI, etídium bromid a propídium jodid<sup>21, 36)</sup> (obr. 2).

Detekcia DNA fragmentov **gélovou elektroforézou** je jedna z metód, ktoré sa používajú na identifikáciu buniek, v ktorých prebieha apoptóza. Fragmentácia internukleozomálnej DNA je charakteristickým znakom apoptózy. Počas apoptózy, aktivované nukleázy štiepia chromatinovú štruktúru DNA na fragmenty obsahujúce 50–300 kilobáz a následne na menšie DNA fragmenty s dĺžkou 180–200 básových párov, ktoré môžu byť extrahované z buniek a vizualizované horizontálnou agarózovou gélovou elektroforézou spojenou s farbením etídium bromidom<sup>38)</sup>.

Na dôkaz fragmentácie DNA v apoptotických bunkách sa meria pomer nízkomolekulovej cytosolovej DNA k vysokomolekulovej DNA (nízkomolekulová DNA sa pri apoptóze zvyšuje) (**Cell Death Detection ELISA kit**). Iná metóda používa tzv. **jednobunkovú gélovú elektroforézu** (Comet Assay<sup>TM</sup>), ktorá je založená na skutočnosti, že denaturované naštiepené fragmenty DNA účinkom elektrického prúdu (pri elektroforéze) migrujú von z apoptotickej bunky, zatiaľ čo nefragmentovaná DNA v bunke zostáva. Dôkaz apoptózy spočíva v detekcii chvosta kométy, ktorá sa pozoruje fluorescenčným mikroskopom<sup>5)</sup>.

Jednou z často používaných metód je metóda väzby fluorescenčného farbiva **annexínu-V** založená na premiestnení fosfatidylserínu (PS) z vnútornej vrstvy na vonkajšiu stranu plazmatickej membrány, kde sa na PS viažu konjugáty annexínu-V, annexín-V FITC (annexín V–fluoresceín izotiokyanát). Na detekciu apoptotických buniek touto metódou sa používa prietokový cytometer alebo fluorescenčný mikroskop<sup>39)</sup>.

**Kaspázy** zohrávajú dôležitú úlohu v procese apoptózy, ktorá je indukovaná nadmernou expresiou kaspázy 3.

Medzi dôležité ciele kaspáz patria cytoplazmatické a jadrové proteíny, ako napr. keratín 18 a poly (ADP-ribózo)polymeráza (PARP). Pri použití syntetických peptidov sa kaspázy rozdeľujú na tri skupiny na základe štyroch aminokyselinových amino zakončení ich štiepaceho miesta. Kaspázy 1, 4 a 5 štiepia substráty obsahujúce sekvenciu WEXD (Trp-Glu-X-Asp), kde X je variabilné. Kaspázy 2, 3 a 7 štiepia substráty so sekvenciou DEXD (Asp-Glu-X-Asp) a kaspázy 6, 8 a 9 uprednostňujú sekvenciu LEXD (Leu-Glu-X-Asp) alebo VEXD (Val-Glu-X-Asp). Meranie kaspázovej enzýmovej aktivity s fluorometrickými a kolorimetrickými peptidovými substrátmi a detekcia kaspázového štiepenia s použitím protilátok na kaspázy umožňujú štúdium apoptických procesov<sup>39, 40)</sup>.

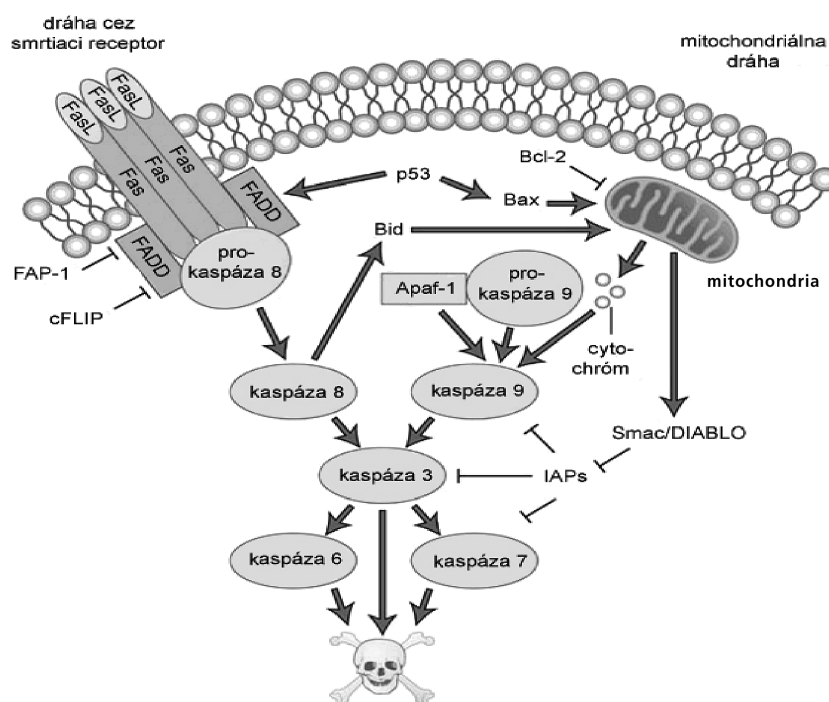
Na detekciu apoptických buniek sa často používa **TUNEL** (terminálna deoxynukleotidylová transferáza (TdT) spojená s dUTP nick koncovým značením) metóda, v ktorej sa exogénne TdT používa na katalyzovanie templátovo nezávislého pridávania bromodeoxyuridíntrifosfátov (Br-dUTP) k voľným 3' hydroxylovým koncom jedno- alebo dvojláknových DNA fragmentov, ktoré sú charakteristické pre apoptické bunky. Po inkorporácii značený bromodeoxyuridín (BrDU) môže byť identifikovaný FITC konjugovanými anti-BrDU protilátkami a analyzovaný použitím prietokového cytometra alebo fluorescenčného mikroskopu<sup>41)</sup>.

### Signálne dráhy apoptózy

Do procesu programovanej bunkovej smrti sú zahrnuté dve hlavné apoptické dráhy, vnútorná – **mitochondriálna dráha** a vonkajšia – **dráha cez smrtiaci receptor** (obr. 3).

Proces apoptózy indukovaný **spustením smrtiacich aktivátorov** (napr. FasL) viažúcimi sa na receptory (napr. Fas) na povrchu bunky je charakterizovaný aktiváciou rodiny intracelulárnych cysteínových proteáz, kaspáz<sup>43)</sup>. Táto väzba umožňuje interakciu s cytoplazmovo viazaným adaptorovým proteínom FADD a prokaspázou-8, ktorá aktivuje kaspázu 8. Aktivácia kaspázy 8, podobná kaspáze 9 vo vnútornej dráhe, označovaných ako iniciátorové kaspázy, vedie k aktivácii efektorových kaspáz, kaspázy 3 a 7, a degradačnej fáze apoptózy<sup>44)</sup>.

**Mitochondriálna apoptická dráha** je charakterizovaná ako odpoveď na rôzne formy bunkového stresu

Obr. 3. Signálne apoptické dráhy <sup>42)</sup>

(poškodenie DNA, odobratie rastových faktorov, pôsobenie cytotoxických liečiv, poruchy bunkového cyklu, pôsobenie ROS). V mitochondrii dochádza k jej permeabilizácii otvorením rôznych mitochondriálnych membránových pórov v závislosti od smrtiacich podnetov. Toto vedie k strate mitochondriálneho membránového potenciálu ( $\Delta\phi_m$ )<sup>45)</sup> a uvoľneniu cytochrómu c, faktora indukujúceho apoptózu (AIF), proteínu Smac/Diablo (druhý aktivátor kaspáz odvodený od mitochondrie/proteín s nízkym pI priamo viažúci inhibítor proteínov apoptózy), endonukleázy G, kaspázy 2 alebo kaspázy 9 z mitochondriálneho medzimembránového priestoru do cytosolu. Cytochróm c aktivuje a viaže sa s aktivačným faktorom-1 apoptózy (Apaf-1), ktorý spolu s ATP a prokaspázou-9 vytvára komplex nazývaný apoptozóm, ktorý je schopný aktivovať kaspázy 1, 2, 3, 4 a autokatalyticky aj kaspázu 9 <sup>28, 46)</sup>.

Kaspáza 8 a kaspáza 9 aktivujú kaspázu 3 proteolytickým štiepením a kaspáza 3 potom štiepi životne dôležité jadrové a cytoplazmatické proteíny alebo iné kaspázy, čo vedie k apoptóze <sup>47)</sup>.

Na regulácii apoptických dráh sa podieľajú proteíny Bcl-2 rodiny, ktoré regulujú mitochondriálnu apoptickú dráhu a to prostredníctvom antiapoptických proteínov ako napr. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w a proapoptických proteínov ako napr. Bax, Bak, Bid, Bad, Bik <sup>28, 48)</sup>. Ďalej sú to inhibítory kaspáz, predstaviteľmi ktorých sú inhibítory proteínov apoptózy (IAPs), ktoré priamo inhibujú aktivovanú kaspázu 3 a kaspázu 7 a blokujú aktiváciu kaspázy 9 <sup>49)</sup> a tumorový supresorový proteín p53, ktorý je aktivovaný rôznymi podnetmi ako napr. protinádorovými liečivami, žiarením, expresiou onkogénov, poškodením DNA alebo odobratím rastových faktorov. Proteín p53 pracuje ako kontrolný proteín pri zastavení bunkového

cyklu, oprave DNA a apoptickej bunkovej smrti. Reguluje membránovú expresiu smrtiacich receptorov ako napr. Fas a jeho priamym transkripčným cieľom je predstaviteľ Bcl-2 rodiny zvyšujúci apoptózu, proteín Bax <sup>50)</sup>. Na regulácii apoptických dráh sa podieľajú aj inhibítory aktivácie kaspáz, medzi ktoré patrí bunkový proteín inhibujúci FLICE, cFLIP. cFLIP inhibuje apoptózu cez smrtiace receptory špecifickou interakciou s FADD a prokaspázou-8. K tejto interakcii nedochádza pred spustením smrtiacich receptorov <sup>51)</sup>.

### Bunkový cyklus

Súbor špecifických procesov prebiehajúcich v bunke, ktoré vedú k rozdeleniu materskej bunky na dve geneticky identické dcérske bunky sa nazýva bunkový cyklus. Bunkový cyklus sa skladá z **interfázy**, ktorá zahŕňa G<sub>1</sub>, S (syntetická fáza) a G<sub>2</sub> fázu, a z **mitózy** (M fázy), ktorej výsledkom je karyokinéza a cytokinéza <sup>53)</sup>. Súčasťou bunkového cyklu je G<sub>0</sub> fáza, v ktorej sú bunky v stave proliferáčného pokoja. Pri nádorových bunkách je fáza G<sub>0</sub> súčasťou G<sub>1</sub> fázy <sup>1)</sup>.

Bunkový cyklus je regulovaný fosforyláciou a defosforyláciou sprostredkovanou proteínkinázami nazývanými cyklín-dependentné kinázy (Cdk), ktoré sa enzymovo aktivujú naviazaním štrukturálnych proteínov, cyklínov <sup>1)</sup>.

Bunka vstupuje do **G<sub>1</sub> fázy** bunkového cyklu fosforyláciou hlavnej brzdy bunkového cyklu, nádorového supresorového génu, proteínu Rb. Následne dochádza k uvoľneniu transkripčného faktora E2F, ktorý aktivuje syntézu cyklínu D, ktorý sa viaže a aktivuje Cdk 4 alebo Cdk 6, a cyklínu E, ktorý spolu s Cdk 2 môže pôsobiť ako



prepínač restriktčného bodu. Bunky v  $G_0$  fáze sú udržované nefosforylovaným proteínom Rb a podobnými bielkovinami p107 a p130<sup>53)</sup>.

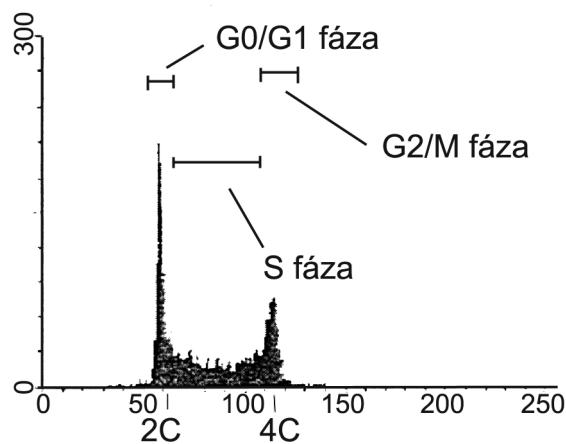
$G_1$  fáza je regulovaná okrem stimulátorov aj inhibítormi proteínkináz INK, medzi ktoré patria proteíny p15 a p16, ktoré inhibujú aktivitu Cdk partnerov cyklínu D a zabraňujú tak prechodu z  $G_1$  fázy do *S fázy* bunkového cyklu. Ďalším inhibítorom cyklín-dependentných kináz je proteín p21, ktorý môže pôsobiť počas trvania celého bunkového cyklu. Proteín p21 je pod kontrolou nádorového supresorového proteínu p53 a označuje sa ako „strážca genómu bunky“. Zabraňuje replikácii poškodenej DNA normálnymi bunkami a podporuje apoptózu. Niektoré molekuly s chybnými proteínmi p53 umožňujú bunkám prenesenie poškodenej DNA do dcérskych buniek, ktorých hromadenie môže viesť k vzniku nádoru. Viac ako 50 % ľudských nádorov má defektný gén p53. *S fáza* bunkového cyklu je regulovaná proteínkinázovou aktivitou cyklínu A spojeného s Cdk 2. V  $G_2$  fáze dominantný cyklín Cdk 1 (označovaný ako Cdc 2) nahrádza Cdk 2, viaže sa buď s cyklínom A, alebo cyklínmi typu B a katalyzuje fosforyláciu proteínov. Cyklíny typu B zostávajú aktívne počas celej *M fázy*<sup>1, 52)</sup>.

V súčasnosti je na sledovanie bunkového cyklu vysoko rozvinutá a používaná *prietoková cytometria*. Prietoková cytometria je založená na analýze a detekcii zmesi buniek na základe ich rozdielnej schopnosti viazať určité fluorescenčné farbivo alebo protilátku označenú farbivom. Medzi takéto metódy patrí meranie DNA obsahu buniek s využitím farbív viažúcich sa na DNA metódou farbenia DNA jedným farbivom ako napr. propídiu jodid, etídium bromid, Hoechst farbivá, hlavne Hoechst 33342 a Hoechst 33258, mitramycín, DAPI, chromomycín; farbenie bromodeoxyuridínom na štúdium bunkovej kinetiky a DNA plus antigén farbenie. Pomocou prietokovej cytometrie sa dá určiť percento buniek v  $G_0/G_1$ , *S* a  $G_2/M$  fáze<sup>21)</sup>.

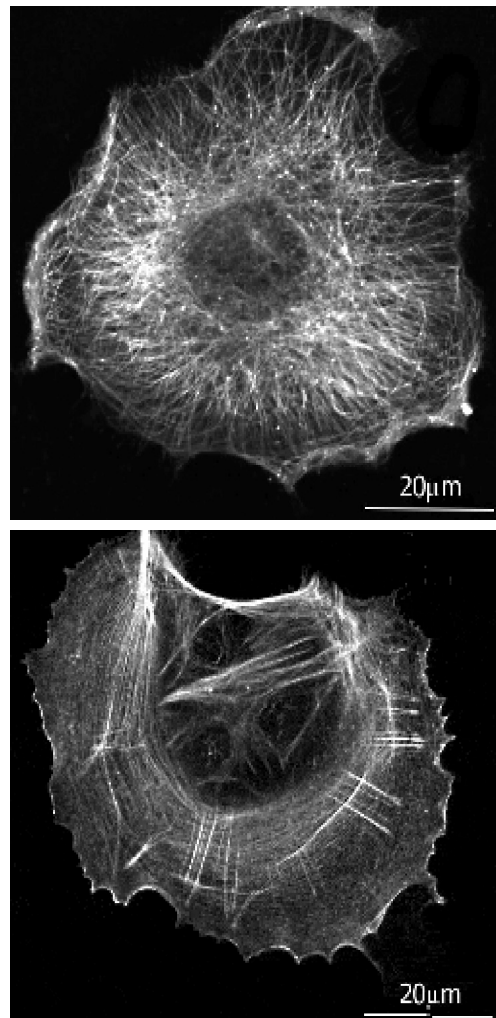
Na obrázku 4 je znázornená reprezentatívna distribúcia DNA obsahu v priebehu bunkového cyklu. V prípade normálnych diploidných buniek rastie obsah DNA (vyjadrený v intenzite fluorescencie) od hodnoty označovanej ako 2C (v  $G_0/G_1$  fáze) počas celej *S fázy*, až dosiahne hodnotu 4C, v ktorej zostáva počas  $G_2$  fázy a v mitóze. Po rozdelení pôvodnej bunky vzniknú 2 dcérske bunky, každá s DNA obsahom 2C. Každý reálny histogram DNA distribúcie vykazuje v okolí svojho maxima určitú variáciu, ktorá môže byť spôsobená rozdielmi v obsahu DNA jednotlivých buniek, procedurami farbenia a inštrumentálnymi chybami. Mierou tejto variácie je koeficient variability (CV), v kvalitných meraniach dosahujúci hodnoty menšie ako 2 %. Keďže *G* a *M* fázy bunkového cyklu majú podobný obsah DNA, jednoduchým DNA-meraním sa nerozlíšia. Tak isto je tomu u  $G_0$  a  $G_1$  fázy. Na rozlíšenie týchto fáz sa vyvinuli metódy využívajúce rôznu fluorescenciu používaného farbiva (akridínová oranž), ktoré sa viaže na dvojrefazcovú a jednorefazcovú DNA a rôznu schopnosť denaturácie DNA v mitotických a interfázových bunkách<sup>54)</sup>.

### Cytoskelet eukaryotickej bunky

Cytoskelet je vysoko dynamická štruktúra, ktorá podlieha neustálej reorganizácii počas toho, ako bunka mení svoj tvar, delí sa a reaguje na zmeny vo svojom okolí.



Obr. 4. Distribúcia bunkového cyklu (histogram populácie proliferujúcich buniek)



Obr. 5. Mikrotubulový (hore) a aktínový (dole) cytoskelet v keratocytoch, vizualizované imunofluorescenciou podľa<sup>57)</sup>

Skladá sa z troch základných typov proteínových vlákien, z mikrofilamentov – **aktínových vlákien**, **mikrotubulov** a **intermediárnych filamentov**.

Organizácia aktínového cytoskeletu zohráva kľúčovú úlohu v rôznych bunkových procesoch, vrátane delenia buniek, cytokinézy, nádorového rastu, pohybu buniek, bunkového rastu vlásoknic počas angiogenézy a v morfológických zmenách bunkového povrchu. Zmeny v štruktúre cytoskeletu môžu byť spôsobené rôznymi faktormi, medzi ktoré patrí pôsobenie xenobiotík, liečiv, oxidačný stres, žiarenie, vírusy a niektoré cytoskeletálne inhibítory schopné indukovať apoptózu alebo cytoskeletálne proteíny, ktoré sú substrátmi pre proteolytické štiepenie. Látky interferujúce buď s polymerizáciou mikrotubulov, ako napr. vinkristín a kolchicín, alebo s depolymerizáciou mikrotubulov, napr. paklitaxel, indukujú apoptózu v ovplyvnených bunkách. Proces apoptózy môže byť indukovaný narušením štruktúry a funkcie mikrotubulov. Aktínové inhibítory, napr. cytochalasíny, poškodzujú sieť mikrofilamentov v bunkách, v ktorých dochádza k apoptóze depolymerizáciou aktínových vlákien; v týchto bunkách nie je apoptóza spojená s klasickými morfológickými znakmi. Cytoskeletálne proteíny sú substrátmi pre kaspázy, ktorých činnosť môže spôsobiť kolaps štruktúry cytoskeletu v apoptických bunkách. Proteolýza fodrínu, cytoskeletálneho proteínu, oslabuje organizáciu mikrofilamentov, čo vedie k tvorbe výbežkov plazmatickej membrány<sup>55, 56</sup>).

Na štúdium zmien cytoskeletu sa používajú napr. **imunocytochemické metódy**, medzi ktoré patrí fluorescenčná mikroskopia, prietoková cytometria a imunoprecipitácia. **Fluorescenčná mikroskopia** je založená na naviazaní špecifickej protilátky na F-aktín alebo phalloidínu značených fluorescenčným farbivom (obr. 5). Phalloidín je toxín muchotrávky *Amanita phalloides*, ktorý sa konjuguje so zeleným fluorescenčným farbivom, fluoresceínom (FITC – fluoresceínizotiokyanát). Phalloidín sa používa na značenie, identifikáciu a kvantifikáciu F-aktínu fixovaného formaldehydom po následnej permeabilizácii, pretože znemožňuje depolymerizáciu a stabilizuje aktínové vlákna zodpovedné za pohyb bunky<sup>58</sup>). Prietoková cytometria sa používa na kvantifikáciu cytoskeletálnych proteínov a jej výhoda spočíva v tom, že fluorescenčné žiarenie je priamo úmerné špecifickým bunkovým zložkám, môže byť detekovaná aj nízka koncentrácia farbiva v bunke a pomocou intracelulárnych enzýmov môže dôjsť k fluorescencii aj nefluorescenčných zlúčenín. Imunoprecipitácia založená na tvorbe komplexu medzi antigénom proteínu a antigén-špecifickou monoklonálnou alebo polyklonálnou protilátkou umožňuje analýzu proteínov cytoskeletu<sup>59</sup>).

Práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky na základe Zmluvy č. APVT-20-007304 a Grantovou agentúrou VEGA SR projektom č. 1/0058/03, 1/1173/04 a 1/2448/05.

## LITERATÚRA

1. **Kaušitz, J., Altaner, Č. et al.:** In: Onkológia. Bratislava, VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 2003, s. 4-30, 83-85, 138-139.
2. **Altaner, Č.:** In: Bunková a molekulárna biológia rakoviny. Bratislava, Liga proti rakovine, 2001, s. 10-21.
3. **Weinberg, R. A.:** In: Jediná odrodilá buňka. Jak vzniká rakovina. Praha, ACADEMIA, 1998, s. 48-55.
4. **Ferenčík, M., Škárka B. et al.:** In: Biochémia. Bratislava, Slovak Academic Press, 2000, s. 410-411.
5. [http://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141\\_1488.html](http://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_1488.html)
6. **Klener, P.:** In: Protinádorová chemoterapie. Praha, Galén, 1996, s. 80-83, 94, 112, 199-201, 278-279.
7. **Fuery, C. J., Impey, H. L., Roberts, N. J. et al.:** Clin. Chem., 2000; 46, s. 620-624.
8. **Kliwer, S. A., Lehman, J., Willson, T.:** Science, 1999; 284, s. 757-760.
9. **Kolář, Z.:** <http://www.lmp.upol.cz/download/receptory.ppt>
10. **Hulín, I. et al.:** In: Patofyziológia. Bratislava, SAP, 2002, s. 108, 214-216.
11. **Kliwer, S. A., Lehmann, J. M., Milburn, M. V. et al.:** Recent Prog. Horm. Res., 1999; 54, s. 345-67.
12. **Kliwer, S. A., Xu, H. E., Lambert, M. H., Willson, T. M.:** Recent Prog. Horm. Res., 2001; 56, s. 239-263.
13. **Bozec, A., Chuzel, F., Chater, S. et al.:** J. Endocrinol., 2004; 183, s. 79-90.
14. **Alexander, B. T.:** Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2003; 285, s. R933-R934.
15. **Wolfs, T. G., de Vries, B., Walter, S. J. et al.:** Am. J. Transplant., 2005; 5, s. 68-75.
16. <http://www.clsjep.cz/Ukazclanek2.asp?clanek=14542&jazyk=>
17. **Salmon, S. E.:** Cancer Treat. Rep., 1984; 68 (1), 117-125.
18. **Ferenčík, M., Rovenský, J., Nyulassy, Š.:** Imunológia. In: Základné termíny a definície (Druhé prepracované a doplnené vydanie). Bratislava, Slovak Academic Press s.r.o., 2001, s. 26-27.
19. **Barile, F. A.:** In: Introduction to in vitro cytotoxicology. Florida, USA, Mechanisms and methods. CRC Press, Boca Raton, 1994, s. 27-45.
20. **Kandárová, H., Jantová, S., Hojerová, J.:** Čes.-slov. Derm., 2004; 79 (2), 75-83.
21. Roche Molecular Biochemicals. Apoptosis and Cell Proliferation. 2<sup>nd</sup> revised edition. s. 1-63.
22. **Denizot, F., Lang, R.:** J. Immunol. Methods., 1986; 89 (2), 271-277.
23. **Jantová, S.:** Cytotoxicita, antimikróbna aktivita a mechanizmus účinku prírodných a syntetických látok. Habilitačná práca. CHTF STU, 1999, s. 9-29.
24. **Pisha, E., Chai, H., Lee, I. S. et al.:** Nature Med., 1995; 1, 1046-1051.
25. **Vopršalová, M., Žáčková, P.:** In: Základy toxikologie pro farmaceuty. UK Praha, Nakladatelství Karolinum, 2000, s. 21-27.
26. **Horáková, K., Jantová, S.:** Biológia. Bratislava, STU, 1998, s. 170-171.
27. **Barišič, K., Petrik, J., Rumora, L.:** Acta Pharm., 2003; 53, 151 – 164.
28. **Babál, P.:** Medicínsky monitor, 2003; 1, 1-9.
29. **Babál, P., Gomez-Zapata, M., Luna, A., Garcia-Fernandez A. J.:** Toxicol. in Vitro, 2003; 17(3), 293-239.
30. **Boudreault, F., Grygorczyk, R.:** J. Microsc., 2004; 215(3), 302-312.
31. **Zink, D., Andrew, H., Fischer, A. H., Nickerson, J. A.:** Cancer, 2004; 4, 677-685.

32. **Putnam, K. P., Bombick, D. W., Doolittle, D. J.:** *Toxicol. in Vitro*, 2002; 16(5), 599-607.
33. **Albrecht, C. F., Theron, E. J., Kruger, P. B.:** *S. Afr. Med. J.*, 1995; 85(9), 853-860.
34. **Veselská, R., Zitterbart, K., Jelínková, Š. et al.:** *Oncol. Rep.*, 2003; 10, 1049-1058.
35. **Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R. et al.:** *Inter. J. Oncol.*, 2002; 21, 165-170.
36. **Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C.:** *J. Immunol. Methods*, 200; 243 (1-2), 167-190.
37. **Jantová, S.:** In: *Chémia a život okolo nás*. Bratislava, Vydavateľstvo STU, 2005, s. 108.
38. **An, W. W., Gong, X. F., Wang, M. W. et al.:** *Acta Pharmacol. Sin.*, 2004; 25 (11), 1502-1508.
39. **Borisenko, G. G., Matura, T., Liu, S. X. et al.:** 413 (1) 41-52.
40. **Dandrea, T., Hellmold, H., Jonsson, C. et al.:** *Free Radic Biol. Med.*, 2004; 36 (7), 881-896.
41. **Kim, S. D., Moon, C. K., Eun, S. Y. et al.:** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 328 (1), 326-334.
42. [www.biomedcentral.com/1534-5874/2/39/figure/F2](http://www.biomedcentral.com/1534-5874/2/39/figure/F2)
43. **Thornberry, N. A., Lazebnik, Y.:** *Science*, 1998; 281, 1312-1316.
44. **Ethell, D. W., Buhler, L. A.:** *Clin. Immunol.*, 2003; 23 (6), 439-446.
45. **Charlot, J. F., Prétet, J. L., Haughey, C., Mouglin, C.:** *Apoptosis*, 2004; 9, 333-343.
46. **Costantini, P., Jacotot, E., Decaudin, D., Kroemer, G. J.:** *Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92, 1042-1053.
47. **Cryns, V., Yuan, J.:** *Genes Dev.*, 1998; 12, 1551-1570.
48. **Hückelhoven, R.:** *Apoptosis*, 2004; 9, 299-307.
49. **Holcik, M., Korneluk, R. G.:** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001; 7, 550-556.
50. **Knudson, C. M., Johnson, G. M., Lin, Y., Korsmeyer, S. J.:** *Cancer Res.*, 2001; 61, 659-665.
51. **Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., Kirchhoff, S.:** *Mol. Cell Biol.*, 2001; 21 (24), 8247-8254.
52. **Alberts, B., Bray, D., Johnson, A. et al.:** In: *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem, Espero Publishing, 1998, s. 547-590.
53. **Nead, M. A., Baglia, L. A., Antinore, M. J. et al.:** *EMBO J.*, 1998; 17, 2342-2352.
54. **Juan, G., Darzynkiewicz, Z.:** In: *Cell Biology (Celis, J. E., ed.) Academic Press*, 1998, s. 261-274.
55. **Ojo-Amaize, E. A., Nchekwube, E. J., Cottam, H. B. et al.:** *Cancer Res.*, 2002; 62, 4007-4014.
56. **Gunaratnam, M., Grant, M. H.:** *Toxicol. in Vitro*, 2004; 18 (3), 245-253.
57. [http://helios.mol.uj.edu.pl/conf\\_c/chapters/chap\\_6.htm](http://helios.mol.uj.edu.pl/conf_c/chapters/chap_6.htm)
58. **Steinmetz, M. O., Stoffler, D., Müller, S. A. et al.:** *J. Mol. Biol.*, 1998; 276, 1-6.
59. **Wary, K. K., Maniero, F., Isakoff, S. J. et al.:** *Cell*, 1996; 87 (4), 733-742.

Došlo 27. 9. 2005.

Přijato ke zveřejnění 1. 3. 2006.

Ing. Silvia Letašiová

Radlinského 9, 812 37 Bratislava, SR

e-mail: [silvia.letasiova@stuba.sk](mailto:silvia.letasiova@stuba.sk)

## NOVÉ KNIHY

### **ROTE LISTE 2006, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland.** Verlag Rote Liste Service GmGH, Frankfurt(Main, cena 75 euro.

Nové vydání katalogu podává aktuální informace o současném stavu hromadně vyráběných léčivých přípravků, které 478 výrobců dodává na trh v SRN.

Shodně s předchozím vydáním katalog uvádějí dva rejstříky: abecední seznam názvů přípravků a rejstřík léčivých látek. Jako tam i zde hlavní obsah tvoří až v dalším monograficky zpracované informace o jednotlivých HVLP v rámci 88 terapeutických skupin. Z celkového počtu 8829 HVLP katalogu ne chemicky definované připadá 7002, zatímco 797 jsou přípravky rostlinného původu, 365 jsou organopreparáty a enzymy a 674 je homeopatik.

Zajímavější pro odbornou veřejnost jsou především informace o změnách, ke kterým v novém vydání došlo. Méně důležité je zjištění, že se přestaly vyrábět přípravky více než desítky vývojově překonaných, tedy obsoletních léčiv. Zajímavější budou informace o přípravcích do terapie zaváděných nových léčiv, jelikož ty se pravděpodobně v krátké době objeví i u nás. Je jich zhruba na dvě desítky. Jsou to například psychoanaleptikum atomoxetin (STRATTERA), antiepileptikum zonisamid (ZONEGRAN), dvě antiparkinsonika, tj. rasagilin (AZILECT)

jako inhibitor MAO-B a tolkapon (TASMAR) jako inhibitor COMT, anticholinergikum darifenacin (EMSELEX) nebo z koronárních terapeutik ivabradin (PROCORALAN).

Z dalších jsou to ještě dva glukokortikoidy, tj. ciklesinid (ALVESCO) jako antiastmatikum a loteprednol (LOTEMYX) jako oftalmologické antiflogistikum, z antagonistů aldosteronu eplerenon (INSPIRA) a z antiagregancií anagrelid (XAGRID), který je již u nás jako THROMBOREDUCTIN. V terapii poruch vápníkového hospodářství se nově uplatňují z analogů vitamínu D parakalcitol (ZEMPLAR) a u osteoporóz distroncium-ranelát (PROTELOS). Z antineoplastik jsou novými erlotinib (TARCEVA) pro terapii metastáz plicních nádorů a monoklonální protilátka bevacizumab (AVASTIN) pro nádory střevního traktu. Ze skupiny orfan drugs jsou novými nitisinon (ORFADIN), inhibitor 4-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasy jako léčivo hereditární tyrosinémie a kyselina karglumová (CARBAGLU), která se podává u hyperamonémií z nedostatku N-acetylglutamát-syntasy.

Pro uživatele s příslušným technickým vybavením je katalog k dispozici i v různých elektronických verzích (ROTE LISTE POCKET PC, ROTE LISTE WIN CD, ROTE LISTE PALM OS).

A. Borovanský