

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**STUDIUM ANTIPROLIFERAČNÍCH VLASTNOSTÍ
SÉRIE NOVÝCH AROYLHYDRAZONOVÝCH
CHELÁTORŮ IONTŮ ŽELEZA**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Eliska Macková

Hradec Králové 2013

Lucie Kolbabová, DiS.

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. PharmDr. Tomášovi Šimůnkovi, Ph.D. za věnovaný čas, připomínkování a poskytnutí cenných rad při tvorbě této diplomové práce. Děkuji také Mgr. Elišce Mackové za odborné vedení a spolupráci v experimentální části práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Hruškové, MUDr., Bc. Ondřeji Vítovi, Ing. Pavlovi Gruberovi, PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. a PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. za odbornou pomoc a cenné rady. V neposlední řadě mé poděkování patří také Grantové agentuře Univerzity Karlovy za finanční podporu (grant GA UK 299511C/2011) a Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za vytvoření vhodných pracovních podmínek a příjemného pracovního prostředí.

Hradec Králové 2013

Lucie Kolbabová, DiS.

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

Hradec Králové 2013

Lucie Kolbabová, DiS.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Lucie Kolbabová, DiS.

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

Název diplomové práce: Studium antiproliferačních vlastností série nových aroylhydrazonových chelátorů iontů železa

Aroylhydrazony jsou tridentální lipofilní chelátory železa s dobrou prostupností do buněk. V posledních desetiletích byla prokázána mimo jiné také výrazná antiproliferativní aktivita některých látek této skupiny. Významným zástupcem aroylhydrazonů je perorálně účinný chelátor salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH), který v předešlých experimentech realizovaných na našem pracovišti prokázal výraznou antiproliferativní aktivitu a schopnost chránit buňky před poškozením oxidačním stresem. Jeho hlavní nevýhodou je však nízká stabilita, daná rychlou hydrolýzou hydrazonové vazby ve vodném prostředí. Z tohoto důvodu byla v minulých letech na KAOCH FaF UK navržena a syntetizována analoga SIH, odvozená od aromatických ketonů, která prokázala signifikantně vyšší stabilitu v králičí plazmě v porovnání s parentní látkou.

Cílem této studie je navázat na předchozí experimenty a zaměřit se na další strukturní modifikace mateřské látky SIH s jejich dopadem na antiproliferativní účinnost. Tato práce byla prováděna na buněčné linii prsního adenokarcinomu MCF-7, proliferativní testy probíhaly po dobu 72 hodin, kdy byly buňky vystaveny účinkům pozorovaných látek a vyhodnoceny metodou vychytávání neutrální červeně.

Výsledky těchto pokusů ukázaly u všech studovaných aroylhydrazonových derivátů statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace, ovšem u některých látek až ve velmi vysokých koncentracích. Pět z devíti látek prokázalo zvýšení antiproliferativní aktivity ve srovnání s mateřskou látkou SIH. Redukce hydrazonové vazby vedla k výraznému snížení účinnosti, zatímco bromace aromatického kruhu v ketonové části neměla na antiproliferativní účinnost zásadní vliv. Rozvětvení alkylového řetězce na hydrazonovém uhlíku vedlo v jednom případě ke zvýšení, ve druhém ke snížení účinku.

Získané hodnoty IC_{50} byly dále porovnány s daty toxicitní studie na linii neonatálních potkaních kardiomyocitů H9c2. U pěti z devíti látek došlo v porovnání se SIH k několikanásobnému zvýšení selektivní toxicity vůči nádorovým buňkám oproti nenádorovým.

Abstract

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

Candidate: Lucie Kolbabová

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

Title of diploma thesis: Study of the antiproliferative properties of the series of novel aroylhydrazone iron chelators

Aroylhydrazones are tridental lipophilic iron chelators with good cell-membrane permeability. In the last decades some compounds of this chemical group have been demonstrated to have a significant antiproliferative activity. Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH), an aroylhydrazone with an oral availability, showed a significant antiproliferative activity in previous experiments in our laboratory as well as the ability to protect cells from the oxidative stress-induced damage. The main disadvantage of SIH is low stability caused by rapid hydrolysis of the hydrazone bond in aqueous environment. To deal with this issue, the Department of Organic and Inorganic Chemistry of the Faculty of Pharmacy (Charles University) designed and synthesized analogues of SIH, derived from aromatic ketones, which showed significantly improved stability in rabbit plasma in comparison with the parent SIH.

The aim of this study is to expand the previous experiments and it is focused on further structure modifications of the parent compound of SIH and their influence on the antiproliferative activity. This study was conducted on breast carcinoma cell line MCF-7. The proliferation of the cells was evaluated after 72 hours of exposure to the tested compounds and was determined by the method of neutral red uptake assay.

The results of this experiment showed a statistically significant and dose-dependent decrease of cellular proliferation for all of the tested aroylhydrazone derivatives, although in some of the compounds only in very high concentrations. Five of nine compounds showed a significant increase of antiproliferative activity in comparison to the parent SIH. Reduction of the hydrazone bond led to the significant loss of activity, whereas the bromination of the aromatic ring in the ketone part of the molecule had no significant influence. The branching on the hydrazone carbon led to increased activity in one case but to decreased activity in another.

Obtained IC₅₀ values were further compared to the toxicity data for neonatal rat cardiomyocyte cell line H9c2. Five of nine compounds exerted improved selectivity for carcinoma cells vs. non-carcinoma cells in comparison with the parent chelator SIH.

Obsah

1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Současný stav řešené problematiky	10
2.1.1 Železo	10
2.1.1.1 Absorpce.....	11
2.1.1.1.1 Mechanismus absorpce.....	11
2.1.1.1.2 Regulace absorpce.....	11
2.1.1.2 Distribuce	12
2.1.1.3 Metabolismus železa	12
2.1.1.3.1 Vstup do buňky.....	12
2.1.1.3.2 Skladování	13
2.1.1.3.3 Regulace	14
2.1.1.4 Vylučování	14
2.1.2 Železo a nádorová buňka	16
2.1.2.1 Angiogeneze	16
2.1.2.2 Metastázy.....	16
2.1.2.3 Makrofágy	17
2.1.3 Chelátory železa	18
2.1.3.1 Regulační proteiny ovlivněné chelatací železa	18
2.1.3.1.1 Cykliny a cyklindependentní kinázy.....	18
2.1.3.1.2 pRb.....	19
2.1.3.1.3 p53.....	19
2.1.3.1.4 p21CIP1/ WAF1	20
2.1.3.1.5 HIF1	20
2.1.3.1.6 NDRG1	21
2.1.3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti chelátorů.....	21
2.1.3.2.1 Lipofilita	21
2.1.3.2.2 Redoxní vlastnosti chelátorů železa	21
2.1.3.3 Přírodní chelátory železa	22
2.1.3.3.1 Siderofory	22
2.1.3.3.1.1 Desferrioxamin	22
2.1.3.3.1.2 Desferrithiocin	23
2.1.3.3.1.3 Desferriexocheliny.....	23
2.1.3.4 Syntetické chelátory železa	24
2.1.3.4.1 Tachpyridin.....	24
2.1.3.4.2 Desferasirox (ICL670A)	24
2.1.3.4.3 Thiosemikarbazony.....	24
2.1.3.4.3.1 Triapin	25
2.1.3.4.4 Aroylhydrazony.....	25
2.1.3.4.4.1 Série 100	25
2.1.3.4.4.2 Série 200	26
2.1.3.4.4.2.1 Metyl a etyl ketonová analoga SIH	26
2.1.3.4.4.3 Série 300	27
2.1.3.4.4.4 PCIH a jeho analoga	27
2.1.3.4.4.5 PKIH a jeho analoga	27
2.1.3.4.5 Hybridní chelátory získané kombinací thiosemikarbazonů a aroylhydrazonů	27
2.1.3.4.5.1 Hybridní chelátory řady NT.....	27
2.1.3.4.5.2 Hybridní chelátory řady DpT	28
2.1.3.4.5.3 Hybridní chelátory řady BpT	28
3 Cíle práce	29

4 Metodika	30
4.1 Materiál	31
4.1.1 Buněčná linie.....	31
4.1.2 Reagencie a chemikálie	31
4.1.3 Použité substance.....	32
4.1.4 Přístrojové a laboratorní vybavení.....	34
4.1.4.1 Zařízení pro kultivaci a sterilní práci s buněčnou linií	34
4.1.4.2 Čtečka 96-jamkových mikrotitračních destiček	34
4.1.4.3 Invertovaný epifluorescenční mikroskop	34
4.1.4.4 Ostatní laboratorní vybavení	35
4.2 Pracovní postupy	36
4.2.1 Kultivace	36
4.2.2 Pasážování.....	36
4.2.3 Počítání buněk	37
4.2.4 Studium antiproliferativních vlastností látek	38
4.2.4.1 Nasazování buněk na pokus	38
4.2.4.2 Roztoky studovaných látek aplikované před inkubací	38
4.2.4.3 Zásobní roztoky	39
4.2.5 Vyhodnocení	39
4.2.5.1 Stanovení životaschopnosti buněk.....	39
4.2.5.2 Roztoky potřebné k vyhodnocení	40
4.2.6 Obrazová dokumentace	41
4.2.6.1 Studium antiproliferativních účinků vybraných chelátorů železa.....	41
4.2.6.1.1 Příprava buněk na fotografování.....	41
4.2.7 Statistické zpracování dat.....	42
5 Výsledky.....	43
5.1 Studium antiproliferativních účinků studovaných látek.....	44
5.1.1 Studium antiproliferativních účinků modelového chelátoru železa SIH	44
5.1.2 Studium antiproliferativních účinků rSIH	45
5.1.3 Studium antiproliferativních účinků rHAPI	46
5.1.4 Studium antiproliferativních účinků rHPPI.....	47
5.1.5 Studium antiproliferativních účinků bHAPI.....	48
5.1.6 Studium antiproliferativních účinků bHPPI	49
5.1.7 Studium antiproliferativních účinků 2API	50
5.1.8 Studium antiproliferativních účinků 7HII.....	51
5.1.9 Studium antiproliferativních účinků H16.....	52
5.1.10 Studium antiproliferativních účinků H18	53
5.2 Obrazová dokumentace.....	54
5.2.1 Studium buněčné morfologie.....	54
6 Diskuse.....	55
7 Závěry	66
8 Seznam zkratk.....	67
9 Seznam citované literatury.....	69

1 Úvod

Tato diplomová práce je součástí výzkumu v rámci projektu 299511 C/2011 Grantové agentury Univerzity Karlovy: „Syntéza a studium antiproliferačních účinků nových aroylhydrazonových chelátorů železa“. Cílem práce je prověřit možnost využití nových aroylhydrazonových chelátorů železa, syntetizovaných v rámci výše uvedeného projektu, v terapii rakoviny prsu v podmínkách *in vitro* na standardizované buněčné linii lidského prsního adenokarcinomu (MCF-7).

2 Teoretická část

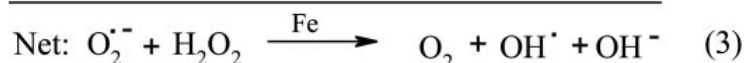
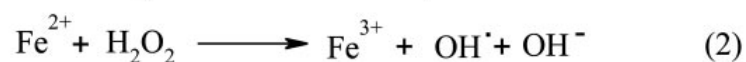
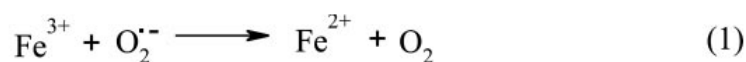
2.1 Současný stav řešené problematiky

2.1.1 Železo

Železo hraje důležitou roli v řadě fyziologických procesů. Tento přechodný prvek je kofaktorem enzymů významných biochemických drah. Jako součást cytochromů se účastní energetického metabolismu a buněčného dýchání, podílí se na syntéze DNA a je složkou transportních proteinů kyslíku (např. hemoglobin, myoglobin) [1]. Jeho katalytická účinnost spočívá v redoxní aktivitě s možností přecházet mezi dvojmocnou (Fe^{2+}) a trojmocnou (Fe^{3+}) formou [2].

Přestože je železo pro fungování organismu nezbytné, nadbytek jeho volných iontů má vlivem téže redoxní aktivity patologické důsledky [3]. Vede k poškození buněčných struktur reaktivními formami kyslíku (ROS), vznikajícími v průběhu Haber-Weissovy a Fentonovy reakce (*Obr. 2.1*), v nichž působí jako katalyzátor [2,4].

Vzniklé ROS se účastní peroxidace lipidů buněčných membrán, což může způsobit jejich destabilizaci, uvolnění obsahu organel do cytosolu a může vést až k nekróze buňky. Peroxidace lipidů navíc vede ke vzniku mutagenního faktoru malondialdehydu (MDA), který reaguje s molekulami DNA a způsobuje jejich poškození. Spolu s řadou genetických predispozičních faktorů má železo také svůj podíl na vzniku a progresi nádorových onemocnění [4]. Z těchto důvodů musí být hladina železa pečlivě regulována na úrovni absorpce, transportu i skladování. Udržování homeostázy tohoto prvku je dosaženo regulačními proteiny [5].



Obr. 2.1: Reakce katalyzované železem (převzato z publikace Kalinowski Richardson 2005). (1) Redukce železa superoxidovým radikálem, (2) Fentonova reakce, (3) Haber-Weissova reakce.

2.1.1.1 Absorpce

Železo je z potravy absorbováno pouze v malém množství, ale příjem a jeho regulace má zásadní význam, protože neexistuje fyziologická cesta exkrece [1].

2.1.1.1.1 Mechanismus absorpce

Vstřebávání železa se odehrává v buňkách střevního epitelu, v enterocytech. Přes cytoplazmatickou membránu těchto buněk může být přenášeno ve dvou formách, a to jako železo hemové nebo nehemové, přičemž první jmenované je absorbováno efektivněji [6].

Nehemová forma je transportována do enterocytu přenašečem bivalentních kovů-1 (divalent metal transporter; DTM-1) [2]. Tímto transportním mechanismem však může být přenesena pouze rozpustná forma Fe^{2+} .

Většina nehemového železa se však v potravě nachází v nerozpustné formě Fe^{3+} , ve které je součástí železitých komplexů. Proto absorpci předchází redukce železitých iontů, prostřednictvím duodenálního cytochromu b (Dcytb) [5]. Jedná se o enzym s reduktázovou aktivitou lokalizovaný v apikální části enterocytální membrány [3].

Hemová forma je vysoce biologicky dostupným zdrojem železa. Vstřebává se jako součást intaktního metaloporfyrinu, který je absorbován odlišnou cestou, než je tomu v případě nehemového železa. Absorpce je uskutečněna pomocí proteinu přenášející hem-1 (haem carrier protein-1; HCP-1) [5]. V endoplazmatickém retikulu (EPR) enterocytu se železo uvolňuje z protoporfirinového kruhu prostřednictvím hem-oxygenázy-1 (HO-1) a v cytosolu se připojuje k zásobám volného železa [7].

Železo je transportováno přes bazolaterální membránu enterocytu do oběhu ferroportinem-1 (FPN1) a oxidováno ferroxidázou hephaestinem, k tomu, aby mohlo být navázáno na transferin (Tf) ve formě Fe^{3+} [5].

2.1.1.1.2 Regulace absorpce

Klíčovou roli v homeostáze železa hraje hepcidin. Jedná se o hormon peptidové povahy produkovaný hepatocyty, který negativně reguluje vstřebávání železa ze střeva, transplacentární přenos mezi matkou a plodem, a zabraňuje uvolňování železa z jater a makrofágů [8].

Pokud organismu hrozí intoxikace železem, je hepcidin intenzivně syntetizován. Po uvolnění z jater putuje k bazolaterální části membrány enterocyty, kde jeho vlivem dochází k internalizaci a rozložení FPN1 [9]. Tímto způsobem zabraňuje uvolnění absorbovaného železa z enterocyty do krevního oběhu [5].

2.1.1.2 Distribuce

Distribuci železa v organismu zajišťuje transferin (Tf). Jedná se o transportní glykoprotein patřící spolu s laktoferinem, ovotransferinem a melanotransferinem do významné rodiny proteinů, které váží železo. V séru vytváří železo ve formě Fe^{3+} vazbu s apoTf za vzniku holoTf [6]. Každá molekula apoTf vždy váže s velmi vysokou afinitou dva atomy Fe^{3+} . HoloTf následně snadno tvoří vazbu s transferinovým receptorem-1 (TfR1) [10].

2.1.1.3 Metabolismus železa

2.1.1.3.1 Vstup do buňky

Tf vstupuje do buňky pomocí TfR1. Jedná se o homodimer lokalizovaný na povrchu buňky. Každý monomer má jedno vazebné místo, tudíž dimer je schopen vázat dvě molekuly Tf najednou [2]. V prostředí fyziologického pH na vnější straně buněčné membrány, je afinita Tf k TfR1 velmi vysoká a snadno dochází k tvorbě vazby za vzniku Tf/TfR1 komplexu [10]. Tento komplex se dostává do intracelulárního prostoru receptorem zprostředkovanou endocytózou. V endozomu se v kyselém pH, vytvořeném pravděpodobně ATP-dependentní protonovou pumpou, železo uvolňuje z vazby na Tf [10] a je následně transportováno přenašečem DMT1 přes membránu endozomu do cytosolu [2,11]. Protože Tf váže Fe^{3+} a transportér DMT1 je schopen přenést pouze formu Fe^{2+} , musí být železo před uvolněním z endozomu redukováno. Tuto redukci pravděpodobně zajišťuje epiteliální antigen prostaty 3 (6-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3; STEAP 3) [4].

Po uvolnění železa putuje apoTf/TfR1 komplex zpět k cytoplazmatické membráně, kde se vlivem neutrálního pH na povrchu rozpadá a jednotlivé složky mohou být použity v dalším cyklu [10].

TfR1 zprostředkovaná endocytóza je hlavní cestou transportu železa do buňky. Řada studií poukazuje na existenci dalších mechanismů, jako je transport transferinovým receptorem-2 (TfR2), který vytváří vazbu s Tf stejně jako TfR1 v závislosti na pH prostředí, ale s přibližně 25x nižší afinitou [10], mechanismus spojený s pinocytózou a další Tf-nezávislé mechanismy [4].

Regulace TfR1 je zajišťována na úrovni translace mRNA za účasti regulačních proteinů (iron-regulatory proteins, IPR) [12], na rozdíl od toho TfR2 regulaci touto cestou nepodléhá [13].

2.1.1.3.2 Skladování

V cytosolu se železo stává součástí tzv. reaktivního poolu (labile iron pool, LIP). LIP je definován jako rezerva slabě vázaného železa [11]. Zde se s největší pravděpodobností vyskytuje jako součást nízkomolekulárních sloučenin a vysokomolekulárních meziproduktů. Přestože původ substituentů stále není plně prozkoumán, předpokládá se, že je zde vázáno na aminokyseliny, nukleotidy a sacharidy [14].

Buňka obsahuje pouze malá množství volného železa v LIP, což naznačuje, že LIP musí existovat ve velmi nízkých koncentracích (3-5%) [15] nebo nemusí být přítomen vůbec [16,17]. Pokud se toto množství zvýší, vzrůstá pravděpodobnost tvorby volných radikálů [18].

Část železa v LIP, je převáděna do specifických kompartmentů, kde je využívána k zajištění buněčného metabolismu [19]. Zbylá část je vychytávána feritinem. Tento skladovací protein je tvořen lehkou (light; L) a těžkou (heavy; H) podjednotkou a má schopnost pevně vázat cca 4500 atomů železa v oxidované formě [20]. K přeměně rozpustných Fe^{2+} iontů na ionty Fe^{3+} dochází vlivem H podjednotky, která má ferroxidázovou aktivitu [3]. Degradací feritinu se uvolněné ionty zpětně redukuje na Fe^{2+} [21].

Skladování železa ve feritinu má rozhodující význam pro ochranu buňky před vznikem oxidačního poškození. Syntéza této bílkoviny je zvýšena při nadbytku železa v buňce, při snížené dostupnosti naopak klesá [22]. Je regulována na úrovni translace mRNA za pomoci IRP [23].

2.1.1.3.3 Regulace

Řada hlavních bílkovin zajišťujících homeostázu železa (FPN1, TfR1 a ferritin) je regulována na post-transkripční úrovni za účasti IRP. Tyto proteiny jsou vázány na prvky (iron-responsive elements, IRE) v nepřekládaných oblastech mRNA regulovaných bílkovin [24,25].

Vazba IRP1 a IRP2 na IRE je řízena intracelulární hladinou železa odlišnými mechanismy [6].

IRP1 má duální charakter. Vykazuje dvě funkce, jež se vzájemně vylučují v závislosti na intracelulární hladině železa. Pokud je hladina železa nízká, IRP1 se váže na IRE s velmi vysokou afinitou [6]. Pokud naopak hladina železa vzroste, IRP1 se váže na skupinu [4Fe-4S], která znemožňuje vazbu na IRE, a IRP1 tak získává akonitázovou aktivitu [26]. Železem nasycená forma IRP1 je cytosolovou izoformou mitochondriální akonitázy [6].

IRP2 je regulován především vlastní degradací [6]. V buňce, která má nedostatek železa, se IRP2 hromadí, zatímco v případě zvýšené hladiny železa je degradován cestou proteazomu [26]. Narozdíl od IRP1 neváže skupinu [4Fe-4S] a tudíž nevykazuje akonitázovou aktivitu [6].

Nepřekládaná oblast mRNA pro FPN1 obsahuje pouze jeden IRE. V případě nedostatku železa dochází vazbou IRP na IRE ke sterickému bránění interakce s ribozomem, a tím k potlačení syntézy FPN1. Buňka tak brání uvolňování železa do krevního oběhu [25].

Regulace syntézy ferritinu probíhá obdobným způsobem. Každý řetězec (L i H) mají po jednom IRE. Vazba IRP na IRE zabraňuje ukládání železa.

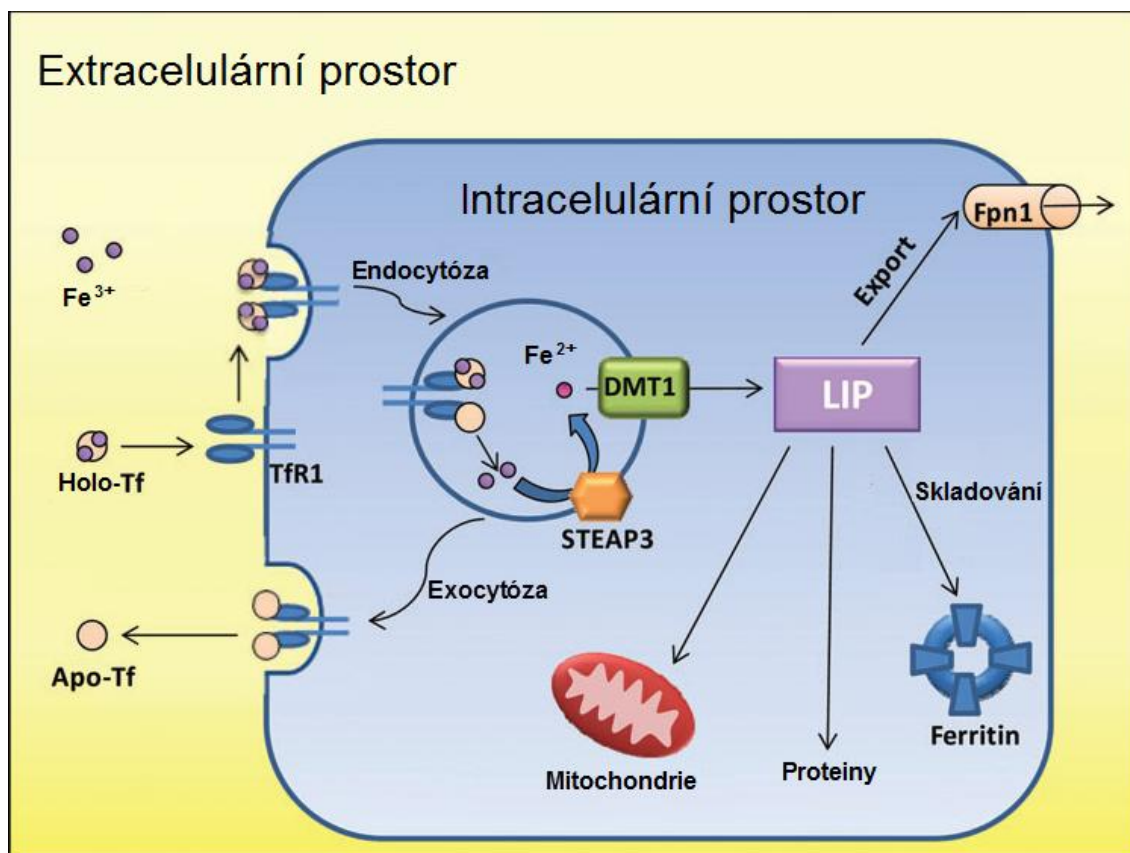
Na rozdíl od předcházejících, mRNA pro TfR1 obsahuje pět IRE. Vazbou IRP na IRE se v tomto případě zajistí vyšší stabilita mRNA, čímž dochází k usnadnění syntézy TfR1. Pro vazbu ribozomu stačí pouze tři navázané IRP [26].

2.1.1.4 Vylučování

Lidský organismus není vybaven schopností exkrece železa v pravém slova smyslu. Jednou z mála možností je jeho vylučování žlučí, jak ve formě volné, tak i vázané (ferritin a Tf). Do žluče se železo dostává z lysozomů hepatocytů [27].

Další možností exkrece je deskvamace buněk, zejména v gastrointestinálním traktu a v neposlední řadě fyziologické krvácení u žen - menstruace [28].

INTRACELULÁRNÍ METABOLISMUS ŽELEZA



Obr. 2.2: Intracelulární metabolismus železa (převzato z publikace Kalinowski, Richardson 2013). Tf obsahující železo vstupuje do buňky prostřednictvím Tfr1 (receptorem zprostředkovaná endocytóza). Snížením pH v endozomu se železo uvolní z Tf a je přenášeno pomocí DMT1 do cytosolu. Zde se stává součástí LIP. Tf je exocytózou vyloučen z buňky. Železo z LIP může být využito k metabolickým funkcím nebo se ukládá ve feritinu. Pomocí hladiny železa v LIP je regulována aktivita IRP1 a IRP2.

2.1.2 Železo a nádorová buňka

Nádorové buňky mají v porovnání se zdravými somatickými buňkami mnohem vyšší nároky na příjem železa z důvodu extrémně rychlé proliferace. Proto se u těchto buněk objevuje řada změn metabolismu železa [29].

Viditelný rozdíl se nachází ve zvýšení exprese TfR na buněčném povrchu [30]. Některé nádorové linie (např. MCF-7) dokonce samy vytvářejí proteiny imunologicky odpovídající Tf. Tvorba těchto proteinů je v případě MCF-7 navíc zesílena 17 β -estradiolem [31], přičemž tento hormon také indukuje syntézu proteinu podobného TfR1 [32]. U celé řady neoplastických buněk bylo zjištěno zvýšení exprese epiteliálního antigenu prostaty STEAP, zatímco v buňkách normální zdravé tkáně je vyjádřen pouze omezeně [4].

Železo je také využíváno ke stabilizaci tyrozylového radikálu na R2 podjednotce ribonukleotid reduktázy (RR). Jedná se o enzym katalyzující konverzi ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy a tím o klíčový protein pro syntézu DNA. Množství RR je v buňkách neoplastické tkáně zvýšeno. Při deprivaci železa dochází k inaktivaci RR, což vede k zastavení buněčného cyklu mezi G1/S fázemi [30]. Také syntéza skladovacího proteinu feritinu je u rakovinných buněk zvýšena [33], což se opět podílí na stimulaci buněčné proliferace [29].

2.1.2.1 Angiogeneze

Buněčná proliferace není možná bez dostatečného přísunu živin a kyslíku. Rychlý růst nádoru vede k nedostatečnému zásobení všech buněk tumoru těmito látkami, což vede k hypoxii. Nádorové buňky mají schopnost hypoxii detekovat, na čemž se z části podílí transkripční faktor aktivovaný hypoxií (hypoxia-inducible factor-1, HIF1) který dává signál k tvorbě nových cév (angiogenezi) [29]. Více o HIF1 viz kapitola 2.1.3.1.5.

2.1.2.2 Metastázy

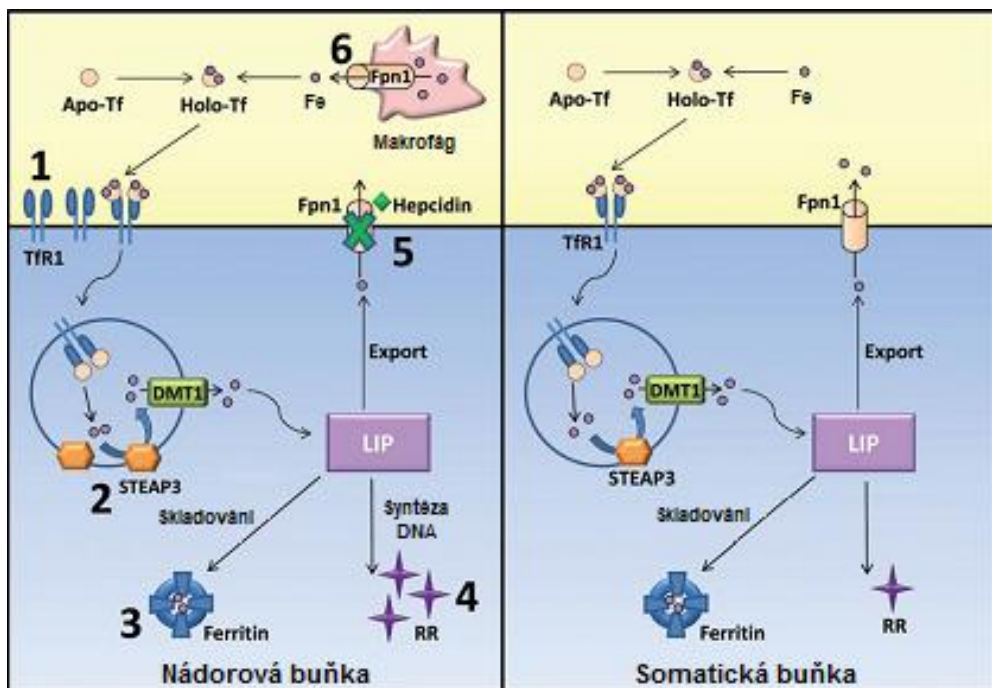
Po několikastupňové nádorové transformaci mohou nádorové buňky získat schopnost pronikat do krevního nebo lymfatického oběhu a tvořit sekundární ložiska -metastázy. Hlavním určujícím faktorem pro jejich tvorbu je schopnost jednotlivých buněk oddělit se a samostatně přežít. Tyto buňky spouští v příslušné tkáni specifické

signalizační kaskády, které umožňují vznik sekundárního ložiska. Metastázy zůstávají příčinou přibližně 90% úmrtí na rakovinu [29].

2.1.2.3 Makrofágy

Tumory tvoří nejen neoplastické buňky, ale také nenádorové stromální buňky mezi které se řadí nádorem-ovlivněné makrofágy (tumour-associated macrophages, TAMs). Obecně hrají makrofágy nezastupitelnou úlohu v homeostáze železa zajišťováním jeho recyklace z hemu. V případě TAMs jsou pozměněny funkce související se vstřebáváním a uvolňováním železa, což v důsledku vede ke zvýšenému zásobení neoplastických buněk tímto prvkem [4]. Bylo prokázáno, že se TAMs podílí nejen na buněčné proliferaci, ale také podporují angiogenezi a tvorbu metastáz [34].

ZMĚNY V METABOLIZMU NÁDOROVÉ BUŇKY



Obr.2.3: Schematické znázornění změn metabolismu železa u nádorové buňky v porovnání se somatickou buňkou (převzato z publikace Richardson Kalinowski 2013). U nádorových buněk byly pozorovány změny v expresi proteinů zajišťujících homeostázu železa. Tyto změny zahrnují (1) zvýšení exprese TfR1 a (2) epiteliálního antigenu prostaty STEAP 3, (3) zvýšení syntézy feritinu, (4) zvýšení exprese RR, (5) snížení exprese FPN1 a zvýšení hladiny hepcidinu a (6) přítomnost nádorem ovlivněných makrofágů (TAMs), které zajišťují zvýšené zásobování buněk železem. V konečném důsledku zajišťují tyto změny nádorovým buňkám dostatečné množství železa potřebného k jejich nekontrolovatelnému růstu.

2.1.3 Chelátory železa

Chelátory železa jsou látky, jejichž molekuly obsahují atomy kyslíku, dusíku popř. síry. Tyto strukturní složky jsou donory volných elektronových párů, které s kationty železa tvoří koordinační vazby [35] a omezují tak jeho dostupnost pro buněčný metabolismus [30].

Ideální chelátor by měl mít k iontům železa vysokou afinitu a vytvářet s nimi stabilní komplexy. Měl by snadno procházet biologickými membránami a mít dobrou biologickou dostupnost [36].

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.2, rychle se dělící nádorové buňky mají v porovnání se somatickými buňkami zvýšené požadavky na železo, díky čemuž jsou mnohem náchylnější k jeho depleci. Z tohoto důvodu představují chelátory železa novou potenciální skupinu v protinádorové terapii [29].

Antiproliferativní účinnost chelátorů železa byla původně přičítána inhibici RR, která hraje klíčovou roli v buněčné proliferaci [35]. Nyní je prokázáno, že jejich účinky dochází i k ovlivnění řady dalších molekul, které mají zásadní význam pro průběh buněčného cyklu (viz. kapitola 2.1.3.1) [37]. Studie chelátorů také prokázaly jejich schopnost indukovat apoptózu buněk prostřednictvím vnitřní (mitochondriální) dráhy [37].

2.1.3.1 Regulační proteiny ovlivněné chelatací železa

Jedná se o skupinu genů a proteinů, které jsou regulovány množstvím intracelulárního železa a jejich exprese je tak výrazně ovlivněna chelatací. Ovlivnění regulace těchto genů a proteinů má mimo jiné zásadní význam pro průběh buněčného cyklu [30,37]. Mezi hlavní skupiny těchto molekul patří cykliny, cyklindependentní kinázy (cdk) a inhibitory cdk (např. p21^{CIP1/WAF1}), tumor supresorové geny (např. p53), retinoblastomový protein (pRb) a další [37].

2.1.3.1.1 Cykliny a cyklindependentní kinázy

Tyto molekuly mají zásadní význam při regulaci průběhu buněčného cyklu. Cykliny modulují fosforylační aktivitu cdk a umožňují tak progresi buněčného cyklu

[37]. Regulační schopnosti těchto proteinů jsou přímo úměrné jejich koncentraci v buňce [38].

Studie prováděné na SK-N-MC neuroepiteliomových buňkách prokázaly, že chelátory železa výrazně redukují expresi cyklinů D1-D3. Ukázalo se, že podstata tohoto jevu souvisí s deplecí železa, která má stejný vliv i na cykliny A i B, ačkoli v daleko menší míře. Vzhledem k významu cyklinu D1 v regulaci buněčného cyklu by mohla mít jeho snížená exprese způsobená chelátory relativně velkou roli v redukcii buněčné proliferace neoplastických buněk [30].

2.1.3.1.2 pRb

Tento protein je důležitým regulátorem buněčného cyklu. Hyperfosforylovaná forma pRb, vzniká účinkem cdk a zprostředkovává přechod z G1 do S fáze. Snížení cyklinu D1 a cdk2 v důsledku chelatace železa brání fosforylaci pRb a dochází k zástavě buněčného cyklu mezi G1/S fázemi [37].

2.1.3.1.3 p53

Transkripční faktor p53 je jedním z nejznámějších a nejdůležitějších regulátorů buněčného cyklu [37]. Hraje důležitou roli v regulaci buněčné proliferace [30]. Je aktivován v reakci na buněčný stres (např. hypoxie) nebo poškození DNA, což vede k zástavě růstu, buněčného dělení, a pokud nedojde ke změně vyvolávajícího faktoru a reparaci i k apoptóze buňky [37].

Snížením hladiny železa dochází ke zvýšení exprese tohoto proteinu [39,40]. Výzkumy ukazují, že některé chelátory (např. DFO nebo NIH) takto fungují v celé řadě nádorových linií, včetně buněk prsního adenokarcinomu MCF-7 [41]. Například chelátory ze skupiny desferri-exocheinů (D-Exo) způsobují reverzibilní zástavu buněčného cyklu normálních epiteliálních buněk, ale u nádorové linie MCF-7 vedou k apoptóze [42].

Schopnost chelátorů specificky modulovat aktivitu p53 v nádorových buňkách výrazně přispívá k jejich antiproliferativní účinnosti [30].

2.1.3.1.4 p21^{CIP1/WAF1}

Stejně jako p53 je také p21^{CIP1/WAF1} ovlivňován hladinou intracelulárního železa. Tento protein je inhibítorem cdk a hraje klíčovou roli v průběhu buněčného cyklu. Jeho vazbou na cyklinE/cdk2 komplex dochází k zástavě buněčného cyklu mezi G1/S fázemi [30].

Další výzkumy ale ukazují, že je p21^{CIP1/WAF1} v nízkých hladinách nezbytný pro tvorbu komplexů cyklinD/cdk a tím k progresi buněčného cyklu. Fosforylace p21^{CIP1/WAF1} způsobuje navíc nahromadění tohoto proteinu v cytoplazmě, což vede k ochraně buňky před apoptózou [30,37].

Nedávná studie zjistila, že některé chelátory železa způsobují pokles exprese p21^{CIP1/WAF1} v závislosti na snížení hladiny železa v buňce [43]. Schopnost modulovat hladinu tohoto proteinu je dalším ukazatelem, do jaké míry mohou chelátory železa ovlivňovat buněčný cyklus [30].

2.1.3.1.5 HIF1

Transkripční faktor aktivovaný hypoxií (hypoxia-inducible factor-1; HIF1) spouští obranné mechanismy vedoucí k záchraně buňky. Tento protein tvoří dvě složky. Podjednotka β , která je lokalizována v jádře a cytosolová podjednotka α , která je regulována v závislosti na stavu hypoxie [37,29]. Za normálních fyziologických podmínek (normální saturace kyslíkem a hladina železa) je podjednotka HIF1 α přeměňována propylhydroxylázou (PH), což umožňuje její vazbu na von Hippel-Lindau protein a následnou degradaci ubikvitin ligázou [30,37].

Při hypoxii buňky nebo za podmínek snížené hladiny železa dochází k inhibici PH s následnou kumulací HIF1 α v buňce. HIF1 α je schopna translokace do jádra, kde váže podjednotku HIF1 β a společně tvoří HIF1 komplexy, které se zde hromadí. HIF1 reguluje expresi mnoha genů (včetně p53 nebo genu pro TfR1) vazbou na prvek citlivý k hypoxii (hypoxia-responsive element, HRE) [30,37,44].

Za určitých podmínek je HIF1 schopen regulovat angiogenezi a zároveň indukovat zastavení buněčného cyklu či navození apoptózy [37]. Chelátory železa prokázaly signifikantní zvýšení exprese tohoto HIF1 u nádorových buněk, čímž také ovlivňují buněčnou proliferaci a indukci buněčné smrti [30].

2.1.3.1.6 NDRG1

Metastatický supresor NDRG1 (N-myc down-stream regulated gene-1) byl nedávno popsán jako nový protein reagující na hladinu železa [30]. Studie zabývající se expresí tohoto proteinu prokázaly nízkou hladinu NDRG1 u neoplastických buněk v porovnání s buňkami okolní tkáně, navíc byla vyšší exprese často spojena se zvýšením diferenciací buněk [45].

Chelátory železa způsobují signifikantní nárůst exprese NDRG1 u buněk řady nádorových linií [46,47], což ukazuje na další možný mechanismus, kterým jsou chelátory schopny inhibovat progresi nádoru [30].

2.1.3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti chelátorů

2.1.3.2.1 Lipofilita

Vyvážené hydrofilně-lipofilní vlastnosti chelátorů železa jsou důležité pro jejich průchod buněčnou membránou. Ligandy s vyšší lipofilitou jsou snáze transportovány do buňky, čímž je zajištěn lepší přístup k intracelulárnímu železu v LIP. Ligandy schopné vstupu do buňky mohou také přímo interagovat s hydrofóbním Fe centrem RR [48]. Obecně vede vyšší lipofilita ligandů k zesílení antiproliferativní aktivity [2].

2.1.3.2.2 Redoxní vlastnosti chelátorů železa

Nejvyšší antiproliferativní účinností se vyznačují chelátory, jejichž schopnost vázat železo je navíc podpořena redoxní aktivitou (např. u Triapinu nebo některých derivátů PKIH) [49]. Tyto chelátory umožňují železu katalyzovat vznik ROS, jež vedou k poškození buněčných struktur a následně k buněčné smrti [2].

Redoxní potenciál mají ligandy se schopností vázat jak Fe^{3+} tak Fe^{2+} ionty [50,51,52]. Chelátory obsahující „lehké“ donorové atomy (např. dusík) mají nižší redoxní potenciál a umožňují redukci centrálního železa. Vznikající Fe^{2+} ionty mohou katalyzovat vznik ROS, které vedou k oxidativnímu poškození buněčných struktur a následné smrti buňky. Naproti tomu chelátory obsahující „těžké“ koordinační skupiny (např. hydroxámový kyslík) mají vysokou afinitu k Fe^{3+} a nízkou k Fe^{2+} [2].

Hexadentální chelátory plně obsazují koordinační sféru chelatovaného atomu železa, čímž brání přímému přístupu H_2O_2 nebo O_2 k tomuto atomu. Bidentální a tridentální chelátory mohou vytvářet částečně disociované komplexy, kde všechny valenční vazby iontu železa nemusí být vázány. Tyto dílčí komplexy umožňují kontakt povrchu kationtu s okolním prostředím a usnadňují tak produkci ROS [2].

2.1.3.3 Přírodní chelátory železa

2.1.3.3.1 Siderofory

Siderofory jsou přírodní ligandy produkované některými druhy mikroorganismů, které slouží k získávání železa z okolního prostředí [53]. Tento prvek je nezbytný pro bakteriální růst, ale obvykle se vyskytuje v nerozpustné formě Fe^{3+} . Proto nemůže být mikroorganismy efektivně vstřebán a využit. Siderofory byly selektivně vyvinuty k vázání železa v rozpustné formě a k umožnění jeho vstřebání coby součásti vytvořených komplexů [2].

2.1.3.3.1.1 Desferrioxamin

Desferrioxamin (DFO) je lineární hexadentální chelátor produkovaný *Streptomyces pilosus* [2]. Obsahuje tři funkční skupiny kyseliny hydroxámové [53], které s vysokou afinitou váží ionty železa a vytváří tak komplexy DFO-Fe v poměru 1:1. DFO je schopen vázat jak Fe^{3+} , tak Fe^{2+} [30,36,54].

V dnešní době je DFO lékem volby v terapii stavů a chorob spojené s přetížením železem, jako např. u léčby β -thalasémie [55]. Různé studie navíc prokázaly antiproliferativní aktivitu DFO proti širokému spektru nádorových buněk. Zkoumání antineoplastické účinnosti kultivací buněk s komplexem DFO-Fe neprokázala žádné zpomalení růstu buněk, což vypovídá o roli železa v antiproliferativní aktivitě DFO [29].

Nevýhodou DFO je jeho vysoká hydrofilita, která omezuje účinnost velmi nízkou absorpcí a krátkým biologickým poločasem [56]. Z tohoto důvodu musí být podáván kontinuální subkutánní infuzí [57].

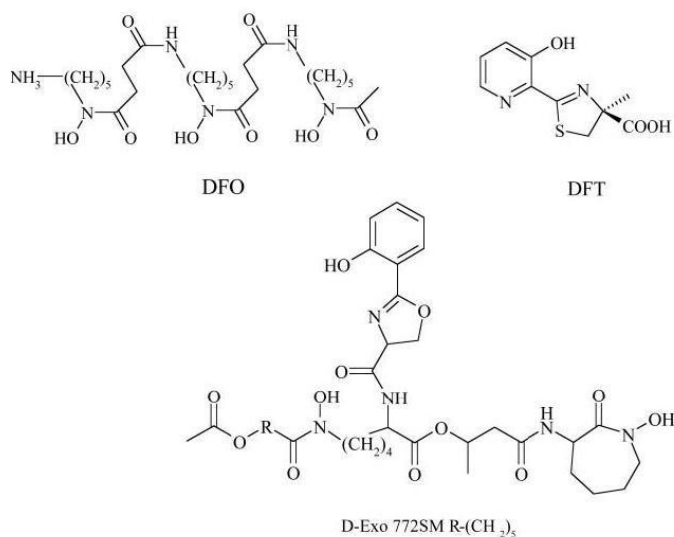
Omezení DFO vedla k vývoji hydrofobnějších chelátorů s vyšší selektivitou a silnějšími protinádorovými účinky [29].

2.1.3.3.1.2 Desferrithiocin

Desferrithiocin (DFT) je tridentální siderofor produkovaný *Streptomyces antibioticus*. S Fe^{3+} vytváří komplexy v poměru 2:1, kdy dvě molekuly DFT váží jeden atom železa. DFT je jedním z neúčinnějších perorálních sideroforů, ale *ferrithiocin* - komplex vytvořený vazbou železa, je silně nefrotoxický [55].

2.1.3.3.1.3 Desferriexocheliny

Desferriexocheliny (D-Exo) jsou skupinou hexadentálních sideroforů izolovaných z *Mycobacterium tuberculosis* [58]. Mají vyvážené hydrofilně-lipofilní vlastnosti, což umožňuje snadný průnik do intracelulárních prostor, kde tvoří vazbu s ionty železa za vzniku redoxně neaktivních komplexů [48]. *In vitro* studie s buněčnou linií prsního adenokarcinomu MCF-7 ukázaly výraznou antiproliferativní aktivitu D-exo, přičemž bylo zjištěno, že na zdravé buňky prsního epitelu tyto chelátory cytotoxicky nepůsobí [59].



Obr. 2.4: Chemické struktury sideroforů (převzato z Kalinowski Richardson 2005).

2.1.3.4 Syntetické chelátory železa

V porovnání s přírodními siderofory byly tyto chelátory železa navrženy a syntetizovány ve snaze dosáhnout co nejvýhodnějších vlastností [2].

Ligandy s potenciální antiproliferativní aktivitou se značně liší ve struktuře, stechiometrii a preferovaném oxidačním stavu (mohou přednostně vytvářet vazby s Fe^{2+} nebo Fe^{3+}) [35].

2.1.3.4.1 Tachpyridin

Tachpyridin je hexadentální chelátor, jehož výrazná antiproliferativní aktivita je dána chelatací železa a tvorbou ROS [60].

V anaerobních podmínkách vykazuje tachpyridin vyšší afinitu k iontům Fe^{2+} než k Fe^{3+} [61]. Při navázání Fe^{3+} iontů navíc dochází k jejich redukci na Fe^{2+} a oxidaci ligandu, což je důležitým krokem na cestě k tvorbě volných radikálů přes Haber-Weissovu reakci. Tachpyridin také inhibuje syntézu feritinu a jeho cytotoxické účinky jsou dále podpořeny schopností vázat i ionty jiných kovů, jako např. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} a Zn^{2+} [29].

2.1.3.4.2 Desferasirox (ICL670A)

ICL670A je perorálně aktivní tridentální chelátor železa, který selektivně váže zejména ionty Fe^{3+} , dále také Fe^{2+} , Cu^{2+} a Zn^{2+} [62].

V porovnání s jinými chelátory železa má relativně nízkou antiproliferativní účinnost, ale jeho vlastností se dá využít v dlouhodobé terapii u pacientů s onemocněním s přetížením železem. Desferasirox (Exjade®) má již v některých zemích platnou registraci [29].

2.1.3.4.3 Thiosemikarbazony

Thiosemikarbazony jsou tridentální chelátory, jejichž ligandy byly první skupinou charakteristickou pro silné protinádorové účinky [63].

Tyto sloučeniny váží ionty kovů prostřednictvím síry a dvou atomů dusíku. Mají vysokou afinitu nejen k iontům železa, ale např. i Cu^{2+} , Zn^{2+} a dalších přechodných kovů. Výrazně inhibují aktivitu RR různými mechanismy [30].

2.1.3.4.3.1 Triapin

Triapin (3-aminopyridin-2-karboxaldehydthiosemikarbazon, 3-APT) je inhibitorem RR a jeho komplexy s kovy navíc vykazují redoxní aktivitu.

Redukce komplexně vázaného Fe^{3+} na Fe^{2+} vede k tvorbě ROS, které jsou schopny zhášet tyrosylový radikál R2 podjednotky RR a v konečném důsledku vedou k inaktivaci tohoto enzymu [29].

Studie prokázaly, že samotný Triapin je méně antiproliferativně účinný než jeho komplexy s kovy [29]. V porovnání s hydroxymočovinou (HU), klinicky používaným inhibitorem RR, byl Triapin účinný i u buněk na HU rezistentních [30].

Momentálně je ve fázi klinického zkoušení [29].

2.1.3.4.4 Aroylhydrazony

Výchozí látkou skupiny aroylhydrazonů je pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH), který prokázal vyšší antiproliferativní účinnost v porovnání s DFO. Další výzkum proto zahrnuje strukturní obměny tohoto chelátoru a studium vztahů mezi strukturou a účinkem jednotlivých ligandů [29].

Aroylhydrazonová analoga byla syntetizována z kyselých hydrazidů a tří původních aromatických aldehydů – pyridoxalu, salicylaldehydu a 2-hydroxy-1-naftylaldehydu, čímž byly vytvořeny tři následující série [2].

2.1.3.4.4.1 Série 100

Tuto sérii chelátorů představuje PIH a jeho analoga, která byla připravena kondenzací hydrazidu isonikotinové kyseliny (příp. hydrazidu karboxylové kyseliny) s pyridoxalem (příp. s aromatickým aldehydem nebo ketonem) za vzniku příslušných hydrazonů

PIH je tridentální, perorálně účinný chelátor, který má vyšší afinitu k Fe^{3+} iontům a s nižší afinitou váže také Fe^{2+} [2]. Snadno prochází cytoplazmatickou i mitochondriální membránou a váže intracelulární železo [10]. Má antiproliferativní aktivitu a mimo to vykazuje také retinoprotektivní a antioxidační účinky, čehož se dá

využit v terapii nemocí s přetížením železem [64,65]. Několik studií ukázalo relativně nízkou toxicitu PIH jak při jednorázovém, tak při opakovaném podání [64,65].

2.1.3.4.4.2 Série 200

Nahrazením pyridoxalové části lipofilnější salicylaldehydickou skupinou vznikl salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) a od něj odvozená série derivátů [2]. Jedná se o tridentální chelátory, které jsou vzhledem k malé molekule a dostatečné lipofilitě účinné po perorálním podání [66].

SIH selektivně vytváří 2:1 komplexy s Fe^{3+} i s Fe^{2+} ionty, přičemž váže železo s vyšší afinitou než je tomu u předešlé série [66]. Navíc má v porovnání s ostatními aroylhydrazonovými deriváty (PIH a NIH) nejvhodnější hydrofilně-lipofilní vlastnosti pro průchod membránami a proto velmi účinně transportuje ionty železa z buněk [20].

SIH kromě antiproliferativní aktivity vykazuje také kardioprotektivní účinky, chrání kardiomyocyty před toxicitou antracyklinů, které se používají jako protinádorová chemoterapeutika [67]. Nedávné výzkumy ukazují na jeho radioprotektivní účinnost a ochranný potenciál u amyotrofické laterální sklerózy [68,69]. Terapie jeho komplexy Fe-SIH snížila expresi virových proteinů a RNA viru hepatitidy C [70].

Limitujícím faktorem SIH je jeho relativně krátký biologický poločas a nízká stabilita hydrazonové vazby, která v plazmě snadno podléhá hydrolýze [30]. Tato vlastnost je zřejmě vlastní všem aroylhydrazonům odvozených od aromatických aldehydů [66].

2.1.3.4.4.2.1 Metyl a etyl ketonová analoga SIH

Na základě výše zmiňovaných důvodů byla navržena a syntetizována nová analoga SIH odvozená od aromatických ketonů. Tyto ligandy vykazují výraznější stabilitu hydrazonové vazby proti hydrolýze v porovnání s mateřskými látkami [66].

Mezi zástupce řadíme např. HAPI, HPPI, 2,4DHAPI, 2,6DHAPI, NHAPI, MHAPI, CHAPI apod. (podrobněji v publikaci Hrušková a kol. 2011 [54]) přičemž NHAPI se ukázal být nejstabilnější z řady těchto chelátorů, protože obsahuje nejsilnější elektronakceptorovou skupinu, nitroskupinu [54]. Naopak 2,6DHAPI, s dvěma OH skupinami na aromatickém cyklu v ketonové části nevykazoval vyšší stabilitu a měl

také nejnižší antiproliferativní účinnost. Zbylá většina těchto látek prokázala výrazný nárůst antiproliferativní aktivity v porovnání se SIH a DFO [66].

2.1.3.4.4.3 Série 300

Tato série látek má ještě výraznější lipofilitu než předešlé díky začlenění 2-hydroxy-1-naftaldehydové skupiny [2]. 2-hydroxy-1-naftaldehyd (NIH) váže železo především ve formě Fe^{3+} iontů [71] a tvoří s nimi redoxně neaktivní komplexy [72].

2.1.3.4.4.4 PCIH a jeho analoga

Jedná se o skupinu tridentálních chelátorů železa, které vznikly zapojením 2-pyridylkarboxaldehydové skupiny thiosemikarbazonů do aroylhydrazonového skeletu [2]. Tato modifikace vedla překvapivě ke snížení antiproliferativní aktivity, ale zvýraznění vlastností využívaných u léčby nemocí s přetížením železem [73].

2.1.3.4.4.5 PKIH a jeho analoga

Di-2-pyridylketon isonikotinoyl hydrazon (PKIH) a jeho analoga vychází z PCIH přidáním lipofilního pyridinového kruhu. Jedná se také o skupinu tridentálních chelátorů, jejichž komplexy se železem vykazují redoxní aktivitu, což zvyšuje jejich antineoplastickou účinnost [52].

2.1.3.4.5 Hybridní chelátory získané kombinací thiosemikarbazonů a aroylhydrazonů

2.1.3.4.5.1 Hybridní chelátory řady NT

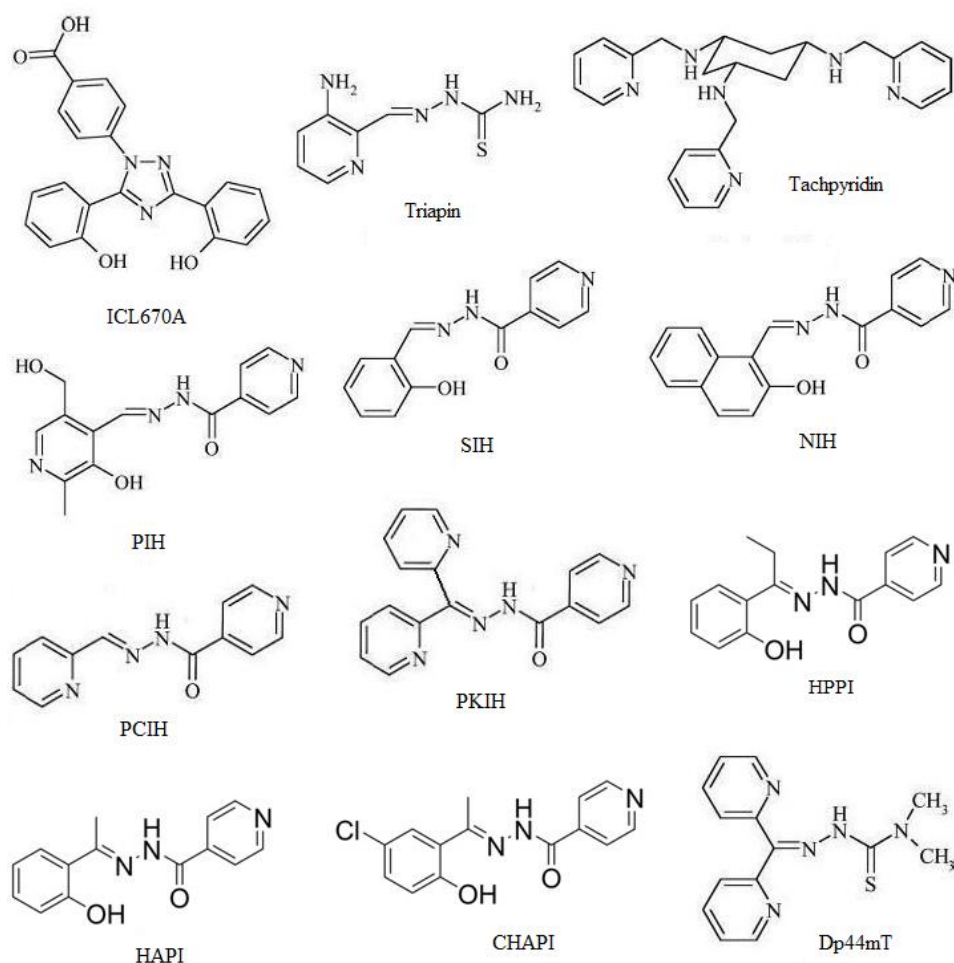
Výchozí látkou této skupiny chelátorů je 2-hydroxy-1-naftylaldehyd-3-thiosemikarbazon (NT). Některá analoga NT prokázala antiproliferativní účinnost v *in vitro* studiích [74].

2.1.3.4.5.2 Hybridní chelátory řady DpT

Mateřskou látkou této skupiny je di-2-pyridylketon thiosemikarbazon (DpT). Některá analoga, jmenovitě Dp4eT, Dp4aT a Dp4pT a Dp44mT (podrobněji v publikaci Kovacevic a kol. 2011 [30]) prokázaly výraznou antiproliferativní účinnost. Aktivita Dp44mT je z části dána schopností vytvářet v nádorových buňkách redoxně aktivní komplexy se železem a následnou tvorbou ROS. Tento chelátor se jeví jako nejúčinnější zástupce skupiny [30].

2.1.3.4.5.3 Hybridní chelátory řady BpT

Tato skupina látek vychází z 2-benzoylpyridin thiosemikarbazonu (BpT). Analoga řady BpT prokázala selektivnější a ještě vyšší antiproliferativní aktivitu než chelátory odvozené od DpT [75].



Obr.2.5: Chemické struktury vybraných syntetických chelátorů železa (Převzato od Macková 2010).

3 Cíle práce

- Studium antiproliferativních účinků série nových aroylhydrazonových chelátorů železa na buněčné linii prsního adenokarcinomu MCF-7.
- Porovnání antiproliferativní účinnosti nových chelátorů a mateřského chelátoru SIH.

4 Metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Buněčná linie

Buněčná linie lidského prsního adenokarcinomu MCF-7 byla získána z evropské banky buněčných linií (European Collection of Cell Cultures; ECACC, Velká Británie).

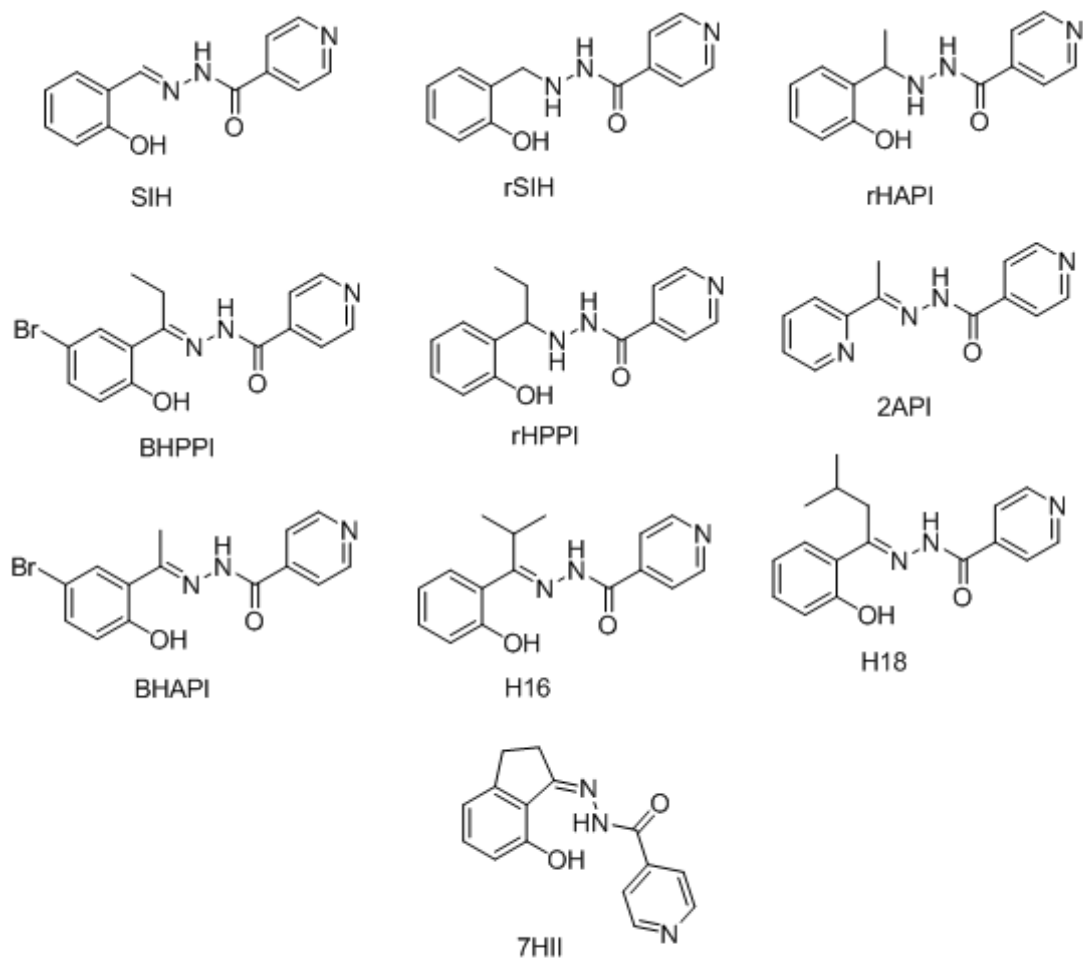
4.1.2 Reagencie a chemikálie

- ADS pufr o pH 7,4 (NaCl 116 mM, KCl 5,3 mM, MgSO₄ x 7H₂O 1,2 mM, HEPES 20 mM)
- dimethylsulfoxid ≥ 99,9% (DMSO) (Sigma, Německo)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza, Belgie)
- etanol absolutní p.a. ≥ 99,9% (Penta, Česká republika)
- fetální bovinní sérum - teplem inaktivované (Lonza)
- formaldehyd 36,3% (Penta)
- fosfátový pufr tablety (phosphate buffered saline - PBS) (Sigma)
- L-glutamin 200mM roztok (Lonza)
- HEPES pufr (N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-(2-etansulfonová kyselina)) (Sigma)
- chlorid vápenatý (Penta)
- kyselina chlorovodíková (Penta)
- kyselina octová - ledová p.a. ≥ 99,9% (Penta)
- neutrální červeň 3,3 g/l roztok (Sigma)
- peroxid vodíku 3% roztok (Fluka)
- trypanová modř 0,4% roztok (Sigma)
- trypsin s EDTA (Lonza)
- ultradestilovaná voda (MQ, přístroj Milli-Q RG, Millipore, Česká republika)
- zásobní roztok penicilin/streptomycin (Lonza)

4.1.3 Použité substance

- salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (**SIH**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- *N'*-(2-hydroxybenzyl)isonikotinoylhydrazid (**rSIH**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- *N'*-(1-(2-hydroxyfenyl)ethyl)isonikotinoylhydrazid (**rHAPI**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- *N'*-(1-(2-hydroxyfenyl)propyl)isonikotinoylhydrazid (**rHPPI**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-[1-(2-hydroxy-5-bromfenyl)ethyliden] isonikotinoylhydrazid (**bHAPI**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-[1-(2-hydroxy-5-bromfenyl)propyliden]isonikotinoylhydrazid (**bHPPI**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-(1-(pyridin-2-yl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid (**2API**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*Z*)-*N'*-(7-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yliden)isonikotinoylhydrazid (**7HII**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-(1-(2-hydroxyfenyl)-2-methylpropyliden)isonikotinoylhydrazid (**H16**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)
- (*E*)-*N'*-(1-(2-hydroxyfenyl)-3-methylbutyliden)isonikotinoylhydrazid (**H18**, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)

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



Obr. 4.1: Chemické struktury salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) a od něj odvozených nových vybraných aroylhydrazonových chelátorů železa.

4.1.4 Přístrojové a laboratorní vybavení

4.1.4.1 Zařízení pro kultivaci a sterilní práci s buněčnou linií

- box s laminárním prouděním BioAir TopSafe 1.2 třídy II (EuroClone S.p.A, Itálie)
- buněčný inkubátor s termostatem a regulací koncentrace CO₂ Sanyo MCO-19AIC (UV) (Panasonic Healthcare, Holandsko)
- vodní lázeň PolyScience temperature controller (Polyscience, USA)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- sterilní kultivační nádoby T75 (TPP, Švýcarsko)
- 96 - jamkové mikrotitrační kultivační destičky s plochým dnem (TPP, Švýcarsko)
- automatické pipety Eppendorf research různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- pipeta elektronická multikanálová - e-PET BioHit 50-1200 µl a 5-100 µl (Biohit, Finsko)
- serologické sterilní pipety 5ml a 10 ml (TPP, Švýcarsko)
- pipetíky Swiftpet (HTL, Polsko)
- pipetík BioHit midi plus (Biohit, Finsko)
- mikrozkušavky 0,5 a 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- sterilní špičky různého objemu (Memmert, Německo)
- laboratorní sklo sterilní (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)

4.1.4.2 Čtečka 96-jamkových mikrotitračních destiček

Absorbance byla stanovována spektrofotometricky pomocí čtečky Infinite M 200 s optickým hranolem (TECAN, Rakousko).

4.1.4.3 Invertovaný epifluorescenční mikroskop

Pro mikroskopii fázového rozhraní byl použit invertovaný mikroskop Nikon Eclipse TS 100 s objektivem Nikon 10x/0,25 (Nikon, Japonsko). Snímky byly pořízeny kamerou COOL-1300Q (VDS Vosskühler, Německo) se softwarem NIS-Elements AR

2.20 (Laboratory Imaging, Česká republika) se zdrojem UV Nikon S-CHG se rtuťovou lampou a filtry Texas Red (TxR), FITC a DAPI (Nikon, Japonsko).

4.1.4.4 Ostatní laboratorní vybavení

- analytické váhy ScalTec SBC 22 (Scaltec, Německo)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Německo)
- laboratorní třepačky Vortex (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- plastové zkumavky různého objemu (TPP, Švýcarsko)
- špičky různého objemu (Eppendorf, Německo; BioHit, Finsko)

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Kultivace

Buňky byly pěstovány ve sterilních kultivačních nádobách o ploše 75 cm² při konstantní teplotě 37°C a v atmosféře 5 % CO₂, která je ekvivalentní bilanci CO₂ v krvi.

Pro kultivaci bylo použito médium DMEM obohacené o 10% tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS h.i.), 4mM L-glutamin, 10mM HEPES pufru (pH = 7,4) a 1 % směsi penicilinu a streptomycinu.

Veškeré manipulace s buňkami byly prováděny v aseptickém prostředí laminárního boxu. Všechny použité roztoky byly předem temperovány na 37°C předeřhřátím na vodní lázni.

4.2.2 Pasážování (subkultivace)

Pasážování bylo periodicky opakováno každý 3. až 4. den. Ředění nově nasazovaných buněk bylo přizpůsobeno rychlosti buněčného dělení tak, aby v den pasáže ještě nedosahovaly úplné konfluence.

Pasáž byla zahájena odsátím média z buněk. Aby došlo k odstranění zbytků séra, následovalo dvojité opláchnutí puftrem PBS. Ve třetím kroku byly přidány 2 ml trypsinu s EDTA. Tento roztok bylo třeba rovnoměrně rozprostřít po celém dně kultivační nádoby a jeho přebytek odsát. Následovala inkubace buněk v těsně uzavřené láhvi při teplotě 37°C po dobu cca 5 minut. Po vyjmutí z inkubátoru se buňky uvolnily ode dna úderem dlaně o stěnu kultivační nádoby, zkontrolovaly pod mikroskopem a trypsin byl zneutralizován přídatkem 10 ml čerstvého kultivačního média DMEM s FBS.

Buňky byly řádně rozsuspendovány vypouštěním proudu buněčné suspenze proti stěně nádoby a potřebný objem přenesen do nové sterilní kultivační lahve s obsahem média. Čerstvě nasazené buňky byly jemnými pohyby kultivační lahve rozprostřeny po dně a vloženy do inkubátoru.

Nespotřebovaná část buněčné suspenze v médiu byla použita k realizaci vlastního pokusu.

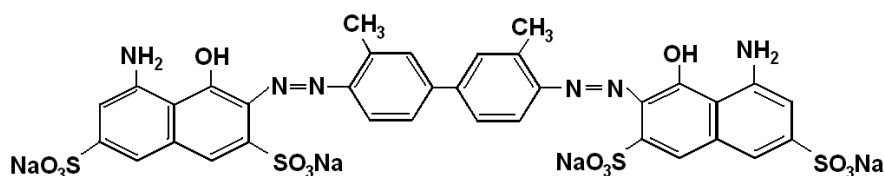
4.2.3 Počítání buněk

Pro správnou interpretaci výsledků pokusu je zásadní nasazení stejného počtu buněk do stejných kultivačních nádob. Pouze takto může být zajištěna reprodukovatelnost a možnost porovnání.

Před vlastním počítáním buněk bylo napipetováno 100 μ l 0,4% roztoku trypanové modři do 0,5ml mikrozkušavky a následně přidáno 100 μ l důkladně promíchané buněčné suspenze. Mikrozkušavka s buňkami byla ponechána cca 1 minutu při laboratorní teplotě, poté se buněčná suspenze řádně promíchala na Vortexu a bylo z ní naneseno 2 x 10 μ l pod sklíčko Bürkerovy komůrky.

Trypanová modř patří mezi tzv. postvitální barviva. Charakter molekuly brání průniku intaktní buněčnou membránou. Jakmile se změní permeabilita membrány po úmrtí buňky, barvivo difunduje do intracelulárního prostoru.

Pod mikroskopem byly počítány pouze neobarvené (živé) buňky v pěti z devíti čtverců, a to vždy stejným způsobem. Výsledný počet buněk byl násoben číslem 2 000 a tím získán počet buněk v 1 ml suspenze (ředění trypanovou modří = 2 x, počet buněk v 1 μ l x 1000 = počet buněk v 1ml).



Obr. 4.2: Trypanová modř

4.2.4 Studium antiproliferativních vlastností látek

4.2.4.1 Nasazování buněk na pokus

Buněčnou suspenzi, získanou předchozím pasážováním bylo třeba naředit na požadovanou hustotu 50 000 buněk na 1ml. Pomocí vaničky a multikanálové pipety byla důkladně promísená suspenze buněk nanášena na 96 jamkovou destičku. Do každé z jamek bylo nanášeno 100 μ l suspenze, což odpovídá 5 000 buněk na jednu jamku. Aby byla zajistěna adheze buněk ke dnu, byly destičky vloženy na 24 hodin do inkubátoru.

Následující den bylo do každé z jamek aplikováno 100 μ l roztoku zkoušené látky. Roztok byl přidáván vždy ve dvojnásobné koncentraci než byla koncentrace požadovaná, protože docházelo k ředění 100 μ l již přítomného média. Buňky byly spolu se studovanými látkami ponechány po dobu 72 hodin v buněčném inkubátoru. Po uplynutí předepsaného času následovalo vyhodnocení za pomoci metody vychytávání neutrální červeně.

4.2.4.2 Roztoky studovaných látek aplikované před inkubací

Všechny studované chelátory iontů železa byly před aplikací rozpuštěny v dimetylsulfoxidu (DMSO) a dle potřeby ředěny na požadované koncentrace z 1000mM a 100mM roztoků. Na 96 jamkovou destičku byly nanášeny ve sloupcích pomocí multikanálové pipety.

První sloupec každé destičky obsahoval negativní kontrolu, tzv. blank. Zde měly být všechny buňky po uplynutí doby inkubace usmrceny. K tomu to účelu byl používán 3% peroxid vodíku zředěný kultivačním médiem na koncentraci 0,02 M. Výsledná koncentrace po aplikaci do jamek byla však 0,01 M (100 μ l buněčné suspenze + 100 μ l roztoku peroxidu).

Nejméně dva další sloupce obsahovaly pozitivní kontrolu. Do nich bylo přidáno kultivační médium a rozpouštědlo používané k přípravě zásobních roztoků, v našem případě DMSO. Pokud bylo ve stanovení v některých jamkách použito vyššího množství rozpouštědla, byl přidán alespoň jeden sloupec s kontrolou vyšší koncentrace DMSO. Bylo nezbytné, aby se obsah DMSO rozpouštějícího látky shodoval s obsahem DMSO ve sloupcích s pozitivní kontrolou.

Zbylé sloupce destičky obsahovaly přidané směsi kultivačního média a zásobních roztoků uvedených v bodě 4.2.4.3.

4.2.4.3 Zásobní roztoky

Aroylhydrazonové chelátory byly rozpouštěny v DMSO a takto předem připravené roztoky aplikovány do jamek k nasazeným buňkám ve třech rozdílných koncentračních škálách. Vycházelo se ze základních roztoků těchto látek (nejčastěji 100 μM a 1000 μM), které byly následně ředěny rozpouštědlem na koncentrace 10 mM, 1 mM a 0,1 mM a byly uchovávány v mrazícím boxu při teplotě -20°C .

Studované látky SIH, bHAPI, rHAPI, rHPPI byly přidány do jamek ve výsledných koncentracích 0,3 μM , 1 μM , 3M, 10 μM , 30 μM , 100 μM a 300 μM . H16, H18, 2API, 7HII a bHPPI ve výsledných koncentracích 0,03 μM 1, 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM a rSIH v koncentracích 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM , 1000 μM , 3000 μM .

V roztocích byl DMSO ve výsledku vždy přítomen v koncentraci 0,1 %. Výjimkou byly roztoky o koncentraci 300 μM a 3000 μM chelátorů, kde bylo obsaženo 0,3 % DMSO.

4.2.5 Vyhodnocení

4.2.5.1 Stanovení životaschopnosti buněk

Principem tohoto stanovení je krátkodobá inkubace buněk s přidáním supravitálního barviva, neutrální červeně. Toto barvivo je slabě kationové povahy, snadno difunduje přes semipermeabilní membránu a kumuluje se v kyselém prostředí intaktních lyzozomů. Podstatou stanovení je kumulace barviva pouze v živých buňkách. U mrtvých nebo poškozených buněk je tato schopnost snížena. Množství akumulované neutrální červeně je tedy přímo úměrné množství živých buněk v jamce kultivační destičky.

V průběhu pokusu byly buňky inkubovány se studovanými látkami po dobu 72 hodin. Poté bylo ze všech jamek 96-ti jamkové destičky odsáno 100 μl média a následně do každé napipetováno 100 μl pracovního roztoku neutrální červeně

o koncentraci 80 µg/ml. Je třeba upozornit na to, že výsledná koncentrace neutrální červeně v každé z jamek byla tedy 40 µg/ml.

Po 3 hodinové inkubaci při 37°C bylo z jamek kompletně odsáto médium s roztokem neutrální červeně a přidalo se 100 µl fixačního roztoku. Destičky byly ponechány při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Následně byla kapalina z buněk opět odsáta a buňky byly dvakrát opláchnuty pufrem PBS. K prvnímu oplachu bylo použito 100 µl, k druhému již jen 50 µl pufru. Po ukončení promývání bylo přidáno 200 µl lyzačního roztoku a destičky byly znovu ponechány při pokojové teplotě 15 minut. Následně byly přemístěny na třepačku, kde se jejich obsah homogenizoval frekvencí 450 otáček za minutu po dalších 15 minut.

Stanovení bylo vyhodnocováno spektrofotometricky měřením absorbance při 540 nm za pomoci přístroje TECAN. Čím vyšší obsah neutrální červeně jamka obsahovala, tím vyšší absorbanci jsme naměřili.

Pro vyhodnocení byla od všech sloupců odečítána absorbance negativní kontroly.

4.2.5.2 Roztoky potřebné k vyhodnocení

Všechny roztoky používané při vyhodnocení pokusů byly připraveny na Katedře biochemických věd do zásoby. Tyto roztoky byly uchovávány při pokojové teplotě. Výjimku tvoří zásobní roztok neutrální červeně, který je komerčně dostupný a je třeba jej uchovávat v lednici.

- ***Pracovní roztok neutrální červeně***

Potřebné množství tohoto roztoku bylo ředěno v čas potřeby bezsérovým médiem ze zásobního roztoku neutrální červeně na požadovanou koncentraci 80µg/ml.

- ***Fixační roztok pro stanovení životaschopnosti buněk***

Jedná se o 0,5% roztok formaldehydu v MQ-vodě, v němž je rozpuštěn 1 g chloridu vápenatého bezvodého na 100 ml.

- ***Pufr PBS***
Roztok vzniklý rozpuštěním komerčně dostupných tablet v předepsaném množství MQ-vody.
- ***Lyzační roztok pro stanovení životaschopnosti buněk***
Jedná se o 50% roztok etanolu v MQ-vodě s přídatkem 1% kyseliny octové ledové.

4.2.6 Obrazová dokumentace

4.2.6.1 Studium antiproliferativních účinků vybraných chelátorů

železa

Buňky byly fotografovány ve 12-jamkové destičce pod invertovaným mikroskopem Nikon Eclipse TS100 se zvětšením 20x. Před fotografováním byl dodržen postup pokusu až do bodu 4.2.4 Odchylka byla ve zvýšení počtu buněk v jedné jamce a to na 20 000 buněk na jamku. Jiný byl také objem nasazované buněčné suspenze a to 1 ml na jamku. Výsledné koncentrace přidávaných roztoků byly shodné jako v uvedeném postupu, jen jsme doporučeně upravili přidávaná množství.

4.2.6.1.1 Příprava buněk na fotografování

Postup byl shodný jako v bodě 4.2.6.1 Buňky byly inkubovány 72 hodin s vybranými chelátory železa o výsledné koncentraci 0 (kontrola) a 10 μM . Následně bylo z jamek s objemem 2 ml odebráno staré médium a buňky byly rychlou manipulací 2x opláchnuty roztokem ADS pufru obsahující 1mM CaCl_2 a 1 g/l glukózy. Hned poté byly pořízeny snímky ve fázovém kontrastu.

4.2.7 Statistické zpracování dat

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí software GraphPad Prism 5 pro systém Windows (GraphPad Software, USA), stejný program byl použit k sestrojení grafů. Výsledky byly vyjádřeny jako průměrné hodnoty měření se směrodatnými odchylkami. Pro výpočet statistické významnosti dat byla použita metoda One-Way ANOVA s *post hoc* testem Bonferroni.

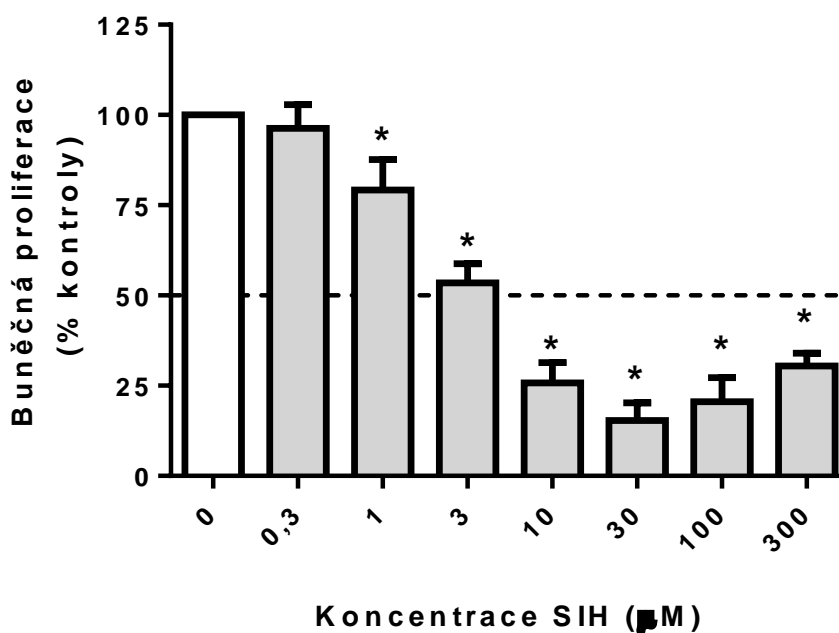
Pro stanovení hodnot IC_{50} (koncentrace studované látky, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byl použit software CalcuSyn verze 1.1 (Biosoft, Velká Británie).

5 Výsledky

5.1 Studium antiproliferativních účinků studovaných látek

5.1.1 Studium antiproliferativních účinků modelového chelátoru železa SIH

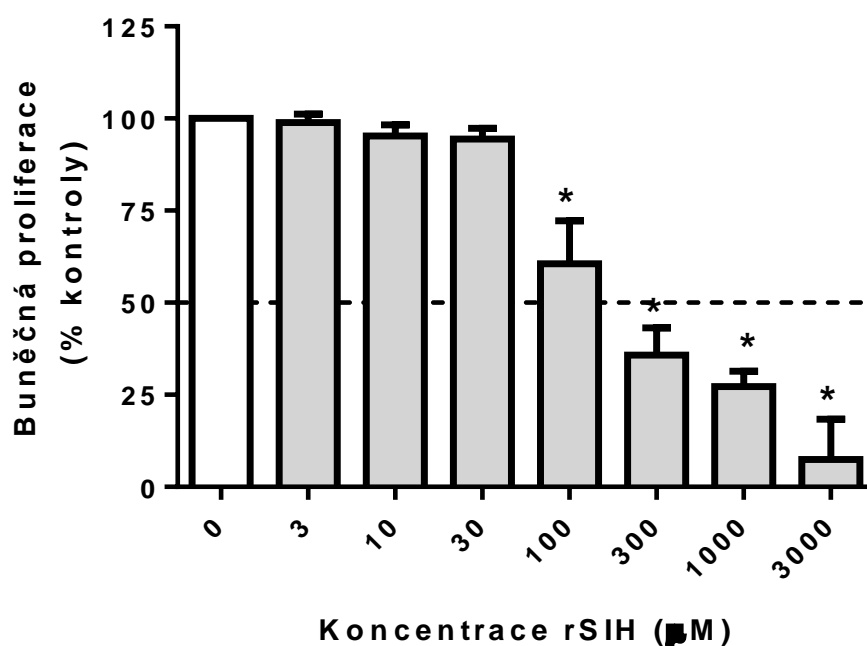
Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací chelátoru železa SIH jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace. SIH byl použit v rozsahu koncentrace 0,3 μM až 300 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace SIH, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $4,21 \pm 1,05 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 30 μM SIH, kdy buněčná proliferace klesla na 15 % v porovnání s kontrolní skupinou (100 %).



Obr. 5.1: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s chelátorem železa SIH (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně) $N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

5.1.2 Studium antiproliferativních účinků rSIH

Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací látky rSIH jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace. rSIH byl použit v rozsahu koncentrace 3 μM až 3000 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace rSIH, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $279,97 \pm 53,17 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 3000 μM rSIH, kdy buněčná proliferace klesla na 12 % v porovnání s kontrolní skupinou (100 %).

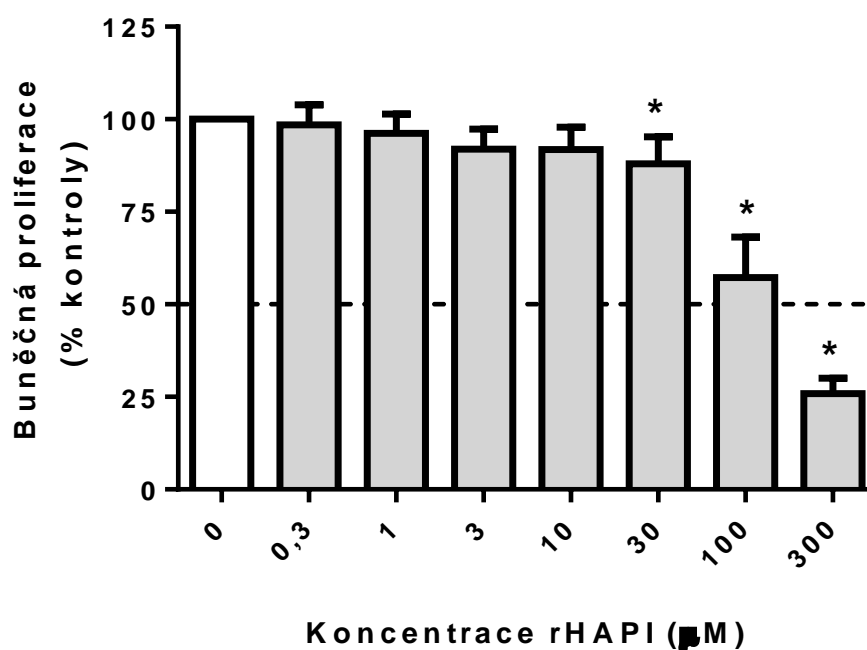


Obr. 5.2: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s látkou rSIH (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně)

$N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *

5.1.3 Studium antiproliferativních účinků rHAPI

Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací látky rHAPI jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace. rHAPI byl použit v rozsahu koncentrace 0,3 μM až 300 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace rHAPI, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $133,47 \pm 28,76 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 300 μM rHAPI, kdy buněčná proliferace klesla na 26 % v porovnání s kontrolní skupinou (100%).

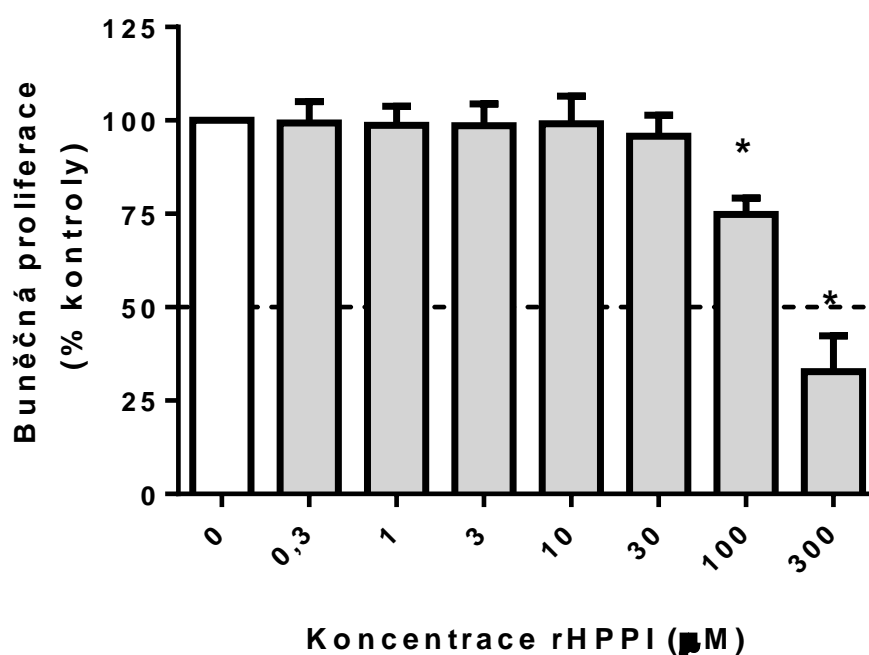


Obr. 5.3: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s látkou rHAPI (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně)

$N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

5.1.4 Studium antiproliferativních účinků rHPPI

Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací látky rHPPI jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace. rHPPI byl použit v rozsahu koncentrace 0,3 μM až 300 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace rHPPI, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $197,86 \pm 13,09 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 300 μM rHPPI, kdy buněčná proliferace klesla na 33 % v porovnání s kontrolní skupinou (100%).

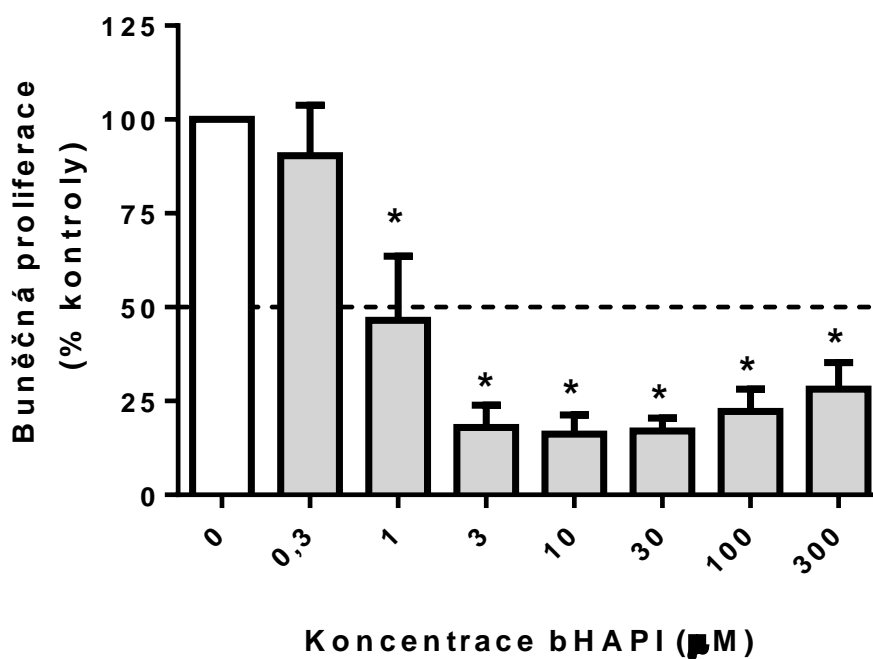


Obr. 5.4: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s látkou rHPPI (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně)

$N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

5.1.5 Studium antiproliferativních účinků bHAPI

Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací látky bHAPI jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace. bHAPI byl použit v rozsahu koncentrace 0,3 μM až 300 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace bHAPI, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $1,12 \pm 0,46 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 10 μM bHAPI, kdy buněčná proliferace klesla na 16 % v porovnání s kontrolní skupinou (100%).

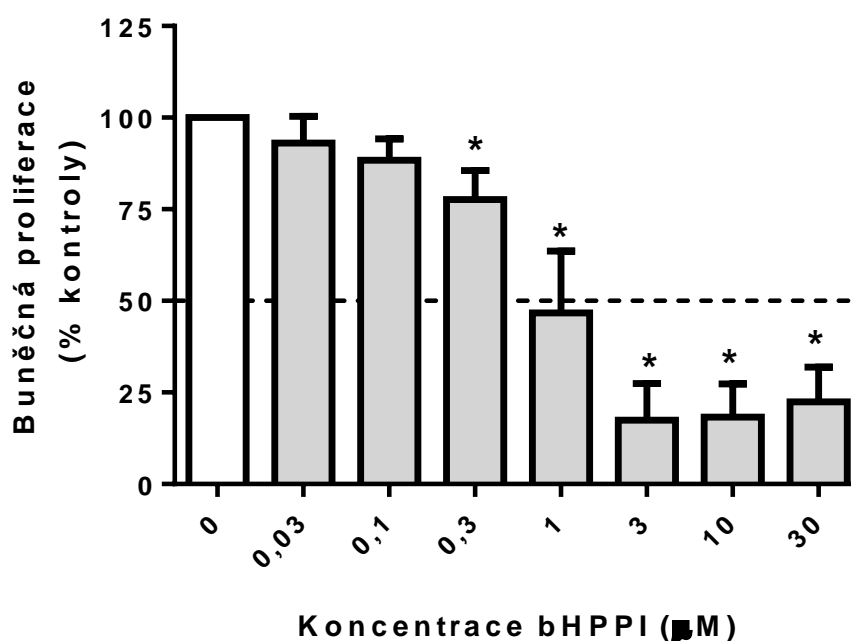


Obr. 5.5: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s látkou bHAPI (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně)

$N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

5.1.6 Studium antiproliferativních účinků bHPPI

Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací látky bHPPI jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace MCF-7. bHPPI byl použit v rozsahu koncentrace 0,03 μM až 30 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace bHPPI, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $0,83 \pm 0,50 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 3 μM bHPPI, kdy buněčná proliferace klesla na 17 % v porovnání s kontrolní skupinou (100%).

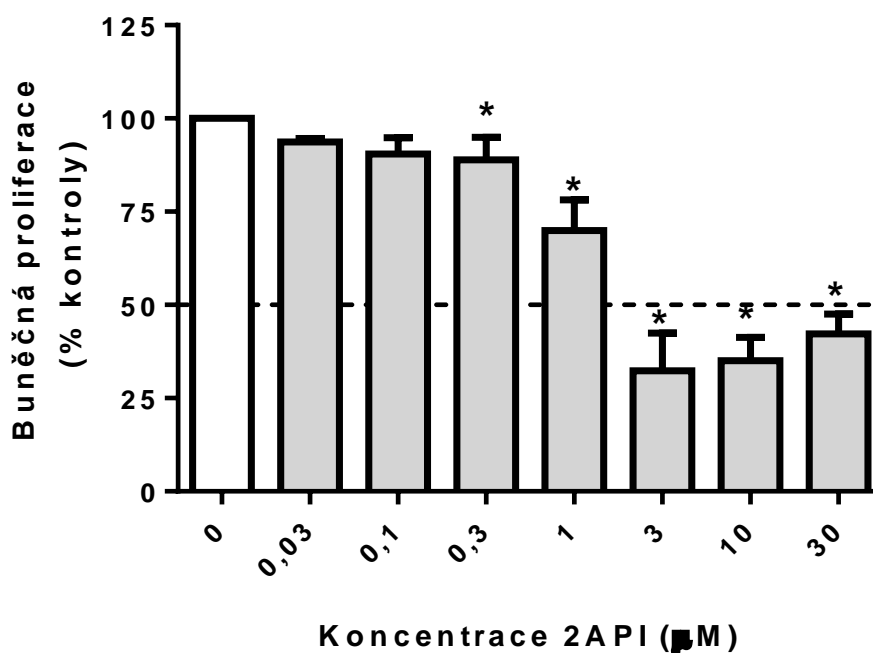


Obr. 5.6: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s látkou bHPPI (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně)

$N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

5.1.7 Studium antiproliferativních účinků 2API

Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací látky 2API jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace. 2API byl použit v rozsahu koncentrace 0,03 μM až 30 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace 2API, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $3,62 \pm 1,82 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 3 μM 2API, kdy buněčná proliferace klesla na 32 % v porovnání s kontrolní skupinou (100 %).

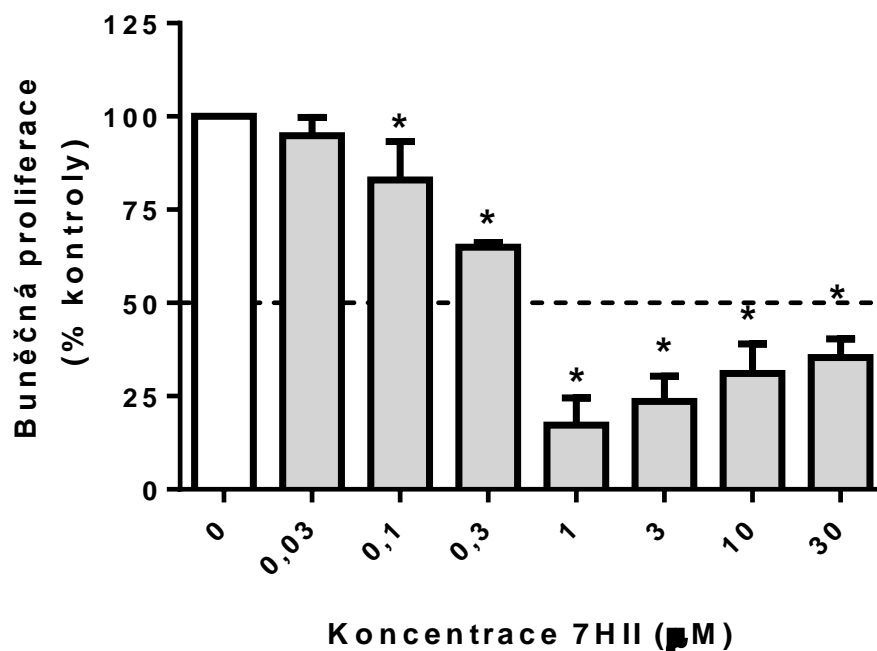


Obr. 5.7: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s látkou 2API (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně)

$N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

5.1.8 Studium antiproliferativních účinků 7HII

Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací látky 7HII jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace. 7HII byl použit v rozsahu koncentrace 0,03 μM až 30 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace 7HII, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $0,38 \pm 0,10 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 1 μM 7HII, kdy buněčná proliferace klesla na 17 % v porovnání s kontrolní skupinou (100 %).

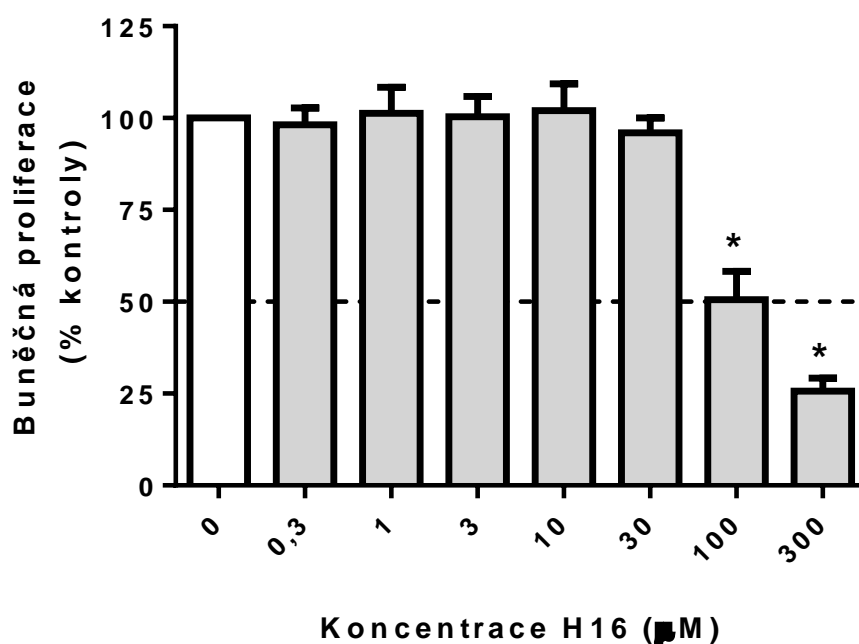


Obr. 5.8: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s látkou 7HII (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně)

$N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

5.1.9 Studium antiproliferativních účinků H16

Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací látky H16 jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace. H16 byl použit v rozsahu koncentrace 0,3 μM až 300 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace H16, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $153,67 \pm 24,20 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 300 μM H16, kdy buněčná proliferace klesla na 26 % v porovnání s kontrolní skupinou (100 %).

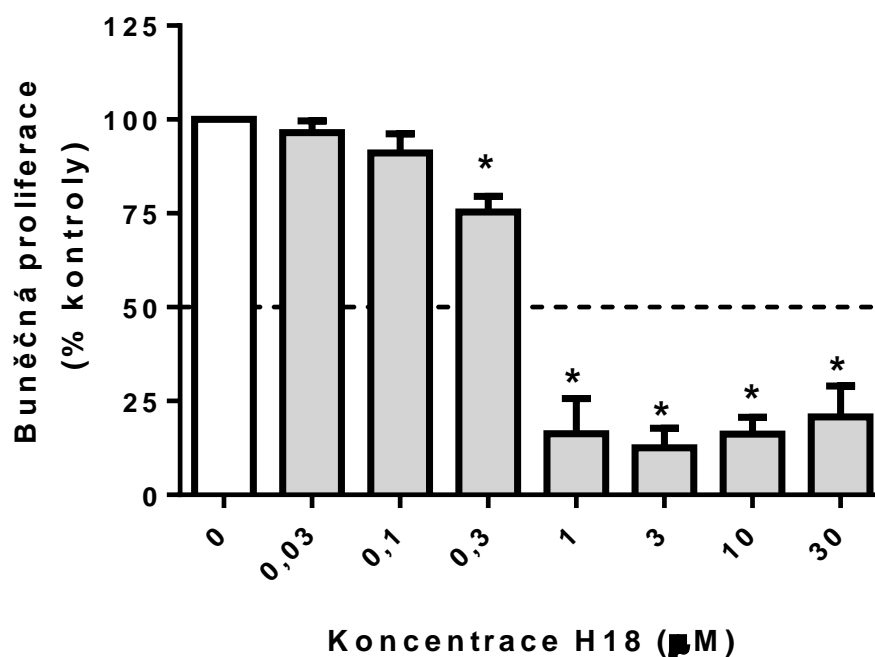


Obr. 5.9: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s látkou H16 (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně)

$N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

5.1.10 Studium antiproliferativních účinků H18

Po 72 hodinové inkubaci MCF-7 buněk se vzrůstající koncentrací látky H18 jsme za použití testu vychytávání neutrální červeně zaznamenali statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace. H18 byl použit v rozsahu koncentrace 0,03 μM až 30 μM . Hodnota IC_{50} (tj. koncentrace H18, která byla schopna snížit proliferaci buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) byla $0,49 \pm 0,18 \mu\text{M}$. Nejvyšší antiproliferativní účinek jsme zaznamenali při koncentraci 3 μM H18, kdy buněčná proliferace klesla na 13 % v porovnání s kontrolní skupinou (100 %).



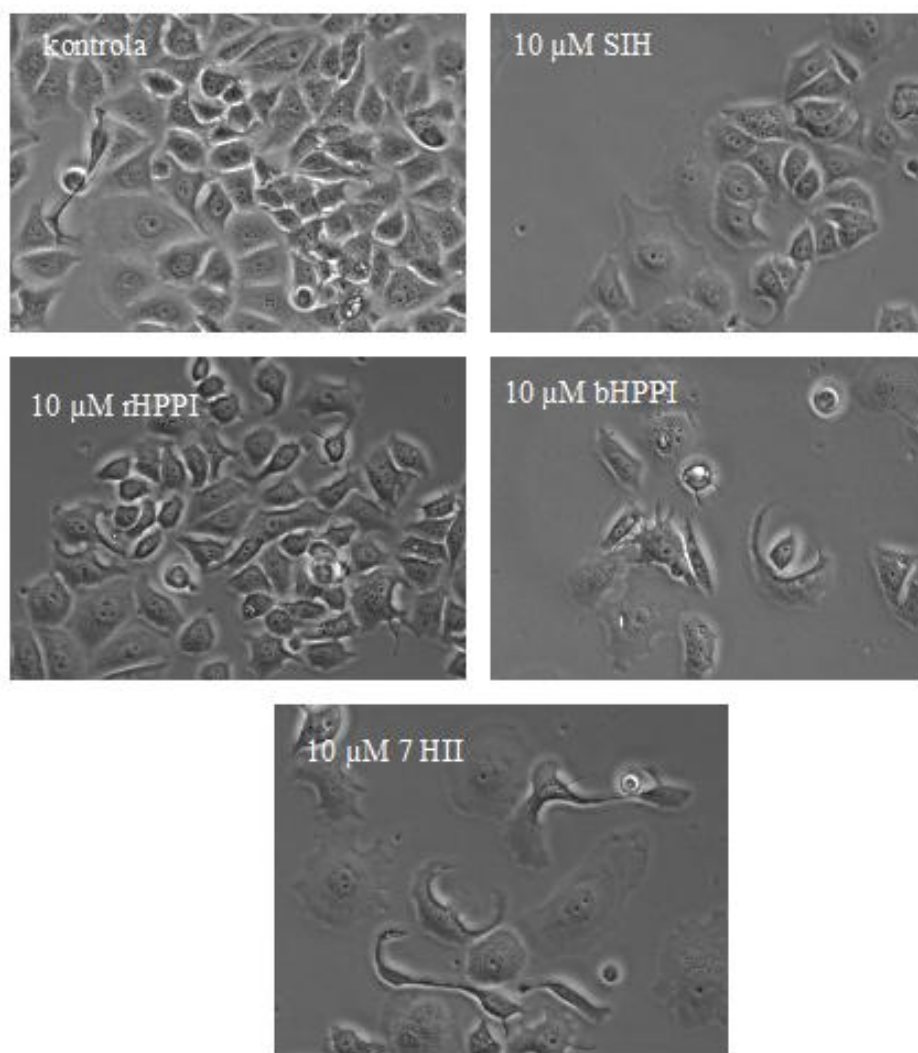
Obr. 5.10: Snížení proliferace buněk MCF-7 po 72 hodinové inkubaci s látkou H18 (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně)

$N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolní skupinou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

5.2 Obrazová dokumentace

5.2.1 Studium buněčné morfologie

Na fotografiích buněk MCF-7 pořízených po 72 hodinové inkubaci s vybranými chelátory železa o koncentraci 10 μM je viditelné snížení buněčné proliferace a změna tvaru některých buněk v porovnání s kontrolou. Na fotografiích je zřejmé, že látka rHPPI není v dané koncentraci pro buňky MCF-7 toxická. V případě účinných chelátorů železa SIH, bHPPI a 7HII je patrné zvětšení buněk, některé buňky mají srpkovitý tvar a jsou patrné také buňky odloučené ode dna, které jsou pravděpodobně mrtvé nebo umírající.



Obr. 5.11: Morfologie MCF-7 buněk inkubovaných 72 hodin s vybranými chelátory železa. Snímky ve fázovém kontrastu za použití objektivu 20x.

6 Diskuse

Zhoubná nádorová onemocnění jsou v celosvětovém měřítku jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Z tohoto důvodu stoupá potřeba vývoje nových, účinnějších a selektivněji působících antineoplastických léčiv [55].

Nová strategie v terapii těchto onemocnění se zaměřuje na vychytávání železa, což je prvek, který hraje klíčovou roli v syntéze DNA, je nezbytný pro buněčnou proliferaci, správnou funkci buněčného metabolismu a průběh buněčného dýchání [55,66].

Rychle se množící nádorové buňky mají vlivem urychleného metabolismu mnohem vyšší nároky na příjem železa. To je také důvodem jejich zvýšené citlivosti k nedostatku tohoto prvku, a tím také k látkám, které tento nedostatek způsobují [30]. Omezení jeho dostupnosti v případě neoplastických buněk představuje výhodnou a originální strategii v inhibici jejich nekontrolovatelné proliferace [66].

Chelátory železa jsou látky, které váží ionty železa a omezují tak možnost jejich využití pro metabolické pochody buňky. Jsou skupinou látek stále více využívanou v experimentální i klinické medicíně. V současné době nachází uplatnění v terapii onemocnění souvisejících s chronickým přetížením železem (jako je např. hemosideróza, β -talasémie nebo hereditární hemochromatóza) či v terapii intoxikací železem [2]. Předmětem preklinických i klinických studií jsou další alternativy využití jejich potenciálu. Některé chelátory železa vykazují schopnost chránit buňky před oxidačním poškozením a vykazují také protektivní účinnost při ochraně kardiomyocytů před toxicitou antracyklinových chemoterapeutik [67] nebo působením oxidovaných forem katecholaminů [76,77]. Příkladem jejich uplatnění je také adjuvantní terapie malárie, kdy se přidávají ke klasické léčbě chininovými deriváty [78]. Další možností je jejich využití v terapii onemocnění HIV. Replikace viru HIV1 je podmíněna dostatečnou zásobou železa, které je nezbytné pro správnou funkci reverzní transkriptázy, genovou expresi a uspořádání kapsidy. Snížením hladiny železa chelatací je možné dosáhnout zpomalení nebo úplného zastavení množení tohoto viru [79,80].

V průběhu studií a využívání těchto látek byla odhalena jejich antiproliferativní účinnost [4,19,81]. Dnes již představují novou skupinu antineoplastických léčiv, která vykazují silné a selektivní účinky u velkého množství neoplastických buněk. Jsou to látky s velkým potenciálem pro terapii nádorových onemocnění [30].

Původně byla antiproliferativní účinnost chelátorů přisuzována inhibici RR, která hraje klíčovou roli v buněčné proliferaci [35]. Studie s triapinem a některými deriváty PKIH prokázaly, že jsou některé chelátory schopny vytvářet redoxně aktivní komplexy,

kteře vedou v nádorových buňkách k tvorbě ROS, poškození buněčných struktur a následně k buněčné smrti [29,49,81]. Další poznatky dokazují, že snížení hladiny železa chelátory navíc působí změnu exprese řady kontrolních molekul buněčného cyklu [37]. Ovlivnění exprese cyklinu D1, inhibitoru cdk p21^{CIP1/WAF1}, p53, NDRG1 a dalších je mimo jiné také příčinou inhibice proliferace buněk a indukce apoptózy. Tím se ukazuje, že zasahují do celé řady metabolických drah buněk.

Účinné chelátory železa by měly mít vyvážené hydrofilně-lipofilní vlastnosti, které umožní dobrou absorpci po perorálním podání a zajišťují dobrou biologickou dostupnost průchodem přes biologické membrány. Měly by vytvářet komplexy se železem intracelulárně a tyto komplexy by měly být dostatečně stabilní [36]. Vysoce hydrofilní charakter klinicky používaného sideroforu DFO omezuje vstřebání po perorální aplikaci, navíc má velmi krátký biologický poločas, což omezuje jeho chelatační účinnost a přináší nevýhody pro použití v klinické praxi, protože musí být aplikován v podobě zdlouhavých, pro pacienty nekomfortních subkutánních infúzí [30].

Aroylhydrazonové chelátory železa vykazují výhodnější rozložení těchto vlastností, což umožňuje jejich dobrou dostupnost i po perorálním podání. Prvním zástupcem, dnes již rozsáhlé skupiny těchto látek byl PIH, syntetizovaný profesorem Poňkou v 70. letech minulého století. Od té doby byla vyvinuta řada aroylhydrazonových analogů záměnou jader a další modifikací struktury [30].

Do této skupiny se řadí také SIH, tridentální syntetický chelátor železa, který je díky malé molekule a dostatečné lipofilně perorálně účinný. Selektivně vytváří 2:1 komplexy s Fe³⁺ i s Fe²⁺ ionty [66] a v porovnání s aroylhydrazony PIH a NIH má nejvýhodnější poměr hydrofilně-lipofilních vlastností, které zajišťují snadný průchod buněčnými membránami a efektivní chelataci intracelulárního železa [20].

SIH je nadějná látka pro terapii onemocnění s přetížením železem [82]. Vykazuje schopnosti chránit kardiomyocyty před kardiotoxicitou antracyklinů [67] a osvědčil se jako chelátor železa s antiproliferativní aktivitou [2]. Jeho velkou nevýhodou je však krátký biologický poločas a nízká stabilita hydrazonové vazby, která ve vodném prostředí plazmy snadno hydrolyzuje [66].

Tato vlastnost se týká všech původních hydrazonů odvozených od aromatických aldehydů [66], proto je dalším předmětem studia snaha zvýšit stabilitu hydrazonové vazby modifikací struktury výchozích látek.

Na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK byla navržena a syntetizována série nových analogů SIH odvozených od aromatických ketonů, která vykazují signifikantně vyšší stabilitu proti hydrolýze hydrazonové vazby [66,83]. Další výzkum aroylhydrazonových derivátů se zabýval také důsledky alkylace na hydrazonovém uhlíku (C=N) a substitucí na fenylovém jádře. Náhradou aldimidinového vodíku v molekule SIH objemnějším elektrondonorovým substituentem byl získán chelátor železa HAPI a jeho vyšší homolog HPPI. Substituce methylovou skupinou v případě HAPI vedla k signifikantnímu zvýšení antiproliferativní aktivity proti buněčné linii MCF-7 v porovnání s mateřskou látkou. Methyloací se ale zároveň dvojnásobně zvýšila cytotoxicita k buňkám H9c2, nekancerogenním kardiomyoblastům, které ve studii zastupovaly tkáň náchylnou k nežádoucí toxicitě zkoušených látek. Zavedením etylové skupiny byl syntetizován propiofenonový derivát HPPI. Tato látka prokázala srovnatelnou antiproliferativní účinnost s HAPI, ale výrazně nižší toxicitu k H9c2. Prodloužení alkylového řetězce se zdá být jednou ze slibných strategií dalšího studia [66].

Cílem této diplomové práce je prověřit antiproliferativní účinnost nových analogů SIH *in vitro* a porovnat tyto výsledky s vlastnostmi mateřské látky SIH.

Antiproliferativní aktivitu SIH a od něj odvozených aroylhydrazonových derivátů jsme určovali na buněčné linii prsního adenokarcinomu MCF-7. Buňky byly inkubovány po dobu 72 hodin s různými škálami koncentrací studovaných látek. U všech zkoumaných chelátorů byl zjištěn statisticky významný, dávkově závislý pokles buněčné proliferace, ovšem u některých látek až ve velmi vysokých koncentracích.

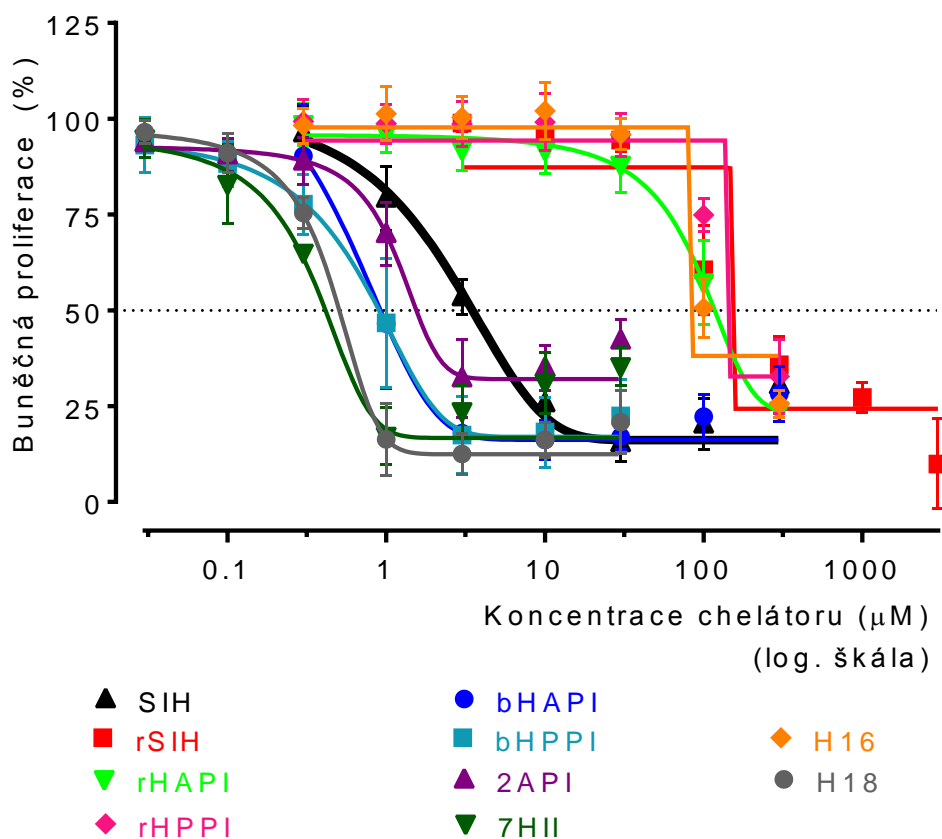
Pomocí software CalcuSyn byly vypočítány hodnoty IC_{50} pro každý ze studovaných chelátorů. Získané hodnoty byly zaneseny do tabulky a porovnány s IC_{50} výchozí látky SIH.

Hodnoty IC_{50} ukázaly u pěti nových aroylhydrazonových derivátů vyšší antiproliferativní aktivitu k buňkám MCF-7 v porovnání s chelátorem SIH. Zbylé látky byly naopak v porovnání s výchozí látkou několikanásobně méně účinné. Nejvyšší antiproliferativní účinnost prokázaly chelátory 7HII, H18 a bHPPI, naopak nejnižší byla naměřena u redukovaných derivátů rSIH a r HPPI. Více uvádí tabulka 6.1 a obrázek 6.1.

Tab. 6.1: Souhrn hodnot IC_{50} chelátoru SIH a jeho analogů pro buněčnou linii MCF-7 získané v rámci této diplomové práce

chelátory	IC_{50} (μM)
<i>SIH</i>	<i>4,21 ± 1,05</i>
rSIH	279,97 ± 53,17
rHAPI	133,47 ± 28,76
rHPPI	197,86 ± 13,09
bHAPI	1,06 ± 0,46
bHPPI	0,83 ± 0,50
2API	3,62 ± 1,82
7HII	0,38 ± 0,11
H16	153,67 ± 24,20
H18	0,49 ± 0,18

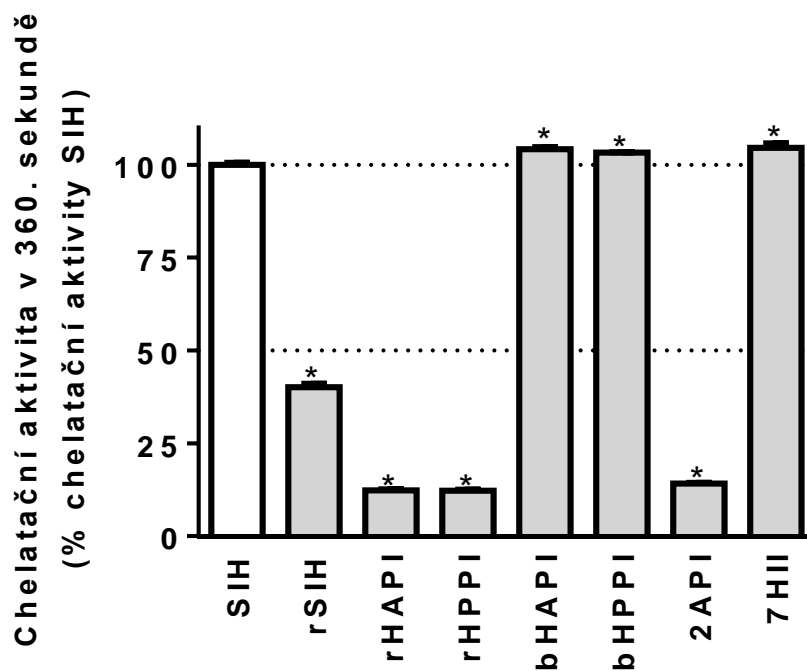
Hodnoty IC_{50} (μM) jsou uváděny se směrodatnou odchylkou (SD). Byly získány 72 hodinovou inkubací chelátorů s buňkami a výpočtem pomocí software CalcuSyn. Červeně zvýrazněné hodnoty označují vyšší antiproliferativní účinnost chelátorů k buňkám MCF-7 než je účinnost mateřského chelátoru SIH, což je řadí do skupiny látek vhodných k možnému využití coby potenciálních cytostatik.



Obr. 6.1: Snížení buněčné proliferace MCF-7 buněk po 72 hodinové inkubaci s chelátorem železa SIH a jeho analogy (vyhodnoceno testem vychytávání neutrální červeně) $N \geq 4$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD).

Chelatační aktivita jednotlivých látek *in vitro* byla dále porovnávána s jejich chelatační účinností v roztoku, stanovením s kalceinem, a schopností chelátorů mobilizovat chelátované železo ven z buňky.

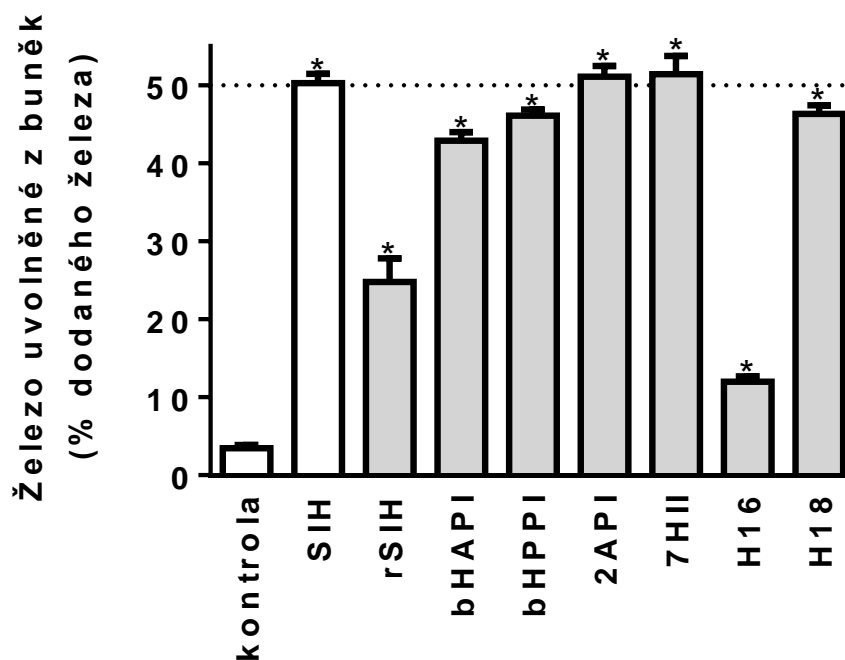
Kalcein je slabým chelátorem železa. Ve volném stavu vykazuje fluorescenci, přičemž navázáním železa se tato fluorescence zhasí. Po přidání $5\mu\text{M}$ zkoušeného chelátoru k roztoku obsahující komplex kalcein-železo byl v rámci stanovení sledován vzestup fluorescence v čase. Principem tohoto stanovení je kompetice o vazbu železa mezi kalceinem a silnějším testovaným chelátorem. Získané hodnoty všech látek byly porovnány s chelatační aktivitou SIH (více obr. 6.2).



Obr. 6.2: Výsledky E. Mackové: Stanovení chelatační aktivity jednotlivých chelátorů v roztoku, stanovení s kalceinem. $N \geq 3$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s chelátorem SIH (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem *.

Mírně vyšší chelatační aktivitu v roztoku v porovnání s původní látkou SIH v roztoku vykazují bHAPI, bHPPI a 7HII. Naopak nižší aktivitu prokázaly redukované deriváty a 2API. Z důvodu technické závady nebylo možno toto stanovení provést u látek H16 a H18.

V pokusu stanovujícím mobilizaci radioaktivně značeného ^{59}Fe z intracelulárního prostoru byly buňky MCF-7 nejdříve inkubovány s holotransferinem s navázaným izotopem ^{59}Fe . Během tříhodinové inkubace buňky absorbují ^{59}Fe do intracelulárního prostoru. Po důkladném oplachu a následném přidání média s testovaným chelátorem o koncentraci $25\mu\text{M}$ byla po další tříhodinové inkubaci měřena radioaktivita v médiu a uvnitř buněk. Výsledky měření uvádí obrázek 6.3. Hodnoty jsou uváděny jako % radioaktivity v médiu, tzn. železa vneseného chelátory ven z buněk. 100% představuje součet radioaktivity v buňkách a v médiu. Chelátor SIH je uváděn jako standard (zde pouze pro srovnání).



Obr. 6.3: Výsledky E. Mackové: Mobilizace ^{59}Fe z MCF-7 buněk. $N \geq 3$ experimenty. Data jsou uvedena jako průměrná hodnota se standardní chybou (SD). Statisticky významně odlišné výsledky v porovnání s kontrolou (ANOVA, $P < 0,05$) jsou označeny symbolem*.

Nejvyšší schopnost mobilizovat chelátované železo z buňky mají 2API a 7HII, kde je mírně vyšší, než u mateřské látky SIH. U chelátoru 2API je tento výsledek mobilizace železa z buněk v porovnání s nízkou chelatační aktivitou v roztoku poněkud zvláštní. Tyto rozdíly mohou být způsobeny interakcí chelátoru 2API s kalceinem. V případě ostatních látek byla schopnost mobilizovat železo z buněk nižší oproti porovnávanému standardu.

Pro možné využití studovaných látek coby potenciálních antineoplastických léčiv je důležité určení jejich selektivity k neoplastickým buňkám. Z tohoto důvodu byly získané hodnoty IC_{50} porovnány s daty toxicitní studie na linii neonatálních potkaních kardiomyocitů H9c2, která představuje tkáň náchylnou k nežádoucí toxicitě zkoumaných chelátorů.

Nejvíce selektivní účinnost prokázala látka H18, která je 15krát více účinná u buněk MCF-7 než v případě H9c2. Poměry hodnot IC_{50} k nádorové a nenádorové linii uvádí tabulka 6.2.

Tab. 6.2: Poměr hodnot IC₅₀ k nenádorovým buňkám linie H9c2 a neoplastickým buňkám MCF-7.

chelátor	IC ₅₀ H9c2/MCF-7 (μM)
<i>SIH</i>	11,75
rSIH	0,14
rHAPI	0,63
rHPPI	1,14
bHAPI	6,59
bHPPI	7,60
2API	0,85
7HII	1,63
H16	*
H18	15,10

Tučně vyznačené hodnoty vyšší než jedna vyjadřují vyšší selektivitu k nádorové buněčné linii MCF-7.

Červeně vyznačené hodnoty udávají několikanásobně vyšší selektivní účinnost u buněk MCF-7, což řadí příslušné chelátory do skupiny látek vhodných k možnému využití coby potenciálních cytostatik. Pro výpočet byla použita data naměřená Kateřinou Pravidíkovou. Hodnota IC₅₀ H9c2 pro H16 není dostupná, protože tato látka v případě buněčné linie H9c2 nevykazuje signifikantní snížení viability.

Látky s redukovanou dvojnou vazbou mezi uhlíkem a dusíkem byly syntetizovány za účelem zvýšení stability molekuly proti hydrolýze labilní hydrazonové vazby. Jak ale z výše uvedeného vyplývá, redukce chelátoru SIH a jeho methyl a etyl derivátů vedla k výraznému snížení antiproliferativní účinnosti snížením chelatační aktivity redukovaných látek v porovnání s parentními látkami. Přítomnost hydrazonové vazby je tedy pro antiproliferativní účinek esenciální.

Zavedení halogenu do molekuly zvyšuje její lipofilitu, což může vést ke zvýšení průniku látky do intracelulárního prostoru. Vlivem kladného mezomerního a záporného

indukčního efektu může také ovlivňovat stabilitu hydrazonové vazby a schopnost chelátovat ionty. Deriváty substituované atomem bromu v poloze 5 fenylového jádra, kterými jsme se zabývali, vykazují nepatrně nižší hodnoty IC_{50} než původní nebromované látky. Na tomto místě je zajímavé srovnání s chelátorem CHAPI ((E)-N`-(1-(5-chloro-2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazidem), který má ve stejné poloze na fenylu vázaný atom chloru. Chlorovaný izoster prokázal proti bHAPI vyšší antiproliferativní účinek [66].

Bromovaná analoga ale vykazují vyšší selektivitu vůči nádorovým buňkám ve srovnání s CHAPI. V případě bHAPI je selektivita srovnatelná s jeho nebromovaným analogem HAPI. bHPPI vykazuje výrazně nižší selektivitu než jeho nehalogovaný analog HPPI, což je dáno jeho vyšší toxicitou k linii buněk H9c2 [66].

V molekule látky 2API je v ketonové části zastoupen 2-hydroxyfenyl pyridinovým jádrem, na chelataci železa se tedy podílí heterocyklický dusík, nikoli fenolický hydroxyl. Ve srovnání se svým analogem HAPI vykazuje však 2API vyšší toxicitu ke kardiomyocytům H9c2. Antiproliferativní aktivita k MCF-7 buňkám 2API se bohužel projevuje v koncentracích, kdy už je toxický ke kardiomyocytům H9c2.

Derivát 7HII obsahuje v ketonové části molekuly stejný počet alkylových uhlíků jako HPPI, liší se pouze jejich indanovým uspořádáním. Tato látka prokázala nejsilnější antiproliferativní aktivitu ze všech zkoumaných látek, bohužel bylo zaznamenáno také signifikantní zvýšení toxicity k H9c2 buňkám oproti HPPI, což činí její profil nepříznivým. Antiproliferativní aktivita 7HII koreluje, obdobně jako u látky 2API s toxicitou k H9c2 buňkám, což lze vysvětlit obecně zvýšenou schopností penetrace této látky do buněk.

Rozvětvení alkylového řetězce na hydrazonovém uhlíku vazby (C=N) výrazně mění vlastnosti molekuly. Látka H16 má řetězec v porovnání s HPPI v α poloze vůči hydrazonové vazbě rozvětvený, alkyl je zde tvořen isopropylovým uspořádáním. Tato látka je v médiu i v použitém rozpouštědle DMSO velmi obtížně rozpustná. V koncentracích, v nichž ji lze převést do roztoku, má vlastní toxicitu téměř nulovou, což je pravděpodobně zapříčiněno rozvětvením řetězce v těsné blízkosti hydrazonové vazby bránícího hydrolýze. Rozvětvení pravděpodobně stericky brání chelataci železa. V mezích rozpustnosti je antiproliferativní účinnost H16 velmi nízká.

Prodloužení řetězce o jeden uhlík zavedením isobutylové skupiny v případě látky H18 vedlo naopak ke zvýšení antiproliferativní účinnosti v porovnání s parentní látkou SIH. Tato látka navíc vykazuje ze všech studovaných látek nejvyšší nárůst selektivity vůči neoplastickým buňkám. Pro druhou nejnižší naměřenou hodnotu IC_{50} a výraznou selektivitu vůči nádorové linii má ze všech zkoumaných látek nejvýhodnější profil. Představuje tedy nejnadějnějšího kandidáta pro další výzkum, zahrnující studium antiproliferační účinnosti na širším panelu nádorových linií, hodnocení protinádorového působení na vhodných *in vivo* modelech, studium toxicity *in vivo* a úvodní farmakokinetickou analýzu.

7 Závěry

- Všechny studované chelátory prokázaly statisticky významné, dávkově závislé snížení buněčné proliferace u MCF-7 buněk
- Pět studovaných látek prokázalo vyšší antiproliferativní účinnost než chelátor SIH
- Redukce hydrazonové vazby vedla k výraznému snížení antiproliferativní aktivity
- Bromace nemá na antiproliferační účinnost zásadní vliv
- Rozvětvení alkylového řetězce v blízkosti hydrazonové vazby vedlo v případě zavedení isopropylu k výraznému snížení antiproliferační i chelatační aktivity a v případě isobutylu naopak k jejich zvýšení

8 Seznam zkratek

2 API	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(1-(pyridin-2-yl)ethyliden)isonikotinoylhydrazid
7 HII	(<i>Z</i>)- <i>N'</i> -(7-hydroxy-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-liden)isonikotinoylhydrazid
bHAPI	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[1-(2-hydroxy-5-bromfenyl)ethyliden]isonikotinoylhydrazid
bHPPI	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[1-(2-hydroxy-5-bromfenyl)propyliden]isonikotinoylhydrazid
BpT	2-benzoylpyridin thiosemikarbazon
CHAPI	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(1-(5-chloro-2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid
Dcytb	duodenální cytochrom b
D-Exo	desferriexocheliny
DFO	desferrioxamin
DFT	deferrithiocin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT-1	přenašeč divalentních kovů-1 (divalent metal transporter-1)
Dp44mT	di-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon
DpT	di-2-pyridylketon thiosemikarbazon
FPN1	ferroportin 1
H 16	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)-2-methylpropyliden)isonikotinoylhydrazid
H 18	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)-3-methylbutyliden)isonikotinoylhydrazid
HCP-1	protein přenášející hem-1 (haem carrier protein-1)
HO-1	hem-oxygenáza-1
HU	hydroxymočovina
ICL670A	kyselina 4-[3,5-bis-(hydroxyfenyl)-1,2,4-triazol-1-yl]-benzoová
IRE	elementy kontrolující železo (iron-responsive elements)
IRP	proteiny regulující železo (iron-regulatory proteins)
LIP	zásoby volného železa (labile iron pool)
MDA	malondialdehyd, konečný produkt peroxidace lipidů
NIH	2-hydroxy-1-naftaldehyd
NT	2-hydroxy-1-naftylaldehyd-3-thiosemikarbazon
PCIH	2-pyridylcarboxaldehyd isonikotinoyl hydrazon
PIH	pyridoxal isonikotinoyl hydrazon

PKIH	di-pyridylketon isonikotinoyl hydrazon
rHAPI	<i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)ethyl)isonikotinoylhydrazid
rHPPI	<i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)propyl)isonikotinoylhydrazid
rSIH	<i>N'</i> -(2-hydroxybenzyl)isonikotinoylhydrazid
STEAP	epiteliální antigen prostaty 3 (6-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3)
ROS	reaktivní formy kyslíku
RR	ribonukleotid reduktáza
SIH	salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon
Tf	transferin
TfR	transferinový receptor

9 Seznam citované literatury

- [1] **Andrews, N.C.** Disorders of Iron Metabolism. *New England Journal of Medicine*. 1999, **341**(26), 1986-1995.
- [2] **Kalinowski, D.S. a D.R. Richardson.** The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacological Reviews*. 2005, **57**(4), 547-583.
- [3] **Hentze, M. W, M. Umuckenthaler a N. C. Andrews.** Balancing Acts. *Cell*. 2004,**117**(3), 285-297.
- [4] **Merlot, A.M., D.S. Kalinowski a D.R. Richardson.** Novel Chelators for Cancer Treatment: Where Are We Now?. *Antioxidants*. 2013, **18**(8), 973-1006.
- [5] **Dunn, L.L., Y.S. Rahmanto a D.R. Richardson.** Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in Cell Biology*. 2007, **17**(2), 93-100.
- [6] **Wallander, M.L., E.A. Leibold a R.S. Eisenstein.** Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2006, **1763**(7), 668-689.
- [7] **Latunde-Dada, G.O., K. Takeuchi, R.J. Simpson a A.T. Mckie.** Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Letters*. 2006, **580**(30), 6865-6870.
- [8] **Ganz, T.** Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003, **102**(3), 783-788.
- [9] **Nemeth, E., M.S. Tuttle, J. Powelson, M.B. Vaughn, A. Donovan, D.M. Ward, T. Ganz a J. Kaplan.** Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*. 2004, **306**, (5704), 2090-2093.
- [10] **Richardson, D. R. a P. Poňka.** The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 1997, **1331**(1), 1-40.
- [11] **Arredondo, M. a M.T. Nunez.** Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005, **26**(4-5), 313-327.
- [12] **Müllner, E.W. a L.C. Kühn.** A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell*. 1988, **53**(5), 815-825.
- [13] **Trinder, D. a E. Baker.** Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry*. 2003, **35**(3), 292-296.

- [14] **Jacobs, A.** Low-molecular weight intracellular iron transport compounds. *Blood*. 1977, **50**(3),433-439.
- [15] **Núñez, M., P. Munoz, V. Gallardo, V. Tapia, A. Esparza, J. Salazar a H. Speisky.** Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. *Free radical biology & medicine*. 2004, **37**(7), 953-960.
- [16] **Vyoral, D., A. Hradílek, J. Neuwirt.** Transferrin and iron distribution in subcellular fractions of K562 cells in the early stages of transferrin endocytosis. *Biochimica et biophysica acta. Complete edition*, 1992, **1137**(2), 148-154.
- [17] **Richardson, D.R., P. Poňka a D. Vyoral.** Distribution of iron in reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone: examination of the intermediates involved in iron metabolism. *Blood*. 1996, **87**(8), 3477 - 3488.
- [18] **Kruszewski, M.** Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003, **531**(1-2), 81-92.
- [19] **Richardson, D.R.** Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002, **42**(3), 267-281.
- [20] **Buss, J.L., J. Neužil, N. Gellert, C. Weber a P. Poňka.** Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs induce apoptosis in hematopoietic cells due to their iron-chelating properties. *Biochemical Pharmacology*. 2003, **65**(2), s. 161-172.
- [21] **Levi, S.** A Human Mitochondrial Ferritin Encoded by an Intronless Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, **276**(27), 24437-24440.
- [22] **Lieu, P.T., M. Heiskala, P.A. Peterson, Y. Yang.** The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2001, **22**(1-2), 1-87.
- [23] **Rouault, T.A., M.W. Hentze, S.W. Caughman, J.B. Harford, R.D. Klausner.** Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science* 1988, **241**(4870), 1207-1210.
- [24] **Youn, P., S. Kim, J.H. Ahn, Y. Kim, J.D. Park a D.Y. Ryu.** Regulation of iron metabolism-related genes in diethylnitrosamine-induced mouse liver tumors. *Toxicology Letters*. 2009, **184**(3), 151-158.
- [25] **Eisenstein a Ross.** Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *Journal of nutrition*. 2003, **5**(133), 1510-1516.
- [26] **Hentze, M. W. a L. C. Kuhn.** Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996, **93**(16), 8175-8182.

- [27] **Horák, J.** *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 232. ISBN 978-802-4732-879.
- [28] **Trojan, S.** *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. přepr. a dopl. Praha: Grada Publishing, 2003, 771. ISBN 8024705125
- [29] **Richardson, D.R., D.S. Kalinowski, S. Lau, P.J. Jansson a D.B. Lovejoy.** Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2009, **1790**(7), 702-717.
- [30] **Kovacevic, Z., D.S. Kalinowski, D.B. Lovejoy, Y.Yu, Y.S. Rahmanto, P.C. Sharpe, P.V. Bernhardt a D.R. Richardson.** The Medicinal Chemistry of Novel Iron Chelators for the Treatment of Cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2011, **11**(5), 483-499.
- [31] **Vandewalle, B., L. Hornez, F. Revillion a J. Lefebvre.** Secretion of transferrin by human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989, **163**(1), 149-154.
- [32] **Poola, I. a J.G. Kiang.** The estrogen-inducible transferrin receptor-like membrane glycoprotein is related to stress-related proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, **34**(269), 21762-21769.
- [33] **Vaughn, C.B., R. Weinstein, B. Bond, R. Rice, R.W. Vaughn, A. Mckendrick, G. Ayad, M.A. Rockwell a R. Rocchio.** Ferritin Content in Human Cancerous and Noncancerous Colonic Tissue. *Cancer Investigation*. 1987, **5**(1), 7-10.
- [34] **Solinas, G., G. Germano, A. Mantovani a P. Allavena.** Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009, **86**(5), 1065-1073.
- [35] **Buss, J.L. B.T. Greene, J. Turner, F.M. Torti a S.V. Torti.** Iron Chelators in Cancer Chemotherapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2004, **4**(15), 1623-1635.
- [36] **Jomova, K. a M. Valko.** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011, **283**(2-3), 65-87.
- [37] **Yu, Y., Z. Kovacevic a D.R. Richardson.** Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell cycle*. 2007, **6**(16), 1982-1994.
- [38] **Sharpe, P.C., D.R. Richardson, D.S. Kalinowski a P.V. Bernhardt.** Synthetic and natural products as iron chelators. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2011, **11**(5), 591-607.
- [39] **Fukuchi, K., S. Tomoyasu, H. Watanabe, S. Kaetsu, N. Tsuruoka a K. Gomi.** Iron deprivation results in an increase in P53 expression. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. 1995, **376**(10), 627-630.

- [40] **Gao, J. a D.R. Richardson.** The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, IV: the mechanisms involved in inhibiting cell-cycle progression. *Blood*. 2001, **98**(3), 842-850.
- [41] **Liang, S.X. a D.R. Richardson.** The effect of potent iron chelators on the regulation of p53: examination of the expression, localization and DNA-binding activity of p53 and the transactivation of WAF1. *Carcinogenesis*. 2003, **24**(10), 1601-1614.
- [42] **Pahl, P.M., S.M. Reese a L.D. Horwitz.** A lipid-soluble iron chelator alters cell cycle regulatory protein binding in breast cancer cells compared to normal breast cells. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 2007, **6**(3), 193-200.
- [43] **Fu, D. a D.R. Richardson.** Iron chelation and regulation of the cell cycle: 2 mechanisms of posttranscriptional regulation of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1/WAF1 by iron depletion. *Blood*. 2007, **110**(2), 752-761.
- [44] **Whitnall, M., J. Howard, P. Poňka a D. R. Richardson.** A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**(40), 14901-14906.
- [45] **Kovacevic, Z. a D.R. Richardson.** The metastasis suppressor, NdrG-1: a new ally in the fight against cancer. *Carcinogenesis*. 2006, **27**(12), 2355-2366.
- [46] **Le, N. T.V. a D.R. Richardson.** Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood*. 2004, **104**(9), 2967-2975.
- [47] **Kovacevic, Z., D. Fu a D.R. Richardson.** The iron-regulated metastasis suppressor, NdrG-1: identification of novel molecular targets. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008, **1783**(10), 1981-1992.
- [48] **Hodges, Y.K., W.E. Antholine a L.D. Horwitz.** Effect on ribonucleotide reductase of novel lipophilic iron chelators: the desferri-exochelins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, **315**(3), 595-598.
- [49] **Chaston, T. B., R.N. Watts, J. Yuan a D.R. Richardson.** Potent Antitumor Activity of Novel Iron Chelators Derived from Di-2-Pyridylketone Isonicotinoyl Hydrazone Involves Fenton-Derived Free Radical Generation. *Clinical Cancer Research*. 2004, **10**(21), 7365-7374.
- [50] **Hider, R. C.** Nature of nontransferrin-bound iron. *European Journal of Clinical Investigation*. 2002, **32**(1), 50-54.
- [51] **Hider, R.C.** Design of therapeutic chelating agents. *Biochemical Society Transactions*. 2002, **30**(4), 751-754.

- [52] **Bernhardt, P.V., L.M. Caldwell, T.B. Chaston, P. Chin a D.R. Richardson.** Cytotoxic iron chelators: characterization of the structure, solution chemistry and redox activity of ligands and iron complexes of the di-2-pyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (H PKIH) analogues. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2003, **8**(8), 866-880.
- [53] **Butler, A. a R.M. Theisen.** Iron(III) siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. *Coordination Chemistry Reviews*. 2010, **254**(3-4), 288-296.
- [54] **Hrušková, K., P. Kovaříková, P. Bendová, P. Hašková, E. Macková, J. Stariat, A. Vávrová, K. Vávrová a T. Šimůnek.** Synthesis and Initial in Vitro Evaluations of Novel Antioxidant Aroylhydrazone Iron Chelators with Increased Stability against Plasma Hydrolysis. *Chemical Research in Toxicology*. 2011, **24**(3), 290-302.
- [55] **Brittenham, G.M.** Iron chelators and iron toxicity. *Alcohol*. 2003, **30**(2), 151-158.
- [56] **Aouad, F., A. Florence, Y. Zhang, F. Collins, C. Henry, R.J. Ward a R.R. Crichton.** Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorganica Chimica Acta*. 2002, 339, 470-480.
- [57] **Hershko, C., A. Abrahamov, A.M. Konijn, W. Breuer, I.Z. Cabantchik, P. Pootrakul a G. Link.** Objectives and methods of iron chelation therapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2003, **1**(2), 151-168.
- [58] **Pahl, P. M. B., X.D. Yan, Y.K. Hodges, E.A. Rosenthal, M.A. Horwitz, L.D. Horwitz.** An Exochelin of Mycobacterium tuberculosis Reversibly Arrests Growth of Human Vascular Smooth Muscle Cells in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, **275**(23), 17821-17826.
- [59] **Pahl, P. M.B., M. A. Horwitz, K. B. Horwitz a L. D. Horwitz.** Desferri-exochelin induces death by apoptosis in human breast cancer cells but does not kill normal breast cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2001, **69**(1), 69-79.
- [60] **Samuni, A.M., M.C. Krishna, W. DeGraff, A. Russo, R.P. Planalp, M.W. Brechbiel a J.B. Mitchell.** Mechanisms underlying the cytotoxic effects of Tachpyr-a novel metal chelator. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002, **1571**(3), 211-218.
- [61] **Torti, S.V., F.M. Torti, S.P. Whitman, M.W. Brechbiel, G. Park a R.P. Planalp.** Tumor cell cytotoxicity of a novel metal chelator. *Blood*. 1998, **92**(4), 1384-1389.
- [62] **Heinz, U. a K. Hegetschweiler, P. Acklin, B. Faller, R. Lattmann a H.P. Schnebli,** . 4-[3,5-bis(2-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid: A novel efficient and selective iron(III) complexing agent. *Angewandte Chemie (International ed.)*. 1999, **38**(17), 2568-2570.
- [63] **Sartorelli, A.C. a B.A. Booth.** Inhibition of the growth of sarcoma 180 ascites cells by combinations of inhibitors of nucleic acid biosynthesis and the cupric chelate of kethoxal bis(thiosemicarbazone). *Cancer Research*. 1967, **27**(9), 1614-1619.

- [64] **Kovaříková P, M. Mokry, J. Klimeš a K. Vávrová.** HPLC study on stability of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, **40**(1), 105-112.
- [65] **Kovaříková P, Z. Mrkvičková a J. Klimeš.** Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material. *Journa of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, **47**(2), 360-370.
- [66] **Macková, E., K. Hrušková, P. Bendová, A. Vávrová, H. Jansová, P. Hašková, P. Kovaříková, K. Vávrová a T. Šimůnek.** Methyl and ethyl ketone analogs of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: Novel iron chelators with selective antiproliferative action. *Chemico-biological interactions*. 2012, **197**(2-3), 69-79.
- [67] **Šimůnek, T., M. Štěrba, O. Popelová, H. Kaiserová, M. Adamcová, M. Hroch, P. Hašková, P. Poňka a V. Geršl.** Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *British Journal of Pharmacology*. 2008, **155**(1), 138-148.
- [68] **Berndt, C., T. Kurz, M. Selenius, A.P. Fernandes, M.R. Edgren a U.T. Brunk.** Chelation of lysosomal iron protects against ionizing radiation. *Biochemical Journal*. 2010, **432**(2), 295-301.
- [69] **Jeong, S. Y., K. I. Rathore, K. Schulz, P. Poňka, P. Arosio a S. David.** Dysregulation of Iron Homeostasis in the CNS Contributes to Disease Progression in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience*. 2009, **29**(3), 610-619.
- [70] **Fillebeen, C. a K. Pantopoulos.** Iron inhibits replication of infectious hepatitis C virus in permissive Huh7.5.1 cells . *Journal of hepatology*. 2011, **55**(1),995-999.
- [71] **Richardson, D. R. a P.V. Bernhardt.** Crystal and molecular structure of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde isonicotinoyl hydrazone (NIH) and its iron(III) complex: an iron chelator with anti-tumour activity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1999, **4**(3), 266-273.
- [72] **Chaston, T.B., D.B. Lovejoy, R.N., Watts a D.R. Richardson.** Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: Multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clinical cancer research*. 2003, **9**(1), 402-414.
- [73] **Becker, E. a D.R. Richardson.** Development of novel aroylhydrazone ligands for iron chelation therapy: 2-Pyridylcarboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone analogs. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1999, **134**(5), 510-521.
- [74] **Lovejoy, D.B. a D.R. Richardson.** Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells. *Blood*. 2002, **100**(2), 666-676.

- [75] **Kalinowski, D., Y. Yu, P.C. Sharpe, M. Islam, Y.T. Liao, D.B. Lovejoy, N. Kumar, P.V. Bernhardt a D.R. Richardson.** Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: Structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. *Journal of medicinal chemistry*. 2007, **50**(15), 3716-3729.
- [76] **Adamcová, M., T. Šimůnek, H. Kaiserová, O. Popelová, M. Štěrba, A. Potáčová, J. Vávrová, J. Maláková a V. Geršl.** In vitro and in vivo examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity. *Toxicology*. 2007, **237**(1-3), 218-228.
- [77] **Štěrba, M., O. Popelová, J. Lenco, A. Fučíková, E. Brčáková, Y. Mazurová, E. Jirkovský, T. Šimůnek, M. Adamcová, S. Mičuda, J. Stulík a V. Geršl.** Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011, **50**(5), 849-862.
- [78] **Mabeza, G.f., G. Biemba a V.R. Gordeuk.** Clinical studies of iron chelators in malaria. *Acta haematologica*. 1996, **95**(1), 78-86.
- [79] **Debebe, Z., T. Ammosova, M. Jerebtsova, J. Kurantsin-Mills, X. Niu, S. Charles, Des R. Richardson, P. E. Ray, V. R. Gordeuk a S. Nekhai.** Iron chelators ICL670 and 311 inhibit HIV-1 transcription. *Virology*. 2007, **367**(2), 324-333.
- [80] **Debebe, Z., T. Ammosova, D. Breuer, D. B. Lovejoy, D. S. Kalinowski, P. K. Karla, K. Kumar, M. Jerebtsova, P. Ray, F. Kashanchi, V. R. Gordeuk, D. R. Richardson a S. Nekhai.** Iron Chelators of the Di-2-pyridylketone Thiosemicarbazone and 2-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone Series Inhibit HIV-1 Transcription: Identification of Novel Cellular Targets--Iron, Cyclin-Dependent Kinase (CDK) 2, and CDK9. *Molecular Pharmacology*. 2010, **79**(1), 185-196.
- [81] **Noulsri, E., D.R. Richardson, S. Lerdwana, S. Fucharoen, T. Yamagishi, D.S. Kalinowski a K. Pattanapanyasat.** Antitumor activity and mechanism of action of the iron chelator, Dp44mT, against leukemic cells. *American Journal of Hematology*. 2009, **84**(3), 170-176.
- [82] **Klimtová I., T. Šimůnek, Y. Mazurová, J. Kaplanová, M. Štěrba, R. Hrdina, V. Geršl, M. Adamcová a P. Poňka.** A study of potential toxic effects after repeated 10-week administration of a new iron chelator-salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to rabbits. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 2003, **46**(4), 163-170.
- [83] **Macková E.** In vitro hodnocení antiproliferativních účinků nových intracelulárních chelátorů železa. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010.