



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Nové karborany jako inhibitory anhydrázy uhličitanu vápenatého

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Nikol Kašpárková**

Studijní obor: Experimentální biologie

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Jana Dvořanová Štěpánková, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Nikol Kašpárková

Název práce: Nové karborany jako inhibitory anhydrázy uhličitanu vápenatého 9

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Laboratoř Experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP

Vedoucí práce: Jana Dvořanová Štěpánková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt:

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium proteinu anhydrázy uhličitanu vápenatého IX (CA IX). Jedná se o formu anhydrázy, která podporuje přežití nádorových buněk v hypoxickém prostředí. Teoretická část je věnována studiu CA IX, její struktuře, expresi a inhibici zvolenými léčivy. Předmětem experimentální části je zjistit zdali vybraná léčiva inhibují CA IX nejen na enzymatické, ale i na buněčné úrovni. Cílem této práce je optimalizovat podmínky detekce exprese CA IX a sledování vlivu inhibitorů.

Klíčová slova: rakovina, hypoxie, kyselé podmínky, pH, anhydráza uhličitanu vápenatého IX

Počet stran: 45

Počet příloh: 1 (CD ROM)

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Nikol Kašpárková

Title of thesis: Novel carboranes as carbonic anhydrase IX inhibitors

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

Supervisor: Mgr. Jan Dvořanová Štěpánková, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract:

This bachelor thesis is focused on the study of protein calcium carbonate anhydrase IX (CA IX). This is a form of carbonic anhydrase which help tumor cells to survive in the hypoxic environment. Theoretical part is aimed at description of CA IX, its structure, expression and inhibition by selected drugs. The experimental part is focused on determining whether the selected drugs inhibit CA IX only at enzymatical or also at cellular level. The aim of this work is to optimize conditions for detection of CA IX expression and impact of drug inhibition.

Keywords: cancer, hypoxia, acid conditions, pH, carbonic anhydrase IX

Number of pages: 45

Number of appendices: 1 (CD ROM)

Language: Czech

**Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně,
za použití citované literatury.**

V Olomouci dne 27.7.2015

.....

Ráda bych tímto poděkovala své vedoucí bakalářské práce, Mgr. Janě Dvořanové Štěpánkové, Ph.D., za její odbornou pomoc, ochotu a v neposlední řadě velkou trpělivost.

Velký dík patří i laboratoři Experimentální medicíny, Ústavu molekulární a translační medicíny, LF UP, za poskytnutí výborných podmínek pro práci na experimentální části mé bakalářské práce.

Infrastrukturní část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Obsah

1	Úvod	10
2	Cíle bakalářské práce	11
3	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1	Hypoxie solidních nádorů	12
3.1.1	Změna pH a podpora růstu nádoru	14
3.2	Anhydráza uhličitanu vápenatého IX	17
3.2.1	Struktura CA IX	19
3.2.2	Role CA IX	19
3.2.3	Inhibice CA IX	20
3.3	Sulfonamidy	20
3.3.1	Acetazolamid	20
3.3.2	Acetazolamid ve farmakologii	21
3.3.3	Farmakokinetika acetazolamidu	21
3.4	Karborany	22
3.5	Obecná struktura karboranů	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1	Testované deriváty	23
4.2	Chemikálie	23
4.3	Složení roztoků	23
4.4	Protilátky	24
4.5	Buněčná linie HT 29	25
4.6	Přístroje a vybavení použité při práci na experimentální části	25
4.7	Metodika	26
4.7.1	Pasážování buněk	26
4.7.2	Příprava buněčného lyzátu	26
4.7.3	Měření koncentrace proteinů v buněčných lyzátech	27
4.7.4	Metoda Western blot	27
4.7.5	MTT test	29
4.7.6	Měření pH buněk pomocí přístroje SDR SensorDish Reader	29
5	VÝSLEDKY	30
5.1	Výsledky Western blot	30

5.2	Výsledky MMT testu.....	31
5.3	Výsledky měření hodnot pH	34
6	Diskuze.....	38
7	Závěr	40
8	Použitá literatura.....	41

Seznam použitých zkratk

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného selhání imunity
ATP	Adenosine Monophosphate, adenosintrifosfát
BCA	Protein Assay Kit, Pierce testovací řada proteinu
BSA	Bovine serum albumine, hovězí sérum albuminu
BT	Bikarbonátový transportér
CA IX	Carbonic anhydrase, anhydráza uhličitanu vápenatého
CB	Carboran, označení látky
CD44	Marker
CDK	Cyklin dependentní kynáza
CNS	Centrální nervová soustava
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Mediu
DNA	Deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová
EPO	Erythropoetin
FCS	Foetal Calf Serum, fetální hovězí sérum
GLUT	Glukózové transportéry
HIF	Hypoxia-induced factor, transkripční faktor indukovaný hypoxií
HIV	Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
HRE	Hypoxia resonse element

HT 29	Buněčná linie získaná z lidské tkáně tlustého střeva
IC50	Half maximal inhibitory concentration
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr
PHD	Propyl – 4 – hydrogenáza
pHe	Extracelulární pH
pHi	Intracelulární pH
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
SDS	Dodecylsulfát sodný
TBS	10x Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGS	10x Tris/glycine/SDS running buffer
Triple	Činidlo sloužící k disociaci buněčných linií
TRIS	Tris base, Tris[hydroxymethyl]aminomethane
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VHL	Von Hippel – Lindau protein, supresurový protein

1 Úvod

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na studium proteinu anhydrázy uhličitanu vápenatého IX (CA IX) exprimovaného v různých typech pevných nádorů s hypoxickými centry. CA IX je transmembránová izoforma anhydráz uhličitanu vápenatého zajišťující přežití nádorových buněk za hypoxických podmínek regulací vnitrobuněčného pH. CA IX je studována jako marker hypoxie, prognostický indikátor a potenciální terapeutický cíl.

Řada odborných prací je zaměřená na studium inhibice aktivity CA IX, zatím však selektivní inhibitor CAIX nebyl popsán. Jednou ze studovaných skupiny látek jsou sulfonamidy, které se podílejí na inhibici anhydráz uhličitanu vápenatého.

V teoretické části práce jsou popsány karborany a sulfonamidy. V chemické knihovně ÚMTM jsou uloženy karborany se sulfonamidovým zbytkem inhibující CA IX na enzymatické úrovni. Předmětem praktické části bakalářské práce je stanovit zda vybrané léčiva inhibují CA IX i na úrovni buněčné.

2 Cíle bakalářské práce

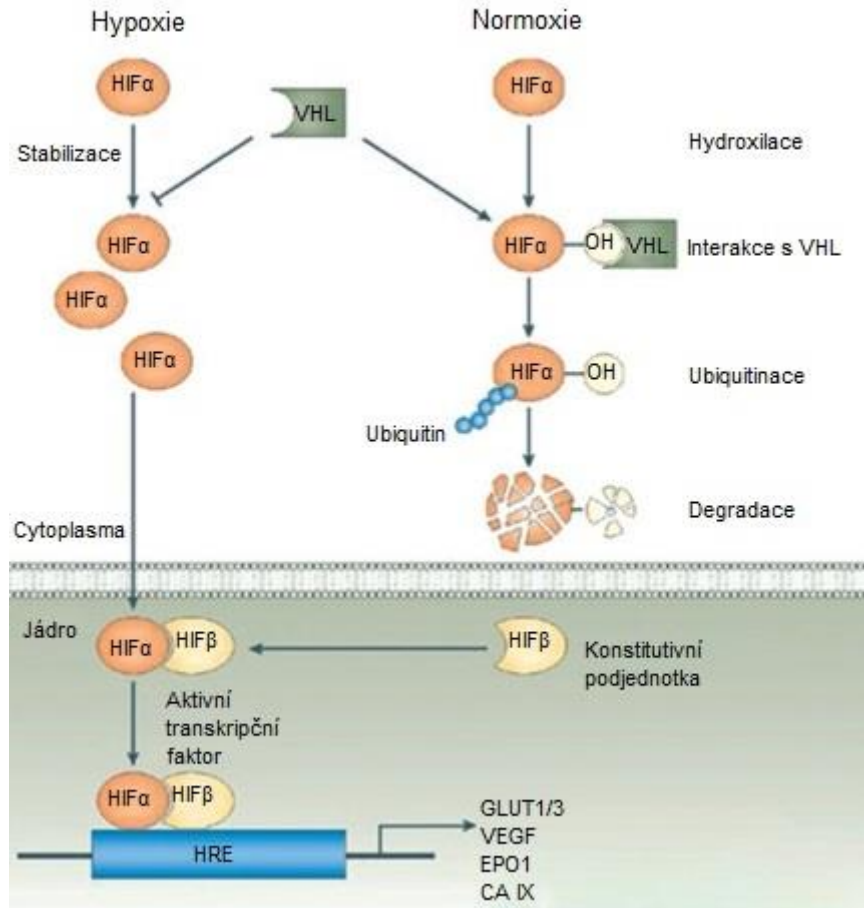
Cílem bakalářské práce je zjistit, zda vybrané léčiva s inhibičním účinkem vůči CA IX na enzymatické úrovni, inhibují aktivitu CA IX a také na úrovni buněčné. Za tímto účelem budou na vybrané buněčné linii optimalizovány podmínky pro detekci zvýšené exprese CA IX a následně sledován vliv inhibitorů na okyselení extracelulárního pH za hypoxických podmínek. Koncentrace léčiv v experimentu bude zvolena na základě testu cytotoxicity.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Hypoxie solidních nádorů

Následkem hypoxie, oblastí s nízkým parciálním tlakem kyslíku, dochází k nedostatečnému okysličení buněk a vyvolávají jejich základní metabolické změny. Hypoxie hraje klíčovou roli v nádorových buňkách a podílí se jak na projevu fenotypu, tak na progresi rakoviny. Mezi jedny z nejčastějších metabolických změn způsobených hypoxií jsou procesy změny v metabolismu glykolýzy, snížení buněčné proliferace a adheze buněk, zvýšení migrace a invaze (Sedlakova O. et. al. 2014).

Expresi hypoxií indukovaných genů je zajištěna HIF-1 transkripčním faktorem. HIF-1 je heterodimer složený z neustále exprimované podjednotky β a na kyslíkem regulované podjednotce α (Obr. 1). HIF α je podjednotka citlivá na kyslík a vyskytuje se přirozeně v dobře okysličených buňkách. Za normální hladiny kyslíku se v buňce na HIF α váže prolyl-4-hydrogenáza (PHD) a poté na takto hydroxylovaný protein se váže von Hippel-Lindau (VHL), přičemž dochází k degradaci ubiquitin-proteázového systému. Za hypoxických podmínek však k navázání VHL proteinu nedochází, důvodem je nefunkčnost PHD, která je potřebná k jeho navázání. HIF α není tedy rozeznáván VHL proteinem, dochází ke stabilizaci a hromadění HIF α . Za těchto podmínek HIF α může procházet do jádra, kde se dimerizuje s podjednotkou HIF- β . Tato reakce dvou podjednotek vede k tvorbě aktivního transkripčního komplexu. HIF transkripční faktor se váže na specifickou oblast v promotoru (HRE, hypoxia response element) cílených genů a aktivuje jejich transkripci. Ovlivněny jsou geny pro glukózové transportéry (GLUT1 a GLUT3), které jsou zahrnuty v metabolismu glukózy, vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), který spouští neoangiogenezi, erythropoietin (EPO1), zahrnutý při tvorbě erytrocytů a anhydráza uhličitanu vápenatého IX (CA IX) zajišťující regulaci pH a tvorbu nových nádorů. Dále dochází k expresi genů zajišťujících buněčné přežití, proliferaci, metabolismus a další procesy. Proteiny exprimované z HIF aktivních genů jako je glukóza, laktátové transportéry, iontové transportery, glykolytické enzymy nebo angiogenetické faktory a receptory, se adaptují na hypoxické prostředí, a proto hrají klíčovou roli v progresi nádorů (Supuran CT. et. al. 2011, Mario Perez-Sayans et. al. 2012).



Obr. 1: Schéma role CA IX v hypoxii (Převzato a jazykově upraveno dle Supuran CT., 2011).

Adaptace buněk na hypoxické prostředí, představují dramatický posun metabolismu glukózy. V normálních buňkách je glukóza převedena na glukózu-6-fosfát a poté na pyruvát, který se oxiduje v mitochondriích na oxid uhličitý a vodu, čímž se uvolní 38 molekul adenosintrifosfátu (ATP). Ve srovnání s normálními buňkami nádorové buňky redukuje pyruvát získaný v prvním kroku procesu na laktát, přitom se uvolní pouze 2 molekul ATP. Tento způsob metabolismu glukózy u nádorových buněk přetrvává i po reoxygenaci. Uvolněný laktát a pyruvát může být použit pro biosyntézu aminokyselin, nukleotidů, lipidů a poskytnout příznivé podmínky pro proliferaci buněk (Gatenby, R. A. et. al. 2004; Ebbesen, P. et al. 2009).

Onkogenní metabolismus vede ke zvýšené produkci kyselých metabolitů laktátu, protonů a oxidu uhličitého. Akumulace těchto kyselých metabolitů vede k intracelulární acidóze, která je neslučitelná s přežitím a následným množením buněk. Nádorové buňky proto aktivují iontové transportéry a čerpadla, tím vytvoří a udržují slabě alkalické intracelulární pH (pHi), které je optimální pro nádorové přežití a následné množení buněk. Transport H^+ vede ke snížení extracelulárního pH (pHe) až na hodnoty 6,0. Důležitou úlohu v této pH regulaci hraje CA IX. (Gatenby, R. A. et al. 2004; Ebbesen, P. et al. 2009).

3.1.1 Změna pH a podpora růstu nádoru

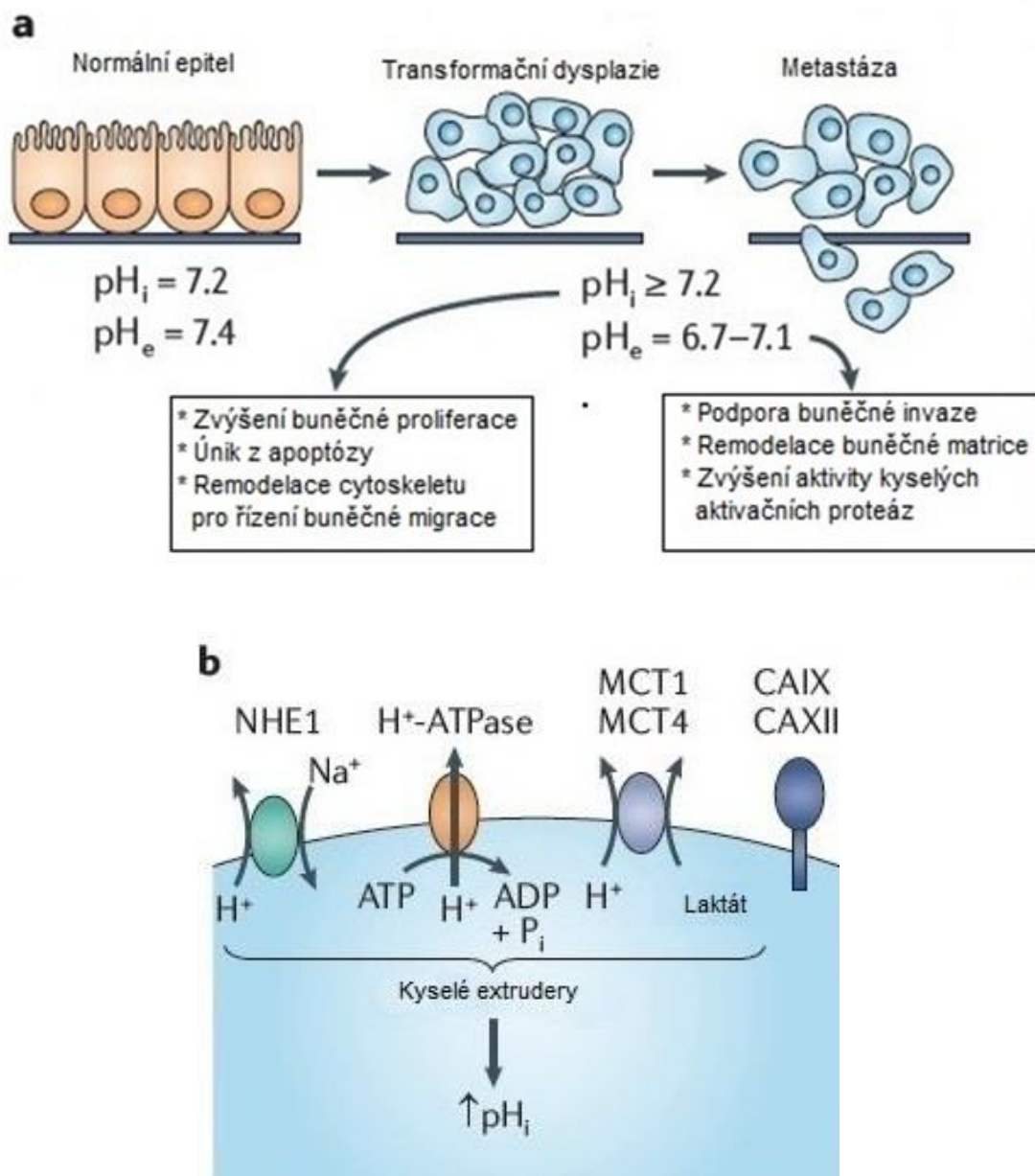
Změny pH jsou většinou způsobeny nějakým signálem pro proliferaci buněk (Pouyssegur et. al. 1985). Zvýšení pHi, podporuje přežití buněk, které se nacházejí ve fázi apoptózy, ta je spojená s intracelulárním okyselením buňky (Lagadic-Gossmann, D. et. al. 2004). Z tohoto důvodu vysoké pHi dodává nádorovým buňkám dva charakteristické znaky, a to další možnost množení a úniku z apoptózy. $pHi > 7,2$ urychluje vstup buňky do S- fáze, kdy dochází k replikaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA), a následný postup do G2/ M fáze (Putney L. K. et. al. 2003). Naopak $pHi < 7,2$ snižuje rychlost postupu buňky do fáze G2/ M, a to způsobuje omezení aktivity mitotického regulačního komplexu a omezení cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1) – cyclin B1 (Harada K. et. al. 2003).

Vyšší pHi také potlačuje proces mitózy, která se spouští aktivací DNA v poškozené kontrolní části (Zhao, R. et al. 2007), a proto představuje speciální formu vstupu buňky do mitotické fáze. Tímto se dostáváme k další předností nádorových buněk a tím je vynechání kontrolního bodu v buněčném cyklu. Zvýšené pHi podporuje nejen neomezenou proliferaci, ale také genetickou nestabilitu (Harguindey S. et. al. 2005).

V normálně se dělících buňkách je pHi obvykle $\sim 7,2$ a nižší než pHe ($\sim 7,4$). Zatímco nádorové buňky mají vyšší pHi $\geq 7,4$ a nižší pHe $\sim 6,7-7,1$ (Gillies et. al. 2000). Tento obrácený pH gradient podporuje tvorbu metastáz (Obr. 2a). Zvášené pHi souvisí se zvášenou proliferací, únikem z apoptózy, remodelací cytoskeletu spojenou s řízením buněčné invaze. Okyselení extracelulárního prostoru podporuje buněčnou

invazi a rozptyl, remodeluje buněčnou matici a stimuluje proteázy aktivované v kyselém prostředí (Webb BA. et. al. 2011).

Zvášení pHi nádorových buněk je paradoxně zodpovědné za vyšší proliferaci a rychlejší glykolýzu, což vede k rychlejší produkci kyselých metabolitů. Avšak změny v expresi a v aktivaci iontových pump a transportérů usnadňuje eflux H⁺ a zachovává vyšší pHi a nižší pHe (Obr. 2b) (Webb BA. et. al. 2011).



Obr. 2: Schéma role pH na progresi rakoviny. **a:** Rakovinové buňky mají obrácený pH gradient v porovnání s normálně diferencovanými buňkami. Vykazují vyšší intracelulární pH (pH_i) a nižšího extracelulární pH (pH_e). **b:** Zvýšená exprese a aktivita membránových transportérů v plazmě, především transportéry H⁺ a anhydrázy uhličitánů vápenatého (CA IX, CA XII), udržují vyšší pH_i a nižší pH_e u nádorových buněk (Převzato a jazykově upraveno dle Webb BA et. al. 2011)

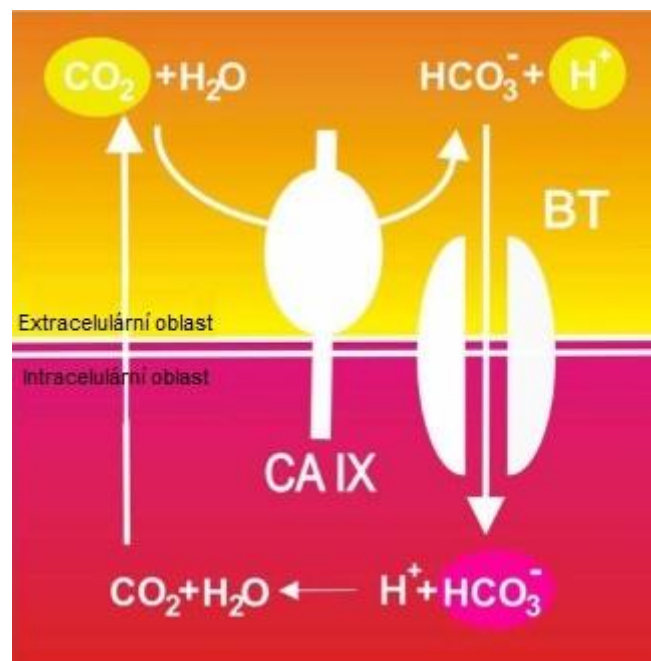
3.2 Anhydráza uhličitanu vápenatého IX

CA IX je jedna z patnácti lidských izoform anhydráz uhličitanu vápenatého (Pastorek J. et. al. 1994), které jsou zastoupeny ve všech buňkách a tkáních lidského těla a účastní fyziologických procesů pro transport vody a iontů a zajištění acido-bazické rovnováhy. Tyto metaloenzymy katalyzují hydrataci oxidu uhličitého na bikarbonátové ionty a protony a jejich aktivní přesun do oblastí s nižší koncentrací (Obr. 3) (Pastorekova S. et. al. 2004). Důležité je, že CA IX není exprimována ve většině normálních tkání, jen v žaludku a epitelu žlučníku (Pastorekova S. et. al. 1997). Na druhou stranu je velmi často a silně exprimována v nádorech, především ve velmi agresivních typech (Ivanov S. et. al. 2001; Tafreshi NK. et. al. 2012).

CA IX, isoforma anhydrázy uhličitanu vápenatého, vázaná na membránu buňky, je pro svůj vysoký výskyt v nádorových buňkách často spojována s rakovinou. Exprese CA IX je regulována HIF transkripčním faktorem, který se objevuje v buňkách za hypoxických podmínek. Vzájemná souvislost tohoto faktoru a CA IX vede ke snížení citlivosti organismu na klasickou formu chemoterapie nebo radioterapie. CA IX přispívá k okyselení v prostředí nádoru a účinně katalyzuje hydrataci oxidu uhličitého na bikarbonát a protony, což vede k chemorezistenci metastáz na slabě bazické protinádorové léky. Jelikož CA IX mohou poskytovat H^+ nebo HCO_3^- ionty, účastní se mnoha fyziologických procesů, jako je buněčné dýchání acidobazická regulace, kalcifikace nebo sekrece různé řady elektrolytů. Bylo také prokázáno, že CA IX se podílí na regulaci pH a buněčných adhezních procesů způsobených metabolismem nádorů (Thiry A. et. al. 2006; Supuran C.T. 2004).

Exprese CA IX se zvyšuje díky HIF aktivační kaskádě v hypoxických buňkách a je regulována von Hippel-Lindau nádorovým proteinem. CA IX se zcela přirozeně vyskytuje v některých částech lidského těla. Nejvyšší hladina CA IX byla v žaludku. Je velmi znepokojivé, pokud se CA IX vyskytuje i v jiných částech těla ve vyšší koncentraci. U většiny případů zvýšená koncentrace této isoformy CA značí zárodek zhoubných nádorů. K nejčastější expresi CA IX dochází u karcinomů vzniklých z tkání, jako jsou například karcinom děložního čípku, plic, jícnu nebo mozku.

Vědci tedy přicházejí s myšlenkou, že pokud se podaří inhibovat proces CA IX, dojde ke snížení intracelulárního pH a tak ke snížení proliferace buněk a indukci buněk (Thiry A. et. al. 2006; Supuran, C.T. 2004).



Obr. 3: Schématické znázorňující katalytickou roli CA IX v regulaci pH u nádorových buněk. CA IX katalyzuje hydrataci CO_2 v okolí buňky na bikarbonátové ionty a protony. Protony zůstávají na extracelulární straně plazmatické membrány a přispívají k acidifikaci vnějšího prostředí. Zatímco bikarbonátové ionty jsou převáděny pomocí bikarbonátových transportérů (BT) do intracelulární oblasti, dochází tak k neutralizaci pH uvnitř buňky. Bikarbonátové ionty reagují s protony za tvorby CO_2 . Následně dojde k difuzi CO_2 do vnějšího prostředí buňky, kde může být hydratováno prostřednictvím CA IX (Převzato a jazykově upraveno dle Sedlakova O. et. al. 2014).

3.2.1 Struktura CA IX

CA IX je multidoménný, transmembránový protein se složitějším uspořádáním. Forma CA IX se skládá z intracitosolické části, kde probíhá fosforylace, dále pak krátkého transmembránového úseku a extracelulární katalytické domény (Pastoreková S. et al. 2004; Pastoreková, S. et al. 1992). Jedinečná doména pro CA IX je proteoglykan. Proteoglykan v CA IX je rozpoznáván monoklonální protilátkou M75. Ta umožňuje počáteční identifikaci a klonování CA IX a je využívána pro detekci nádorové tkáně (Sedlakova O. et al. 2014; Pastorek J. et al. 1994). Protein proteoglykan hraje také zásadní roli v procesu buněčné adheze u nádorových buněk (Pastorekova S. et al. 2004; Svastova E. et al. 2003).

3.2.2 Role CA IX

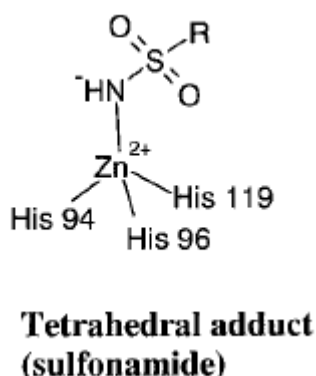
Správná kontrola pH je důležitá i pro buněčnou migraci a invazi. Na tomto procesu se podílejí oblasti buněk zvané lamellipodia a invadopodia, které jsou charakteristické svou absencí mitochondrií, glykolytické výroby energie, intenzivním transportem iontů (Stock C. et al. 2009). Tyto transportery umožňují pohyb, a to tím způsobem, že vytlačují laktát, protony a CO_2 a importují CO_2 . To vytváří kyselé pH na vnější straně membrány a mírně alkalické prostředí uvnitř buňky (Stock C. et al. 2009). Zvýšená exprese CA IX podporuje migraci/ invazi buněk. Potlačení CA IX nebo delece jeho katalytické aktivity vede ke snížení těchto procesů, které jsou prvními kroky šíření metastáz v těle (Svastova E, et al. 2012). Tato myšlenka nabízí slibnou animetastatickou strategii. Exprese CA IX koreluje s expresí kmenových buněk markeru CD44, (Fujiwara D, et al. 2013), pokud tedy dojde k inhibici CA IX, následuje i inhibice rakoviny (Lock FE, et al. 2013). To vše je v souladu s preklinickými důkazy. Vyčerpání nebo farmakologická inhibice CA IX, způsobuje útlum nádoru (Lou Y, et al. 2011).

3.2.3 Inhibice CA IX

Potlačení, delece katalytické domény nebo farmakologická inhibice CA IX má za následek nepatrně nižší růst nádorové tkáně, a to, že buňky zmírňují své škodlivé účinky extracelulární acidózy za hypoxických podmínek (Lou Y, et. al. 2011). CA IX rovněž přispívá k odolnosti na radioterapii a chemoterapii. Nádory exprimující vysoké hladiny CA IX jsou méně citlivé na experimentální léčbu, a inhibice CA IX katalytické aktivity výrazně snižuje jejich rezistenci k chemoterapii nebo radioterapii (Dubois L, et. al. 2011).

3.3 Sulfonamidy

Ukázalo se, že vazba sulfonamidů na aktivní místo zinkového iontu má jedinečnou vlastnost inhibovat CA. Záporně nabitý dusík, je navázán na iont zinku a vytváří tak silnou afinitu sulfonamidové skupiny na zinkový prvek CA (Obr. 4) (Abbate F, et. al. 2002).

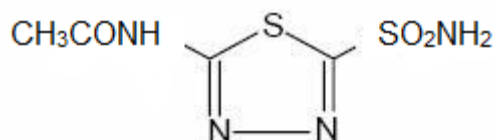


Obr. 4: Připojení sulfonamidů na zinkový atom CA způsobující inhibici funkce CA

(Převzato a upraveno dle Supuran CT. et. al. 2003)

3.3.1 Acetazolamid

Acetazolamid je lék známý také pod komerčním názvem Diamox nebo Atenezol. Jedná se o inhibitor enzymu, který má specifický účinek na karboanhydrázy. Látka se jeví jako bílá, až nažloutlá a má krystalickou formu. Chemický název této sloučeniny je N-(5-sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl) (Obr. 5). Acetazolamid je možné podávat intravenózně nebo v podobě potahovaných tablet (Dollery C. 1999)



Obr. 5: Strukturní vzorec Acetazolamidu ($C_4H_6N_4O_3S_2$) (Převzato a upraveno z knihy Dollery C. 1999)

Acetazolamid ve farmakologii

Acetazolamid účinně tlumí sekreci tekutiny v případě onemocnění zeleným zákalem, snižuje totiž rychlost tvorby komorové vody, čímž se snižuje nitrooční tlak (Friedland BR, et. al., 1977). Používá se také při léčbě některých poruch centrálního nervového systému (CNS), jako je například epilepsie nebo při poruše vylučování moči. Acetazolamid ovlivňuje reakci hydratace oxidu uhličitého a dehydrataci kyseliny uhličitě. Výsledkem je ztráta HCO_3 iontů v ledvinových tubulech, a to má za následek zvýšení diurézy primární moči (Dollery C. 1999).

Farmakokinetika acetazolamidu

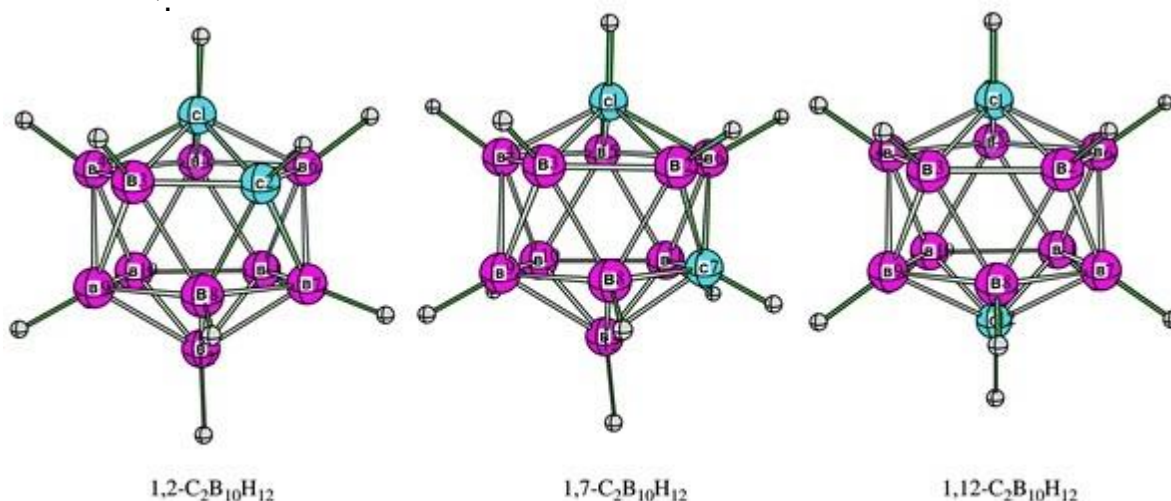
Nejvíce využívanou metodou analýzy krevní plazmy na přítomnost acetazolamidu je kapalinová chromatografie (Chambers DM, et. al., 1981) a plynová chromatografie (Wallace SM, et. al., 1977). Tento lék je vylučován v nezměněné formě v moči a nebyla dosud zjištěna jeho afinita k jakýmkoliv tkáním. Acetazolamid je zcela netoxický, ojedinělé nežádoucí účinky byly potvrzeny pouze u pacientů s alergickou reakcí nebo přecitlivělostí na sulfonamidy. Zvýšené opatrnosti dávkování je třeba dbát u kojících matek a starších lidí. Jelikož není acetazolamid metabolizovaný v játrech, může dojít při podání větší dávky léku k ospalosti až dezorientaci pacienta (Dollery C. 1999).

3.4 Karborany

Jedná se o unikátní látky, které se skládají ze sloučenin boru, uhlíku a vodíku. Modifikace těchto karboranů a metallakarboranů mohou být použity jako inhibitory k potenciálním terapeutickým účelům v oblasti lidských a virových enzymů. Právě tyto sloučeniny, jsou v poslední době často využívány při vývoji nového léku proti syndromu získaného selhání imunity (AIDS). Jedná se o látky, které by dokázaly blokovat vývojový cyklus viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) tím, že zastaví činnost HIV-proteázy (Kozisek M. et. al. 2008; Rezacova P. et. al. 2009). Karborany jsou také studovány jako inhibitory CA IX (Brynda J. et. al. 2012).

3.5 Obecná struktura karboranů

Karborany mají polyhedrální strukturu, tedy strukturu podobnou diamantu. Díky této struktuře jsou karborany a jejich deriváty isoelektricky podobné. Při číslování jednotlivých atomů ve struktuře karboranu se vychází vždy od prvku s nejnižším počtem vazeb a po směru hodinových ručiček. Jako u boranů se v nomenklatuře používají sekundární předpony closo-, nido-, arachno-, hypho-, ortho-, atd. Nejpoužívanějším karboranem je $C_2B_{10}H_{12}$ (Obr. 6). Vzniká reakcí acetylenu s dekarboranem za přítomnosti diethyl-sulfidu (George B. Kauffmann, Carborane, Encyclopedia Britannica, 2015).



Obr. 6: Struktura hyperkarboranu v polyhedrální struktuře. (Převzato a upraveno dle Eluvathingal D. Jemmis, et. al. 2006)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Testované deriváty

Testované deriváty CB-30, CB-31, CB-33 jsou odvozené od karboranu 1,2-C₂B₁₀H₁₂, a obsahují sulfonamidový zbytek. U látek byla potvrzena inhibice CA IX na enzymatické úrovni.

4.2 Chemikálie

Methanol (Lach-Ner), 2-merkptoethanol 98% (Sigma-Aldrich), Triple (Life Technologies), McCoy medium (Sigma Aldrich), Sodium Bicarbonate (Sigma Aldrich), Deoxycholát sodný (Sigma aldrich), Tween 20 (Sigma Aldrich), TRIS (Sigma Aldrich), EDTA (Sigma Aldrich), TGS (Bio-Rad), SDS (Sigma Aldrich), MTT (Sigma Aldrich), BSA (Sigma Aldrich), Pierce (Thermo Scientific), DMSO (Sigma Aldrich), DMEM (Sigma Aldrich), TEMED (Sigma Aldrich), MARKER 26634 (Life Technologies), TBS (Bio-Rad), Akrylamid (Bio-Rad), Amonium Persulfát (Sigma Aldrich)

4.3 Složení roztoků

- **Médium McCoy:** 500ml McCoy média, 55ml 10% FCS (Foetal Calf Serum), směs Streptomycin + Penicilin 5 ml, L-Glutamin (200mmol/l);
- **DMEM pro měření extracelulárního pH:** 1l H₂O, DMEM médium v práškové formě (Sigma Aldrich) rozpustit v příslušném množství vody, NaHCO₃ upravit na 11mM, 10% FCS;
- **RIPA pufr:** 150 mmol/l NaCl, 1% Tween x-100, 0,5% deoxycholát sodný, 1% SDS, 50mmol/l TRIS pH 8, 1mmol/l kyselina ethylendiaminteraoctová (EDTA), Rosche proteázový inhibitor, Rosche fosfátový inhibitor;
- **Pierce roztok:** 20ml Pierce roztoku + Ionic Detergent (Thermo Scientific, 22663) ve formě prášku;

- **PBS pufr:** 8 g NaCl + 800 ml H₂O, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄; pH upraveno na 7,4 a doplněno do 1 l H₂O;
- **10x TGS, pufr na elektroforézu:** 100ml 10x TGS (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3), 900ml H₂O;
- **1x TBS/T:** 100ml 10x TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.4), 900 ml H₂O, 1 ml Tween 20;
- **Blokovací pufr 5% mléko:** 2 g sušeného mléka, 40 ml H₂O;
- **MTT pufr:** 5 mg/ml 3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid;
- **1x SDS pufr:** 500 ml 2% dodecylsulfátu sodného, 500 ml H₂O;
- **Katodový pufr:** 25 mM TRIS (1,5 g na 500 ml deionizované vody), pH upraveno na 9,4;
- **Anodový pufr I.:** 0,3 M TRIS (18,15 g na 500 ml deionizované vody), pH upraveno na 10,4;
- **Anodový pufr II.:** 25 mM TRIS (1.5 g na 500 ml deionizované vody), pH upraveno na 10,4;
- **Separační gel:** 4,95 ml H₂O, 6 ml 30% akrylamidu, 3,75 ml 1,5 M TRIS (pH 8,8), 0,15 ml 10% SDS, 0,15 ml 10% amonium persulfátu, 6 µl tetramethylethylendiaminu (TEMED);
- **Zaostřovací gel:** 7 ml H₂O, 1,65 ml 30% akrylamidu, 1,25 ml 1M TRIS (pH 6,8), 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% amonium persulfátu, 20 µl TEMED;
- **Primary Antibody Dilution Buffer:** 1xTBS, 0,1% Tween 20, 1,25 g BSA, 20 ml H₂O;

4.4 Protilátky

Byly použity primární protilátky anti CA IX (Santa Cruz Biotechnology) a anti β-Tubulin (Sigma Aldrich). Obě tyto protilátky jsme ředili v poměru 1 : 80 000 v 5% mléce.

Ze skupiny sekundárních protilátek byly použity anti-Rabbit (Alexa Fluor 488 Sigma Aldrich), kterou jsme aplikovali na primární protilátku CA a anti-Mouse (F2 883 Sigma Aldrich), kterou jsme stejně jako v předchozím případě aplikovali tentokrát na druhou zvolenou primární protilátku β-Tubulin.

4.5 Buněčná linie HT 29

Buněčná linie HT 29 je získávána z lidské tkáně tlustého střeva. Používá se zejména při léčbě kolorektálního adenokarcinomu.

Buněčná linie byla kultivována v McCoy médiu s 10% fetálním hovězím sérem (FCS), streptomycinem a 200 mmol/l L- Glicinem. Linie byla uchovávána při -80°C v hladícím boxu nebo inkubátoru při 37°C a 5% CO₂. Práce s HT 29 byla prováděna ve flowboxu s laminárním prouděním vzduchu.

4.6 Přístroje a vybavení použité při práci na experimentální části

Sada automatických pipet (Eppendorf), mikroskop IX51 (Olympus), mikroskop Primo Vert (Zeiss), laboratorní váha K0003 (AND), magnetická míchačka RTC Basic (IKA), vortex Genie 2 (Scientific Industries), elektroforetický zdroj PowerPacTM HC Power Supply (Bio-Rad), aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací zařízení Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), proteinový detekční systém a zároveň přístroj na promývání a blokování membrán SNAP i.d. 2.0 Systém (Select Science), přístroj na měření pH (SDR Sensor Dish Reader, PreSens), automatický čítač buněk ViCell XR (Beckmann Coulter), flowbox s laminárním prouděním vzduchu MSC Advantage (Thermo Scientific), inkubátor na normoxické podmínky (Thermo Scientific), inkubátor na hypoxické podmínky (Thermo Scientific), přístroj na měření absorbance (EnVision Multimode Plate Reader, PerkinElmer), centrifuga (Hettich), termostat (Mettmert)

4.7 Metodika

4.7.1 Pasážování buněk

Buněčné linie HT-29 nasazené na středním flasku (75 cm²) ponechány růstu v inkubátoru (5% CO₂, 17% O₂, 37°C) do 90% konfluence byly pasážovány 2x týdně. Z flasku bylo odstraněno médium, buňky byly promyty fosfátovým pufr (PBS) pufr (37°C) a přidání 1 ml disociačního činidla (Triple). Flask byl opět vložen do inkubátoru na 5 minut. Po uvolnění buněk bylo na deaktivaci Triplu použito McCoy médium a buněčná suspenze byla převedena do 50 ml falkony. Buňky byly spočítány pomocí automatického analyzátoru ViCell. Do nového flasku byly buňky nasazeny v koncentraci 1,5x10⁶ buněk na flask v objemu 20 ml McCoy média.

4.7.2 Příprava buněčného lyzátu

Adherentní buněčné linie HT-29 kultivované na Petriho miskách do požadované konfluence nebo po dokončení treatmentu byly promyty ledovým PBS a plastovou škrabkou odstraněny z misky do 15 ml zkumavky. Buňky byly spočítány pomocí automatického analyzátoru ViCell, dále centrifugovány 5 min při 4°C při 400 g, supernatant byl odsát a buňky rozsuspendovány ve 3 ml ledového PBS. Po opakované centrifugaci a promytí buněk ledovým PBS byl k buněčnému sedimentu přidán RIPA pufr (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer - 5 mil. buněk 100 µl RIPA pufru). Po převedení do 1,5 ml zkumavek byly buňky 15 min lyzovány na ledu a následně centrifugován 30 min 1600 g při 4 °C. Supernatant byl odpipetován a zamražen na -80°C.

4.7.3 Měření koncentrace proteinů v buněčných lyzátech

Pro vytvoření kalibrační křivky byly použity standardy firmy Thermo Scientific v koncentraci 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000. Buněčný lyzát byl naředěn 5x, 10x a 20x do RIPA pufru. Do 96 jamkového panelu bylo nanášeno 10 µl od každého naředěného vzorku, nakonec bylo přidáno 150 µl Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Panel byl inkubován 30 minut při 37°C. Pomocí přístroje EnVision Multimode Plate Reader byla snímána absorbance standardů, blanku a naředěných buněčných lyzátů o neznámé koncentraci. Z výsledků absorbancí standardů byla stanovena kalibrační křivka pro odvození hladiny proteinů ve studovaných vzorcích.

4.7.4 Metoda Western blot

Příprava vzorků

Zamrazené vzorky HT29 byly vyjmuty z -80 °C a uloženy na led. Měřením koncentrace vzorků metodou BCA jsme stanovili množství proteinu pro nanášení na polyakrylamidový gel.

Příprava gelů a elektroforéza

K našemu experimentu jsme zvolili separační a zaostřovací gel o tloušťce 1 mm. Do zatuhlých jamek v gelu bylo nanášeno 20 µg proteinu s nanášecím pufrům a také zvolený marker molekulové hmotnosti (26634 - Life Technologies). Sestavená elektroforéza byla zalita elektroforetickým pufrům. Separační část probíhala při 100 V po dobu 40 minut. Jakmile přešly vzorky do dělicího gelu, napětí bylo zvýšeno na 120 V a ponecháno dalších 60 minut.

Western blot

Po dokončení separace byl gel přenesen na připravené Whatman filtrační papíry, které byly předem pufrovány. Tři filtrační papíry pufrovány v katodovém pufru byly přeneseny na gel, následně na ně byla přenesena nitrocelulózová membrána s velikostí pórů 0,45 μm , která byla překryta dvěma filtračními papíry pufrovanými v anodovém pufru II a dále tři filtrační papíry pufrované v anodovém pufru I. Takto připravené vzorky byly vloženy do blotovacího přístroje Trans-Blot Turbo (Biorad) na dobu 30 minut 300V.

Blokování membrány

Připravené membrány byly promyty 1x TBS/T a následně barveny barvou Ponceau-S po dobu 5 minut. Obarvené membrány jsou opět promývány v 1x TBS/T. Poté byly blokovány 0,5% roztokem sušeného mléka a promývány 1x TBS/T na přístroji SNAP i.d. 2.0 (Milipore).

Imunodetekce na membráně

Na dno petriho misky byl položen navlhčený filtrační papír, pro zachování vlhkosti, a na něho parafilm o menších rozměrech. Na parafilm byla umístěna membrána a na ni nanášeny primární protilátky CA IX a β -Tubulin. Membrány byly inkubovány před noc v chladicí místnosti.

Připravený 5% roztok sušeného mléka byl rozdělen dvakrát po 10ml. Do jedné z falkonek byla přidána sekundární protilátka anti-Mouse (F2 883) a do druhé sekundární protilátka anti-Rabbit (AF 488), obě ředěny 1:1000. Membrána, která nesla primární protilátku CA IX byla vložena do misky s roztokem a protilátkou anti-Rabbit, do roztoku se sekundární protilátkou anti-Mouse byla vložena membrána s β -Tubulinem. Vše bylo inkubováno 1 hodinu na třepačce v pokojové teplotě. Po uplynulé době byly membrány 3x promyty 1x TBS/T.

4.7.5 MTT test

Pro stanovení citlivosti buněčných linií k testovaným derivátům byl zvolen tzv. MTT test. Jedná se o kolorimetrické vyhodnocení metabolické aktivity buněk. Principem metody je redukce 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan, který tvoří fialové krystaly. K redukci fialových krystalů dochází na membráně mitochondrií živých buněk (Mosmann, 1983). Na rozpuštění vzniklých krystalů se používá roztok dodecylsulfát sodný (SDS). Vyhodnocení se provádí pomocí měření absorbance na spektrofotometru. Absorbance je přímo úměrná počtu živých buněk.

Buňky byly nanесeny na 96 jamkové mikrotitrační destičky v koncentraci 10^4 buněk na jamku. Po 24 hodinách byla do kultivačního média k buňkám přidána testovaná léčiva v koncentrační řadě od 0,5 – 300 μM . Látky byly naředěny ze 100 mM zásobních roztoků v DMSO, zamražených v alikvotech na $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Inkubace probíhala 3 dny při 37°C , 5% CO_2 . Následně bylo do jamek přidáno MTT na výslednou koncentraci 0,12 mg/ml. Po 4 hodinové inkubaci byl k buňkám přidán 1:1 10% SDS pro rozpuštění formazanových krystalů. Výsledné zbarvení roztoku v jamkách bylo vyhodnoceno spektrofotometrem EnVision Multimode Plate Reader, PerkinElmer.

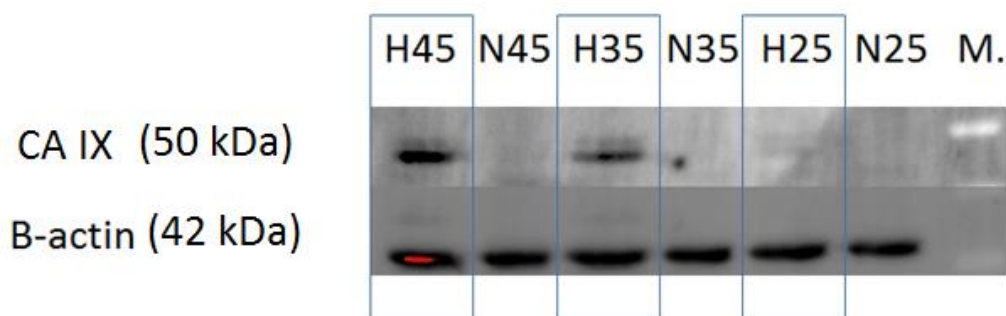
4.7.6 Měření pH buněk pomocí přístroje SDR SensorDish Reader

SDR SensorDish Reader je malý 24 jamkový snímač pro neinvazivní detekci kyslíku a pH v multititrační destičce. Ta obsahuje senzory na dně každé jamky. Signál je ze senzorů odečítán neinvazivně přes průhledné dno. Sensor Dish Reader byl umístěn v inkubátoru s hypoxickým prostředím a pH bylo odečítáno během kultivace buněk v průběhu 48 h každých 5 minut. Přístroj měří pH na 4 desetinné místa.

5 VÝSLEDKY

5.1 Výsledky Western blot

K ověření exprese CA IX v buněčných liniích HT-29 byla zvolena metoda Western blot. Buněčné linie byly inkubovány za hypoxických (1% O₂) a normoxických podmínek po dobu 25, 35 a 45 hodin (Obr. 7). Přítomnost proteinu CA IX v buňkách byla prokázána po 35 a 45 hodinách inkubaci v hypoxických podmínkách. Za normoxických podmínek exprese proteinu CA IX nebyla detekována. Optimální podmínky pro zvýšenou hladinu exprese proteinu CA IX byly zvoleny pro 45 hodinovou inkubaci buněčných linií HT-29 za hypoxických podmínek.



Obr. 7: Exprese proteinu CA IX. Byly použity lyzáty buněčné linie HT-29. Podmínky inkubace buněčných linií HT-29 před lyzí: (H45) hypoxie 45 h; (N45) normoxie 45 h; (H35) hypoxie 35 h, (N35) normoxie 35 h; (H25) hypoxie 25 h; (N25) normoxie 25 h; (M) marker molekulové hmotnosti Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Life Technologies).

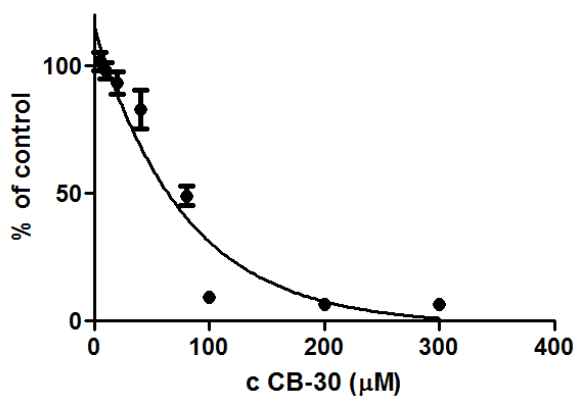
5.2 Výsledky MMT testu

Míra toxicity testovaných látek acetazolamidu, CB-30, CB-31 a CB-33 byla stanovena MTT testem. Látky byly testovány na buněčných liniích HT-29 ve dvou opakováních ze dvou různých pasáží.

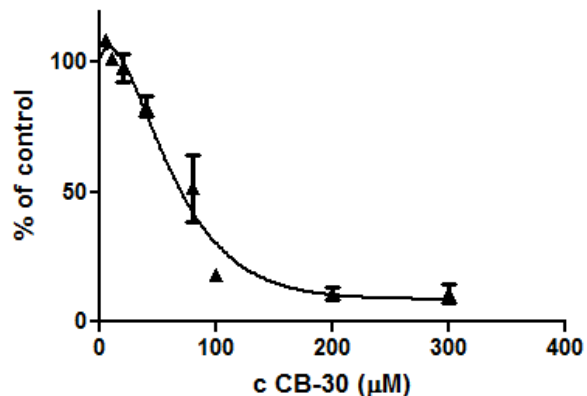
Hodnota absorbancí byla měřena při 540 nm. Hodnoty byly převedeny na procenta a pomocí programu GraphPad (SigmaPlot 11.0) byl stanovena hodnota IC₅₀ (Half maximal inhibitory concentration), tj. koncentrace látky způsobující zástavu metabolismu u 50% buněk. Směrodatná odchylka je uvedena v tabulce.

Obr. 8: Křivka přežití buněčných linií HT-29 v závislosti na koncentraci látek CB-30 za normoxických a hypoxických podmínek.

Normoxie CB – 30

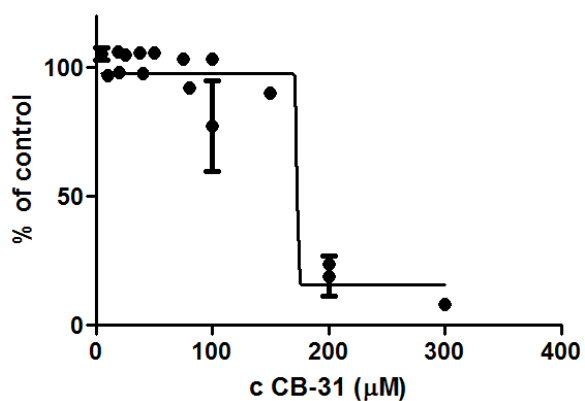


Hypoxie CB - 30

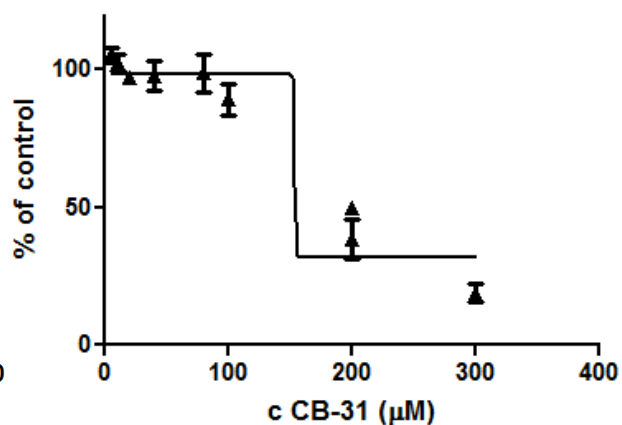


Obr. 9: Křivka přežití buněčných linií HT-29 v závislosti na koncentraci látek CB-31 za normoxických a hypoxických podmínek.

Normoxie CB – 31

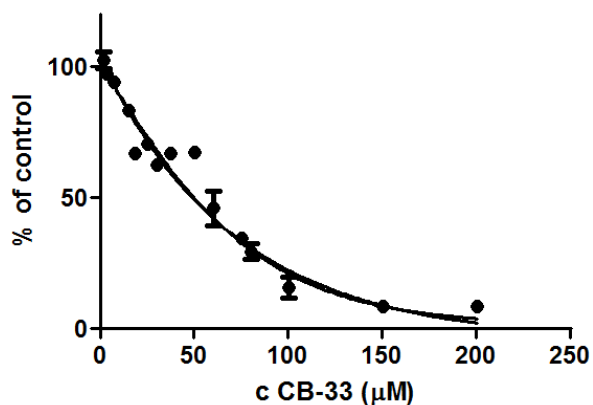


Hypoxie CB - 31

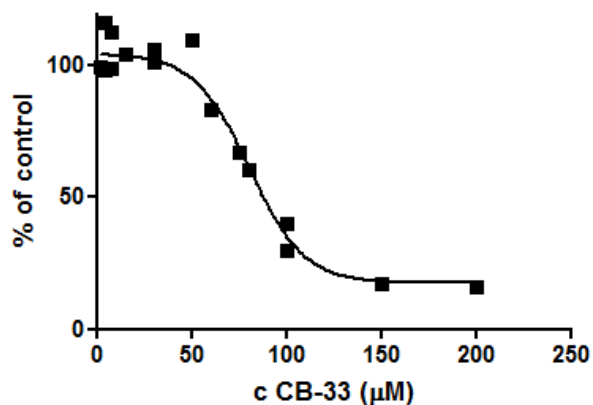


Obr. 10: Křivka přežití buněčných linií HT-29 v závislosti na koncentraci látek CB-33 za normoxických a hypoxických podmínek.

Normoxie CB – 33

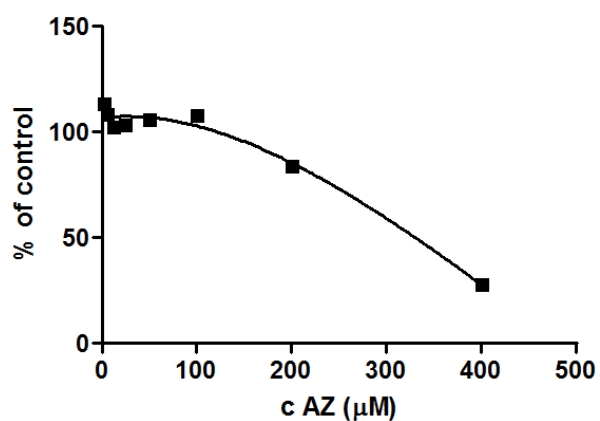


Hypoxie CB - 33

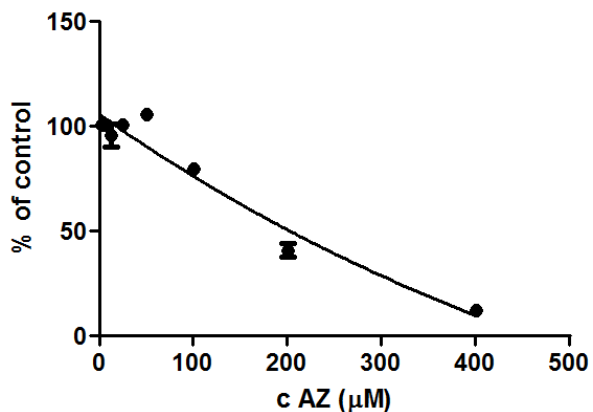


Obr. 11: Křivka přežití buněčných linií HT-29 v závislosti na koncentraci látky acetazolamid za normoxických a hypoxických podmínek.

Normoxie AZ



Hypoxie AZ



Tab. 1: Výsledky měření IC50 koncentrací jednotlivých látek za normoxických a hypoxických podmínek. Hodnoty IC50 jsou uvedeny v μM koncentraci.

Testovaná látka	Podmínky inkubace	Průměr hodnot IC50 \pm směrodatná odchylka
CB-30	Normoxie	64,3 \pm 5,70
	Hypoxie	71,4 \pm 10,07
CB-31	Normoxie	151,5 \pm 24,24
	Hypoxie	147,4 \pm 6,43
CB-33	Normoxie	50,4 \pm 3,08
	Hypoxie	92,6 \pm 2,55
AZ	Normoxie	203,0 \pm 13,26
	Hypoxie	330,0 \pm 3,41

5.3 Výsledky měření hodnot pH

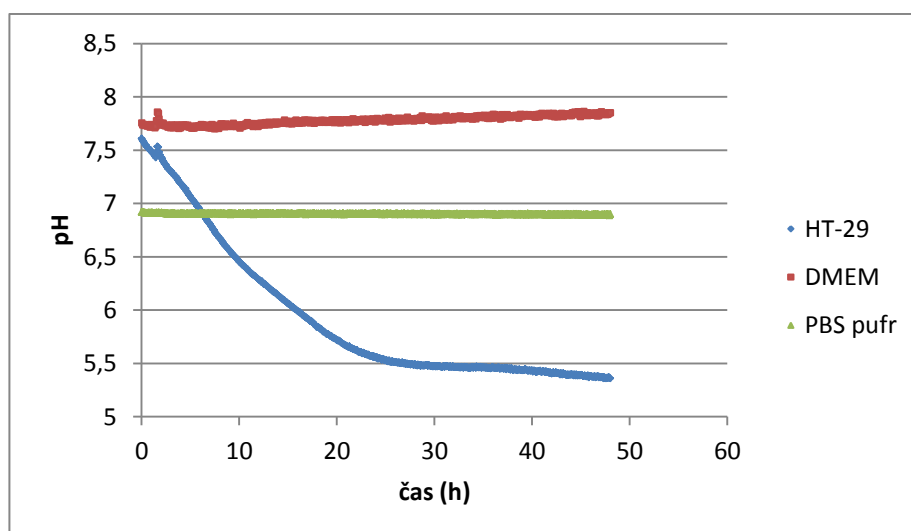
K ověření inhibice proteinu CAIX byla zvolena metoda detekce extracelulárního pH pomocí SDR přístroje od firmy PreSens. Buňky byly nasazeny do 12 jamek 24 jamkového panelu v koncentraci $2,2 \cdot 10^5$ buněk/jamku v McCoy médiu, do jedné jamky byl nanesen PBS pufr o upraveném pH na hodnotu 6,9 pro kontrolu správnosti měření SDR systému, do zbývajících jamek bylo nanášeno McCoy médium. Buňky byly ponechány přes noc v inkubátoru za normoxických podmínek, aby přisedly na dno jamky. Další den bylo McCoy médium vyměněno za médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Mediu) s 22 mM HCO_3^- s příslušným léčivem nebo bez něj. Léčivo bylo přidáno i do samotného DMEM média. 24 jamkový panel byl přenesen na SDR snímací zařízení umístěné v inkubátoru s hypoxickými podmínkami. Po dobu tří dnů po pěti minutách byl z jednotlivých jamek snímán fluorescenční signál, který byl automaticky přepočítán na hodnoty pH.

Hodnota pH PBS pufru po celou dobu měření odpovídá jeho skutečné hodnotě pH 6,9. (Obr. 12, zelená křivka), čímž jsme potvrdili správnost měření SDR systému.

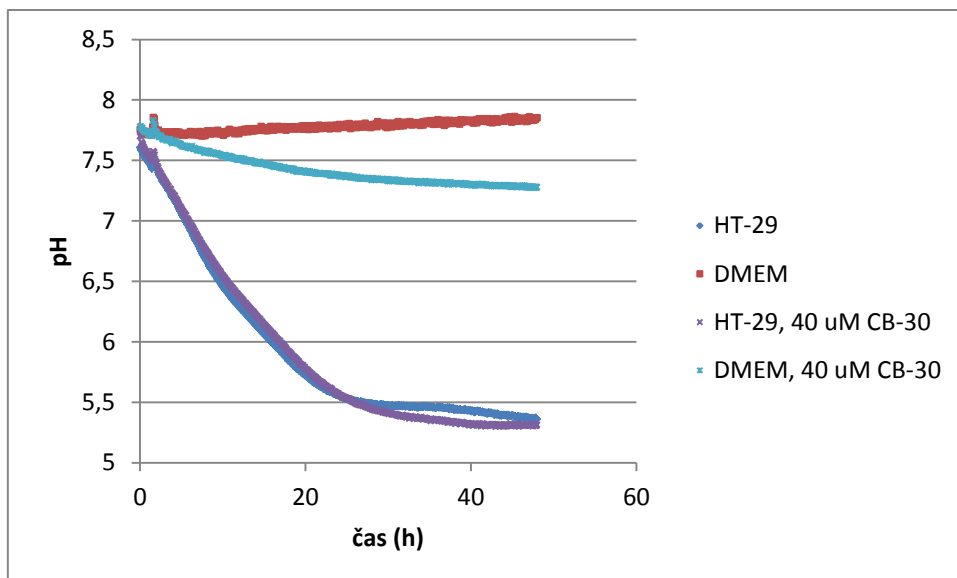
Hodnota pH DMEM média mírně se mírně zvýšila během dvou dnů měření od hodnoty 7,61 po hodnotu 7,89. Hodnota extracelulárního pH buněčných linií HT-29 se prudce snížila během prvních 20 hodin měření, dále mírně klesala a po 48 hodinách byla naměřena hodnota pH 5,36 (Obr. 12).

Buněčné linie HT-29 kultivovány v přítomnosti karboranu 40 μM CB-30 udržují hodnotu extracelulárního pH na stejných hodnotách jako u buněk HT-29 bez přítomnosti karboranu (Obr. 13). Pokud byl 40 μM CB-30 přidán do samotného DMEM média, jeho hodnota se za 48h snížila z pH 7,78 na pH 7,28. U karboran CB-31 v 40 μM koncentraci nebyla pozorována změna pH buněčné kultury v průběhu měření. Buněčné médium však bylo okyseleno za 48 h o 0,53 jednotky (Obr. 14). 40 μM kabrobran CB-33 neovlivňuje v průběhu dvou dnů měření ani pH média ani buněčné kultury (Obr. 15).

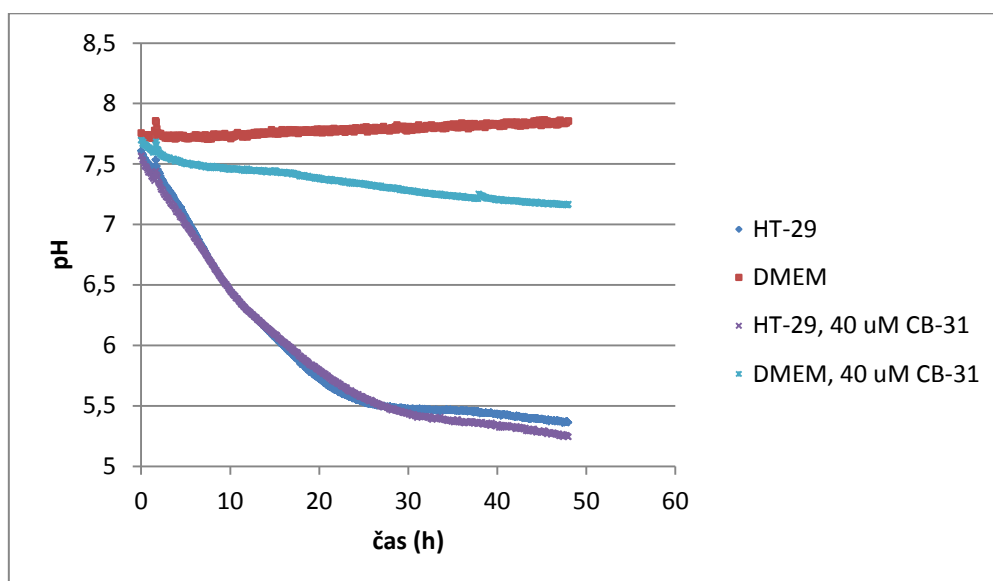
40 μM CB-30 a CB31 nemají vliv na extracelulární pH buněčných linií HT-29. Pokud dochází ke alkalizaci extracelulárního pH buněčných linií HT-29 vlivem inhibice CAIX, efekt je překryt kyselým pH těchto karboranů.



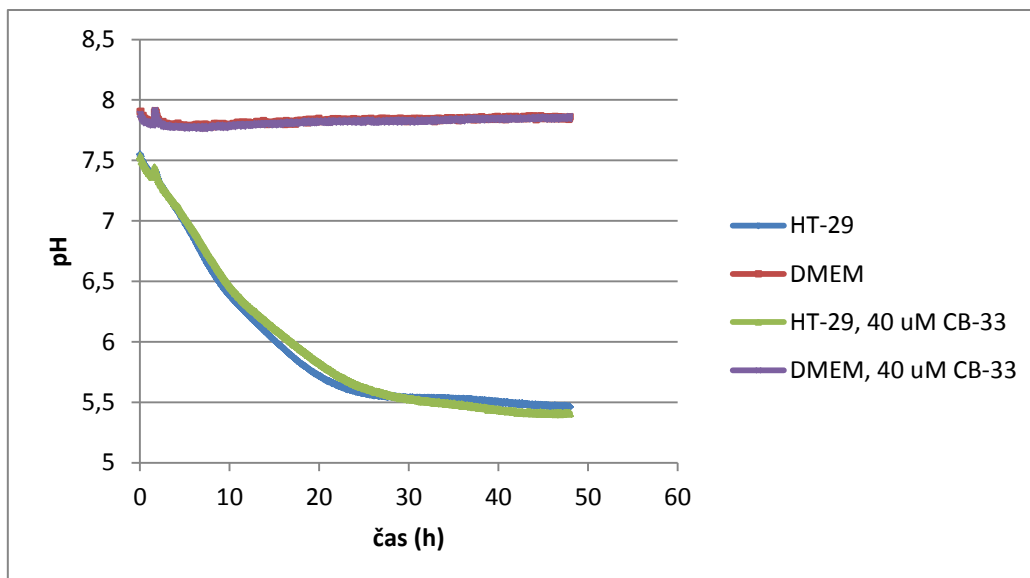
Obr. 12: Graf závislosti pH na čase pufru PBS, pH 6,9 (zelená křivka), DMEM média (červená křivka) a buněčné kultury HT-29 (modrá křivka).



Obr. 13: Graf závislosti pH na čase DMEM média (červená křivka), DMEM média s 40 μM CB-30 (světle modrá křivka) buněčné kultury HT-29 (tmavě modrá křivka), HT-29 s 40 μM CB-30 (fialová křivka).



Obr. 14: Graf závislosti pH na čase DMEM média (červená křivka), DMEM média s 40 μM CB-31 (světle modrá křivka) buněčné kultury HT-29 (tmavě modrá křivka), HT-29 s 40 μM CB-31 (fialová křivka).



Obr. 15: Graf závislosti pH na čase DMEM média (červená křivka), DMEM média s 40 μM CB-33 (fialová křivka) buněčné kultury HT-29 (tmavě modrá křivka), HT-29 s 40 μM CB-33 (fialová křivka).

6 Diskuze

Jedním ze znaků nádorových tkání je výskyt hypoxických center a následně exprese CA IX. Bylo zjištěno, že přítomnost CA IX v nádorové tkáni souvisí s tvorbou metastáz a horší prognózou. Inhibicí CAIX dochází ke snížení vnitrobuněčného pH a omezení invazivity buněk (Svastova et. al. 2004). Zajímavou skupinou látek se jeví být v tomto ohledu sulfonamidy, látky odvozené od acetazolamidu, který je nespécifickým inhibitorem CAIX (Supuran 2011).

Ústav molekulární a translační medicíny získal skupinu 28 látek, odvozených od karboranů se sulfonamidovým zbytkem, u kterých bylo na enzymatické úrovni potvrzeno, že inhibují extracelulární protein CAIX ve vyšší míře než intracelulární CA II, který je běžně přítomný ve zdravé tkáni. Předmětem této bakalářské práce bylo zjistit, zda tři vybrané karborany CB-30, CB-31 a CB-33 budou inhibovat CA IX také na buněčné úrovni. Za tímto účelem byly optimalizovány podmínky pro zvýšenou expresi CAIX u buněčných linií adenokarcinomu tlustého střeva HT-29. Linie byly inkubovány za normoxických a hypoxických podmínek po dobu 25, 35 a 45 h. Pomocí metody western blot bylo určeno, že 45 h inkubace za hypoxických podmínek je vhodná pro buněnou kultivaci.

Pomocí MTT testu byly zvoleny hodnoty IC₅₀ testovaných derivátů. Nejúčinnější je látka CB-33 s IC₅₀ (50,5 ± 3,05) μM, dále látka CB-30 (64,3 ± 5,70) μM a nejnižší účinnosti bylo dosaženo u látky CB-31 (147,5 ± 6,43) μM. Hodnoty IC₅₀ jsou pro látky CB-30 a CB-31 za normoxických i hypoxických látek srovnatelné. Vyšších hodnot IC₅₀ bylo dosaženo pro hypoxické podmínky ve srovnání s normoxickými u derivátů CB-33 a acetazolamidu. Účinnost acetazolamidu jako kontrolního léčiva by měla být mírně zvýšena za hypoxických podmínek. Vhodnější metodou pro stanovení účinnosti derivátů by mohla být Clonogenic assay, kde se projeví efekt na vznik nových kolonií. Negativně může působit kyselé prostředí média na správnou funkčnost MTT a tvorbu formazanu.

Extracelulární pH bylo měřeno SDR přístrojem po dobu 48 h za hypoxických podmínek. Hodnota pH DMEM média stoupla během dvou dnů měření o 0,28 jednotek. Látky CB-30 a CB-31 po přidání do média v průběhu času stále více okyselují médium, v přítomnosti buněčné kultury se však pH pohybovalo jako u kontroly. Okyselení média pravděpodobně ovlivňuje efekt léčiv na změnu pH v buněčné kultuře. Látka CB-33 ve 20 μ M nezpůsobuje změnu pH média ani buněčné kultury.

7 Závěr

V práci byly testovány nové karborany se sulfonamidovým zbytkem s cílem určit jejich účinnost na inhibici CA IX na buněčné úrovni. Látky byly porovnávány s acetazolamidem, nescifickým inhibitorem CA, v klinické praxi využívaným jako diuretikum.

V první části práce byly optimalizovány podmínky pro získání zvýšené exprese CA IX za hypoxických podmínek na buněčných liniích HT-29. Následně byla stanovena cytotoxicita studovaných látek za normoxických a hypoxických podmínek. Hodnoty cytotoxicit látek byly použity jako vstupní hodnoty pro experiment měření extracelulárního pH. Sledoval se vliv studovaných inhibitorů CAIX na snížení extracelulárního pH za hypoxických podmínek.

8 Použitá literatura

Abbate F, Supuran CT, Scozzafava A, Orioli P, Stubbs MT, Klebe G. The sulfonamide group as an ideal anchor for the design of potent human carbonic anhydrase inhibitors: Role of hydrogen-bonding networks in ligand binding and drug design. *J Med Chem.* 2002; 45, 3583-3587.

Brynda J, Mader P, Sicha V, Fabry M, Poncova K, Bakardiev M, Gruner B, Cigler P, Rezacova P. Carborane Based Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Angew. Chem. Int.* 2013; 52, 13760 –13763.

Dubois L, Peeters S, Lieuwes NG, Geusens N, Thiry A, Wigfield S, Carta F, McIntyre A, Scozzafava A, Dogné JM, Supuran CT, Harris AL, Masereel B, Lambin P. Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother Oncol.* 2011; 99, 424-431.

Ebbesen P, Pettersen EO, Gorr TA, Jobst G, Williams K, Kieninger J, Wenger RH, Pastorekova S, Dubois L, Lambin P, Wouters BG, Van Den Beucken T, Supuran CT, Poellinger L, Ratcliffe P, Kanopka A, Görlach A, Gasmann M, Harris AL, Maxwell P, Scozzafava A. Taking advantage of tumor cell adaptations to hypoxia for developing new tumor markers and treatment strategies. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2009; 24, 1–39.

Eluvathingal DJ, Elambalassery GJ, Pattiyil P. Hypercarbons in polyhedral structures. *Chem. Soc. Rev.* 2006; 35,157-168.

Friedland BR, Mallonee J, Anderson DR. Short term dose response characteristics of acetazolamide in man. *Arch Ophthalmol.* 1977; 95, 1809-1812.

Fujiwara D, Kato K, Nohara S, Iwanuma Y, Kajiyama Y. The usefulness of three-dimensional cell culture in induction of cancer stem cells from esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 434, 773-778.

Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004; 4, 891-899.

Gillies, R. J., Raghunand, N., Karczmar, G. S. & Bhujwala, Z. M. MRI of the tumor microenvironment. *J. Magn. Reson. Imaging* 2002; 16, 430–450.

Harada K, Oita E, Chiba K. Metaphase I arrest of starfish oocytes induced via the MAP kinase pathway is released by an increase of intracellular pH. *Development*. 2003; 130, 4581-4586.

Harguindey S, Orive G, Luis Pedraz J, Paradiso A, Reshkin SJ. The role of pH dynamics and the Na⁺/ H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin - one single nature. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1756, 1-24.

Chambers DM, White MH, Kostenbauder HB. Efficient extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography-ultraviolet quantitation of acetazolamide in serum. *J Chromatogr*. 1981; 225, 231-235.

Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonicanhydrases in human cancer. *Am J Pathol*. 2001; 158, 905-919.

Kozisek M, Cigler P, Lepsik M, Fanfrlik J, Rezacova P, Brynda J, Pokorna J, Plesek J, Gruner B, Grantz-Saskova K, Vaclavikova J, Kraeusslich H.-G, Kral V, Konvalinka J. Inorganic polyhedral metallacarborane inhibitors of HIV protease – a new approach to vercoming antiviral resistance *J. Med. Chem*. 2008; 51, 4839-4843 (2008).

Lagadic-Gossmann D, Huc L, Lecureur V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ*. 2004; 11, 953-961.

Lock FE, McDonald PC, Lou Y, Serrano I, Chafe SC, Ostlund C, Aparicio S, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene*. 2013; 32, 5210-5219.

Lou Y, McDonald PC, Oloumi A, Chia S, Ostlund C, Ahmadi A, Kyle A, Auf dem Keller U, Leung S, Huntsman D, Clarke B, Sutherland BW, Waterhouse D, Bally M, Roskelley C, Overall CM, Minchinton A, Pacchiano F, Carta F, Scozzafava A, Touisni N, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Targetingtumor hypoxia: suppression of breast

tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res.* 2011; 71, 3364-3376.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65, 55-63.

Pastorek J, Pastoreková S, Callebaut I, Mornon JP, Zelník V, Opavský R, Zaťovicová M, Liao S, Portetelle D, Stanbridge EJ, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene.* 1994; 9, 2877-2888.

Pastorekova S, Parkkila S, Parkkila AK, Opavsky R, Zelnik V, Saarnio J, et al. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* 1997;112, 398-408.

Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004; 19, 199-229.

Pastorekova S, Zavadova Z, Kostál M, Babusíková O, Závada J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology.* 1992; 187, 620-626.

Perez-Sayans M, Supuran CT, Pastorekova S, Suarez-Penaranda JM, Pilar GD, Barros-Angueira F, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. The role of carbonic anhydrase IX in hypoxia control in OSCC. *J Oral Pathol Med.* 2013; 42,1-8.

Putney LK, Barber DL. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *J Biol Chem.* 2003; 278, 44645-44649.

Rezacova P, Pokorna J, Brynda J, Kozisek M, Cigler P, Lepsik M, Fanfrlik J, Rezac J, Grantz Saskova K, Sieglöva I, Plešek J, Sicha V, Gruner B, Oberwinkler H, Sedláček J, Krausslich HG, Hobza P, Kral V, Konvalinka J. Design of Potent HIV Protease Inhibitors Based on Inorganic Polyhedral Metalla-carboranes. *J Med Chem.* 2009; 52, 7132-7141.

Sedlakova O, Svastova E, Takacova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Front Physiol.* 2014; 8; 4:400.

Stock C, Schwab A. Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Arch.* 2009; 458, 981-992.

Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev.* 2003; 23, 146-189.

Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010; 20, 3467-74

Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and activators for novel therapeutic applications. *Future Med Chem.* 2011; 3: 1165-80.

Svastova E, Zilka N, Zatovicová M, Gibadulinová A, Ciampor F, Pastorek J, Pastoreková S. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res.* 2003; 290, 332-345.

Tafreshi NK, Bui MM, Bishop K, Lloyd MC, Enkemann SA, Lopez AS, et al. Noninvasive detection of breast cancer lymph node metastasis using carbonic anhydrases IX and XII targeted imaging probes. *Clin Cancer Res.* 2012;18, 207–19.

Thiry A, Dogné JM, Masereel B, Supuran CT. Targeting tumor associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27, 566-573.

Wallace SM, Shah VP, Riegelman S. GLC analysis of acetazolamide in blood, plasma, and saliva following oral administration to normal subjects. *J Pharm Sci.* 1977; 66, 527-530.

Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11, 671-677

Zhao R, Oxley D, Smith TS, Follows GA, Green AR, Alexander DR. DNA damage-induced Bcl-xL deamidation is mediated by NHE-1 antiport regulated intracellular pH. *PLoS Biol.* 2007; 5, e1.

INTERNETOVÉ ZDROJE

George B. Kauffmann, Carborane, Encyclopedia Britannica, 2015
<http://www.britannica.com/science/carborane> (staženo 18.7.2015)