

## PŮVODNÁ PRÁČA

## VLIV OLOMOUCINU A ROSKOVITINU NA PRODUKCI METALOPROTEINÁZ DEGRADUJÍCÍCH EXTRACELULÁRNÍ MATRIX POJIVOVÉ TKÁŇĚ LIDSKÝMI FIBROBLASTY A CHONDROCYTY

J. Štovičková

## THE EFFECT OF OLOMOUCIN AND ROSCOVITIN ON THE PRODUCTION OF METALLOPROTEINASE DEGRADING EXTRACELLULAR MATRIX OF THE CONNECTIVE TISSUE BY HUMAN FIBROBLASTS AND CHONDROCYTES

Revmatologický ústav, Praha  
 Ředitel: doc. MUDr. K. Pavelka, CSc.

## Souhrn

**Cíl:** Zjistit, zda je možno inhibitory buněčného dělení ovlivnit produkci metaloproteináz štěpících mezibuněčnou matrix.

**Metody:** V kulturách lidských embryonálních fibroblastů a lidských synoviálních buněk z revmatoidní synovie nebo chondrocytů a synoviálních buněk z osteoartrické chrupavky a synovie byla stanovována proliferační aktivita nepřímo měřením mitochondriální dehydrogenázové aktivity metodou štěpení MTT. Produkce metaloproteináz byla sledována v kondicionovaných mediích zymograficky v 10 % polyakrylamidovém gelu s želatinou nebo s kaseinem jako substrátem.

**Výsledky:** Olomoucín a roskovitín, deriváty 4-benzylamino-9-methylpurinu, snižují proliferační aktivitu jak plicních fibroblastů, tak synoviálních buněk a chondrocytů. IC<sub>50</sub> pro olomoucín je u plicních fibroblastů 70±14 μmol/L, u buněk z revmatických tkání 56±14 μmol/L. U roskovitínu je IC<sub>50</sub> 14±2,8 μmol/L pro plicní fibroblasty a 11,2±2,8 μmol/L pro revmatoidní buňky. Produkce metaloproteináz není olomoucínem ani roskovitínem ovlivněna u nestimulovaných plicních fibroblastů. Jsou-li však stimulovány mitogenem, je působením olomoucínu potlačena produkce stimulovaných metaloproteináz. U buněk z revmatoidní synovie je oběma inhibitory potlačována produkce želatinázy B, želatinázy A, intersticiální kolagenázy a metaloproteináz o molekulové hmotnosti 135 a 150 kDa. U buněk z osteoartrického kloubu je oběma inhibitory potlačována pouze produkce intersticiální kolagenázy.

**Závěr:** Z daných experimentálních dat je možno vyvodit, že proliferace a exprese metaloproteináz jsou procesy, které spolu přímo nesouvisí. Spojovacím můstkem mezi nimi jsou pravděpodobně kinázy aktivované extracelulárními mitogeny (ERK/MAP kinázy). Olomoucín i roskovitín jsou inhibitory jak kináz řídících buněčný cyklus, tak ERK/MAP kináz, a tedy mohou úspěšně inhibovat jak proliferační

## Summary

**Goal:** To assess the possibility to use inhibitors of the cell division for the reduction of the production of matrix metalloproteinases.

**Methods:** The proliferation of embryonal human lung fibroblasts from rheumatoid synovium and chondrocytes from osteoarthritic cartilage was measured indirectly by the method of splitting MTT by the mitochondrial dehydrogenase. The production of matrix metalloproteinases was followed by zymography on 10 % PAGE with copolymerized gelatine or caseine as substrates.

**Results:** Olomoucine and roscovitine, the derivatives of 4-benzylamino-9-methylpurine, down-regulated proliferation of embryonal human lung fibroblasts as well as fibroblasts from rheumatoid synovium and chondrocytes from osteoarthritis cartilage, respectively. IC<sub>50</sub> was 70±14 μmol/L for olomoucine and 14±2,8 μmol/L for roscovitine in the case of lung fibroblasts and 56±14 μmol/L for olomoucine and 11,2±2,8 μmol/L for roscovitine in the case of rheumatoid synovial fibroblasts or osteoarthritic cartilage chondrocytes. The production of matrix metalloproteinases was not affected by these inhibitors when the treated cells were unstimulated lung fibroblasts. When the cells were stimulated by methylsulphoxid, olomoucine down-regulated production of metalloproteinases induced by this mitogen. When cells from rheumatoid synovium were treated by either inhibitor gelatinase B, gelatinase A, fibroblasts collagenase and two other metalloproteinases with M<sub>r</sub> 135 and 150 kDa were down-regulated. In the cultures of chondrocytes from osteoarthritic cartilage only fibroblast collagenase was slightly down-regulated by both inhibitors.

**Conclusion:** The proliferation of the cells and production of matrix metalloproteinases are not closely related events. The connection between them provide probably ERK/MAP kinases. Olomoucine and roscovitine are inhibitors of both cyclin-dependent kinases

aktivitu, tak produkci metaloproteináz buněk stimulovaných exogenními mitogeny.

**Klíčová slova:** olomoucín, roskovitin, proliferace, produkce metaloproteináz.

## ÚVOD

Progresivní destrukce kloubů je v revmatických chorobách zprostředkována převážně matrix metaloproteinázami (1, 2). Ty jsou syntetizovány především buňkami synoviální vstélky a chrupavky (3, 4). Expresí metaloproteináz je regulována cytokiny (5), steroidy a retinoidy (6), proteiny komplexu AP-1 (7) a bývá, zejména u revmatoidní artritidy, doprovázena expresí onkogenů (8). V časných stádiích revmatoidní artritidy některé buňky synoviální vstélky získávají transformovaný fenotyp (9) a produkují onkogeny a zároveň produkují zvýšené množství proteináz (10). Buňky synoviální membrány tak získávají některé rysy nádorových buněk (11). Naproti tomu osteoartróza, další revmatická choroba znetvořující klouby, začíná fokální hyperhydratací chrupavky a vyznačuje se změnou v syntéze kolagenu (12). V pozdějších stádiích upadá syntéza proteoglykanů a dále se aktivují proteinázy (13) a dočasně se zvyšuje proliferace chondrocytů. Naopak hyperplasie s výskytem transformovaných buněk se u osteoartrótické synovie nevyskytuje a exprese onkogenů je nepatrná (14). Tyto skutečnosti naznačují, že proliferace buněk a exprese metaloproteináz jsou procesy, které mají hlubší souvislost. V nedávné době bylo skutečně prokázáno, že exprese některých metaloproteináz a proliferativní aktivita buněk jsou souběžně regulované procesy. Např. inhibice želatinázy A (72 kDa želatinázy) vede u kryších glomerulárních mesangiálních buněk k inhibici proliferace (15). Naopak trombin, aktivátor želatinázy A, vede u lidských cévních endoteliálních buněk ke zvýšení sekrece želatinázy A, intersticiální kolagenázy a tkáňového inhibitoru metaloproteináz 1 (TIMP 1) a zároveň stimuluje proliferaci (16). Proto se domnívám, že inhibitory buněčného dělení by mohly inhibovat také expresi metaloproteináz.

V České republice se studiem látek regulujících buněčný cyklus zabývá Ústav experimentální botaniky v Olomouci. Na tomto pracovišti syntetizovali vysoce účinné a vysoce selektivní kompetitivní inhibitory cyklin-dependentní proteinkinázy p34 cdc2/cyklin B, olomoucín (17) a roskovitin (18). Oba inhibitory jsou odvozeny od N<sup>6</sup>-benzylaminopurinu a zadržují přechod buněk z fáze G1 do S a z fáze G2 do M. Kromě zmíněné cdc2 kinázy inhibují cyklin-dependentní kinázy p33 cdk2/cyklin E a mozkovou p33cdk5/p35. Tyto vysoce konzervativní kinázy se účastní regulace buněčného cyklu u všech eukaryotických buněk. Olomoucín a roskovitin inhibují také erk1 a erk2 MAP kinázy, které zprostředkovávají přenos extracelulárních sig-

regulating the progression of cells through the cell cycle and ERK/MAP kinases which regulate the production of AP-1 as a result of extracellular stimuli. That is why both olomoucine and roscovitine can down-regulate proliferation as well as production of matrix metalloproteinases by the cells stimulated by exogenous mitogens.

**Key words:** olomoucine, roscovitine, proliferation, production of matrix metalloproteinases.

nálů. Z farmakologického hlediska tak tyto látky představují modelové sloučeniny pro novou třídu antimitotických a antitumorových léčiv, které jsou nenádorové pro buňky poměrně netoxické. Jejich testováním se zabývá laboratoř patofyziologie LF Univerzity Palackého v Olomouci a Ústav toxikologie a soudního lékařství v Praze.

## METODY

### *Buněčné kultury*

Lidské embryonální plicní fibroblasty (produkt firmy Sevak, 19. pasáž) byly kultivovány do konfluency při 37 °C v mediu DMEM/F12 firmy Sigma s přidávkou 5 % hovězího fetálního séra a 80 mg gentamicinu K/L media ve vlhké atmosféře sycené CO<sub>2</sub> na 5 %. Potom bylo medium odsáto a buňky uvolněny 0,2 % trypsinem, promyty mediem s 10 % fetálním sérem a převedeny do media s 5 % sérem. Hustota buněk byla nastavena na 2x10<sup>5</sup>/mL a buněčná suspenze byla rozpipetována do zkumavek s přidávkou olomoucínu nebo roskovitinu. Buněčné suspenze pak byly rozpipetovány po 100 µL do 96jamkových kultivačních destiček, každá koncentrace inhibitoru do 8 jamek ve dvou paralelních destičkách. Po 72 hodinách kultivace bylo do jedné destičky přidáno 3-[4,5-dimethyliazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromidu (MTT) pro stanovení metabolické aktivity a z paralelní destičky bylo odebráno medium pro stanovení metaloproteináz.

Lidské synoviální buňky byly získávány z revmatoidní nebo osteoartrótické synovie. Tkáň byla zbavena tuku a rozstříhána na cca 1 mm<sup>3</sup> kousky a promyta PBS s gentamycinem. Potom byla 15 min digerována hyaluronidázou Sevak (obsah 1 ampule o 168 TRU byl rozpuštěn ve 2 mL PBS a aplikován na promytou tkáň). Po digesci byla tkáň promyta PBS s gentamycinem a digerována 4 h v 0,2 % roztoku klostridiální kolagenázy Sevak v mediu s 5 % sérem. Uvolněné buňky byly promyty mediem a hustota byla nastavena na 5x10<sup>5</sup>/mL. Další postup byl shodný jako u plicních fibroblastů.

Lidské chondrocyty byly získávány z osteoartrótické chrupavky. Chrupavka byla rozkrájena na lupínky cca 3 mm<sup>2</sup>, 3x promyta PBS s gentamycinem a digerována 1 h při 37 °C v 0,8 % roztoku klostridiální kolagenázy v mediu s 5 % séra. Po 1 h byl roztok kolagenázy zředěn mediem na 0,4 % a chrupavka digerována přes noc. Uvolněné chondrocyty byly promyty mediem a dále zpracovány jako plicní fibroblasty.

### Stanovení metabolické aktivity

Zkoumané buněčné kultury byly testovány v 96jamkových mikrokultivačních destičkách. 6 hodin před koncem kultivace byl přidán roztok MTT (5 mg/mL) tak, aby výsledná koncentrace v kultuře byla 0,5 mg/mL. Vytvořily se nerozpustné formazanové krystaly, které byly po odsátí media rozpuštěny v 10 % dodecylsulfátu sodném (SDS). Absorbance byla měřena při 580 nm na čtečce mikrotitračních destiček.

### Zymografická analýza

Obsah metaloproteináz v kondiciovaných mediích byl stanovován elektroforeticky v 10 % polyakrylamidovém gelu v TRIS-glycinovém pufru s 0,1 % SDS a se zakomponovanou 0,5 % želatinou nebo kaseinem. Obvyklé podmínky elektroforézy byly 30 min při 80 V pro průchod vzorků zaostřovacím gelem a 2,5 hodiny při 100 V pro průchod separačním gelem. Po elektroforéze byly gely renaturovány 1 h v 2,5 % Tritonu X-100 a inkubovány 20 h při 37 °C v 50 mmol/L Tris-HCl pufru pH 7,5 s 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> a 5 μmol/L ZnCl<sub>2</sub>. Po obarvení Coomassie Blue byly zóny metaloproteináz vidět jako bílé proužky na modrém pozadí. Jako markery molekulových hmotností byly použity proteiny o M<sub>r</sub> 205, 116, 97, 84, 66, 55 a 45 kDa (firmy Sigma).

## VÝSLEDKY

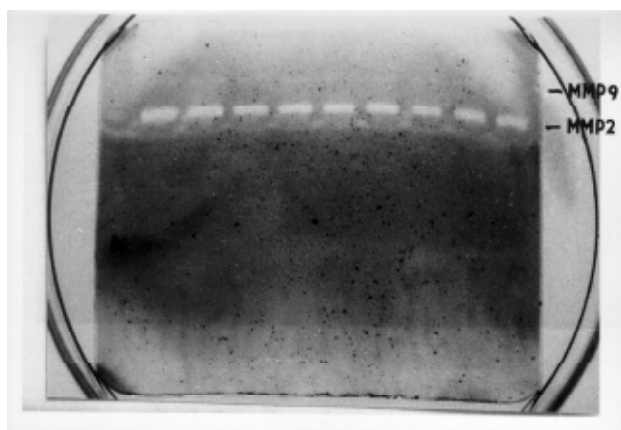
Bylo zpracováno 10 kultur lidských plicních embryonálních fibroblastů (LEP), 5 kultur lidských synoviálních buněk z revmatoidní synovie, 2 kultury lidských chondrocytů z osteoartrótické chrupavky a 1 kultura synoviálních buněk z osteoartrótické synovie. LEPy byly používány mezi 20. až 25. pasáží, buňky ze synovií a chrupavek okamžitě po uvolnění z tkání. Věk pacientů byl 70±3 roky.

V kulturách proliferujících plicních fibrocytů olomoucín v koncentračním rozmezí 0–154 μmol/L s inkrementem 14 μmol/L a roskovitin v koncentračním rozmezí 0–30,8 μmol/L s inkrementem 2,8 μmol/L plynule snižovaly proliferační aktivitu. Viabilita buněk při tom nebyla významně snížena až do koncentrace 140 μmol/L u olomoucínu a 28 μmol/L u roskovitinu. Po odstranění inhibitorů z media buňky dále proliferovaly. IC<sub>50</sub> pro olomoucín byla 70±14 μmol/L a pro roskovitin 14±2,8 μmol/L. Plicní fibroblasty sekretovaly do media prožlatinázu B (92 kDa kolagenáza typu IV, MMP-9), žlatinázu A (72 kDa kolagenáza typu IV, MMP-2), a to převážně v aktivovaných formách 66 a 62 kDa a metaloproteinázu o molekulové hmotnosti 54 a 53 kDa. Dominantní metaloproteinázou byla žlatináza A. Byl-li do kultivačního media přidán olomoucín rozpuštěný v HCl, spektrum ani množství sekretovaných metaloproteináz nebylo olomoucínem ovlivněno. Byl-li olomoucín rozpuštěn v dimetylsulfoxidu (DMSO) a naředěn tak, aby výsledná koncentrace DMSO

byla 0,2 %, plicní fibroblasty sekretovaly kromě již zmíněných metaloproteináz také vysokomolekulární adukty o hmotnostech 270, 200, 150, 120 a 105 kDa. S výjimkou zón 120 a 105 kDa byly zymografické zóny těchto metaloproteináz velmi slabé. Síla zón všech indukovaných metaloproteináz se snižovala úměrně s rostoucí koncentrací olomoucínu (obr. 1 a 2). Skutečnost, že zymogram ukazuje pouze metaloproteinázy, byla potvrzena inkubací paralelních gelů v aktivačním pufru s přídavkem 40 mmol/L EDTA, která je chelatačním inhibitorem metaloproteináz. V přítomnosti EDTA se žádné proteinázové zóny neukázaly.

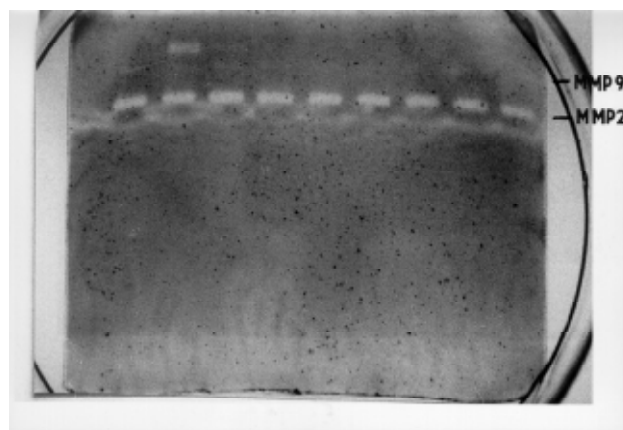
Synoviální buňky z RA synovie odpovídají na působení olomoucínu i roskovitinu rovněž snížením proliferační aktivity. IC<sub>50</sub> pro olomoucín byla 56±14 μmol/L a pro roskovitin 11,2±2,8 μmol/L. Spektrum metaloproteináz produkovaných synoviálními buňkami z RA synovie je mnohem širší než u plicních fibroblastů. Typický příklad ukazují obrázky 3 a 4. Kromě žlatináz A a B, které byly v kondiciovaných mediích přítomny jak ve formě proenzymů, tak ve svých aktivovaných formách, jsou přítomny i vysokomolekulární adukty a metaloproteináza odpovídající molekulovou hmotností intersticiální kolagenáze. Z vysokomolekulárních aduktů byla nejčastěji přítomna metaloproteináza o molekulové hmotnosti 270 kDa a metaloproteinázy o hmotnostech 75, 150, 135, 120 a 105 kDa. Žlatináza B byla přítomna převážně ve formě proenzymu o molekulové hmotnosti 92 kDa. Jen malá část byla přítomna v částečně aktivované formě 88 kDa. Naproti tomu žlatináza A (72 kDa) byla přítomna především v aktivovaných formách 68, 66 a 62 kDa a jen malá část byla přítomna ve formě 72 kDa proenzymu. Dominantní byla sekrece žlatinázy A. Dále byly patrné zóny o molekulové hmotnosti 54, 53 a 52 kDa a ve třech případech z pěti také metaloproteináza o molekulové hmotnosti 43 kDa. Vliv olomoucínu na produkci metaloproteináz ukazuje obrázek 3, vliv roskovitinu obrázek 4. Na působení olomoucínu i roskovitinu byla nejcitlivější sekrece metaloproteinázy o molekulové hmotnosti 54–52 kDa. Protože tato metaloproteináza není patrná na zymogramu s kaseinovým substrátem, jde nejspíše o intersticiální kolagenázu (MMP-1). Oba inhibitory snižují též sekreci žlatinázy B i žlatinázy A a vysokomolekulárních aduktů o molekulové hmotnosti 150 a 135 kDa (obr. 4 a 5).

Chondrocyty z OA chrupavky rovněž reagují na olomoucín i roskovitin snížením proliferační aktivity. IC<sub>50</sub> byly pro oba inhibitory shodné jako pro synoviální buňky. V kondiciovaných mediích kultur chondrocytů z OA chrupavky byly oproti mediím z kultur RA synoviálních buněk nalezeny překvapivě vysoké aktivity proteináz o molekulové hmotnostech 105 a 120 kDa. Také poměr aktivit žlatinázy A a žlatinázy B byl výrazně odlišný od poměru v kulturách synoviálních buněk. Zatímco v kulturách synoviálních buněk převládala aktivita žlatinázy A, v kulturách chondrocytů byly aktivity obou žlatináz prakticky shodné. Při-



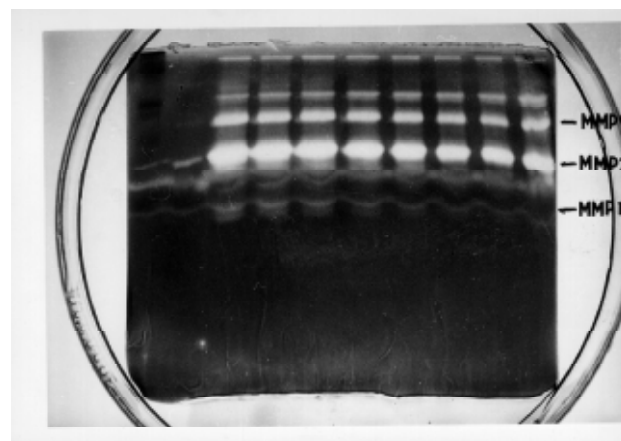
Obr. 1. Vliv olomoucínu rozpuštěného v HCl na produkci matrix metaloproteináz lidskými embryonálními plicními fibroblasty. V 1. sloupci jsou markery mol. hmotnosti, ve 2. sloupci kondiciované médium bez olomoucínu, ve 3. až 10. sloupci kondiciovaná média s rostoucí koncentrací olomoucínu od 14 do 112  $\mu\text{mol/L}$ . Použité skratky: MMP1 — fibroblastová kolagenáza, MMP2 — želatináza A, MMP9 — želatináza B.

Fig. 1. The effect of olomoucine dissolved in 40 mmol/L HCl on the production of matrix metalloproteinases by human embryonal lung fibroblasts. Lane 1: markers of mol. weight, lane 2: conditioned medium from untreated culture, lanes 3—10: conditioned media from culture treated by increasing concentrations of olomoucine (concentration range 14—112  $\mu\text{mol/L}$  with increment of 14  $\mu\text{mol/L}$ ). Abbreviations used: MMP1 — fibroblast collagenase, MMP2 — gelatinase A, MMP9 — gelatinase B.



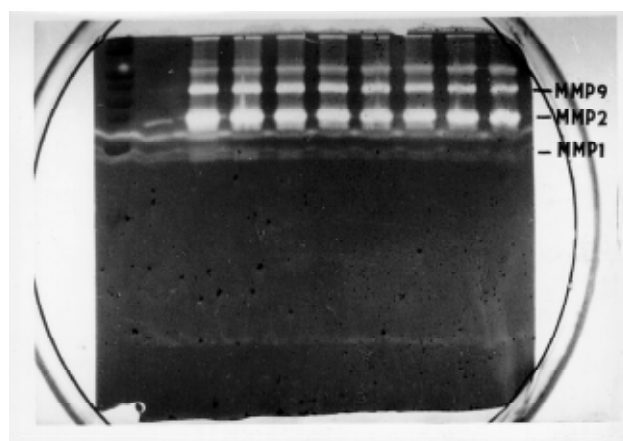
Obr. 2. Vliv olomoucínu rozpuštěného v DMSO na produkci matrix metaloproteináz lidskými embryonálními fibroblasty. V 1. sloupci jsou markery mol. hmotnosti, ve 2. sloupci kondiciované médium bez přídavku DMSO, ve 3. sloupci kondiciované médium s přídavkem DMSO (0,2 %) a ve 4. až 10. sloupci jsou kondiciovaná média s přídavkem olomoucínu (14—98  $\mu\text{mol/L}$ ) a 0,2 % DMSO.

Fig. 2. The effect of olomoucine dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO) on the production of matrix metalloproteinases by human lung fibroblasts. Lane 1: markers of mol. weight, lane 2: conditioned medium not supplemented with DMSO, lanes 3: conditioned medium supplemented with 0.2 % of DMSO. Lane 4—10: conditioned media supplemented with increasing concentration of olomoucine (14—98  $\mu\text{mol/L}$  in 0.2 % DMSO).



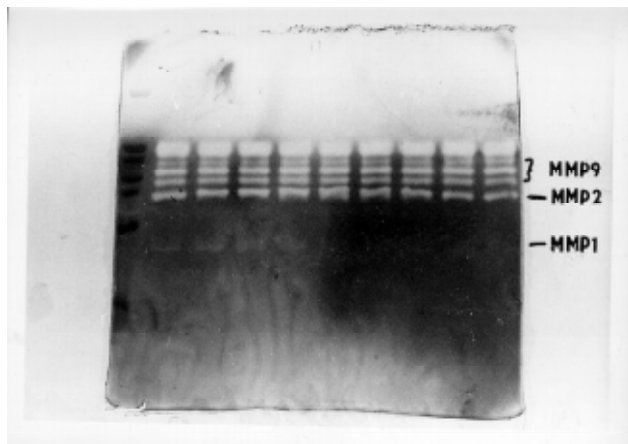
Obr. 3. Vliv olomoucínu na produkci metaloproteináz lidskými synoviálními buňkami z revmatoidní synovie. V 1. sloupci jsou markery mol. hmotnosti, ve 2. sloupci čisté médium, ve 3. až 10. sloupci kondiciovaná média s rostoucí koncentrací olomoucínu od 0 do 98  $\mu\text{mol/L}$ .

Fig. 3. The effect of olomoucine on the production of matrix metalloproteinases by fibroblasts from rheumatoid synovium. Lane 1: markers of mol. weight, lane 2: free medium, lanes 3—10: conditioned medium from the culture treated by the increasing concentration of olomoucine (range 0—98  $\mu\text{mol/L}$ , increment 14  $\mu\text{mol/L}$ ).



Obr. 4. Vliv roscovitínu na produkci metaloproteináz lidskými synoviálními buňkami z revmatoidní synovie. V 1. sloupci jsou markery mol. hmotnosti, ve 2. sloupci je čisté médium, ve 3. až 10. sloupci jsou kondiciovaná média s rostoucí koncentrací roscovitínu od 0 do 19,6  $\mu\text{mol/L}$ .

Fig. 4. The effect of roscovitine on the production of matrix metalloproteinases by fibroblasts from rheumatoid synovium. Lane 1: markers of mol. weight, lane 2: free medium, lanes 3—10: conditioned medium from the culture treated by roscovitine (range 0—19.6  $\mu\text{mol/L}$ , increment 2.8  $\mu\text{mol/L}$ ).



Obr. 5. Vliv roskovitinu na produkci metaloproteináz chondrocytů z osteoartrótické chrupavky. V 1. sloupci jsou markery mol. hmotnosti, ve 2. až 10. sloupci jsou kondicionovaná media s rostoucí koncentrací roskovitinu od 0 do 22,4  $\mu\text{mol/L}$ .

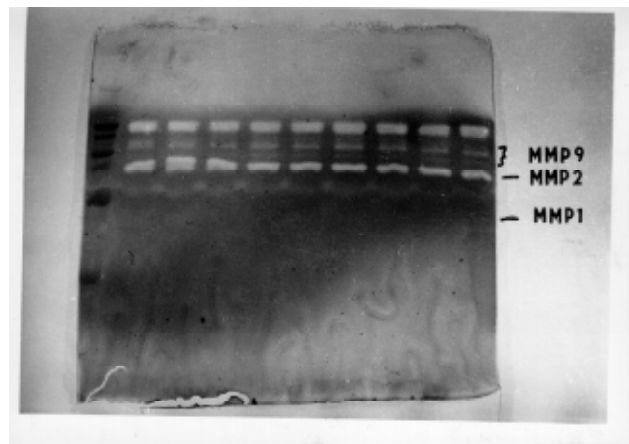
Fig. 5. The effect of roscovitine on the production of matrix metalloproteinases by chondrocytes from osteoarthritis cartilage. Lane 1: markers of mol. weight, lane 2—10: conditioned medium from the cultures treated by increasing concentrations of roscovitine (0—22.4  $\mu\text{mol/L}$ ).

tom želatináza B byla přítomna jak ve formě 92 kDa, tak v aktivovaných formách 88 a 82 kDa, zatímco želatináza A byla přítomna jen ve formě 66 kDa. Chondrocyty z OA chrupavky rovněž sekretovaly metaloproteinázu o molekulové hmotnosti 54 a 53 kDa. Slabý inhibiční účinek bylo možno pozorovat pouze na sekreci metaloproteinázy o molekulové hmotnosti 54—53 kDa.

V jednom případě byla získána chrupavka i synovie z jednoho pacienta s osteoartrózou kolena. V produkci metaloproteináz synoviálními buňkami a chondrocyty byl významný kvantitativní rozdíl. Chondrocyty produkovaly jako majoritní želatinázu B, kdežto synoviální buňky, podobně jako v případě synoviálních buněk z RA synovie, produkovaly jako majoritní želatinázu A. Podobně jako kultura chondrocytů, tak i kultura synoviálních buněk z OA kloubu produkovala neobvykle velká množství metaloproteináz o molekulové hmotnostech 105 a 120 kDa. Naopak produkce metaloproteinázy o molekulové hmotnosti 54—53 kDa byla nepatrná. Inhibiční účinek olomoucínu a roskovitinu bylo možno pozorovat jen na produkci této minoritní metaloproteinázy (obr. 5 a 6).

## DISKUSE

Pro zhodnocení vlivu olomoucínu a roskovitinu na ne-transformované a nestimulované buňky byly použity lidské plicní embryonální fibroblasty. Pokud nejsou stimulovány, produkují želatinázu A a malá množství želatinázy B a in-



Obr. 6. Vliv roskovitinu na produkci metaloproteináz synoviálními buňkami z osteoartrótické synovie. V 1. sloupci jsou markery mol. hmotnosti, ve 2. až 10. sloupci jsou kondicionovaná media s rostoucí koncentrací roskovitinu od 0 do 22,4  $\mu\text{mol/L}$ .

Fig. 6. The effect of roscovitine on the production of matrix metalloproteinases by synovial cells from osteoarthritis synovium. Lane 1: markers of mol. weight, lane 2—10: conditioned media from cultures treated with increasing concentrations of roscovitine (0—22.4  $\mu\text{mol/L}$ ).

tersticiální kolagenázy. Přestože olomoucín i roskovitín inhibovaly proliferační aktivitu těchto fibroblastů, na produkci metaloproteináz neměly žádný vliv. Když však byly plicní fibroblasty stimulovány mitogenem (DMSO), produkovaly kromě výše zmíněných metaloproteináz také jistá množství vysokomolekulárních aduktů. Produkce těchto indukovaných metaloproteináz byla inhibována olomoucínem v závislosti na koncentraci. Buňky získané z revmatoidní synovie produkovaly významně širší spektrum metaloproteináz než plicní fibroblasty.

Olomoucín a roskovitín inhibovaly účinně intersticiální kolagenázu, želatinázu B i želatinázu A a některé vysokomolekulární adukty. Buňky získané z osteoartrótické synovie a chrupavky rovněž produkovaly širší spektrum metaloproteináz než plicní fibroblasty, ale ne tak široké a ne tak mohutně jako synoviální buňky z revmatoidní synovie. V tomto případě olomoucín a roskovitín inhibovaly pouze sekreci intersticiální kolagenázy. Inhibice proliferace byla u synoviálních buněk i u chondrocytů podobná jako u plicních fibroblastů. Z těchto experimentálních dat vyvozují, že olomoucín a roskovitín neovlivňují produkci konstitutivně exprimovaných metaloproteináz, avšak snižují produkci indukovaných metaloproteináz, a to zejména metaloproteináz indukovaných AP-1 komplexem. V tomto ohledu je ovšem poněkud nečekaná inhibice produkce želatinázy A synoviálními buňkami z revmatoidní synovie. Expres želatinázy A není totiž na komplexu AP-1 závislá. Dále z těchto dat plyne, že proliferace a produkce metaloproteináz jsou procesy, které spolu přímo nesouvisí. Spojení

mezi nimi je pravděpodobně zprostředkováno kinázami stimulovanými extracelulárními mitogeny (ERK/MAP kinázami), které po aktivaci exogenním mitogenem indukují expresi c-Fos a c-Myc (19). c-Fos je součástí komplexu AP-1 a c-Myc aktivuje cyklin A (20), který je nezbytný pro přechod z fáze S do fáze M. Spojení mezi aktivací mitogenem aktivovaných (MAP) kináz a expresí želatinázy B (21) a intersticiální kolagenázy (22) bylo skutečně v nedávné době prokázáno. Protože olomoucín i roskovitin inhibují jak cyklin-dependentní kinázy, tak ERK/MAP kinázy zpomalují postup buněčným cyklem a zároveň inhibují stimulaci metaloproteináz buněk aktivovaných extracelulárními mitogeny. Tím mohou přispět jak k potlačení hyperplazie u revmatoidní synovie, tak ke zmírnění erozivního charakteru pannu. Mohou proto být perspektivním antirevmatickým agensem, a to zejména proto, že jsou pro buňky toxické až při vysokých koncentracích, které už na proliferaci aktivitu a na další snižování produkce metaloproteináz nemají vliv.\*

\*Práce byla podpořena grantem 3640-3 IGA MZ České republiky.

## LITERATURA

1. **Woessner, J.F.:** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 5, 1991, s. 2145—2154.
2. **Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A.:** Matrix metalloproteinases. A review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4, 1993, s. 197—250.
3. **Gravallese, E.M., Darling, J.M., Ladd, A.L., Katz, J.N., Glimcher, J.H.:** In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthr Rheum*, 34, 1991, s. 1076—1084.
4. **Dean, D.D., Azzo, W., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Woessner, Jr., J.F.:** Levels of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human osteoarthritic cartilage. *J Rheum*, 14, 1987, s. 43—51.
5. **Mauviel, A.:** Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem*, 53, 1993, s. 288—295.
6. **Jonat, C., Ramsdorf, H.J., Park, K.U., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H., Herrlich, P.:** Antitumor promotion and antiinflammation: Downmodulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 62, 1990, s. 1189—1204.
7. **Auble, D.T., Sirum-Connolly, K.L., Brinckerhoff, C.E.:** Transcriptional regulation of MMP genes: Role of AP-1 sequences. *Matrix*, 1992, Suppl. 1, s. 200.
8. **Trabandt, A., Gay, R.E., Gay, S.:** Oncogene activation in rheumatoid synovium. *APMIS*, 100, 1992, s. 861—875.
9. **Fassbender, G.H.:** Histomorphologic basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Collagen Rel Res*, 3, 1983, s. 141—155.
10. **Trabandt, A., Aicher, W.K., Gay, R.E. et al.:** Expression of the collagenolytic and ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/1 mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix*, 10, 1990, s. 349—361.
11. **Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S., Liotta, L.:** Tumor cell interactions with extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol*, 9, 1993, s. 541—573.
12. **Nimi, M.E., Desmukh, K.:** Differences in collagen metabolism between normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Science*, 181, 1973, s. 751—754.
13. **Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Howel, D.S., Woessner, Jr., J.F.:** Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 84, 1989, s. 678—685.
14. **Gay, S., Gay R.E., Koopman, W.J.:** Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: Two cellular mechanisms explain joint destruction. *Ann Rheum Dis*, 52, 1993, s. 39—47.
15. **Steinmann-Miggli, K., Lukeš, M., Marti, H.P.:** Rat mesangial cells and matrix metalloproteinase inhibitor of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) and of cell proliferation. *J Amer Soc Nephrol*, 8, 1997, s. 395—405.
16. **Zucker, S., Mirza, H., Conner, C.E., Lorenz, A.F., Drews, M.H., Bahou, W.F., Jesty, J.:** Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: Conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer*, 77, 1998, s. 780—786.
17. **Veselý, J., Havlíček, L., Strnad, M., Blow, J.J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Latham, D.S., Kato, J., Detivaud, L., Leclerc, S., Meijer, L.:** Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Europ J Biochem*, 224, 1994, s. 771—786.
18. **Havlíček, L., Hanuš, J., Veselý, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., Strnad, M.:** Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem*, 40, 1997, č. 4, s. 408—412.
19. **Kyriakis, J.M., Avruch, J.:** S6 kinases and MAP kinases: Sequential intermediates in insulin/mitogen-activated protein kinase cascade. In: *Protein kinases* edit. By Woodgett, J.R., IRL Press Oxford, 1994, s. 85—148.
20. **Simon, C., Goepfert, H., Boyd, D.:** Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced  $M_r$  92 kDa type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res*, 58, 1998, s. 1135—1139.
21. **Gum, R., Wang, H., Lengyel, E., Boyd, D.:** Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signalling cascades. *Oncogene*, 14, 1997, s. 1481—1494.
22. **Reunanen, N., Westermarck, J., Häkkinen, L., Holmström, T.H., Elo, I., Eriksson, J.E., Kähäri, V.M.:** Enhancement of fibroblast collagenase (Matrix Metalloproteinase-1) gene expression by ceramide is mediated by extracellular signal-regulated and stress-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, 273, 1998, č. 9, s. 5137—5145.

Do redakcie došlo 4.1.1999.

Adresa autora: MUDr. J. Štovičková, Revmatologický ústav, Na slupí 4, 128 50 Praha, Česká republika.