



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Vliv záření na protinádorovou aktivitu nového  
derivátu cisplatiny**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Lucie Polášková**  
Studijní program: B1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Jitka Prachařová, Ph. D.**  
Termín odevzdání práce: 2020

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Polášková
Název práce	Vliv záření na protinádorovou aktivitu nového derivátu cisplatiny
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jitka Prachařová, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

V klinické praxi jsou pro účely protinádorové chemoterapie zavedena léčiva na bázi platiny jako cisplatina, karboplatina a oxaliplatina. Použití těchto látek je však spojeno s celou řadou nežádoucích vedlejších účinků. Z tohoto důvodu jsou syntetizovány a testovány nové komplexy platiny, které by dokázaly působit cíleně v místě nádoru a díky tomu měly menší nežádoucí vedlejší účinky na organismus pacienta. Během posledních let byly vyvinuty platičité komplexy, které jsou ve své Pt(IV) formě neaktivními proléčivy a do formy aktivního cytostatika jsou konvertovány ozářením přímo v cílovém místě. Dané látky jsou kandidáty pro využití ve fotodynamické terapii. Bylo také zjištěno, že aktivita Pt(II) komplexů může být zvýšena díky ozáření přímo v oblasti nádoru. Např. inaktivní izomer cisplatiny, transplatina, vykazuje po ozáření cytotoxické účinky na nádorové buňky. Úkolem této práce bude testovat derivát cisplatiny, konkrétně *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(1M7AI)] (1M7AI = 1-methyl-7-azaindol), jehož biologický efekt by mohl být ovlivněn ozářením. Zejména bude testován vliv této látky na DNA a cytotoxická aktivita na nádorových buňkách před a po ozáření.

Klíčová slova	cisplatina, platinové komplexy, fotodynamická terapie, nádorová onemocnění, protinádorová aktivita
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Lucie Polášková
Title of thesis	Effect of irradiation on the anticancer activity of the new cisplatin derivate
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jitka Prachařová, Ph. D.
The year of presentation	2020

### Abstract

Platinum-based drugs such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin have been introduced into clinical practice for anti-tumor chemotherapy. However, these substances exhibit whole series of undesirable side effects. Due to these undesirable effects there is urge to design novel platinum complexes that would overcome such effects and target special tissues or organs. In recent years novel platinum(IV) complexes have been synthehsed in form of inactive prodrug which can be activated by irradiation directly at the target site. Such substances could be suitable candidates for photodynamic therapy. It has also been found out that the activity of Pt(II) complexes can be increased by irradiation. For example, the inactive isomer of cisplatin, transplatin exhibits cytotoxic effects on human cancerous cell lines after irradiation. The main focus of my thesis is to evaluate biological effect of light activated cisplatin based complex  $cis\text{-[PtCl}_2\text{(NH}_3\text{)(1M7AI)]}$  (1M7AI = 1-methyl-7-azaindol). Cytotoxic activity and interaction with DNA of this compound will be studied on human cancerous cell lines before and after irradiation.

Keywords	cisplatin, platinum complexes, photodynamic therapy, tumor disease, anticancer activity
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za její odborné vedení, ochotu a především vstřícný přístup, který mi poskytla během vypracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Haně Crlíkové za cenné rady, které mi poskytla při vypracování jak teoretické, tak praktické části.

## OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. CÍL PRÁCE .....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	10
3.1. Cisplatina a její analoga .....	10
3.1.1. Mechanismus účinku cisplatiny .....	11
3.1.2. Karboplatina .....	12
3.1.3. Oxaliplatina.....	13
3.1.4. Další léčiva na bázi platiny .....	13
3.2. Fotochemoterapie v léčbě nádorových onemocnění.....	14
3.2.1. Historie .....	15
3.2.2. Fotosenzitizéry pro PDT .....	16
3.2.3. Mechanismus účinku PDT .....	19
3.2.4. Klinické využití PDT .....	22
3.3. Fotocitlivé platinové komplexy .....	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	26
4.1. Materiál .....	26
4.1.1. Platinové komplexy.....	26
4.1.2. Biologický materiál a chemikálie.....	26
4.1.3. Laboratorní vybavení a software .....	28
4.2. Metody .....	29
4.2.1. Kultivace buněk .....	29
4.2.2. Počítání buněk.....	30
4.2.3. Ošetření buněk testovanými komplexy.....	30
4.2.4. Stanovení cytotoxicity komplexů pomocí MTT testu.....	31
4.2.5. Štěpení savčí DNA <i>in vitro</i> .....	32
4.2.6. Comet assay .....	33
5. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	37
6. ZÁVĚR.....	44
POUŽITÁ LITERATURA .....	45

## SEZNAM ZKRATEK

1M7AI	1-methyl-7-azaindol
ATB	antibiotikum
cDDP	cisplatina, <i>cis</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]
CIS	<i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> )(1M7AI)]
DMSO	dimethylsulfoxid
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtBr	ethidium bromid
FBS	fetální hovězí sérum
LMP	low melting point agarose
OC	open-circular
PBS	fosfátový pufr
PS	fotosenzitizér
r <sub>b</sub>	počet molekul komplexu skutečně navázaných na jednom nukleotidu
r <sub>i</sub>	počet molekul komplexu teoreticky navázaných na jednom nukleotidu
ROS	reaktivní formy kyslíku
SC	supercoiled
TAE	tris-acetát/EDTA pufr

# 1 ÚVOD

Protinádorové účinky cisplatiny jsou známy již řadu let a díky nim se tato látka stala nejúčinnějším cytostatikem vůbec. I přes velký úspěch cisplatiny využívané k léčbě nádorů močového měchýře, vaječníků, varlat a některých dalších nádorů, vykazuje cisplatina nežádoucí vedlejší účinky, které se staly impulzem pro vývoj nových protinádorových léčiv na bázi platiny.

Určitou naději v léčbě nádorových onemocnění představují fotoaktivovatelná proléčiva na bázi platiny(IV), která jsou testována pro využití ve fotodynamické terapii. Tato proléčiva mohou být aktivována lokálně v oblasti nádoru až po ozáření, což minimalizuje poškození zdravé okolní tkáně a představuje menší zátěž na organismus pacienta. V posledních letech se výzkum zaměřil na tyto platičité komplexy. Bylo také zjištěno, že záření může zvýšit účinek některých platnatých komplexů. Bylo tedy syntetizováno a testováno několik analog cisplatiny, která by mohla po ozáření vykazovat zvýšený cytotoxický účinek na nádorové buňky. Pro tuto práci byl zvolen derivát platiny *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(1M7AI)](1M7AI = 1-methyl-7-azaindol), u kterého je předpokládána vazba na stejný biologický cíl, na který se váže cisplatina, a to DNA. Vazba tohoto komplexu byla prokázána v experimentální části této práce. Také bylo zjištěno, že daná látka působí zřejmě mechanismem odlišným od konvenční cisplatiny, i když oba komplexy mají stejný biologický cíl. Během testů provedených v předkládané práci bylo potvrzeno, že uvedený analog cisplatiny vykazuje po ozáření UVA zvýšenou cytotoxicitu v nádorové linii lidského adenokarcinomu děložního čípku. Tento účinek je zřejmě spojen se štěpením DNA, které bylo prokázáno na plazmidové DNA v bezbuněčném médiu, ale i přímo v zmíněných nádorových buňkách.



## **2 CÍL PRÁCE**

1. Shromáždit nejnovější literaturu k dané problematice.
2. Na základě studia připravených literárních zdrojů sepsat rešerši na uvedené téma.
3. Studovat vliv záření na aktivitu nového platinového komplexu v lidských nádorových buňkách.
4. Získané výsledky srovnat s daty dostupnými v odborné literatuře pro další fotocitlivé kovové komplexy se zaměřením na jejich biologickou aktivitu v nádorových buněčných liniích.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Cisplatina a její analoga

Cisplatina neboli *cis*-diammindichloroplatnatý komplex je nejznámější a první klinicky používané cytostatikum na bázi platiny. Dle chemické struktury je cisplatina jednoduchá anorganická molekula složená z 11 atomů. Na centrální atom platiny, která se nachází v oxidačním stupni II, jsou navázány dvě aminové skupiny a dva atomy chlóru. Při hydrolyze dochází k výměně chloridových iontů v molekule cisplatiny za vodu a vznikají pozitivně nabitě reaktivní mono- či di-aqua formy cisplatiny schopné interagovat s buněčnými komponentami. *Trans* izomer cisplatiny, transplatina, je i přes shodné chemické složení protinádorově neúčinný (Brabec, 1998).

Objev unikátních vlastností cisplatiny byl učiněn v 60. letech minulého století a je spojen s prací prof. Barnetta Rosenberga, který zkoumal vliv elektrického pole na růst bakterií *Escherichia coli* (Rosenberg *et al*, 1965). Do nádoby s bakteriemi v živné půdě, která obsahovala amonné soli, ponořil dvě platinové elektrody a mezi ně vložil elektrické napětí. Výsledkem experimentu bylo zastavení dělení bakteriálních buněk vzniklé v důsledku elektrolytických dějů na platinových elektrodách, během kterých vznikaly sloučeniny platiny podobné cisplatině. Právě tyto sloučeniny platiny ovlivnily dělení bakteriálních buněk bez omezení jejich růstu, kdy bakteriální buňky rostly v dlouhých filamentech.

Cisplatina byla dále zkoumána a později byly také objeveny její protinádorové účinky. Poté se tato látka dostala do klinické praxe a stala se nejučinnějším cytostatikem vůbec. V současné době se cisplatina využívá k léčbě rakoviny varlat, vaječníků, močového měchýře, plic, některých nádorů hlavy a krku a mnoha dalších malignit (Dasari *et al*, 2014). I přes léčbu velkého spektra různých typů nádorů vykazuje toto cytostatikum značné nežádoucí účinky na organismus pacienta. Mezi tyto účinky se řadí např. nefrotoxicita, ototoxicita, nevolnost a další. Velkou překážku v léčbě cisplatinou představuje také získaná rezistence, kdy dochází ke snížení citlivosti nádoru vůči cisplatině, pokud je podávána opakovaně.

Uvedené nedostatky se staly impulzem pro vývoj nových léčiv na bázi platiny i dalších těžkých kovů a pro hledání postupů vedoucích k zvýšení biologické účinnosti nových i stávajících látek (kombinace chemoterapie a hypertermie, fotodynamická terapie, směrování léčiv do nádorové tkáně pomocí

magnetů, terapie s využitím látek obsahujících skupiny cílící na specifické determinanty na povrchu nádorových buněk, atd.; (Ghosh, 2019). Výsledkem tohoto výzkumu a vývoje by pak měla být efektivní léčiva méně toxická pro organismus pacienta, jež by nezpůsobovala rezistenci nádorových buněk k léčbě danou látkou při opakovaném podání. Byla testována celá řada analog cisplatiny a dalších látek, z nichž jsou dnes v klinické praxi v České republice používány karboplatina a oxaliplatin. Další komplexy kovů jsou pak ve fázi testování.

### 3.1.1 Mechanismus účinku cisplatiny

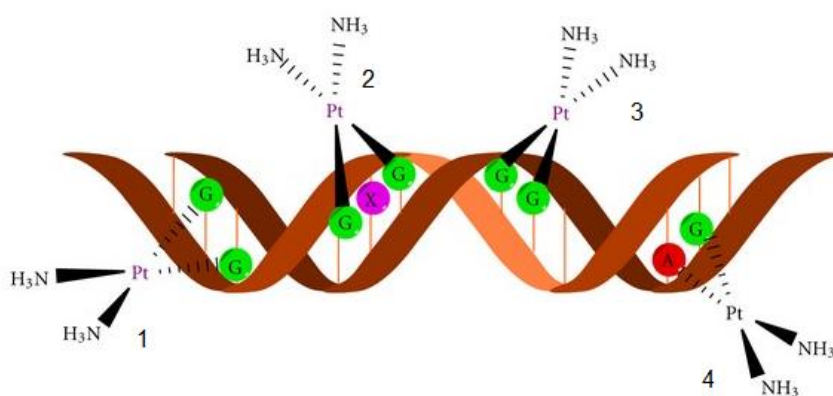
Po objevení protinádorových vlastností cisplatiny následoval výzkum mechanismu účinku této látky a později také dalších sloučenin na bázi platiny. Přes velké množství buněčných složek, se kterými cisplatin reaguje, se studie zaměřily zejména na vazbu cisplatiny a jejích analogů na DNA, která je farmakologickým cílem těchto léčiv (Jamieson *et al*, 1999).

Cisplatin, karboplatina a oxaliplatin představují komplexy čtvercové planární Pt(II) nesoucí dva inertní ligandy „neodštěpitelné skupiny“ a dva labilní ligandy „odstupující skupiny“ (Johnstone *et al*, 2015). Navzdory úspěchu, kterého tato léčiva dosáhla, stále vedou problémy s rezistencí a toxicitou spojenou s podáním těchto látek k vývoji nových farmak a léčebných postupů. Obecný mechanismus účinku těchto tří látek zahrnuje čtyři klíčové kroky. Jedná se o průnik do buňky, aktivaci, vazbu na DNA a „zpracování“ lézí, tzv. aduktů, vytvořených danými látkami na DNA buněčnými mechanismy vedoucími v důsledku poškození DNA k buněčné smrti nádorových buněk nebo k opravě tohoto poškození.

Pacientům je cisplatin podávána intravenózně formou infúze ve fyziologickém roztoku a krevním řečištěm se dostává do cílové tkáně. Molekula cisplatiny může do buněk pronikat pasivní difúzí přes plazmatickou membránu nebo aktivním transportem zprostředkovaným membránovými transportéry (Johnstone *et al*, 2016). Bylo zjištěno, že cisplatin je do buňky přenášena pomocí transportérů mědi Ctr1 (copper transporter 1) a Ctr2 (copper transporter 2). V intracelulárním prostoru nastává hydrolýza Pt-Cl vazeb vedoucí k substituci chloro ligandů cisplatiny molekulami vody nebo ionty OH<sup>-</sup> (Štarha *et al*, 2018). U cisplatiny je tato substituce ligandů spouštěna výrazně nižší koncentrací iontů cytosolického chloridu (přibližně 4 mmol × l<sup>-1</sup>) ve srovnání s extracelulární

matricí (přibližně  $100 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) (Johnstone *et al*, 2015). Výsledkem je aktivovaná akvatovaná forma,  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ , která může reagovat s buněčnými cíli. Mimo DNA cisplatina také může reagovat s RNA, proteiny a membránovými fosfolipidy (Jamieson *et Lippard*, 1999).

Cisplatina v akvatované formě vstupuje do jádra buněk a podstupuje substituci vodního ligandu za heterocyklickou DNA bázi. Nejvíce nukleofilní pozici na DNA představují  $\text{N}^7$  místa deoxyguanosinových zbytků. Nejdříve cisplatina vytváří monofunkční adukty na DNA, které se mohou následně uzavírat. Pak vznikají adukty bifunkční způsobující tzv. zesíťování (můstky) na DNA. Takovéto zesíťování může nastat mezi deoxyguanosiny na stejném i na různých řetězcích (Obrázek 2; Johnstone *et al*, 2016). Největší změny v struktuře DNA způsobují 1,2-vnitrořetězcové můstky mezi purinovými bázemi a cisplatinou, nejčastěji mezi sousedními guaniny nebo adeninem a guaninem (Dasari *et al*, 2014). Vzniklé adukty DNA deformují její strukturu, přičemž studie prokázaly ohýbání a odvíjení dvojité šroubovice (Johnstone *et al*, 2016).



Obrázek 2: Adukty na DNA tvořené cisplatinou; 1: meziřetězcový můstek mezi dvěma guaniny, 2: vnitrořetězcový můstek mezi dvěma guaniny oddělenými jednou bází (1,3-GXG), 3: vnitrořetězcový můstek mezi dvěma sousedními guaniny (1,2-GG), 4: vnitrořetězcový můstek mezi guaninem a adeninem (1,2-AG; převzato z Gómez-Ruiz *et al*, 2012)

### 3.1.2 Karboplatina

Brzy po schválení cisplatiny a objevu nežádoucích účinků spojených s jejím použitím bylo prioritou identifikovat méně toxický analog, který by si ale zachoval protinádorovou účinnost cisplatiny. Karboplatina je široce používaným

protinádorovým léčivem druhé generace a přímým analogem cisplatinou. Velký průlom v identifikaci karboplatiny přinesl Johnson Matthey ve spolupráci s Institutem pro výzkum rakoviny ve Velké Británii. Potvrdilo se, že cyklobutandikarboxylátová skupina karboplatiny je stabilnější než chloridové ligandy cisplatinou, pomaleji podléhá hydrolyze a může tak poskytnout nižší toxicitu (Muggia *et al*, 2015). Cytotoxicita obou léčiv je způsobena adukty platiny, které tyto látky vytváří na DNA, jež je jejich farmakologickým cílem. Ačkoliv jsou tyto adukty tvořené na DNA cisplatinou i karboplatinou identické, tvorba aduktů karboplatiny je pomalejší, což má za následek nižší toxicitu ve srovnání s cisplatinou (Mlcousková *et al*, 2012).

### **3.1.3 Oxaliplatina**

Poslední platinové cytostatikum schválené v České republice pro použití v protinádorové chemoterapii představuje oxaliplatina. Tento lék třetí generace byl poprvé syntetizován v Japonsku, ale následně byl povolen pro klinické využití např. ve Francii nebo Spojených státech (Johnstone *et al*, 2016). Jedinou indikaci jeví oxaliplatina v léčbě kolorektálního karcinomu v kombinaci např. s 5-fluorouracilem a leukovorinem. Tato kombinace známá pod názvem FOLFOX režim je v současné době základem adjuvantní chemoterapie u pacientů s kolorektálním karcinomem (Zhang *et al*, 2014).

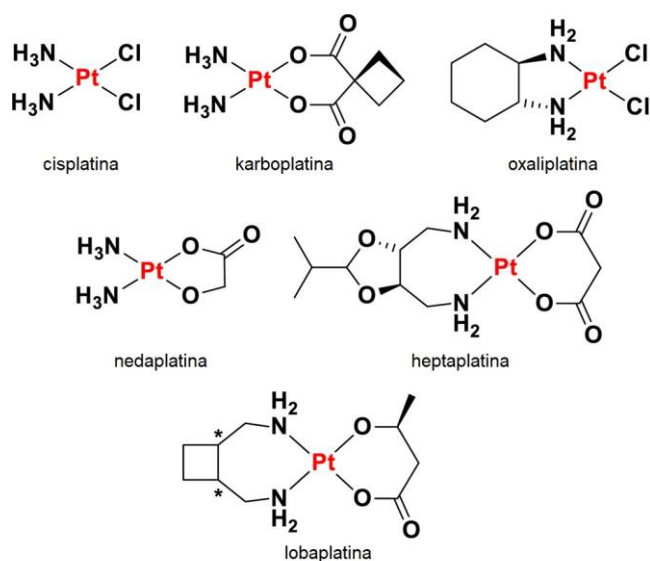
### **3.1.4 Další léčiva na bázi platiny**

Pro klinické využití mimo celosvětově schválenou cisplatinu, karboplatinu a oxaliplatinu byla také schválena další tři léčiva, a to nedaplatina, lobaplatina a heptaplatina (Obrázek 1). Tato tři léčiva byla však schválena pouze v Číně, Japonsku a Jižní Koreji (Johnstone *et al*, 2016). Další látky na bázi platiny jsou ve fázi testování.

Cisplatinou, karboplatinou a nedaplatinou mají obdobné spektrum léčitelných nádorů v důsledku podobného složení těchto látek (dva nosné aminové ligandy). Výhodou karboplatiny a nedaplatiny jsou jejich méně závažné negativní vedlejší účinky na organismus pacienta v porovnání s cisplatinou. Naopak oxaliplatina, lobaplatina a heptaplatina obsahují jiné nosné ligandy a hydrolyzou těchto komplexů pak v intracelulárním prostoru vznikají jiné typy Pt-komplexních částic způsobujících odlišné změny v cílové molekule DNA (Štarha *et Trávníček*, 2018).

Tyto látky interagují s DNA, nicméně tvoří na DNA jiné spektrum aduktů ve srovnání s cisplatinou. Aduktů u těchto látek způsobují odlišnou biologickou odpověď.

Obecně je pro vývoj nových protinádorově aktivních látek podstatné, aby látka obsahovala alespoň některé z uvedených vlastností – aktivitu srovnatelnou nebo vyšší v porovnání s konvenčními chemoterapeutiky; aplikaci jež není spojena s výraznými negativními vedlejšími účinky; schopnost překonávat rezistenci některých typů nádorů a mechanismus účinku odlišný od konvenčních léčiv (Štarha *et* Trávníček, 2018).



Obrázek 1: Protinádorová léčiva na bázi platiny (převzato z Johnstone *et al*, 2016)

### 3.2 Fotochemoterapie v léčbě nádorových onemocnění

Kromě protinádorové chemoterapie s využitím výše uvedených sloučenin se v léčbě nádorových onemocnění v současné době uplatňuje nebo je testováno hned několik dalších metod a jejich kombinací, např. chirurgická léčba, chemoterapie, radioterapie, imunoterapie nebo fotodynamická terapie. Zejména poslední zmíněná metoda umožňuje cílené působení použitého léčiva v určeném místě, což má za následek zničení nádorových buněk při minimálním poškození okolní zdravé tkáně.

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT) je moderní a neinvazivní terapie využívaná pro léčbu maligních i benigních nádorů. Nejčastější indikací PDT je léčba kožních nádorů, ale své uplatnění nachází i v dermatologii, gynekologii a urologii (Kwiatkowski *et al*, 2018).

PDT je založena na interakci tří složek – světla o vhodné vlnové délce, fotosenzitizéru (fotosenzibilizátoru, PS) a kyslíku. Díky interakci těchto faktorů vznikají v cílovém místě reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS), které reagují s buněčnými komponentami, což v konečném důsledku může vést k buněčné smrti – apoptóze nebo nekróze (Rkein *et* Ozog, 2014). Po aplikaci PDT dochází k aktivaci PS světlem přímo v ozářené tkáni. PS působí s vysokou selektivitou, kdy dochází k destrukci nádorových buněk a to téměř bez poškození okolní zdravé tkáně. Výhodou PDT je také opakovatelnost terapie v krátkém čase, oproti chemo- a radioterapii, jelikož aplikovaná fotosenzitivní látka vykazuje bez přístupu světla téměř nulovou toxicitu. Dále je léčba nádorů pomocí PDT neinvazní – není potřeba žádný chirurgický zásah (Yoon *et al*, 2013).

Jistým omezením výše popsané terapie je světlo aktivující fotosenzitivní látku. Nejhluběji do tkáně proniká červené světlo a je tedy ideálním pro využití v PDT. Červené světlo však není vždy vhodné pro aktivaci daného fotosenzitizéru. PDT se tedy využívá k léčbě nádorů na povrchu těla nebo na orgánech, které jsou endoskopicky dostupné. V současné době je PDT používána k léčbě rakoviny plic, povrchové rakoviny žaludku, děložního čípku, močového měchýře, hlavy a krku (Bednarski *et al*, 2007).

### 3.2.1 Historie

Již ve starověkém Egyptě, Indii a Číně se využívalo kombinace účinných látek z různých rostlin se slunečním světlem k léčbě kožních nádorů, psoriázy a také vitiliga (Daniell *et* Hill, 1991). Starověké civilizace využívaly např. k léčbě vitiliga, což je kožní porucha, kdy dochází ke ztrátě melanocytů neboli buněk tvořících pigment, přírodní fotosenzibilizátory psoraleny. Při této léčbě byl z rostliny obsahující psoralen vytvořen prášek, který byl aplikován na depigmentované kožní léze a po vystavení slunečním paprskům došlo k aktivaci fotocitlivé látky.

Fototerapie byla dále rozvinuta dánským lékařem Nielsem Finsenem, který popsal léčbu neštovic pomocí červeného světla, které zabránilo praskání neštovicových postul. Finsen dále pokračoval ve výzkumu ultrafialového světla pro léčbu kožní formy tuberkulózy a za objev fototerapie obdržel v roce 1903 Nobelovu cenu. Na počátku 20. století student medicíny Oscar Raab zjistil, že působení světla na akridinové barvivo má letální účinky na prvoky rodu *Paramecium*. Následující experimenty potvrdily, že světlo v kombinaci s akridinem

bylo zodpovědné za uvedenou toxicitu, zatímco samotný akridin, světlo nebo akridin vystavený světlu a poté přidáný k *Paramecium* nebyly toxické (Hamblin, 2019).

K využití PDT také velmi přispěl profesor Herman von Tappeiner, který v roce 1907 zavedl termín "fotodynamický efekt" pro popis oxygendependentní reakce po fotosenzibilizaci. Tappeiner také zkoumal vliv záření na barviva akridinové povahy a doplnil, že v nepřítomnosti kyslíku akridinové barvivo ani světlo nezpůsobuje buněčnou smrt. Dále pokračoval ve vývoji PDT a jako první popsal využití této terapie u lidí, kde bylo využito červené fluorescenční barvivo eosin jako fotosenzitizér k léčbě různých stavů kůže a condylomata lata (Ozog *et al*, 2016).

### **3.2.2 Fotosenzitizéry pro PDT**

Významný podíl na správném fungování PDT mají vhodně zvolené fotosenzitizéry (PS), které můžeme definovat jako látky, jež generují ROS po ozáření a mohou být tedy použity k usmrcení buněk vyvolanému světlem nebo k inaktivaci vybraných proteinů. Ideální PS by měl splňovat několik následujících kritérií. Měl by být dobře rozpustný ve vodě a stabilní při průchodu organismem, kde by se měl kumulovat v nádorové tkáni a naopak rychle vyplavovat ze zdravé tkáně. Ideální PS by měl mít také přesné chemické složení umožňující snadnou výrobu s nízkými výrobními náklady a dále by měl být stabilní při skladování (Abrahamse *et Hamblin*, 2016). Klíčové je také vysoké absorpční maximum v oblasti 600 – 800 nm, tedy v oblasti červeného světla, které dobře proniká do tkání (Kwiatkowski *et al*, 2018).

PS můžeme klasifikovat dle chemické struktury, čistoty nebo také mechanismu účinku. První generaci PS představují směsi sloučenin s porfyrinovou strukturou, a to hematoporfyrin a jeho deriváty komplexně označované jako HpD. Do druhé generace, která byla vyvinuta na základě nedostatků první generace, spadá kyselina 5-aminolevulová a sloučeniny odvozené od porfyrinové struktury. Poslední generace má stejný mechanismus účinku jako dvě přechodící generace, ale je obohacená o specifické nosiče umožňující dodání PS do cílové tkáně.



## **Fotosenzitizéry I. generace**

První aplikace fotosenzitivní látky v kombinaci se světlem se připisuje Oscaru Raabovi, jenž popsal světlem zprostředkovanou cytotoxicitu akridinové červeni u prvoků rodu *Paramecium*, jak již bylo popsáno výše. Avšak prvním klinicky využívaným PS pro nádorovou terapii byla ve vodě rozpustná směs porfyrinů (HpD). Nejčastějším a nejdéle používaným PS v klinické praxi je Photofrin®.

Komerční produkt Photofrin® je známý i pod názvem porfymer sodný. Navzdory širokému spektru aplikací v protinádorové léčbě má tento přípravek také řadu omezení, která vyplývají např. z nízké chemické čistoty (jedná se o směs více než 60 látek; Kwiatkowski *et al*, 2018). Riziková je také vysoká kožní fotocitlivost, která může přetrvávat až několik týdnů po aplikaci tohoto PS. Od roku 1993 se Photofrin® začal používat v klinické praxi např. v USA, Velké Británii, Kanadě a Francii a nejčastěji se využívá k terapii nádorů plic, jícnu, močového měchýře či žaludku.

## **Fotosenzitizéry II. generace**

Druhá generace PS byla vyvinuta na základě negativ generace předešlé. PS II. generace se vyznačují vyšší chemickou čistotou, efektivnější tvorbou singletního kyslíku po ozáření a lepším pronikáním PS do hlouběji umístěných tkání díky jejich maximální absorpci při 650 – 800 nm (Kwiatkowski *et al*, 2018). Příkladem této generace PS je kyselina 5-aminolevulová (ALA) a dále sloučeniny odvozené od porfyrinové struktury, jako např. chloriny, ftalocyaniny, naftalocyaniny, bakteriochloriny a další. Určitou nevýhodu PS II. generace představuje jejich špatná rozpustnost ve vodě, která je značně omezující při intravenózním podání PS a je tedy nutné hledat efektivnější metody dodání léčiva do nádorové tkáně (Nowak-Stepniowska *et al*, 2013).

Kyselina 5-aminolevulová je přirozeně se vyskytující aminokyselinou, která je prekurzorem hemu a protoporfyrinu IX (PpIX). ALA je druhem proléčiva, které se stává aktivním až po transformaci na PpIX, který je po ozáření viditelným světlem schopen červeně fluoreskovat a dochází k tvorbě ROS (Fujino, 2016). Mimo nádorovou terapii nachází ALA své uplatnění v léčbě zánětlivých onemocnění, autoimunitních onemocnění a v dermatologii. V klinické praxi se také používají její estery, např. methylaminolevulát pod názvem Metvix® a hexaminolevulát na trhu vedený s názvem Hexvix®.

Za zmínku také stojí temoporfin patřící do skupiny chlorinů, který je na trhu uváděn jako komerční přípravek Foscan®. Agenturou EMA (Evropská agentura pro léčivé přípravky) byl schválen k terapii nádorů hlavy a krku. Výhodou Foscanu® je vysoký absorpční pík při 652 nm. Jelikož se jedná o silný PS, bohužel může poškodit zdravou tkáň v okolí nádoru a fotocitlivost kůže může přetrvávat i dva týdny po aplikaci tohoto PS (Hamblin, 2019).

### **Fotosenzitizéry III. generace**

Známy jsou také fotosenzitizéry III. generace, které jsou v současnosti dále vyvíjeny a zkoumány pro efektivnější PDT zejména díky pokrokům v oblasti nanotechnologií a genového inženýrství. Mechanismus účinku u této generace PS se nijak neliší od předchozích generací. Rozdílný je však způsob transportu látky do nádorové tkáně. Zatímco u fotosenzitizérů předchozích generací nebylo využito aktivního cílení těchto látek do místa nádoru, PS III. generace jsou obohaceny o specifické nosiče, které umožňují dodání PS do specifické nádorové tkáně (Kou *et al*, 2017).

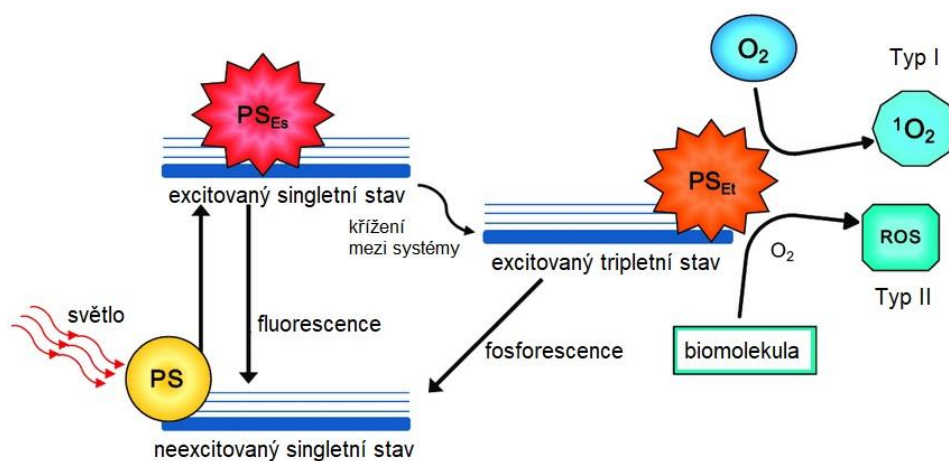
Pro zvýšení selektivity a zvýšení akumulace PS v nádorové oblasti lze využít různých modifikací. Např. kombinací PS druhé generace s molekulami zaměřenými na cílový receptor nebo konjugací s monoklonální protilátkou cílenou na specifický antigen rakovinné buňky. V praxi je cíleno zejména na povrchové markery nádoru, např. receptory růstového faktoru nebo receptory transferinu (Kwiatkovski *et al*, 2018). Do místa nádoru, kde jsou tyto receptory přítomny ve větším množství, se tedy dostane více fotosenzitivní látky. Látka se do tkáně dostává v neaktivní formě a její aktivace je stejná jako u PS první a druhé generace.

### 3.2.3 Mechanismus účinku PDT

Základní mechanismus klasické PDT je založen na interakci tří složek: fotosenzitizéru, světla odpovídající vlnové délky a molekulárního kyslíku. Právě molekulární kyslík se během PDT využívá k tvorbě ROS, které mají cytotoxický účinek na buňky neoplastické tkáně. Prvním krokem při PDT je aplikace PS do těla pacienta a jeho distribuce do celého organismu nebo lokálně pouze do vybrané nádorové tkáně. Následuje ozáření světlem vhodné vlnové délky, které se shoduje s absorpčním maximem PS. Po vystavení zvoleným vlnovým délkám PS přechází ze základního energetického stavu  $S^0$  do excitovaného singletového stavu  $S^1$ . Singletový excitovaný stav PS není stabilní a doba jeho trvání se pohybuje pouze v řádu několika nanosekund. Dochází tak ke ztrátě energie formou světelné emise nebo vnitřní konverzí ve formě tepla. Část energie je využita k přechodu molekuly PS do tripletového stavu  $T^1$ . Přechod PS z tohoto stavu zpět na stav základní může probíhat dvěma způsoby, které budou popsány následovně (Sorbellini *et al*, 2018; Kwiatkowski *et al* 2018).

V prvním typu fotoreakce PS reaguje přímo se substrátem, kterým jsou komponenty nádorové tkáně. Mezi PS v excitovaném tripletovém stavu a substrátem dochází k přenosu elektronů nebo protonů, což vede ke vzniku radikálových aniontů nebo kationtů (Obrázek 3). Reakcí těchto radikálů s kyslíkem pak vznikají ROS. Nejdříve vzniká ROS ve formě superoxidového aniontového radikálu ( $O_2^{\cdot -}$ ), který vytváří další generace ROS v buňkách. Takto zahájená kaskáda reakcí vede k oxidačnímu stresu a dále k destrukci rakovinových buněk (Kwiatkowski *et al*, 2018).

Fotoreakce druhého typu se vyznačuje přenosem energie srážkou PS v excitovaném tripletovém stavu s molekulárním kyslíkem (Obrázek 3). Tento přenos energie vede k tvorbě singletového kyslíku. Obecně můžeme konstatovat, že tento singletový excitovaný stav PS není velmi stabilní, avšak může podstoupit proces označovaný jako „křížení mezi systémy“, který vede k tvorbě daleko stabilnějšího excitovaného tripletového stavu. Životnost stavu tripletu se pohybuje v mikrosekundách a je tedy dlouhodobější než u stavu singletu. Právě jeho dlouhá životnost umožňuje dostatek času ke zmíněnému přenosu energie (Abrahamse, 2017).



Obrázek 3: Schematický Jablonskiho diagram ukazující mechanismus působení fotosenzitizérů vyžadujících kyslík při PDT. Po absorpci světla dosáhne PS vzrušeného singletového stavu. Po křížení mezi systémy může PS reagovat s biomolekulami prostřednictvím přenosu atomu vodíku za vzniku ROS (reakce typu I); nebo PS může reagovat přímo s kyslíkem za přenosu energie (reakce typu II; převzato z Calixto *et al*, 2016)

Generování ROS prostřednictvím fotoreakce druhého typu je mechanisticky jednodušší a většina PS využívaných v protinádorové terapii je spojena s tímto mechanismem účinku (Abrahamse, 2017). Oba typy fotoreakce vedou v konečném důsledku k buněčné smrti, a to k apoptóze, nekróze nebo autofagii.

Apoptóza, programovaná buněčná smrt, vede k destrukci cílové buňky tak, aby došlo k minimálnímu poškození okolních zdravých buněk. Tento typ buněčné smrti využívá enzymatické regulační kaskády buňky, která nastává po aktivaci tzv. kaspáz. Patologický typ buněčné smrti představuje nekróza, která je vyvolána chemickými, mechanickými či biologickými vlivy působícími na buňku. Dochází k narušení integrity cytoplazmatické membrány a rovnováhy vnitřního prostředí buňky. Vnitřní obsah buňky se tedy vylije do okolí a často nastává zánětlivá reakce. Autofagie je buněčná smrt primárně sloužící k udržení homeostázy v buňkách, kdy zajišťuje zejména odstranění nepotřebných organel a proteinů. Bylo zjištěno, že jednotlivé typy buněčné smrti do jisté míry závisí na typu PS. Například apoptóza je zprostředkována v případě mitochondriálně lokalizovaných PS, zatímco lyzosomální lokalizace vede k nekróze či autofagii (Oniszczyk *et al*, 2016).

Důležitou součástí celého mechanismu PDT je mimo použití vhodného PS a přítomnosti kyslíku v nádorové tkáni také výběr světla určité vlnové délky. Světlo musí proniknout kůží a tkání, aby dosáhlo cílového místa a aktivovalo PS. Pronikání světla do tkáně je složitý proces, který je závislý na optických vlastnostech tkáně při použité vlnové délce (Straten *et al*, 2017). Mezi zdroje světla dostupné pro PDT patří žárovky poskytující širokopásmové světlo, obloukové lampy a také diodové lasery (Chilakamarthi *et* Giribabu, 2017).

Jak již bylo zmíněno, pro PDT je optimální použití světla vlnových délek mezi 600 – 800 nm. Kratší vlnové délky málo pronikají do tkáně a naopak vyšší vlnové délky nemají dostatečnou energii k excitaci molekulárního kyslíku do singletního stavu. Právě dostatečné množství ROS je důležité pro zajištění dobré intenzity účinku na nádorovou tkáň. Úspěšnost PDT závisí také na celkové dávce světla použitého k ozáření vybraného nádoru, době expozice a plynulosti ozařování (Chilakamarthi *et* Giribabu, 2017).

Široce používaný zdroj světla pro PDT představují lasery, které poskytují přesné dávky světelného záření (Ozog *et al*, 2016). Lasery jsou silné a lze je připojit k optickým vláknům, která se využívají k intersticiálnímu osvětlení hluboce lokalizovaných nádorů (Straten *et al*, 2017). Četné studie se zabývají také využitím světelných LED diod v PDT. Tyto diody emitující světlo jsou levné, snadno se vyrábějí, mají vysoký výkon a lze je použít pro širokou škálu vlnových délek. (Straten *et al*, 2017). Aktivace PS je také ovlivněna způsobem aplikace záření. V současné době se v klinické praxi provádí povrchová, intersticiální a intraoperativní PDT.

Patofyziologickou vlastností nádorů je přítomnost hypoxických oblastí, které jsou nedostatečně zásobeny kyslíkem. Vznik těchto oblastí je výsledkem nepochybně mezi zásobením nádorové tkáně kyslíkem a jeho spotřebou, která je u nádorů v porovnání s normální zdravou tkání vyšší. Jeho nedostatek tak během ozáření vede ke zvýšené rezistenci nádorové tkáně a k tvorbě proteinů závislých na hladině kyslíku, které usnadňují metastázování nádorů. Růst nádoru a tvorbu metastáz umožní také angiogeneze neboli proces novotvorby krevních kapilár. Díky síti krevních kapilár je rostoucí nádor zásoben živinami a kyslíkem (Vodvařka, 2001). V současné době jsou vyvíjeny nové látky, které jsou schopny ničit nádorové buňky lokálně a v nepřítomnosti kyslíku.

### 3.2.4 Klinické využití PDT

Každá terapie aplikovaná v oblasti medicíny má své výhody i nevýhody. Výhodou PDT je její neinvazivnost a zacílení na určitou část organismu nebo tkáň, díky čemuž není zasažen celý organismus. PDT i chemoterapii lze kombinovat s jinou léčbou, ale PDT má oproti chemoterapii mírnější vedlejší nežádoucí účinky. Po operaci chemo- a radio- rezistentních nádorů může být PDT využita jako metoda paliativní léčby (Oniszczyk *et al*, 2016). Krátkodobé vedlejší účinky PDT jsou obvykle mírné a dochází k nim během léčby nebo prvních 24 hodin po léčbě. Řadí se mezi ně např. edémy, zarudnutí kůže, svědění, bolest, přechodná petechie a purpura. Naopak mezi dlouhodobější vedlejší účinky patří pigmentové skvrny a katarakta neboli šedý zákal. PDT může být přirozeně omezena obrannými systémy, které napomáhají rakovinným buňkám přežít a vychytat vytvořené radikály. Příkladem je superoxiddismutáza a glutathion. Ten působí proti negativnímu vlivu volných radikálů, kdy je schopen zabránit poškození důležitých buněčných složek způsobených reaktivními druhy kyslíku (Oniszczyk *et al*, 2016).

Tato moderní a neinvazivní metoda nachází své využití v dermatologii, a to konkrétně v terapii nemelanomových kožních nádorů. Ty se vyskytují zejména na místech vystavených slunečnímu záření, a to nejčastěji na obličeji, hřbetech ruky, předloktí a mužské pleši (dermanet.cz). Během posledních 100 let se PDT vyvinula v bezpečnou a účinnou dermatologickou léčbu pro aktinickou keratózu, povrchovou nemelanomovou rakovinu kůže a také akné, verrucae a rosacea (Ozog *et al*, 2016). Mimo oblast dermatologie je PDT používána jako adjuvantní terapie k léčbě nádorů plic, dýchacích cest, nervových a močových cest a vitreoretinálních onemocnění (onemocnění sítnice a sklivce).

### 3.3 Fotocitlivé platinové komplexy

Ve snaze zvýšit selektivitu a snížit systémovou toxicitu platinových látek byla vyvinuta fotoaktivovatelná proléčiva na bázi platiny (Johnstone *et al*, 2016). Použití tradičních protinádorových sloučenin na bázi platiny je omezeno vedlejšími účinky a také problémem získané rezistence některých nádorů. K překonání těchto negativ je zkoumáno použití inertních a netoxických komplexů platiny, které mohou být aktivovány lokálně v rakovinných buňkách až po samotném ozáření (Mackay *et al*, 2007). Fotoaktivace proléčiv nabízí možnost nových mechanismů působení a také tvorbu nových aduktů s konečným biologickým cílem, např. DNA, RNA a proteiny. Nové mechanismy účinku jsou důležité k překonání inherentní nebo získané rezistence na cisplatinu (Gandioso *et al*, 2015).

Mezi dvě doposud prozkoumané třídy fotoaktivovatelných platinových komplexů patří diiodo a diazidoplaticité komplexy (Bednarski *et al*, 2007). Tyto komplexy mají lepší rozpustnost ve vodě v porovnání s cisplatinou a jsou aktivní pouze tehdy, jsou-li ozářeny určitými vlnovými délkami světla. Po fotoaktivaci interagují tyto komplexy s DNA, kdy vyvolávají biologickou odpověď odlišnou od cisplatiny, avšak tato odpověď nakonec také vede k buněčné smrti (Pizarro *et Sadler*, 2009).

Jako první generaci fotoaktivovatelných Pt<sup>IV</sup> komplexů s obecným vzorcem *trans,cis*-[Pt(X)<sub>2</sub>l<sub>2</sub>(en)] uvedl Kratochvíl *et al.* v roce 1996 diiodo-Pt(IV)-ethylenediaminy nesoucí různé axiální ligandy. První generace fotoaktivovatelných komplexů platiny(IV) byla založena na jodidu jako redukujícím ligandu a ethylenediaminu jako neodštěpující se skupině (Johnstone *et al*, 2016). Tyto komplexy se však ukázaly jako nevhodné pro klinické aplikace, jelikož byly předčasně redukovány pomocí buněčných thiolů, zejména glutathionu, na cytotoxické komplexy Pt(II) (Bednarski *et al*, 2007; Bednarski *et al*, 2006).

Je známo, že několik azidových komplexů přechodných kovů je citlivých na světlo a podléhají tak fotosubstitučním a fotoredukčním reakcím (Johnstone *et al*, 2016). Proto byly jodidové ligandy nahrazeny azidovými ligandy za účelem přípravy druhé generace fotoaktivovatelných prekurzorů platiny(IV). Na rozdíl od komplexů diiodoplaticitých jsou azidy obsahující komplexy stabilnější vůči hydrolýze a ve fyziologickém prostředí po dobu až 90 dnů. Fotoaktivní diazidoplaticité komplexy vykazují vysokou stabilitu ve tmě, slibnou fotocytotoxicitu nezávislou na kyslíku a nové mechanismy působení, které jim umožňují jistým

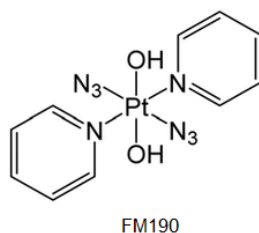
způsobem obejít získanou rezistenci nádorových buněk na cisplatinu. (Shi *et al*, 2019). Mezi nejúspěšnější diazidoplaticité komplexy patří FM165 a FM190.

*Trans, trans, trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(pyridin)] (FM165; Obrázek 3) představuje vysoce účinný komplex, který je po fotoaktivaci až 80 krát více cytotoxický než cisplatina v ovariální nádorové buněčné linii A2780. Dále je stabilní vůči biologickým redukčním látkám ve tmě, reaguje s deriváty guaninu a s DNA poskytuje neobvyklé adukty Pt<sup>II</sup>, které se snadno netvoří v nepřítomnosti světla (Mackay *et al*, 2007; Pizarro *et Sadler*, 2009).

Druhým nejúspěšnějším komplexem je *trans, trans, trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(pyridin)<sub>2</sub>] (FM190; Obrázek 4; Farrer *et al*, 2010). Tento komplex je vysoce stabilní ve fyziologickém prostředí a dobře rozpustný ve vodě. Může být fotoaktivován nízkými dávkami UVA záření, ale také viditelným světlem. Tento komplex je také tepelně stabilnější než FM165. Po fotoaktivaci vykazuje FM190 fototoxicitu vůči řadě lidských buněčných linií, např. keranocytům (HaCaT), parentálnímu (A2780) a k cisplatině rezistentnímu (A2780CIS) ovariálnímu karcinomu. Pro fotoredukci Pt(IV) na aktivní formu Pt(II) jsou klíčové dva azidové ligandy (Pizarro *et Sadler*, 2009). Po ozáření azidové ligandy odstupují za vzniku azidových radikálů, které jsou nestabilní ve vodném prostředí a rychle se rozkládají na molekulární dusík (N<sub>2</sub>), čímž zabraňují reoxidaci platinového centra (Obrázek 5; Ronconi *et Sadler*, 2007).

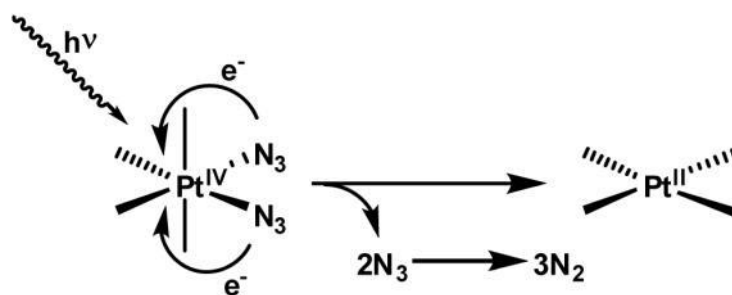


Obrázek 3: Diazidoplaticitý komplex *trans, trans, trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(pyridin)] (FM165; převzato z Pizarro *et Sadler*, 2009)



Obrázek 4: Diazidoplaticitý komplex *trans, trans, trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(pyridin)<sub>2</sub>] (FM190; převzato z Shi *et al*, 2019)





Obrázek 5: Možný mechanismus fotoredukce Pt(IV)-diazidových komplexů (převzato z Ronconi *et Sadler*, 2007)

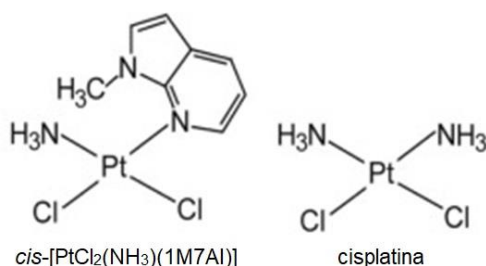
Fotoaktivovatelné diazidoplatičité komplexy tedy představují zajímavou třídu potenciálních protirakovinových proléčiv, která mohou být selektivně aktivována světlem přímo v cílovém místě a ničit buňky mechanismem odlišným od cisplatiny. Toxicitu těchto komplexů ovlivňuje také oxidační stav platiny, kdy oktahedrál ní struktura platiny(IV) je stabilnější oproti planárním komplexům dvojmocné platiny. Oktahedrál ní komplexy platiny(IV) mohou být výhodné v lékařské chemii, jelikož jsou méně citlivé na substituční reakce, a tak podléhají méně reakcím také na cestě k nádoru (Pizarro *et Sadler*, 2009; Bednarski *et al*, 2013). Bylo také zjištěno, že i aktivita Pt(II) látek může být zesílena pomocí ozáření (např. transplatina a karboplatina).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Platinové komplexy

Pro experimentální část byl zvolen derivát platiny *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(1M7AI)] (1M7AI = 1-methyl-7-azaindol; CIS komplex). Tento komplex poskytl prof. Giovanni Natile z University of Bari (Itálie). CIS komplex se liší od cDDP navázanými ligandy, kdy ligand -NH<sub>3</sub> je nahrazen 1-methyl-7-azaindolem. Pro kontrolu byly některé experimenty provedeny také s cisplatinou (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]; cDDP; Sigma-Aldrich; Česká republika). Je známo, že biologickým cílem cDDP je DNA v jádře buněk, proto jsme v experimentální části předkládané práce zkoumaly, zda je DNA taktéž biologickým cílem CIS komplexu. Zásobní roztoky platinových komplexů (cDDP a CIS; Obrázek 6) byly připravovány vždy čerstvé v koncentraci 50 mmol × l<sup>-1</sup>. Oba komplexy byly rozpouštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a skladovány ve tmě.



Obrázek 6: Strukturní vzorec CIS komplexu (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(1M7AI)]) a cisplatin (převzato z Prachařová *et al*, 2018).

#### 4.1.2 Biologický materiál a chemikálie

agaróza (Serva, Německo)

antibiotika (ATB):

Penicillin (10 U·ml<sup>-1</sup>; (Sigma-Aldrich; Česká republika)

Streptomycin (10 µg·ml<sup>-1</sup>; (Sigma-Aldrich; Česká republika)

bromthiazolová modř (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid; Duchefa; Nizozemí)

buněčná linie lidského adenokarcinomu děložního čípku HeLa (ATCC – American Type Culture Collection; USA)

dimethylsulfoxid (Penta; Česká republika)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biosera; Francie)

Earle's balanced salt solution 10x (Sigma-Aldrich; Česká republika)  
ethidium bromid (Sigma-Aldrich; Česká republika)  
fetální hovězí sérum (FBS; Biosera; Francie)  
hydroxid sodný (Sigma-Aldrich; Česká republika)  
chloristan sodný (Sigma-Aldrich; Česká republika)  
nízkothnoucí (LMP, Low Melting Point) agaróza (Promega; USA)  
plasmidová DNA pUC19 (New England BioLabs; Velká Británie)  
trypanová modř (Sigma-Aldrich; Česká republika)  
trypsin/EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová; Sigma-Aldrich; Česká republika)

K přípravě všech roztoků byla použita deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)

### **Použité roztoky**

Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS) 10x pH 7,4:

- 150 mmol × l<sup>-1</sup> NaCl
- 2 mmol × l<sup>-1</sup> KCl
- 10 mmol × l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 2 mmol × l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH fosfátového pufru bylo upraveno pomocí 5 mol × l<sup>-1</sup> NaOH na pH 7,4

TAE pufr 50x pro nativní agarózovou elektroforézu

- 2 mol × l<sup>-1</sup> Tris
- 1 mol × l<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COOH
- 50 mmol × l<sup>-1</sup> EDTA

Lyzační roztok pH 10 pro comet assay

- 2,5 mol × l<sup>-1</sup> NaCl
- 100 mmol × l<sup>-1</sup> EDTA
- 10 mmol × l<sup>-1</sup> Tris
- 1% Triton X100

pH lyzačního roztoku bylo upraveno pomocí 5 mol × l<sup>-1</sup> NaOH na pH 10

Neutralizační roztok pH 7,5 pro comet assay

- 0,4 mmol × l<sup>-1</sup> Tris

pH neutralizačního roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na pH 7,5

Roztok pro alkalickou elektroforézu pro comet assay

- 300 mmol × l<sup>-1</sup> NaOH
- 1 mmol × l<sup>-1</sup> EDTA

Příprava MTT roztoku

- 0,5 g bromthiazolové modři (MTT)
- 100 ml PBS 1x

#### **4.1.3 Laboratorní vybavení a software**

automatická počítačka buněk TC-20 (Bio-Rad; USA)

automatické pipety (Eppendorf; Německo)

CO<sub>2</sub> inkubátor, model MCO-18AC-PE (Panasonic; Japonsko)

digestoř Forlab (Block; Česká republika)

elektroforetická souprava PowerPac Basic (Bio-Rad; USA)

invertovaný fluorescenční mikroskop IX73 (Olympus; Česká republika)

invertovaný mikroskop NIB-100 (MIKRO; Česká republika)

laminární box SafeFAST Classic 212 (Faster; Itálie)

magnetická míchačka RCT basic (IKA®; Německo)

multifunkční modulární reader SPARK Tecan (Schoeller; Česká republika)

ozařovač s řízeným osvitem Luzchem LZC-ICH2 (Luzchem Research Inc.; Kanada)

pH metr (Boeco; Německo)

stolní centrifuga Sigma 3-18K (Sartorius; Německo)

třepačka Universal Orbital Shaker OS-20 (BOECO; Německo)

sestava transiluminátoru a vizualizačního kamerového systému CareStream Gel Logic (Carestream Molecular Imaging; USA)

vodní lázeň SB-12L shaking water bath (Benchmark Scientific; USA)

výrobník dH<sub>2</sub>O Smart2Pure (Thermo Scientific™; USA)

Pro vyhodnocení dat byl použit software GraphPad Prism4 (GraphPadPrism Software; USA) a Microsoft Excel (Microsoft, USA).

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Kultivace buněk**

Pro experimenty v rámci bakalářské práce byla vybrána buněčná linie HeLa. Tato buněčná linie byla odvozena od maligního adenokarcinomu děložního čípku a již řadu let se jí dostává komerčního využití. Jedná se o adherentní buněčnou linii.

HeLa buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37°C a v 5% atmosféře oxidu uhličitého dle standardního protokolu. Konfluentní buňky byly pasážovány dvakrát týdně s využitím roztoku trypsin/EDTA (viz Biologický materiál a chemikálie) následovně:

1. Ve vodní lázni nastavené na teplotu 37°C bylo nahříváno PBS 1x a médium DMEM s přídavkem 10% FBS a ATB po dobu 30 minut. Roztok trypsin/EDTA byl rozmrazen při laboratorní teplotě.
2. Práce s buňkami byla prováděna za aseptických podmínek v laminárním boxu.
3. Před samotným pasážováním byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem.
4. Do předem připravené falkony bylo odsáto staré médium z kultivační lahve s buňkami.
5. Buňky byly opláchnuty 2 ml PBS 1x.
6. K buňkám byl přidán 1 ml roztoku trypsin/EDTA a kultivační lahev byla ponechána v inkubátoru do oddělení buněk od kultivačního povrchu (cca po dobu 2 minut).
7. Po inkubaci byly buňky opět zkontrolovány pod mikroskopem. V kultivační lahvi byl ponechán cca 1 ml buněčné suspenze obsahující  $1,5 \times 10^6$  buněk, ke kterému bylo přidáno 10-12 ml média DMEM. Buněčná suspenze byla přenesena do nové kultivační lahve a držena za kultivačních podmínek pro další použití.

#### 4.2.2 Počítání buněk

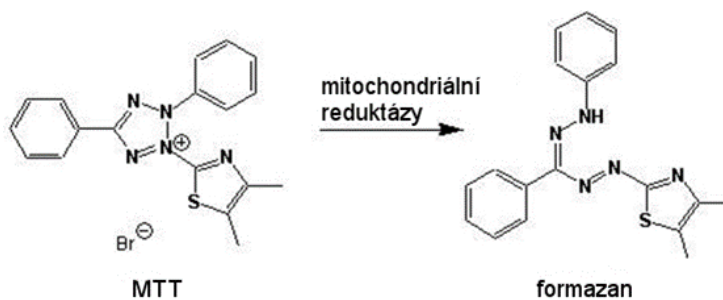
Pro nasazení přesného počtu buněk na kultivační nádoby nebo desky bylo před každým experimentem nezbytné buňky spočítat. Buňky oddělené od kultivačního povrchu byly barveny pomocí trypanové modři, což je barvivo běžně používané pro stanovení životaschopnosti buněk. Živé buňky mají neporušenou cytoplazmatickou membránu a barvivo tak neproniká dovnitř buňky. V případě proniknutí barviva do intracelulárního prostoru je toto barvivo živými buňkami ihned transportováno ven. Živé buňky se tak při vizualizaci jeví jako bezbarvé, naopak mrtvé buňky s porušenou integritou cytoplazmatické membrány jsou zbarveny modře (Kim *et al*, 2016). Obarvená buněčná suspenze byla napipetována na speciální sklíčko, které bylo vloženo do automatické počítačky buněk. Tento přístroj automaticky vyhodnotil celkový počet buněk a počet živých buněk v procentech na základě analýzy obrazu.

#### 4.2.3 Ošetření buněk testovanými komplexy

1. Pro test cytotoxické aktivity cDDP a CIS komplexu byly HeLa buňky sazeny na 96 – jamkové desky v počtu 10 000 buněk na jednu jamku v desce v 100  $\mu\text{l}$  kompletního média. Buňky byly drženy za kultivačních podmínek po dobu 24 hodin.
2. Konfluentní buňky byly ošetřeny testovanými komplexy. Výsledný rozsah použitých koncentrací byl 0 – 100  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  pro cDDP a 0 – 50  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  pro CIS komplex. Koncentrace DMSO v kultivačním médiu nebyla vyšší než 0,5 %, což nijak neovlivňuje životaschopnost použitých buněk. Buňky ošetřené uvedenými látkami byly inkubovány při 37°C a v 5% atmosféře oxidu uhličitého po dobu 1 hodiny.
3. Po inkubaci bylo odstraněno kultivační médium s komplexy a buňky byly opláchnuty PBS 1x.
4. Následně bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$ /jamka EBSS a určené 96 – jamkové desky s buňkami byly ozařovány UVA ( $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$ ) po dobu 30 minut. Ozařovaným i neozařovaným buňkám bylo odstraněno EBSS, byly promyty PBS 1x a bylo k nim přidáno 200  $\mu\text{l}$ /jamka plnohodnotného média DMEM.
5. Cytotoxicita testovaných komplexů byla stanovena po 24 hodinách (recovery) pomocí MTT testu.

#### 4.2.4 Stanovení cytotoxicity komplexů pomocí MTT testu

Principem MTT testu je redukce žlutého MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu) mitochondriálními enzymy živých buněk na tmavě fialový formazanový derivát (Obrázek 7). Tento derivát je v buňkách uchován ve formě nerozpustných krystalů, které jsou následně rozpuštěny v DMSO. Počet živých buněk je přímo úměrný intenzitě fialového zbarvení.



Obrázek 7: Redukce 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu na formazanový derivát.

1. Po působení testovaných komplexů (viz výše) na buňky byl proveden test MTT. Buňky byly ošetřeny 10  $\mu\text{l}$  na jamku připraveného roztoku MTT o koncentraci 5  $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ . Buňky byly inkubovány za kultivačních podmínek s roztokem MTT po dobu 4 hodin.
2. Po inkubaci buněk s MTT roztokem bylo z desek odstraněno médium a připipetováno 100  $\mu\text{l}$  DMSO/jamka, které sloužilo k rozpuštění vzniklých formazanových krystalů.
3. Vyhodnocení životaschopnosti buněk bylo provedeno pomocí absorpčního spektrometru změřením absorbance při 570 nm (referenční vlnová délka 630 nm).
4. Následně byly hodnoty naměřené spektremetrem zpracovány pomocí programů Microsoft Excel a GraphPad a byly zjištěny hodnoty  $\text{IC}_{50}$  (koncentrace sloučeniny, při které přežije 50 % buněk). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  byla stanovena z křivek vynesené závislosti přežití buněk (%) na koncentraci cDDP či CIS komplexu ( $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ).

#### 4.2.5 Štěpení savčí DNA *in vitro*

Plasmidová DNA pUC19 byla modifikována cDDP a CIS komplexem na stanovené hodnoty  $r_i$  (počet molekul komplexu teoreticky navázaných na jednom nukleotidu). Pro tento experiment hodnota  $r_i = r_b$  (počet molekul komplexu skutečně navázaných na jednom nukleotidu) činila 0,02.

Byly připraveny reakční směsi s testovanými komplexy a kontrola dle tabulky 1. Zásobní roztoky byly o koncentraci  $3,1 \times 10^{-3} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  pro DNA,  $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  pro cDDP a CIS komplex.

Následně byly směsi inkubovány při  $37^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin ve tmě.

Po inkubaci byly vzorky rozděleny na dvě poloviny, kdy první část vzorku nebyla ozařována a druhá část vzorků byla ozařována UVA zářením pomocí fotoreaktoru Luzchem ( $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$ ) po různě dlouhou dobu (0, 5, 10 a 20 minut).

Vzorky byly po ukončení inkubace smíchány s bromfenolovou modří a napipetovány do gelu dle tabulky 2. Následně byly vzorky podrobeny nativní agarózové elektroforéze (1% agarózový gel v elektroforetickém pufru TAE 1x) při laboratorní teplotě a napětí 0,8 V/cm.

Po ukončení elektroforézy byl agarózový gel se vzorky obarven fluorescenčním interkalačním barvivem ethidium bromidem (EtBr). Vzorky byly vizualizovány pomocí transiluminátoru a následně byl gel vyhodnocen.

Tabulka 1: Rozpis přípravy reakčních směsí s testovanými komplexy

	10 mmol $\times \text{l}^{-1}$		
	DNA [ $\mu\text{l}$ ]	NaClO <sub>4</sub> [ $\mu\text{l}$ ]	komplex [ $\mu\text{l}$ ]
K	23	577	-
cDDP	23	574	3
CIS komplex	23	575,4	1,6



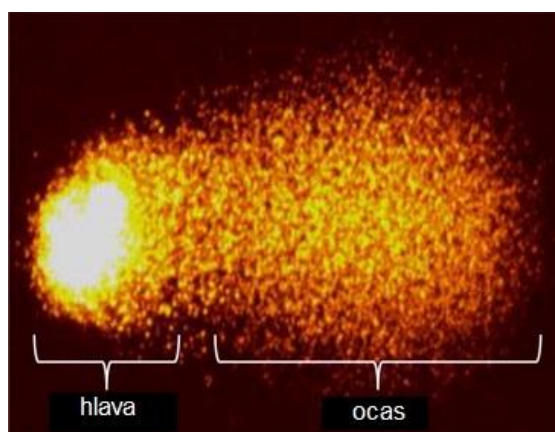
Tabulka 2: Rozpis jednotlivých vzorků pipetovaných do elektroforetického gelu

číslo vzorku	délka ozařování [minuty]	komplex
1	-	
2	20	-
3	-	
4	5	
5	10	cDDP
6	20	
7	-	
8	5	
9	10	CIS komplex
10	20	

#### 4.2.6 Comet assay

Comet assay, známá také pod názvem gelová elektroforéza s jednotlivými buňkami (jádry), je jednoduchá a všestranná metoda pro detekci poškození DNA přímo v buňkách. Tato metoda byla popsána vědci Ostlingem a Johnsonem v roce 1984, kteří neužívali termín „kometa“, ale popsali ocas jako DNA uvolněnou z nadšroubovicového vinutí. Později byla tato metoda upravena Singh *et al* v roce 1988 (Kumaravel, 2009; Beedanagari *et al*, 2014).

Comet assay umožňuje detekci především jedno- či dvouřetězcových zlomů na DNA. Tento experiment spočívá v rozdílné rychlosti migrace, kdy poškozená DNA migruje během elektroforézy rychleji oproti nepoškozené DNA. Právě nepoškozená DNA zůstává zakotvena ve vrstvě agarózy a migrující poškozená DNA tak připomíná tvar komety (Obrázek 8).



Obrázek 8: Obrázek ukazující „kometu“ vzniklou poškozením DNA zahrnující hlavu (nepoškozenou DNA) a ocas (poškozenou DNA; převzato z Beedanagari, 2014).

1. HeLa buňky byly nasazeny na 6 cm Petriho misky v počtu  $10^6$  buněk/miska v 4 ml média DMEM a inkubovány po dobu 24 hodin. Následně byly buňky ošetřeny testovanými komplexy o koncentraci  $30 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  dle tabulky 3 a inkubovány 24 hodin za kultivačních podmínek.

Tabulka 3: Rozpis přípravy vzorků s testovanými komplexy pro comet assay

číslo vzorku	komplex	délka ozařování UVA [minuty]
1	-	-
2	-	30
3	CIS	-
4	CIS	30
5	cDDP	-
6	cDDP	30

vzorek č.1 a 2 byly použity jako negativní kontrola

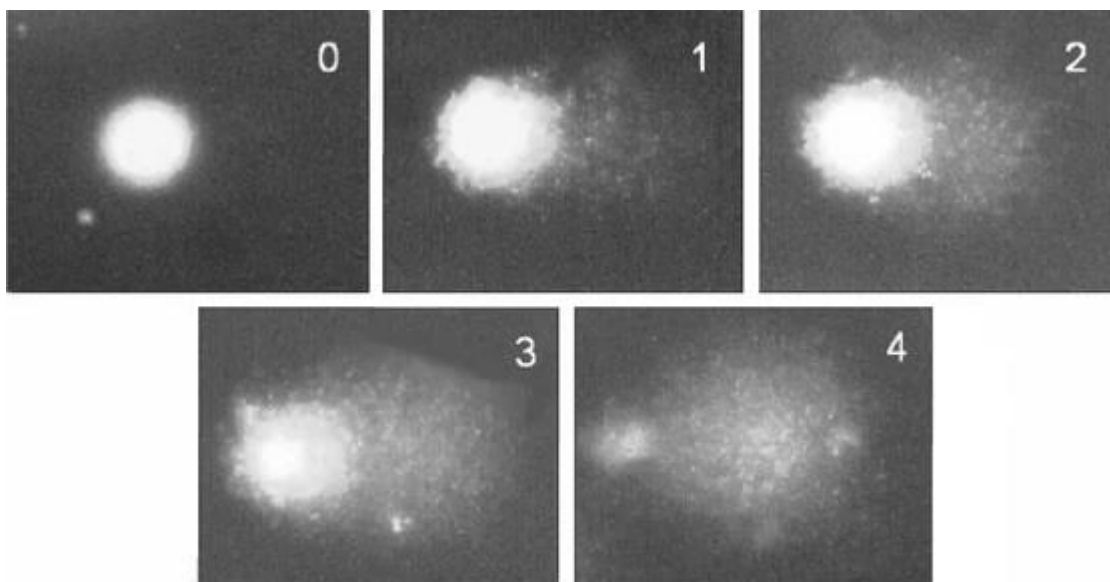
Po dokončení inkubace bylo buňkám odsáto médium, byl proveden oplach pomocí PBS 1x a byly přidány 2 ml EBSS. Zvolené vzorky byly ozářeny UVA ( $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$ ;  $5 \text{ J/cm}^2$ ) po dobu 30 min pomocí ozařovače Luzchem (viz Tabulka 3). Buňky byly poté opláchnuty PBS 1x a inkubovány po dobu 1 hodiny v kompletním kultivačním médiu.

2. Buňky byly sklizeny pomocí sterilní škrabky a přeneseny do falkony s 10 ml PBS 1x.
3. Obsah falkon byl zcentrifugován při 2500 otáčkách po dobu 3 minut. Buňky byly resuspendovány v 1 ml PBS 1x (tímto byla získána suspenze obsahující  $1,5 \times 10^6$  buněk/ml).
4. Alkalická comet assay probíhala na podložních sklech potažených dvěma tenkými vrstvami 1% nízko tuhnutí agarózy v PBS (Low Melting Point agarose; LMP). Na podložní sklo bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  1% LMP agarózy v PBS a rovnoměrně roztaženo pomocí druhého podložního skla. Tato vrstva tuhla přes noc za laboratorní teploty. Dále byla stejným

způsobem nanese druhá vrstva, která tuhnula po dobu 1-2 hodin za laboratorní teploty.

5. Do lyzačního roztoku byl před samotnou lýzí buněk přidán viskózní detergent 1% Triton X100 a společně s roztokem pro elektroforézu byly roztoky chlazeny v chladícím boxu.
6. 1% LMP agaróza v PBS byla rozvařena v mikrovlnné troubě a umístěna do vodní lázně nastavené na 40°C . Dále bylo do připravených mikrozku mávek typu Eppendorf přidáno 140 µl této agarosy a 60 µl vzorků připravených v kroku č.4.
7. Z připraveného roztoku LMP agarosy v PBS smíchaného s buněčnou suspenzí bylo odebráno 100 µl, nanese na podložní sklo se dvěma vrstvami 1% LMP agarosy v PBS a překryto krycím sklem. Vše bylo provedeno v duplikátu. Skla se inkubovala po dobu 30 minut na ledu. Po ztuhnutí agarózy byla krycí skla odstraněna a podložní skla se vzorky byla ponořena do lyzačního roztoku, který rozrušil membrány buněk. Vzorky byly inkubovány při 4°C po dobu 16 hodin (přes noc)
8. Po lýzi buněk byla podložní skla promyta v dH<sub>2</sub>O a následně ponořena do elektroforetické vany s vychlazeným elektroforetickým roztokem na dobu 1 hodiny, během které nastalo rozvolnění DNA. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí a proběhla elektroforéza při 4°C, 0,4 V/cm po dobu 20 minut.
9. Po ukončení elektroforézy byla podložní skla proplachována 3krát po dobu 5 minut v neutralizačním pufru.
10. Jaderná DNA lokalizovaná v agaróze na podložním skle byla zviditelněna pomocí fluorescenčního barviva EtBr (2 µg × ml<sup>-1</sup>).
11. Poškození DNA vlivem testovaných komplexů bylo hodnoceno u padesáti náhodně vybraných jader pro každý vzorek pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus. Toto poškození bylo následně zařazeno do skupin intenzity poškození N0 – N4 (N0 značí nejmenší poškození a N4 je nejvyšší stupeň poškození DNA; Obrázek 9).
12. Celkové poškození DNA bylo vypočítáno dle vzorce:

$(N0.0) + (N1.1) + (N2.2) + (N3.3) + (N4.4)$ ; kde N0 – N4 jsou stupně poškození DNA (viz výše)



Obrázek 9: Vizuální klasifikace komet do tříd poškození dle Collinse (1995).  
Na obrázcích jsou lymfocyty barvené DAPI (převzato z Kumaravel, 2007)

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### Test cytotoxicity

Pomocí standartního MTT testu byla stanovena cytotoxicita CIS komplexu se zaměřením na testování vlivu UVA záření na cytotoxickou aktivitu tohoto komplexu. Pro srovnání byl stejný experiment proveden také s cisplatinou. Buňky byly ošetřeny testovanými komplexy o řadě různých koncentrací (viz Materiál a metody). Nejvyšší použitá koncentrace činila  $50 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  pro cDDP a  $100 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  pro CIS komplex. Jedna část buněk s komplexy byla ozářena UVA zářením ( $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$ ) a druhá část byla ponechána ve tmě. Jak již bylo řečeno, pro stanovení životaschopnosti buněk byl použit standardní MTT test. Mitochondriální enzymy živých buněk redukovaly žlutý MTT na fialový formazan. Tuto mitochondriální metabolickou aktivitu vykazují pouze živé buňky, a proto intenzita fialového zbarvení je přímo úměrná počtu živých buněk. Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  testovaných komplexů byly stanoveny pomocí programu GraphPad (Tabulka 4). V případě HeLa buněk ošetřených cDDP ozářených i neozářených byly hodnoty  $\text{IC}_{50}$  vyšší než maximální koncentrace této látky použitá pro testy, tedy  $50 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ , což značí 100% životaschopnost buněk v rozmezí koncentrací 0 –  $50 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . V porovnání s daty v publikaci (Štarha *et al*, 2016) se hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro cDDP liší. Ve zmíněné publikaci hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro cDDP činí  $30.4 \pm 11.0 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Rozdílnost v hodnotách je způsobena dobou buněčné akumulace, po kterou byly buňky vystaveny působení tohoto komplexu. V našem případě doba buněčné akumulace trvala 1 hodinu. Za daný časový úsek cDDP pronikne do buňky a následně k svému biologickému cíli, tedy DNA v jádře HeLa buněk, mnohem méně než v případě použité delší doby inkubace, která činila ve zmíněné publikaci 24 hodin. Během experimentů v naší laboratoři s použitou kratší dobou inkubace jsme tedy zaznamenali vyšší hodnotu  $\text{IC}_{50}$  pro cDDP. V tomto experimentu s cDDP nebyly voleny vyšší koncentrace cDDP než  $50 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ , jelikož záření nemá vliv na cytotoxicitu této látky, která byla použita jako kontrola.

Byl také vyhodnocen cytotoxický účinek CIS komplexu. V případě neozářených buněk byly hodnoty  $\text{IC}_{50}$  opět vyšší než maximální koncentrace CIS komplexu, kterou byly buňky ošetřeny. V rozmezí koncentrací 0 -  $50 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  bez ozáření neměl CIS komplex žádný efekt na nádorové buňky a byl tedy netoxický ve tmě, což je optimální vlastnost pro praktické využití. Komplex, který je ve tmě

neaktivní nebo vykazuje pouze nízkou cytotoxicitu, nepůsobí při průchodu organismem na normální zdravé buňky a může tak způsobovat menší nežádoucí vedlejší účinky v porovnání s konvenčními cytostatiky. U buněk vystavených UVA záření ( $\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$ ) byla hodnota  $IC_{50} 5.197 \pm 0.9 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . V případě CIS komplexu tedy UVA záření způsobilo cytotoxický účinek této látky na nádorové buňky (Tabulka 4). Pomocí programu GraphPad byly také vytvořeny přežívací křivky závislosti HeLa buněk na koncentraci testovaného komplexu po ozáření, kdy reprezentativní křivka je uvedena níže (viz Graf 1). Cytotoxická aktivita CIS komplexu v ozářených vzorcích byla zřejmě způsobena v důsledku produkce ROS, které by mohly indukovat štěpení DNA. Tato teorie byla tedy následně ověřována v dalších experimentech *in vitro* v bezbuněčném médiu, kdy bylo sledováno štěpení plasmidové DNA, a dále přímo v buňkách s využitím metody comet assay.

Za cytotoxickou aktivitu komplexu CIS po ozáření vzorků UVA mohlo být také zodpovědné přeskupení aduktů tvořených danou látkou na DNA. Po tmě vzniká na DNA určité spektrum aduktů použité látky, kdy po ozáření může docházet k přeskupování těchto aduktů na adukty způsobující větší poškození DNA a tedy vyvolávající v konečném důsledku v buňkách silnější cytotoxický efekt.

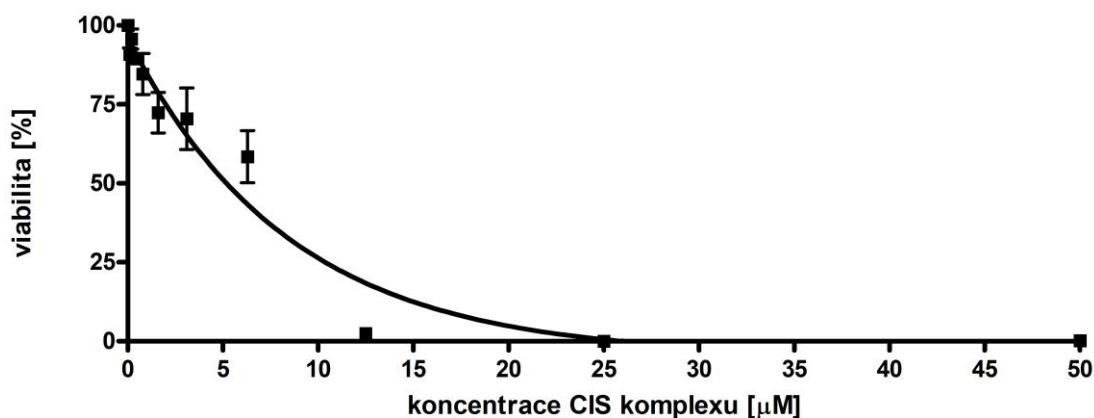
Cytotoxický účinek cDDP a CIS komplexu se tedy liší z důvodu rozdílného mechanismu účinku těchto komplexů. O cDDP je známo, že ji nelze aktivovat světlem, a proto bychom ani v případě ošetření buněk vyšší koncentrací cDDP, než v námi použitím rozmezí koncentrací  $0 - 50 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ , nedetekovali rozdíl mezi cDDP neozářenou a ozářenou UVA zářením.

Tabulka 4: Hodnoty  $IC_{50}$  pro cDDP a CIS komplex před a po ozáření <sup>a</sup>

komplex	$IC_{50} [\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}]$	
	tma	UVA
cDDP	> 50	> 50
CIS komplex	> 100	$5.197 \pm 0.9$

<sup>a</sup> Experimenty byly provedeny v triplicátu.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD tří nezávislých měření.



Graf 1: Přežívací křivka závislosti viability HeLa buněk na koncentraci CIS komplexu (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(1M7AI)]) po ozáření UVA po dobu 30 min.

### Štěpení savčí DNA

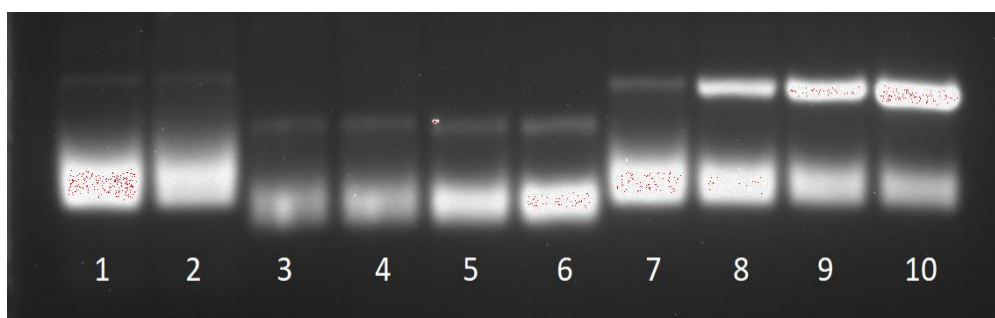
Jak již bylo řečeno, biologickým cílem cDDP je DNA v jádře buněk. Během předběžných experimentů bylo zjištěno, že také testovaný CIS komplex se váže na DNA. V dalším experimentu bylo testováno, zda CIS komplex v kombinaci s ozářením UVA má vliv na plasmidovou DNA v bezbuněčném médiu.

Pro experiment byl použit komerčně dodávaný plasmid pUC19, který je ve své základní formě tvořen uzavřenou kruhovou (supercoiled, SC) DNA. Plasmid byl modifikován cDDP a CIS komplexem v prostředí 10 mmol  $\times$  l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> (optimální pro vazbu těchto látek na DNA). Následně byly vzorky podrobeny nativní agarózové elektroforéze. Ve vzorcích modifikovaných CIS komplexem a ozářených po dobu 5, 10 a 20 minut (Obrázek 10) bylo pozorováno štěpení plasmidové DNA. PUC19 v superhelikální formě byla štěpena na otevřenou kruhovou formu (open-circular, OC) DNA. Tento efekt mohl být způsoben vlivem tvorby ROS během ozařování CIS komplexu, pravděpodobně singletového kyslíku. Tento efekt štěpení nebyl pozorován v neozářených vzorcích ani ve vzorcích DNA modifikovaných cDDP (Obrázek 10).

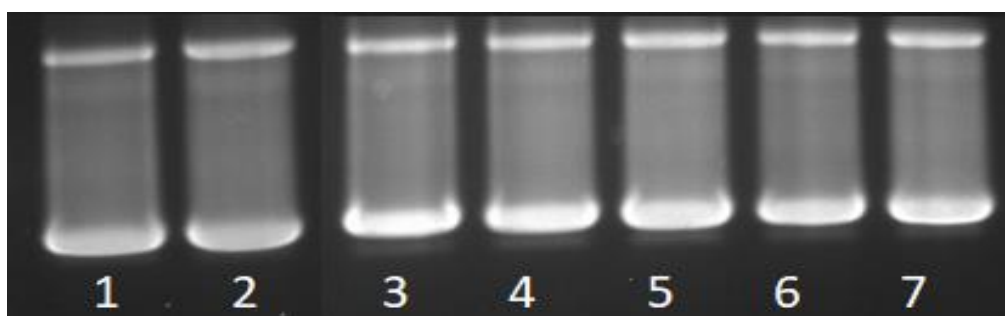
Rozdíl ve struktuře cDDP a CIS komplexu spočívá v nahrazení jednoho NH<sub>3</sub> ligandu za 1-methyl-7azaindolový ligand (1M7AI). Aby bylo prokázáno štěpení DNA CIS komplexem, který obsahuje ligand 1M7AI na centrálním atomu Pt, byl proveden experiment se samotným ligandem 1M7AI a plasmidovou DNA pUC19. Z vyhodnocení elektroforetického gelu je zřejmé, že samotný ligand plasmidovou DNA nikterak neovlivňuje (Obrázek 11). Nukleázový efekt štěpení

plasmidové DNA má tedy pouze 1M7AI ligand navázaný na centrálním atomu Pt ve struktuře testovaného CIS komplexu.

Z obrázku 8 je patrné, že se zvyšující se délkou doby ozařování ve vzorcích modifikovaných CIS komplexem, klesá intenzita pásu odpovídajícího SC DNA (supercoiled forma = uzavřená plasmidová DNA) a také klesá superhelikální hustota. Toto snížení hustoty v důsledku odvíjení dvojité šroubovice způsobuje snížení rychlosti migrace přes agarózový gel a umožňuje tak pozorovat efekt štěpení, při němž přechází jedna forma DNA v druhou (Keck a Lippard, 1992). Současně vzrůstá intenzita pásu odpovídajícího OC formě DNA, což značí štěpení plasmidové DNA, které pozorujeme pouze v případě CIS komplexu. U kontrolních vzorků a vzorků modifikovaných cDDP, neozařovaných ani ozařovaných, štěpení plasmidové DNA nebylo detekováno.



Obrázek 10: 1: K- neozařený vzorek (DNA); 2: K- DNA ozářená po dobu 20 min; 3: cDDP neozařená; 4-6: cDDP ozáření UVA po různou dobu (5, 10, 20 min); 7: CIS komplex neozařený vzorek; 8-10: CIS komplex ozáření UVA po různou dobu (5, 10, 20 min).



Obrázek 11: Plasmidová DNA s 1M7AI ligandem; 1: K- neozařený vzorek (DNA); 2: K- ozářená po dobu 20 min; 3: 1M7AI neozařený vzorek; 4-7: 1M7AI ozáření UVA po různou dobu (5,10,15 a 20 min).

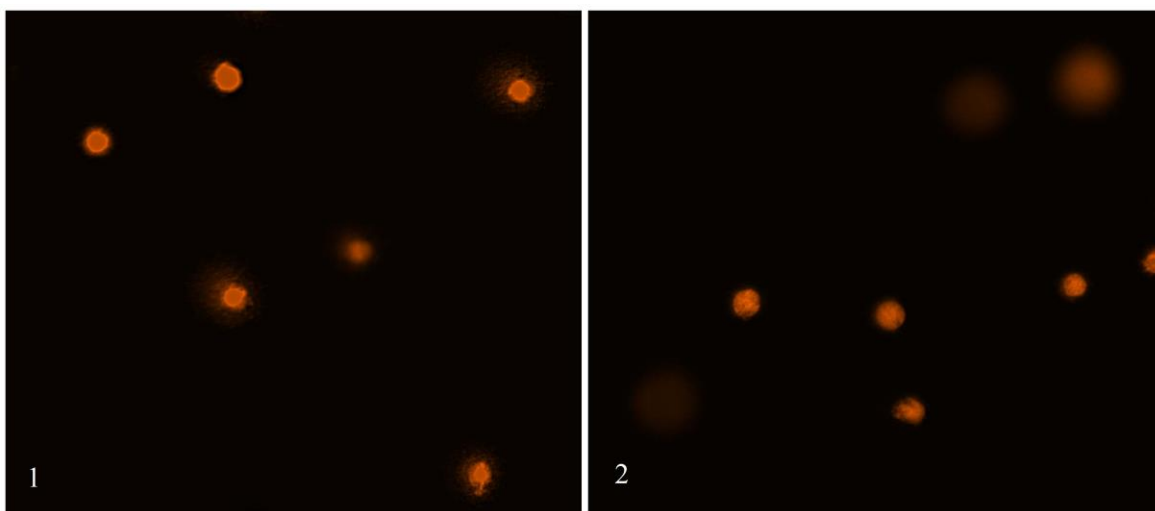


## Comet assay

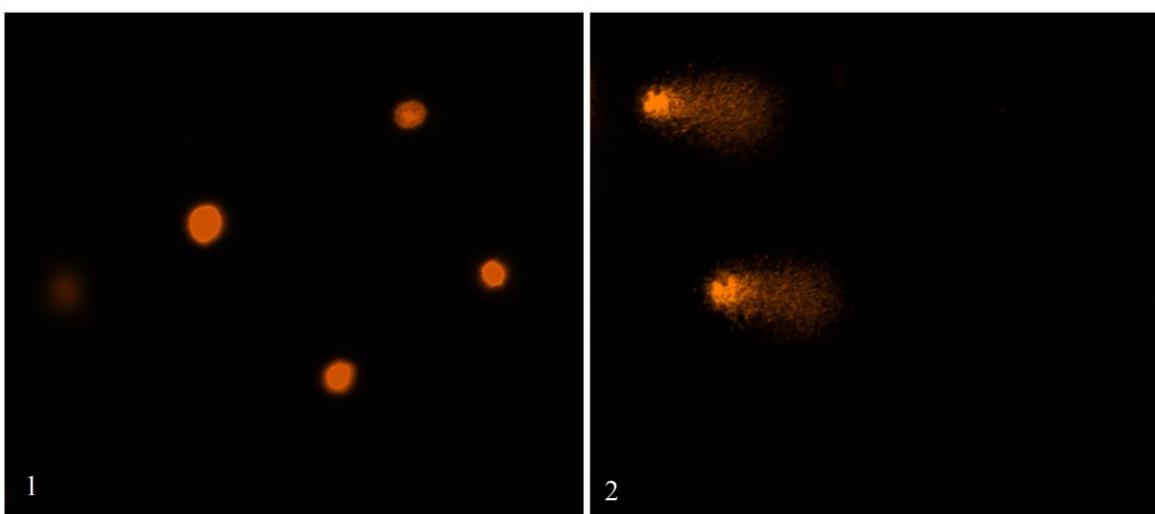
V předchozím experimentu bylo zjištěno, že CIS komplex vykazuje po ozáření UVA nukleázovou aktivitu na DNA, která může být zodpovědná za fototoxicitu uvedeného komplexu. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda tento efekt probíhá také v prostředí živých buněk. Pro tento účel byl zvolen kometový test (comet assay).

Během kometového testu nejprve dochází působením lyzačního roztoku s detergentem Tritonem X100 k narušení membrány buněk. V tomto roztoku jsou ve vysokých koncentracích přítomny soli, které odstraňují buněčné membrány, objem bílkovin, cytoplazmu a narušují nukleosomy a histony (Shukla *et al*, 2018). Následně se samotná DNA ovlivněná testovanou látkou, v našem případě štěpená CIS komplexem, pohybuje v agarózovém gelu vlivem elektrického pole ven z jádra buňky a formuje se do specifického tvaru připomínajícího kometu. Metodou comet assay bylo v naší práci prokázáno, že vlivem působení CIS komplexu na jadernou DNA nastává fragmentace řetězců této biomakromolekuly (Obrázek 12 a 13).

Celkové poškození DNA je zaznamenáno v grafu 2, ze kterého můžeme konstatovat, že schopnost CIS komplexu štěpit jadernou DNA buněk po ozáření UVA výrazně vzrostla. V porovnání s hladinou fragmentace DNA u kontrolních vzorků je hladina fragmentace DNA CIS komplexem až 2,5 krát vyšší.

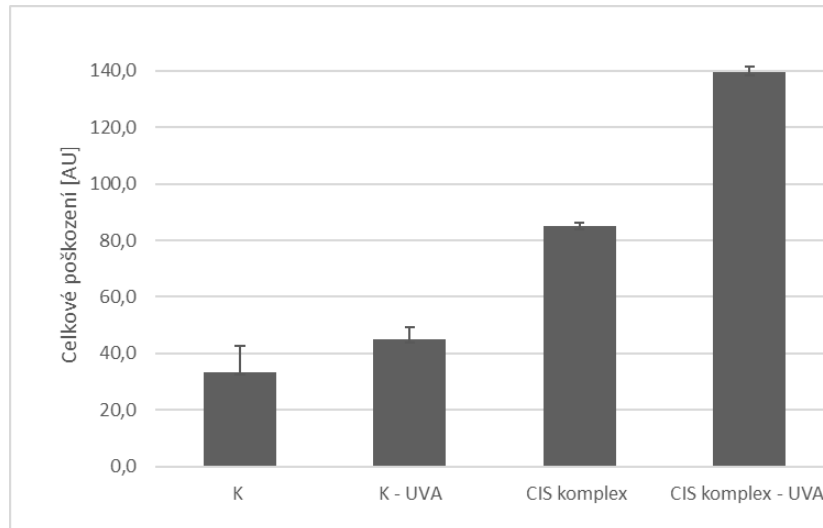


Obrázek 12: Comet assay; 1: kontrola neozářená; 2: CIS komplex neozářený



Obrázek 13: Comet assay; 1: kontrola ozářená; 2: CIS komplex ozářený UVA zářením

Během jiných výzkumů bylo zjištěno, že fragmentaci DNA způsobují také další platinové komplexy obsahující 7-azaindolový ligand, a to *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(3-Chloro-7-azaindol)<sub>2</sub>] a *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(3-Iodo-7-azaindol)<sub>2</sub>]. Bylo však prokázáno, že tyto komplexy indukují fragmentaci DNA např. v buňkách A2780 v důsledku apoptotických procesů (Muchová *et al*, 2013). Nejedná se tedy o látky, jejichž účinnost by byla spojena s tvorbou reaktivních forem kyslíku a ovlivnitelná kombinací se zářením.



Graf 2: Štěpení DNA v HeLa buňkách ošetřených CIS komplexem. K: kontrola neozářená, K: UVA ozářená po dobu 30 min, CIS komplex neozářený, CIS komplex UVA ozáření po dobu 30 min

## 6 ZÁVĚR

Teoretická část této práce se věnuje prvnímu klinicky používanému cytostatiku na bázi platiny – cisplatině, jejímu mechanismu účinku a dalším analogům. Dále se práce zabývá fotochemoterapií v léčbě nádorových onemocnění, její historií, samotným mechanismem účinku a také rozdělením PS, které jsou klíčové pro správné fungování této terapie. Na konci teoretické části jsou shrnuty poznatky o fotoaktivovatelných proléčivech na bázi platiny, která byla vyvinuta ve snaze snížit nežádoucí vedlejší účinky konvenčních platinových cytostatik a jsou nyní testována pro využití v protinádorové terapii.

V experimentální části byl pak studován vliv nového derivátu cisplatin, konkrétně, *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(1M7AI)] (1M7AI = 1-methyl-7-azaindol; CIS komplex) na DNA a na buněčnou linii HeLa odvozenou od maligního adenokarcinomu děložního čípku. Konkrétně byla testována cytotoxicita a schopnost uvedeného komplexu štěpit DNA *in vitro* (v bezbuněčném médiu) a v HeLa buňkách před a po ozáření UVA. U dané linie byl pomocí MTT testu prokázán zvýšený cytotoxický účinek CIS komplexu po ozáření UVA zářením. Pro srovnávací účely byl proveden stejný experiment i s cisplatinou, jejíž účinek na nádorové buňky nebyl nijak ovlivněn světlem, což je v souladu s experimentálními daty dalších studií. Dále byla prokázána schopnost CIS komplexu v kombinaci s UVA zářením štěpit DNA *in vitro* a také v nádorových buňkách. Popsané účinky CIS komplexu mohly být mimo jiné způsobeny tvorbou ROS, což bude potvrzeno během další práce. Na základě získaných výsledků se testovaný platinový CIS komplex jeví jako slibný kandidát pro využití v protinádorové terapii.

## POUŽITÁ LITERATURA

- Abrahamse** H., Hamblin M.R. (2016) New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J* 473, 347-364
- Abrahamse** H., Kruger C.A., Kadanyo S., Mishra A. (2017) Nanoparticles for Advanced Photodynamic Therapy of Cancer. *Photomedicine and Laser Surgery* 35 (11), 581-588
- Bednarski** P.J., Grünert R., Zielzki M., Wellner A., Mackay F., Sadler P.J. (2006) Light-Activated Destruction of Cancer Cell Nuclei by Platinum Diazide Complexes. *Chemistry & Biology* 13, 61-67
- Bednarski** P.J., Korpis K., Westendorf A.F., Perfahl S., Grünert R. (2013) Effect of light – activated diazido – Pt(IV) complexes on cancer cells in vitro. *Phil Trans R Soc A* 371: 20120118
- Bednarski** P.J., Mackay F., Sadler P. (2007) Photoactivatable Platinum Complexes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 7(1), 75-93
- Beedanagari** S., Vulimiri S.V., Bhatia S., Mahadevan B. (2014) Genotoxicity biomarkers. *Biomarkers in Toxicology*, kapitola 43, 729-742
- Brabec** V. (1998) Nové možnosti v léčbě zhoubných nádorů sloučeninami platiny a ruthenia. *Živa* 4, 148-149
- Calixto** G.M.F., Bernegossi J., Marise de Freitas L, Fontana C.R., Chorilli M. (2016) Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules* 21 (3), 1-18
- Daniell** M.D., Hill J.S. (1991) A history of photodynamic therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery* 61, 340-348
- Dasari** S., Tchounwou P.B. (2014) Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740, 364-378
- Farrer** N.J., Woods J.A., Salassa L., Zhao Y., Robinson K.S., Clarkson G., Sadler P.J. (2010) A Potent Trans-Diimine Platinum Anticancer Complex Photoactivated by Visible Light. *Angewandte Chemie International Edition* 49 (47), 8905-8908
- Fujino** M., Nishio Y., Ito H., Tanaka T., Li X. (2016) 5-Aminolevulinic acid regulates the inflammatory response and alloimmune reaction. *International Immunopharmacology* 37, 71-78
- Gandioso** A., Shaili E., Massaguer A., Artigas G., González-Cantó A., Woods J.A., Sadler P.J., Marchán V. (2015) An integrin-targeted photoactivatable Pt(IV)

complex as a selective anticancer pro-drugs: synthesis and photoactivation studies. *Chem. Commun* 51, 9169-9172

**Ghosh S** (2019) Cisplatin: The First Metal Base Anticancer Drug. *Bioorganic Chemistry* 88, 1-20

**Gómez-Ruiz, S., Maksimović-Ivanić, D., Mijatović, S., & Kaluđerović, G. N.** (2012). On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 5, 1–14.

**Hamblin M.R.** (2019) Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. *Photochemistry nad Photobiology* 96, 506-516

**Chilakamarthi U., Giribabu L.** (2017) Photodynamic Therapy: Past, present and future. *Chem Rec.* 8, 775-802

**Jamieson E.R., Lippard S.J.** (1999) Structure, Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews* 99 (9), 2467-2498

**Johnstone T.C., Suntharalingam K., Lippard S.J.** (2015) Third row transition metals for the treatment of cancer. *Phil Trans R Soc A* 373, 20140185–20140185

**Johnstone T.C., Suntharalingam K., Lippard S.J.** (2016) The Next Generations of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev.* 116 (5), 3436-3486

**Keck M.V., Lippard S.J.** (1992) Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society* 114 (9), 3386-3390

**Kou J., Dou D., Yang L.** (2017) Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget* 8 (46), 81591-81603

Kožní nádory. *Portál moderní dermatologie pro širokou veřejnost*, dostupné z [http://www.dermanet.cz/cs/kozni-choroby/melanomy/kozni-nadory\\_s536x7245.html](http://www.dermanet.cz/cs/kozni-choroby/melanomy/kozni-nadory_s536x7245.html), staženo dne 24.2. 2020

**Kumaravel T.S., Vilhar B., Faux S.P., Jha A.N.** (2007) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25 (1), 53-64

**Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzińska E., Knap-Czop K., Kulbacka J.** (2018) Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106, 1098-1107

**Mackay F.S., Woods J.A., Heringová K., Kašpárková J., Pizarro A.M., Moggach S.A., Parsons S., Brabec V., Sadler P.J.** (2007) A potent cytotoxic photoactivated

platinum complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104 (52), 20743-20748

**Mlcouskova J.**, Stepankova J., Brabec V. (2012) Antitumor carboplatin is more toxic in tumor cells when photoactivated: enhanced DNA binding. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 17 (6), 891-898

**Muggia F.M.**, Bonetti A., Hoeschele J.D., Rozenzweig M., Howell S.B. (2015) Platinum Antitumor Complexes: 50 Years Since Barnett Rosenberg's Discovery. *Journal of Clinical Oncology* 33, 4219-4226

**Muchová T.**, Prachařová J., Štarha P., Olivová R., Vrána O., Benešová B., Brabec V. (2013) Insight into the toxic effects of cis-dichloridoplatinum(II) complexes containing 7-azaindole halogeno derivatives in tumor cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 18 (5), 579-589

**Nowak-Stepniowska A.**, Pergoł P., Padzik-Graczyk A. (2013) Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy mechanisms and applications. *Postepy Biochem* 59, 53-63

**Oniszczyk A.**, Wojtunik-Kulesza K.A., Oniszczyk T., Kasprzak K. (2016) The potential of photodynamic therapy (PDT) – Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83, 912-929

**Ozog D.**, Rkein A., Fabi S., Gold M., Goldman M., Lowe N., Nicholas J., Martin G., Munavalli F. (2016) Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. *Dermatologic Surgery* 42, 804-827

**Pizarro A.M.**, Sadler P.J. (2009) Unusual DNA binding for metal anticancer complexes. *Biochimie* 91 (10), 1198-1211

**Prachařová J.**, Intini F.P., Natile G., Kašpárová J., Brabec V. (2018) Potentiation of cytotoxic action of cis by UVA irradiation. Mechanistic insights. *Inorganica Chimica Acta* 472, 199-206

**Rkein A.**, Ozog D. (2014) Photodynamic Therapy. *Dermatologic Clinics* 32 (3), 415-425

**Ronconi L.**, Sadler P. J. (2007): Using coordination chemistry to design new medicines. *Coordination Chemistry Reviews* 251, 1633-1648

**Rosenberg B.**, Vancamp L., Krigas T. (1965) Inhibition of division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205, 698-699

**Shi H.**, Imberti C., Sadler P.J. (2019) Diazido platinum(IV) complexes for photoactivated anticancer chemotherapy. *Inorg. Chem. Front.* 6, 1623-1638

- Shukla** R.K. (2018) An introduction to the single cell gel electrophoresis assay: a technique resolving issues in forensic science. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 8, 1-7
- Sorbellini** E., Rucco M., Rinaldi F. (2018) Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update. *Lasers in Medical Science* 33, 1431-1439
- Štarha** P., Trávníček Z. (2018) Protinádorově účinné komplexy přechodných kovů: Historie a současnost *Chem. Listy* 112, 412-420
- Štarha** P., Vančo J., Trávníček Z., Hošek J., Klusáková J., Dvořák Z. (2016) Platinum(II) Iodido Complexes of 7-Azaindoles with Significant Antiproliferative Effects: An Old Story Revisited with Unexpected Outcomes. *PLOS ONE* 11 (12), 12-14
- Van Straten** D., Mashayekhi V., Brujin H.S., Oliveira S., Robinson D.J. (2017) Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers (Basel)* 9 (12), 2-34
- Vodvářka** P. (2001) Nádorová hypoxie a vliv podpůrné léčby erythropoetinem na výsledky protinádorové léčby. *Klinická onkologie* 14, 39-45
- Yoon** I., Li J.Z., Shim Y.K. (2013) Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clin Endoscopy* 46 (1), 7-23
- Zhang** J., Wang X., Liu T., Liu S., Jing X. (2014) Antitumor activity of electrospun polylactide nanofibers loaded with 5-fluorouracil and oxaliplatin against colorectal cancer. *Journal Drug Delivery* 23, 784-790