

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**



**Bakalářská práce**

**Olomouc 2010**

**Jana Potočková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Chinolony a studium jejich biologických  
(cytotoxických) účinků**

**Bakalářská práce**

**Jana Potočková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezentace

**Olomouc 2010**

**Vedoucí práce: MUDr. Petr Dřubák, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce MUDr. Petra Dřubáka, Ph.D. a uvedla jsem všechny použité prameny a literaturu.

V Olomouci dne 6.5.2010

í í í í í í í í í í í í í í í .

## Souhrn

Chinolony představují skupinu synteticky připravených látek známých zejména svými baktericidními účinky a do současné doby používaných především jako antibiotika. Jsou odvozeny od chinolinu, jehož modifikací vznikla celá řada nových látek. Díky svému neobvyklému mechanismu účinku o inhibici topoisomeráz o začínají být v posledních letech intenzivně studovány také jako potenciální protinádorová léčiva.

Moderní metodou, která je v medicíně a farmakologii při studiu účinků léčiv hojně používána, je průtoková cytometrie. Možnosti jejího využití jsou široké, v rámci mé bakalářské práce byla využita pro analýzu alterací buněčného cyklu a apoptózy buněk nádorové linie CEM, které byly ošetřeny nově syntetizovanými chinolonovými deriváty.

## Summary

The quinolines represent the group of synthetically made substances known and used especially for their antibacterial effects until now. They are derived from the quinoline, which when modified creates a whole new range of substances. Thanks to their unique mechanism of action - an inhibition of topoisomerases - quinolines have been intensively studied as potential antitumour drugs.

My thesis is in this context focused on the cell cycle and apoptosis analysis of the CEM cancer cell line treated by newly synthesised quinoline derivatives. For this type of analysis I've used well established flow cytometry method.

Poděkování

Chci tímto poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce MUDr. Petru Dflubákovi, Ph.D. za čas, trpělivost a cenné rady, které mi poskytl během tvorby bakalářské práce. Dále mě díky patří celému kolektivu Laboratoře experimentální medicíny při Diabetické klinice FNOL, zejména Mgr. Ivo Frydrychovi, Ph.D. a Mgr. Petru Konečnému, za jejich ochotu a vstřícnost.



Obrázek 4 - A - bodový graf (dot plot), B - vrstevnicový graf (contour plot), C - hustotní graf (density plot).....	27
Obrázek 5 - Histogramy znázorňující distribuci buněk ošetřených chinolonovými deriváty v průběhu buněčného cyklu.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
Obrázek 6 - Histogramy použité k analýze apoptózy buněk ošetřených chinolonovými deriváty.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>

### Seznam tabulek

Tabulka I - Přehled testovaných derivátů .....	32
Tabulka II - Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>



# 1 Úvod

Zhoubná nádorová onemocnění představují závažný celospolečenský problém. Patří mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtnosti u nás i ve světě. Tato skutečnost podnítila mnohé lékařské bádání po příčinách vzniku těchto onemocnění, po mechanismech vedoucích k transformaci normálních buněk v buňku nádorovou a dalších problémech souvisejících s kancerogenezí. Do popředí zájmu se dostaly i léčebné postupy protinádorové terapie. Do 20. let 20. století byly možnosti tehdejších lékařů omezené pouze na chirurgickou léčbu, která se později přidala i radioterapie. Ve 40. letech minulého století zaznamenáváme první zmínky o onkologické chemoterapii. Přestože se v současné době díky novým poznatkům v oblasti genetiky, molekulární biologie, nanotechnologie a dalších vědních disciplín jeví jako nejvíce perspektivní disciplína zejména cílená terapie, genová terapie a biologická léčba, má onkologická chemoterapie mezi ostatními disciplínami stále své nezastupitelné místo. Jsou hledány nové sloučeniny s protinádorovým účinkem, jejichž studium může vést k identifikaci nových protinádorových cílů a využití v cílené terapii.

Zajímavou skupinu chemoterapeutik reprezentují chinolony, používané do dnešní doby díky svým antimikrobiálním účinkům jako antibiotika. Díky své výhodné farmakokinetice, relativně nízké toxicitě, baktericidním účinkům a v neposlední řadě neobvyklému mechanismu účinku byla nasyntetizována od 70. let až do dnešní doby řada dalších derivátů, jejichž potenciálním cílem je zasáhnout proti DNA virům, houbám, ale i rezistentním mikroorganismům. Další potenciál chinolonů spoívá ve schopnosti specificky se vázat na DNA nádorových buněk, což činí chinolony základem mezi potenciálními protinádorovými léčivami (Příborský, J., 2000).

## 2 Současný stav léčebné problematiky

Chinolony, do současné doby známé a v klinické praxi používané především pro své antibakteriální účinky, by mohly teoreticky vykazovat protinádorové účinky díky svému neobvyklému mechanismu účinku a schopnosti vázat se k DNA nádorových buněk. Každý rok jsou po celém světě syntetizovány stovky nových derivátů, z nichž jen velmi malé procento se ukáže být významným ve vztahu k léčbě nádorových onemocnění. Přestože je současná terapie nádorových onemocnění soustředěna především na možnosti cílené a biologické terapie, výzkum a již dříve i nově syntetizovaných léčiv by rozhodně neml být opomíjen. Dle výsledků klinických studií se totiž jako pro pacienta přínosný ukázal tzv. multimodální přístup vyúsťující kombinace několika různých metod a cílů protinádorové léčby (např. radioterapie, chemoterapie, imunoterapie aj.)

### 2.1 Nádorová onemocnění a jejich výskyt v ČR

Podle Státního zdravotního ústavu představují nádorová onemocnění v České republice druhou nejvyšší příčinu úmrtnosti (nejvyšší příčinou úmrtnosti jsou choroby kardiovaskulárního systému). Přestože se v posledních letech výrazně zlepšila informovanost obyvatelstva o významu prevence a včasné detekce nádorového onemocnění a existují výraznější možnosti léčby přesvědkerou snahu lékařů, umírá na nádorová onemocnění v ČR více než 27 tisíc osob a incidence tohoto onemocnění narůstá každým rokem o 2 až 2,5 %. Bohužel, Česká republika zaujímá poslední příčky v celoevropských statistikách jak v incidenci rakoviny obecně, tak také ve výskytu kolorektálního karcinomu u mužů. Rovněž u žen, které jsou nejvíce postižovány nádory prsu, statistiky poukazují na vzestupný trend v incidenci tohoto onemocnění po 45. roce věku. Přes zvyšující se incidenci se díky novým léčebným a včasným diagnostickým postupům daří snížit úmrtnost pacientů (vysoká úmrtnost je dána především diagnostikou v pokročilém stádiu nemoci).

U dětí jsou nádorová onemocnění méně častá než u dospělé populace. Nejvíce se vyskytujícím nádorem u dětí jsou leukemie, představující až 30% zhoubných nádorových onemocnění ve věku do 15 let. Leukemie jsou nemoci krvetvorby, zapříčiněné maligní transformací krvetvorných buněk v raném stádiu jejich

diferenciace. U pacienta pak vedle sebe existují 2 populace buněk, jedna vycházející z normální kmenové buňky a druhá z leukemické (Navrátil, L. a kol., 2008). Podstatou vzniku leukemie je opakované poškození genetické výbavy buňky, dle kterých teorií zahájené již v průběhu nitroděložního vývoje (Starý, J. Leukemie). V důsledku opakovaných genetických změn vzniká nádorová kmenová leukemická buňka, která proliferuje a dává tak základ nediferencovaným buňkám (blastům) v kostní dřevě a lymfatické tkáni. Tyto posléze utlačují všechny normálně se vyskytující buněčné elementy v kostní dřevě a jsou vyplavovány do periferní krve.

Příčiny onemocnění nejsou v žádném případě známy, existuje však několik faktorů, u nichž se předpokládá, že podporují iniciaci tohoto onemocnění. Jsou to zejména genetické faktory, karcinogenní látky (fyzikální jako nadměrná dávka ionizujícího záření, chemické jako benzen, alkylaromatické uhlovodíky), snížená obranyschopnost organismu (infekce, stres, nezdravý životní styl) a některé virové infekce (Slezáková a kol., 2007).

Dle rychlosti průběhu můžeme leukemie zjednodušeně rozdělit na akutní a chronické. Akutní leukemie u dětí tvoří asi 80 % dětských leukemií, tvoří akutní lymfoblastická leukemie (ALL), 15 % tvoří akutní myeloidní leukemie (AML), 5 % tvoří myelodysplastický syndrom (MDS) a 2-3 % chronická myeloidní leukemie (CML) (Starý, J.: 2007?). Akutní leukemie můžeme dále rozdělit na 10 typů dle klasifikace FAB (francouzsko-americko-britské): 3 typy akutní lymfoblastické leukemie L1 až L3 a 6 typů akutní myeloidní leukemie M1 až M6, k nimž se přidává jako M7 tzv. megakaryoblastická leukemie (megakaryoblasty dávají základ pro vznik krevních destiček). Podrobněji členění jednotlivých typů leukemií by bylo příliš složité, neboť nádorová zvrhklá pluripotentní buňka, ze které vzniká leukemický klon, má schopnost se diferencovat (byť chorobně), a dává tak základ kterékoli linii krvetvorných buněk (Skala, E.: 2001?). Podrobněji bych se tedy chtěl zmínit pouze o ALL, která má úzký vztah k této bakalářské práci.

### **2.1.1 Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)**

ALL se vyskytuje nejčastěji u dětí ve věku mezi 2.-5. rokem života, v pubertě nebo u starších pacientů po 80. roce života. ALL má velmi rychlý průběh, od vypuknutí prvních příznaků může nemocného zahubit v řádu několika dnů až týdnů. Mezi první

příznaky ALL patří horečka a zvýšená teplota, bledost, únava, zvětění břicha (zejména jater a sleziny), krvácivost sliznic, zvětění mízních uzlin a bolest končetin. Zrádnost tohoto onemocnění spoívá ve zpoátku nespecifických příznacích, které mohou být pizuzovány běžnému respiračnímu onemocnění, jenfi často mfe vypuknutí nemoci provázet. Pacient však na podávanou lébu nereaguje, respirační onemocnění se vrací nebo neustupuje.

Pro správnou diagnostiku ALL je nezbytný především rozbor krve a kostní dřeně. Kromě mikroskopického vyšetření je důležitou součástí diagnostiky také určení povrchových znaků buněk a genetické vyšetření chromozomálních změn, které mohou mít značný prognostický význam. Mezi významné prognostické markery mfe patří za adit např. přítomnost tzv. filadelfského chromozomu, který vzniká translokací genetického materiálu mezi chromozomy 9 a 22 a vede ke vzniku fúzního BCR/ABL genu. V tomto případě je prognóza nepříznivá a léčba musí být často doplněna o lék, který cíleně likviduje nádorové buňky ó Glivec. Mezi další prognostické markery patří trizomie chromozomu 21, polyzomie (např. chromozomy X, 18, 10, 6, 17, 4 a 14), delece chromatinu v oblastech 9p, 12p, 13q, 6q, 7p, X a mnoho dalších. Existuje sada příznivých a nepříznivých translokací např. pacienti s translokací t(12;21) (p12;q22) související s geny TEL-AML1 mají dobrou prognózu, jsou totiž citliví na lébu L-asparaginázou (Hajdúch a kol., 2003)

Standardní léčba pacient je vedena podle jednotných protokolů a spoívá především v podání vhodné kombinace protinádorových chemoterapeutik. Tato léčba mfe být doplněna i o radioterapii (ozáření mozku), v problematických případech i o transplantaci kostní dřeně. Vyléčit se dnes daí přibližně 80 % nemocných ALL, zbylých 20 % dříve prodává relaps (návrat) nemoci, který je nejastji v prvních pěti letech od ukončení léčby (Starý, J.: 2007?).

## 2.2 Příiny maligní transformace

Aby bylo možné objevovat a aplikovat nové léčebné postupy v boji s nádorovými onemocněními, naprostou nutností se ukázalo pochopení příin, mechanismů a dšledků maligní transformace buňky. V současné době je akceptován názor, že za maligní transformací stojí genetické změny mající nejastji charakter

bodové mutace, delece, translokace i genové amplifikace, přičemž nastává nejen pouze jediná změna v DNA, ale akumulace několika (obvykle se uvádí 4 až 6) návazných událostí.

Mutace vznikají v genomu spontánně, avšak s příliš malou pravděpodobností, než aby se staly významnými ve spojitosti s maligní transformací. Velkou roli zde hrají zejména již mutageny (UV záření, ionizující záření, některé chemické sloučeniny a akridinová barviva, alkylační látky, aromatické látky aj., virové infekce aj.), které zvyšují rychlost tvorby mutací a pravděpodobnost jejich vzniku v buňce. Při vzniku spontánních mutací mohou také látky podporující proliferaci aktivitu buněk (nutí buňku, aby replikovala svoji DNA, včetně počet replikací znamená možnost akumulace většího počtu spontánních mutací).

Obecně mluvíme tedy, že hlavním cílem mutací jsou dvě skupiny genů: první skupina obsahuje protoonkogeny, které jsou mutací aktivovány a tumorové supresorové geny, u kterých dochází k jejich inaktivaci. Mutace mohou postihnout také geny odpovědné za řízení buněčného cyklu (viz. kapitola 2.2.1) a indukci apoptózy (viz. kapitola 2.2.2). Pokud dojde k chybě při replikaci DNA, normální buňka pomocí opravného aparátu vyhledá chybně zkopírované báze při replikaci a odstraní je. Pokud je poškození buňky již natolik rozsáhlé, že není schopna je opravit, dojde k indukci apoptózy. Při maligní transformaci ale dojde k selhání procesu reparace a inaktivaci genů, které by za normálních podmínek spustily apoptózu. Tímto si nádorové buňky zajistí relativní nesmrtnost (ve spojitosti s nesmrtností mají nádorové buňky také aktivované geny pro telomerázu, které jsou během zárodečného vývoje v mnoha normálních buňkách potlačeny).

Maligní transformace je charakterizována ztrátou genetické rozmanitosti neboli heterozygotnosti. Zhoubný růst buněk nastává po ztrátě obou alel supresorových genů. Buňky však pasivně nečekají na druhou náhodnou somatickou mutaci, ale jsou schopny se aditivně oba chromozomy daného páru paralelně vedle sebe, čímž je umožněna výměna genetické informace procesem homologní rekombinace DNA. Tento jev je překvapivě poměrně častý (nastává s pravděpodobností 1/1000 dělení). Během maligní transformace také dochází ke ztrátě integrity genetické informace. Za normálních podmínek buňka chrání svoji DNA před různými antioxidanty a také celou řadou enzymů (např. N-acetyltransferáza), neutralizujících a detoxikujících škodlivé molekuly, které by jinak mohly způsobit genetické poškození.

Mohlo by se zdát, že maligně transformovaná buňka a normální buňka jsou geneticky odlišné, avšak rozdíl mezi nimi představují méně než 0,01 procenta genomu,

přesto jsou schopny v tle vyvolat rozvrat a v krajním případě organismus zahubit (Weinberg, R. A., 1998; Kovář, J., 2005). Vzhledem k stále neuspokojivým výsledkům jsou u asné protinádorové terapie je nutnost hledání nových protinádorových léčebných přístupů.

### 2.2.1 Buněčný cyklus

Posloupnost vzájemně koordinovaných procesů zahrnujících duplikaci a dělení buňky označujeme jako buněčný cyklus. Sestává z poměrně dlouhého období relativního klidu označovaného jako interfáze a období dělení genetické informace (mitózy) a dělení buňky (cytokineze) označovaného souhrnně jako M fáze. Interfáze zahrnuje tři fáze  $G_1$ , S a  $G_2$ .

$G_1$  fáze je obdobím intenzivního růstu buňky. Probíhá syntéza bílkovin, DNA polymerázy, RNA a tubulinu. Nachází se zde také první kontrolní bod buněčného cyklu  $G_1$  checkpoint, kdy buňka kontroluje, zda proběhla předchozí M fáze správně, zda nedošlo k mutacím v DNA. V případě poškození DNA mutacemi hrají důležitou roli kinázy ATM a ATR, které se vážou na mutovanou DNA, a checkpoint kinázy CHK1 a CHK2, které předávají signál na BRCA (oprava DNA), p21 (zástava buněčného cyklu) a p53 (apoptóza). V tomto kontrolním bodě se buňka rozhoduje podle několika kritérií, jaká bude její další cesta buněčným cyklem či zda vstoupí do S fáze, pozastaví buněčný cyklus, přejde do klidové fáze  $G_0$ , nebo zvolí řízenou sebeustrukturu v podobě apoptózy. Tyto kritéria mohou být dostatečně velikost, pohostinné podmínky, poškození DNA apod. Tento kontrolní bod buňka překoná fosforylací proteinu Rb a uvolněním transkripčních faktorů. Přechod buňky  $G_1$  kontrolním bodem je závislý také na signálech od okolí či tzv. mitogenních faktorech (růstové faktory, hormony apod.). Tyto aktivují specifické povrchové buněčné receptory, dochází k aktivaci proteinu RAS a k přenosu mitogenního signálu do nitra buňky. Přenos tohoto signálu uskutečňují mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK). Konečným mediátorem signálu jsou transkripční faktory. Mutace či overexpresí kterékoli součástí této kaskády (ať už receptor, proteinu RAS, MAPK či transkripčních faktorů) může být daný buněčný klon stimulován k proliferaci vedoucí až k maligní transformaci.

S ó fáze dostala svůj název podle děje, který je pro ni charakteristický, a to je syntéza DNA zahrnující replikaci DNA a histon s následným zdvojením chromozom (u živočišných buněk také duplikaci centriol).

Následuje další klidová fáze - G<sub>2</sub> typická svojí metabolickou aktivitou a růstem buňky. V této fázi se nachází další kontrolní bod umožňující zastavení cyklu před vstupem do mitózy. Buňka reviduje, zda je dostatečně velká a zda je všechna DNA replikována. Poslední kontrolní bod, metafázický, se nachází na přechodu metafáze do anafáze a v případě nenapojení všech chromozomů na mitotické vřeténko navozuje zablokování průchodu buňky do další fáze. Kontrolní body jsou tedy velmi důležitými součástmi buněčného cyklu, nebo přesněji kontrolují přechody mezi jednotlivými fázemi (Alberts a kol., 1998; Klener a kol., 2010; Hynes, S., 2003; Kovář, J., 2003).

Buněčný cyklus je přesně regulovaný proces. Mezi hlavní pozitivní regulátory patří cyklin závislé kinázy (CDK) zprostředkovávající fosforylaci klíčových buněčných proteinů. Aby mohly vykonávat svoji funkci, musejí být samy aktivovány, a to vazbou s příslušným cyklinem, jehož koncentrace v buňce v průběhu buněčného cyklu periodicky klesá a narůstá. Hlavními negativními regulátory jsou pak proteiny známé jako inhibitory CDK, u savčích buněk jsou to například p16, p21 (jeho transkripci indukuje protein p53, který je aktivován na základě poškození DNA) nebo p27 (předpokládá se, že je modelovým příkladem regulace progresu na základě exogenních signálů) (Kovář, J., 2003).

### 2.2.2 Apoptóza

Apoptóza je typem programované buněčné smrti, kdy buňka v zájmu zachování ochrany a integrity svého okolí špáchá sebevraždu. Její mechanismus není zatím zcela známý, víme však, že na rozdíl od nekrózy je apoptóza charakteristická asnou degradací DNA, tedy za podmínek, kdy plazmatická membrána buňky zůstává intaktní. Pro apoptózu je typických hned několik morfologických a funkčních změn: ztráta funkce mitochondrií a zvýšená permeabilita mitochondriální membrány, swelling, pokles mitochondriálního potenciálu, změny v buněčném jádře (dochází ke kondenzaci chromatinu uvnitř jaderné membrány), změna tvaru buňky (buňka se zmenšuje,

ššcvrkáváö). Pokud tedy buňka obdrží signály pro svoji vlastní sebeustrukci, zahájí kaskádu procesů, na jejichž konci dojde k aktivaci proteáz ICE a následné destrukci buňky aš do rozpadu v apoptotickú t líska.

Signály, které mohou vyvolat indukci apoptózy, mohou být endogenního i exogenního p vodu. Hlavním exogenním signálem může být aktivace proteinu p53 v d sledku poškození DNA. Aktivovaný p53 indukuje expresi proteinu p21, který inhibuje CDK, tudíž buňka nemůže pokračovat v započatém buněném cyklu, není jí dovolen vstup do S fáze, dochází k aktivaci kaspáz a destrukci buňky. Buňka je vybavena také mechanismy, které mohou zabokovat aktivaci ICE proteáz a není pak navozena indukce apoptózy o např. zvýšená exprese proteinu Bcl-2.

Apoptotická t líska vznikají z cytoplazmy v d sledku destrukce buňky aktivovanými proteázami. Jsou tvořena často intaktními nebo poškozenými organelami, rozporcovaným jaderným materiálem a jsou ohraničena vlastní plazmatickou membránou. Mají na svém povrchu antigenní determinanty, podle nichž je apoptotická buňka rozpoznána např. makrofágy a eliminována fagocytózou.

Apoptóza je nesmírně důležitým procesem nebo se účastní na embryogenezi, je důležitým morfogenetickým initelem (např. oddělování prstů na končetinách během ontogenetického vývoje), podílí na eliminaci potenciálně nebezpečných buněk a také na udržení tkáňové homeostázy. Počet buněk nově vzniklých dělením by měl v případě dospělého organismu přibližně odpovídat počtu buněk eliminovaných (apoptózou). Významnou úlohu hraje apoptóza v imunitním systému (např. negativní selekce B a T buněk). Indukce apoptózy jak přírodními nebo nepřirodními aktivátory je v současné době považována za perspektivní přístup v protinádorové terapii (Kovář, J., 2005).

### **2.3 Přehled současných protinádorových léčebných přístupů**

Jak již bylo uvedeno dříve, v současné době existuje široké spektrum přístupů k léčbě nádorových onemocnění, a to zejména díky novým poznatkům o lidském genomu a znalostech příčin vzniku nádorových onemocnění (Hynie, S., 2003). Podle Klenera a kol., 2010 patří mezi současné terapeutické postupy tyto:

- chirurgická léčba
- radioterapie



- konven ní chemoterapie
- hormonální lé ba
- imunoterapie
- transplantace kostní d en
- genová terapie
- cílená lé ba
  - inhibice angiogeneze
  - inhibice metastáz
  - indukce diferenciac
  - inhibice mikroprost edí

K tomuto p ehledu je vhodné poznamenat, že z dosavadních zku-eností s lé bou nádorových onemocn ní nelze tyto p ístupy separovat, ale naopak je fládoucí zvolit jejich vhodnou kombinaci a zahájit tzv. multimodální lé bu. Velký význam v lé b má také chemoprevence, spo ívající v pouflití p írozených nebo syntetických látek za ú elem zabrán ní vzniku nádoru a/nebo zpomalení, zastavení í zvratu jifl zapo atého kancerogenního procesu (tyto ú inky mají nap . n která antirevmatika, retinoly, vakcíny, p írodní látky ó ajové polyfenoly, resveratrol, lykopen aj.). D leflitá se ukazuje být í podp rná lé ba, která je jednou z p í in sniflující se mortality pacient (Klener a kol., 2010). Podrobn ji se zmíním pouze o konven ní chemoterapii, nebo je jediným lé ebným p ístupem souvisejícím s touto bakalá skou prací.

### 2.3.1 Konven ní chemoterapie

Princip konven ní chemoterapie spo ívá v podávání vhodných protinádorových chemoterapeutik ó cytostatik, jejichfl cílem je zastavit r st nádoru a jeho progresi tím, že u nádorových bun k vyvolává defekty DNA, zástavu proliferace a následn apoptózu nebo jinou formu bun né smrti (nekrózu í mitotickou katastrofu). Nevýhodou podávání cytostatik v-ak z stává fakt, že kv li svým neselektivním mechanism m ú inku postihují í zdravou tká s vysokou prolifera ní aktivitou jako jsou sliznice GIT, kostní d e , epitel, vlasové folikuly atp. P esto cytostatika postihují z ady p í in nádorové bu ky ast ji (nap . vy-í energetické nároky, akumulace mutací, vy-í citlivost k oxidativnímu stresu,

vyčerpané kompenzatorní mechanismy atp.) Cytostatika ovlivňují často klíčová místa nutná pro buněnou replikaci a mezi základní mechanismy jejich účinku patří:

- a) inhibice biosyntézy nukleových kyselin (NK) a jejich prekurzor
- b) poškození struktury a funkce již přítomných NK (alkylace, interkalace, rozštěpení DNA)
- c) inhibice mikrotubulů a zábrana buněnému dělení
- d) další mechanismy účinku (ovlivnění diferenciace nádorových buněk, stimulace imunologických procesů, stimulace apoptózy)

Ad a) Do této skupiny patří jednak látky blokuje enzymy, které se účastní syntézy NK nebo jejich komponent, ale také látky strukturně podobné těm kterým jsou částem nukleotidů dochází pak k jejich vmezení mezi nukleové báze a NK se tak stávají nefunkčními. Tyto látky pak souhrnně označujeme jako antimetabolity. Antimetabolity zahrnují:

- antifolika (analogy kyseliny listové, např. metotrexát, pemetrexed)
- analogy purinů (antipuriny, např. merkaptopurin, thioguanin)
- analogy pyrimidinů (antipyrimidiny, např. 5-fluorouracil, cytarabin)
- inhibitory ribonukleotidreduktázy

Ad b) Do této skupiny patří:

- alkylační látky (tvorí kovalentní vazbu s DNA, čímž dojde k denuraci a následnému znemožnění transkripce, např. cyklofosfamid, deriváty platiny)
- interkalační látky (nekovalentní vazba s DNA a následné znemožnění transkripce)
- inhibitory topoizomeráz (znemožnění správného prostorového uspořádání dvouřetězce DNA, indukce tvorby zlomů v DNA a porušení její funkce, např. etoposid, topotecan a také chinolonové deriváty)
- radiomimetika (např. bleomycin)

Ad c) Do této skupiny patří látky obecně označované jako antimitotika, nebo inhibují průchod buňky buněným cyklem a působí nejčastěji jako:

- látky poškozující cytoskelet - inhibitory polymerace mikrotubulů (inhibují především tubulinu v mikrotubulech a tím brání tvorbě dělicího větvečka, např. Vinca-alkaloidy)

- inhibitory depolymerace mikrotubul (brání desintegraci d lícího v eténka na mikrotubuly, nap . taxany)
- inhibitory aurora kináz (aurora kinázy jsou d leflité p i separaci chromozom b hem mitózy)
- inhibitory cyklin - dependentních kináz (CDK ó zaji- ují plynulý pr chod bun ným cyklem)

Ad d) Látky s jinými mechanismy ú inku, nap .:

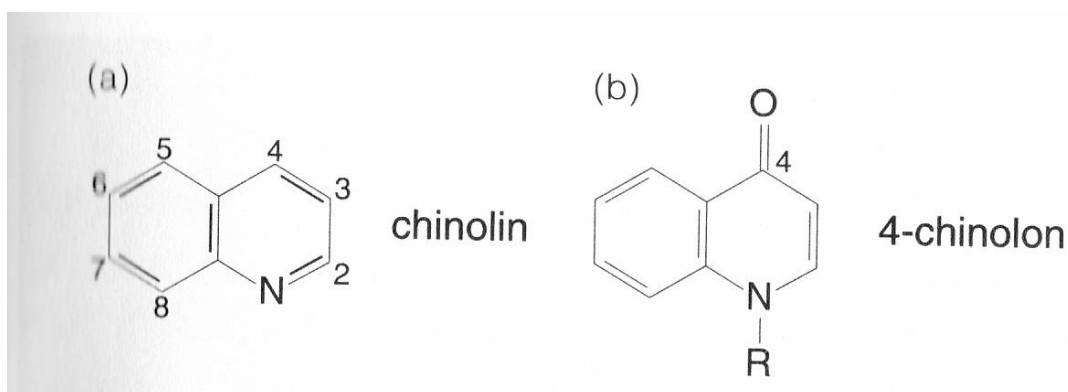
- inhibice proteosyntézy (L ó asparagináza)
- inhibice degrada ních protein
- po-kození bun ných membrán aj. (Hynie, S., 2003; Klener a kol., 2010)

## 2.4 Chinolony

Chinolony pat í mezi širokospektrá baktericidní chemoterapeutika výlu n syntetického p vodu. První chinolony byly nasyntetizovány jifl v 60. letech minulého století, ale do -ír-ího pov domí se dostaly afl v roce 1976, kdy byla do lé by zavedena kyselina nalidixová (Nalidixin), objevená jifl v roce 1962 G. Y. Leshere. Dal-í látka, kyselina oxolinová (Desuro), byla p ipravena v 70. letech 20. století. První chinolonové deriváty (**nefluorované**) m ly lipofilní charakter - mohly voln difundovat p es plazmatickou membránu do cytoplazmy. Byly pouffivány hlavn jako systémová antibiotika, zejména p i zán tech mo ových cest. Postupem asu získávaly tyto deriváty na oblib a jejich vývoj stále pokračoval. Pr lom nastal v 2. polovin 80. let zavedením molekuly fluoru do polohy 6, což umofnilo roz-í it spektrum jejich vyuuffití jako antiinfektiva dýchacích cest. Komer n nejúsp -n j-ími **flurochinolony** se staly ciprofloxacin a ofloxacin. Výhodná farmakokinetika, relativn nízká toxicita a antibakteriální ú inky spojené s neobvyklým mechanismem ú inku se staly v 2. pol. 90. let podn tem pro syntézu dal-ích derivát ó **fluorochinolon** **tvrté generace** (fluorochinolon s roz-í eným spektrem ú inku) (P íborský, J., 2000).

## 2.4.1 Chemická struktura chinolonů

Všechny deriváty chinolonových chemoterapeutik jsou odvozeny od chinolinu (obr. 1a), představujícího základní model jejich struktury. Dnes se však prakticky všechna tato chemoterapeutika odvozují od nejjednoduššího typu molekuly, kterým je 4-ochinolin (obr. 1b).



Obrázek 1 – Strukturální vzorce chinolinu a 4 - chinolonu (Příborský, J. 2000.)

Ke zvýšení účinnosti chinolonů je důležité přítomnost substituentů na C6, C7, C8 a na N1. Na atom uhlíku C6 bývá téměř výlučně navázán fluor, který významně zvyšuje účinnost těchto látek na široké spektrum bakteriálních druhů (v důsledku zvýšení intenzity vazby molekuly chinolonu na komplex DNA s gyrázou, jakož i zvýšení intenzity pronikání chinolonu do buněk – stejně účinný má i piperazinový kruh). Na C7 pak bývá navázána methylskupina (v případě kyseliny nalidixové), aminoskupina (přispívá ke zvýšení hydrofility těchto léčiv – neschopnost dané látky prostupovat fosfolipidovými dvojvrstevnými membránami), nebo piperazinový kruh jak je tomu například u kyseliny pipemidové, norfloxacinu, ciprofloxacinu aj. Piperazinový kruh je odpovědný za zvýšení hydrofility, současně zvýšení antimikrobiální aktivity a možnost dosáhnout vysokých koncentrací léčiva v krevní plazmě, tudíž i za snížení jeho vyloučení močí. Na atom N1 bývá v optimálních případech vázána cyklopropylová skupina (ciprofloxacin), ethylová skupina (norfloxacin) nebo methylaminová skupina (amifloxacin). Molekula chinolonu má tedy optimální antibakteriální aktivitu za těchto podmínek:

- N1 je substituován

- je zachována dvojná vazba mezi C2 a C3
- na C3 je vázána karboxylová skupina
- na C4 je vázána ketoskupina

Tyto podmínky splňuje 4-chinolon-3-karboxylová kyselina, může být proto považována za molekulární základ chinolonových chemoterapeutik (Příborský, J., 2000).

## 2.4.2 Mechanismus účinku chinolon

Mezi jeden z popsaných mechanismů účinku chinolon patří inhibice topoizomeráz. Topoizomerázy jsou nukleární enzymy, které mají zásadní význam pro hladký průběh replikace (Klener a kol., 2010). Topoizomerázy do sebe otevírají a opět spojují fosfodiesterové vazby v dvouřubovici DNA (Příborský, J., 2000). Jsou přítomny ve všech buňkách a zjednodušeně můžeme rozdělit do 3 skupin: savčí topoizomeráza I, savčí topoizomeráza II a bakteriální gyráza (odpovídá topoizomeráze II) (Holý, A., 2004).

Podrobněji lze zahrnout 3 skupiny: typ I, typ II a zvláštní topoizomerázy. Typ I zahrnuje topoizomerázu I kódovanou genem topA (její funkce je do sebe přerušit jedno dvojitě vlákně dvouřubovici, přerušit negativní převíjení DNA a následně přerušit a opět spojit, cofl umocní kontinuitu replikačního procesu), a také topoizomerázu III kódovanou genem topB (ta provádí dekatenci, tj. oddělování DNA). Typ II zahrnuje topoizomerázu II (DNA gyrázu) kódovanou geny gyrA a gyrB (přerušuje do sebe obě vlákně dvojitě řubovici DNA a opět je spojí, tvoří a uvolňuje uzly v DNA) a topoizomerázu IV kódovanou geny parC a parE (která dekatenuje molekuly DNA a umožňuje oddělení dceřiných chromozomů) (Příborský, J., 2000; Klener a kol., 2010). Místem zásahu chinolonů jsou topoizomerázy II. typu (DNA gyráza a topoizomeráza IV). Pravděpodobně se váží nejen na molekuly enzymu DNA gyrázy, ale také na 5' konce jednovlákně DNA. V případě vazby s DNA gyrázou dojde ke spojení gyrázy se zlomy v DNA. Toto spojení působí jako bariéra proti volnému pohybu replikační vidlice. V případě vazby s 5' koncem jednovlákně DNA chinolony brání rozdělení chromozomu ve dva dceřině (Příborský, J., 2000). Souhrnně je možné konstatovat, že při blokádě funkce topoizomeráz nedojde k opětovnému spojení

et zc a vzniklé zlomy v DNA mají pro osud bu ky letální ú inek (Klener a kol., 2010).

### 2.4.3 Vyuffití chinolon v klinické praxi

Díky svým farmakokinetickým vlastnostem, zejména schopnosti kompletn se vst ebat z GIT, dobré distribuci do tkání v etn fl u e, slin a kostí a schopnosti jejich vylu ování do mo i, kde dosahují mnohonásobn vy—í koncentrace ve srovnání s plazmou, našly nefluorované chinolony své uplatn ní p edev—ím v lé b gramnegativních infekcí mo ových cest (Martínková a kol., 2007).

Uplatn ní fluorovaných chinolin je —ir—í, krom gramnegativních mikroorganism pokrývá i stafylokoky, mykoplasmata a intracelulárn lokalizované patogeny ó legionely, chlamydie a n která mykobakteria. Nep sobí v—ak na anaeroby a jejich ú innost v i grampozitivním mikroorganism m je rovn fl slab—í. N které fluorochinolony v kombinaci s jinými antibiotiky mohou být pouffity i k lé b tuberkulózy.

Fluorochinolony s roz—í eným spektrem bývají n kdy ozna ovány jako respira ní fluorochinolony, nebo se uplat ují zejména p i lé b infekcí dýchacích cest. P sobí na grampozitivní i gramnegativní bakterie, dále potom na pneumokoky rezistentní na penicilin, na mnohé enterokoky a anaeroby. Ostatní indikace jsou shodné s p edchozí skupinou.

### 2.4.4 Neffádoucí ú inky chinolon

Mezi nefádoucí ú inky chinolon pat í:

- gastrointestinální obtíffe jako je nauzea, zvracení, bolesti b icha, nechutenství
- bolest hlavy, halucinace, k e e
- kofní projevy
- fotosenzibilizace aj. (Martínková a kol., 2007)

Ve výjime ných p ípadech mohou n které chinolony vyvolat akutní intersticiální nefritidu (akutní po—kození a selhání ledvin) (Teplan a kol., 2010), dále myopatii indukovanou léky (degenerace a odumírání svalových vláken) (Rovenský a kol., 2006),

cholestázu (akutní poškození drobných fluovodů související v těle s působením metabolitů daného preparátu) (Lukáš a kol., 2007) aj.

#### 2.4.5 Perspektivy dalšího vývoje

Stejně jako u jiných protinádorových léčiv je také u chinolonů studován zejména vztah mezi strukturou dané látky a jejími biologickými účinky. Ty jsou ovlivněny typem substituentu navázaným na základní skelet, ale také na polohu substituentu (případně jejich vzájemnosti). Je známo, že například kmeny *Pseudomonas aeruginosa* jsou mimořádně citlivé na velikost substituentu vázaného na atom N4 piperazinového kruhu (piperazin je obvykle zaváděn do polohy C7). Se změnou substituentu se účinnost takového léčiva snižuje (Příborský, J., 2000).

V posledních letech byl zaznamenán vzestupný trend v spotřebě chinolonových derivátů, což může mít záporný negativní dopad zejména v podobě vzniku rezistence bakterií na tato antibiotika. Jsou proto hledány účinnější látky s nižší frekvencí vzniku rezistence, vyšší antibakteriální aktivitou, stejně jako lepšími farmakokinetickými vlastnostmi a současně s nižší toxicitou. Další potenciál chinolonů vyjma známé baktericidní účinky spoívá ve vývoji látek s vyšší specifitou vůči DNA buněk maligních nádorů, které by bylo možné používat v protinádorové terapii (Příborský, J., 2000).

V jedné ze studií provedené na Katedře organické chemie Univerzity Palackého v Olomouci ve spolupráci s Výzkumným institutem pro organické syntézy v Pardubicích bylo zjištěno, že některé deriváty 3-hydroxy-2-phenyl-4(1H)-chinolonu vykazují isosterii s přírodními flavonoidy. Princip isosterie spoívá v nahrazení atomu nebo skupiny atomů jiným, přičemž odvozená sloučenina má podobné biologické vlastnosti jako výchozí látka (pokud zůstane zachováno rozložení elektronové hustoty). Přírodní flavonoidy jsou známy svými cytostatickými a antileukemickými účinky (Hradil a kol., 2004).

V dnešní době existuje celá řada metod vhodných pro testování biologických účinků potenciálních protinádorových léčiv. Vysoce perspektivní metodou pro screening vlivu potenciálních léčiv na regulaci buněčného cyklu a indukci apoptózy je proušková cytometrie, které je v tomto směru věnována velká pozornost.

## 2.5 Pr toková cytometrie

Pr toková cytometrie je moderní, vysoce citlivá metoda umožňující sledování ady vlastností buněk (pop. jiných korpuskulárních objektů) v suspenzi s rychlostí detekce ařn kolik set buněk za vteřinu (Toman a kol., 2009). Základy této metody položil v roce 1950 W.Coulter. V 60. a 70. letech se začalo mluvit o imunofenotypizaci buněk, v roce 1975 byla Köhlerem a Milsteinem objevena hybridomová biotechnologie umožňující tvorbu monoklonálních protilátek. Věchny tyto události předcházely objevu prvních pr tokových cytometrů, jejichž historie spadá do 70. a 80. let 20.stol. Začala se postupně rozvíjet imunologická charakterizace povrchových a cytoplazmatických antigenů jak normálních, tak i patologických hematopoetických buněk a imunologická identifikace buněčných podskupin, které nebylo možno rozlišit klasickou morfologií. V roce 1982 byla v Paříži založena CD nomenklatura, která je stále doplňována a aktualizována (CD molekuly - cluster of differentiation - tvoří skupinu protilátek, které rozpoznávají specifický epitop daného antigenu). Díky pokroku v oblasti počítačových a laserových technologií jsou dnešní cytometry citlivými moderními přístroji nacházejícími své uplatnění v mnoha odvětvích především medicínského a biologického výzkumu (Marinov, I., 2008).

### 2.5.1 Princip metody

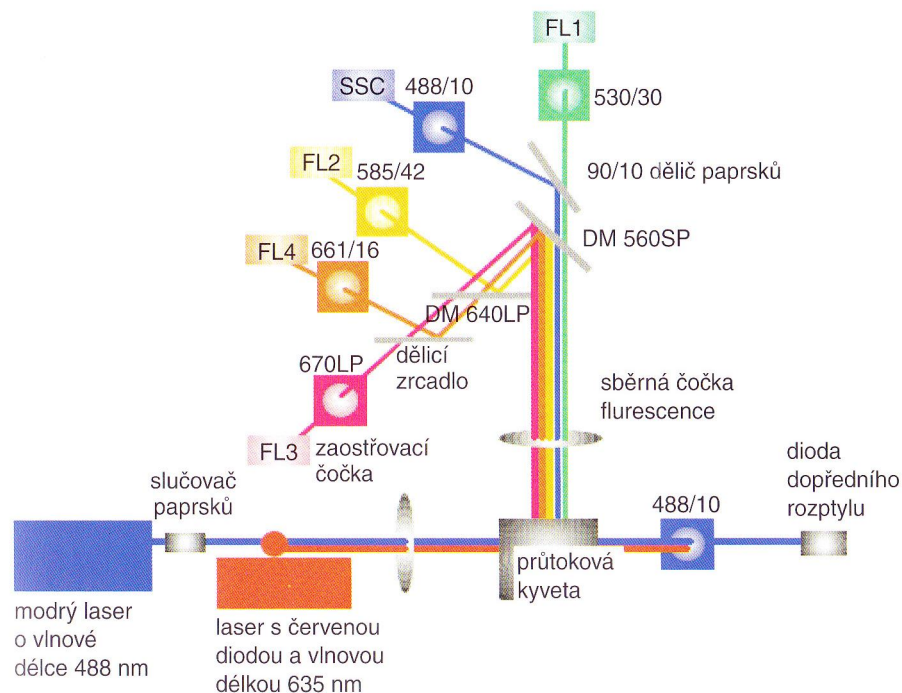
Bučky, značené protilátkami s fluorescenční koncovkou nebo obarvené různými fluorochromy, jsou nasávány trubicou pro nasávání vzorku (tryskou) a unášeny laminárním proudem nosné kapaliny (tzv. sheath fluid) do pr tokové měřicí kyvety. Laminární proud nosné tekutiny v kyvetě zajišťuje tzv. hydrodynamickou fokusaci proudu buněk v jedné řadě za sebou do střední kyvety umožňující snímání signálu z každé částice zvlášť. V pr tokové kyvetě jsou proudící částice zachycovány laserovým paprskem (optický systém pr tokového cytometru je znázorněn níže, viz. Obr.2). U souasných cytometrů je nejčastěji používán modrý laser o vlnové délce 488 nm a červený laser o vlnové délce 635 nm, který před dopadem na částice prochází přes zaostřovací čočku. Signál vznikající interakcí buněk s laserovým paprskem (rozptýlené světlo a emitovaná fluorescence) je zachycen buřdiodou dopředního rozptylu (signál



dopředního rozptylu (viz. kap. 2.5.2), nebo sbírnou kolekcí fluorescence (signál bočního rozptylu a fluorescence viz. kap. 2.5.2). Poté je rozdelen systémem hranol, optických filtrů a zrcadel podle vlnové délky (barvy) emitované fluorescence. Jednotlivé světelné signály jsou převedeny na elektrické impulzy a zesíleny (lineárně i logaritmičtě) fotonásobičem, poté snímány detektory a pomocí počítačového systému digitalizovány a graficky znázorněny. Zjednodušeně můžeme tedy konstatovat, že základními komponentami průtokového cytometru jsou fluidní systém, optický systém a počítačový systém (Marinov, I., 2008, Eckschlager a kol., 1999).

Pozn.: Důležitými prvky optického systému průtokových cytometrů jsou 3 typy filtrů :

- long pass filtry, které propouští světlo od určité vlnové délky, to s nižší vlnovou délkou zachytí
- short pass filtry, které propouští světlo do určité vlnové délky
- band pass filtry, které propouští světlo v určitém rozsahu vlnových délek (Eckschlager a kol., 1999) .



**Obrázek 2 – Optický systém průtokového cytometru BD FACS Calibur (Marinov, I., 2008)**

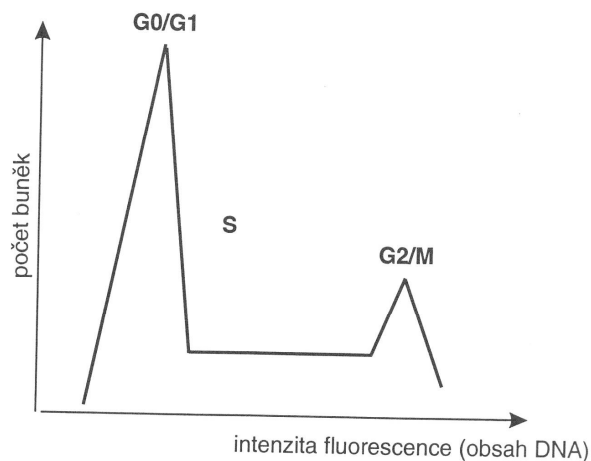
## 2.5.2 Základní parametry flow cytometrické analýzy

Mezi základní parametry flow cytometrické analýzy máme zařadit následující:

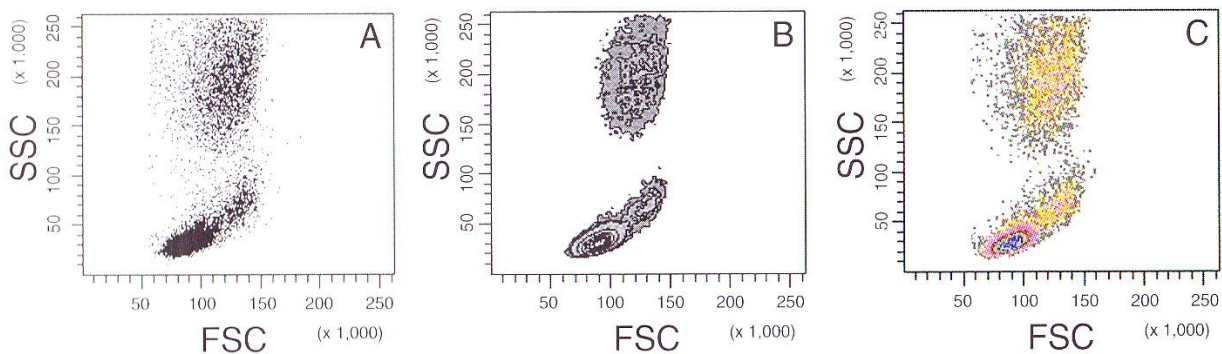
- Dopřední rozptyl (forward scatter channel ó FCS)
  - intenzita FCS signálu poskytuje informaci o velikosti částic
  - pomocí FCS jsou odlišeny viabilní buňky od buněčné drti,
- boční rozptyl (side scatter channel ó SSC)
  - jeho intenzita poskytuje informaci o vnitřní struktuře (granularitě) buněk
- fluorescence
  - znamená vyzařování světelné energie o dané vlnové délce
  - poskytuje kvantitativní a kvalitativní informaci o membránových nebo cytoplazmatických receptorech značených protilátkou s fluorochromem nebo fluorochromem sloučícím jako fyzikální chemická sonda (fluorochromy jsou barviva schopná absorbovat světelnou energii o určité vlnové délce a následně ji vyzařovat v jiné vlnové délce, např. akridinová oranž nebo propidium iodid ó interkalace do DNA/RNA)
  - intenzita fluorescence se odvíjí od typu použitého fluorochromu, vazebné kapacity konjugátu fluorochromu ó monoklonální protilátka a od množství epitopů, znaků, i změn fyzikálních chemických parametrů buňky
- kompenzace fluorescenčního přesvitání (spectral-overlap)
  - je nutná při použití více fluorochromů, jejichž emisní spektra se překrývají (ze signálu z daného fotonásobiče pro daný fluorochrom odečítáme procento vyjadřující fluorescenční přesvitání jiného fluorochromu)
- faktory ovlivňující flow cytometrické analýzy
  - patří sem např. relativní intenzita fluorochromu, nespecifická vazba fluorochromu, stabilita tandemových konjugátů, sterická zábrana a interakce protilátek (Marinov, I., 2008)

### 2.5.3 Výstupní data flow cytometrického měření

Výstupem měření na prtokovém cytometru jsou výsledky v grafické a číselné formě (tabulky s příslušnými statistikami). Grafické výstupy mohou být jednoparametrové, kde na ose x je znázorněna intenzita signálu a na ose y množství buněk/částic (viz. Obr.3) nebo dvouparametrové, kde na ose x je vynesena relativní intenzita jednoho a na ose y druhého signálu. Množství buněk (třetí rozměr) je u dvouparametrového histogramu znázorněno hustotou bodů (tzv. dot-plot histogram) nebo barami připomínajícími vrstevnice (tzv. contour-plot histogram) (Eckschlager a kol., 1999). Tímto typem dvourozměrného histogramu je hustotní graf (density plot), (viz. Obr. 4).



Obrázek 3 Schéma jednotlivých fází buněného cyklu podle obsahu DNA (Eckschlager a kol., 1999)



Obrázek 4 A) bodový graf (dot plot), B) vrstevnicový graf (contour plot), C) hustotní graf (density plot)

## 2.5.4 Výhody a nevýhody pr tokové cytometrie

I p es n které nevýhody, jakými m fle být hlu nost p ístroje, prostorová i finan ní náro nost, z stává pr toková cytometrie vysoce perspektivní metodou ve výzkumu i klinické praxi. Jejými nespornými p ednostmi jsou zejména aplikovatelnost v mnoha v deckých disciplínách, mofnost m ení ady fyzikálních, chemických, biologických parametr na velkém množství ástic v relativn krátkém ase, m ení bez p edchozí separace bun k, mofnost kvantitativní a kvalitativní analýzy (u n kterých p ístroj je jedním z parametr í as, cofl umofl uje provád t kinetické studie) a v neposlední ad také mofnost selektivní analýzy a zobrazování konkrétní cílové populace prost ednictvím elektronického ohrani ení (gating) (Murinov, I., 2008, Eckschlager a kol., 1999).

## 2.5.5 Vyuffití pr tokové cytometrie v praxi

Jak jifl bylo p edesláno, pr toková cytometrie nachází široké uplatn ní ve výzkumu i v klinické praxi. Pomocí této metody jsou provád na vy-et ení povrchových a intracelulárních antigen (imunofenotypizace), protilátek, n kterých bun ných funkcí (nap . fagocytózy), aktivity enzym , vnit ního prost edí bun k , pr ník lék do bun k a mnoho dal-ích. V -ír-ím úhlu pohledu poskytuje pr toková cytometrie mofnost aplikace ve vy-et ení solidních nádor , v diagnostice defekt imunity, diagnostice a monitorování aktivity autoimunitních chorob, u transplantací, v hematookologii a v neposlední ad p i DNA-analýze (Eckschlager a kol. 1999), která souvisí s touto bakalá skou prací.

### 2.5.5.1 Cytometrická DNA-analýza

V diagnostice a prognosování zhoubných nádor jsou popisovány dva d leflité parametry související s obsahem DNA:

- DNA-ploidie
  - udává, kolikrát více obsahují nádorové bu ky ve fázi G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> více DNA nefl - li bu ky normální ve stejné fázi bun ného cyklu (DNA-index)

- parametry kinetiky buněného cyklu
  - tento parametr bývá udáván jako procento buněk v populaci v jednotlivých fázích buněného cyklu
  - podle relativního obsahu DNA jsme schopni v prouškově cytometrii rozlišit tři fáze: G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub>/M
  - vyšetření kinetiky buněného cyklu je založeno na stechiometrické vazbě na kterých fluorochrom (např. propidium iodid) k DNA/RNA po předchozí aplikaci RNA-ázy a následném hodnocení intenzity fluorescence inkorporovaného fluorochromu, která je přímo úměrná obsahu DNA v buňce (viz. Obr.4) (Eckschlager a kol., 1999).

### 3 Cíle práce

Cíle práce je možné shrnout do následujících bodů :

1. Vypracování referátu na téma molekulární metody vhodné pro studium cytotoxických a buněčný cyklus modulujících účinků u potenciálních cytotoxických léčiv.
2. Cytotoxická analýza chinolonových derivátů na nádorových buněčných liniích.
3. Analýza alterací buněčného cyklu po ošetření chinolonovými deriváty.

## **4 Materiál a metodika**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Buněné kultury**

Jako biologický materiál byla použita nádorová buněná linie CEM odvozená od lidské akutní lymfoblastická leukemie. Zamražené alikvoty této linie byly uchovávány v prostředí tekutého dusíku při  $-180^{\circ}\text{C}$ . Po rychlém rozmrazení ve vodní lázni při  $37^{\circ}\text{C}$  a následné centrifugaci při  $1400\text{ g}$  po dobu 7 minut jim bylo vyměněno zamrazovací médium za médium kultivace. Pro danou buněnou linii bylo použito médium RPMI 1640 s přísadkou 20% fetálního bovinního séra (FBS), 5 ml streptomycinu (STM) na 1 litr média a 0,5 ml penicilinu (PNC) na 1 litr média. Po rozplnění do kultivačních lahví byla buněná suspenze kultivována v inkubátoru při  $37^{\circ}\text{C}$  s 5% obsahem  $\text{CO}_2$  a pasážována třikrát za týden.

#### **4.1.2 Testovaná cytostatika**

Mezi testovaná cytostatika byly zařazeny vybrané chinolonové deriváty (viz Tabulka I.), které byly otestovány cytotoxickým MTT testem (princip popsán níže) a vykazovaly hodnotu  $\text{IC}_{50}$  nižší než  $2\text{ }\mu\text{mol/l}$ . Hodnota  $\text{IC}_{50}$  udává koncentraci látky - cytostatika, která je letální pro 50 % nádorových buněk.

**Tabulka I - P ehled testovaných derivát**

Název derivátu	IC50 (μmol/l)
MSHQ10	0,698
MSHQ6	0,69
MSHQ4	0,647
MSHQ9	0,898
MSHQ11	0,654
MSHQE	0,729
MSHQK	0,737
MSHQN	0,608
04-0712	1,7
04-0713	1,7
07-1024	1,3
07-1025	0,602
04-0674	1,6
04-0706	1,7
05-0785	1,4
MSDS4	0,73
05-0759	1,8
05-0755	0,724
05-0789	0,647
05-0790	0,629
04-0711	1,4
04-0694	0,265
04-0697	0,244
04-0676	0,25
04-0714	1,5

#### 4.1.2.1 Princip MTT testu

MTT test slouží ke stanovení viability bun k a cytotoxicity lé iv. Tato metoda je založena na redukci flutého rozpustného 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan, který vytvá í modré krystaly hv zdicovitého tvaru. K této reakci dochází na mitochondriální membrán flivých bun k vlivem respirace. Formazan je následn rozpu-t n pomocí silného detergentu. Vyhodnocení se provádí spektrofotometricky nej ast ji p i vlnové délce 540 nm. ím intenzivn j-í je zbarvení v dané jamce a tedy i vy-í absorbance, tím vy-í je procento flivých bun k. Naopak, pokud bu ky nep eflívají, nedochází u nich k respiraci na mitochondriální membrán , modré krystaly formazanu se netvo í a jamky z stávají fluté. (Scudiero a kol., 1988)



## 4.2 Metodika experimentální části

### 4.2.1 Inkubace buněk, ošetření chinolonovými deriváty a fixace buněk

U buněk nádorové linie CEM, kultivovaných v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>, byla pomocí Bürkerovy komůrky zjištěna jejich hustota a následně byla tato suspenze naředěna médiem RPMI 1640 na požadovanou koncentraci 250 000 buněk na jamku. Z této suspenze byly napipetovány 4 ml do každé z jamek – tedy jamkového panelu a takto byly buňky kultivovány v inkubátoru při shora uvedených podmínkách. Po 24 hodinové inkubaci byla k buňkám přidána cytostatika či chinolonové deriváty, a to vždy tak, aby výsledná koncentrace cytostatika v každé jamce odpovídala hodnotám 1x IC<sub>50</sub> [μmol/l] a 5x IC<sub>50</sub> [μmol/l] (hodnoty IC<sub>50</sub> pro testovaná cytostatika viz Tab. I). Po 24 hodinové inkubaci od přidání léčiva byly buňky pipetovány z jednotlivých jamek do předem označených zkumavek a zcentrifugovány při 1400 g po dobu 5 minut, následovalo odsátí supernatantu, promytí buněk 5 ml fyziologického roztoku s opětnou centrifugací za stejných podmínek a fixace buněk, která byla provedena přidáním 2 ml ledově vychlazeného 70% ethanolu na mírném vortexu. Takto zafixované buňky byly uchovávány v mrazáku při 20 °C po dobu několika dnů před vlastní cytometrickou analýzou.

### 4.2.2 Příprava buněk pro měření na protokovém cytometru FACSCalibur

- buňky, které byly zafixovány v 70% ethanolu a uchovány při -20°C, byly před samotným měřením zcentrifugovány při 800g po dobu 5 minut
- následovalo odsátí supernatantu a přidání 1 ml citrátového pufru 1x k peletě, propipetování, přidání dalších 3 ml citrátového pufru 1x
- centrifugace při 800g po dobu 5 minut
- supernatant byl odsát, k peletě bylo přidáno 600 μl pracovního roztoku propidium iodidu a buněčná suspenze byla promíchána na mírném vortexu
- následovala inkubace s propidium iodidem ve vodní lázni při 37°C po dobu 15 minut, ve tmě
- poté bylo přidáno 500 μl pracovního roztoku RNasy a proběhla znovu inkubace ve vodní lázni za stejných podmínek

- po inkubaci byly vzorky na 1 hodinu ponechány v lednici z důvodu stabilizace

#### **4.2.3 Měření na cytometru FACSCalibur, vyhodnocení naměřených dat**

Pro samotné měření vzorků na cytometru byl použit program CellQuest. Měření buněčného cyklu a apoptózy s točitým nastavením odpovídajících měřících templátů a dalších parametrů bylo provedeno ve třech opakováních. Jako kontrola byly použity buňky téže linie, které nebyly ošetřeny chinolonovými deriváty a byly inkubovány 48 hodin při výše uvedených podmínkách a stejně zpracovány.

K vyhodnocení naměřených dat buněčného cyklu a apoptózy byl opět použit software CellQuest a získané histogramy s odpovídajícími statistikami byly ukládány do programu ClarisWork ve formátu .rtf. Buněčný cyklus byl navíc analyzován pomocí programu ModFit.

## **5 Výsledky**

## **6 Diskuse**

## 7 Závěr

Tato práce byla zaměřena na studium biologických účinků chinolonových derivátů, kterými byly ošetřeny buňky nádorové buněčné linie CEM odvozené od akutní lymfoblastické leukémie. Moderní metodou, vhodnou pro studium buněčného cyklu modulujících a cytotoxických účinků testovaných derivátů, se stala průtoková cytometrie. Pomocí této metody se podařilo identifikovat látky zasahující do regulace buněčného cyklu a navozující inhibici ve všech fázích buněčného cyklu- G1, S a G2/M. Za zajímavé látky můžeme považovat ty, které inhibovaly buňky v S a G2/M fázi, nebo by teoreticky mohly vykazovat dostatečně cílený účinek zasahující klíčové proteiny syntézy DNA nebo proteiny nezbytné pro regulaci mitózy. Dále byl sledován účinek testovaných látek na indukci apoptózy. Po 24 hodinové inkubaci v přítomnosti látek významně indukovala tvorbu apoptotických tělísek. Zároveň ale indukce apoptózy nebyla u žádné z testované sloučeniny natolik vysoká, aby zkreslila analýzu buněčného cyklu. Průtoková cytometrie nepatří mezi metody, pomocí kterých bychom mohli přesně stanovit cíle protinádorových chemoterapeutik. K tomuto účelu slouží molekulárně biologické metody jako například western blotting, expresní profilování na úrovni mRNA, proteinová značení protilátkou v případě histonu H3<sup>pSer10</sup>, značení pomocí BrU, BrdU aj. Zůstává tedy velkou výzvou další syntéza a testování dalších chinolonových derivátů, které by v budoucnu mohly být aplikovány v klinické praxi jako účinná protinádorová léčiva.

## 8 Seznam použitých zkratk

DNA	deoxyribonukleová kyselina
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
MDS	myelodysplastický syndrom
CML	chronická myeloidní leukemie
BCR/ABL	fúzní gen vznikající translokací genetického materiálu chromozom 9 a 22
TEL ó AML 1	fúzní gen vznikající translokací t (12;21)
ATM kinázy	ataxia teleangiectasia mutated (kinázy aktivované po-pození DNA)
ATR kinázy	ataxia teleangiectasia and Rad3 related (kinázy aktivované po-pození DNA)
CHK1 a CHK2	checkpoint kinázy
Rb protein	retinoblastomový protein
RAS	protoonkogen
MAPK	mitogenem aktivované kinázy
ICE proteázy	interleukin 1 m ní proteázy podobné enzym m
Bcl ó 2	B-cell lymphoma geny související s apoptózou
GIT	gastrointestinální trakt
NK	nukleové kyseliny
GyrA a GyrB	geny kódující enzym DNA gyrázu
parC a parE	geny kódující topoizomerázu IV
topA	geny kódující topoizomerázu I
topB	geny kódující topoizomerázu III
CD molekuly	šcluster of differentiation ō skupina protilátek rozpoznávajících specifický epitop daného antigenu
FCS	forward scatter channel
SSC	side scatter channel
RNA-áza	enzym -t píící ribonukleové kyseliny
PNC	penicilin
STM	streptomycin

CEM	nádorová bun ěná linie odvozená od akutní lymfoblastická leukemie
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
BrU	bromuridin
BrdU	bromdeoxyuridin
mRNA	mediátorová RNA

## 9 P ístroje, chemikálie, roztoky

### P ístroje:

temperovaná vodní láze (Techne), pr tokový cytometr FACS Calibur (Becton Dickinson), vortex (Genie), centrifuga (Eppendorf), biohazard box (Forma Scientific), sv telný mikroskop, CO<sub>2</sub> inkubátor (Jouan)

### Chemikálie:

Propidium iodid (Sigma), dimethylsulfoxid (Sigma), fyziologický roztok, Triton X-100 (Koch-light limited), citrát trisodný monohydrát (Aldrich), ethanol, ribonukleasa A (Sigma), purifikovaná voda (deionizovaná i destilovaná), kultura ní médium RPMI-1640 (Sigma), fetální telecí sérum (Biocom, R), streptomycin 100 µg/ml (Sigma S 9137), penicilin 100 µg/ml (Biotika, Slovensko), NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, HCl (Lachema), (chemikálie, u nichfl není uveden název firmy byly získány z nemocni ní lékárny)

### Roztoky:

10x koncentrovaný PBS

80 g NaCl, 32,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> se rozpustí v 700 ml destilované vody, pH se upraví na 7,4 pomocí HCl, doplní se do 1 litru deionizovanou H<sub>2</sub>O a pH se ov í a eventueln znovu upraví

1x PBS

10 ml 10x koncentrovaného PBS se smíchá s 90 ml neionizované vody

70% ethanol

70 ml 99% ethanolu se smíchá s 29 ml H<sub>2</sub>O.

Pracovní roztok propidium jodidu (50 µg/ml)

Smícháme 2 mg propidium iodidu, 2 ml 2% zásobního roztoku Triton X-100 a doplníme do 40 ml deionizovanou H<sub>2</sub>O



2% zásobní roztok Tritonu X-100

2 ml Triton X-100 se smíchá s 100 ml 10x koncentrovaného citrátového pufru

10 x koncentrovaný citrátový pufr

5,68 g citrátu trisodného monohydrátu se doplní do 500 ml H<sub>2</sub>O

1x koncentrovaný citrátový pufr

10 ml 10x koncentrovaného citrátového pufru se smíchá s 90 ml neionizované vody

Pracovní roztok RNAázy (0,5 mg/ml)

10 mg RNAázy se rozpustí v 5 ml 1x koncentrovaného citrátového pufru

## 10 Literatura

Knihy:

- [1] ALBERTS, Bruce, a kol. *Základy buněné biologie : Úvod do molekulární biologie buky*. 2. vyd. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [2] ECKSCHLAGER, Tomáš; BARTKOVÁ, Jiřina; VYBÍRALOVÁ, Hana. *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Vyd. 1. Praha : Grada Publishing, 1999. 172 s. ISBN 80-7169-279-4.
- [3] HOLÝ, Antonín. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*. Vyd. 1. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2004. 414 s. ISBN 80-244-0855-4.
- [4] HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie Díl VII/A : Protinádorová chemoterapeutika a imunomodulační látky*. 2. přepracované vyd. Praha : Karolinum, 2003. 166 s. ISBN 80-246-0656-9.
- [5] KOVÁČEK, Jan. *Buněná proliferace a mechanismy její regulace I.* 2. vyd. Praha : Karolinum, 2003. 64 s. ISBN 80-246-0704-2.
- [6] KOVÁČEK, Jan. *Buněná proliferace a mechanismy její regulace II.* 2. vyd. Praha : Karolinum, 2005. 74 s. ISBN 80-246-1133-3.
- [7] MARINOV, Iuri. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. Praha : TRITON, 2008. 148 s. ISBN 978-80-7387-143-7.
- [8] KLENER, Pavel; KLENER, Pavel, jr. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. 1. vyd., Praha : Grada Publishing, 2010. 209 s. ISBN 978-80-247-2808-7.

- [9] P ÍBORSKÝ, Jan. *Chinolony*. Praha : MAXDORF, 2000. 112 s. ISBN 80-85912-16-3.
- [10] SKALA, Evfen. Leukémie. *Liga proti rakovin : broflura*. 2001?, s. 2 - 10.
- [11] STARÝ, Jan. Leukémie v d tském v ku. *Liga proti rakovin : broflura*. 2007?, s. 1 - 6.
- [12] TO<sup>TM</sup>OVSKÝ, Václav. Leukémie d tského v ku. *Liga proti rakovin : broflura*. 2001, s. 12 - 14.
- [13] WEINBERG, Robert A. *Jediná odrodilá bu ka : Jak vzniká rakovina*. 1. vyd., Praha : Academia, 2003. 156 s. ISBN 80-200-1071-8.

e- knihy:

- [14] LUKÁ<sup>TM</sup> Karel, a kol. *Chorobné znaky a p íznaky* [online]. Praha : Grada Publishing, 2007 [cit. 2010-04-18]. Dostupné z WWW: < [http://books.google.com/books?id=GpMcCOtt6OgC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs\\_v2\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/books?id=GpMcCOtt6OgC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false) >.
- [15] MARTÍNKOVÁ, Ji ina , a kol. *Farmakologie pro studenty zdravotnických obor* [online]. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2007 [cit. 2010-04-29]. Dostupné z WWW: < <http://books.google.com/books?id=7INQpLuETq4C&pg=PA16&dq=chinolony&lr=&hl=cs&cd=16#v=onepage&q=chinolony&f=false> >. ISBN 978-80-247-1356-4.
- [16] ROVENSKÝ, Jozef, a kol. *Revmatologický výkladový slovník* [online]. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2006 [cit. 2010-05-14]. Dostupné z WWW: < <http://books.google.com/books?id=PJpm4XUXRjoC&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Jozef+Rovensk%C3%BD%22&lr=&hl=cs&cd=1#v=onepage&q&f=false> >. ISBN 80-247-1614-3.

- [17] TEPLAN, Vladimír , a kol. *Akutní poškození a selhání ledvin v klinické medicíně* [online]. 1. vyd. . Praha : Grada Publishing, 2010 [cit. 2010-04-25]. Dostupné z WWW: <  
[http://books.google.com/books?id=vRpwZxmkgIgC&printsec=frontcover&dq=  
=inauthor:%22Vladim%C3%ADr+Teplan+a+kolektiv%22&lr=&hl=cs&cd=1  
#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/books?id=vRpwZxmkgIgC&printsec=frontcover&dq=%3Dinauthor:%22Vladim%C3%ADr+Teplan+a+kolektiv%22&lr=&hl=cs&cd=1#v=onepage&q&f=false)>. ISBN 978-80-247-1121-8.

Seriálové publikace:

- [18] HRADIL, Pavel, a kol. Synthesis, NMR spectra and X-ray data of chloro and dichloro derivatives of 3-hydroxy-2-phenylquinolin-4(1H)-ones and their cytostatic activity. *J. Heterocyclic Chem.*. 2004, 3, 41, s. 375-379.
- [19] SCUDIERO, A. D., a kol. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research*. 1988, X, s. 4827 - 4833.
- [20] HAJDÚCH, Marián, a kol. Racionální individualizace protinádorové léčby - molekulární, buněčné a klinické aspekty. *Edukativní slovník*. 2003, x, s. 136-147.

