

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Optické vlastnosti vybraných chemoterapeutik



Vypracoval:

Studijní obor:

Vedoucí bakalářské práce:

Radek Ostruszka

Biofyzika

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

Olomouc 2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Radek Ostruszka

Název práce: Optické vlastnosti vybraných chemoterapeutik

Typ práce: Experimentální

Pracoviště: Katedra biofyziky

Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt:

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo roztrždit cytostatika na základě biologického účinku a chemické struktury. Dle mechanismu účinku byly rozděleny do tří skupin, a to na inhibitory biosyntézy nukleových kyselin, na látky poškozující strukturu nukleových kyselin a na látky poškozující mikrotubuly dělicího vřeténka. Během dalšího dělení bylo přihlédnuto i k chemické struktuře. Experimentální cíl práce spočíval v proměření absorpčních a fluorescenčních spekter doxorubicinu, fluorouracilu, gemcitabinu a merkaptopurinu pro různá pH a následném určení základních charakteristik spekter, jako jsou maxima a jejich posun v závislosti na pH, izobestické a izoemisní body, Stokesův posun a další. Fitováním dat byly také stanoveny hodnoty záporného dekadického logaritmu rovnovážné acidobazické konstanty jako $pK_a = 9,59$ pro doxorubicin, $pK_a = 7,92$ pro fluorouracil, $pK_a = 3,58$ pro gemcitabin a nakonec $pK_a = 7,69$ pro merkaptopurin.

Klíčová slova: absorpční spektra, emisní spektra, doxorubicin, fluorouracil, gemcitabin, merkaptopurin, rovnovážná acidobazická konstanta

Počet stran: 40

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Radek Ostruszka

Title of thesis: Optical properties of chosen chemotherapeutics

Type of thesis: Experimental

Department: Department of biophysics

Supervisor: doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

The year of defence: 2018

Abstract:

One of the aims of this bachelor thesis was to categorize cytostatics based on the biological effect and chemical structure. In terms of the mechanism of action, they were divided into three groups, namely, nucleic acid biosynthesis inhibitors, nucleic acid damaging agents and agents which damage microtubules of the mitotic spindle. To help the further partition, their chemical structure was taken into account. The experimental goal of this thesis was to measure the absorption and fluorescence spectra of doxorubicin, fluorouracil, gemcitabine and mercaptopurine for sundry pHs, furthermore, to determine the fundamental properties of the spectra, for instance, maxima and their shift according to pH, isobestic and isoemission points, Stokes' shift and others. By fitting the data, values of negative decadic logarithm of acido-basic equilibrium constant as $pK_a = 9,59$ for doxorubicin, $pK_a = 7,92$ for fluorouracil, $pK_a = 3,58$ for gemcitabine and lastly $pK_a = 7,69$ for mercaptopurine were determined.

Key words: absorption spectra, emission spectra, doxorubicin, fluorouracil, gemcitabine, mercaptopurine, acido-basic equilibrium constant

Number of pages: 40

Number of attachments: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením doc. RNDr. Martina Kubaly, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne.....

Rád bych tímto poděkoval vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, odborné vedení a trpělivost během řešení mé práce. Rovněž děkuji Bc. Tereze Štenclové za bezmeznou ochotu a pomoc s experimentální částí mé bakalářské práce. Dále také děkuji Mgr. Ursule Ferretti, Bc. Alžbete Kubištelové, Mgr. Ondřeji Kocábovi a Mgr. Petře Čechové za rady a příjemnou atmosféru při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat i své rodině a přátelům za psychickou podporu při psaní bakalářské práce.

SEZNAM ZKRATEK

THF	tetrahydrofolát (<i>tetrahydrofolate</i>) neboli kyselina tetrahydrolistová (<i>tetrahydrofolic acid</i>)
RFC	přenašeče redukovaných folátů (<i>reduced-folate carriers</i>)
TIMP	6-thioinosin-5'-monofosfát (<i>6-thioinosine-5'-monophosphate</i>)
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát (<i>5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate</i>)
FUTP	5-fluorouridin-5'-trifosfát (<i>5-fluorouridine-5'-triphosphate</i>)
UTP	uridin-5'-trifosfát (<i>uridine-5'-triphosphate</i>)
FUDP	5-fluorouridin-5'-difosfát (<i>5-fluorouridine-5'-diphosphate</i>)
FdUTP	5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-trifosfát (<i>5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate</i>)
dFdCMP	2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin-5'-monofosfát (<i>2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine-5'-monophosphate</i>)
dFdCDP	2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin-5'-difosfát (<i>2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine-5'-diphosphate</i>)
dFdCTP	2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin-5'-trifosfát (<i>2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate</i>)

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Přehled problematiky	2
2.1	Chemoterapeutika.....	2
2.2	Cytostatika.....	2
2.3	Mechanismus účinku	3
2.3.1	Inhibice biosyntézy nukleových kyselin	3
2.3.2	Poškození struktury nukleových kyselin.....	4
2.3.3	Poškození mikrotubulů dělicího vřeténka	4
2.4	Rozdělení cytostatik dle mechanismu účinku s přihlédnutím k chemické struktuře.....	4
2.4.1	Antimetaboly	4
2.4.1.1	Deriváty kyseliny listové (antifoláty)	5
2.4.1.1.1	Methotrexát.....	5
2.4.1.1.2	Raltitrexed	6
2.4.1.2	Deriváty purinu	6
2.4.1.2.1	6-merkaptopurin	6
2.4.1.2.2	Fludarabin.....	7
2.4.1.3	Deriváty pyrimidinu	7
2.4.1.3.1	5-fluorouracil.....	8
2.4.1.3.2	Gemcitabin.....	9
2.4.2	Alkylační cytostatika.....	10
2.4.2.1	Cyklofosfamid.....	10
2.4.2.2	Deriváty nitrosomočoviny	11
2.4.3	Deriváty platiny.....	11
2.4.3.1	Cisplatina.....	12
2.4.3.2	Karboplatina	12
2.4.4	Interkalátory.....	12
2.4.5	Inhibitory topoizomerázy I a topoizomerázy II.....	13
2.4.6	Cytostatika s radiomimetickým účinkem	14
2.4.7	Inhibitory polymerace mikrotubulů (vinca alkaloidy).....	14
2.4.8	Inhibitory depolymerace mikrotubulů	15
3	Cíl práce.....	16
4	Materiál a metody	17
4.1	Měření absorpčních spekter	17
4.2	Měření emisních spekter.....	18
5	Výsledky	19
5.1	Doxorubicin	19
5.1.1	Absorpční spektrum.....	19
5.1.2	Emisní spektrum.....	21

5.2	5-fluorouracil	22
5.2.1	Absorpční spektrum.....	22
5.2.2	Emisní spektrum.....	24
5.3	Gemcitabin	25
5.3.1	Absorpční spektrum.....	25
5.4	6-merkaptopurin	27
5.4.1	Absorpční spektrum.....	27
5.4.2	Emisní spektrum.....	29
6	Diskuze	31
6.1	Doxorubicin	31
6.2	5-fluorouracil	33
6.3	Gemcitabin	34
6.4	6-merkaptopurin	34
7	Závěr	36
8	Seznam použité literatury	37
9	Internetové zdroje	40

1 Úvod

V současné době je rakovina velmi závažným a rozšířeným onemocněním, a proto je nezbytné vylepšovat dosavadní způsoby nejen její léčby, ale také i diagnózy. Včasné odhalení této nemoci je velice důležité a může znamenat rozdíl mezi uzdravením pacienta a jeho smrtí. Vedle chirurgického odstranění nádorových buněk či ozařování existuje také možnost chemoterapie. Ta spočívá v podávání léčiv zvaných cytostatika, která usmrcují primárně rychle se dělící buňky. Jejich hlavním cílem je molekula DNA a látky nezbytné pro správný průběh buněčného dělení.

Existuje mnoho různých způsobů, jakými může cytostatikum zastavit dělení buňky a usmrtit ji. Podle toho je lze rozdělit do různých skupin. Antimetabolity mohou zastavit tvorbu stavebních kamenů DNA, nebo se mohou místo nich do molekuly DNA včlenit a způsobit tak její poškození. Alkylační látky se vážou přímo na DNA, čímž zapříčiní změnu její struktury. Radiomimetika zase způsobují tvorbu vysoce reaktivních molekul, které s DNA interagují a vyvolávají zlomy v její struktuře. A to je jen ukázka několika mechanismů účinku. Cytostatika se navzájem také liší tím, v jaké fázi buněčného dělení působí. Některá mohou účinkovat během celého procesu dělení, jiná pouze v určité fázi.

Jak již bylo řečeno, cytostatika působí především na rychle se dělící buňky. Takové buňky tvoří v lidském těle i některé zdravé tkáně, a tak jsou cytostatiky rovněž poškozovány. Při užívání těchto léčiv se tudíž mohou projevit různé nežádoucí účinky, ke kterým patří například vypadávání vlasů, nevolnost, zvracení a zhoršené hojení ran. Snahou je tedy nalézt léčiva, která by využívala specifických vlastností nádorových buněk a nepoškozovala by tak tkáně zdravé. Velkým problémem je také možnost vzniku rezistence nádorových buněk vůči působení daného cytostatika.

Cílem této bakalářské práce bylo zkoumat optické vlastnosti zvolených cytostatik v závislosti na pH prostředí a určit jejich pK_a . Tato hodnota nám může sdělit, co se bude s danou molekulou dít v prostředí s určitou hodnotou pH.

2 Přehled problematiky

2.1 Chemoterapeutika

Chemoterapie je léčebná terapie, při které se pacientovi podávají léky chemicky syntetizované. V onkologii se však jedná o podávání léčiv s cytotoxickým účinkem, a to bez ohledu na to, zda jsou získávána z živých organismů, či vyrobena synteticky (Adam a kol. 2003). Chemoterapii předcházela chirurgická léčba a radioterapie, její počátky se objevují až ve čtyřicátých letech 20. století. Teprve v šedesátých letech se chemoterapie stala jednou z hlavních metod užívaných k léčbě nádorových onemocnění (Klener jr. a Klener 2013).

Pojmem chemoterapeutika jsou tedy označována jednak cytostatika, pomocí kterých jsou léčena různá nádorová onemocnění, jednak jsou do této obrovské skupiny látek řazena i antimikrobiální chemoterapeutika, jež se užívají k léčbě infekcí způsobených mikroorganismy, jako jsou například bakterie, viry či plísňe (Adam a kol. 2003).

Jelikož se experimentální část mé práce zabývá výhradně cytostatikou, následující kapitoly již budou věnovány jen těmto látkám.

2.2 Cytostatika

Jedná se o látky zpomalující či zastavující proliferaci buněk. Určitým způsobem tedy narušují průběh buněčného dělení a znemožní tak jeho dovršení. V důsledku toho může dojít až k sebezničení buněk neboli apoptóze, jedná se tedy o látky cytotoxické (Lüllmann a kol. 2012).

Upřednostňovány jsou rychle se dělící zhoubné nádorové buňky. Zdravé tkáně, jejichž frekvence dělení není až tak vysoká, jsou téměř nedotčeny. Téměř neovlivněny jsou bohužel také tumory složené z pomalu se dělících buněk. A naopak, existují i rychle se dělící zdravé tkáně, jako například buňky kostní dřeně, vlasových folikul a sliznice gastrointestinálního traktu, které jsou také cytostatikou poškozovány (LaPlant a Louzon 2014, Lüllmann a kol. 2012).

Jelikož cytostatika účinkují nespecificky, znamená to, že od sebe nerozlišují zdravé buňky a buňky nádorové. Důsledkem toho je pak možnost projevu vedlejších účinků při užívání těchto léčiv, ke kterým patří například vypadávání vlasů, zhoršené hojení

ran, poruchy trávicího ústrojí, zvracení, zvýšená náchylnost k infekcím a útlum kostní dřeně (Lüllmann a kol. 2012, Rang a kol. 2015).

Velkým problémem je také možnost vzniku rezistence vůči danému cytostatiku. Ta může vzniknout například omezením jeho vstupu do nitrobuňčného prostoru, urychlením výstupu z buňky, snížením aktivace látky na aktivní metabolit, zvýšením degradace látky na neúčinný metabolit či rychlou opravou škod způsobených cytostatikem (Martínková 2007).

2.3 Mechanismus účinku

Existuje několik způsobů, jakým mohou cytostatika zabránit buněčnému dělení a způsobit smrt buňky. Různá cytostatika využívají jiného mechanismu účinku a působí v jiné fázi buněčného dělení. V následujících podkapitolách jsou popsány jednotlivé mechanismy.

2.3.1 Inhibice biosyntézy nukleových kyselin

Je uskutečněna buďto tím, že je blokována aktivita enzymů katalyzující reakce metabolismu purinu a pyrimidinu, nebo tím, že se tato cytostatika zabudují do nukleových kyselin (LaPlant a Louzon 2014). Zabudování do DNA způsobí inhibici její replikace či indukci zlomů (Klener jr. a Klener 2013). Purinové a pyrimidinové dusíkaté báze jsou totiž stavebními jednotkami DNA, a pokud nedochází k jejich syntéze, nemůže dojít ani k syntéze DNA.

Jelikož tato cytostatika mají podobnou chemickou strukturu jako přirozené metabolity a zastavují metabolismus nukleových kyselin, jsou nazývány antimetabolity (Klener jr. a Klener 2013).

2.3.2 Poškození struktury nukleových kyselin

Podstata tohoto procesu spočívá ve změně struktury DNA, dojde tedy k jejímu poškození. Takováto molekula již nemůže sloužit jako předloha při biosyntéze nové nukleové kyseliny. Důsledkem je nemožnost průběhu replikace DNA, a tudíž ani následného dělení buňky.

K tomuto poškození může dojít alkyací, interkalací, rozštěpením molekuly DNA (radiomimetika) či inhibicí topoizomeráz (Klener jr. a Klener 2013).

2.3.3 Poškození mikrotubulů dělicího vřeténka

Stavební jednotkou dělicího vřeténka jsou mikrotubuly. Ty vznikají polymerací proteinů α -tubulinu a β -tubulinu. Během anafáze se prostřednictvím dělicího vřeténka od sebe odtáhnou zdvojené chromozomy. Působení tzv. vřeténkových jedů znemožní průběh tohoto procesu, buněčné dělení se tak v této fázi zastaví a v důsledku toho dojde k apoptóze buňky (Klener jr. a Klener 2013, Lüllmann a kol. 2012).

K poškození mikrotubulů může dojít následkem inhibice polymerace či depolymerace mikrotubulů.

2.4 Rozdělení cytostatik dle mechanismu účinku s přihlédnutím k chemické struktuře

2.4.1 Antimetabolity

Tyto látky mohou způsobit inhibici enzymů nutných k proběhnutí různých biosyntetických reakcí nukleových kyselin (LaPlant a Louzon 2014). Většinou je však nutné antimetabolity nejdříve metabolicky pozměnit, a to nejčastěji na nukleotid. V této formě se poté zabudují do nukleových kyselin (Klener jr. a Klener 2013). Největší cytotoxický účinek mají během fáze S buněčného cyklu, jedná se tedy o fázově specifická cytostatika (LaPlant a Louzon 2014).

Antimetabolity lze dle molekuly, od které jsou odvozeny, rozdělit na deriváty listové kyseliny, deriváty purinu a deriváty pyrimidinu.

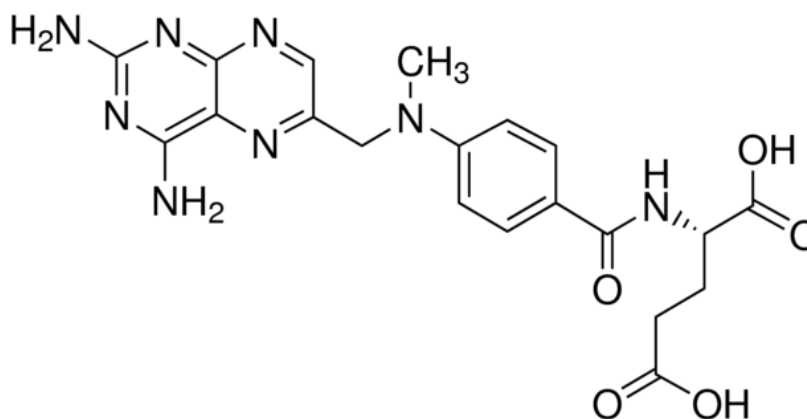
2.4.1.1 Deriváty kyseliny listové (antifoláty)

Foláty se skládají z pteridinového kruhu, zbytku kyseliny p-aminobenzoové a zbytku kyseliny glutamové. Jsou nezbytné pro syntézu purinových nukleotidů a thymidylátu, a tudíž i pro syntézu samotné DNA a dělení buňky. Uvnitř buňky dochází nejprve k jejich polyglutamaci, následně jsou redukovány na tetrahydrofolát (THF) za přítomnosti dihydrofolát reduktázy (Rang a kol. 2015). Tento a několik dalších enzymů jsou antifoláty inhibovány, čímž dojde k narušení syntézy DNA (Klener jr. a Klener 2013).

2.4.1.1.1 Methotrexát

Methotrexát neboli (2S)-2-[(4-[(2,4-diaminopteridin-6-yl)methyl](methylamino)benzoyl)amino]pentandiová kyselina (viz Obrázek 1) je nejvíce používané antifolátové cytostatikum. Do nitrobuněčného prostoru vstupuje prostřednictvím přenašečů redukovaných folátů (RFC), při vyšší koncentraci látky vně buňky dochází také k difuzi přes cytoplazmatickou membránu. Uvnitř buňky je pomocí folylpolyglutamát syntetázy přeměněn na aktivní metabolity, které inhibují dihydrofolát reduktázu, thymidylát syntázu a enzymy podílející se na syntéze purinů (Belkov a kol. 1999). Blokací enzymu dihydrofolát reduktáza dojde k prudkému snížení množství THF a jeho metabolitů, a tudíž k poruše syntézy DNA (Klener jr. a Klener 2013).

Užívá se k léčbě akutní lymfoblastické leukémie, non-Hodgkinova lymfomu, osteosarkomu, ale také k léčbě autoimunitních onemocnění, jako je například revmatoidní artritida či lupénka (Mikkelsen a kol. 2011).



Obrázek 1: Chemická struktura methotrexátu. (Převzato z [1])

2.4.1.1.2 Raltitrexed

Chemický název této látky je N-(5-[N-(3,4-dihydro-2-methyl-4-oxochinazolin-6-ylmethyl)-N-methylamino]-2-thenoyl)-L-glutamová kyselina. Působí jako inhibitor enzymu thymidylát syntáza (Wang a kol. 2006). Tento enzym katalyzuje přeměnu 2'-deoxyuridin-5'-monofosfátu na 2'-deoxythymidin-5'-monofosfát (Carreras a Santi 1995). Užívá se k léčbě karcinomu tlustého střeva (Wang a kol. 2006).

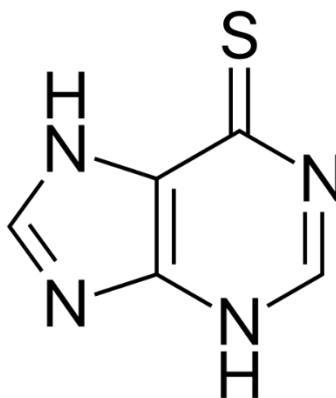
2.4.1.2 Deriváty purinu

Tyto látky se svou chemickou strukturou velmi podobají molekulám purinových bází adeninu a guaninu či molekulám jejich nukleosidů nebo nukleotidů. Proto mohou inhibovat syntézu těchto bází, či je nahradit v DNA jako falešné báze.

2.4.1.2.1 6-merkaptopurin

Jde o derivát hypoxantinu (viz Obrázek 2), ve kterém je atom kyslíku nahrazen atomem síry (LaPlant a Louzon 2014). Skrz plazmatickou membránu se dostává prostřednictvím transportních proteinů (Zaza a kol. 2010). V buňce je za přítomnosti hypoxantin-guanin fosforibosyl transferázy přeměněn na nukleotid 6-thioinosin-5'-monofosfát (TIMP), jenž inhibuje několik enzymů katalyzujících syntézu purinových nukleotidů. Fosforylací TIMP vzniká 6-thioinosin-5'-trifosfát, který se může včlenit do RNA a DNA (Chu a Sartorelli 2012).

TIMP může být také přeměněn na 6-thioguanosin-5'-monofosfát, který se po fosforylaci na difosfát a trifosfát může zabudovat do RNA. Deoxyribonukleotidová forma 6-thio-2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát se může včlenit do DNA. Užívá se k léčbě akutní lymfoblastické leukémie a také k léčbě Crohnovy choroby (LaPlant a Louzon 2014).



Obrázek 2: Chemická struktura 6-merkaptopurinu. (Převzato z [2])

2.4.1.2.2 Fludarabin

Před vstupem do nitrobuňčného prostoru podstupuje fludarabin-5'-monofosfát neboli 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenin-5'-monofosfát defosforylaci pomocí plazmatických fosfatáz na fludarabin, jenž je poté transportován do buňky prostřednictvím nukleosidových transportérů (Fernández-Calotti a kol. 2012, Klener jr. a Klener 2013).

Uvnitř buňky je fosforylován znovu na fludarabin-5'-monofosfát za přítomnosti deoxycytidin kinázy. Nakonec je přeměněn na fludarabin-5'-trifosfát, který inhibuje DNA polymerázu α a DNA polymerázu β a také může být včleněn do DNA. Fludarabin-5'-difosfát navíc inhibuje enzym ribonukleotid reduktázu (Chu a Sartorelli 2012). Primárně se užívá k léčbě chronické lymfatické leukémie (Nabi a Hohl 2009).

2.4.1.3 Deriváty pyrimidinu

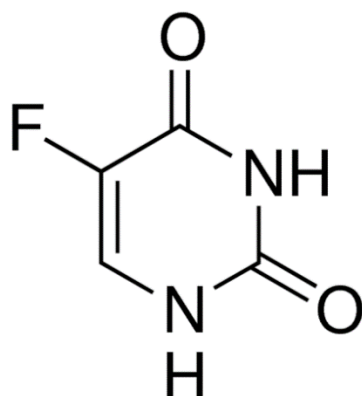
Působí stejným mechanismem jako deriváty purinu, avšak s tím rozdílem, že chemickou strukturou se podobají molekulám dusíkatých bází cytosinu, uracilu a thyminu nebo molekulám jejich nukleosidů či nukleotidů.

2.4.1.3.1 5-fluorouracil

Jde o derivát uracilu mající na pozici 5 navázaný atom fluoru (viz Obrázek 3). Z výsledků Wohlhuetera a kol. (1980) plyne, že 5-fluorouracil, stejně jako uracil, se do nitrobuněčného prostoru dostává procesem usnadněné difuze. V buňce je enzymaticky přeměněn na 5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát (FdUMP). Tento metabolit inhibuje enzym thymidylát syntázu, který katalyzuje syntézu thymidin-5'-monofosfátu potřebného pro syntézu DNA. Toto cytostatikum je také pomocí enzymů přeměněno na 5-fluorouridin-5'-trifosfát (FUTP), jenž se místo uridin-5'-trifosfátu (UTP) zabuduje do RNA (Diasio a Harris 1989, LaPlant a Louzon 2014). Navíc dochází i k přeměně 5-fluorouridin-5'-difosfátu (FUDP) v přítomnosti enzymu ribonukleotid reduktáza a následné fosforylaci za vzniku 5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-trifosfátu (FdUTP), který se včleňuje do DNA. Dochází k poškození DNA, následné zástavě replikace a k apoptóze buňky (Chu a Sartorelli 2012, Klener jr. a Klener 2013).

Užívá se kupříkladu k léčbě kolorektálního karcinomu, karcinomu jícnu, slinivky břišní, karcinomu jater a karcinomu tlustého střeva a konečníku (Chu a Sartorelli 2012).

S touto látkou souvisí cytostatikum kapecitabin, který se třemi enzymatickými procesy přeměňuje právě na 5-fluorouracil (Desmoulin a kol. 2002).



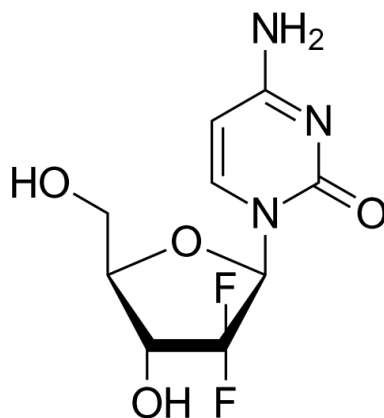
Obrázek 3: Chemická struktura 5-fluorouracilu. (Převzato z [3])

2.4.1.3.2 Gemcitabin

Gemcitabin (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin) je derivát deoxycytidinu, což je nukleosid složený z cytosinu a deoxyribózy (viz Obrázek 4). Strukturně se liší pouze tím, že gemcitabin má na cukerné části molekuly nahrazeny dva atomy vodíku dvěma atomy fluoru.

Do buňky se dostává prostřednictvím nukleosidových transportérů umístěných v plazmatické membráně (Mackey a kol. 1998). V buňce dochází k postupným fosforylacím gemcitabinu pomocí několika kináz na 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin-5'-monofosfát (dFdCMP), difosfát (dFdCDP) a nakonec i trifosfát (dFdCTP). Metabolit dFdCTP inhibuje DNA polymerázu α a DNA polymerázu β , což vede k blokaci syntézy a opravy DNA (Chu a Sartorelli 2012). Také se tento metabolit může do DNA zabudovat, což způsobí její poškození, které vede k apoptóze buňky (Ruiz van Haperen a kol. 1993). Mimo to dFdCDP inhibuje enzym ribonukleotid reduktázu, což sníží množství deoxyribonukleotidů, které jsou důležité pro syntézu DNA (Chu a Sartorelli 2012).

Nejčastěji se používá se k léčbě malobuněčného karcinomu plic a karcinomu slinivky břišní (LaPlant a Louzon 2014).



Obrázek 4: Chemická struktura gemcitabinu. (Převzato z [4])

2.4.2 Alkylační cytostatika

Název této třídy látek je dán jejich schopností kovalentně navázat alkylové zbytky na konkrétní nukleofilní centra v buňce (Rang a kol. 2015). Takováto místa lze nalézt i v molekulách dusíkatých bází tvořící dvoušroubovici DNA, jejíž alkylace vede ke smrti buňky. Hlavním místem alkylace DNA je atom dusíku v poloze 7 v molekule guaninu. V menší míře taktéž dochází k alkylování dusíku v poloze 1 a 3 v molekule adeninu, dusíku v poloze 3 v molekule cytosinu a kyslíku v poloze 6 v guaninu (Chu a Sartorelli 2012).

Monofunkční látky se mohou vázat pouze na jedno místo molekuly DNA. Většina alkylačních cytostatik jsou však látky bifunkční, obsahují tedy dvě reaktivní skupiny, a mohou tudíž vytvářet i příčné vazby mezi dvěma bázemi. Tyto vazby jsou buď vnitřetězcové, tedy v rámci jednoho vlákna dvoušroubovice, nebo meziřetězcové, kdy v daném místě molekuly dojde k propojení obou vláken, což znemožní průběh replikace DNA (Rang a kol. 2015).

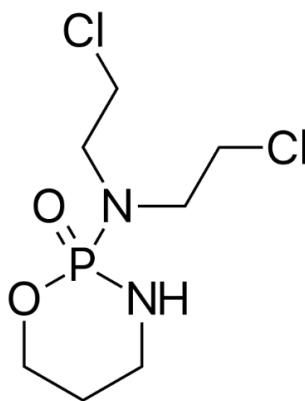
Alkylace guaninu může vést například k chybnému spárování guaninu s thyminem, nebo ke konfiguračním změnám DNA vedoucím k rozštěpení vláken. Přestože jsou tato cytostatika fázově nespecifická, buňky jsou nejcitlivější na alkylování během pozdní G₁ fáze a S fáze buněčného cyklu.

Nejvíce klinicky užívaná alkylační cytostatika obsahují ve své struktuře bis-[chloroethyl]amin, ethylenimin nebo nitrosomočovinu (Chu a Sartorelli 2012).

2.4.2.1 Cyklofosfamid

Jde o bifunkční derivát oxazafosforinu (viz Obrázek 5), jehož cytotoxicita spočívá v tvorbě meziřetězcových vazeb. V játrech dochází k jeho hydroxylaci působením cytochromu P450 na meziproduct 4-hydroxycyklofosfamid, jenž se neenzymaticky štěpí na aktivní metabolity, kterými jsou hořčičný fosfamid a akrolein.

Užívá se k léčbě lymfomů, leukémií, sarkomů a karcinomu prsu (Holstein a Hohl 2009, LaPlant a Louzon 2014, Pavelka a kol. 2005).



Obrázek 5: Chemická struktura cyklofosfamidu. (Převzato z [5])

2.4.2.2 Deriváty nitrosomočoviny

Jejich cytotoxický účinek spočívá v propojení obou vláken dvoušroubovice DNA. V organismu jsou tyto deriváty neenzymatickým rozkladem přeměněny na aktivní metabolity s alkylačními účinky. Jelikož se tyto látky velmi dobře rozpouštějí v tucích, snadno se dostanou skrz hematoencefalickou bariéru, a tudíž jsou užívány k léčbě mozkových nádorů (Chu a Sartorelli 2012). Mezi tyto deriváty patří například látky karmustin a lomustin.

2.4.3 Deriváty platiny

Jedná se o koordinační sloučeniny, jejichž centrálním atomem je platina. Působí podobným mechanismem jako alkylační látky, přestože nemají alkylové skupiny, kterými by se mohly na molekulu DNA navázat. Jakožto bifunkční látky mají schopnost se vázat k jednomu či ke dvěma nukleofilním místům dvoušroubovice DNA. Mohou tedy vytvářet i příčné vazby, a to jak vnitřetězcové, tak meziřetězcové (LaPlant a Louzon 2014). Mezi deriváty platiny patří látky cisplatina, karboplatina a oxaliplatina, která se užívá k léčbě karcinomu žaludku, jícnu, slinivky břišní a kolorektálního karcinomu (Chu a Sartorelli 2012).

2.4.3.1 Cisplatina

Cisplatina je prvním objeveným derivátem platiny s protinádorovým účinkem. Na její centrální atom jsou navázány dva atomy chloru a dvě NH_3 skupiny (Rang a kol. 2015). Po vstupu do buňky dochází k odštěpení chloridových aniontů, čímž vzniká reaktivní komplex reagující s molekulami vody a následně také s DNA, přičemž dochází k tvorbě příčných vazeb mezi guaninovými bázemi (LaPlant a Louzon 2014, Rang a kol. 2015).

Rosenberg a kol. (1965) objevili její cytotoxické působení, když zkoumali účinky elektrického pole na růst bakterie *Escherichia coli* užitím platinových elektrod. Jejich dělení bylo však inhibováno.

Jde o velmi účinné cytostatikum užívané k léčbě karcinomu vaječníků, močového měchýře, žaludku, jícnu, malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic a dalších chorob (Chu a Sartorelli 2012). Během léčby je však nutná hydratace pacienta a patřičné zajištění vylučování moči, jelikož se jedná o silně nefrotoxickou látku (Martínková 2007).

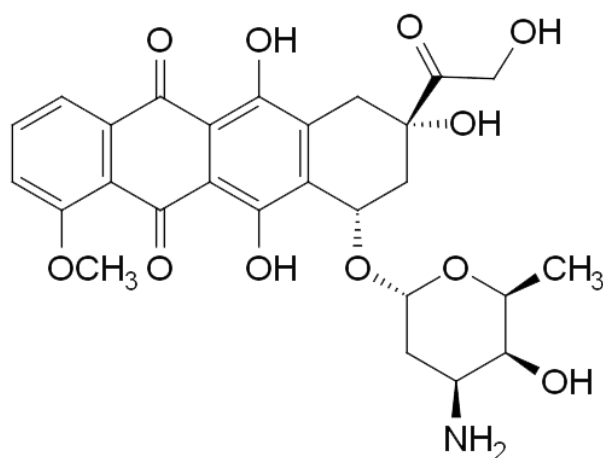
2.4.3.2 Karboplatina

Z hlediska chemické struktury se tato látka od cisplatiny liší tím, že místo chloridových ligandů má na centrální atom navázanu cyklobutan-1,1-dikarboxylovou kyselinu (Treskes a kol. 1991). Má podobné využití jako cisplatina, avšak s mírnějším projevem nefrotoxicity, neurotoxicity, ototoxicity a dalších vedlejších účinků (Rang a kol. 2015).

2.4.4 Interkalátory

Interkalátory jsou malé molekuly, které se vmezeří mezi páry dusíkatých bází dvoušroubovice DNA (Lerman 1961). Molekuly se na dusíkaté báze vážou vodíkovými můstky, což vede k inhibici replikace a transkripce DNA (Klener jr. a Klener 2013). Takovýto účinek mají například antracyklinová cytostatika, která kromě interkalace působí také jako inhibitory topoizomerázy II a podílejí se na tvorbě reaktivních forem kyslíku. Tvorba volných radikálů je příčinou kardiotoxicity těchto látek. Mezi antracykliny patří daunorubicin, epirubicin a také doxorubicin (viz Obrázek 6), který se užívá k léčbě karcinomu plic, prsu, štítné žlázy, neuroblastomu,

non-Hodgkinova a Hodgkinova lymfomu a mnohočetného myelomu (Chu a Sartorelli 2012).



Obrázek 6: Chemická struktura doxorubicinu. (Převzato z [6])

2.4.5 Inhibitory topoizomerázy I a topoizomerázy II

Aby mohla být nová DNA syntetizována, musí napřed dojít k rozpletení dvoušroubovice. To je zprostředkované enzymem helikáza, která svým působením ruší vodíkové vazby mezi dusíkatými bázemi tvořící dvoušroubovici. Důsledkem tohoto procesu je nárůst napětí v nerozpletené části dvoušroubovice. Aby se toto napětí uvolnilo, dochází ke stáčení dvoušroubovice, čímž vzniká takzvaný superhelix (Alberts a kol. 2008). Aby nedošlo ke zlomům jednoho či obou vláken DNA, je nezbytné napětí uvolňovat opakovaně.

Toto je zajišťováno enzymem topoizomeráza, která se kovalentní vazbou naváže na fosfátovou kostru molekuly DNA a rozruší fosfodiesterovou vazbu, čímž dojde k rozpojení vlákna. Enzym uvolní část napětí a vlákno poté znovu spojí. Zatímco topoizomeráza typu I rozštěpuje pouze jedno vlákno DNA, topoizomeráza typu II se kovalentně váže na obě vlákna DNA současně a štěpí je (Alberts a kol. 2008, Klener jr. a Klener 2013).

Inhibice tohoto enzymu znemožní opětovné spojení vláken dvoušroubovice a vzniklé zlomy v molekule mají za následek smrt buňky (Klener jr. a Klener 2013, Lüllmann a kol. 2012).

Jedním z představitelů inhibitorů topoizomerázy I je kamptotecin. Jde o přírodní alkaloid s chinolinovým cyklem izolovaný z kůry stromu *Camptotheca acuminata*.

Irinotekan a topotekan jsou jeho polosyntetické deriváty. Topotekan se užívá k léčbě karcinomu vaječníku a malobuněčného karcinomu plic. Irinotekan se používá k léčbě kolorektálního karcinomu

Mezi inhibitory topoizomerázy II patří například látka etoposid. Jedná se o polosyntetický derivát podofylotoxinu, který se extrahuje z kořene *Podophyllum peltatum*. Užívá se k léčbě malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic, non-Hodgkinova a Hodgkinova lymfomu a karcinomu žaludku (Chu a Sartorelli 2012, LaPlant a Louzon 2014).

2.4.6 Cytostatika s radiomimetickým účinkem

Látky s tímto účinkem způsobují stejné poškození molekuly DNA, jako vyvolává vystavení této molekuly ionizujícímu záření. Patří mezi ně glykopeptidové antibiotikum bleomycin izolované z bakterie *Streptomyces verticillus* (Klener jr. a Klener 2013). Jeho účinek spočívá ve fragmentaci vláken dvoušroubovice DNA vlivem působení reaktivních forem kyslíku na fosfodiesterovou vazbu v DNA. Užívá se k léčbě non-Hodgkinova a Hodgkinova lymfomu karcinomu varlat a děložního hrdla (Chu a Sartorelli 2012).

2.4.7 Inhibitory polymerace mikrotubulů (vinca alkaloidy)

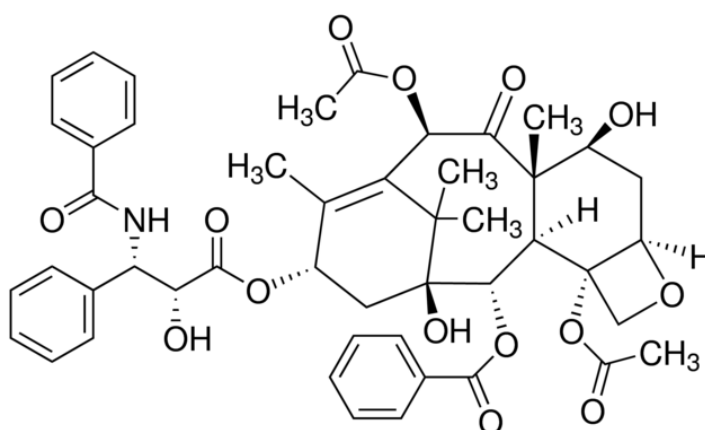
Vinca alkaloidy jsou dimerní indolové alkaloidy složené ze dvou prekurzorů, katarantinu a vindolinu, obsažených v barvínkovci růžovém (*Vinca rosea*). Jedni z představitelů této skupiny jsou vinblastin a vinkristin, které lze také přímo izolovat z výše uvedené rostliny (Hirata a kol. 1994). Vinblastin se používá k léčbě non-Hodgkinova a Hodgkinova lymfomu, karcinomu prsu a Kaposiho sarkomu, kdežto vinkristin má své využití při léčbě akutní lymfoblastické leukémie, nefroblastomu a neuroblastomu (Chu a Sartorelli 2012). Mezi polosyntetické deriváty patří například vindezín a vinflunin.

Cytotoxický účinek vinca alkaloidů spočívá v navázání se na tubulin, čímž dojde k inhibici polymerace mikrotubulů, což zabrání tvorbě dělicího vřeténka, jehož existence je potřebná k oddělení chromozomů. To způsobí zástavu mitózy během metafáze, zástavu buněčného dělení a nakonec smrt buňky (Chu a Sartorelli 2012, Nabi a Hohl 2009).

2.4.8 Inhibitory depolymerace mikrotubulů

Látky způsobující inhibici depolymerace se nazývají taxany. Navážou se na mikrotubuly, urychlují jejich polymeraci a stabilizují vazbu mezi jednotlivými molekulami tubulinu. Hromadění nefunkčních atypických mikrotubulů způsobí, že nedojde k oddělení chromozomů. Výsledkem je inhibice mitózy a následná buněčná smrt (Chu a Sartorelli 2012, LaPlant a Louzon 2014).

Jednou z látek stabilizujících mikrotubuly je paklitaxel (viz Obrázek 7). Jde o alkaloid izolovaný z kůry tisu západoevropského (*Taxus brevifolia*) a tisu červeného (*Taxus baccata*) užívaný k léčbě nemalobuněčného a malobuněčného karcinomu plic, karcinomu prsu, prostaty a jícnu. Dalším alkaloidem ze třídy taxanů je docetaxel, který je získáván z jehličí tisu červeného. Dnes se oba alkaloidy vyrábějí polosynteticky (Chu a Sartorelli 2012, Martínková 2007).



Obrázek 7: Chemická struktura paklitaxelu. (Převzato z [7])

3 Cíl práce

Jedním z cílů mé bakalářské práce je přehledně popsat chemoterapeutika z hlediska jejich chemické struktury a biologických účinků. Experimentální cíl práce spočívá v proměření základních absorpčních a fluorescenčních charakteristik vybraných látek. Dále je mým cílem diskutovat výsledky z hlediska citlivosti naměřených parametrů na vliv okolního prostředí.

4 Materiál a metody

Mezi analyzované látky patří doxorubicin hydrochlorid, 5-fluorouracil, gemcitabin hydrochlorid a 6-merkaptopurin monohydrát. Všechny byly zakoupeny od výrobce Sigma-Aldrich s čistotou vyšší než 98 %. Jelikož bylo měření prováděno pro širokou škálu pH, byl použit Britton-Robinsonův pufr. Jedná se o univerzální vícesložkový pufr skládající se z 0,04 M kyseliny borité (lach:ner; 99,5 %), z 0,04 M kyseliny trihydrogenfosforečné (lach:ner, 85%) a z 0,04 M kyseliny octové (lach:ner; 99,8%). Jako rozpouštědlo byla použita destilovaná voda.

Hodnota pH připraveného pufru byla upravována přikapáváním 0,2 M hydroxidu sodného (Sigma-Aldrich, ≥ 98 %), a to v rozmezí pH od 2 do 11 s krokem 0,5. K měření byl použit pH metr inoLab pH7110 (WTW, Weilheim in Oberbayern, Německo), jenž byl před užitím podle návodu kalibrován.

4.1 Měření absorpčních spekter

Absorpční spektra 2,5 μM roztoku doxorubicinu a 5 μM roztoku fluorouracilu, gemcitabinu a merkaptopurinu v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm byla měřena na absorpčním spektrofotometru SPECORD 250 PLUS – 223G1032 (Analytik Jena, Jena, Německo) pro pH Britton-Robinsonova pufru v rozmezí od 2 do 11 a krokem 0,5. Jako reference byl užit čistý pufr příslušného pH. Spektra byla měřena s krokem 1 nm, rychlostí 2 nm/s a v rozsahu vlnových délek 200-700 nm pro doxorubicin a 200-500 nm pro ostatní analyzované látky. Šířka spektrálního pásu monochromátoru byla nastavena na 1 nm.

Molární extinkční koeficient $\varepsilon(\lambda)$ byl vypočten ze vztahu

$$\varepsilon(\lambda) = \frac{A(\lambda)}{c \cdot l}, \quad (1)$$

kde $A(\lambda)$ představuje změřenou absorbanci, c je koncentrace látky a l značí optickou dráhu (Kubala a kol. 2011).

4.2 Měření emisních spekter

Měření emisního spektra předcházela volba excitačních vlnových délek, které byly pro každou látku různé. Vlnové délky excitace byly voleny na základě absorpčního spektra látky, přičemž byly zvoleny vlnové délky 450, 480, 550 a 595 nm pro doxorubicin, 268, 283 a 310 nm pro fluorouracil, 235, 269, 275 a 286 nm pro gemcitabin a 290, 313, 316, 324 a 350 nm pro merkaptopurin. Měření bylo opět provedeno v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm pro stejné hodnoty pH pufru jako v případě spekter absorpčních. Signál čistého pufru o dané hodnotě pH byl odečten jako pozadí. K měření spektra 5 μM roztoku fluorouracilu, gemcitabinu a merkaptopurinu byl použit spektrofluorometr Fluorolog-3 (HORIBA Scientific, Longjumeau, Francie). Z důvodu dočasné poruchy tohoto přístroje bylo spektrum 2,5 μM roztoku doxorubicinu změřeno na spektrofluorimetru F-4500 (Hitachi, Tokyo, Japonsko). Šířka spektrálního pásu excitačního a emisního monochromátoru byla u obou přístrojů nastavena na 5 nm, rychlost měření na 5 nm/s a krok na 1 nm.

Závislost intenzity fluorescence F na pH byla proložena křivkou danou rovnicí

$$F = F_B - \frac{F_B - F_A}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}}, \quad (2)$$

kde F_A a F_B označují postupně intenzitu fluorescence kyselých a zásaditých forem molekuly a pK_a představuje záporný dekadický logaritmus rovnovážné acidobazické konstanty (Kubala a kol. 2011). Nahradíme-li intenzitu fluorescence absorbcí A , lze upravený vztah užít i pro určení pK_a z absorpčního spektra. Platí tedy, že

$$A = A_B - \frac{A_B - A_A}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}}, \quad (3)$$

kde A_A a A_B představují postupně absorbcí kyselých a zásaditých forem molekuly.

5 Výsledky

Dle parametrů uvedených v metodice měření byla proměřena absorpční a fluorescenční spektra analyzovaných chemoterapeutik. Užitím vztahu (1) byly vypočteny hodnoty molárního extinkčního koeficientu. Dále byla proložením závislosti intenzity fluorescence na pH (při dané vlnové délce) křivkou ve tvaru rovnice (2) a proložením závislosti absorbance na pH (při dané vlnové délce) křivkou o rovnici (3) určena hodnota pK_a . Jednotlivá spektra jsou uvedena v následujících podkapitolách.

5.1 Doxorubicin

5.1.1 Absorpční spektrum

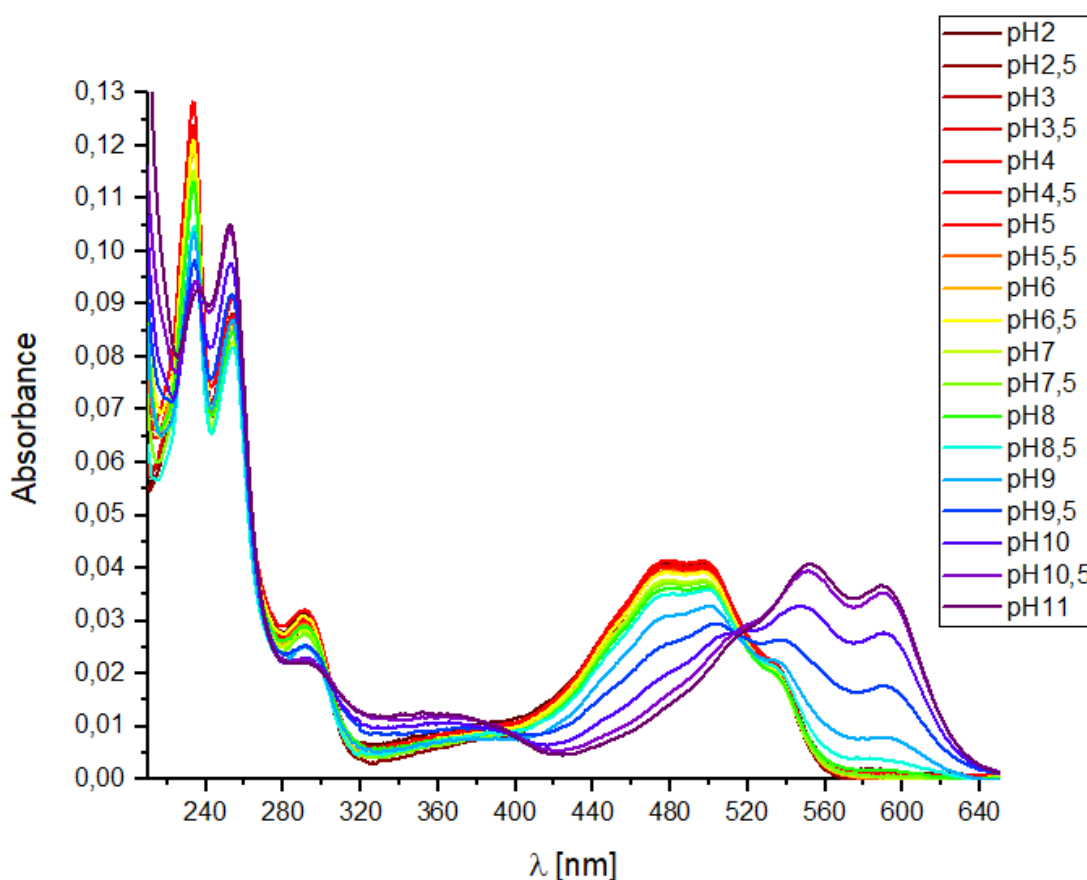
Spektrum vykazuje několik maxim v měřeném rozsahu vlnových délek (viz Obrázek 8). V ultrafialové spektrální oblasti se maximum vyskytuje při 233 nm ($\varepsilon = 50900 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 4 a $\varepsilon = 45700 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 7), přičemž pro $\text{pH} \geq 8,5$ dochází k bathochromnímu posunu maxima (236 nm při pH 11). Další maximum lze pozorovat při 254 nm ($\varepsilon = 36300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 4 a $\varepsilon = 33000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 7), pro $\text{pH} \geq 9$ dochází k malému hypsochromnímu posunu (252 nm při pH 11). Následuje maximum při vlnové délce 291 nm ($\varepsilon = 12800 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 4 a $\varepsilon = 11300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 7), kdy v rozmezích pH 4 – 11 absorbance s rostoucím pH klesá.

Ve viditelné oblasti spektra je pro pH 2 – 8 dominantní pás v oblasti 400 – 550 nm se dvěma hlavními maximy na 478 nm a 497 nm ($\varepsilon = 16500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 4 a $\varepsilon = 15100 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 7), jedním menším maximem okolo 530 nm ($\varepsilon = 9200 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 4 a $\varepsilon = 8300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 7) a zřetelným ramenem okolo 440 nm. Pro vyšší pH se celý pás bathochromně posunuje a kromě ramena okolo 520 nm můžeme identifikovat dva hlavní píky okolo 552 nm ($\varepsilon = 2900 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 7 a $\varepsilon = 12900 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 10) a 590 nm ($\varepsilon = 400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 7 a $\varepsilon = 11100 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 10).

Dále lze z grafu vyčíst, že v oblasti od 303 nm do 395 nm a v oblasti od 516 nm se s rostoucím pH absorbance zvyšuje, a naopak v oblasti od 395 nm do 516 nm dochází se zvyšujícím se pH k poklesu absorbance.

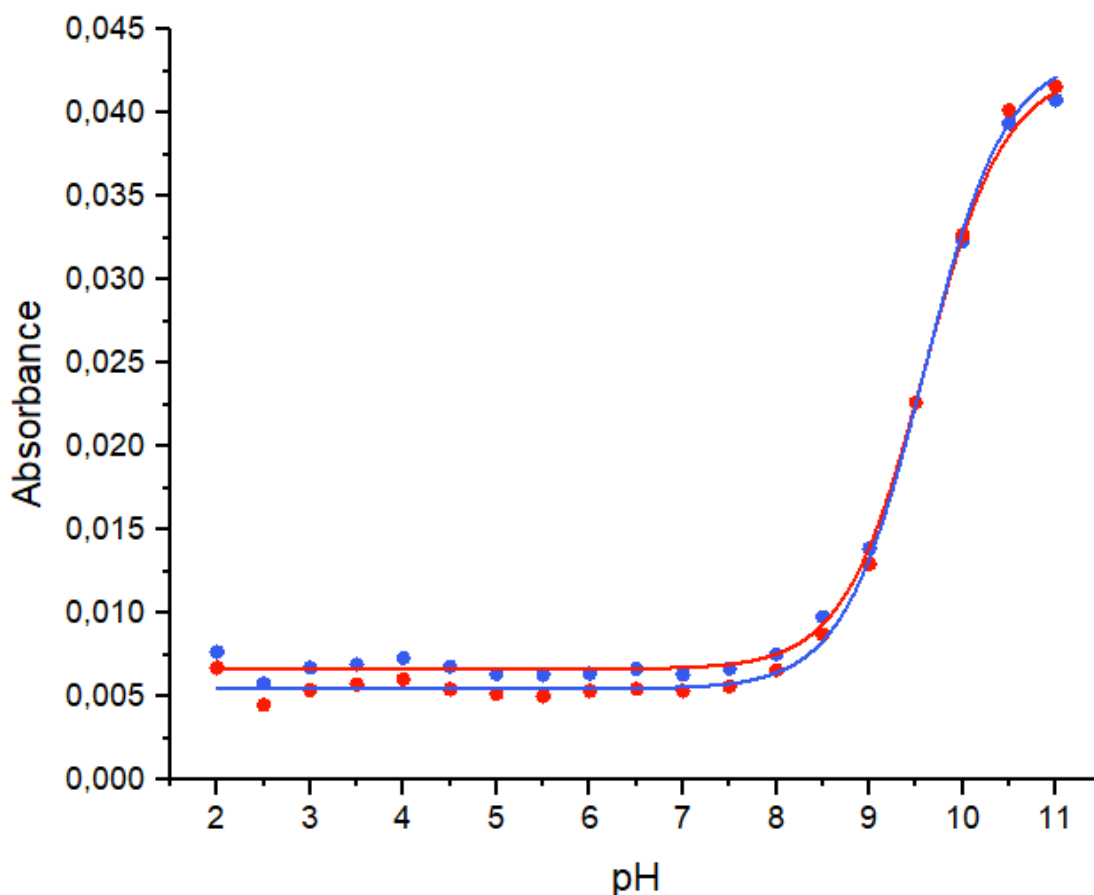
Na vlnových délkách 303 nm a 516 nm se nachází izobestický bod, což indikuje, že spektrální změny v této oblasti jsou dány přechodem pouze mezi dvěma formami molekuly. V případě oblasti okolo vlnové délky 395 nm se křivky příslušející různým hodnotám pH neprotnulý v jednom bodě, nýbrž v několika, a situace je tedy patrně složitější.

Doxorubicin měl v prostředí s pH 2 – 9,5 oranžové zbarvení, při vyšším pH došlo ke zbarvení látky do světle fialova, což lze vyvodit i z tvaru absorpčního spektra.



Obrázek 8: Absorpční spektrum 2,5 μM roztoku doxorubicinu pro různá pH pufry.

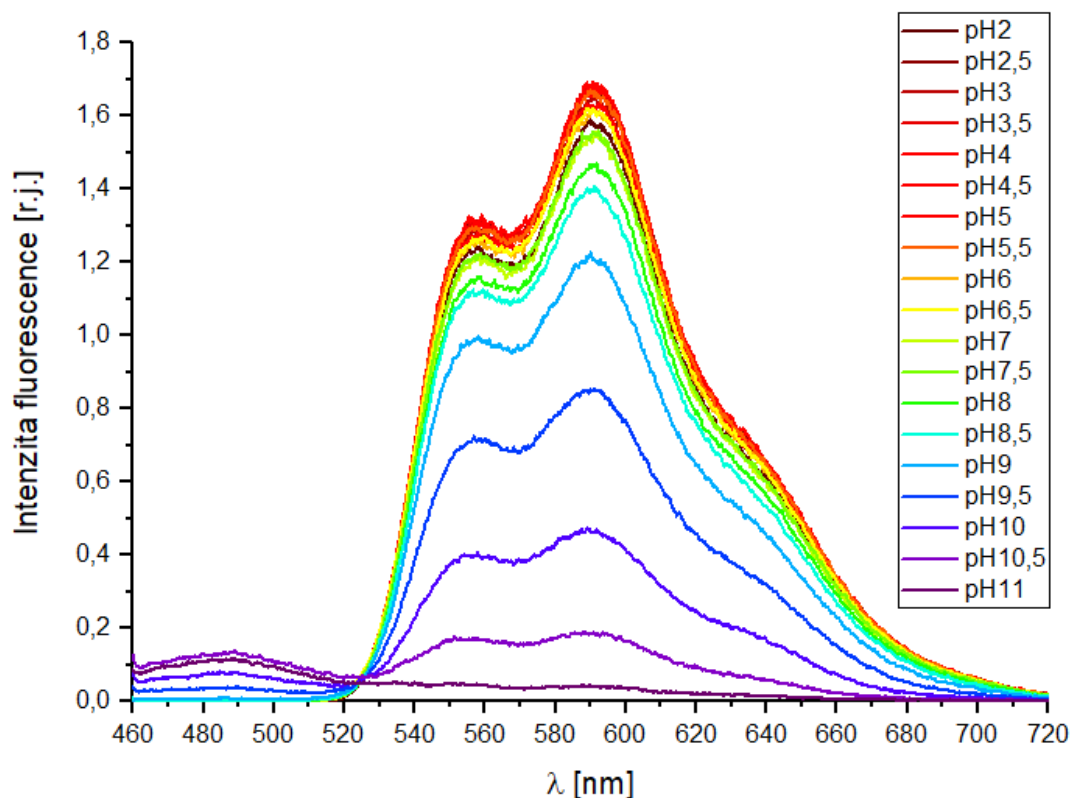
Proložením hodnot absorbance doxorubicinu na vlnové délce 552 nm (viz Obrázek 9) křivkou byla obdržena hodnota $pK_a = (9,59 \pm 0,02)$. Je zřejmé, že se zde projevuje pouze přechod mezi dvěma formami molekuly. Stejným případem je i vlnová délka 590 nm (viz Obrázek 9).



Obrázek 9: Grafy závislosti absorbance při 552 nm (modré body, oranžová křivka) a při 590 nm (oranžové body, modrá křivka) na pH pufru proložené křivkou dle rovnice (3).

5.1.2 Emisní spektrum

V emisním spektru doxorubicinu jsou viditelná tři intenzitní maxima (viz Obrázek 10). Okolo vlnové délky 488 nm lze pozorovat maximum pro $\text{pH} \geq 8$, přičemž dochází k nárůstu intenzity fluorescence se zvyšující se hodnotou pH. Výjimkou je pH 11. Další maxima se vyskytují na vlnových délkách 558 nm a 591 nm. V oblasti od 525 nm intenzita fluorescence naopak s rostoucím pH klesá, uvedená vlnová délka je izoemisním bodem v měřeném rozsahu pH kromě pH 11.



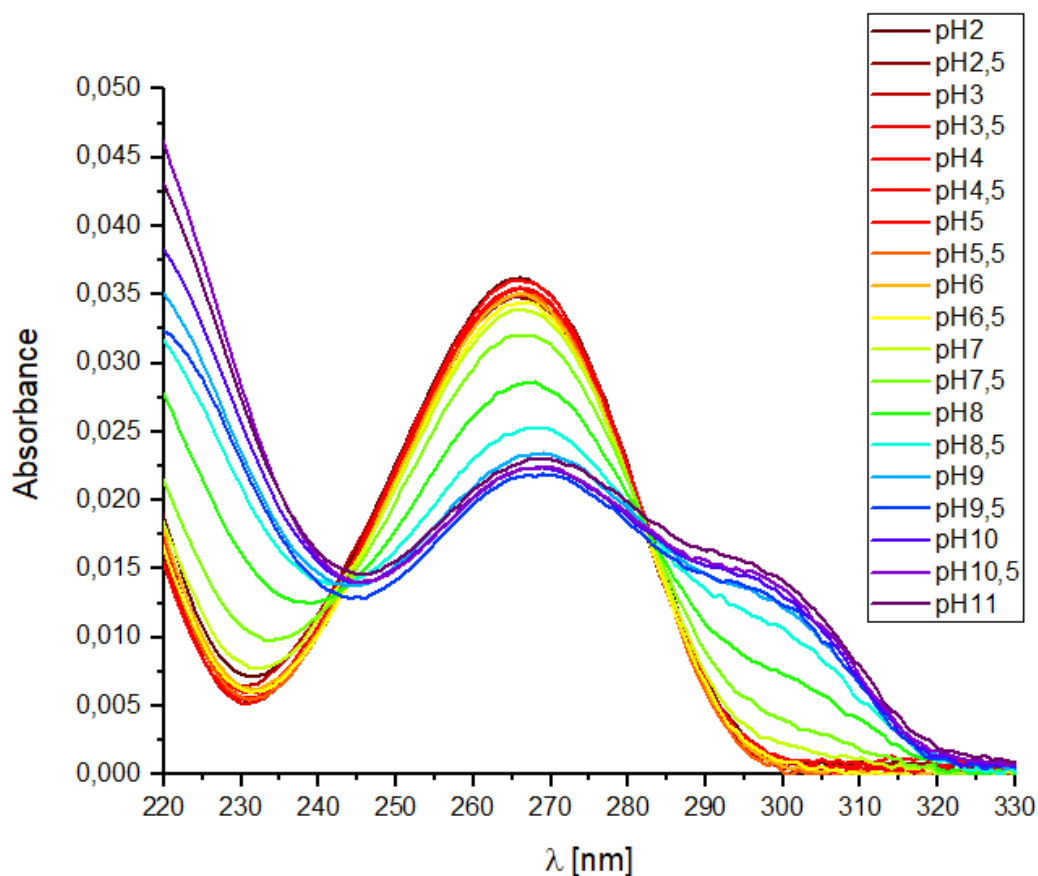
Obrázek 10: Emisní spektrum 2,5 μM roztoku doxorubicinu při excitaci světlem o vlnové délce 480 nm pro různá pH pufru.

5.2 5-fluorouracil

5.2.1 Absorpční spektrum

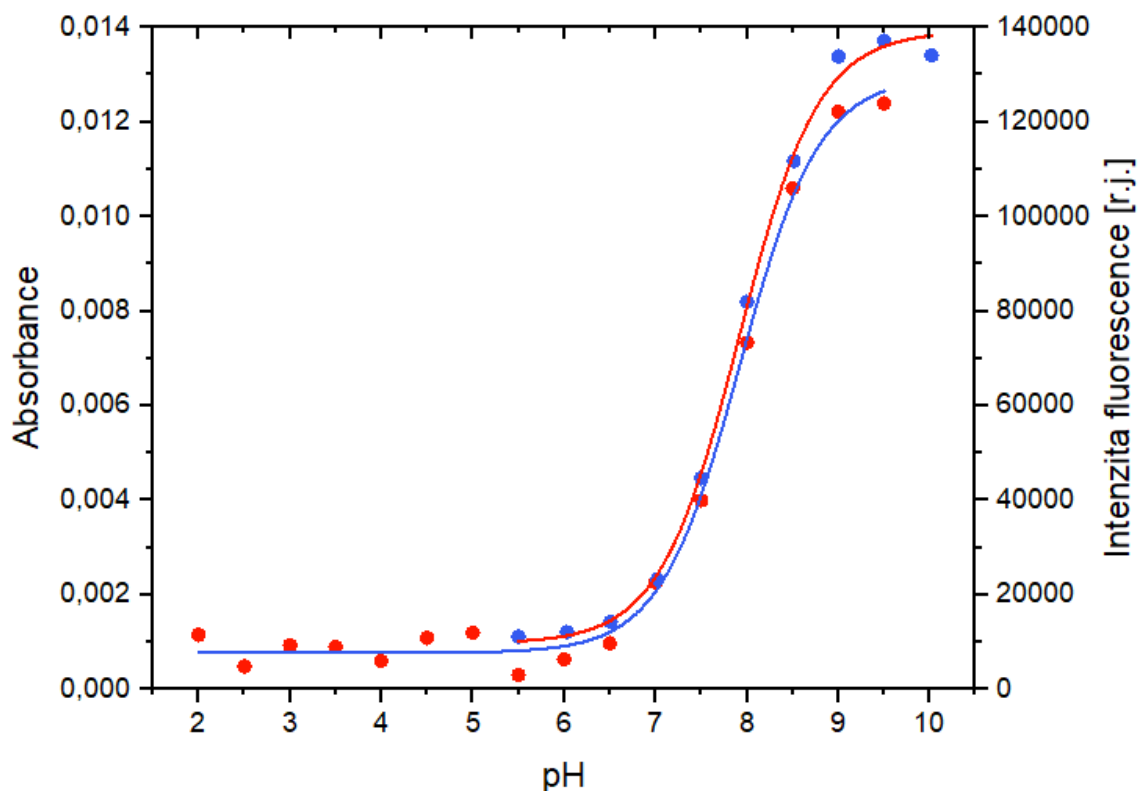
Ve spektru můžeme pozorovat pouze jedno maximum nacházející se na vlnové délce 266 nm ($\varepsilon = 7100 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 4) pro kyselá pH, u zásaditých pH dochází k jeho posunu k vyšším vlnovým délkám, kdy pro pH 11 se maximum vyskytuje při 269 nm ($\varepsilon = 4600 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), a dále se objevuje pás s maximem okolo 300 nm (viz Obrázek 11).

Vidíme také, že ve spektrální oblasti od 244 nm do 282 nm dochází s rostoucím pH k poklesu absorbance, nicméně pro pH od 10 do 11 absorbance vzrůstá. Naopak v oblasti od 282 nm se se zvyšujícím se pH zvyšuje i hodnota absorbance. Ve viditelné oblasti spektra látka světlo neabsorbuje. V měřeném rozsahu vlnových délek se nenachází žádný izobestický bod.



Obrázek 11: Absorpční spektrum 5 μM roztoku 5-fluorouracilu pro různá pH pufru.

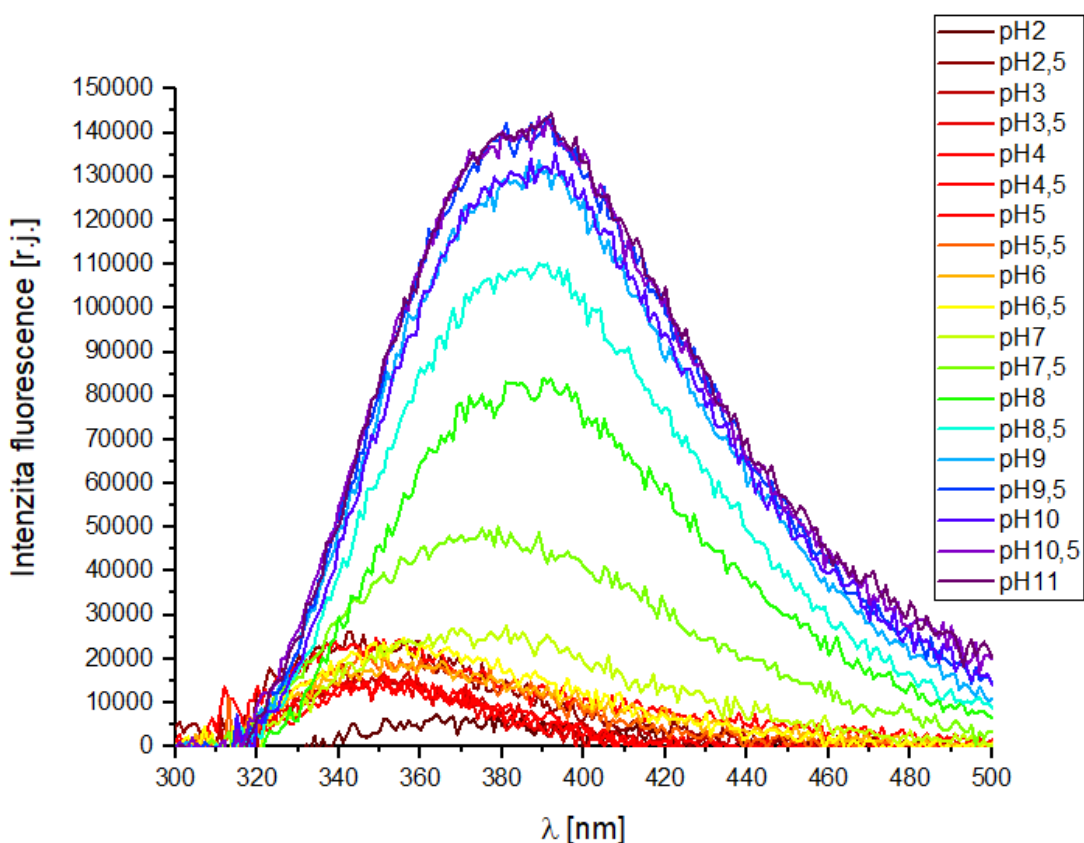
Proložením hodnot absorbance 5-fluorouracilu na vlnové délce 300 nm (viz Obrázek 12) křivkou byla získána hodnota $\text{pK}_a = (7,92 \pm 0,04)$. Tento výsledek potvrzuje i fit v emisním spektru na vlnové délce 389 nm (viz Obrázek 12). Z dat je navíc patrné, že okolo pH 10 se nachází další přechod, nicméně pro provedení fitu nemáme dostatečný počet bodů.



Obrázek 12: Grafy závislosti absorbance při 300 nm (oranžové body, modrá křivka) a intenzity fluorescence při 389 nm (modré body, oranžová křivka) na pH pufru proložené křivkou dle rovnic (2) a (3).

5.2.2 Emisní spektrum

Pro pH od 2,5 do 5,5 se maximum intenzity fluorescence nachází na vlnové délce 349 nm, poté se bathochromně posunuje, až nakonec pro pH od 9 do 11 se maximum intenzity vyskytuje při 389 nm (viz Obrázek 13). U zásaditých pH si lze povšimnout, že intenzita fluorescence roste se zvyšujícím se pH. Stokesův posuv je pro kyselá pH přibližně roven 83 nm, u zásaditých pH se jedná zhruba o hodnotu 88 nm.



Obrázek 13: Emisní spektrum 5 µM roztoku 5-fluorouracilu při excitaci světlem o vlnové délce 283 nm pro různá pH pufru.

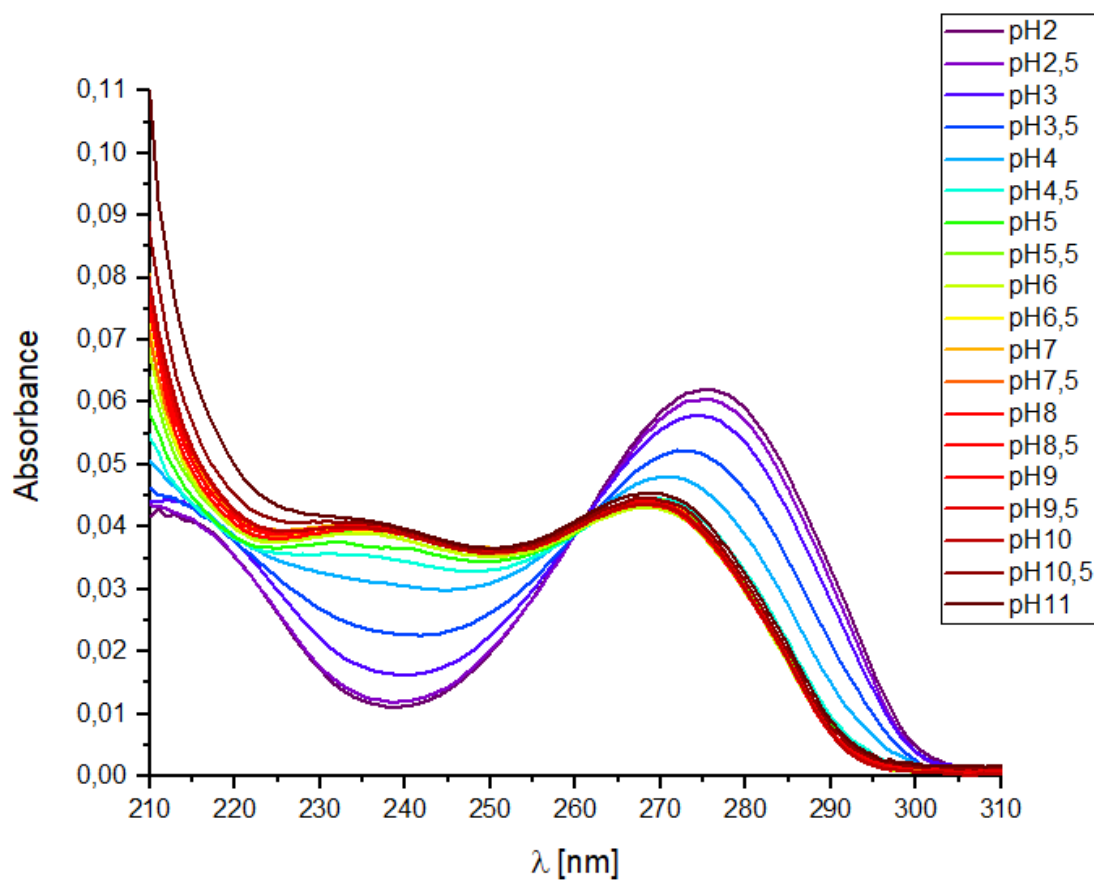
5.3 Gemcitabin

5.3.1 Absorpční spektrum

V rozmezí pH od 5,5 do 10 vidíme plytké maximum při 234 nm ($\epsilon = 8100 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 7). Hlavní absorpční pás se pro pH od 5 do 11 nachází na vlnové délce 268 nm ($\epsilon = 8900 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 7), pro nižší pH dochází k posunu maxima k vyšším vlnovým délkám (viz Obrázek 14), kdy maximum pro pH 2 je při 275 nm ($\epsilon = 12400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Ve viditelné oblasti spektra nedochází k absorpci světla vzorkem.

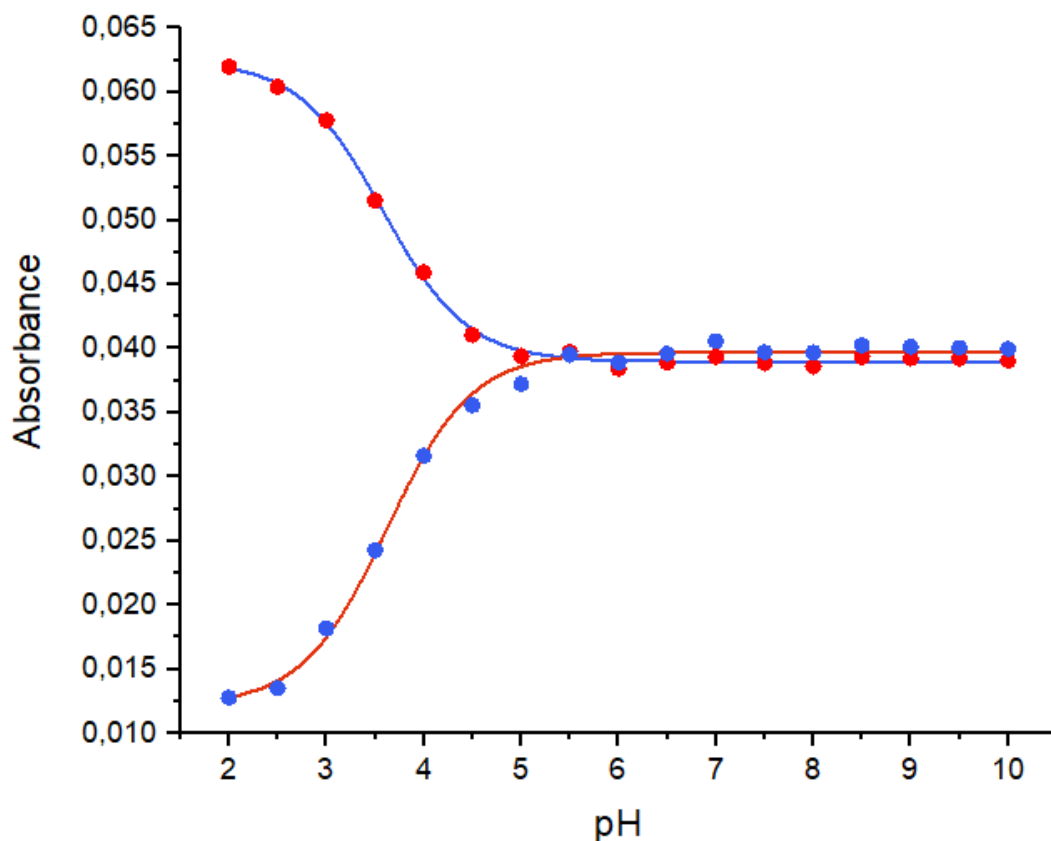
Z grafu můžeme vyčíst, že v oblasti do 261 nm dochází k poklesu absorbance s klesající hodnotou pH, a naopak v oblasti od 261 nm nastává jev opačný až na pH 11, u kterého se absorbance zvýšila. Na vlnové délce 261 nm se nachází izobestický bod.

Emisní spektrum gemcitabinu zde není uvedeno proto, že tato látka nevykazuje fluorescenci.



Obrázek 14: Absorpční spektrum 5 μM roztoku gemcitabinu pro různá pH pufru.

Proložením hodnot absorbance gemcitabinu na vlnové délce 234 nm (viz Obrázek 15) křivkou byla získána hodnota $pK_a = (3,62 \pm 0,04)$. Obdobného výsledku bylo dosaženo z absorbancí na vlnové délce 275 nm (viz Obrázek 15), kdy hodnota $pK_a = (3,58 \pm 0,03)$.



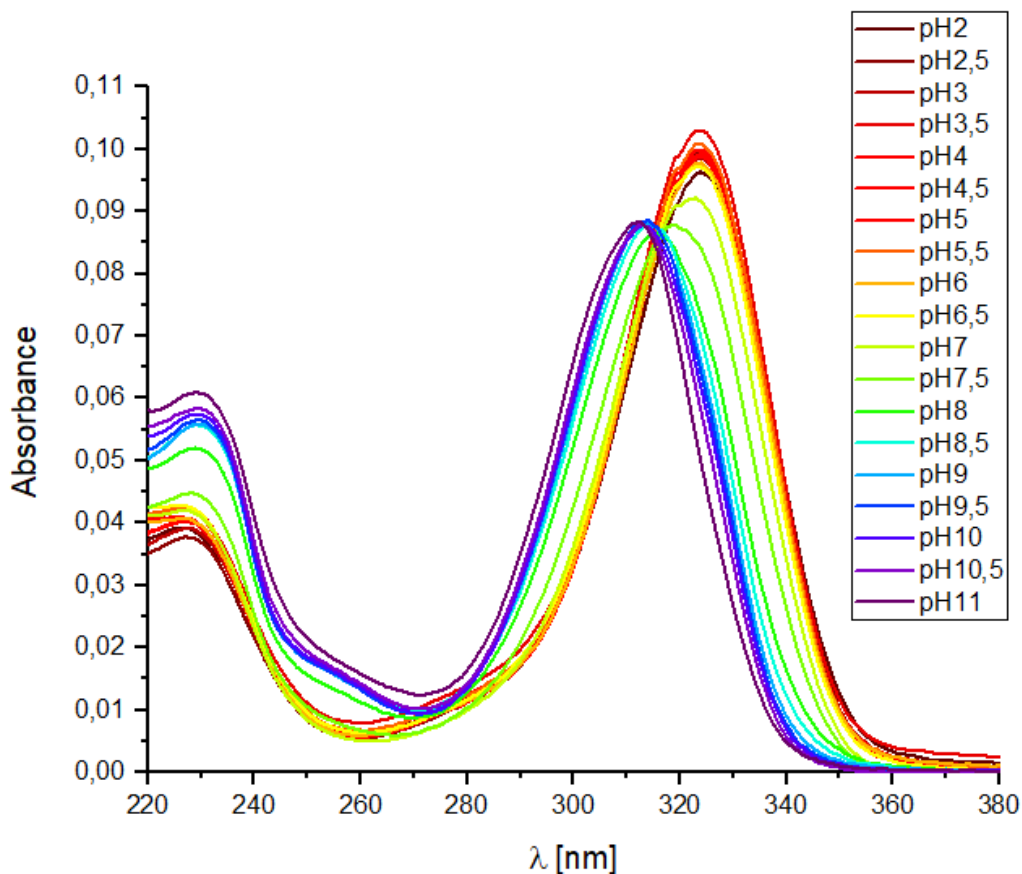
Obrázek 15: Grafy závislosti absorbance při 234 nm (modré body) a při 275 nm (oranžové body) na pH pufru proložené křivkou dle rovnice (3).

5.4 6-merkaptopurin

5.4.1 Absorpční spektrum

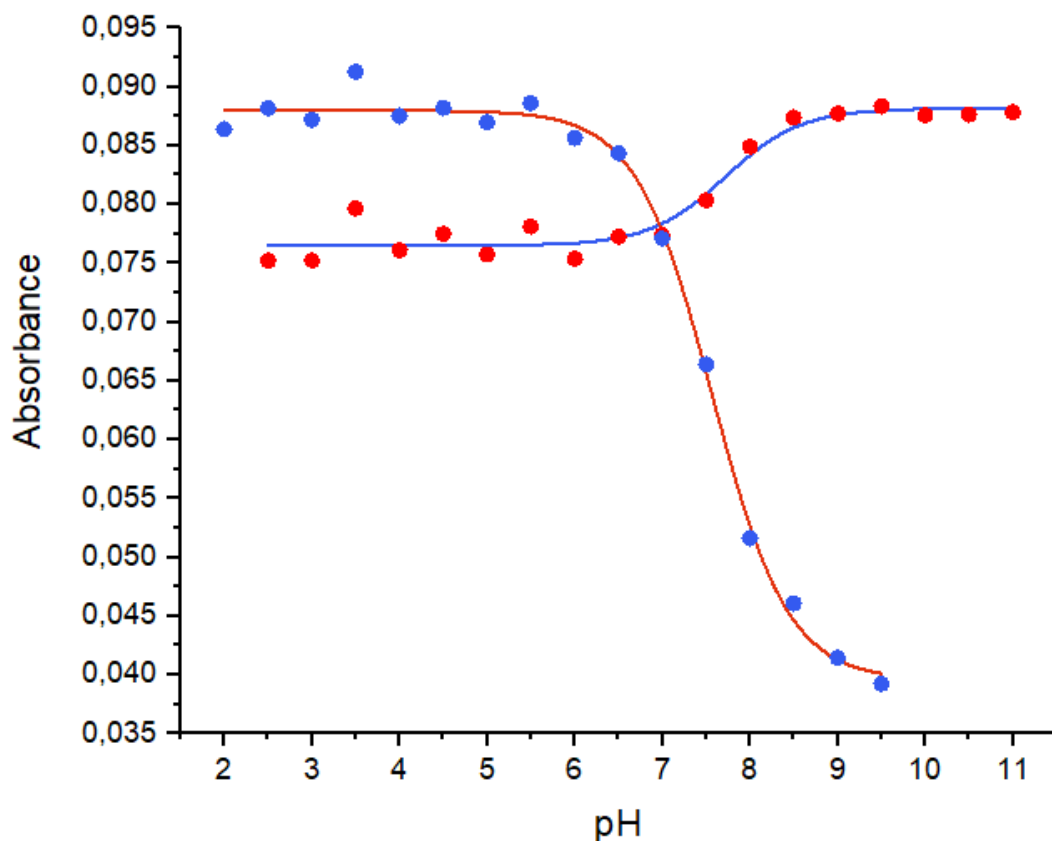
V ultrafialové oblasti se maximum pro kyselá pH nachází na vlnové délce 226 nm ($\epsilon = 8000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 4), u zásaditých pH jde o vlnovou délku 229 nm ($\epsilon = 11500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 10) (viz Obrázek 16). Hlavní absorpční pás se vyskytuje při 312 nm pro pH 11 ($\epsilon = 17600 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), toto maximum se pro nižší hodnoty pH posouvá k vyšším vlnovým délkám, přičemž v kyselém prostředí má spektrum své maximum na vlnové délce 324 nm ($\epsilon = 19800 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro pH 4). Ve viditelné oblasti spektra látka záření neabsorbuje.

Lze si též povšimnout, že ve spektrální oblasti do 316 nm absorbance s klesajícím pH klesá, naopak v oblasti od 316 nm absorbance roste. Vlnová délka 316 nm není izobestickým bodem.



Obrázek 16: Absorpční spektrum 5 μM roztoku merkaptopurinu.

Proložením hodnot absorbance merkaptopurinu na vlnové délce 313 nm (viz Obrázek 17) křivkou byla získána hodnota $pK_a = (7,7 \pm 0,2)$. Z hodnot absorbance na vlnové délce 330 nm byl obdržen výsledek zatížený menší nejistotou. Hodnota $pK_a = (7,69 \pm 0,08)$.

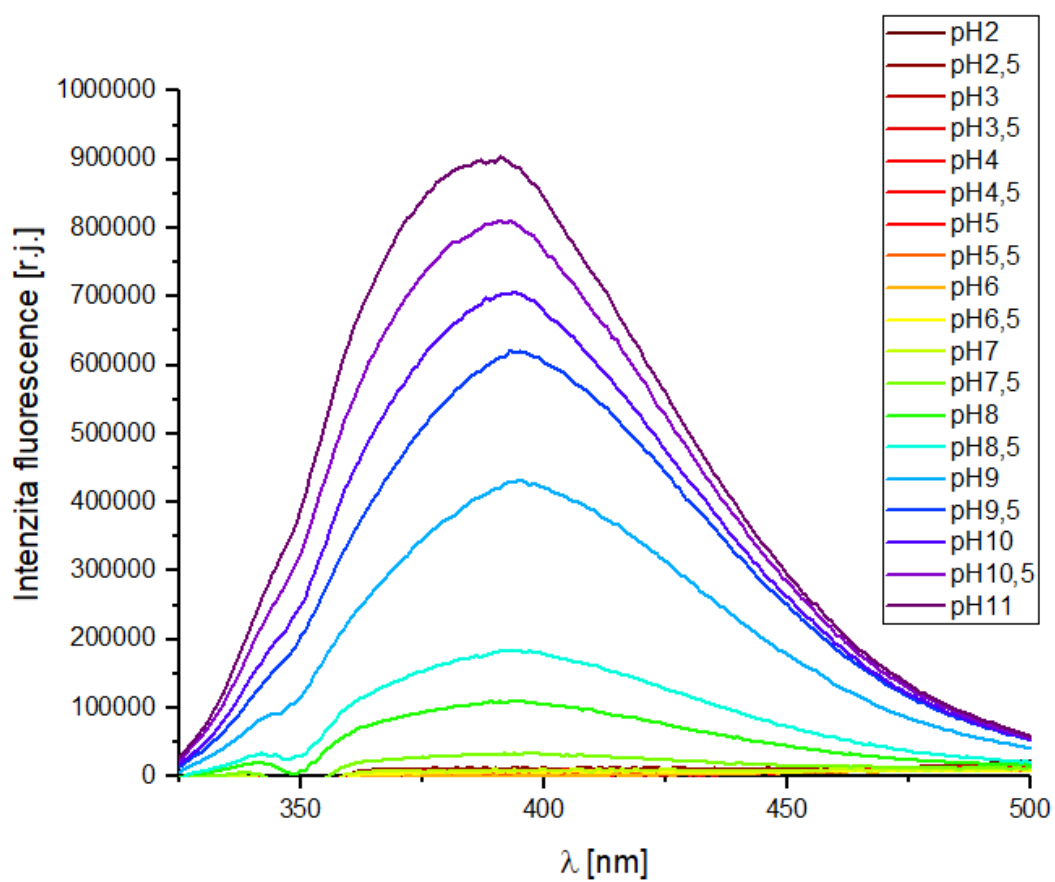


Obrázek 17: Grafy závislosti absorbance při 313 nm (oranžové body) a při 330 nm (modré body) na pH pufru proložené křivkou dle rovnice (3).

5.4.2 Emisní spektrum

Maximum intenzity fluorescence merkaptopurinu pro pH 11 se vyskytuje při 391 nm a pro nižší hodnoty zásaditých pH se posouvá k vyšším vlnovým délkám, a to k 398 nm pro pH 7,5 (viz Obrázek 18). Hodnota velikosti intenzity fluorescence roste se zvyšujícím se pH. Stokesův posuv je přibližně roven 75 nm pro kyselá pH a 79 nm pro pH zásaditá.

Změna tvaru spektra kolem 350 nm nevypovídá nic o látce, jedná se pouze o artefakt vzniklý kvůli nedokonalému odečtení pásu Ramanova rozptylu.



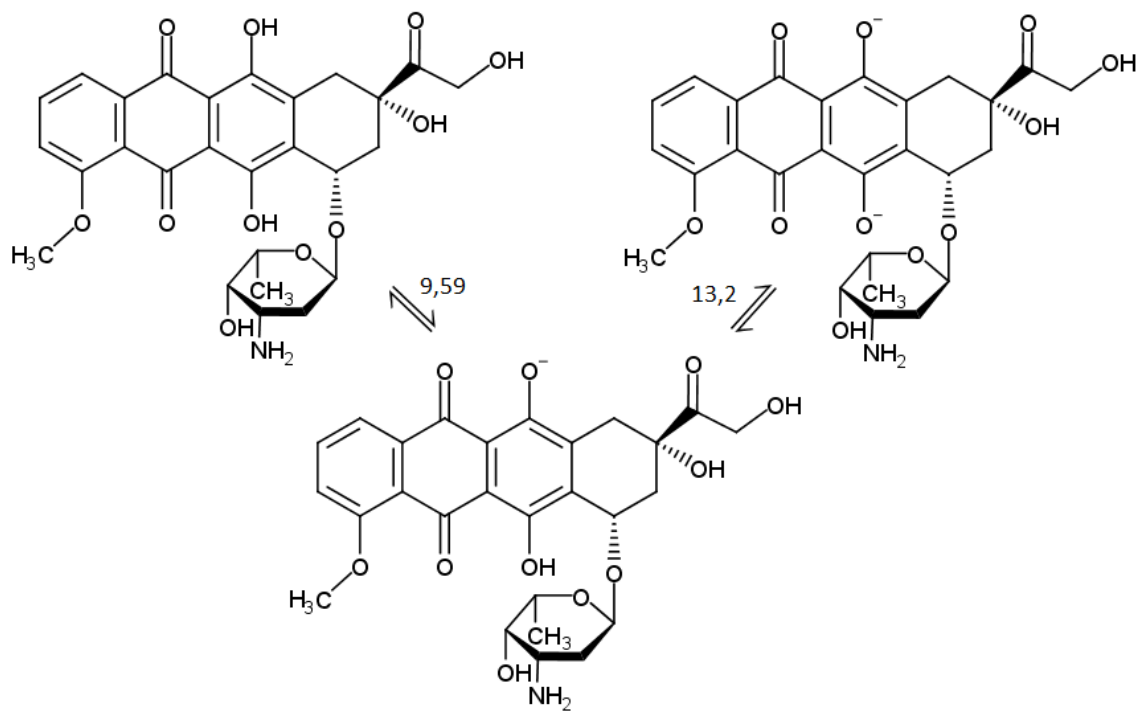
Obrázek 18: Emisní spektrum 5 μM roztoku merkaptopurinu při excitaci světlem o vlnové délce 313 nm pro různá pH pufru.

6 Diskuze

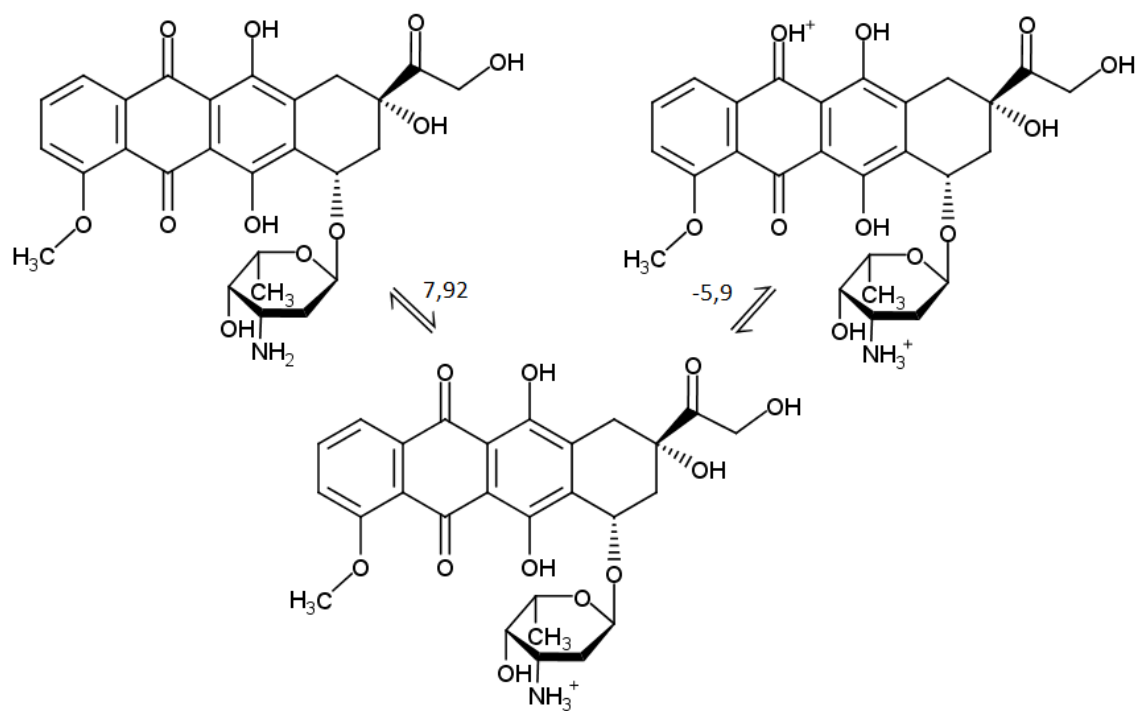
V této práci jsme zkoumali vliv pH na tvar absorpčních a emisních spekter čtyř molekul. Při změně pH roztoku může docházet k ionizacím molekuly, přesněji řečeno k protonacím či deprotonacím jejích funkčních skupin. Molekula tedy přechází v jinou formu. Hodnota pK_a je poté rovna pH, při němž je počet molekul jedné formy roven počtu molekul formy druhé, tedy poměr mezi protonovanou a deprotonovanou formou je 1:1. Chemické struktury v následujících podkapitolách byly vytvořeny v programu MarvinSketch, který je dostupný na webových stránkách [8].

6.1 Doxorubicin

Zjištěná hodnota $pK_a = (9,59 \pm 0,02)$ pro doxorubicin hydrochlorid odpovídá dle výsledků Righettiho a kol. (1979) ($pK_a = 9,60$) ionizaci hydroxylové skupiny navázané na benzenové jádro skrz uhlík na pozici 11 (viz Obrázek 19). Jedná se o přechod mezi aniontem mající světle fialové zbarvení a neutrální molekulou (Eksborg 1978). Righetti a kol. (1979) uvádějí ještě $pK_a = 7,92$ odpovídající ionizaci aminoskupiny cukerné části molekuly (viz Obrázek 20). Zde se jedná o přechod mezi neutrální molekulou a kationtem oranžové barvy. Righetti a kol. (1979) také uvádějí, že pro rozsah pH od 3 do 7 nedochází v molekule ke změně náboje. V tomto rozmezí pH se tudíž nebude nacházet další hodnota pK_a . Sturgeon a Schulman (1977) vypočítali ještě $pK_a = (-5,9 \pm 0,05)$, jež odpovídá ionizaci karbonylové skupiny vázané na uhlík na pozici 12 (viz Obrázek 20), a jde tedy o přechod mezi kationtem a dikationtem, a hodnotu $pK_a = (13,2 \pm 0,2)$, která odpovídá ionizaci druhé hydroxylové skupiny vázané na benzenové jádro (viz Obrázek 19). Zde dochází k přechodu mezi aniontem a dianiontem. Absorpční maxima při 497 nm a 552 nm odpovídají postupně aniontové a kationtové formě a maximum při 558 nm v emisním spektru odpovídá kationtu (Sturgeon a Schulman 1977). Hodnoty emisních maxim Changenet-Barret a kol. (2013) a Kumar a kol. (2016) korespondují s námi naměřenými hodnotami.



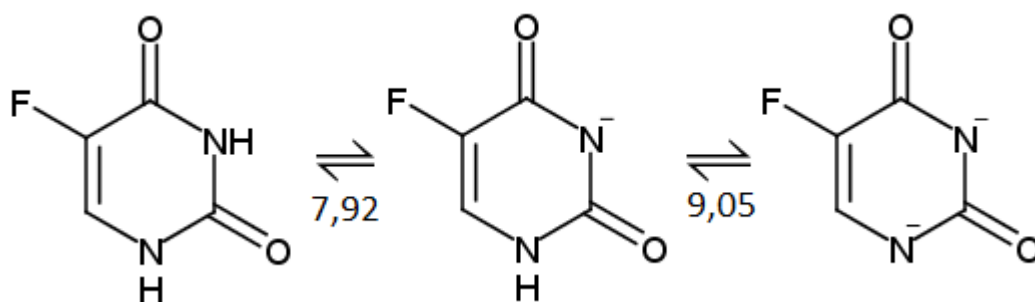
Obrázek 19: Deprotonace doxorubicinu.



Obrázek 20: Protonace doxorubicinu.

6.2 5-fluorouracil

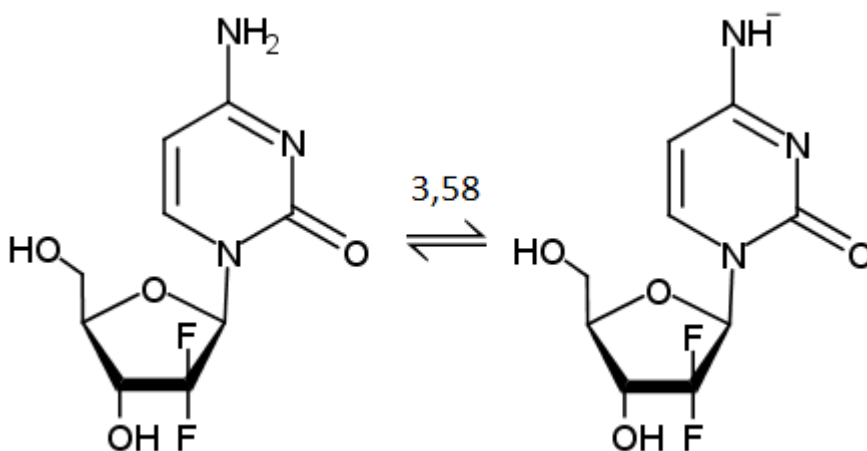
Odštěpení protonu z molekuly 5-fluorouracilu může probíhat ze dvou jejích funkčních skupin. Jedná se o NH skupiny tvořící heterocyklický kruh (Jang a kol. 2001). Předpokládá se, že 5-fluorouracil existuje až do pH 6 převážně jako neutrální molekula (Mioduszewska a kol. 2017). Jang a kol. (2001) určili teoretickými výpočty hodnoty pK_a pro obě funkční skupiny, a to jako $pK_a = 7,26$ pro dusík na pozici 3 a $pK_a = 9,05$ pro dusík na pozici 1. Námi stanovená hodnota $pK_a = (7,92 \pm 0,04)$ sice koresponduje s hodnotou určenou Privatem a Sowersem (1996) ($pK_a = 7,93$), avšak při porovnání s teoretickými hodnotami 7,26 a 9,05 je patrné, že jsme zjistili pouze jakousi střední hodnotu a že naše metoda nemá dostatečné rozlišení pro rozpoznání toho, že se jedná o dva přechody a ke stanovení přesnějších hodnot pK_a těchto přechodů. Při pH 7,26 je tedy polovina molekul 5-fluorouracilu v neutrální formě a polovina ve formě deprotonované (viz Obrázek 21). Při dalším zvyšování pH dochází k odštěpování vodíku i z druhého dusíku v heterocyklickém kruhu a vzniká dianiont. Nad pH 9,5 převládá v roztoku dianiontová forma 5-fluorouracilu (Mioduszewska a kol. 2017). Tato forma je z energetického hlediska méně stabilnější než aniont vzniklý odštěpením vodíku z dusíku na pozici 3 (Markova a kol. 2010). Mioduszewska a kol. (2017) uvádějí, že důsledkem deprotonace je zvýšení elektronové hustoty okolo obou atomů dusíku a kyslíku v heterocyklickém kruhu a okolo fluoru. Vyšší hodnotu pK_a u molekuly uracilu ($pK_a = 9,5$) lze přisoudit fluoru nacházejícím se na pozici 5 (Niedzwicki a kol. 1983, Şanlı a kol. 2010). Z výsledků měření Gustavssona a kol. (2006) vyplývá, že absorpční maximum 5-fluorouracilu se nachází při 266 nm a z výsledků Lohmanna (1974) plyne, že se maximum vyskytuje při 265,3 nm, což je v souladu s našimi výsledky pro pH 7. Lohmann (1974) také uvádí maximum při 203,3 nm, které nebylo z důvodu omezení přístroje možné změřit.



Obrázek 21: Acidobazická rovnováha 5-fluorouracilu.

6.3 Gemcitabin

Zjištěná hodnota $pK_a = (3,58 \pm 0,03)$ pro gemcitabin odpovídá ionizaci aminoskupiny (viz Obrázek 22), kdy dochází k přechodu mezi neutrální molekulou a její deprotonovanou formou (Pili a kol. 2009). Moog a kol. (2000) přisuzují nízkou hodnotu pK_a atomům fluoru navázaných na cukernou část molekuly, přičemž Fox a Shugar (1952) stanovili pK_a molekuly 2'-deoxycytidin jako 4,3.

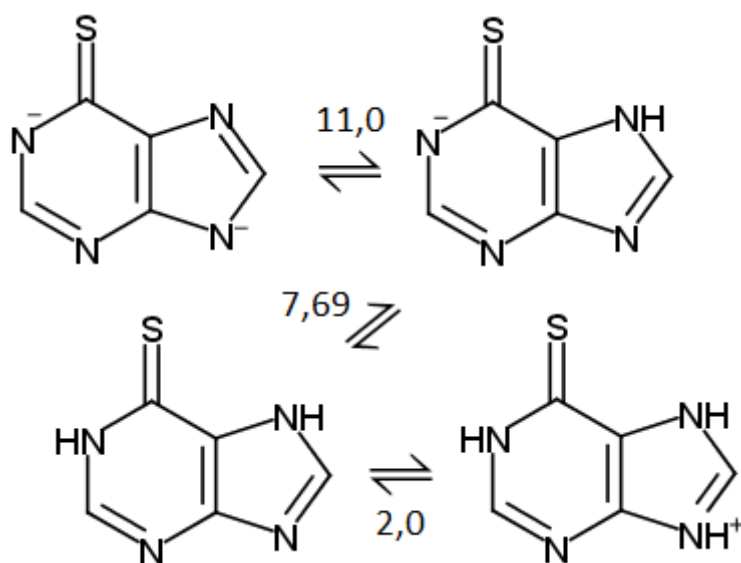


Obrázek 22: Acidobazická rovnováha gemcitabinu.

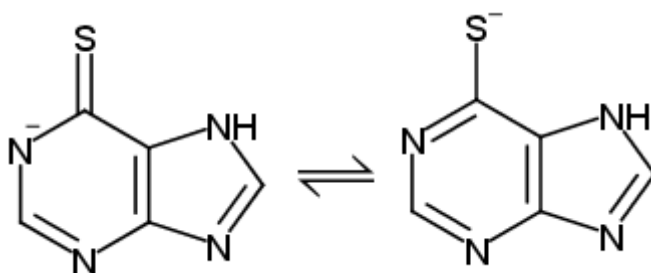
6.4 6-merkaptopurin

Pro 6-merkaptopurin jsme pK_a určili jako $7,69 \pm 0,08$. Tato hodnota koresponduje s hodnotou 7,77 určenou Albertem a Brownem (1954), Gninguem a Aaronem (1985) a Hemmensem a Moorem (1986) a odpovídá ionizaci dusíku na pozici 1 v pyrimidinovém kruhu, přičemž nastává přechod mezi neutrální molekulou a aniontem (viz Obrázek 23). Hemmens a Moore (1986) navíc určili $pK_a = 2,0$, jež odpovídá protonaci dusíku na pozici 9 v imidazolovém kruhu za vzniku kationtu, a $pK_a = 11,0$ odpovídající deprotonaci dusíku na pozici 7 v imidazolovém kruhu za vzniku dianiontu. Pro dianiont stanovili Albert a Brown (1954) hodnotu pK_a jako $10,84 \pm 0,04$, Fox a kol. (1958) určili $pK_a = (11,17 \pm 0,06)$. Hemmens a Moore (1986) také uvádějí, že posun absorpčního maxima mezi pH 7 a 8 indikuje to, že ionizace thiolové skupiny byla uskutečněna tautomerizací 6-merkaptopurinu z thionové formy na formu thiolovou (viz Obrázek 24). Mason (1954) uvádí, že absorpční

maximum pro pH 5,09 je při 225 nm a 325 nm a pro pH 9,3 při 228 nm a 312 nm, což potvrzuje posun obou maxim v závislosti na pH.



Obrázek 23: Acidobazická rovnováha 6-merkaptopurinu.



Obrázek 24: Tautomerizace thionové formy 6-merkaptopurinu na formu thiolovou.

7 Závěr

V teoretické části byla cytostatika rozdělena na základě biologického účinku a chemické struktury do několika skupin, což bylo jedním z cílů této bakalářské práce. Dalším cílem bylo proměřit absorpční a fluorescenční spektra doxorubicinu, fluorouracilu, gemcitabinu a merkaptopurinu pro pH v rozsahu od 2 do 11 a určit základní charakteristiky. Ze spekter byly zjištěny polohy jednotlivých maxim a jejich posun v závislosti na pH. K nalezeným maximům byly vypočítány molární extinkční koeficienty. Dále byl popsán vývoj absorbance a intenzity fluorescence v závislosti na pH. Taktéž byly identifikovány izobestické a izoemisní body, pokud se v měřeném rozsahu vlnových délek nacházely. Z rozdílu vlnové délky emisního a absorpčního maxima byl pro fluorouracil a merkaptopurin uveden Stokesův posuv. Emisní spektrum gemcitabinu nebylo v práci uvedeno, jelikož tato látka nevykazovala při měření fluorescenci.

Fitováním experimentálních dat byly získány hodnoty záporného dekadického logaritmu rovnovážné acidobazické konstanty pK_a , které byly následně porovnány s výsledky uvedenými v literatuře. V budoucnu by pro zjištění dalších hodnot pK_a bylo vhodné měření provádět s menším krokem, či užít jiné metody.

8 Seznam použité literatury

- Adam Z., Vorlíček J., Koptíková J. (2003) *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. 1. vydání. Grada Publishing, Praha, Česká republika, 787 stran.
- Albert A., Brown D.J. (1954) Purine studies. Part I. Stability to acid and alkali. Solubility. Ionization. Comparison with pteridines. *Journal of the Chemical Society* 2060-2071.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) *Molecular biology of the cell*. 5. vydání, Garland Science, New York, Spojené státy americké, 1616 stran.
- Belkov V.M., Krynetski E.Y., Schuetz J.D., Yanishevski Y., Masson E., Mathew S., Raimondi S., Pui C.H., Relling M.V., Evans W.E. (1999) Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *The American Society of Hematology* **93**, 1643-1650.
- Carreras C.W., Santi D.V. (1995) The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annual Review of Biochemistry* **64**, 721-762.
- Desmoulin F., Gilard V., Malet-Martino M., Martino R. (2002) Metabolism of capecitabine, an oral fluorouracil prodrug: ¹⁹F NMR studies in animal models and human urine. *Drug Metabolism and Disposition* **30**, 1221-1229.
- Diasio R.B., Harris B.E. (1989) Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clinical Pharmacokinetics* **16**, 215-237.
- Eksborg S. (1978) Extraction of daunorubicin and doxorubicin and their hydroxyl metabolites: self-association in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **67**, 782-785.
- Fernández-Calotti P.X., Lopez-Guerra M., Colomer D., Pastor-Anglada M. (2012) Enhancement of fludarabine sensitivity by all-trans-retinoic acid in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* **97**, 943-951.
- Fox J.J., Shugar D. (1952) Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. II. Natural and synthetic pyrimidine nucleosides. *Biochimica et Biophysica Acta* **9**, 369-384
- Fox J.J., Wempen I., Hampton A., Doerr I.L. (1958) Thiation of nucleosides. I. Synthesis of 2-amino-6-mercapto-9-β-D-ribofuranosylpurine (“thioguanosine”) and related purine nucleosides. *Journal of the American Chemical Society* **80**, 1669-1675.
- Gningue D., Aaron J.J. (1985) Fluorimetric determination of dissociation constants and pH-controlled fluorescence analysis of purines and pyrimidines. *Talanta* **32**, 183-187.
- Gustavsson T., Bányász Á., Lazzarotto E., Markovitsi D., Scalmani G., Frisch M.J., Barone V., Improta R. (2006) Singlet excited-state behavior of uracil and thymine in aqueous solution: a combined experimental and computational study of 11 uracil derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 607-619.
- Hemmens V.J., Moore D.E. (1986) Photochemical sensitization by azathioprine and its metabolites – I. 6-mercaptopurine. *Photochemistry and Photobiology* **43**, 247-255.
- Hirata K., Miyamoto K., Miura Y. (1994) *Catharanthus roseus* L. (Periwinkle): Production of vindoline and catharanthine in multiple shoot cultures. In: *Medical and aromatic plants VI. Biotechnology in agriculture and forestry* vol. 26, (Bajaj Y.P.S. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, 46-55.
- Holstein S.A., Hohl R.J. (2009) Prostate cancer. In: *Pharmacology and therapeutics: Principles to practice*. 1. vydání, (Waldman S.A., Terzic A. eds.), Saunders Elsevier, Spojené státy americké, 951-958.
- Changenet-Barret P., Gustavsson T., Markovitsi D., Manet I., Monti S. (2013) Unraveling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**, 2937-2944.
- Chu E., Sartorelli A.C. (2012) Chapter 54 Cancer Chemotherapy. In: *Basic and clinical pharmacology*. 13. vydání, (Katzung B.G., Trevor A.J. eds.), McGraw-Hill Education, New York, Spojené státy americké, 918-945.
- Jang Y.H., Sowers L.C., Çağın T., Goddard W.A. (2001) First principles calculation of pK_a values for 5-substituted uracils. *The Journal of Physical Chemistry A* **105**, 274-280.

- Klener P. jr. a Klener P. (2013) *Principy systémové protinádorové léčby*. 1. vydání, Grada Publishing, Praha, Česká republika, 200 stran.
- Kubala M., Vacek J., Popa I., Janovská M., Kosina P., Ulrichová J., Trávníček Z., Šimánek V. (2011) The fluorescence properties and NMR analysis of protopine and allocryptopine. *Journal of Luminescence* **131**, 1340-1345.
- Kumar P., Agnihotri S., Roy I. (2016) Synthesis of dox drug conjugation and citric acid stabilized superparamagnetic iron-oxide nanoparticles for drug delivery. *Biochemistry and Physiology* **5**:194.
- LaPlant K., Louzon P. (2014) Chapter 46: Anticancer drugs. In: *Pharmacology*. 6. vydání, (Whalen K., Finkel R., Panavelil T.A. eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Spojené státy americké, 587-618.
- Lerman L.S. (1961) Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology* **3**, 18-30.
- Lohmann W. (1974) Halogen-substitution effect on the optical absorption bands of uracil. *Zeitschrift für Naturforschung C* **29**, 493-495.
- Lüllmann H., Mohr K., Hein L. (2012) *Barevný atlas farmakologie*. 4. vydání, Thieme Verlag, Stuttgart, Německo, 384 stran.
- Mackey J.R., Mani R.S., Selner M., Mowles D., Young J.D., Belt J.A., Crawford C.R., Cass C.E. (1998) Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Research* **58**, 4349-4357.
- Markova N., Enchev V., Ivanova G. (2010) Tautomeric equilibria of 5-fluorouracil anionic species in water. *The Journal of Physical Chemistry A* **114**, 13154-13162.
- Martínková J. (2007) *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání, Grada Publishing, Praha, Česká republika, 380 stran.
- Mason S.F. (1954) Purine studies. Part II. The ultra-violet absorption spectra of some mono- and poly-substituted purines. *Journal of the Chemical Society* 2071-2081.
- Mikkelsen T.S., Thorn C.F., Yang J.J., Ulrich C.M., French D., Zaza G., Dunnenberger H.M., Marsh S., McLeod H.L., Giacomini K., Becker M.L., Gaedigk R., Leeder J.S., Kager L., Relling M.V., Evans W., Klein T.E., Altman R.B. (2011) PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenetics and Genomics* **21**, 679-685.
- Mioduszewska K., Dolzonek J., Wyrzykowski D., Kubik L., Wiczling P., Sikorska C., Tonski M., Kaczynski Z., Stepnowski P., Bialk-Bielinska A. (2017) Overview of experimental and computational methods for the determination of the pKa values of 5-fluorouracil, cyclophosphamide, ifosfamide, imatinib and methotrexate. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **97**, 283-296.
- Moog R., Brandl M., Schubert R., Unger C., Massing U. (2000) Effect of nucleoside analogues and oligonucleotides on hydrolysis of liposomal phospholipids. *International Journal of Pharmaceutics* **206**, 43-53.
- Nabi J., Hohl R.J. (2009) Hematologic malignancies. In: *Pharmacology and therapeutics: Principles to practice*. 1. vydání, (Waldman S.A., Terzic A. eds.), Elsevier, Spojené státy americké, 945-950.
- Niedzwicki J.G., Elkouni M.H., Chu S.H., Cha S. (1983) Structure-activity relationship of ligands of the pyrimidine nucleoside phosphorylases. *Biochemical Pharmacology* **32**, 399-415.
- Pavelka K., Bečvář R., Dejmková H., Doležal T., Dostál C., Hrba J., Hrnčír Z., Jarošová H., Jarošová K., Mičková D., Mlynáriková V., Olejárová M., Pavelková A., Rovenský J., Růžičková O., Štolfa J., Tegzová D., Tesař V., Urbanová Z., Vencovský J., Zitko T. (2005) *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. 1. vydání, Grada Publishing, Praha, Česká republika, 436 stran.
- Pili B., Bourgaux C., Meneau F., Couvreur P., Ollivon M. (2009) Interaction of an anticancer drug, gemcitabine, with phospholipid bilayers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **98**, 19-28.
- Privat E.J., Sowers L.C. (1996) A proposed mechanism for the mutagenicity of 5-formyluracil. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **354**, 151-156.

- Rang H.P., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson G. (2015) *Rang & Dale's Pharmacology*. 8. vydání, Elsevier, Spojené státy americké, 776 stran.
- Righetti P.G., Menozzi M., Gianazza E., Valentini L. (1979) Protolytic equilibria of doxorubicin as determined by isoelectric focusing and 'electrophoretic titration curves'. *FEBS Letters* **101**, 51-55.
- Rosenberg B., Vancamp L., Krigas T. (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698-699.
- Ruiz van Haperen V.W.T., Veerman G., Vermorken J.B., Peters G.J. (1993) 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochemical Pharmacology* **46**, 762-766.
- Şanlı N., Şanlı S., Alsancak G. (2010) Determination of dissociation constants of folic acid (leucovorin), 5-fluorouracil, and irinotecan in hydro-organic media by a spectrophotometric method. *Journal of Chemical & Engineering Data* **55**, 2695-2699.
- Sturgeon R.J., Schulman S.G. (1977) Electronic absorption spectra and protolytic equilibria of doxorubicin: direct spectrophotometric determination of microconstants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **66**, 958-961.
- Treskes M., Holwerda U., Klein I., Pinedo H.M., van der Vijgh W.J.F. (1991) The chemical reactivity of the modulating agent WR2721 (ethiofos) and its main metabolites with the antitumor agents cisplatin and carboplatin. *Biochemical Pharmacology* **42**, 2125-2130.
- Wang D., Gao Y., Yun L. (2006) Study on brain targeting of raltitrexed following intranasal administration in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **57**, 97-104.
- Wohlhueter R.M., McIvor R.S., Plagemann P.G.W. (1980) Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology* **104**, 309-319.
- Zaza G., Cheok M., Krynetskaia N., Thorn C., Stocco G., Hebert J.M., McLeod H., Weilshilboum R.M., Relling M.V., Evans W.E., Klein T.E., Altman R.B. (2010) Thiopurine pathway. *Pharmacogenetics and Genomics* **20**, 573-574.

9 Internetové zdroje

- [1] Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services [online]. [26. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/methotrexate454445905211?lang=en®ion=CZ>
- [2] Wikipedia, the free encyclopedia. Mercaptopurine [online]. [26. 7. 2018]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Mercaptopurine>
- [3] Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services [online]. [26. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/fluorouracil130085121811?lang=en®ion=CZ>
- [4] Wikipedia, the free encyclopedia. Gemcitabine [online]. [26. 7. 2018]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Gemcitabine>
- [5] Wikipedia, the free encyclopedia. Cyclophosphamide [online]. [26. 7. 2018]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclophosphamide>
- [6] Wikipedia, the free encyclopedia. Doxorubicin [online]. [26. 7. 2018]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Doxorubicin>
- [7] Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services [online]. [26. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/paclitaxel1853913306962411?lang=en®ion=CZ>
- [8] ChemAxon – Software Solutions and Services for Chemistry & Biology [online]. [25. 7. 2018]. Dostupný z: <https://chemaxon.com/products/marvin>