

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Kombinovaný účinek nového protinádorově účinného komplexu
ruthenia a UV záření na DNA.**

Vypracovala: Bc. Adéla Stavárková

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.

Olomouc 2016

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Prof. RNDr. Viktoru Brabcovi, DrSc., za vedení mé práce a za umožnění práce v jeho kolektivu. Mé poděkování patří i Prof. RNDr. Janě Kašpárkové, PhD. za její cenné rady a konzultace a především za její čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Tereze Muchové, Ph.D. a Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za spolupráci, jejich trpělivost a pomoc při měření. V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině a mému manželovi Martinovi a dcerce Šarlotě za podporu, čas a trpělivost při studiu a při sepisování této práce.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře projektu IGA_PrF_20164 013.

Já, Adéla Stavárková, prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Prof. RNDr. Viktora Brabce, DrSc. a za použití literatury uvedené na konci této diplomové práce.

V Olomouci dne

SOUHRN

Klinicky využívaná platinová cytostatika mají mnohá úskalí, která vedla k výzkumu nových metalofarmak s lepšími farmakologickými vlastnostmi, především vyšší selektivitou pro nádorové buňky. Jednou z možností zvýšení selektivity je fotoaktivace či fotopotenciace platinových či rutheniových léčiv. Fotoaktivace zajišťuje cílené zaměření na nádorovou tkáň a zajišťuje tak menší poškození okolní tkáně.

V této diplomové práci jsme se zaměřili na studium účinku protinádorově účinného komplexu ruthenia $[\text{Ru}(\text{tol})\text{flavonol}]\text{Cl}$ a jeho vlivu na DNA při kombinaci s UVA zářením. Zjistili jsme, že kombinace léčiva a záření umocňuje tvorbu cytotoxických jednořetězcových zlomů v DNA. A to jak v bezbuněčném tak i buněčném médiu. Studovali jsme i fotofyzikální vlastnosti tohoto komplexu a zjistili jsme, že tento komplex je schopen generovat singletní kyslík $^1\text{O}_2$, který se podílí na štěpení DNA. Nakonec jsme studovali cytotoxicitu v nádorových buňkách A2780 a zjistili jsme, že životaschopnost nádorových buněk byla po ozáření mnohem nižší než v nepřítomnosti záření. Z těchto výsledků lze usoudit, že komplex $[\text{Ru}(\text{tol})\text{flavonol}]\text{Cl}$ vykazuje dobrou fotodynamickou aktivitu v nádorových buňkách a lze jej považovat za vhodného kandidáta pro další výzkum fotocitlivých léčiv.

ABSTRACT

The clinical use of conventional antitumor platinum drugs is associated with a number of drawbacks, which led to the search for new metal-based drugs with improved pharmacological properties, especially with higher selectivity for tumor cells. One possibility of increasing the selectivity is photoactivation or photopotential of platinum or ruthenium drugs. The photoactivation provides a targeting to tumor tissues and ensures a lesser damage to surrounding tissue.

In this diploma work, we studied the effect of antitumor ruthenium complex [Ru(tol)flavonol]Cl and its effect on DNA in combination with UVA radiation. We found that the combination of drugs and radiation enhanced the formation of cytotoxic single-strand breaks in DNA in both cell-free and cell culture media. We studied photophysical properties of this complex as well, and found that this complex was able to generate singlet oxygen $^1\text{O}_2$, which is involved in DNA cleavage. Finally, we studied the cytotoxicity in A2780 cancer cells and found that the viability of cancer cells after irradiation was much lower than in the absence of radiation. It can be concluded from these results that the complex [Ru(tol)flavonol]Cl exhibits a good photodynamic activity in tumor cells and can be identified as a suitable candidate for further research of photosensitive drugs.

SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
BMF	bromfenolová modř
C	cytosin
cDDP	cisplatina, cis-diammindichloridoplatnatý komplex
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtBr	ethidium bromid
FBS	fetální hovězí sérum
FDA	Správa potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration)
G	guanin
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
HPM	high melting point, vysokotuhnoucí agaróza
IC₅₀	koncentrace sloučeniny, při níž testovaná chemikálie způsobí smrt 50 % buněk
LED	dioda emitující světlo (Light-Emitting Diode)
LPM	low melting point, nízkotuhnoucí agaróza
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
mRNA	mediátorová (messenger) RNA

NRA	test cytotoxicity s neutrální červení (neutral red uptake assay)
OC DNA	otevřená cirkulární (open circular) DNA
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PDT	fotodynamická terapie
PS	fotosenzitivní látka, fotosenzitizér
PUVA	léčba založená na kombinaci psoralenu a UVA záření
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
RTG	rentgenové záření
r_i	počet molekul komplexu připadajících na jeden nukleotid
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
Ru1	komplex [Ru(tol)flavonol]Cl
SC DNA	superhelikální kruhová (supercoiled circular) DNA
T	tymin
TAE	tris-acetát/EDTA pufr
UV	ultrafialové světlo
VIS	viditelné světlo

OBSAH

1	ÚVOD	- 1 -
2	PŘEHLED PROBLEMATIKY	- 4 -
2.1	Cytostatika	- 4 -
2.1.1	Cisplatina	- 4 -
2.1.2	Platnatá cytostatika druhé generace	- 6 -
2.1.3	Mechanismus účinku cisplatiny	- 9 -
2.2	Nová léčiva	- 14 -
2.2.1	Léčiva na bázi platiny (IV)	- 14 -
2.2.2	Léčiva na bázi titanu	- 15 -
2.2.3	Léčiva na bázi zlata	- 15 -
2.2.4	Léčiva na bázi železa	- 15 -
2.2.5	Další organokovová léčiva	- 16 -
2.3	Léčiva na bázi ruthenia	- 17 -
2.3.1	Chemické vlastnosti komplexů ruthenia	- 17 -
2.3.2	Mechanismus účinku	- 19 -
2.3.3	Protinádorové sloučeniny ruthenia	- 20 -
2.4	Fotodynamická terapie	- 22 -
2.4.1	Vývoj fotodynamické terapie	- 22 -
2.4.2	Mechanismus fotodynamické terapie	- 23 -
2.4.3	Fotoaktivace platičitých a platnatých komplexů	- 25 -
2.4.4	Fotoaktivace rutheniových komplexů	- 26 -
3	CÍL PRÁCE	- 28 -
4	MATERIÁL A METODY	- 29 -
4.1	Použité chemikálie	- 29 -
4.2	Přístroje	- 31 -
4.3	Metody	- 31 -

4.3.1	Příprava a ozařování vzorků	- 31 -
4.3.2	Studium mechanismu štěpení DNA	- 32 -
4.3.3	Elektroforéza v nativním agarózovém gelu.....	- 32 -
4.3.4	Testování fragmentace DNA v živých buňkách (comet test).....	- 33 -
4.3.5	Stanovení cytotoxicity (NRU test, výpočet IC ₅₀)	- 34 -
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	- 36 -
5.1	Vliv kombinace UV záření a komplexu ruthenia na DNA <i>in vitro</i>....	- 36 -
5.2	Vliv kombinace viditelného záření a komplexu ruthenia na DNA <i>in vitro</i>	- 39 -
5.3	Mechanismus štěpení DNA	- 42 -
5.4	Účinky kombinace záření a komplexu ruthenia na DNA v živých buňkách	- 44 -
5.5	Vliv záření na cytotoxicitu komplexu ruthenia.....	- 46 -
6	ZÁVĚR	- 48 -
7	SEZNAM LITERATURY	- 50 -

Lidé bez odborného vzdělání v chemii a medicíně si možná neuvědomují, jak obtížný problém léčba rakoviny ve skutečnosti představuje. Je to skoro tak těžké – ne zcela, ale téměř – jako nalézt látku, která by, řekněme, dokázala levé ucho rozpustit a pravé nepoškodit. Tak malý je rozdíl mezi rakovinnou buňkou a její normální, původní variantou.

– William Woglom –

1 ÚVOD

Mutace jsou jedním z nejdůležitějších zdrojů proměnlivosti organismů, jak rostlinných tak živočišných. Mutace působí nejen na nukleové kyseliny, ale také na mitochondrie či na chloroplasty u rostlin. Již roku 1943 američtí vědci Salvador Luria a Max Delbrück prokázali, že mutace jsou hlavní příčinou genetických změn (Veverka 2014). K takovýmto genetickým změnám dochází během celého období života jedince. Dochází k nim vlivem nepřesností nepřetržitých přepisů genetické informace i vlivem vnějšího prostředí, kam můžeme zařadit tabákový kouř, UV, RTG radioaktivní a ionizační záření, azbest, aldehydy, volné radikály a další látky, se kterými jsme takřka denně v kontaktu, a souhrnně se nazývají kancerogeny. Identifikace těchto činitelů má zásadní význam pro primární prevenci proti nádorovým onemocněním, neboť zevní faktory jsou hlavní příčinou onemocnění (Doll *et Peto* 1981). Zevní vlivy se podílí na vzniku 75-95 % všech nádorů a hlavními činiteli jsou kouření a strava, dále pak obezita, nadváha, nedostatek pohybu, pití alkoholu a určité infekce (Adam *et al.* 2011).

K mutacím dochází v našem těle nepřetržitě a bez opravných mechanismů by byly s životem neslučitelné. Nicméně i přes důmyslné opravné mechanismy mohou některá poškození buňce uniknout a při nashromáždění více mutací se může buňka začít nekontrolovatelně dělit. O rakovině víme, že je způsobená proliferací jedné jediné buňky. V normálních buňkách je proces dělení dokonale regulován, ale u nádorových buněk není růst omezen a vytváří se jedna generace za druhou. Nejedná se o pouhé klonování, neboť rakovina je klonálně se vyvíjející nemoc. Tyto buňky jsou dokonalejší než buňky zdravé, protože rostou rychleji, dokáží se lépe přizpůsobovat a přežívat. Nádorové buňky ztrácí schopnost apoptózy, množí se a tvoří nádorovou tkáň - rakovinu. Jednoduše řečeno, rakovina zaplní tělo nadměrným počtem buněk.

Kdybychom si o rakovině mysleli, že je to moderní nemoc, byli bychom na omylu. První doložené zmínky o rakovině pochází již ze starověku (Capasso 2005), kdy egyptský lékař Imhotep (2625 př. n. l.) popsal jako první příznaky nádoru prsu (Strouhal *et Němečková* 2008). Další zmínka o nádoru pak pochází až z roku 440 př. n. l., kdy si perská královna Atosa nechala provést excizi krvavé bulky v prsu. Archeology a paleontology byla nádorová onemocnění nalezena například na čelistní kosti staré dva miliony let. U mumie staré dva tisíce let našli nádor napadající pánevní kost a nejstarší

dochovanou maligní tkání je břišní nádor datovaný kolem roku 400 n. l. (Mukherjee 2015).

Lidé tedy na toto onemocnění umírají již více než pět tisíc let. Důvodů, proč se nám zdá být rakovina nemocí moderní doby, je hned několik. Jelikož rakovina úzce souvisí s věkem, tak neměla v dřívějších dobách tolik šancí se projevit, protože lidé se dožívali mnohem nižšího věku než nyní. Za poslední století se totiž doba dožití zvýšila o dvacet šest let. Další příčinou je, že rakovina byla skryta mezi mnoha jinými smrtelnými nemocemi, jako byl tyfus, mor, tuberkulóza, neštovice, zápal plic a další. S objevem léků a vymýcením těchto chorob se rakovina projevovala stále častěji. A v neposlední řadě je rakovina častější i díky pokroku. S rozvojem techniky se zdokonalily metody biopsie a autopsie a celkově schopnost diagnostiky. Paradoxně se zavedením mamografie se výrazně zvýšil výskyt rakoviny prsu, neboť nám umožňuje dřívější diagnózu.

Nádorové onemocnění lze charakterizovat jako patologickou hyperplazii (tj. nekontrolovatelný růst) buněk a organismus jako celek ztrácí kontrolu nad rozmnožováním těchto buněk. Nádorové buňky začínají narušovat normální funkci postižené tkáně a jsou schopné se šířit krevním řečištěm a lymfatickým oběhem a usazovat se v jiných částech těla. Především v kostech, mozku či plicích (Mukherjee 2015). Takto vzniklé nové dceřiné nádory se označují jako metastáze. V dnešní době je známo okolo sto padesáti druhů zhoubných nádorů. Již samotné slovo rakovina je odvozeno od působení onemocnění, tedy od postupného rozlézání do okolních tkání.

Prvními léčebnými postupy byla hrubá chirurgie. V 16. století byli lékaři vynalézavější a k léčbě nádorů využívali žíhání pájkou, leptání kyselinami či stlačení nádoru pomocí olovených destiček (Mukherjee 2015). Od těchto dob však uplynulo několik století a v léčbě, diagnostice a výzkumu došlo k velkým objevům a pokrokům. A to i přesto, že doposud nebyl zcela jasně popsán mechanismus vzniku nádorového bujení. Úspěšný boj s rakovinou spočívá buď v ochraně buněk před mutacemi či v odstranění již nádorových buněk. Největším problémem léčby je úzké genetické propojení růstu zdravých a nádorových buněk.

V současnosti jsou již běžnými léčebnými postupy chirurgie, která byla v dnešní podobě zavedena do praxe v 90. letech 19. století chirurgem Halstedem (Mukherjee 2015). S objevem RTG počátkem 20. století se k léčbě začalo používat ozařování - radioterapie. Rozvoj pokračoval chemoterapií a modernějšími přístupy v léčbě rakoviny,

které se užívají v klinické praxi, jako jsou imunoterapie, hormonální léčba a biologická léčba. Dalším možným přístupem by mohla být léčba založená na cíleném transportu léčiv. V souvislosti s rakovinou se též mluví o symptomatické či paliativní léčbě. To znamená, že samotné nádorové onemocnění je již v takovém stádiu, že ho nelze léčit, a tak se přistupuje pouze k tišení bolesti a udržení přijatelné kvality života pacienta.

Chemoterapie je léčba založená na periodickém podávání léčiv - cytostatik. Tyto látky jsou nejčastěji metalofarmaka, tedy látky obsahující přechodný kov. Běžně jím je platina, v současnosti se však již používají i jiné kovy jako ruthenium, osmium a další. Tyto látky se po podání pacientovi dostávají do krevního řečiště a zde jsou roznášeny po celém těle s cílem zasáhnout všechny nádorové buňky v organismu. V ideálním případě by takovéto preparáty měly zasáhnout pouze rakovinné buňky a zastavit tak jejich dělení, ovšem jejich působení je nespecifické a antiproliferační. To znamená, že zastavují jak dělení nemocných, tak i zdravých buněk. Tento efekt je nežádoucí a patří mezi hlavní vedlejší účinky chemoterapie. K dalším známým vedlejším účinkům chemoterapie řadíme nevolnost, zvracení, vypadávání vlasů a mnohé další. Mezi další nevýhody této léčby patří získaná rezistence na léčivo, úzké spektrum působnosti daného cytostatika a mnohdy i farmakologické aspekty (např. způsob podání léčiva).

Pro tyto a mnohé další důvody je nanejvýš nutné, aby pokračoval výzkum mechanismu účinku vzniku nádorových onemocnění a s tím spojený vývoj nových léčiv. Léčiv, které by byly účinné i na doposud rezistentní nádory, měly minimum vedlejších účinků a působily selektivně pouze v nádorových buňkách.

2 PŘEHLED PROBLEMATIKY

2.1 CYTOSTATIKA

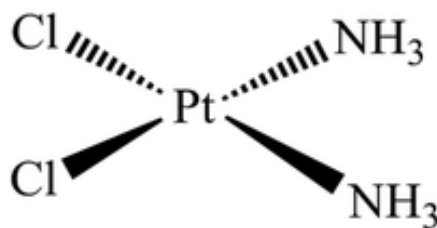
Cílem těchto léčiv je zajistit optimální farmakologický účinek při minimální toxicitě látek a přitom zajistit prevenci vzniku rezistence. Jsou to cytotoxické látky, z nichž některé poškozují nádorovou DNA. Neřadíme mezi ně pouze sloučeniny platiny, jejichž nejznámějším a nejúčinnějším zástupcem je cisplatina, ale dále zde patří alkylující látky (např. cyklofosfamid, busulfandakarbazin, chlorambucil, melfalan, ifosfamid, chlormethin, mitolactol a mitobronitol), antimetabolity (např. 5-fluorouracil, metotrexát), vřetenkové jedy (např. vinkristin), inhibitory topoizomerázy I (např. topotecan), antibiotika (např. doxorubicin či mitomycin) a dále lze jmenovat i hormonální látky.

Cytostatika jsou charakteristická svou malou terapeutickou šíří (Adam *et al.* 2011) a vyznačují se širokým spektrem nežádoucích účinků – zabíjí všechny rychle se dělící buňky, tedy nejen nádorové buňky, ale i buňky vlasových folikulů, buňky gastrointestinálního traktu, způsobují útlum kostní dřeně, anemii či leukopenii. Mnohá z cytostatik jsou nefro-, oto-, hepatotoxické. Kontraindikací při léčbě cytostatiky je těhotenství. A mnohdy může být nevýhodou i intravenózní podání léčiv.

V současnosti jsou v praxi nejpoužívanějšími platnatá cytostatika, tedy cisplatina a druhá generace platnatých cytostatik, která jsou odvozená od cisplatiny.

2.1.1 CISPLATINA

Cisplatina (cis-diammindichloridoplatnatý komplex, cDDP, strukturní vzorec na obr. 1) je anorganický metalický komplex využívaný v lékařství jako protinádorové léčivo. Syntetizována byla již v polovině 19. století italským chemikem Michele Peyronem pod názvem Peyronův chlorid (Kelland 2007).



Obr. 1: strukturní vzorec cisplatiny.

V té době se o jejích protinádorových účincích nevědělo a trvalo zhruba 120 let, než tyto vlastnosti objevil americký biofyzik Barnett Rosenberg (Brabec 1998). Rosenberg zkoumal vliv elektrického pole na růst buněk bakterie rodu *Escherichia coli*. Experiment prováděl jako elektrolýzu za použití platinových elektrod a roztoku, který obsahoval chlorid amonný a bakterie *E. coli*. Po zapnutí elektrického pole došlo k zastavení dělení bakteriálních buněk, nicméně tyto buňky stále rostly a prodlužovaly se (Rosenberg *et al.* 1965). Následně Rosenberg vysvětlil efekt tím, že při probíhající elektrolýze vznikají v roztoku sloučeniny podobné cisplatině. Rosenberg a jeho kolegové poté vyřkli domněnku, že tyto sloučeniny na bázi platiny by mohly zastavovat růst nádorů.

Tato domněnka byla později důkladně zkoumána a v roce 1968 byla potvrzena při pozitivních experimentech na myších (Kelland 2007). První pacienti byli cisplatinou léčeni v roce 1971, tedy pouhé tři roky od potvrzení protinádorových účinků této látky. To je v dnešní době, kdy se nová léčiva podrobují minimálně několikaletému výzkumu a testování, naprosto nemyslitelné a je pravděpodobné, že by v dnešní době cDDP ani nebyla schválená do klinické praxe. Poté v roce 1978 byla cDDP oficiálně schválena FDA (Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) pro klinickou praxi v USA.

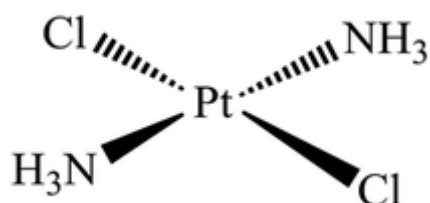
V osmdesátých letech minulého století se cDDP začala vyrábět v Brně firmou Lachema a.s. Stala se tak schváleným cytostatikem i pro Českou republiku a v současné době se stále hojně používá. Největších účinků dosahuje v léčbě nádorů varlat, prostaty a vaječníků (Brabec 1990). U těchto nádorů je v 85 % případů dosaženo úplné remise. Používá se i k léčbě nádorů močového měchýře, malobuněčného nádoru plic, trávící trubice, u některých nádorů hlavy a krku (Brabec 1998) a děložního čípku (Lovejoy *et Lippard* 2009). Nevýhodou cDDP zůstává její neúčinnost na nejběžněji se vyskytující nádory prsu a tlustého střeva (Kelland 2007).

I přes poměrně velkou úspěšnost v léčbě nádorů se použití cDDP potýká s řadou omezení. Jedná se o již zmíněný problém malého spektra působnosti. Mezi další omezení můžeme zařadit mnohé vedlejší účinky léčiv – nefrotoxicita, nevolnosti a zvracení, průjemy, stomatitida, neurotoxicita, nekrózy kůže a podkoží (Adam *et al.* 2011). Téměř fatální nefrotoxicitu lze eliminovat hyperhydratací a následnou forsírovanou diurézou (Klener *et Klener jr.* 2010). V neposlední řadě se jedná o problém s rezistencí, ať už

přirozenou či získanou (Kelland 2007). Úskalím cDDP jsou i její přirozené mutagenní a kancerogenní vlastnosti (Brabec 1998).

V účinnosti cDDP hraje důležitou roli i průběh a komplexnost léčebné terapie. V rámci komplexnosti terapie hraje důležitou roli eskalace dávek léčiva, kombinace více druhů cytostatik (tzv. kombinovaná léčba), kombinace více léčebných postupů (např. chemoterapie spolu s chirurgickým zákrokem či s radioterapií) a nelze opomenout důležitost cirkadiálních rytmů. CDDP patří mezi fázově nespecifická cytostatika a lze ji tedy použít jak k léčbě rychle proliferujících nádorů, tak u solidních nádorů s pomalou proliferací. Samotná léčba probíhá vždy intravenózně formou infúze a léčebný proces probíhá opakovaně v 3-4 týdenních cyklech (Passeto *et al.* 2006).

Neopomenutelným faktem je, že *trans* izomer cDDP nevykazuje stejné protinádorové vlastnosti. Přestože se transplatina (trans-diammindichloridoplatnatý komplex, strukturní vzorec na obr. 2) liší od cDDP jen nepatrně, má poměrně rozdílné chemické, fyzikální a biologické vlastnosti (Brabec 1990). Transplatina sama o sobě vyvolává změny v konformaci DNA, ale tyto změny jsou natolik slabé, že nedokáží vyvolat smrt nádorových buněk. V poslední době však výzkumy ukázaly, že po aplikaci UV zářením dosahuje cytotoxicita transplatiny podobných účinků jako cDDP (Heringova *et al.* 2006) – viz kapitola 2.4 Fotodynamická terapie.



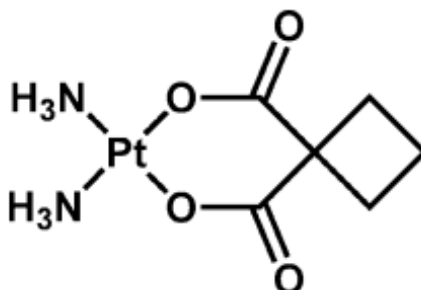
Obr. 2: strukturní vzorec transplatiny.

2.1.2 PLATNATÁ CYTOSTATIKA DRUHÉ GENERACE

Nevýhody spojené s toxicitou, především vysokou nefrotoxicitou, a rezistencí cDDP vedly k vývoji léčiv s lepšími farmakologickými vlastnostmi, širším spektrem protinádorové aktivity a menším množstvím nežádoucích účinků. Tyto látky se vyvíjí modifikací cDDP tak, že se nahradí odstupující chloridové ligandy (např. karboplatina). Případně je možné modifikovat i neodstupující amonné skupiny jinými funkčními skupinami (např. oxaliplatina). U těchto cytostatik druhé generace je vždy centrálním atomem platina v oxidačním stupni II.

KARBOPLATINA

Karboplatina (cis-diammincyklobutandikarboxylplatnatý komplex, strukturní vzorec na obr. 3) je prvním analogem odvozeným od cDDP. Karboplatina vzniká nahrazením odstupujících chloridových ligandů za cyklobutandikarboxylátový ligand.

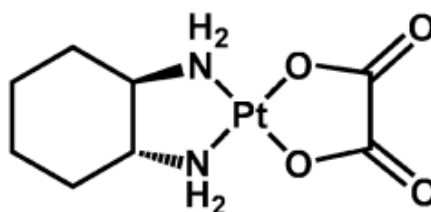


Obr. 3: strukturní vzorec karboplatiny.

Její mechanismus účinku se shoduje s působením cDDP, nicméně v porovnání s cDDP má méně vedlejších účinků. K těm hlavním však stále řadíme myelosupresi, zvracení, vypadávání vlasů a ochlupení, stomatitidu a neurotoxicitu (Adam *et al.* 2011). Stejně jako u cDDP je podání striktně nitrožilní, ale bez nutnosti hydratace, jako je tomu u cDDP a je možné ji podávat ve vyšších dávkách. Bohužel má stejné spektrum působnosti jako cDDP a při opakovaném podání se vytváří rezistence (Kelland 2007).

OXALIPLATINA

Oxaliplatina ((1R,2R-diamminocyclohexan)oxalát)platnatý komplex, strukturní vzorec na obr. 4) je cytostatikem třetí generace (Boulikas *et al.* 2007), které je využíváné ve standardní léčbě. Poprvé byla syntetizována v roce 1978 Kidanim *et al.* (Pizzaro, Sadler 2010). Tento analog se od cDDP liší nahrazením odstupujících chloridových ligandů za molekulu oxalátu a neodstupující amonné ligandy byly nahrazeny ligandem RR-dach (dach = diaminocyklohexan).

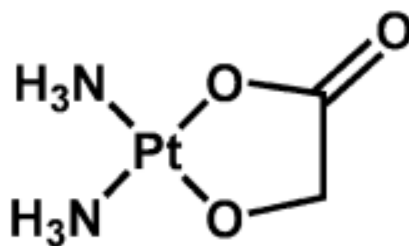


Obr. 4: strukturní vzorec oxaliplatiny.

Oxaliplatina se nejčastěji využívá k léčbě kolorektálního karcinomu (rakovina tlustého střeva) v kombinaci s 5-fluorouracilem (tzv. kombinovaná léčba) vůči kterému je cDDP neúčinná. Oproti předchozím dvěma cytostatikům má nejméně vedlejších účinků, přesto se vyznačuje periferní senzoricou neuropatií, nevolností a zvracením (Adam *et al.* 2011). Nižší toxicita je způsobena pomalejší hydrolyzou, během níž disociuje oxalátový ligand (Brabec *et Kasparkova* 2005a).

NEDAPLATINA

Nedaplatina (cis-diammin-glykolátplatnatý komplex, strukturní vzorec na obr. 5) je třetím analogem cDDP a byla vyvinuta v Japonsku a pouze zde je registrována k použití (Kelland 2007). Je schválena pro léčbu rakoviny hlavy a krku, plic, jícnu, vaječníků, děložního čípku a varlat (Boulikas *et al.* 2007). Oproti cDDP má sice méně nežádoucích účinků, celkově však nejsou pozorovány významnější výhody ve srovnání s cDDP (Brabec *et Kasparkova* 2005a). A stejně jako u cDDP je nutná hydratace léčiva před použitím (Boulikas *et al.* 2007).



Obr. 5: strukturní vzorec nedaplatiny.

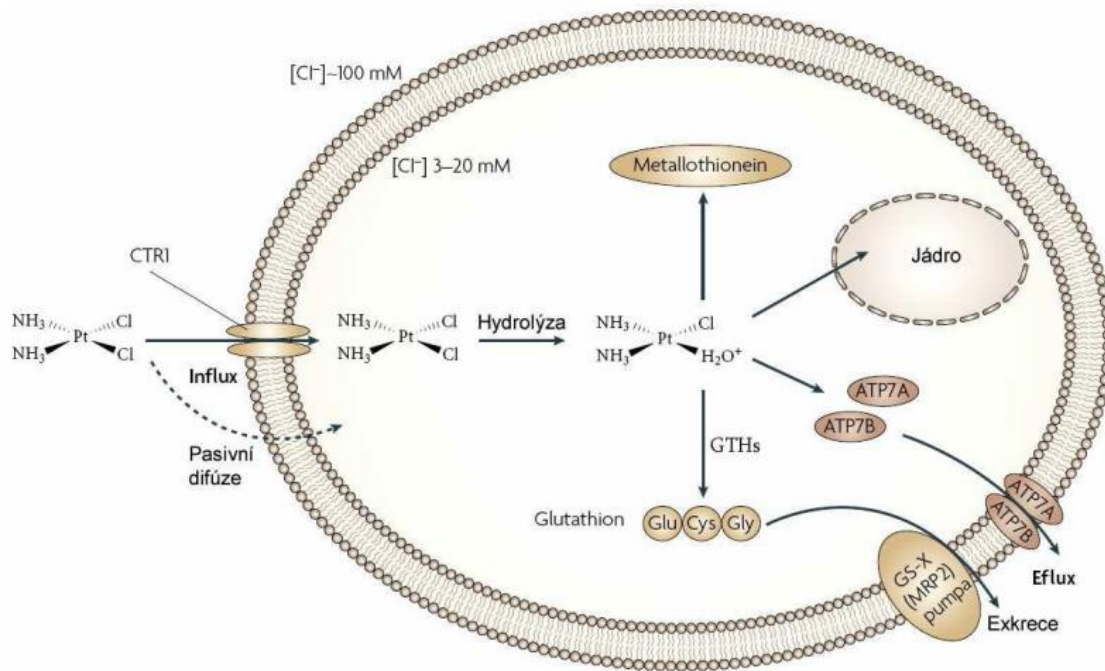
Z dalších zástupců lze jmenovat ormaplatinu, pikoplatinu, loboplatinu, heptaplatinu, satraplatinu a další (Pizzaro *et Sadler* 2009). Satraplatina byla jako první z platinových léčiv podána orálně a je používána u pacientů s rakovinou prostaty (Kelland 2007).

2.1.3 MECHANISMUS ÚČINKU CISPLATINY

CDDP je elektrofilní neutrální sloučenina, jejímž centrálním atomem je platina a na ní jsou v *cis* konformaci navázány dvě amonné skupiny a dva atomy chloru (viz. obr. 1). Amonné ligandy jsou k platině připojeny silnou koordinační vazbou, přičemž atomy chloru jsou navázány slabě a ve vodném prostředí snadno hydrolyzují. Proto atomy chloru označujeme jako odstupující skupiny.

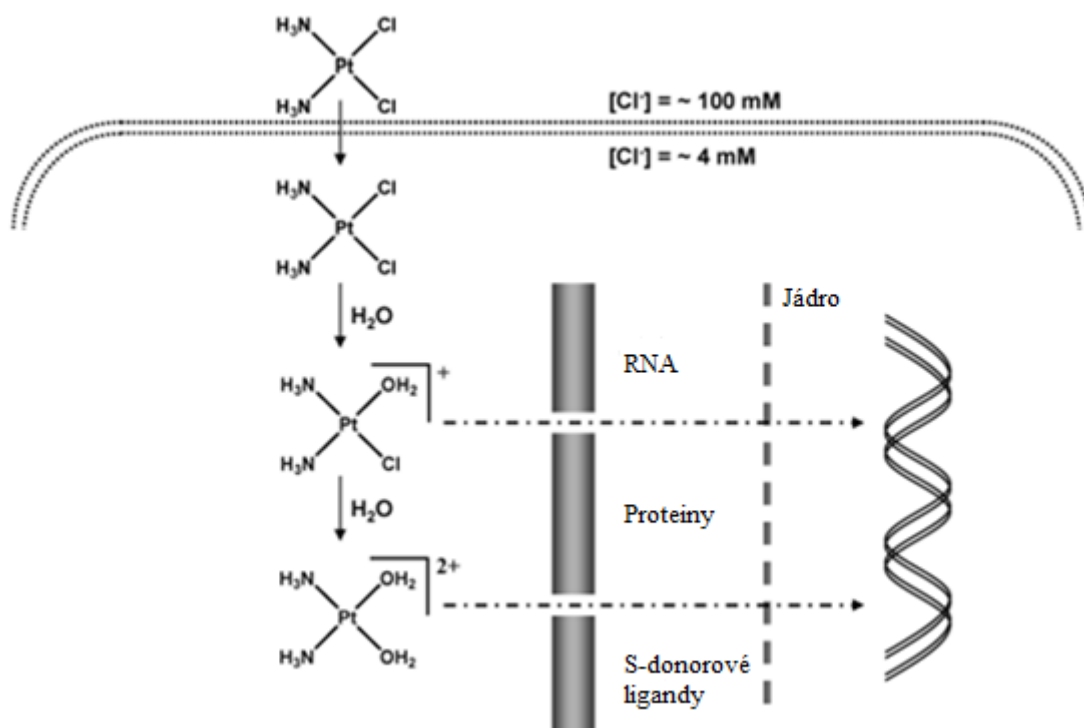
Stejně jako většina platnatých cytostatik je i cDDP pacientům podávána intravenózně, tedy přímo do krevního řečiště (Adam *et al.* 2011). A ještě před tím, než pronikne nádorovou buňkou k jádru, reaguje v krvi s různými chemickými látkami. Především se sloučeninami, které obsahují molekuly síry – thioly a thioetery, jako např. glutation (Brabec *et* Kasparikova 2005b). Ty bohužel při reakci s cDDP její protinádorové účinky inaktivují. Obecně se však cDDP nachází v krvi ve stabilní dichloroformě z důvodu vysoké koncentrace chloridových iontů, která se uvádí okolo 100 mM (Jung *et* Lippard 2007, Kelland 2007).

Před vstupem do vnitrobuněčného prostoru nádorové buňky, reaguje cDDP v buněčné membráně s fosfolipidy a fosfatidylserinem (Passeto *et al.* 2006). V cytoplazmě pak opět může reagovat se sloučeninami síry, s RNA či proteiny. Do buňky cDDP vstupuje dvěma různými způsoby – pasivní difúzí či aktivním transportem (Kelland 2007). Aktivní transport je zprostředkován proteinovými přenašeči, jímž jsou např. komplexy Ctr1, které přes membránu přenáší i měďnaté ionty (Brabec *et* Kasparikova 2005b, Kelland 2007). Tyto dva možné způsoby transportu jsou schematicky znázorněné na obr. 6.



Obr. 6: schématické znázornění průchodu cDDP cytoplazmatickou membránou buňky pomocí aktivního transportu (influx) či pasivní difúze. Znázornění hydrolyzy cDDP na monoaqua formu. Reakce hydratované formy cDDP se sloučeninami síry, průchod jadernou membránou do jádra buňky, aktivní export z buňky (převzato z Kelland 2007 a upraveno).

Jakmile se cDDP ocitne v buněčné cytoplazmě, tak dochází k hydrolyze, neboť uvnitř buňky je koncentrace chloridových iontů nižší a pohybuje se v rozmezí 3-20 mM (Jung *et* Lippard 2007, Kelland 2007). K hydrolyze cDDP dochází ve dvou krocích, přičemž nejprve dochází k výměně jednoho chloridového ligandu za molekulu vody a vzniká tzv. monoaqua forma, která se již označuje jako aktivní sloučenina. A ve druhém kroku se nahrazuje druhý chloridový ligand a vzniká diaqua forma (Jung *et* Lippard 2007) a z cDDP se stává kationt. Průběh hydrolyzy cDDP je schematicky znázorněn na obr. 7. Hydratovaná forma cDDP je elektrofilní a v cytoplazmě opět může reagovat se sloučeninami síry, s RNA či proteiny (Passeto *et al.* 2006), což je patrné z obr. 7. Důsledkem těchto reakcí se protinádorový účinek cDDP částečně snižuje, neboť se určité množství léčiva inaktivuje. Ke snížení množství cDDP přispívá i aktivní export (eflux) cDDP z buňky. Aktivní export je opět zprostředkován proteinovými přenašeči mědi (ATP7A, ATP7B) či pomocí MRP2 pumpy (Kelland 2007). Tyto exportní děje jsou znázorněny na obr. 6.

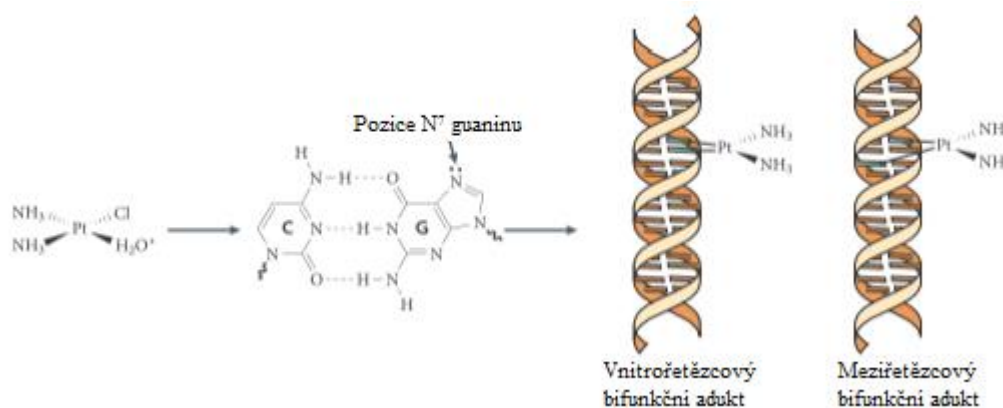


Obr. 7: schématické znázornění dvou krokové hydrolyzy cDDP. A znázornění potencionálních reaktantů reagujících v buněčné cytoplazmě s cDDP (převzato z Jung et Lippard 2007 a upraveno).

Cílovým místem působení cDDP v buňce je jaderná DNA (Brabec 1990). Ačkoliv cDDP v buňce reaguje s mnoha makromolekulami, jak již bylo zmíněno výše, přesto pouze reakce s DNA má požadované farmakologické účinky. To bylo prokázáno i experimentálně pomocí inkorporace radioaktivně značených prekurzorů (Popoff *et al.* 1987). Testy též prokázaly, že pouze 10 % z celkového množství podané cDDP se váže k DNA a na jednu molekulu DNA se váže 22 molekul platnatého komplexu (Brabec 1990). Pro srovnání na jednu molekulu mRNA se váže jedna molekula platnatého komplexu a na 1500 molekul proteinu připadá jeden platnatý komplex.

Aby měla cDDP požadovaný farmakologický účinek, je potřeba, aby se navázala na DNA. To se děje ve dvou krocích. Nejprve dochází k hydrolyze jednoho chloridového ligandu a vzniká aktivní monoaqua forma, která se váže kovalentně do velkého žlábků DNA k purinovým bázím. Přičemž se preferenčně váže na guanin (případně adenin) v poloze dusíku N⁷ (Brabec *et Kasparkova* 2005b, Jung *et Lippard* 2007). Tento proces je schématicky znázorněn na obr. 8. Takovýmto způsobem se na DNA vytvoří monofunkční adukt. V následujícím kroku dochází k hydrolyze druhého chloridového

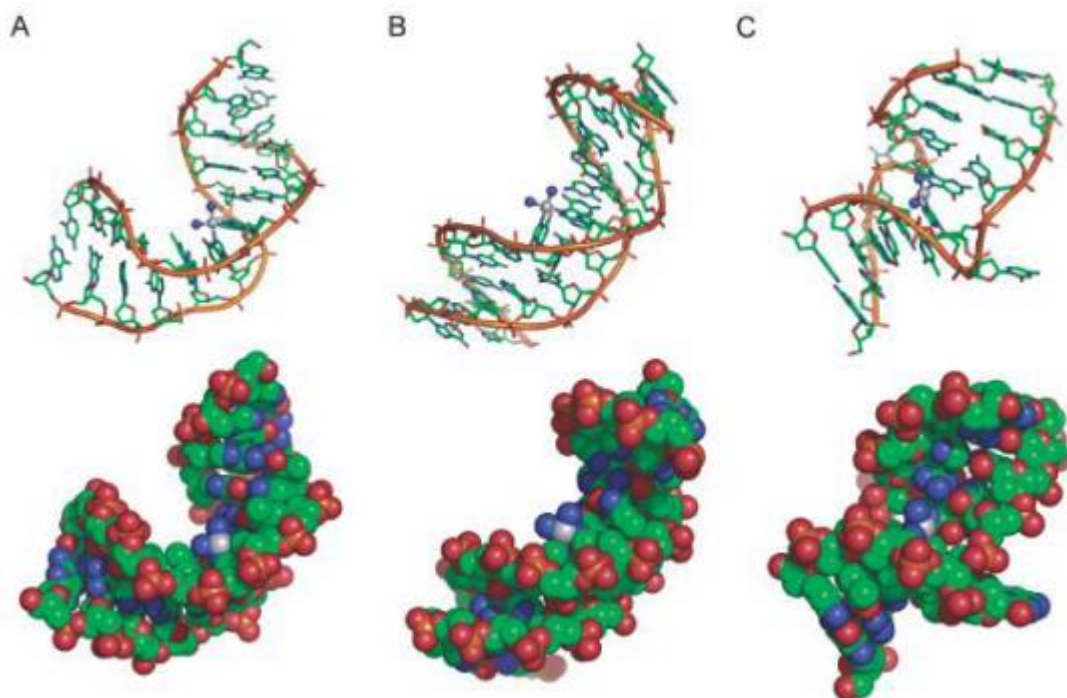
ligandu a jeho vazbě k reaktivnímu místu na DNA. Po navázání vzniká bifunkční adukt, který je nejčastěji vnitřetězcový případně meziřetězcový (obr. 8). V malém množství případů dochází k tvorbě i jiných typů aduktů.



Obr. 8: schematické znázornění vazby monoamina komplexu do preferenční pozice dusíku N7 guaninu. Schéma vnitřetězcového a meziřetězcového bifunkčního aduktu (převzato z Kelland 2007 a upraveno).

Jak již bylo zmíněno, tak nejčastější formou aduktů jsou vnitřetězcové můstky, které se nejhojněji tvoří mezi dvěma sousedními guaniny (1,2-GG). Tento typ aduktu se vyskytuje až v 65 % případů (Brabec 1990, Jung et Lippard 2007). Druhým nejčastějším aduktem je 1,2-AG, který se vyskytuje přibližně v 25 % případů. Dalším vnitřetězcovým aduktem je 1,3-GXG, kde X představuje A, C či T a tento typ aduktu je zastoupen 5-10 % případů. Méně častými adukty jsou meziřetězcové můstky a monofunkční adukty (Jung *et al.* Lippard 2007).

Po vytvoření aduktu dochází k tvorbě strukturních změn na DNA. Nejčastěji dochází ke konformačním změnám díky ohybu, zkrácení či odvíjení DNA, žlábků DNA se mohou rozvinout či zploštit (Brabec *et al.* Kasparkova 2005b), čímž dochází k destabilizaci DNA. Tyto strukturní změny jsou zobrazeny na obr. 9. Je známo, že struktura DNA je nejvíce narušena při tvorbě meziřetězcových můstků. Adukt 1,2-GG způsobuje v místě reakce rozvinutí DNA o přibližně 13° a ohýbá osu duplexu DNA o $35\text{--}40^\circ$ směrem k velkému žlábků (Jung *et al.* Lippard 2007). Z obr. 9 je však patrné, že k velkým konformačním změnám dochází i při tvorbě meziřetězcových aduktů. Ty vyvolávají rozvinutí DNA až o 79° , vlivem čehož se narušují „stacking“ interakce v molekule DNA. V oblasti meziřetězcových můstků dochází k přechodu DNA na levotočivou formu, což je způsobeno ohybem dvoušroubovice o 47° (Coste *et al.* 1999).



Obr. 9: konformační změny DNA způsobené tvorbou aduktů. (A) nejhojněji zastoupený vnitrořetězcový adukt 1,2-GG. (B) vnitrořetězcový adukt 1,3-GXG. (C) meziřetězcový adukt 1,3-GXG. Struktura konformačních změn DNA byla vytvořena programem PyMol (převzato z Jung *et Lippard* 2007).

Veškeré tyto konformační změny DNA mají za následek ovlivnění buněčného metabolismu. Nejčastěji se jedná o inhibici či narušení replikace, transkripce či opravných mechanismů DNA (Brabec *et Kasparkova* 2005b, Jung *et Lippard* 2007). V důsledku inhibice těchto důležitých buněčných mechanismů dochází k poškození celé buňky. Vlivem strukturních změn dochází i k ovlivnění mnoha různých signálních drah v buňce, např. p53, cyklin-dependentní kináza, cykliny, kaspázy, protein kináza C, pRb a mnoho dalších (Passeto *et al.* 2006). Narušením všech těchto nezbytných buněčných procesů dochází k řízené buněčné smrti – apoptóze.

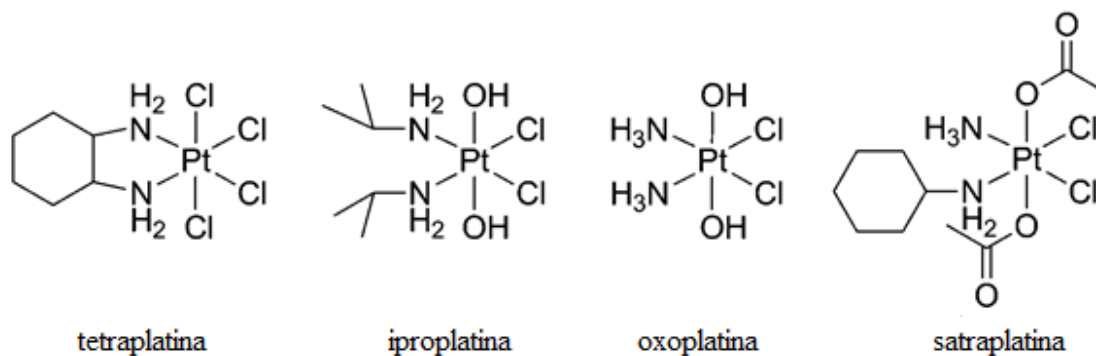
2.2 NOVÁ LÉČIVA

2.2.1 LÉČIVA NA BÁZI PLATINY (IV)

Platičitá léčiva obsahují jako centrální atom platínu v oxidačním stupni IV. Tyto komplexy mají oktaedrální strukturu, která je kineticky více inertní než komplexy Pt(II), a proto podléhají substituci pomaleji (Bednarski *et al.* 2006). Dále jsou metabolicky více stabilní, díky čemuž jsou méně toxické a mají užší spektrum vedlejších účinků. Další výhodou je i jejich vyšší rozpustnost ve vodě (Pizzaro *et Sadler* 2009).

Tato skupina léčiv je ve své původní podobě neaktivní a musí dojít k jejich aktivaci. Ta je způsobena vlivem redukčních činidel obsažených v organismu. Dochází k odtržení axiálních ligandů a komplex přechází na oxidační stupeň II (Hall *et Hambley* 2002). Tato forma sloučeniny je již reaktivní a hydrolýza a reakce s DNA již probíhá stejným způsobem jako u cDDP.

Do této skupiny léčiv řadíme tetraplatinu, iproplatinu a oxoplatinu (Hall *et Hambley* 2002) a jejich strukturní vzorce jsou na obr. 10. Tyto komplexy jsou stále ve fázi klinického testování. Dalším zástupcem je satraplatina, která byla schválena ke klinickému používání v roce 2007 a její velkou výhodou je perorální podání (Kelland 2007). Využívána je především k léčbě nádorů prostaty.



Obr. 10: strukturní vzorce platičitých komplexů – tetraplatiny, iproplatiny, oxoplatiny a satraplatiny (převzato z Xu *et al.* 2015 a upraveno).

Velkou výhodou této skupiny léčiv je jejich možné specifické působení, díky fotoaktivaci v cílovém místě působení (Pizzaro *et Sadler* 2009). Tato aktivace světlem zajistí přechod komplexu z neaktivního Pt(IV) na aktivní Pt(II) pouze v nádorové oblasti. Tyto možnosti cílené terapie budou více rozebrány v kapitole 2.4 Fotodynamická terapie.

2.2.2 LÉČIVA NA BÁZI TITANU

Do této skupiny léčiv řadíme látky, jejichž centrálním atomem je titan v oxidačním stupni IV. Hlavními zástupci jsou dvě léčiva – budotitan a titanocen (Gielen *et* Tiekink 2005). U obou látek byla popsána interakce s jadernou DNA, a proto byly dále zkoumány jako potenciální protinádorová léčiva. Tyto látky mají stejně jako cDDP dva odstupující ligandy v poloze *cis*, nicméně jejich spektrum působnosti se od cDDP značně liší.

Budotitan je prvním neplatnatým léčivem, které bylo klinicky testováno. V experimentech na myších se prokázal jako vhodné terapeutikum pro léčbu pomalu rostoucích nádorů (Gielen *et* Tiekink 2005). A to především v gastrointestinální oblasti. Ovšem z důvodu nízké stability, byly klinické testy ukončeny.

2.2.3 LÉČIVA NA BÁZI ZLATA

Dalším potenciálním kovem, který by se mohl uplatnit jako potenciální cytostatikum je zlato. Možné protinádorové účinky byly experimentálně potvrzeny, nicméně doposud nebyly žádné komplexy zlata klinicky testovány (Gielen *et* Tiekink 2005). Ovšem léčivo Auranofin, které je používáno k léčbě artritidy, je cytotoxické vůči HeLa buňkám a leukémii P388. Tato látka a její analogy obsahující síru a fosfor jsou nyní hojně studovány. Obecně se však sloučeniny zlata využívají převážně k léčbě artritidy, HIV, malárie a bronchiálního astmatu (Allardyce *et* Dyson 2001).

2.2.4 LÉČIVA NA BÁZI ŽELEZA

Organokovové sloučeniny jsou všeobecně vhodnými kandidáty na protinádorová léčiva. Důvodem jsou jejich koordinační a redoxní vlastnosti a kationty kovů zajišťují možné navázání na záporně nabitě biomakromolekuly (Gielen *et* Tiekink 2005). I atom železa se jeví jako možný kandidát pro centrální atom komplexů protinádorových léčiv. Nevýhodou komplexů s atomem železa je jejich hromadění v organismu a následná toxicita. Nicméně i přes tyto skutečnosti se molekulární modelování léčiv (drug design) zabývá ferrocenem a jeho deriváty jako potenciálními cytostatiky. Nedávné důkazy ukázaly, že ferroceny mohou působit jako stimulatory imunitního systému či jako

inhibitory topoizomerázy II. Výhodou ferrocenu je stabilita ve vodném prostředí a lipofilní charakter, díky čemuž snadno prochází buněčnou membránou (Dive *et* Biot 2008). Současně se tato látka testuje jako možné antimalarikum.

2.2.5 DALŠÍ ORGANOKOVOVÁ LÉČIVA

Cín jakožto centrální atom v komplexech se jeví jako velmi dobrý kandidát na cytostatikum. Komplex di-*n*-butyltin diterebát byl v experimentech účinnější než cDDP a jeho cytotoxicita byla srovnatelná s doxorubicinem (Dive *et* Biot 2008). I proto jsou další organické sloučeniny cínu s karboxylovými a dikarboxylovými kyselinami syntetizovány a testovány na protinádorovou aktivitu.

Komplexy palladia Pd(II) obsahující síru mají též dobré protinádorové účinky. V mnoho případech prokázaly vyšší cytotoxické účinky než cDDP a jsou aktivní i na nádorové linie, které jsou rezistentní vůči cDDP (Dive *et* Biot 2008). U těchto komplexů byla prokázána vyšší účinnost při léčbě rakoviny vaječníků v porovnání s cDDP, zároveň se však projevila vysoká nefrotoxicita. Přesto jsou komplexy palladia intenzivně zkoumány a některé z nich by se daly využít v kombinované léčbě s již zavedenými cytostatiky. Palladium se využívá k léčbě HIV a k výrobě dentálních slitin (Allardyce *et* Dyson 2001).

U vápníku byla prokázána souvislost mezi příjmem mléčných výrobků a nižším rizikem rozvoje rakoviny tlustého střeva (Dive *et* Biot 2008). Ekvivalentní výsledky nebyly pozorovány u doplňků stravy v podobě uhličitanu vápenatého.

Důležité je i studium zinku, u kterého byla prokázána souvislost mezi nedostatkem zinku v organismu a vyšším rizikem vzniku nádorového onemocnění, především rakoviny prostaty (Dive *et* Biot 2008). Zinek má také důležitou roli při ochraně DNA před poškozením, jako antioxidant, je součástí mnoho oprav DNA a je protizánětlivý.

Velmi slibnými kandidáty jsou komplexy rhodia a to především Rh(I), Rh(II) a Rh(III). Rhodium se mimo jiné využívá jako radiosensitizér, k léčbě bakteriálních infekcí, malárie, leishmaniózy a k výrobě dentálních slitin (Allardyce *et* Dyson 2001). Dalšími vhodnými kandidáty jsou mangan, iridium či osmium (Dive *et* Biot 2008).

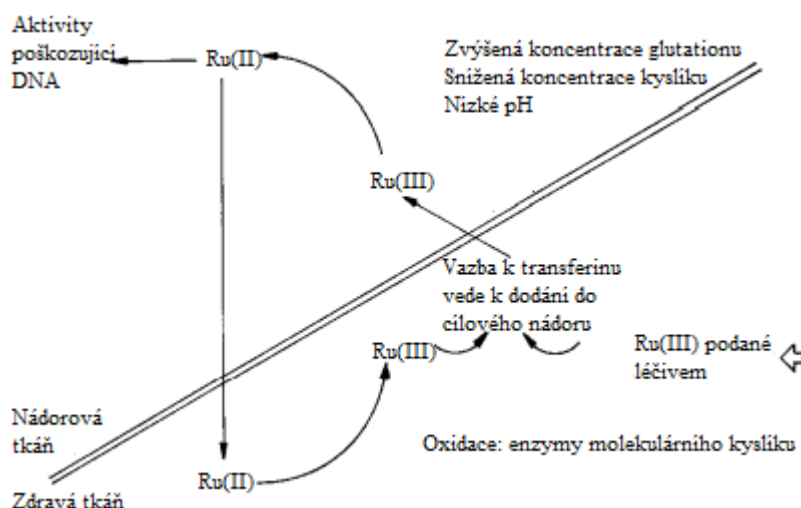
2.3 LÉČIVA NA BÁZI RUTHENIA

Prvek ruthenia byl objeven roku 1844 Karlem Karlovitchem Klausem. Je to tvrdý bílý kov, který má uplatnění především v metalurgii (Gielen *et* Tiekink 2005). V posledních dvaceti letech však ruthenium našlo své uplatnění i v medicíně, např. v radiodiagnostice, komplexy ruthenia se využívají jako imunosupresiva, antibiotika, antimalarika či chemoterapeutika (Allardyce *et* Dyson 2001). Takové komplexy jsou vybírány buď na základě analogie s jinými protinádorovými léčivy, nebo na základě studia vlastností konkrétních komplexů (Gielen *et* Tiekink 2005).

2.3.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI KOMPLEXŮ RUTHENIA

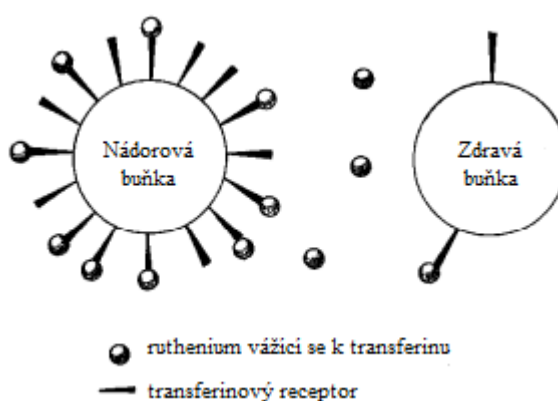
Ruthenium se díky svým vlastnostem velmi dobře hodí k léčebným aplikacím. Mezi tyto vlastnosti lze zařadit rychlou výměnu ligandů, široký rozsah oxidačních stavů ruthenia a schopnost ruthenia napodobit železo ve vazbě na biologické molekuly (Allardyce *et* Dyson 2001). Oproti cDDP má ruthenium šest koordinačních míst a nejčastěji se syntetizuje s aminovými a iminovými ligandy, které poskytují mnoho inovačních metalofarmak (Clarke 2002). Dále jsou známé thiolové komplexy Ru a komplexy s flavonoidy, ale z důvodu jejich nestability se nevyužívají.

Ruthenium se vyskytuje ve všech oxidačních stavech od 0 do VIII (Gielen *et* Tiekink 2005), nejčastějšími jsou však stupně Ru(II), Ru(III) a Ru(IV), které mají ve vodném roztoku obvykle oktaedrickou geometrii (Allardyce *et* Dyson 2001, Clarke 2002). Nejstabilnějším stupněm je Ru(III), přičemž elektronový přechod z Ru(III) na Ru(II) je v nádorových buňkách velice snadný, jelikož v nich panuje redukční prostředí (Allardyce *et* Dyson 2001). V případě, že Ru(II) opustí místo s nízkou koncentrací kyslíku, může snadno pomocí oxidantů přejít na Ru(III), jak je schematicky znázorněno na obr. 11.



Obr. 11: mění se oxidační stav ruthenia ve zdravé a nádorové tkáni. Redukční prostředí rakovinné buňky upřednostňuje Ru(II), které je biologicky aktivnější než Ru(III). Ru(III) fungují tedy jako proléčiva, která se aktivují redukcí při dosažení nádorové buňky (převzato z Allardyce et Dyson 2001 a upraveno).

Vzhledem k tomu, že rychle se dělící buňky mají vyšší požadavky na přísun železa, je výhodou rutheniovým komplexů, že se váží k transferinu a albuminu. Bylo totiž prokázáno, že po aplikaci je ruthenia 2-12 krát více v rakovinných buňkách, než ve zdravých (Allardyce et Dyson 2001). A to díky tomu, že nádorové buňky mají na membráně mnohonásobně větší počet transferinových receptorů. I díky tomuto faktu je toxicita pro zdravé buňky snížena a rutheniové komplexy mají méně vedlejších účinků.



Obr. 12: schematické znázornění selektivního vychytávání transferinu u nádorových buněk. Většina rakovinných buněk má vyšší počet transferinových receptorů (vlevo) ve srovnání se zdravými buňkami (vpravo). Ruthenium se tedy zaměřuje na nádorové buňky (převzato z Allardyce et Dyson 2001 a upraveno).

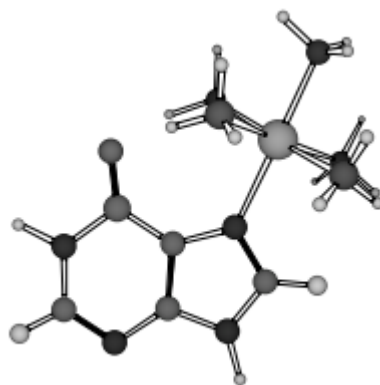
2.3.2 MECHANISMUS ÚČINKU

Vzhledem k osmiboké struktuře komplexů Ru(II) a Ru(III), oproti čtvercové rovinné struktuře cDDP, působí rutheniové komplexy pravděpodobně jiným mechanismem (Clarke 2002). Jak bylo již naznačeno výše, nejprve musí dojít k přenosu komplexu do nádorové tkáně. Mnohé ze studovaných rutheniových komplexů se v krvi snadno vážou k transferinu a albuminu. Transferin pak usnadňuje jejich průchod do nádorových buněk. Bohužel v buňce mají komplexy větší preferenci k vazbě k imidazolu na proteinech, než ke guaninu na DNA (Clarke 2002). Uvolnění Ru(III) z transferinu se indukuje nízkým pH, které se v nádorových buňkách nachází.

Dále dochází k redukci Ru(III) na Ru(II). K té dochází přednostně v nádorových buňkách, jelikož v nich je nižší koncentrace kyslíku (tzv. hypoxie) a z tohoto důvodu je v buňkách upřednostňována glykolýza. Při ní se však uvolňuje kyselina mléčná, která snižuje hodnotu pH v rakovinných buňkách. Dále je známo, že Ru(II) je reaktivnější a zvyšuje se tak selektivní toxicita pro nádor (Clarke 2002).

Dalším krokem je aktivace Ru(II) komplexu. Stejně jako u cDDP musí dojít k hydrolyze, tedy nahrazení ligandů molekulou vody. Jednotlivé ligandy mohou díky svým rozmanitým geometrickým efektům usnadnit či inhibovat vazbu komplexu k nukleovým kyselinám.

Posléze se hydrolyzovaný komplex ruthenia váže kovalentně k DNA. Nejčastější je vazba k purinům v poloze dusíku N⁷ (Clarke 2002), jak je znázorněno na obr. 13.



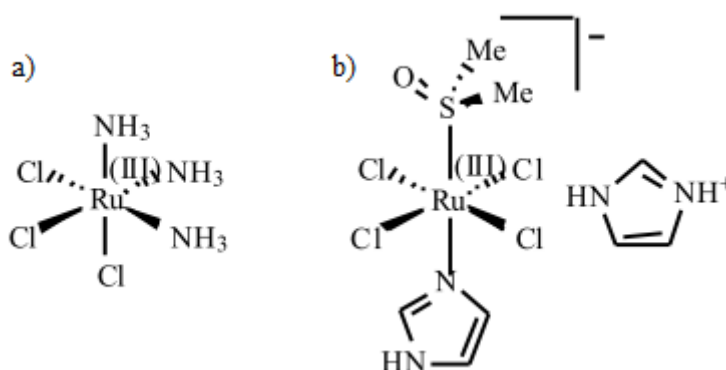
Obr. 13: vazba komplexu $[(\text{Hyp}\kappa^7)(\text{NH}_3)_5\text{Ru}]^{3+}$ k preferenčnímu dusíku N⁷ na adeninu případně na guaninu (převzato z Clarke 2002 a upraveno).

Zda dochází k tvorbě monofunkčního aduktu, který je znázorněn na obr. 13, či bifunkčního aduktu záleží na konkrétním typu rutheniového komplexu. Jednotlivé komplexy pak způsobují různé poškození DNA. Může jimi být např. mutagenní aktivita, inhibice replikace DNA, indukce SOS oprav, vazba na jadernou DNA a snížení syntézy RNA (Brabec *et* Nováková 2006, Clarke 2002). Cílem některých komplexů jsou i mitochondrie či povrch nádorových buněk. Ačkoliv se předpokládá, že protinádorové komplexy ruthenia mají jiný mechanismus účinku než cDDP, jejich molekulární mechanismus není doposud zcela prozkoumán.

2.3.3 PROTINÁDOROVÉ SLOUČENINY RUTHENIA

Potenciální protinádorová aktivita ruthenioých sloučenin byla nejprve zkoumána skupinou vědců kolem Clarka, kteří studovali chlor-amino deriváty (Gielen *et* Tiekink 2005). Tyto sloučeniny byly vybrány především kvůli jejich podobnosti s cDDP. Ačkoliv se tyto komplexy s DNA interagují poměrně rychle, nejsou v protinádorové léčbě příliš účinné. Nejslibnějším zástupcem této skupiny byl komplex *fac*-[Ru^{III}(NH₃)₃Cl₃], nicméně i ten byl zamítnut z důvodu malé rozpustnosti ve vodě. Strukturální vzorec tohoto komplexu je na obr. 14 a).

Rozpustnost komplexů lze zlepšit nahrazením amino ligandů za dimethylsulfoxid (DMSO). Počáteční studie byly provedeny Mestronim, Alessiem a spolupracovníky (Gielen *et* Tiekink 2005). Na základě těchto komplexů byla vytvořena i sloučenina NAMI-A ((H₂Im)[*trans*-Ru(DMSO)Cl₄(Im)]), jejíž strukturální vzorec je na obr. 14 b).

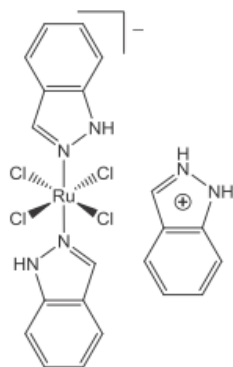


Obr. 14: a) strukturální vzorec komplexu *fac*-[Ru^{III}(NH₃)₃Cl₃], b) strukturální vzorec komplexu (H₂Im)[*trans*-Ru(DMSO)Cl₄(Im)], NAMI-A (převzato z Alessio *et al.* 2004 a upraveno).

Nejprve dojde k hydrolyze dvou chloridových ligandů a vytvoří se aktivní aqua forma (Brabec *et Nováková* 2006). NAMI-A se na DNA váže mnohem rychleji než cDDP a na DNA vytváří bifunkční vnitřetězcové adukty a tím zastavuje syntézu RNA *in vitro*. Působí na proliferaci buněk, zastavují buněčný cyklus v G₂-M fázi, kromě toho i modifikují morfologii buněčné membrány (Alessio *et al.* 2004).

Komplex NAMI-A jako jeden ze dvou ruthenioých komplexů dosáhl klinických studií a úspěšně dokončil I. fázi studia, kdy byl testován na 24 pacientech (Alessio *et al.* 2004, Bergamo *et al.* 2012). Toto léčivo má protinádorové a antimetastázové vlastnosti a *in vivo* prokazuje vysokou efektivitu proti plicním metastázám (Brabec *et Nováková* 2006). Je tedy zřejmé, že spektrum protinádorových účinků se liší od cDDP. Ve studii bylo též prokázáno, že NAMI-A je v průměru 1053 krát méně cytotoxická než cDDP. Což lze vysvětlit sníženou reaktivitou s DNA. Navíc působí synergicky při použití v kombinaci s dalším cytostatikem (Bergamo *et al.* 2012). Další výhodou je i zachování účinnosti při opakovaném podání. Mezi vedlejší účinky patří celková malátnost, tvorba kožních puchýřů a po injekčním podání se v místě vpichu může objevit zánět žil.

Druhým komplexem, který prošel I. fází klinického testování na 8 pacientech je KP1019 ((HInd)[Ru(III)Cl₄(Ind)₂]), jehož strukturní vzorec je na obr. 15. Byl vyvinut skupinou profesora Kepplera a nyní se častěji označuje jako FFC14a (Bergamo *et al.* 2012). Jeho předností jsou pozitivní výsledky při léčbě kolorektálního karcinomu a stejně jako komplex NAMI-A má značné antimetastázové vlastnosti. Dále se vyznačuje minimem vedlejších účinků (Brabec *et Nováková* 2006). Jako většina ruthenioých komplexů se váže na transferin a v nádorových buňkách způsobuje apoptózu, která je vyvolána depolarizací mitochondriální membrány (Bergamo *et al.* 2012).



Obr. 15: chemická struktura komplexu ((HInd)[Ru(III)Cl₄(Ind)₂], KP1019 (převzato z Bergamo *et al.* 2012).

2.4 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Fotodynamická terapie (PDT) je metoda, která využívá neionizující záření k aktivaci určitých chemických látek, které po ozáření konkrétní vlnovou délkou nabývají vysoké biologické aktivity (Klener *et Klener jr.* 2010). Díky této mimořádné aktivitě pak mohou zastavit nádorové bujení. Účinkem záření se v buňce uvolňují kyslíkové radikály (singletní kyslík, superoxidový kyslíkový radikál, hydroxylový radikál aj.), které jsou schopné vyvolat takové poškození buněčných struktur, které vedou k apoptóze či nekróze. Určité druhy fotosenzibilizačních látek působí přímo na endotelie nově vytvořených cév nádoru, díky čemuž se poruší krevní zásobení nádoru a ten postupně odumírá.

Fotodynamická terapie je druh fotochemoterapie a se označuje jako specifická léčebná metoda (Klener *et Klener jr.* 2010). Jednak proto, že využívané chemické látky se vychytávají preferenčně v rakovinných buňkách a buňkách jaterních a kožních a jednak proto, že účinek terapie se projeví v oblasti, která byla selektivně ozářena. Aby byla tato metoda ještě více selektivní, lze fotosenzitivní látky navázat na nosiče, kterými mohou být monoklonální protilátky, polymery či nanočástice.

2.4.1 VÝVOJ FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

Fotodynamická terapie má své kořeny již ve starověku, ačkoliv se nejednalo o fotodynamickou terapii v takovém smyslu, jak ji chápeme dnes. Již po několik staletí se využívalo samotného účinku světla či účinku světla v kombinaci s chemickými sloučeninami (Pervaiz *et Olivo* 2006). K léčbě kožního onemocnění vitiligo se ve starověké Indii, Číně a Egyptě využívala chemická látka psoralen v kombinaci se světlem a k léčbě psoriázy se využívalo samotných účinků světelného záření. Látky na bázi psolarenů se v lékařství využívají do teď v tzv. PUVA terapii k léčbě psoriázy, vitiliga a v imunoterapii (Ackroyd *et al.* 2001). Světlo se dále využívalo k léčbě lupénky, rakoviny a dokonce i psychózy.

V 18. a 19. století se ve Francii využívalo sluneční záření k léčbě tuberkulózy, křivice, kurdějí, revmatismu a dalším onemocněním (Ackroyd *et al.* 2001). Dánský lékař Finsen pomocí červeného světla léčil neštovice a s pomocí ultrafialového záření a uhlíkové fototerapie léčil tuberkulózu, za což v roce 1903 obdržel Nobelovu cenu.

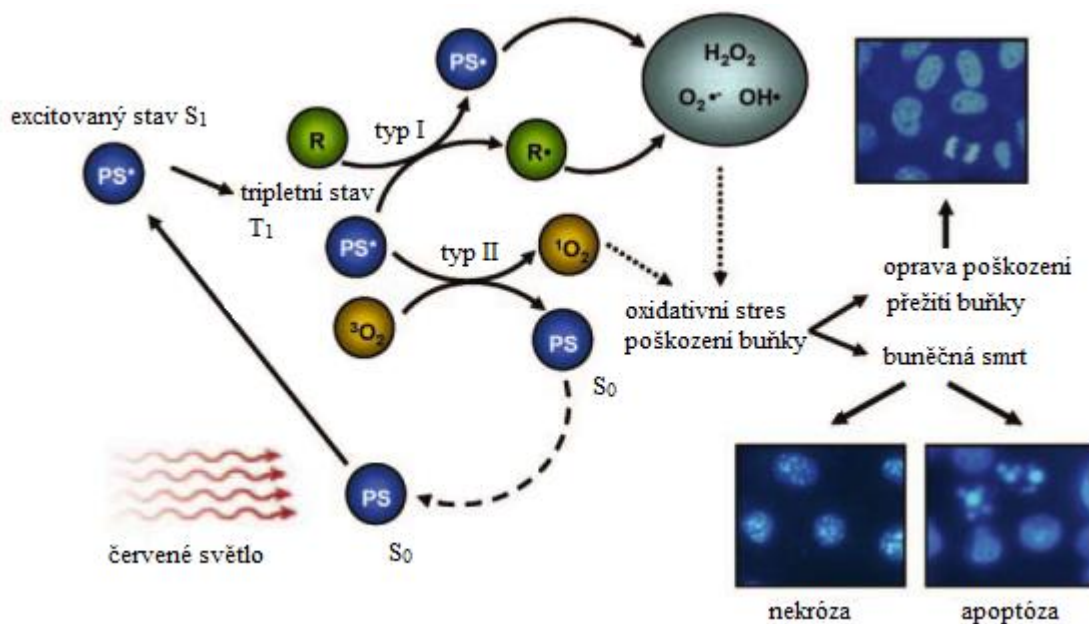
Velkým pokrokem ve fotodynamické terapii byl objev Oscara Raaba, který pracoval s profesorem von Tappeinerem v Mnichově, kteří zjistili, že kombinace akridinové červeně a světla má smrtící účinky na prvoky rodu *Paramecium* (Ackroyd *et al.* 2001, Pervaiz *et Olivo* 2006). Von Tappeiner se účastnil i prvního lékařského využití této aplikace. Spolu s dermatologem Jesionekem aplikovali pacientovi na kůži eosin (fluorescentní červené barvivo) v kombinaci s bílým světlem k léčbě kožního nádoru (Ackroyd *et al.* 2001). Von Tappeiner i dále pokračoval v prokázání nutnosti přítomnosti kyslíku při fotosenzitivní reakci a roku 1907 zavedl termín fotodynamický efekt.

Hlavním milníkem fotodynamické terapie je rok 1975, kdy Dougherty a jeho spolupracovníci úspěšně vyléčili nádor u myši při kombinaci hematoporfyrinového derivátu (HpD) a červeného světla (Ackroyd *et al.* 2001).

2.4.2 MECHANISMUS FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

Fotodynamická terapie je metoda kombinující účinek viditelného záření, fotosenzitivní látky (PS) a molekulárního kyslíku O₂ (Juarranz *et al.* 2008). Fotosenzitivní látky se vyznačují tím, že se selektivně hromadí v nádorové tkáni a cytotoxický efekt těchto látek se projeví po aktivaci světlem o konkrétní vlnové délce (Juarranz *et al.* 2008, Pervaiz *et Olivo* 2006). Vlnová délka se nejčastěji volí z červené spektrální oblasti, tedy větší než 600 nm, z důvodu hlubšího průniku záření tkání. Následně je energie z excitovaného fotosenzitizéru přenesena na molekulární kyslík, který přechází na singletní kyslík a další reaktivní formy kyslíku (ROS). Ty jsou vysoce reaktivní a spouští kaskádu biochemických procesů v buňce, které vedou k poškození a smrti nádorových buněk (Juarranz *et al.* 2008). Mechanismus je zachycen na obr. 16.

Hlavními výhodami fotodynamické terapie je velmi nízká systémová toxicita, díky PS, které jsou aktivní pouze po ozáření (Juarranz *et al.* 2008). Dále pak selektivní působení a možnost samostatné aplikace či aplikace v kombinaci s ostatními léčebnými technikami (tj. chemoterapie, chirurgie a další). PS se mohou podávat buďto systémově nebo topicky v závislosti na typu nádoru a jeho lokalizace. Hlavními požadavky na PS jsou nereaktivita ve tmě, sám o sobě musí být netoxický a měl by mít vlastní fluorescenci, čehož se dá využít i v diagnostice nádorů (Pervaiz *et Olivo* 2006).



Obr. 16: mechanismus fotodynamické terapie, která vyžaduje červené světlo, fotosenzitivní látku a molekulární kyslík. PS se ze základního singletního stavu S_0 světlem aktivuje na excitovaný stav S_1 a dále následuje mezisystémový přechod na excitovaný tripletní stav T_1 . Ze stavu T_1 se přenáší energie do biologických substrátů a molekulárního kyslíku reakcemi typu I a II a tím jsou generovány ROS. Ty vyvolávají poškození buňky, které může být buď opraveno, nebo vede k buněčné smrti (převzato z Juarranz *et al.* 2008 a upraveno).

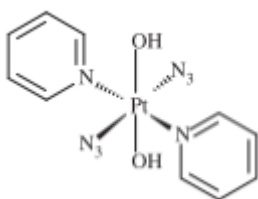
S rozvojem techniky není nutné zaměření pouze na nádory kůže a jiné snadno přístupné tumory. K léčbě a k co nejpřesnějšímu zaměření na nádor se v dnešní době využívají lasery, LED, luminiscenční diody či optická vlákna v kombinaci s endoskopií. Díky tomu se tato metoda stala přístupná pro nádory močového měchýře, gastrointestinálního traktu, gynekologické nádory, nádory plic a jícnu (Bednarski *et al.* 2006). Všeobecně je velkou výhodou, pokud je nádor snadno přístupný záření, jelikož červené světlo proniká tkáň do hloubky pouhých 5 mm (Berners-Price 2011). V případě UVA záření o vlnové délce 365 nm je to pouhý 1 mm. Jednou z hlavních nevýhod této metody je malé množství kyslíku v nádorové tkáni, který je ovšem pro reakci nezbytný.

Pro PDT bylo schváleno pouze několik málo fotosenzitizérů, které prošly klinickým testováním. Jedná se o Photofrin, Visudyne (verteporfin) a Levulan (Ackroyd *et al.* 2001). Photofrin byl schválen v roce 1994 k léčbě karcinomu jícnu, Foscan v roce 2001 k léčbě nádorů hlavy a krku (Juarranz *et al.* 2008). Pro topické použití se využívá Levulan a Metvix.

2.4.3 FOTOAKTIVACE PLATIČITÝCH A PLATNATÝCH KOMPLEXŮ

Komplexy platiny (IV) jsou obecně méně reaktivní než komplexy platiny (II), čehož využil profesor Sadler k vytvoření neaktivních proléčiv (Berners-Price 2011). Ty po ozáření přechází z oxidačního stupně IV na aktivní oxidační stupeň II. Prvních pokusů o vývoj platičitých proléčiv se zhostil profesor Bednarski a jeho kolegové, kteří vytvořili diiodoplatičité komplexy. Ty se však ukázaly jako ne příliš vhodné, neboť nebyly ve tmě stabilní a v organismu reagovaly příliš brzy s glutationem a přecházely na aktivní formu v oxidačním stupni II (Bednarski *et al.* 2006, Bednarski *et al.* 2013, Berners-Price 2011).

Významnějšími zástupci fotoaktivovatelných platičitých komplexů jsou diazidoplatičité komplexy. Na jejich vývoji se podílel profesor Sadler a jeho spolupracovníci. Oproti diiodoplatičítým komplexům se tyto komplexy vyznačují stabilitou ve tmě a značnou cytotoxicitou po aktivaci UV zářením (Bednarski *et al.* 2013). Tato skupina látek obsahuje mnoho aktivních komplexů, nicméně nejvýznamnějším z nich je *trans, trans, trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(pyridin)₂] (FM190) a jeho struktura je zobrazena na obr. 17. Výhodou tohoto komplexu je, že se aktivuje za použití UVA nebo viditelného záření (Pracharova *et al.* 2012). Tento komplex po fotoaktivaci způsobuje na DNA odlišné poškození a je schopen zastavit RNA polymerázu II účinněji než cDDP. Obrovským kladem komplexu FM190 je, že při aktivaci UVA zářením nevyžaduje přítomnost kyslíku v nádorových buňkách, nicméně v buňce produkují reaktivní formy dusíku RNS (Bednarski *et al.* 2013). Proto je FM190 vhodným kandidátem pro preklinické testování (Bednarski *et al.* 2006).



Obr. 17: strukturální vzorec komplexu *trans, trans, trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(pyridin)₂] (FM190).

Stejný přístup fotoaktivace je možné využít i u platnatých komplexů. Při světelné aktivaci cDDP se neprokázala její zvýšená cytotoxicita, nicméně při aktivaci UV zářením se neaktivní transplatina stala stejně cytotoxickou jako cDDP (Heringova *et al.* 2006). A takto aktivovaná transplatina tvořila meziřetězcové adukty na DNA. U cDDP se zjistilo,

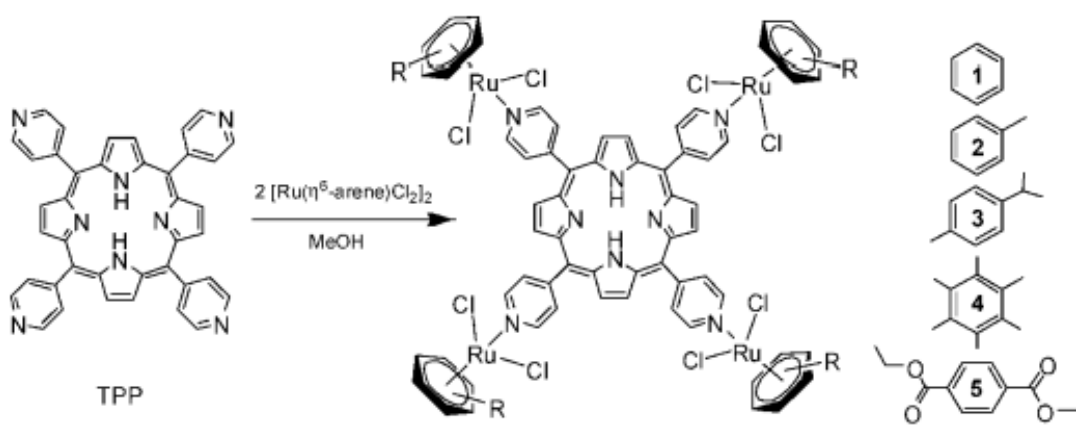
že tvoří větší množství konformačních změn při kombinaci s ionizujícím zářením na DNA *in vitro* (Vrana *et Brabec* 1986).

Vliv záření byl testován i na dalších platnatých komplexech. Jedním z nich je např. karboplatina. U tohoto komplexu byl experimentálně prokázán pozitivní vliv UV záření při vazbě karboplatiny na DNA (Mlcouskova *et al.* 2012). Fotoaktivací se zvyšuje reaktivita tohoto komplexu. Stejně jako byl studován vliv záření na karboplatinu, byla testována i oxaliplatina, u níž však vlivem záření nedošlo ke zvýšení reaktivity a cytotoxicity (Vaverkova 2013).

2.4.4 FOTOAKTIVACE RUTHENIOVÝCH KOMPLEXŮ

U fotoaktivovatelných komplexů ruthenia platí stejné zásady, jako u předchozích látek. Komplex musí být v základním stavu stabilní a netoxický, měl by mít dobře popsány fotofyzikální vlastnosti, efektivní fotochemickou konverzi na aktivní formu a měl by silně absorbovat v oblasti dlouhých vlnových délek 640-850 nm (Clarke 2002).

Ukázalo se, že k těmto účelům jsou vhodné různé struktury komplexů. Jednou ze dvou hlavních skupin jsou aren-rutheniové komplexy vážící se na tetrafenylporfyrinové jádro (TPP, 5,10,15,20-tetra(4-pyridin)porfyrin). Arenem může být benzen C_6H_6 , toluen $C_6H_5CH_3$, p - i Pr C_6H_4Me , C_6Me_6 či 1,4- $C_6H_4(COOEt)_2$ (Schmitt *et al.* 2008). Syntéza a struktura komplexu $[Ru_4(\eta^6\text{-aren})_4(TPP)Cl_8]$ je zobrazena na obr. 18.

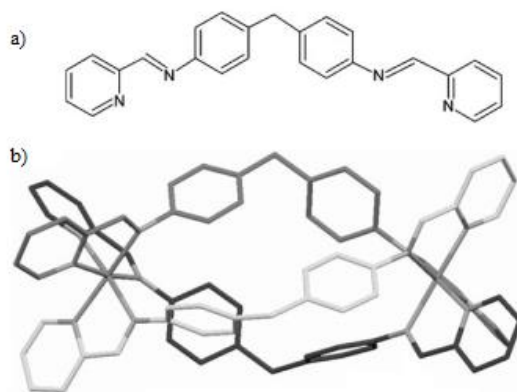


Obr. 18: Syntéza komplexu $[Ru_4(\eta^6\text{-aren})_4(TPP)Cl_8]$, kde arenem je C_6H_6 (1), $C_6H_5CH_3$ (2), p - i Pr C_6H_4Me (3), C_6Me_6 (4) a 1,4- $C_6H_4(COOEt)_2$ (5, převzato z Schmitt *et al.* 2008).

Tyto komplexy účinně kombinují fotosenzitivní vlastnosti porfyrinů a chemoterapeutické vlastnosti ruthenia (Schmitt *et al.* 2008). Další výhodou vazby ruthenia na porfyrin je zvýšení hydrofility komplexu, který se stává rozpustným i v polárních rozpouštědlech. Fluorescenční mikroskopií bylo prokázáno, že se tyto komplexy začleňují do lidských melanomových buněk a koncentrují se v cytoplazmě a organelách, ale ne v jádru, jako je tomu u Ru(III) komplexů. Všech pět těchto rutheniových komplexů mělo srovnatelné cytotoxické a fototoxické vlastnosti.

Účinek těchto pěti komplexů byl zkoumán na buňkách lidského melanomu Me300 (Schmitt *et al.* 2008). Tyto buňky byly po dobu 24 hodin inkubovány s jednotlivými komplexy o koncentraci 10 μM a po této době byly ozářeny světlem o vlnové délce 652 nm. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí MTT testu a prokázalo se, že po expozici světlem vzrostla cytotoxicita komplexů o 60 – 80 %. Je tedy patrné, že tyto komplexy jsou vhodnými kandidáty pro fotodynamickou terapii.

Druhou skupinou je komplex odvozený od struktury trojřetězcových helikátů železa $[\text{Fe}_2\text{L}_3]^{4+}$, kde bylo namísto železa vloženo ruthenium (Malina *et al.* 2008). Tento komplex $[\text{Ru}_2\text{L}_3]^{4+}$, jehož struktura a struktura ligandu L je na obr. 19, se váže k DNA nekovalentně a je poměrně hodně stabilní. Komplex $[\text{Ru}_2\text{L}_3]^{4+}$ vykazuje cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým liniím HBL-100 a T47D. Po navázání na DNA ji negativně odvíjí o 13° a přednostně se váže k pravidelně se střídajícím purino-pyrimidinovým sekvencím. Je možné jej aktivovat viditelným a UVA zářením, přičemž způsobuje na DNA zlomy a štěpí DNA převážně na zbytcích guaninu pomocí singletního kyslíku, který generuje. Proto je i tento komplex vhodný pro fotodynamickou terapii a další výzkum.



Obr. 19: a) struktura ligandu L, b) struktura válcového komplexu $[\text{Ru}_2\text{L}_3]^{4+}$ stanovená pomocí rentgenové krystalografie (převzato z Malina *et al.* 2008 a upraveno).

3 CÍL PRÁCE

- Vypracovat přehled problematiky na téma interakce DNA s protinádorově účinnými komplexy těžkých kovů, se zaměřením na komplexy ruthenia. Popsat dosud známé informace o možnosti aktivace sloučenin těžkých kovů, především ruthenia, ultrafialovým a viditelným zářením.
- Provést experimenty zaměřené na stanovení účinku UVA (popř. viditelného) záření na DNA modifikovanou komplexem ruthenia.
- Diskutovat získané výsledky. Zaměřit se především na srovnání získaných výsledků s údaji známými z odborné literatury, diskutovat získané výsledky z hlediska biologické aktivity studovaného komplexu a potenciálu pro případné terapeutické využití.

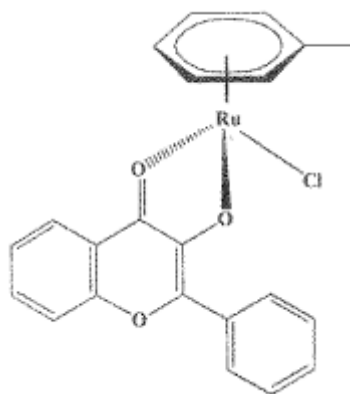
4 MATERIÁL A METODY

4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Všechny chemikálie byly p. a. čistoty.

Ve všech experimentech byla použita deionizovaná voda ($\kappa = 0,005 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).

- Komplex $[\text{Ru}(\text{tol})\text{flavonol}]\text{Cl}$ o molekulové hmotnosti $465,89 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, jehož strukturní vzorec je na obr. 20. Tento komplex je v textu označován jako komplex Ru1.



Obr. 20: strukturní vzorec komplexu $[\text{Ru}(\text{tol})\text{flavonol}]\text{Cl}$.

- Plazmidová DNA pUC19 o koncentraci $2,48\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (New England Biolabs, Velká Británie)
- Chloristan sodný NaClO_4 (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- TRIS-acetátový (TAE) pufr 50x
 - $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-acetát (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
 - $0,002 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ethylendiamintetraoctová kyselina EDTA (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Agaróza (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Bromfenolová modř (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Ethidium bromid EtBr (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)

- Dimethylformamid DMF (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Mannitol (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Dimethylsulfoxid DMSO (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Superoxid dismutáza SOD (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Azid sodný NaN_3 (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan TRIS (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Acetát sodný CH_3COONa (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Kultivační médium RPMI 1640 a trypsin (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Fetální hovězí (bovinní) sérum FBS (Biosera, Boussens, Francie)
- Fosfátový pufr PBS pufr 10x
 - $1,37 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid sodný NaCl (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
 - $0,027 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid draselný KCl (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
 - $0,101 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrogenfosforečnan sodný Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
 - $0,018 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Buněčná linie A2780 (lidský ovariální karcinom) byla poskytnuta prof. B. Kepplerem z Univesity of Vienna
- Neutrální červeň (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Hydroxid sodný NaOH (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Nízkotuhnoucí agaróza (LMP) v PBS (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)

4.2 PŘÍSTROJE

- Major science UV transluminátor Gel Logic 112
- Fotoreaktor Luzchem LZC-ICH2 s regulátorem teploty
- Flow box Biohazard, SafeFAST Classic
- Absorbanční reader Synergy MX (Biotek, VT, USA)
- CO₂ inkubátor MCO-18ACUV-PE, Panasonic
- Chladicí box friulinox
- Fluorescenčního mikroskopu CellR (Olympus)
- Další běžné laboratorní přístroje: vortex, centrifuga, třepačka, digestoř, zdroje pro elektroforézu

4.3 METODY

4.3.1 PŘÍPRAVA A OZAŘOVÁNÍ VZORKŮ

Vzorky byly připraveny vždy v celkovém objemu 10 μl a obsahovaly 0,6 μg DNA pUC19, komplex Ru1 o různých koncentracích tak, že r_i bylo v rozmezí 0 - 0,2 NaClO₄ o koncentraci 0,01 mol·l⁻¹. Hodnoty r_i vyjadřují počet molekul komplexu připadajících na jeden nukleotid. Konkrétní hodnoty r_i jsou vždy uvedeny u příslušných experimentů v kapitole 5 Výsledky a diskuze. Vzorky byly připraveny vždy ve dvou sadách, přičemž kontrolní vzorky byly uchovávány ve tmě a druhá sada vzorků byla ozařována pomocí UV nebo viditelného záření ve fotoreaktoru. Vzorky byly připraveny vždy ve dvou sadách, přičemž kontrolní vzorky byly uchovávány ve tmě a druhá sada vzorků byla ozařována pomocí UV nebo viditelného záření ve fotoreaktoru. Připravené vzorky byly ozařovány pomocí přístroje Luzchem LZC-ICH2 s regulátorem teploty, přičemž teplota byla nastavena na 37 °C. Tento fotoreaktor obsahuje 16 lamp generujících UV záření ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$; 4,3 mW·cm⁻²) nebo 16 lamp emitujících viditelné záření ($\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$; 65 mW·cm⁻²). Doba ozařování vzorků se odvíjí od typu experimentu a v kapitole 5 Výsledky a diskuze je tato doba u jednotlivých pokusů uvedena. Před nanesením vzorku na gel byl ke každému vzorku přidán roztok bromfenolové modře (BMF) v 1/6 objemu vzorku.

4.3.2 STUDIUM MECHANISMU ŠTĚPENÍ DNA

Vzorky byly připraveny, jak je popsáno v kapitole 4.3.1. K 0,6 μg DNA pUC19 v NaClO_4 o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl přidán komplex Ru1 tak, že $r_i = 0,03$ v případě ozařování UVA nebo $r_i = 0,06$ v případě ozařování viditelným zářením. K takto připraveným vzorkům byly přidány vycytávače radikálů: dimethylsulfoxid (DMSO) o výsledné koncentraci $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, manitol o výsledné koncentraci $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, superoxid dismutasa o výsledné koncentraci $1000 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ a azid sodný (NaN_3) o výsledné koncentraci $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Celkový objem vzorků byl $10 \mu\text{l}$. Byly také připraveny kontrolní vzorky bez přítomnosti komplexu Ru1 a nebo bez přítomnosti jakéhokoli vycytávače. Vzorky byly poté ozařovány, jak je popsáno v kapitole 4.3.1. UVA zářením pod dobu 30 min nebo viditelným zářením po dobu 180 min. Poté byl ke každému vzorku přidán roztok bromfenolové modře (BMF) v 1/6 objemu vzorku a vzorky byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy.

4.3.3 ELEKTROFORÉZA V NATIVNÍM AGARÓZOVÉM GELU

Nejprve byl připraven agarózový gel pro elektroforézu, smícháním 1 % agarózy v pufru TAE 1x. Směs byla následně vařena v erlenmeyerově baňce po dobu přibližně 8 minut v mikrovlnné troubě. Následně byl gel v baňce schlazen pod proudem studené vody na teplotu přibližně $40 - 60 \text{ }^\circ\text{C}$ a nalit do vaničky na elektroforézu s připraveným hřebínkem, který je nezbytný pro vytvoření jamek, do kterých se po ztuhnutí nanáší vzorky. Gel tuhnul po dobu 30 minut a po ztuhnutí se celý přelil pufrům TAE 1x, který slouží jako elektrolyt.

Před nanesením vzorků na gel se ke každému vzorku přidal roztok bromfenolové modře (BMF, 1/6 objemu vzorku), který je nutný pro zviditelnění čela elektroforézy. Elektroforéza probíhala vždy za konstantního napětí a po takovou dobu, aby barevné čelo doputovalo minimálně do poloviny délky gelu. Po skončení elektroforézy byl gel obarven pomalým třepáním ve vodném roztoku EtBr ($0,75 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 20 minut, který se interkaluje mezi páry bází DNA a díky fluorescenci fragmenty DNA vizualizuje. Následně bylo kvůli snížení pozadí fluorescence přebytečné množství EtBr odstraněno pomalým třepáním v deionizované vodě opět po dobu 20 minut. Výsledek

elektroforetické separace byl vizualizován a zachycen pomocí přístroje Major science UV transluminátoru.

To jakou rychlostí se molekuly DNA v agarózovém gelu pohybují, závisí na jejich superhelikální hustotě, která se označuje jako elektroforetická mobilita. Plazmidová DNA, která má pozitivní či negativní nadšroubovicové vinutí, se označuje jako SC forma a v gelu putuje vždy nejrychleji. V případě, že dojde ke snížení superhelikální hustoty, k uvolnění nadšroubovicového vinutí, způsobeného např. zlomem v jednom z řetězců (OC forma DNA), či k linearizaci plazmidové DNA, tak se tyto formy DNA pohybují v gelu vždy pomaleji než SC forma. A to z důvodu, že dojde ke snížení elektroforetické pohyblivosti těchto forem DNA.

Intenzity jednotlivých elektroforetických proužků na gelu byly vyhodnoceny pomocí AIDA image analyzer software (Raytest, Německo) a následně vyjádřeny jako procentuální přírůstek OC formy DNA v jednotlivých vzorcích v porovnání s kontrolním vzorkem, který neobsahuje komplex Ru1.

4.3.4 TESTOVÁNÍ FRAGMENTACE DNA V ŽIVÝCH BUŇKÁCH (COMET TEST)

Protokol, který byl použit pro hodnocení poškození DNA v nádorových buňkách A2780, byl v souladu s Ersson *et* Möller (2011) s určitými úpravami. Nejprve byla připravena mikroskopická sklíčka, předem vyvařená v 6% peroxidu vodíku po dobu 30 min. Sklíčka byla potažena dvěma vrstvami 1 % agarózy v PBS.

Buňky lidského karcinomu vaječníků A2780 byly intoxikovány studovaným komplexem Ru1 o koncentraci 5 μ M po dobu 1 hodiny. Vzorky byly poté ozářeny UVA ($\lambda_{max} = 365$ nm) po dobu 10 minut. Po skončení ozařování byly buňky sbírány trypsinizací (1x trypsin/EDTA) a pro zastavení trypsinizace bylo použito 150 μ l fetálního séra. Buňky byly resuspendovány v 1000 μ l PBS a centrifugujeme (5 min, 2 000 rpm). Pelet byl poté resuspendován v 1000 μ l PBS. Na podložní sklíčka potažená HMP agarózou bylo naneseno 100 μ l buněčné suspenze smíchané s 1 % nízkotuhnoucí agarózou (LPM) v PBS. Tímto postupem byla získána hustota přibližně 10 000 jader na preparát. Podložní skla se vzorky byla přikryta krycím sklíčkem, položena na vychlazenou destičku a ponechána v lednici po dobu 30 minut (do zatuhnutí agarózy). Následně byla krycí

sklíčka odstraněna a podložní skla s fixovanými buňkami byla inkubována v ledovém lyzačním pufru (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO, pH = 10) při teplotě 4 °C po dobu 16 hodin. Po lýze byla sklíčka promyta v deionizované vodě, umístěna do elektroforetické vany a ponořena v chladném pufru (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) po dobu 40 minut, aby došlo k rozvolnění šroubovice DNA. Vzorky byly poté podrobeny elektroforetické separaci DNA (30 min, 21 V, 4 °C). Nakonec byla sklíčka 3krát omyta neutralizačním pufrům (0,4 M Tris, pH = 7,5) a usušena.

Pro vyhodnocení byly vzorky obarveny pomocí EtBr ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, excitace $\lambda_{max} = 285$ nm, emise $\lambda_{max} = 605$ nm). Poškození DNA (vzniklé kometky) bylo pozorováno mikroskopicky pomocí fluorescenčního mikroskopu CellR (Olympus), který je vybavený DSU (Disk Scanning Unit) a černobílou digitální CCD kamerou CCD-ORCA/ER. Poškození bylo vyhodnocováno na 100 náhodných jádrech/sklíčko. Buňky byly vizuálně rozděleny do pěti skupin, podle intenzity fragmentace DNA od 0 (nepoškozené) do 4 (maximálně poškozené) dle Kobayashi *et al.* (1995). Každá kometka byla zařazena do konkrétní skupiny dle klasifikace a pro každé sklíčko bylo spočítáno celkové poškození v rozmezí od 0 - 200 arbitrálních jednotek (Li *et al.* 2004). Celkové poškození pak bylo vypočítáno z rovnice

$$\text{celkové poškození} = (0 \cdot N_0) + (1 \cdot N_1) + (2 \cdot N_2) + (3 \cdot N_3) + (4 \cdot N_4),$$

kde N_0 , N_1 , N_2 , N_3 a N_4 je konkrétní množství jader v jednotlivých skupinách 0 - 4.

4.3.5 STANOVENÍ CYTOTOXICITY (NRA TEST, VÝPOČET IC_{50})

Vliv rutheniového komplexu Ru1 a UV záření na životaschopnost nádorových buněk byl testován kolorimetrickým NRA (neutral red uptake assay) testem. Kationtové barvivo neutrální červeň snadno prochází skrz buněčnou membránu a v buňce se hromadí v lysozomech. Vitální barvivo při vstupu do lysozomu získává náboj a váže se na aniontová vazebná místa v matrix lysozomů (Repetto *et al.* 2008). Díky získanému náboji neutrální červeň neprochází zpět do cytoplazmy. Buňky, které jsou poškozené či mrtvé, ztrácí gradient pH a dochází ke zvýšení propustnosti membrány, čímž buňky přicházejí o

schopnost zadržovat toto barvivo a během promývací procedury je barvivo vymyto. Tedy pouze viabilní buňky zůstávají červeně obarvené.

Prvním krokem NRA testu je pasážování buněk. K tomu byly použity buňky lidského ovariálního karcinomu A2780, které byly pěstovány v kultivačním médiu RPMI 1640 doplněném o penicilin-streptomycin (1 %) a FBS (fetální bovinní sérum, 10 %). Takto připravené buňky byly nasazeny do 96jamkové tkáňové kultivační destičky v hustotě 10 000 buněk/jamka v 100 μ l růstového média a po dobu 24 hodin byly inkubovány ve stálém prostředí 37 °C a 5 % CO₂ atmosféře.

Dalším krokem je ovlivňování nádorových buněk pomocí našeho testovaného komplexu Ru1. Komplex byl testován v sérii koncentrací 0,1 - 50 μ M v růstovém médiu v celkovém objemu 100 μ l na jamku a buňky byly dále kultivovány za stejných podmínek po dobu 24 hodin.

Po ukončení inkubace jsme z destičky odstranili kultivační médium s komplexem Ru1 a nahradili ho 100 μ l média bez antibiotik, aby se nám při ozařování UV zářením nerozkládalo. Takto připravenou destičku jsme nechali ozařovat po dobu 30 minut ve fotoreaktoru a kontrolní destičku jsme vrátili do inkubátoru. Po ukončení ozařování jsme v obou destičkách vyměnili médium za médium s antibiotiky a destičky inkubovali za stejných podmínek opět po dobu 24 hodin.

Po uplynutí této doby jsme z destiček odstranili kultivační médium a nahradili ho 100 μ l roztoku neutrální červeně (40 μ g·ml⁻¹) v růstovém médiu RPMI 1640 bez antibiotik a buňky jsme inkubovali po dobu 2 hodin v inkubátoru. Poté jsme roztok neutrální červeně z destiček odstranili a nádorové buňky promyli 100 μ l pufru PBS 1x. Jelikož se neutrální červeně metabolizuje v lysozomech, tak jsme k uvolnění barviva z lysozomů použili 100 μ l odbarvovacího roztoku. Výslednou intenzitu zabarvení, tedy životaschopnost buněk, jsme detekovali měřením absorbance na readeru Synergy MX při vlnové délce 540 nm.

Hodnoty IC₅₀ (koncentrace, která způsobí 50 % inhibici metabolické aktivity buněk) byly vypočítány z grafické závislosti přežívání buněk (%) na koncentraci studovaného komplexu Ru1 (μ M).

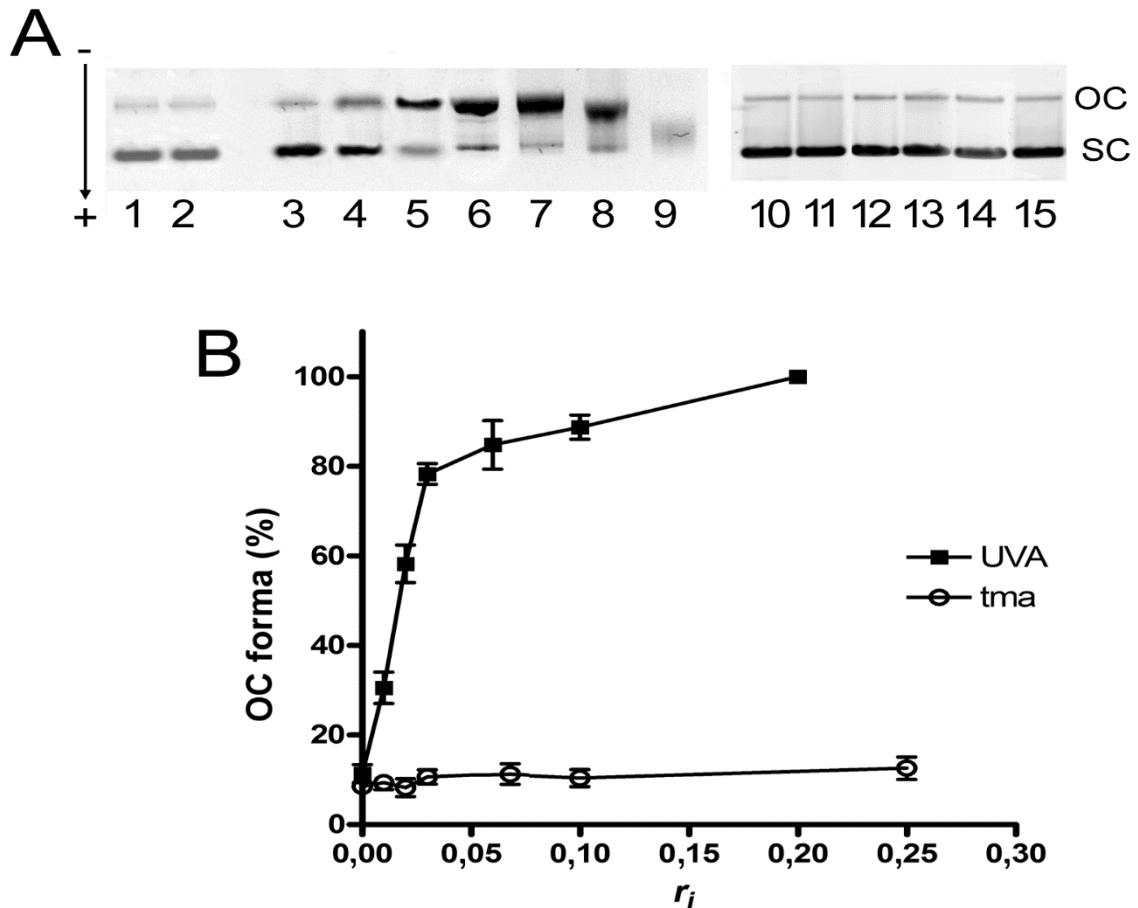
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 VLIV KOMBINACE UV ZÁŘENÍ A KOMPLEXU RUTHENIA NA DNA *IN VITRO*

Již dříve bylo ukázáno, že komplex Ru1 ([Ru(tol)(flavonol)Cl]); struktura komplexu viz obr. 20 v kapitole 4 Materiál a metody), vykazuje cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám, a také, že toto jeho biologické působení může souviset s jeho interakcí s DNA (Folvarská 2015). V odborné literatuře je popsána řada případů, kdy komplexy ruthenia vykazovaly citlivost vůči záření a jejich biologické účinky byly zvýšeny, pokud byly buňky ozářeny současně nebo následně po podání daného komplexu ruthenia (Brabec *et al.* 2016, Malina *et al.* 2008, Schmitt *et al.* 2007). Abychom zjistili, zda také účinek komplexu Ru1 může být ovlivněn zářením, studovali jsme interakci komplexu Ru1 s DNA, a to nejprve v bezbuněčném prostředí.

V tomto experimentu byly testované vzorky připraveny tak, že poměr koncentrací Ru1 a DNA (r_i) se lišil v rozmezí 0 - 0,2. Tyto vzorky byly rozděleny na dvě poloviny, jedna část vzorků byla umístěna do fotoreaktoru Luzchem a ozařována UVA zářením po dobu 30 min tak, jak je uvedeno v kapitole 4 Materiál a metody. Druhá část vzorků byla ponechána ve tmě bez ozáření po stejnou dobu, tj. 30 min. Po uplynutí tohoto časového intervalu byly vzorky analyzovány elektroforézou v 1% agarozovém gelu.

Výsledky experimentu jsou znázorněny na obr. 21. Panel A ukazuje fotografii gelu obarveného ethidium bromidem. Z obrázku gelu a také z kvantitativního vyhodnocení (obr. 21 B) je patrné, že s rostoucím poměrem koncentrací Ru1 a DNA (rostoucím r_i) roste zastoupení OC formy DNA a současně klesá množství SC formy DNA. Tento efekt je však pozorovatelný jen u vzorků, které byly ozařovány UVA zářením. U vzorků, které byly ponechány ve tmě, se zastoupení obou forem DNA nemění v celém rozsahu použitých koncentrací komplexu Ru1. Také kontrolní vzorek DNA bez přítomnosti komplexu Ru1 ($r_i = 0$) nevykazoval po ozáření žádné významné změny v zastoupení OC a SC forem DNA ve srovnání s toutéž neozářenou DNA. Z toho je zřejmé, že pozorovaný efekt je vyvolán kombinací komplexu Ru1 a UVA záření. Samotný komplex Ru1 ani samotné UVA záření za námi použitých podmínek přírůstek OC formy nevyvolává.



Obr. 21: A) obrázek typického gelu po elektroforéze vzorků DNA modifikované komplexem *Ru1* a ozářené UVA zářením. Dráhy: 1 - DNA ve tmě, neozářená; 2 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,2$) neozářená; 3 - DNA ($r_i = 0$) ozářená; 4 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,01$) ozářená; 5 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,02$) ozářená; 6 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,03$) ozářená; 7 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,06$) ozářená; 8 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,1$) ozářená; 9 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,2$) ozářená. 10 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,01$) ve tmě; 11 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,02$) ve tmě; 12 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,03$) ve tmě; 13 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,08$) ve tmě; 14 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,1$) ve tmě; 15 - DNA + *Ru1* ($r_i = 0,25$) ve tmě. Vzorky byly ozařovány po dobu 30 min při 37°C zářením UVA (vzorky 3-9) nebo drženy ve tmě po dobu 30 min při 37°C (vzorky 1, 2 a 10 - 15).

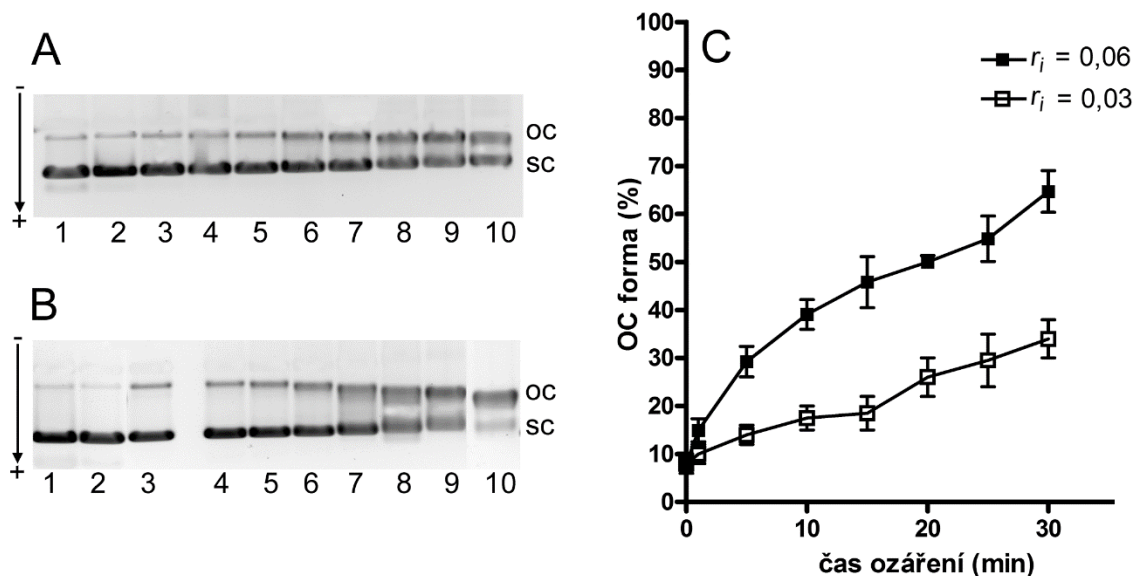
B) Kvantitativní vyhodnocení experimentů - závislost procentuálního zastoupení OC formy ve vzorku ozařované DNA na r_i . Body představují průměrnou hodnotu a úsečky směrodatnou odchylku ze dvou nezávislých experimentů.

Přírůstek OC formy v DNA je indikátorem toho, že došlo ke štěpení cukr-fosfátové kostry DNA a tím k přerušení jednoho řetězce, což vede k uvolnění superhelikálního vinutí. Tato interpretace je v souladu s dříve uveřejněnými literárními údaji (Brabec *et al.* 2016, Du *et al.* 2011, Chen *et al.* 2013). Vzhledem k tomu, že jsme na gelu nepozorovali vznik lineární formy DNA, což by svědčilo o vzniku dvouřetězcových zlomů v DNA, lze usoudit, že za námi testovaných podmínek vznikají v DNA společným působením Ru1 a UVA přednostně pouze jednořetězcové zlomy.

V následujícím experimentu jsme testovali, zda intenzita štěpení DNA a tedy i přírůstek OC formy závisí na době ozařování. Byly připraveny dvě sady vzorků o rozdílném r_i ($r_i = 0,03$ a $0,06$) a tyto vzorky byly ozařovány po dobu 1, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 min. Jako kontroly byly připraveny také vzorky, které byly inkubovány 30 min ve tmě a také vzorky samotné DNA bez přítomnosti komplexu Ru1, které byly ozařovány UVA zářením. Po ozáření byly vzorky opět analyzovány elektroforézou v agarozovém gelu.

Výsledky tohoto experimentu jsou shrnuty na obr. 22. Z fotografie obarveného gelu a také z denzitometrického vyhodnocení výsledných gelů je zřejmé, že množství OC formy v jednotlivých vzorcích narůstá s rostoucí dobou ozařování, přičemž tento nárůst je strmější u vzorků, kde byla koncentrace komplexu Ru 1 vyšší ($r_i = 0,06$).

Tyto výsledky potvrdily závěry učiněné z předchozích experimentů, tj. že kombinovaným účinkem komplexu Ru1 a UVA záření dochází ke štěpení jednoho řetězce DNA a že tento efekt závisí jak na koncentraci komplexu Ru1, tak na době ozařování.



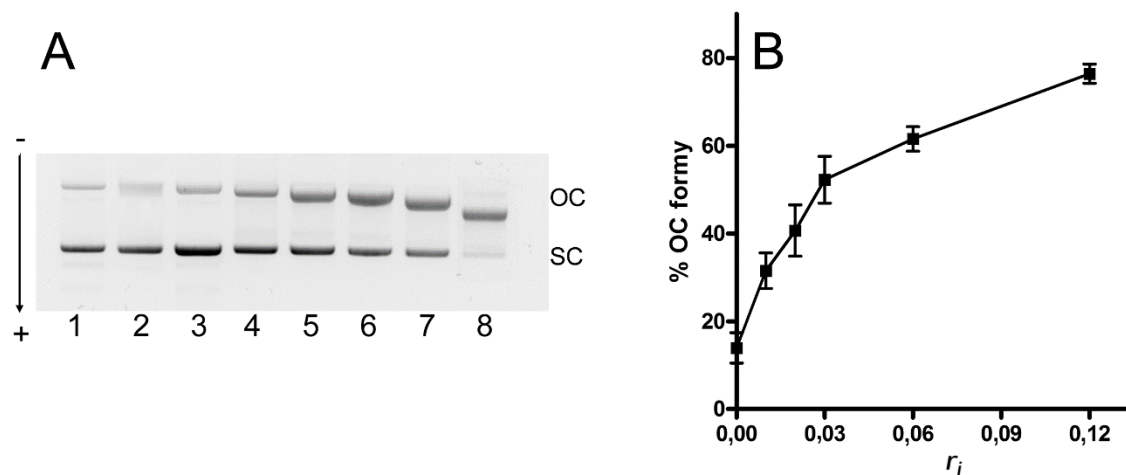
Obr. 22: A) a B) obrázky typických gelů po elektroforéze vzorků DNA modifikované komplexem *RuI* ($r_i = 0,03$ (A) a $r_i = 0,06$ (B)) ozářené zářením UVA po různě dlouhou dobu. Dráhy: 1 - DNA ve tmě, neozářená ($t = 30$ min); 2 - DNA ozářená ($t = 30$ min); 3 - DNA + *RuI* neozářená ($t = 0$ min); 4 - DNA + *RuI* ozářená ($t = 1$ min); 5 - DNA + *RuI* ozářená ($t = 5$ min); 6 - DNA + *RuI* ozářená ($t = 10$ min); 7 - DNA + *RuI* ozářená ($t = 15$ min); 8 - DNA + *RuI* ozářená ($t = 20$ min); 9 - DNA + *RuI* ozářená ($t = 25$ min); 10 - DNA + *RuI* ozářená ($t = 30$ min). Vzorky byly ozářovány po uvedené dobu při 37 °C UVA zářením (vzorky 2 a 4 - 9) nebo drženy ve tmě po uvedené dobu při 37°C (vzorky 1 a 3).

C) Kvantitativní vyhodnocení experimentů - závislost procentuálního zastoupení OC formy ve vzorku ozařované DNA na době ozařování. Body představují průměrnou hodnotu a úsečky směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů.

5.2 VLIV KOMBINACE VIDITELNÉHO ZÁŘENÍ A KOMPLEXU RUTHENIA NA DNA *IN VITRO*

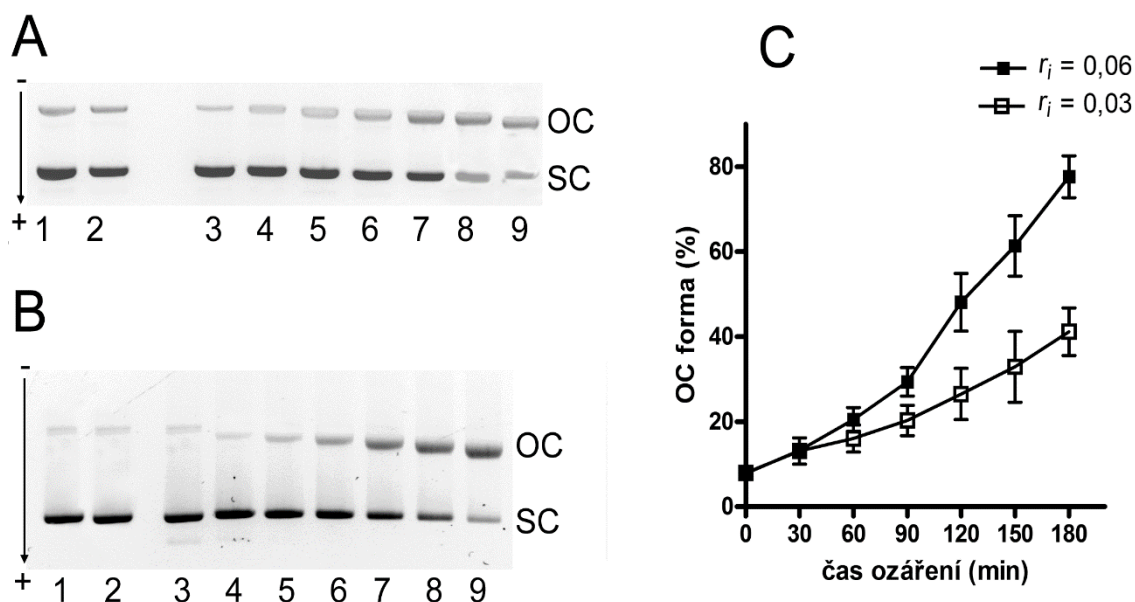
V dalším kroku jsme řešili otázku, zda efekt, pozorovaný pro UVA záření, může být vyvolán také zářením ve viditelné oblasti spektra. Podobně jako v předchozích experimentech jsme k plazmidové DNA pUC19 přidali komplex *RuI* o zvolené koncentraci a vzorky ponechali ve tmě (kontrolní vzorky) nebo jsme je ozářili viditelným světlem. Po ozáření byly vzorky DNA opět analyzovány pomocí gelové elektroforézy.

Obr. 23 a 24 ukazují fotografie výsledného gelu po obarvení ethidium bromidem. Z obrázku je patrné, že také při působení viditelného záření ($\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$) dochází ve vzorcích obsahujících studovaný komplex Ru1 k štěpení řetězce DNA, což je patrné z nárůstu množství OC formy DNA. Intenzita štěpení je, podobně jako v případě UVA záření, úměrná jak koncentraci Ru1, tak i délce doby ozařování vzorku.



Obr. 23: A) obrázek typického gelu po elektroforéze vzorků DNA modifikované komplexem Ru1 a ozářené viditelným zářením. Dráhy: 1 - DNA ve tmě, neozářená; 2 - DNA + Ru1 ($r_i = 0,12$) ve tmě, neozářená; 3 - DNA ($r_i = 0$) ozářená; 4 - DNA + Ru1 ($r_i = 0,01$) ozářená; 5 - DNA + Ru1 ($r_i = 0,02$) ozářená; 6 - DNA + Ru1 ($r_i = 0,03$) ozářená; 7 - DNA + Ru1 ($r_i = 0,06$) ozářená; 8 - DNA + Ru1 ($r_i = 0,12$) ozářená. Vzorky byly ozařovány po dobu 180 min při 37 °C viditelným zářením (vzorky 3-8) nebo drženy ve tmě po dobu 180 min při 37°C (vzorky 1 a 2).

B) Kvantitativní vyhodnocení experimentů - závislost procentuálního zastoupení OC formy ve vzorku ozařované DNA na r_i . Body představují průměrnou hodnotu a úsečky směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 24: A) a B) obrázky typických gelů po elektroforéze vzorků DNA modifikované komplexem RuI ($r_i = 0,03$ (A) a $r_i = 0,06$ (B)) ozářené viditelným zářením po různě dlouhou dobu. Dráhy: 1 - DNA ve tmě ($t = 2$ h), neozářená; 2 - DNA ozářená ($t = 2$ h); 3 - DNA + RuI neozářená ($t = 0$ min); 4 - DNA + RuI ozářená ($t = 30$ min); 5 - DNA + RuI ozářená ($t = 60$ min); 6 - DNA + RuI ozářená ($t = 90$ min); 7 - DNA + RuI ozářená ($t = 120$ min); 8 - DNA + RuI ozářená ($t = 150$ min); 9 - DNA + RuI ozářená ($t = 180$ min). Vzorky byly ozařovány po uvedené době při 37°C viditelným zářením (vzorky 2 a 4 - 9) nebo drženy ve tmě po uvedené době při 37°C (vzorky 1 a 3).

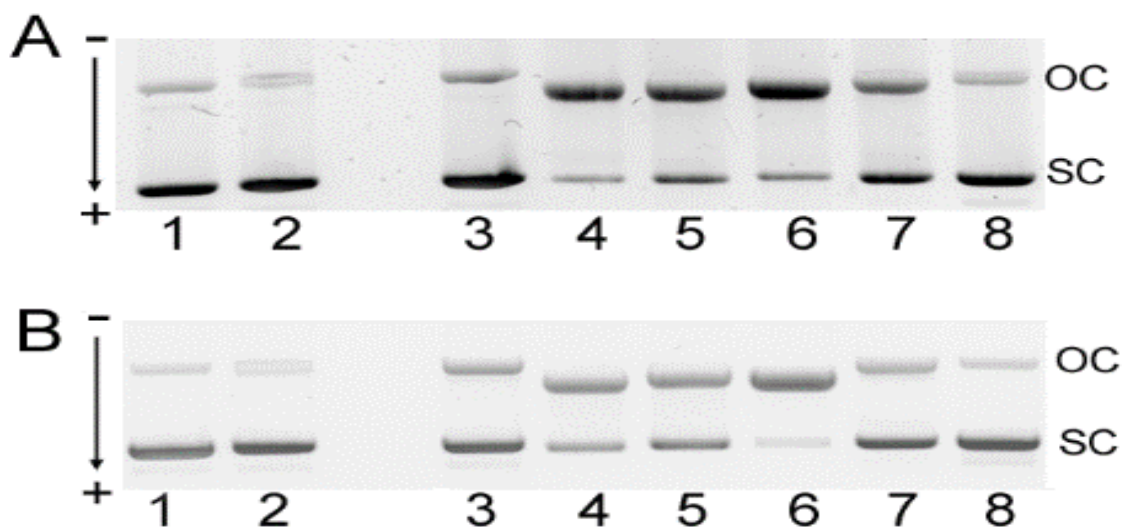
C) Kvantitativní vyhodnocení experimentů - závislost procentuálního zastoupení OC formy ve vzorku ozařované DNA na době ozařování. Body představují průměrnou hodnotu a úsečky směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů.

Ze srovnání výsledků získaných pro UVA a viditelné záření je zřejmé, že i když v obou případech dochází ke štěpení DNA, UVA záření je výrazně účinnější a pro dosažení stejného efektu postačí ozařovat výrazně kratší dobu než v případě viditelného záření.

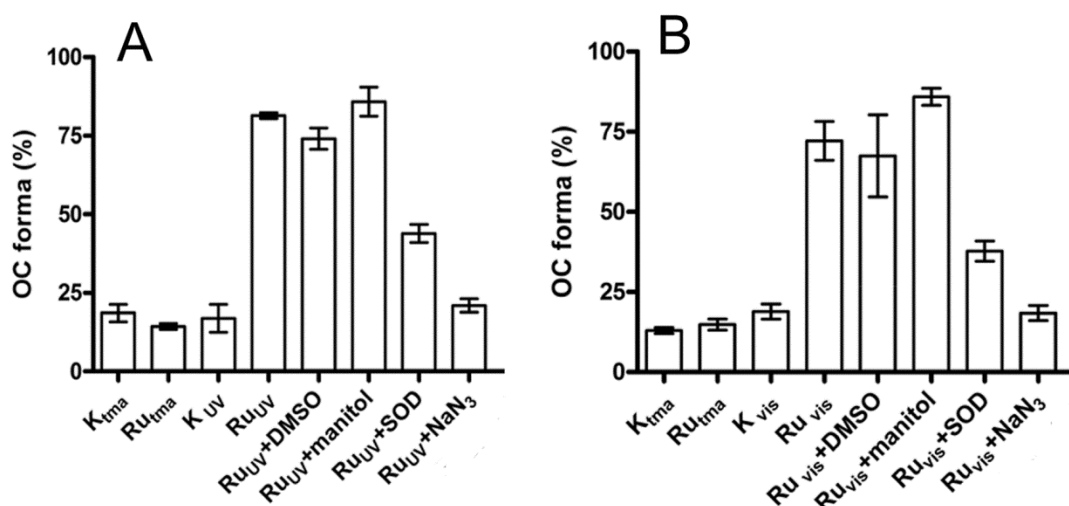
5.3 MECHANISMUS ŠTĚPENÍ DNA

K objasnění mechanismu, kterým ke štěpení cukr-fosfátové kostry DNA dochází, jsme využili experiment, který byl již dříve k obdobnému účelu použit (Malina *et al.* 2008, Brabec *et al.* 2016). V tomto experimentu jsme sledovali účinnost štěpení DNA vyvolaného kombinací komplexu ruthenia a záření za přítomnosti různých ‚vychytávačů‘ radikálů („radical scavengers“), které přednostně reagují s určitými radikály a tím snižují jejich účinek na DNA. Pokud tedy dojde za přítomnosti určitého ‚vychytávače‘ specifického pro daný typ radikálů k inhibici štěpení, lze předpokládat, že tyto radikály hrají v mechanismu štěpení DNA podstatnou roli.

Výsledky tohoto experimentu jsou patrné z obr. 25 a 26, kde panel A obr. 25 ukazuje výsledek při použití UVA záření a panel B výsledek pro viditelné záření. Obr. 26 pak shrnuje kvantitativní vyhodnocení experimentů.



Obr. 25: typický elektroforeogram ukazující štěpení pUC19 DNA modifikované komplexem RuI za přítomnosti různých vychytávačů radikálů po ozáření UVA (A) nebo viditelným (B) zářením. Dráhy: 1 - DNA ve tmě; 2 - DNA + RuI ve tmě; 3 - DNA + UVA/VIS; 4 - DNA + RuI + UVA/VIS; 5 - DNA + RuI + DMSO + UVA/VIS; 6 - DNA + RuI + manitol + UVA/VIS; 7 - DNA + RuI + SOD + UVA/VIS; 8 - DNA + RuI + NaN₃ + UVA/VIS.



Obr. 26: sloupcový graf znázorňující kvantitativní vyhodnocení efektu různých vychytávačů na štěpící aktivitu komplexu RuI vyvolanou UVA (A) nebo viditelným zářením (B). Sloupce představují průměr \pm směrodatnou odchylku z vyhodnocení čtyř nezávislých experimentů.

Z výsledků je zřejmé, že největší vliv na výslednou účinnost štěpení měl azid sodný (NaN_3) a také superoxid dismutáza (SOD). NaN_3 je znám jako zhášec singletního kyslíku ($^1\text{O}_2$) a SOD reaguje s $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Malina *et al.* 2008, Brabec *et al.* 2016). Ze zjištění, že přítomnost těchto dvou látek vedla k významnému snížení štěpení DNA ozářeným komplexem RuI lze tedy usoudit, že v mechanismu štěpení hrají superoxidový anion a singletní kyslík důležitou roli. Naproti tomu přítomnost DMSO a manitolu, které zhášejí hydroxylové radikály (OH^{\cdot}), měla na výsledné štěpení jen malý a vzhledem k uvedené směrodatné odchylce statisticky nevýznamný vliv. Z toho můžeme usoudit, že OH^{\cdot} se na štěpení DNA vyvolaném komplexem RuI po ozáření významně nepodílí. Tyto závěry mohou být navrženy jak pro aktivaci komplexu RuI UVA zářením, tak i pro aktivaci zářením ve viditelné oblasti.

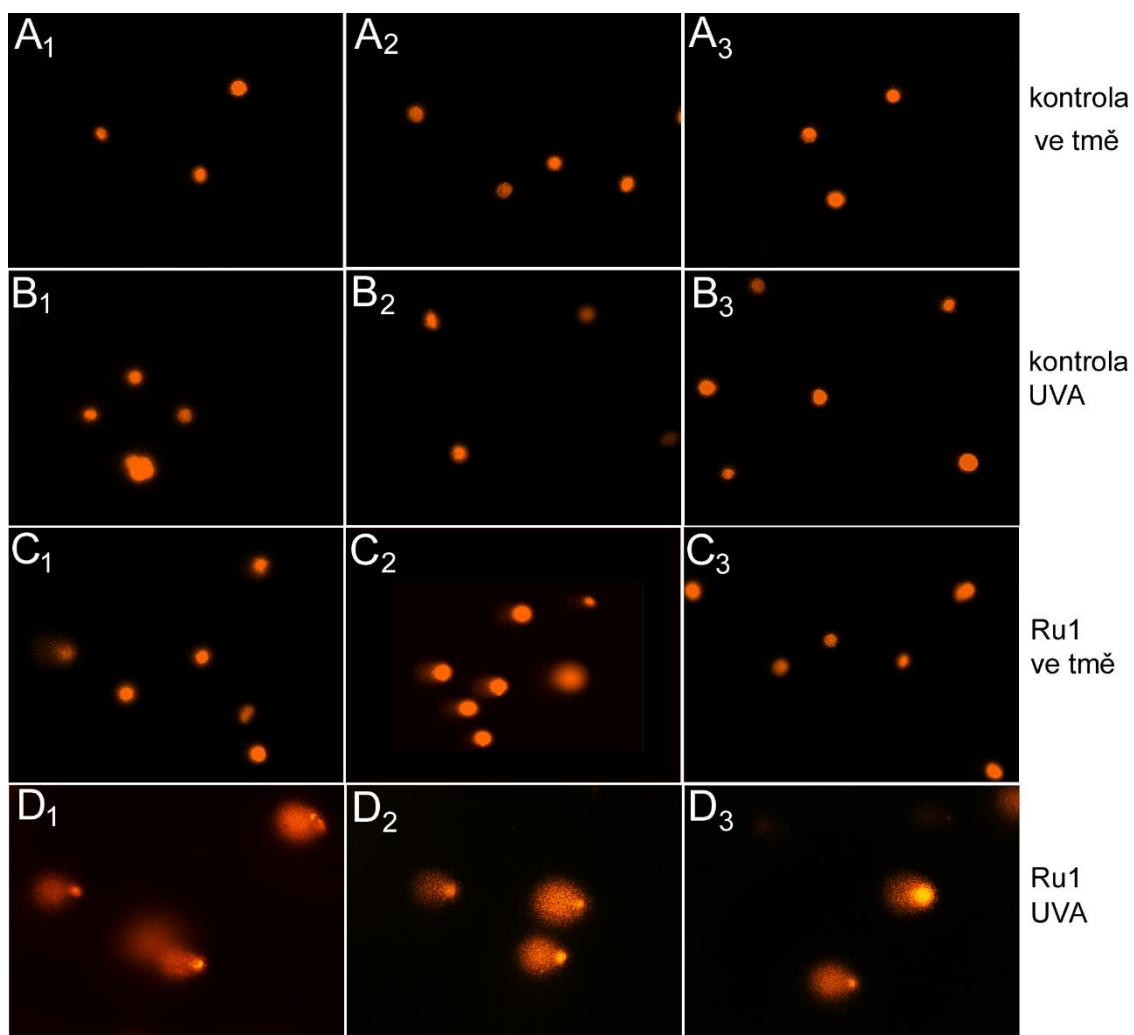
5.4 ÚČINKY KOMBINACE ZÁŘENÍ A KOMPLEXU RUTHENIA NA DNA V ŽIVÝCH BUŇKÁCH

Abychom zjistili, zda námi studovaný komplex ruthenia je v kombinaci se zářením schopen vyvolat štěpení DNA nejen *in vitro*, jak bylo popsáno výše, ale také *in cellulo*, tj. v živých buňkách, sledovali jsme poškození DNA pomocí kometového testu.

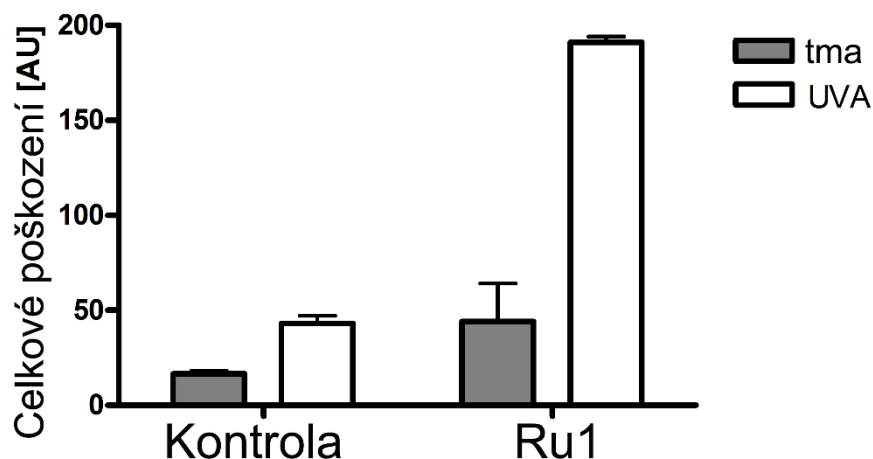
K tomuto experimentu byly využity buňky lidského karcinomu vaječníků A2780. Buňky byly ošetřeny komplexem Ru1 o výsledné koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 1 h a poté ozářeny UVA po dobu 10 min. Experiment byl proveden tak, jak je popsáno v kapitole 4 Materiál a metody.

Obr. 27 ukazuje fotografie zorných polí pozorovaných v mikroskopu po provedení experimentu. Zatímco v kontrolních neozářených i ozářených buňkách zůstává DNA kompaktní v jádrech (panely A, B a C na obr. 27), fotoreakce komplexu Ru1 v ozářených buňkách vedla k tvorbě zlomů v DNA, což se projevilo výrazně zvýšenou migrací DNA z jádra a tvorbou tzv. komet (panely D na obr. 27). Tento výsledek je také patrný z kvantitativního vyhodnocení toho experimentu, které je uvedeno na obr. 28.

Získané výsledky jsou tedy v souladu s daty naměřenými *in vitro* a ukazují, že komplex Ru1 je po aktivaci zářením schopen vyvolat zlomy v DNA, a to i v živých buňkách.



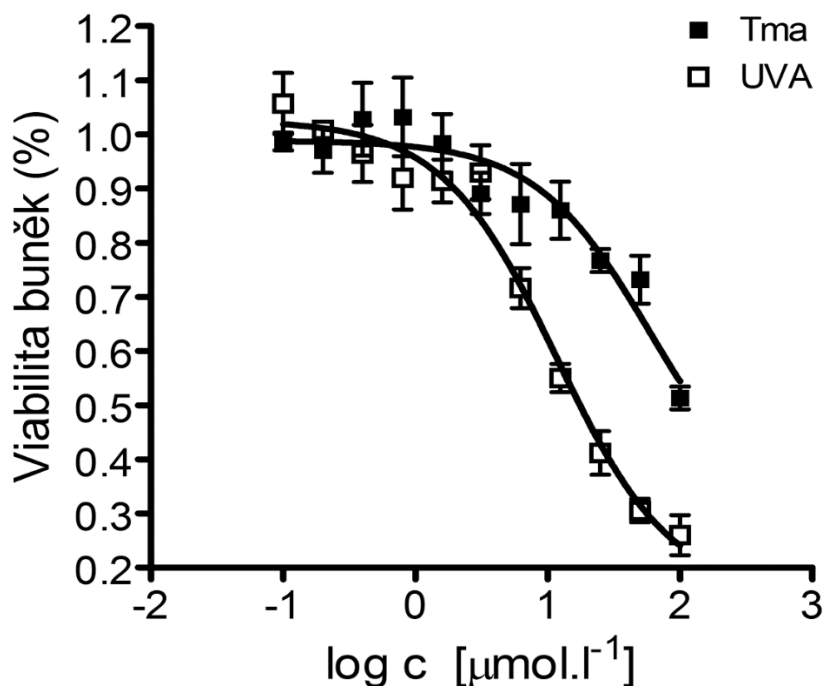
Obr. 27: vliv komplexu Ru1 na poškození DNA v lidských nádorových buňkách A2780. Panely: A - kontrolní, neozářené buňky bez přítomnosti Ru1; B - kontrolní buňky ozářené UVA po dobu 10 min bez přítomnosti Ru1; C - buňky ošetřené komplexem Ru1, neozářené; D - buňky ošetřené Ru1, ozářené UVA po dobu 10 min. Obrázek zachycuje fotografie vždy tří náhodně vybraných zorných polí.



Obr. 28: kvantitativní vyhodnocení kometového testu. Graf znázorňuje průměrné hodnoty a směrodatné odchylky dat ze dvou mikroskopických sklíček. Poškození bylo vyhodnocováno vždy ze 100 náhodně vybraných jader/sklíčko.

5.5 VLIV ZÁŘENÍ NA CYTOTOXICITU KOMPLEXU RUTHENIA

Vliv UVA záření na cytotoxicitu komplexu $[\text{Ru}(\text{tol})(\text{flavonol})\text{Cl}]$ vůči buňkám lidského karcinomu vaječníků byl testován pomocí neutrální červeně tak, jak je popsáno v kapitole 4 Materiál a metody. Naměřené hodnoty absorbance byly převedeny na procenta životnosti (viability) buněk vzhledem k příslušné kontrole, tj. životnost buněk v kontrolních jamkách bez přítomnosti Ru1 ve tmě nebo ozářených UVA byla brána jako 100%. Hodnoty IC_{50} (koncentrace sloučeniny, při níž je právě 50 % buněk živých) byly vypočítány z grafické závislosti přežívání buněk na koncentraci daného komplexu – obr. 29 a jsou uvedeny v tab. 1.



Obr. 29: Cytotoxicita komplexu Ru1 při inkubaci ve tmě nebo při ozáření UVA. Body v grafu představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze šesti měření provedených současně (vždy na jedné destičce).

Tab. 1: Hodnoty IC_{50} stanovené pro komplex Ru1 ve tmě nebo po ozáření UVA zářením u buněk A2780. Uvedené hodnoty představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze šesti měření provedených současně (vždy na jedné destičce).

	tma	UVA
IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	98 ± 2	16 ± 1

Z výsledků je patrné, že UVA záření výrazně zesiluje cytotoxické působení komplexu Ru1 na studované nádorové buňky, takže po ozáření je komplex Ru1 přibližně 6-krát účinnější než při inkubaci ve tmě. Tento efekt může souviset s tím, co bylo ukázáno v předchozích experimentech, tj. že komplex Ru1 po ozáření UVA vyvolává jednořetězcové zlomy v DNA. Protože přerušování cukr-fosfátové kostry představuje vážné poškození genetického materiálu a pokud není opraveno, je pro buňku letální, lze předpokládat, že právě vznik těchto zlomů je zodpovědný za zvýšenou toxicitu ozářeného Ru1 v nádorových buňkách.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provést experimenty zaměřené na stanovení účinku UVA a viditelného záření na DNA modifikovanou rutheniovým komplexem. Získané výsledky poté srovnat s údaji z odborné literatury týkající se rutheniových komplexů a vlivu využití UVA záření. A dále diskutovat výsledky z hlediska biologické aktivity studovaného komplexu Ru1 a potenciálu pro případné terapeutické využití.

Vliv kombinace UVA záření a viditelného záření a komplexu ruthenia na DNA jsme testovali nejprve *in vitro* pomocí gelové elektroforézy. Z výsledků experimentů je zřejmé, že s rostoucím poměrem koncentrací komplexu Ru1 a DNA (rostoucí r_i) roste množství OC formy DNA. Dále jsme studovali vliv doby ozařování vzorků a z výsledků vyplývá, že množství OC formy DNA narůstá s délkou doby ozařování. Tyto experimenty prokázaly, že v DNA vznikají pouze jednořetězcové zlomy.

Obdobné experimenty jsme provedli i s viditelným zářením. Při těchto experimentech jsme došli ke stejným závěrům, jako u experimentů s UVA zářením, tj. že kombinovaným účinkem komplexu Ru1 a viditelného záření dochází ke štěpení jednoho řetězce DNA (vznik OC formy) a že tento efekt závisí jak na koncentraci komplexu Ru1, tak na době ozařování. Nicméně po srovnání těchto dvou experimentů je patrné, že UVA záření je výrazně účinnější a pro dosažení stejného efektu postačí vzorky ozařovat výrazně kratší dobu. Tyto zjištěné výsledky korespondují s údaji uveřejněnými v odborné literatuře pro jiné komplexy ruthenia či jiných kovů.

Mechanismus štěpení DNA jsme studovali pomocí „vyčytávačů“ radikálů („radical scavengers“). Z výsledků je zřejmé, že největší vliv na účinnost štěpení měl azid sodný (NaN_3) a superoxid dismutáza (SOD). Azid sodný je zhášecem singletního kyslíku a superoxid dismutáza reaguje se superoxidovým aniontem, přičemž tyto radikály hrají významnou roli v mechanismu štěpení DNA. Naproti tomu hydroxylový radikál se v mechanismu štěpení DNA podílí minimálně. V obou experimentech, s UVA a viditelným zářením, jsme došli ke stejným závěrům.

Vliv kombinace UVA záření a komplexu ruthenia na DNA v lidských nádorových buňkách A2780 jsme testovali i *in cellulo* pomocí kometového testu. Z výsledků je patrný účinek kombinace komplexu Ru1 a UVA záření na DNA, který zapříčinil vznik zlomů na DNA a projevil se zvýšenou migrací DNA z jádra a tvorbou tzv. komet. Tyto výsledky

jsou v souladu se závěry experimentů *in vitro*, tedy že komplex Ru1 způsobuje na DNA jednořetězcové zlomy.

Vznik jednořetězcových zlomů se také projevil výrazným zvýšením cytotoxické účinnosti komplexu Ru1 po ozáření oproti situaci ve tmě. Díky těmto vlastnostem by komplex Ru1 mohl být vhodným kandidátem pro další výzkum jako potenciální léčivo pro fotodynamickou terapii.

Jak je zmíněno v teoretické části diplomové práce, v současné době je výzkum fotoaktivace nebo fotopotenciace léčiv na bázi komplexů kovů velmi aktuální. Aktivace nebo zesílení účinku zářením je jedním ze způsobů, jak překonat problémy spojené s nízkou selektivitou těchto látek, protože aplikace záření může být cílena výhradně na nádorovou tkáň, takže výsledné toxické působení může být omezeno jen na buňky nádoru. Výsledky, získané v rámci této diplomové práce, tak mohou přispět k rozšíření poznatků potřebných pro vývoj těchto nových světlocitlivých léčiv.

7 SEZNAM LITERATURY

Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M (2001) The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* 74(5), 656-669

Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J *et al.* (2011) *Obecná onkologie*. Galen, Praha.

Alessio E, Mestroni G, Bergamo A, Sava G (2004) Ruthenium antimetastatic agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4(15), 1525-1535

Allardyce CS, Dyson PJ (2001) Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. *Platinum Metals Rev.* 45(2), 62-69

Bednarski PJ, Grünert R, Zielzki M, Wellner A, Mackay FS, Sadler PJ (2006) Light-activated destruction of cancer cell nuclei by platinum diazide complexes. *Chemistry & Biology* 13, 61-67

Bednarski PJ, Korpis K, Westendorf AF, Perfahl S, Grünert R (2013) Effects of light-activated diazido-Pt^{IV} complexes on cancer cells *in vitro*. *Phil. Trans. R. Soc. A* 371, 1-15

Bergamo A, Gaiddon C, Schellens JHM, Beijnen JH, Sava G (2012) Approaching tumour therapy beyond platinum drugs Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. *Journal of Inorganic Biochemistry* 106, 90-99

Berners-Price SJ (2011) Activating platinum anticancer complexes with visible light. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 804-805

Brabec V (1990) Molekulární aspekty mechanismu protinádorového působení cisplatin. *Biologické listy* 55(1), 42-58

Brabec V (1998) Nové možnosti v léčbě zhoubných nádorů sloučeninami platiny a ruthenia. *Živa* 4, 148-149

Brabec V, Kasparkova J (2005a) Modifications of DNA by platinum complexes Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resistance Updates* 8, 131-146

- Brabec V, Kasparkova J (2005b) DNA interaction of platinum anticancer drugs. Recent advances and mechanisms of action. *Metal Compounds in Cancer Chemotherapy* 187-217
- Brabec V, Novakova O (2006) DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates* 9, 111-122
- Brabec V, Pracharova J, Stepankova J, Sadler PJ, Kasparkova J (2016) Photo-induced DNA cleavage and cytotoxicity of a ruthenium(II) arene anticancer complex. *J. Inorg. Biochem.* 160, 149-155
- Boulikas T, Pantos A, Bellis E, Christofis P (2007) Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy* 5, 537-583
- Capasso LL (2005) Antiquity of Cancer. *Int. J. Cancer* 113, 2-13
- Clarke MJ (2002) Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews* 232, 69-93
- Coste F, Malinge JM, Serre L, Shepard W, Roth M, Leng M, Zelwer C (1999) Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site. *Nucleic Acids Research* 27, 1837-1846
- Dive D, Biot Ch (2008) Ferrocene conjugates of chloroquine and other antimalarials: the development of ferroquine, a new antimalarial. *Chem Med Chem* 3, 383-391
- Doll R, Peto R (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66(6), 1191-1308
- Du KJ, Wang JQ, Kou JF, Li GY, Wang LL, Chao H, Ji LN (2011) Synthesis, DNA-binding and topoisomerase inhibitory activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 1056-1065
- Ersson C, Möller L (2011) The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, Electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments. *Mutagenesis* 26(6), 689-695
- Folvarska L (2015) Interakce DNA s novým protinádorově účinným komplexem ruthenia s flavonolovým ligandem. Diplomová práce, UP Olomouc

Gielen M, Tiekink ERT (2005) *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic Agents the use of metals in medicine*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

Hall MD, Hambley TW (2002) Platinum(IV) antitumor compounds: their bioinorganic chemistry. *Coordination Chemistry Reviews* 232, 49-67

Heringova P, Woods J, Mackay FS, Kasparkova J, Sadler PJ, Brabec V (2006) Transplatin is cytotoxic when photoactivated: enhanced formation of DNA cross-links. *J. Med. Chem.* 49, 7792-7798

Chen GJ, Wang ZG, Qiao X, Xu YJ, Tian L, Yan SP (2013) Synthesis, DNA binding, photo-induced DNA cleavage, cytotoxicity studies of a family of heavy rare earth complexes. *J. Inorg. Biochem.* 127, 39-45

Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S (2008) Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 10, 148-154

Jung Y, Lippard SJ (2007) Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chemical Reviews* 107 (5), 1387-1407

Kelland L (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7, 573-584

Klener P, Klener P jr. (2010) *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Grada, Praha.

Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T (1995) A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun* 3, 103-115

Li Y, Yao J, Chang M, Cuendet M, Bolton JL (2004) Altered apoptotic response in MCF 10A cells treated with the equine estrogen metabolite, 4-hydroxyequilenin. *Toxicol Lett* 154, 225-233

Lovejoy KS, Lippard SJ (2009) Non-traditional platinum compounds for improved accumulation, oral bioavailability, and tumor targeting. *Dalton Trans.*, 10651-10659

- Malina J, Hannon MJ, Brabec V (2008) Interaction of dinuclear ruthenium (II) supramolecular cylinders with DNA: sequence-specific binding, unwinding, and photocleavage. *Chem. Eur. J.* 14, 10408-10414
- Mlcouskova J, Stepankova J, Brabec V (2012) Antitumor carboplatin is more toxic in tumor cells when photoactivated: enhanced DNA binding. *J Biol Inorg Chem* 17, 891-898
- Mukherjee S (2015) *Vládkyně všech nemocí. Příběh rakoviny.* Muni Press, Brno.
- Passeto LM, D`Andrea MR, Brandes AA, Rossi E, Monfardini S (2006) The development of platinum compounds and their possible combination. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 60, 59-75
- Pervaiz S, Olivo M (2006) Art and science of photodynamic therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33, 551–556
- Pizzaro AM, Sadler PJ (2009) Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* 91, 1198-1211
- Popoff SC, Beck DJ, Rupp WD (1987) Repair of plasmid DNA damaged in vitro with cis- or trans-diamminedichloroplatinum(II) in *Escherichia coli*. *Mutation Research* 183, 129-137
- Pracharova J, Zerzankova L, Stepankova J, Novakova O, Farrer NJ, Sadler PJ, Brabec V, Kasparkova J (2012) Interactions of DNA with a new platinum (IV) azide dipyridine complex activated by UVA and visible light: relationship to toxicity in tumor cells. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1099-1111
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 3(7), 1125-1131
- Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T (1965) Inhibition of division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205, 698-699
- Schmitt F, Govindaswamy P, Süß-Fink G, Ang WH, Dyson PJ, Juillerat-Jeanneret L, Therrien B (2007) Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer. *J. Med. Chem.* 51(6), 1811-1816

Strouhal E, Němečková A (2008) Trpěli i dávní lidé nádory?: historie a paleopatologie nádorů, zvláště zhoubných. Karolinum, Praha.

Vaverkova A (2013) Fotoaktivace oxaliplatiny. Vliv na reakci s DNA in vitro. Bakalářská práce, UP Olomouc

Veverka M (2014) Evoluce svým vlastním tvůrcem. Prostor, Praha.

Vrana O, Brabec V (1986) The effect of combined treatment with platinum complexes and ionizing-radiation on DNA in vitro. International journal of radiation biology 6, 995-1007

Xu Z, Wang Z, Yiu S, Zhu G (2015) Mono- and di-bromo platinum(IV) prodrugs via oxidative bromination: synthesis, characterization, and cytotoxicity. Dalton Trans. 44, 199918-19926