

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky



Bakalářská práce

Fotoaktivace oxaliplatin. Vliv na reakci s DNA *in vitro*.

Vypracovala: Adéla Vaverková

Studijní obor: Molekulární biofyzika

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

Já, Adéla Vaverková, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Prof. RNDr. Viktora Brabce, DrSc. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla na konci práce.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala Prof. RNDr. Viktoru Brabcovi, DrSc., za vedení mé bakalářské práce a za umožnění práce v jeho kolektivu. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Tereze Muchové, Ph.D. a Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za spolupráci a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. A také chci poděkovat své rodině za podporu při studiu a svému příteli Martinovi.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře projektu IGA_PrF_2014 029.

Abstrakt

Cisplatina je nejstarším a dosud nejúčinnějším protinádorovým léčivem na bázi platiny používaným v klinické praxi. Ovšem její mnohé vedlejší účinky a vznik rezistence nádoru vůči cisplatině vedly vědce k vývoji platinových cytostatik druhé generace. Tato cytostatika druhé generace mají sice méně vedlejších účinků, ovšem spektrum působnosti je takřka stejné jako u cisplatiny. V neposlední řadě je nedostatkem těchto léčiv jejich nespecifické působení. Jedním z možných řešení tohoto problému je fotoaktivace inertního neaktivního proléčiva přímo v místě nádoru např. pomocí UV záření.

Cílem experimentální části této práce bylo stanovit rychlost vazby protinádorově účinné oxaliplatiny, derivátu cisplatiny, na DNA z telecího thymu ve tmě a po aktivaci UV zářením a tyto získané výsledky porovnat s již zveřejněnými výsledky fotoaktivace protinádorově účinné karboplatiny v práci Mlcouskova *et al.* (2012). K určení rychlosti vazby oxaliplatiny na DNA byly použity dvě odlišné metody. Hlavní metodou byla diferenční pulzní polarografie ke stanovení množství nenavázané (volné) platiny na DNA. Druhou použitou metodou bylo odstranění volné platiny pomocí chromatografie na molekulové síti, tzv. sephadexové kolonky. V tomto případě byla měřena navázaná platina na DNA pomocí atomové absorpční spektroskopie. Získané výsledky ukázaly, že oxaliplatina se za tmy váže jen velmi pomalu a při ozáření UV zářením se rychlost vazby zvýší jen nepatrně. Při srovnání těchto naměřených výsledků s již uveřejněnými výsledky o karboplatině v práci Mlcouskova *et al.* (2012) je zřejmé, že efekt fotoaktivace oxaliplatiny je téměř zanedbatelný, oproti karboplatině, u které je efekt výrazný. Příčina tohoto velmi rozdílného působení fotoaktivace obou sloučenin není prozatím známa a mohla by být podmětem zkoumání v navazujícím magisterském studiu.

Abstract

Cisplatin is the oldest and still the most effective anticancer platinum-based drug used in clinical practice. However, many of its side effects and the emergence of tumor resistance to cisplatin led scientists to develop second-generation platinum agents. These cytostatic of the second generation have had less side effects, but the spectrum of activity was almost identical as of cisplatin. Finally, the limitations in the clinical use of these drugs consists also in their non-specific effects. One possible solution of this problem is to photoactivate the inactive prodrug directly at the tumor site, e. g. by UV irradiation.

The experimental part of this work was to determine the rate of binding of antitumor oxaliplatin, analogue of cisplatin, to calf thymus DNA in the dark and after activation of oxaliplatin by UV irradiation and compare these results with those already published for antitumor carboplatin in the article by Mlcouskova *et al.* (2012). The rare of oxaliplatin binding to the DNA was studied by two different methods. The differential pulse polarography was the main method to determine the amount of unbound (free) platinum to DNA. The second method was based on the removal of free platinum by silica molecular networks, such as sephadex column. In this case, platinum bound to the DNA was assessed by atomic absorption spectroscopy. The results show that oxaliplatin binds to DNA very slowly in the dark. In contrast, UV irradiation increased the binding rate only slightly. In comparison with the work by Mlcouskova *et al.* (2012), it is evident that the effect of photoactivation of oxaliplatin is almost negligible compared to carboplatin, which is photoactivated efficiently. The cause of the very different effects of photoactivation of the two compounds is not yet known and represents an interesting problem to be explored in the master study.

Seznam zkratek

A	adenin
AAS	bezplamenná atomová absorpční spektroskopie
C	cytosin
Cisplatina	<i>cis</i> -diammindichoridoplatnatý komplex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
G	guanin
Karboplatina	<i>cis</i> -diamminkyklobutandikarboxylátplatnatý komplex
Oxaliplatina	(1R,2R-diamminkyklohexan)oxalátplatnatý komplex
PDT	fotodynamická terapie (photodynamic therapy)
r_b	počet molekul platinového komplexu navázaných na jeden nukleotid
r_i	počet molekul komplexu připadajících na jeden nukleotid
T	tymin
VIS	viditelné světlo
UV	ultrafialové záření

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	11
2.1. Cisplatina jako cytostatikum	11
2.2. Mechanismus účinku cisplatiny	12
2.3. Platinová cytostatika druhé generace	16
2.3.1. Karboplatina	17
2.3.2. Oxaliplatina	17
2.3.3. Nedaplatina	18
2.3.4. Lobaplatina	19
2.3.5. Heptaplatina	19
2.3.6. Pikoplatina	20
2.3.7. Satraplatina	20
2.4. Aktivace komplexů platiny zářením	21
2.4.1. Fotodynamické terapie	21
2.4.2. Fotoaktivace platičitých komplexů	23
2.4.3. Fotoaktivace platnatých komplexů	24
3. Cíl práce	28
4. Materiál a metody	29
4.1. Použité chemikálie	29
4.2.1. Příprava elektrolytu	30
4.2.2. Příprava vzorků	30
4.2.3. Ozařování platnatých komplexů	30
4.2.4. Měření kinetiky pomocí diferenční pulzní polarografie	31
4.2.5. Měření kinetiky pomocí ASS	31
4.2.6. Stanovení koncentrace DNA	32
5. Výsledky a diskuze	33

6. Závěr	44
7. Seznam literatury	45

1. Úvod

Nádorové onemocnění, jakožto rakovina, je obecný název chorob, při kterých tělní buňky rostou a množí se nekontrolovatelnou rychlostí, přičemž ztrácejí schopnost apoptózy a buňka se stává nesmrtelnou. Téměř všechny buňky v těle mohou podléhat mutacím a získávají tak schopnost proliferovat bez zábran. Mutace dědí i potomstvo postižené buňky a dalším dělením mutovaných buněk vzniká nádor. Nádor může být benigní nebo maligní. Benigní nádory jsou nezhoubné a nešíří se v těle pacienta dále. Naproti tomu maligní nádory jsou zhoubné, prorůstají do okolní tkáně a rozšiřují se do dalších částí těla, kde vytváří metastáze.

K mutacím v našem těle dochází neustále. Ve většině případů dochází ke spontánním mutacím, které jsou dány chybami při replikaci DNA a dále případně chybami při opravě poškozené DNA. Další mutace jsou spojeny s faktory vnějšího prostředí, které se nazývají kancerogeny. Mezi běžné kancerogeny patří tabákový kouř, UV a rentgenové záření, arzen, azbest a také benzen. Ačkoliv je většina mutací složitými opravnými mechanismy v těle odstraněna, přesto některé buňky mutacím podlehnou a začínají se nekontrolovatelně dělit. Tyto mutované buňky se rychle dělí a rostou a vytváří nádor. Nádorové buňky se mohou šířit krevním řečištěm po celém těle a vytvářet metastáze.

Spektrum léčby nádorových onemocnění je v dnešní době poměrně široké, avšak ne každá metoda je využitelná pro daný typ nádoru. Běžnou metodou je chirurgická léčba, při které je operativně odstraněn zhoubný nádor. Další rozšířenou metodou je radioterapie, což je léčba ionizujícím zářením a její sofistikovanou formou je tzv. gama-nůž. Velkým odvětvím léčby rakoviny je chemoterapie, která spočívá v podávání léčivých cytotoxických látek pacientovi, tzv. cytostatik. Největším problémem této léčby je, že není selektivní. To znamená, že tyto látky působí jednak na nádor, ale i na okolní zdravou tkáň. Dalším negativem této léčby jsou časté vedlejší účinky a vznik rezistence na léčivo. V poslední době se proto nejčastěji využívá kombinované chemoterapie, při které se podávají dvě a více chemoterapeutika zároveň a dosahuje se tak lepších léčebných účinků a také se snižuje vznik rezistencí. Mezi další léčebné metody nádorových onemocnění se řadí hormonální léčba, imunoterapie, imunomodulační léčba a ve vývoji je cílený transport léčiv pomocí nanočástic.

Rakovina je druhou nejčastější příčinou smrti a nejčastěji se v lidském těle vyskytuje v plicích, prsou, prostatě a střevech. Proto se vědci po celém světě snaží přijít na mechanismus vzniku rakovinného bujení a také na mechanismus protinádorového účinku cytostatik. Dalším úkolem biomedicíny je vývoj nových terapeuticky účinnějších a šetrnějších analogů.

2. Teoretická část

2.1. Cisplatina jako cytostatikum

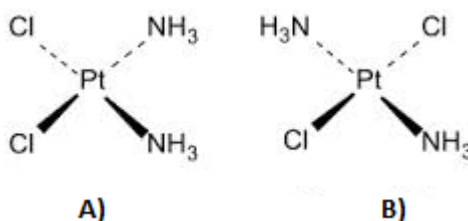
Cisplatina je generickým názvem pro *cis*-diammindichloridoplatnatý komplex (Peyronův chlorid) a její strukturní vzorec je na obr. 1 a). Syntetizována byla poprvé v roce 1844, ovšem její protinádorové účinky byly objeveny roku 1965 americkým biofyzikem Barnettem Rosenbergem (Brabec, 1998). Původně zkoumal vliv elektrického pole na růst a dělení bakterií *Escherichia coli*. Při experimentu vložil do živného roztoku, ve kterém byly amonné soli a bakterie, platinové elektrody a při zapnutí elektrického napětí se zastavilo dělení *E. coli*, avšak buňky stále rostly (Rosenberg *et al.* 1965). Tento efekt vysvětlil tím, že během elektrolýzy začaly vznikat sloučeniny platiny podobné cisplatině. Díky tomuto zjištění Rosenberga napadlo, že sloučeniny platiny by mohly potlačovat dělení nádorových buněk, tedy potlačit růst nádorů. Tato domněnka byla potvrzena roku 1968 při testování účinnosti cisplatinu na nádorech u myši, kdy došlo k regresi nádoru (Kelland 2007). První pacienti v USA byli cisplatinou léčeni roku 1971 a v roce 1978 byla cisplatina oficiálně schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) ke klinickému využití v USA.

Cisplatina je také registrovaným léčivem v České republice a její využití v klinické praxi se stále zvyšuje. Úplné remise je dosaženo u více než 85 % pacientů s nádory varlat, vysoce efektivní je i u léčby nádorů vaječníků, močového měchýře a prostaty (Brabec 1990). Úspěchů je taktéž dosaženo při léčbě kostních nádorů, rakoviny hlavy a krku, malobuněčného karcinomu plic a děložního čípku (Lovejoy *et Lippard* 2009, Weiss *et Christian* 1993). Bohužel toto cytostatikum nepotlačuje růst nejčastějších lidských nádorů, jako jsou nádory tlustého střeva a nádory prsu (Brabec 1998). Ačkoliv je cisplatina velmi účinným léčivem rakoviny a má hlavní klinický význam, má také mnohá úskalí. Hlavními nevýhodami tohoto cytostatika je nefrotoxicita, toxicita pro gastrointestinálního traktu (Kelland 2007), léčbu doprovázejí nežádoucí vedlejší účinky a ačkoliv je cisplatina registrována jako léčivo, má i mutagenní a kancerogenní účinky (Brabec 1990, Brabec 1998). Dalším úskalím léčby je rezistence nádorů vůči cisplatině. Rezistenci si může nádor vybudovat během opakované léčby, anebo má nádor přirozenou rezistenci vůči cisplatině (Kelland 2007).

Přirozenou rezistenci má např. kolorektální karcinom, nádor prsu či plic. Rezistence je tak hlavní překážkou v klinickém využití.

V důsledku těchto výše popsaných problémů je zapotřebí stále navrhovat a testovat nová léčiva, ať už je centrálním kovem platina, ruthenium (Brabec 1998, Brabec 2002) či jiný kov. Přehled cytostatik odvozených od platiny je shrnut v kapitole 2.3. Platinová cytostatika druhé generace. Mnoho léčiv je dnes navrhováno racionálně, k tomu je ovšem zapotřebí znát velmi dobře mechanismus účinku léčiva, který ovšem stále není u cisplatiny bezesbytku probádán. Proto je nezbytné nejen vyvíjet léčiva nová, ale stejně tak důležité je se zabývat jejich působením na molekulární a biochemické úrovni.

Za zmínku stojí, že *trans* izomer diammindichloridoplatnatého komplexu, transplatina (*trans*-diammindichloridoplatnatý komplex, *trans*-DDP), který je na obr. 1 B), nevykazuje protinádorovou aktivitu. Ačkoliv i tento komplex vyvolává změny v konformaci DNA a její stabilitě, tak i přesto je jeho toxicita vůči nádorovým buňkám natolik slabá, že nemá protinádorové účinky (Brabec 1990). Nicméně je tento komplex využíván ke studiu mechanismu působení cisplatiny (Brabec 1990).



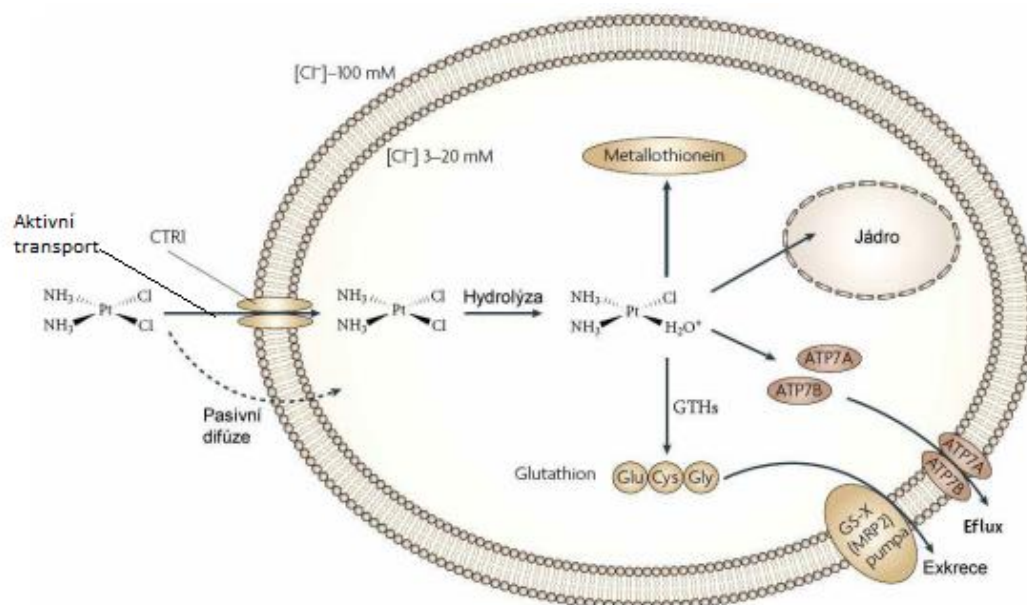
Obr. 1 – strukturní vzorec cisplatiny (A) a jejího izomeru transplatiny (B).

2.2. Mechanismus účinku cisplatiny

Protinádorová aktivita cytostatika je komplexním jevem a k tomu abychom jej pochopili, je nutné brát v úvahu mnohé aspekty. Cisplatina, jakožto komplex přechodného kovu platiny, je elektrofilní a může reagovat s mnoha buněčnými složkami (Brabec 1990). Za kritické cílové místo působení je považována ta buněčná složka, ve které cisplatina vyvolává lézi. V důsledku léze dochází k narušení buněčných fyziologických či regulačních dějů a to vede k zastavení dělení buňky.

Cisplatina je pacientovi podávána intravenózně. V krevním řečišti se cisplatina nachází ve stabilní dichloroformě a to díky vysoké koncentraci chloridových iontů v krvi (~100 mM, Jung *et* Lippard 2007, Kelland 2007). Předtím než dosáhne jádra nádorové buňky, může v krevním řečišti reagovat s různými sloučeninami, především se sloučeninami obsahujícími síru (Brabec *et* Kasparkova 2005a). Thioly, glutation nebo sloučeniny síry jsou velmi reaktivní vůči cisplatině a inaktivují ji ještě dříve, než dorazí do nádorové buňky. Naopak thioethery, včetně L-methioninu, vytváří s cisplatinou aktivní meziprodukty a dále pak hydrolyzují.

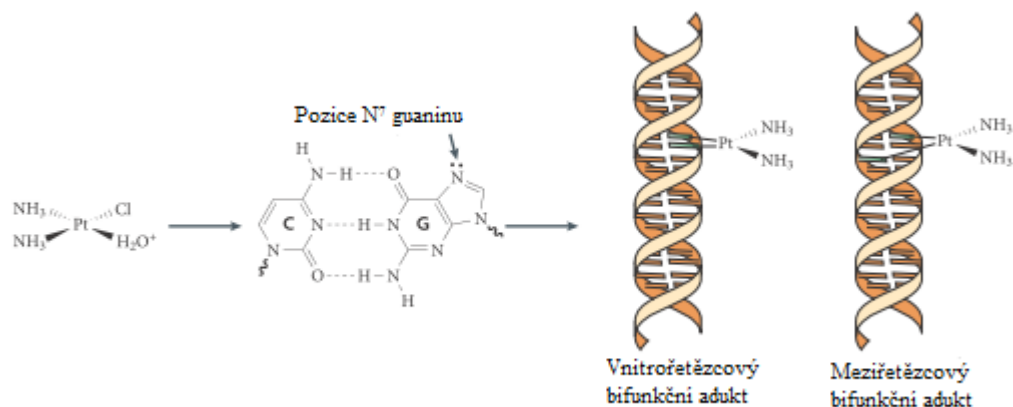
Cisplatina proniká do buňky dvěma způsoby. Buďto pasivní difúzí nebo prostřednictvím aktivního transportu, pomocí proteinových přenašečů, kterým je např. proteinový komplex Ctr1, který přenáší ionty mědi (Brabec *et* Kasparkova 2005a, Kelland 2007). V cytoplazmatické membráně může cisplatina reagovat s fosfolipidy a fosfatidylserinem (Passeto *et al.* 2006). V cytoplazmě dochází k hydrolyze cisplatin, z důvodu nižší koncentrace chloridových iontů (3-20 mM, Jung *et* Lippard 2007, Kelland 2007), tedy odstupující chloridové ligandy jsou nahrazeny vodou a cisplatina přechází do aktivní formy (Brabec *et* Kasparkova 2005a). Tato hydratovaná forma cisplatin je silně elektrofilní a může tak reagovat s nukleofily v buňce. V cytoplazmě může opět reagovat se sloučeninami obsahujícími síru (Kelland 2007, Passeto *et al.* 2006) a s dusíkatými atomy na zbytcích nukleových kyselin (Brabec *et* Kasparkova 2005a). V důsledku těchto reakcí dochází k částečné inaktivaci léčiva. Cisplatina může být z buňky exportováno např. pomocí transportérů mědi (ATP7A, ATP7B) či MRP2 pumpy ještě dříve, než se naváže na DNA, což také přispívá k rezistenci (Kelland 2007). Všechny tyto děje jsou zachyceny na obr. 2.



Obr. 2 – průchod cisplatinou přes cytoplazmatickou membránu, hydrolyza cisplatinu na aktivní formu, reakce aktivní formy cisplatinu se sloučeninami síry, průchod hydratované formy do jádra buňky, aktivní export z buňky (převzato z: Kelland 2007 a upraveno).

V buňce je cílovým místem cytostatického působení aktivované formy cisplatinu DNA (Brabec 1990, Jung *et* Lippard 2007). Zajímavým faktem je, že asi jen 10 % cisplatinu se váže k DNA. Dále bylo zjištěno, že na jednu molekulu DNA připadá v průměru 22 molekul platnatého komplexu. Rozsah vazby na ostatní makromolekuly je výrazně nižší, rozsah vázání na jednu molekulu RNA je 170 až 33000 krát menší než na DNA a na jednu molekulu bílkoviny 33000 krát menší (Brabec 1990). Je tedy patrné, že mnoho makromolekul v buňce reaguje s farmakem, ale pouze reakce léčiva s DNA má farmakologické účinky.

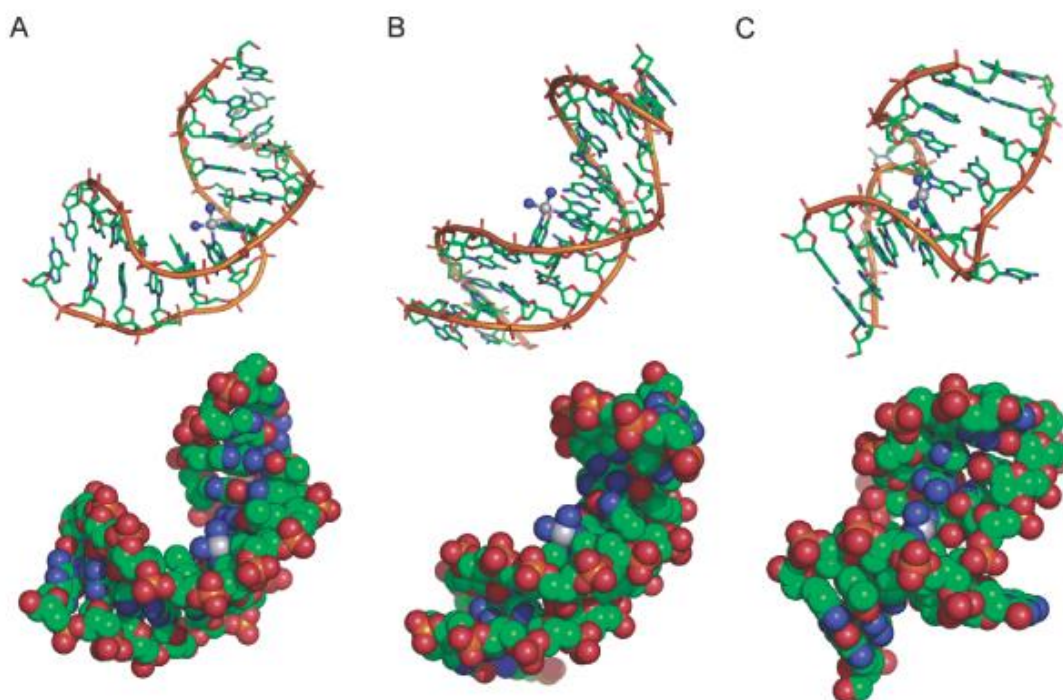
Cisplatinu se na DNA váže ve dvou krocích. Nejprve je jeden z chloridových ligandů nahrazen vodou a přechází do aktivní monoaqua formy. V této aktivní formě se kovalentně váže do velkého žlábků k purinovým bázím, preferenčně na guanin či adenin v poloze dusíku N⁷ (Jung *et* Lippard 2007). Přičemž cisplatinu reaguje preferenčně se zbytky guaninu (Brabec *et* Kasparkova 2005a) a na DNA se vytváří monofunkční adukt. Ve druhém kroku je zbylý chloridový ligand vyměněn za vodu a v případě, že je v blízkosti aduktu další reaktivní místo, tak se vytváří bifunkční adukt (Jung *et* Lippard 2007). Tyto bifunkční adukty jsou nejčastěji vnitřetězcové nebo meziřetězcové, méně často se mohou vyskytovat i jiné typy aduktů. Schéma vazby cisplatinu na DNA je popsáno na obr. 3.



Obr. 3 – schéma vazby monoaqua komplexu na dusík N^7 guaninu. Následná tvorba vnitrořetězcového či meziřetězcového bifunkčního aduktu (převzato z: Kelland 2007 a upraveno).

V největším počtu se vyskytují adukty s vnitrořetězcovými můstky, a to především mezi dvěma sousedními guaniny 1,2-GG, případně mezi guaninem a adeninem 1,2-AG (Brabec 1990, Jung *et* Lippard 2007). Četnější je adukt 1,2-GG, který se vyskytuje v 63-65 % případů a adukt 1,2-AG v 22-25 % případů. Méně častým aduktem, který se vyskytuje v 5-10 % případů, je vnitrořetězcová vazba (můstek) 1,3-GXG mezi dvěma guaniny oddělenými jednou bází X, kde X je A, C či T. Dalšími adukty jsou meziřetězcové můstky, kdy se cisplatina váže na dva guaniny v komplementárních řetězcích ($5'$ -GC/ $5'$ -GC), a monofunkční adukty (Jung *et* Lippard 2007). Karboplatina a oxaliplatina vytváří stejné adukty jako cisplatina. Nejčastějším aduktem je 1,2-GG vnitrořetězcový můstek.

Adukty cisplatiny vytváří strukturální změny v DNA, které jsou zobrazeny na obr. 4. Tyto změny ve struktuře mohou být způsobeny ohybem, krácením či odvíjením DNA a dochází k rozvinutí či zploštění žlábků DNA (Brabec *et* Kasparikova 2005a). Největší změny v konformaci DNA způsobují 1,2-GG a 1,2-AG adukty. Tyto konformační změny mají velký vliv na metabolické procesy v buňce, replikaci, transkripci a opravné mechanismy, přičemž tyto děje inhibují (Brabec *et* Kasparikova 2005a, Jung *et* Lippard 2007). Jelikož jsou replikace a transkripce nezbytné pro dělení buněk, má jejich inhibice cytotoxické účinky.



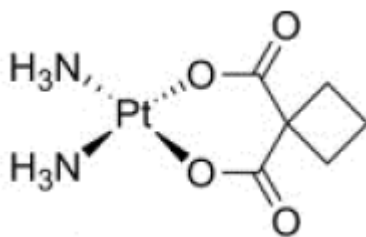
Obr. 4 – změny v konformaci DNA. (A) adukt 1,2-GG, (B) vnitrořetězový adukt 1,3-GXG a (C) meziřetězový adukt 1,3-GXG, tyto obrázky bylo vytvořeny pomocí programu PyMol (převzato z: Jung et Lippard 2007).

2.3. Platinová cytostatika druhé generace

Ačkoliv je cisplatina velmi účinná v léčbě některých nádorů, má i mnoho negativních účinků. Od jejího zavedení do klinické praxe bylo testováno velké množství analogů cisplatiny, jakožto potencionálních protinádorových léčiv, ovšem jen zlomek prošel klinickými testy a úspěšně se využívá v praxi. Tyto analogy jsou vyvíjeny především za účelem minimalizace vedlejších účinků, rozšíření spektra působnosti, vylepšení farmakologických vlastností a jsou hledány komplexy s aktivitou proti rezistentním nádorům (Brabec *et* Kasparkova 2005a). Platinová cytostatika druhé generace vznikla modifikací cisplatiny použitím jiné funkční skupiny místo odstupujícího chloridového ligandu a dále nahrazením neodstupujících amonných skupin jiným ligandem. Centrálním atomem zůstává platina v oxidačním stupni II.

2.3.1. Karboplatina

Jako první cytostatikum druhé generace byla představena karboplatina (*cis*-diammincyklobutandikarboxylplatnatý komplex), jejíž strukturní vzorec je na obr. 5. Toto cytostatikum je schváleno ke klinickému použití na celém světě od roku 1989 (Brabec *et* Kasparkova 2005a, Kelland 2007). Výhodou karboplatiny je nižší toxicita oproti cisplatině a může být podávána ve větších dávkách, stále ovšem intravenózně. Snížené toxické účinky v nádorových buňkách a přijatelnější vedlejší účinky lze připsat nižší reaktivitě karboplatiny s nukleofily (Kelland 2007). Bohužel je účinná na stejný typ nádorů jako cisplatin, a to především na rakovinu vaječníků a varlat. Léčbu však stále provází mnohé vedlejší účinky a při opakované léčbě opět vzniká rezistence nádorových buněk na toto cytostatikum. Ve srovnání s cisplatinou není karboplatina nefrotoxická, je méně toxická pro gastrointestinální trakt a také je méně neurotoxická. Hlavním vedlejším účinkem je myelosuprese (potlačení krvetvorby kostní dřeně), která limituje podanou dávku karboplatiny.



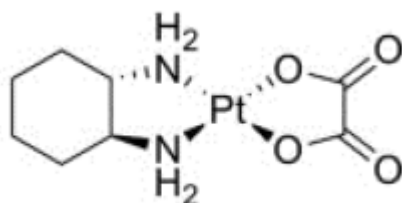
Obr. 5 – strukturní vzorec karboplatiny.

Odstupující atomy chloru byly nahrazeny cyklobutandikarboxylátovým ligandem, který disociuje ve vodném prostředí pomaleji a tím zajišťuje nižší toxicitu. Z tohoto důvodu je ovšem nutné podávat karboplatinu ve vyšší koncentraci, neboť DNA adukty vytváří pomaleji. Aduky tvořené karboplatinou jsou podobné těm, které tvoří cisplatin, nicméně mají odlišnou sekvenční preferenci (Blommaert *et al.* 1995 cit. v Brabec *et* Kasparkova 2005a).

2.3.2. Oxaliplatina

Oxaliplatina ((1*R*,2*R*-diammincyklohexan)oxalátolatnatý komplex), jejíž strukturní vzorec vidíme na obr. 6, byla do klinické praxe zavedena později než karboplatina. Jako první byla schválena pro léčbu kolorektálního karcinomu (Lovejoy *et*

Lippard 2009). První klinické studie byly provedeny již v roce 1992 (Kelland 2007), kdy se prokázalo, že spolu s 5-fluorouracilem a leucovorinem vykazuje dobrou účinnost vůči nádoru tlustého střeva rezistentnímu na cisplatinu (Brabec *et* Kasparkova 2005a). Roku 2002 byla oficiálně schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) ke klinickému využití.

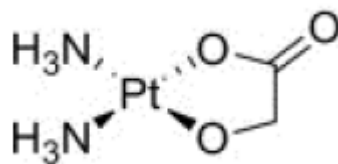


Obr. 6 – strukturní vzorec oxaliplatiny.

V tomto případě byly odstupující atomy chloru u cisplatinu nahrazeny oxalátovým ligandem a neodstupující amonné skupiny nahrazeny ligandem RR-dach (dach=diaminocyklohexan). Hydrolýza u oxaliplatiny je opět pomalejší než u cisplatinu (Brabec *et* Kasparkova 2005a) a během hydrolýzy disociuje oxalátový ligand. Místa, kde oxaliplatina tvoří na DNA adukty, jsou téměř totožná s cisplatinou. Nicméně některé studie ukazují, že oxaliplatina je méně reaktivní a tvoří DNA adukty hůře než cisplatinu (Pizarro *et* Sadler 2009). I přes nižší reaktivitu oxaliplatiny s DNA, vykazuje podobnou nebo vyšší cytotoxicitu v několika lidských nádorech (Brabec *et* Kasparkova 2005a). Zajímavé je i to, že oxaliplatina vyžaduje méně DNA lézí k dosažení inhibice růstu nádorových buněk, než je tomu u cisplatinu.

2.3.3. Nedaplatina

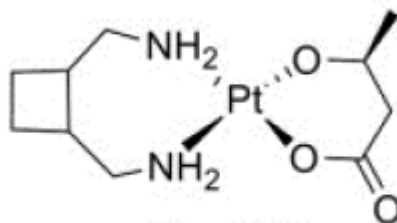
Nedaplatina (cis-diammin-glykolátplatnatý komplex) je cytostatikum používané výhradně v Japonsku (Brabec *et* Kasparkova 2005b, Kelland 2007, Lovejoy *et* Lippard 2009) a její strukturní vzorec je na obr. 7. Využívá se k léčbě nádorů hlavy a krku, plic, jícnu, varlat, vaječníků a děložního čípku. Oproti cisplatině je sice nedaplatina méně toxická, má však podobné protinádorové vlastnosti a není tedy výrazně výhodnější (Brabec *et* Kasparkova 2005b).



Obr. 7 – strukturní vzorec nedaplatiny.

2.3.4. Lobaplatina

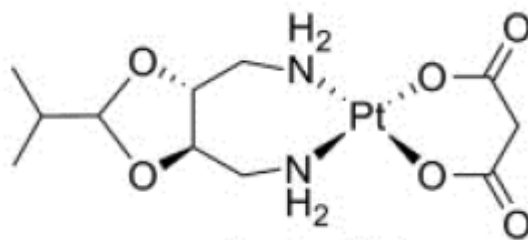
Lobaplatina (strukturní vzorec na obr. 8) je prozatím využívána pouze v Číně k léčbě chronického myeloidní leukemie a malobuněčného karcinomu plic (Boulikas *et al.* 2007). Lobaplatina dokončila II. Klinického testování v USA, Austrálii, Evropě, Brazílii a Jižní Africe a mohla by být schválena pro léčbu různých typů rakoviny včetně rakoviny prsu, jícnu, plic, vaječníků a chronické myeloidní leukemii. Zásadním vedlejším účinkem je trombocytopenie a dávka je tedy závislá na funkci ledvin pacienta. Toto cytostatikum by mohlo představovat pokrok ve vývoji platnatých léčiv, jelikož je účinné i u nádorů rezistentních vůči cisplatině a karboplatině.



Obr. 8 – strukturní vzorec lobaplatiny.

2.3.5. Heptaplatina

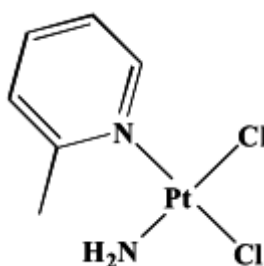
Heptaplatina je schváleným léčivem pouze v Jižní Koreji a to pro léčbu karcinomu žaludku (Boulikas *et al.* 2007). Preklinické testy naznačují její větší protinádorový účinek a nižší toxicitu, než je tomu u cisplatině. A to především nižší nefrotoxicitu. Heptaplatiny byla zkoumána jako léčivo proti nádoru hlavy a krku v kombinaci s 5-fluorouracilem nebo paclitaxelem. Její strukturní vzorec je znázorněn na obr. 9.



Obr. 9 – strukturní vzorec heptaplatiny.

2.3.6. Pikoplatina

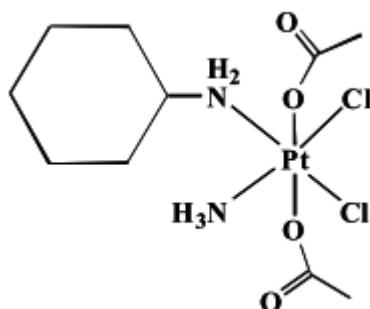
Pikoplatina, strukturní vzorec je na obr. 10, je stále ve fázi klinického testování, ale přináší příznivé výsledky. Je účinná na rakovinné buňky, které jsou rezistentní vůči cisplatině (Kelland 2007, Lovejoy *et* Lippard 2009). V II. fázi klinického testování se osvědčila při léčbě malobuněčného karcinomu plic. V I. fázi je testování pikoplatiny v kombinaci s 5-fluoruracilam a leucovorinem na rakovinu tlustého střeva a ve II. fázi u karcinomu prostaty, kde je Pikoplatina v kombinaci s docetaxelem. Oproti cisplatině není neurotoxická a nefrotoxická, vedlejším účinkem zůstává myelosuprese (Kelland 2007).



Obr. 10 – strukturní vzorec pikoplatiny.

2.3.7. Satraplatina

Satraplatina, jejíž strukturní vzorec je obr. 11, je prvním platnatým cytostatikem, které je podáváno perorálně (Kelland 2007). V roce 2007 byla schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) k léčbě rakoviny prostaty. Studie také ukázala, že satraplatina snižuje riziko progresse onemocnění bez ohledu na typ předchozí chemoterapie (McKeage 2007). Opět vedlejším účinkem zůstává myelosuprese (Lovejoy *et* Lippard 2009).



Obr. 11 – strukturní vzorec satraplatiny.

2.4. Aktivace komplexů platiny zářením

Velká nevýhoda již zavedených cytostatik, jako je cisplatina, karboplatina či oxaliplatina, je, že působí nespecificky a tím poškozují i zdravé, nenádorové buňky a tkáň. V dnešní době je již několik strategií jak tomuto předejít a jedna ze strategií jak vylepšit specifickost účinku, tedy omezit se pouze na nádorovou tkáň, je připravit inertní neaktivní proléčivo a aktivovat jej přímo v místě nádoru. Aktivace proléčiva v konkrétním místě může být provedena více způsoby a jedním z nich je aktivace zářením, které je zacíleno jen na dané místo. Této strategii se dá dobře využít při léčbě lokalizovaných nádorů přístupných záření, jako je např. rakovina močového měchýře, gastrointestinálního traktu, gynekologické nádory, nádory plic a jícnu, které jsou dobře přístupné endoskopicky a pak samozřejmě nádory kůže (Bednarski *et al.* 2006, Juarranz *et al.* 2008). Hlavním důvodem proč musí být nádor co nejvíce přístupný záření, je že UV záření při vlnové délce 365 nm proniká tkáň pouze do hloubky 1 mm (Berners-Price 2011). Viditelné záření proniká do větší hloubky, např. zelené do 3 mm a červené do 5 mm.

2.4.1. Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie má své počátky již ve starověku, kdy ji využívali Egypťané k léčbě kožních onemocnění jako je třeba vitiligo či psoriáza (Fitzpatrick *et Pathak* 1959 cit. v Perviaz *et Olivo* 2006). Fotodynamická terapie v pravém slova smyslu se začala vyvíjet počátkem 20. století, kdy prof. Von Tappeiner se studentem

medicíny Oscarem Raabem zjistili, že kombinace akridinové červeně spolu se světlem má na prvoky rodu *Paramecium* letální účinky (Jurranz *et al.* 2008, Perviaz *et al.* 2006). Tento fotodynamický efekt potvrdil Von Tappeiner spolu s dermatologem Jesionkem roku 1903, kdy aplikovali topicky eosin a bílé světlo při léčbě kožního nádoru. Profesor Von Tappeiner dále zjistil, že pro účinný efekt je nutná přítomnost kyslíku a roku 1907 poprvé užil výrazu fotodynamický efekt.

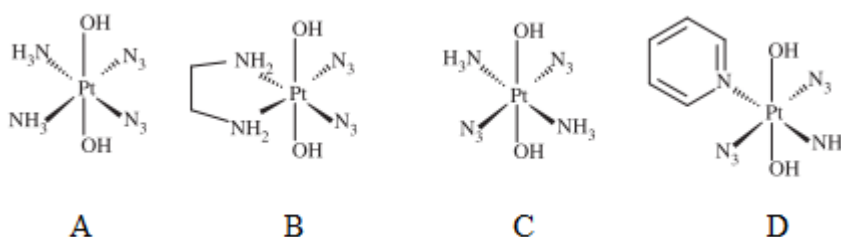
Fotodynamická terapie (PDT, photodynamic therapy) je minimálně invazivní metoda schválená ke klinickému využití jak pro léčbu nádorových onemocnění, tak i pro nenádorové onemocnění, především dermatózy. Při této léčbě se využívá spolupůsobení světla, fotosenzitivní látky a molekulárního kyslíku. Fotosenzitizér se selektivně hromadí v nádorové tkáni a tumor je následně ozářen světlem o konkrétní vlnové délce, které odpovídá absorpčnímu maximu senzitivizéru (Jurranz *et al.* 2008). Vlnové délka se obvykle pohybuje v červené oblasti spektra, tedy okolo 600 nm a vyšší, jelikož červené světlo proniká hlouběji do tkáni. Fotosenzitizér je sám o sobě netoxický a má vlastní fluorescenci, čehož se dá dobře využít k diagnostice (Perviaz *et al.* 2006), dále musí být ve tmě nereaktivní. K co nejpřesnějšímu osvětlení konkrétního místa se využívají lasery, luminiscenční diody, LED (Light-Emitting Diode) či optická vlákna. Fotosenzitizér světlo absorbuje a vznikají excitované stavy, které reagují se substrátem a molekulárním kyslíkem za vzniku reaktivních forem kyslík (ROS), především singletního kyslíku $\frac{1}{2}O$ (Jurranz *et al.* 2008). Tyto fotoprodukty jsou cytotoxické a poměrně rychle degradují membránové lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, vlivem oxidativního stresu. Vyvolané změny v jejich struktuře vedou k buněčnému poškození a dále k buněčné smrti ve formě nekrózy a apoptózy. PDT nemá kromě fotosenzibilizace kůže vedlejší účinky a další výhodou je, že je tato metoda selektivní. Jedním z problémů ovšem může být nedostatek kyslíku, kterého je uvnitř nádoru málo a je potřebný pro reakci.

Pro metodu PDT bylo do klinické praxe schváleno pouze několik málo fotosenzitizérů. Je to Photofrin, který byl schválen roku 1994 v Kanadě a dnes se používá téměř na celém světě především k léčbě karcinomu jícnu (Jurranz *et al.* 2008). Dalším schváleným fotosenzitizátorem byl roku 2001 Foscan k léčbě karcinomů hlavy a krku. A dalšími dvěma jsou Levulan a Metvix, které jsou určeny pouze pro topické použití.

2.4.2. Fotoaktivace platičitých komplexů

Centrálním atomem platičitých komplexů je platina v oxidačním stupni IV a na něj se váží ligandy. Při fotoaktivaci přechází platina z oxidačního stupně IV na oxidační stupeň II. Do této skupiny proléčiv patří diiodoplatičité komplexy, u kterých při fotoaktivaci odstupují jodidové ligandy. Tyto komplexy však nejsou vhodné pro klinické použití, jelikož komplex se redukuje na aktivní formu Pt(II) ještě před ozářením, z důvodu reakce s thioley, především glutationem (Bednarski *et al.* 2006, Bednarski *et al.* 2013).

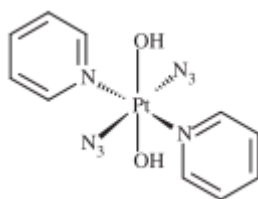
Významnější skupinou jsou diazidoplatičité komplexy. Něktými ze zástupců této skupiny jsou např. *cis, trans, cis*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂] (FM58), *cis, trans*-[Pt(en)(N₃)₂(OH)₂] (FM59), *trans, trans, trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂] (FM137) a *trans, trans, trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)(pyridin)] (FM165), jejichž strukturní vzorce jsou na obr. 12 (Bednarski *et al.* 2013). Tyto komplexy byly vyvinuty skupinou vědců okolo prof. Petera Sadlera a jejich budoucnost je velmi slibná z důvodu jejich vynikající stability za tmy a schopnosti cytotoxicity po ozáření UV zářením.



Obr. 12 – strukturní vzorce diazidoplatičitých komplexů. (A) - *cis, trans, cis*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂] (FM58), (B) - *cis, trans*-[Pt(en)(N₃)₂(OH)₂] (FM59), (C) - *trans, trans, trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂] (FM137), (D) - *trans, trans, trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)(pyridin)] (FM165), převzato z Bednarski *et al.* 2013 a upraveno.

Cytotoxicita látek FM58 a FM59 je horší či srovnatelná s cisplatinou, ačkoliv adukty DNA tvoří mnohem rychleji než cisplatinou (Bednarski *et al.* 2006). Fotoaktivace těchto chemoterapeutik má ohromný vliv na morfologii nádorových buněk a na jejich následný rozpad. A mechanismus účinku těchto proléčiv se významně odlišuje od mechanismu účinku cisplatinu. Zajímavý je i fakt, že *trans* komplex FM137 je po ozáření UV zářením přinejmenším stejně aktivní jako cisplatinou (Berners-Price 2011).

Nejvýznamnějším komplexem této skupiny je komplex *trans, trans, trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(pyridin)₂] (FM190), jehož strukturní vzorec je na obr. 13. Přestože je inertní vůči hydrolyze, je účinný i na nádory rezistentní na cisplatinu (Berners-Price 2011). Průlomem je i jeho aktivovatelnost nejenom UV zářením, ale i viditelným světlem, především pak modrým a zeleným světlem (Berners-Price 2011, Pracharova *et al.* 2012). Dalším kladem je jeho silná fototoxicita i při nízké dávce ozáření. Tento komplex je vhodným kandidátem pro preklinické testování na zvířecích modelech nádorů (Bednarski *et al.* 2013).



Obr. 13 – strukturní vzorec komplexu *trans, trans, trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(pyridin)₂] (FM190.)

Velkou výhodou fotoaktivace chemoterapeutik je, že při aktivaci těchto komplexů není nutná přítomnost molekulárního kyslíku, jako tomu bylo u PDT (Bednarski *et al.* 2006). Při ozáření vytváří tyto komplexy reaktivní formy dusíku (RNS) a je pravděpodobné, že právě RNS jsou pro nádorovou buňku cytotoxické, podobně jako tomu bylo u reaktivních forem kyslíku u PDT (Bednarski *et al.* 2013).

2.4.3. Fotoaktivace platnatých komplexů

Jak již bylo zmíněno výše, ačkoliv je cisplatinu protinádorově účinná, její *trans* izomer *trans*platinu cytotoxická není. Velmi zajímavý je proto fakt, že po ozáření UV zářením je *trans*platinu téměř stejně cytotoxická jako cisplatinu, a to především v důsledku zvýšené tvorby meziřetězcových můstků (Heringova *et al.* 2006). Kdežto cytotoxicita cisplatinu je ozářením ovlivněna jen velmi málo. Přesto bylo zjištěno, že při kombinaci cisplatinu a ionizujícího záření na DNA *in vitro*, dochází ke zvýšení rozsahu konformačních změn DNA (Vrana *et Brabec* 1986).

Záření nemusí být využíváno pouze pro nové platnaté komplexy, které byly vyvinuté speciálně k tomuto účelu. Záření se může kombinovat i s již zavedenými platnatými cytostatiky jako je např. karboplatina. Mlčoušková *et al.* (2012) zjistili, že

při ozařování vzorku DNA s karboplatinou UV zářením o vlnové délce 365 nm, je po 5 hodinách navázáno více než 50 % karboplatiny na DNA. Kdežto u vzorku karboplatiny s DNA, který byl uchován po tmě či ozářen viditelným světlem, bylo po 5 hodinách navázáno méně než 10 % karboplatiny na DNA, a po 45 hodinách bylo navázáno okolo 30 % karboplatiny. Karboplatina se tedy stává mnohonásobně reaktivnější vlivem UV záření a díky tomuto poznatku by se mohly zlepšit výsledky léčby. Karboplatina je tak dalším kandidátem v léčbě rakoviny pomocí fotoaktivovatelných chemoterapeutik.

Takovými kandidáty by potenciálně mohly být i další již používaná platnatá cytostatika. Jedním z nich by mohla být i oxaliplatina, což je komplex testovaný na vliv záření v další části této práce.

2.5. Diferenční pulzní polarografie

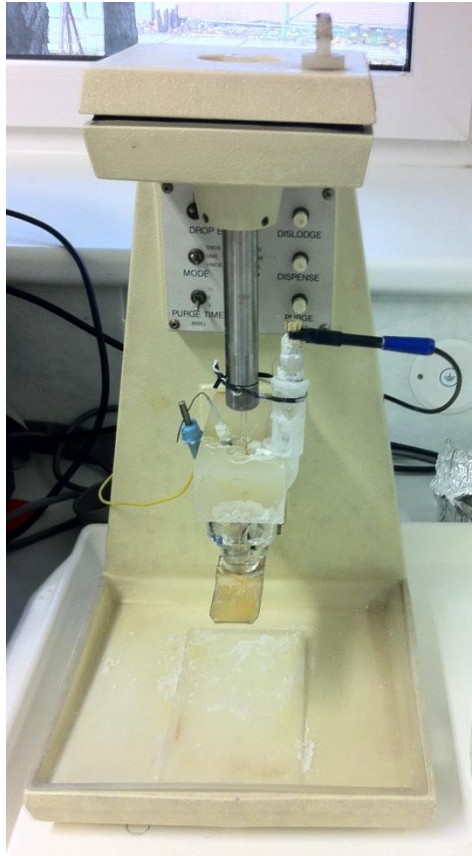
Polarografie se řadí mezi elektrochemické analytické metody. Byla objevena roku 1922 Čechem Jaroslavem Heyrovským, který za ni obdržel roku 1959 Nobelovu cenu za chemii. Tato metoda slouží ke kvalitativní i kvantitativní analýze oxidovatelných nebo redukovatelných látek v roztoku. Princip je založen na vyhodnocování závislosti elektrického proudu na napětí, které je přivedeno na dvojici elektrod, které jsou ponořeny v elektrolytu, kde dochází k elektrolýze. Výsledkem měření jsou křivky, tzv. polarografické vlny, jejichž polohy charakterizují jednotlivé druhy látek. Touto metodou lze určit i koncentraci látky, která se určuje z velikosti proudu.

Jak bylo zmíněno výše, polarografický experiment spočívá ve vyhodnocování závislosti proudu na napětí přivedeném na dvojici elektrod, ponořených do elektrolyzovaného roztoku. Jedna elektroda je dokonale polarizovatelná a druhá je nepolarizovatelná elektroda. Tou dokonale polarizovatelnou elektrodou (katoda) je rtuťová kapková elektroda, nepolarizovatelnou může být např. nasycená kalomelová nebo argentchloridová elektroda. Rtuťová kapková elektroda je tvořena tlustostěnnou skleněnou kapilárou, na jejímž konci pravidelně odkapává kapka rtuti. Na povrchu této kapky se pak vytváří elektrická dvojvrstva. Zvyšuje se rozdíl potenciálů mezi anodou a katodou a dochází k vylučování iontů na katodě a následně narůstá proud. Velikost proudu je však omezena množstvím iontů, které mohou ke katodě z roztoku přicházet. Proud se přestává zvětšovat, jakmile se vyrovná množství vylučujících iontů a iontů

přicházejících z roztoku. Pro každé následující měření je vytvořena nová rtuťová kapka. Vodivost roztoku je zajištěna základním elektrolytem. Výsledkem měření je polarogram.

Diferenční pulzní polarografie je, spolu s dalšími sofistikovanými metodami jako např. AAS, fluorescenční spektroskopie či vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC), vhodnou a velmi citlivou metodou pro stanovení vazby platnatého i platinového léčiva na DNA (Kim *et al.* 1990). Diferenční pulzní polarografie slouží ke stanovení volné (nenavázané) platiny na DNA v přítomnosti DNA nebo komplexu DNA-platina bez nutnosti separace volné platiny z reakčních produktů. Měření se provádí v elektrolytu, který je složený z formaldehydu, hydrazinu a kyseliny sírové (FHSA elektrolyt). Metoda je založena na měření polarografického katalytického proudu vylučování vodíku poskytovaného komplexu platiny v prostředí základního elektrolytu obsahujícího formaldehyd – hydrazin – kyselina sírová, ve kterém se DNA nebo komplex DNA-platina vysráží (Kim *et al.* 1990). Mezi výhody této metody patří především jednoduchost, rychlost a vysoká citlivost. Díky rychlosti měření lze tuto metodu použít pro studium kinetiky vazby platnatého léčiva na DNA. Citlivost diferenční pulzní polarografie ke stanovení platiny v roztoku je 10^{-9} M, což se ukázalo jako výhoda např. při pokusech, ve kterých se používají plasmidové nebo virové DNA, protože tyto vzorky jsou obvykle k dispozici jen v omezeném množství.

Měření bylo provedeno na přístroji EG&G Princeton Applied Research Model 384B Polarographic Analyzer, který je na obr. 14. Měření bylo provedeno s využitím tříelektrodevého systému. Pracovní elektroda byla rtuťová kapková, argentchloridová elektroda sloužila jako referenční elektroda a jako pomocná elektrodou byla použita elektroda z pyrolytického grafitu. Pracovní elektroda byla polarizována na potenciály v rozmezí -0,4 až -1 V (proti argentchloridové elektrodě) při rychlosti polarizace elektrody 50 mV/s (Kim *et al.* 1990). Odkapávání rtuťové kapky bylo nastaveno na interval 1 s.



Obr. 14 – polarograf EG&G Princeton Applied Research Model 384B Polarographic Analyzer.

3. Cíl práce

- Vypracovat přehled dosud známých informací o interakcích DNA s protinádorově účinnými komplexy platiny, se zvláštním zaměřením na aktivace sloučenin těžkých kovů, především platiny, ultrafialovým a viditelným zářením.
- Provést experimenty zaměřené na stanovení rychlosti vazby oxaliplatiny na DNA z telecího thymu ve tmě a po aktivaci UV zářením.
- Získané výsledky srovnat s údaji z odborné literatury, které se týkají fotoaktivace karboplatiny a diskutovat je z hlediska biologické aktivity obou sloučenin.

4. Materiál a metody

4.1. Použité chemikálie

Všechny chemikálie byly p. a. čistoty.

Ve všech experimentech byla použita deionizovaná voda.

- DNA z telecího thymu (obsah G+C párů 42 %, průměrná molekulová hmotnost $M_r = 20000$ kDa) připravena dle postupu, který byl popsán v literatuře (Brabec *et* Palecek 1976)
- Kyselina sírová od firmy Penta (Chrudim, ČR), formaldehyd a hydrazin od firmy Sigma (Praha, ČR) pro přípravu elektrolytu
- Chloristan sodný zakoupený od firmy Sigma (Heidelberg, Německo)
- Sephadex G-50 (Coarse) od firmy Sigma (Praha, ČR)
- Oxaliplatina od firmy Sigma (Praha, ČR)
- Karboplatina od firmy Sigma (Praha, ČR)
- RR-DACH byl získán darem od prof. Natile (University Bari, Itálie)
- Cisplatina od firmy Sigma (Praha, ČR)
- Deionizovaná voda (měrná vodivost $\kappa = 0,005 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)

4.2. Metody

4.2.1. Příprava elektrolytu

Elektrolyt slouží k měření rychlosti vazby platinových komplexů na DNA s využitím diferenční pulzní polarografie. Do 5 ml elektrolytu, který se skládá z 0,08 M formaldehydu, 0,008 M hydrazinu a 0,75 M kyseliny sírové, je přidán analyzovaný vzorek (5 μl či 10 μl). V elektrolytu dochází k okamžitému srážení DNA, čímž dochází k zastavení reakce platinového komplexu s DNA.

4.2.2. Příprava vzorků

Telecí thymová DNA ($20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla rozpuštěna v prostředí NaClO_4 (10 mM). Směs byla protřepána na Vortexu a následně byl vzorek stočen na mikrocentrifuze. Poté byl ke směsi přidán daný komplex platiny, vzorek byl opět protřepán na Vortexu a okamžitě byl uschován do tmy, případně vložen do fotoreaktoru, kde byl ozařován světlem UV ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$). V obou případech byly vzorky uchovávány při teplotě 37 °C. Hodnota r_i (počet molekul komplexu připadajících na jeden nukleotid na počátku reakce s DNA) byla 0,08. Doba ozařování byla u jednotlivých komplexů různá. Následně byly v různých časových intervalech odebírány alikvoty a vyhodnocovány pomocí diferenční pulzní polarografie, nebo pomocí metody Sephadexových kolonek a následnou analýzou pomocí AAS.

4.2.3. Ozařování platnatých komplexů

Komplexy platiny byly aktivovány UV zářením. Fotoaktivovatelné komplexy byly ozařovány ve fotoreaktoru Luzchem LZC-ICH2 s regulátorem teploty. Teplota byla nastavena na 37 °C. Ve fotoreaktoru se nachází 16 lamp pro UV záření ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$, $3,5 \text{ mW}/\text{cm}^2$).

4.2.4. Měření kinetiky pomocí diferenční pulzní polarografie

K měření volné (nenavázané) platiny na DNA byla použita metoda diferenční pulzní polarografie na rtuťové kapkové elektrodě. K měření byl použit přístroj EG&G Princeton Applied Research Model 384B Polarographic analyzer. Tento přístroj je složen ze tříelektrodového systému. Podrobněji je diferenční pulzní polarografie rozebrána v teoretické části, kapitola 2.5. Diferenční pulzní polarografie.

V určitých časových intervalech byly odebírány alikvoty vzorku, které byly pipetou přeneseny do 5 ml základního elektrolytu. Následně byla tato směs analyzována na polarografu. Polarografický signál je v tomto případě úměrný koncentraci volné platiny. Množství navázané platiny na DNA (v %) lze pak snad spočítat dle vzorce

$$Z(\%) = 100 - \left(\frac{I_{pt}}{I_{p0}} \cdot 100 \right),$$

kde I_{pt} značí velikost proudové odezvy pro volný platinový komplex ze vzorku v čase t a I_{p0} značí velikost proudové odezvy v čase $t = 0$ min, kdy je 100 % komplexu nenavázáno na DNA.

4.2.5. Měření kinetiky pomocí ASS

Kromě předchozí metody, která byla použita ve většině případů, se rychlost vazby platnatých komplexů na DNA měřila i pomocí AAS.

Vzorky byly v tomto případě ozařovány maximálně po dobu 3,5 hod v závislosti na druhu komplexu. V průběhu ozařování byly odebírány v různých časových intervalech alikvoty a následně byly filtrovány přes kolonky obsahující Sephadex G-50, čímž byla odstraněna volná (nenavázaná) platina.

Do připravených kolonek s vatou a Sephadexem byly odebírány v různých časových intervalech alikvoty o objemu 100 μ l. Kolonky se vzorky se daly stáčet na 4 minuty při 2500 otáčkách za minutu. Tímto procesem byla ze vzorku odstraněna volná platina. DNA s navázanou platinou při stáčení skla do ependorfky, ve které je vzorek uchován pro další analýzu na ASS či pro měření koncentrace vzorku na spektrofotometru.

Nakonec byly v daném roztoku DNA pomocí AAS stanoveny koncentrace platiny. Hodnota r_b (počet molekul platinového komplexu navázaných na jeden nukleotid) pak byla vypočtena jako podíl koncentrace platiny ku koncentraci DNA, kdy koncentrace DNA je uvedena jako koncentrace nukleotidů.

4.2.6. Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru DU[®]730, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA. Spektrum bylo proměřováno v rozmezí 200 – 400 nm, přičemž důležité jsou pro nás vlnové délky 260 nm, 280 nm a 350 nm. A to z důvodu, že při 260 nm absorbuje DNA, při 280 nm RNA a při 350 nm absorbují proteiny. Za standard byl zvolen NaClO₄ (10 mM). Z poměru absorbance A při 260 nm a 280 nm lze usoudit na čistotu vzorku. Při znečištění vzorku bílkovinami vychází poměr těchto dvou absorbancí pod 2,0. V běžné praxi stačí, když se poměr absorbancí pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,0.

Pomocí absorbance A při 260 nm (měření v kyvetě, kdy délka dráhy paprsku ve vzorku je L [cm]) lze vypočíst i koncentraci DNA dle následujícího vzorce

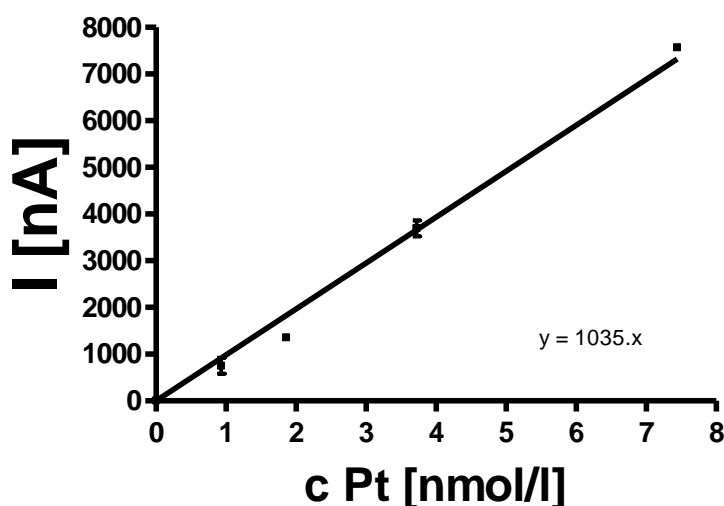
$$c [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = \frac{A}{L} \cdot 50,$$

kde A je rozdíl absorbance při 260 nm a 350 nm.

5. Výsledky a diskuze

Pro stanovení rychlosti, kterou se oxaliplatina váže na DNA jak ve tmě, tak i po aktivaci UV zářením, byla zvolena metoda diferenční pulsní polarografie. Tato metoda umožňuje s velkou citlivostí stanovit koncentraci volného komplexu platiny v reakční směsi s DNA v různých časech reakce (viz Materiál a metody).

Nejprve byla proměřena závislost výšky polarografického signálu (intenzity proudu) na koncentraci oxaliplatiny. Tato závislost je na obr. 15.



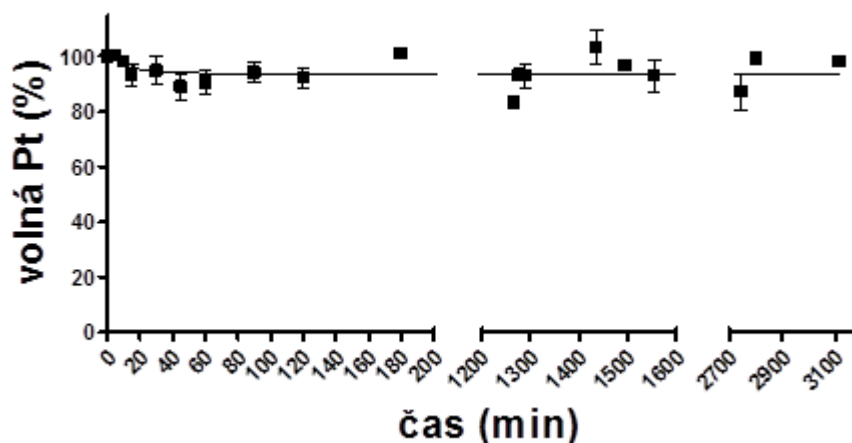
Obr. 15 - Závislost výšky polarografického signálu (intenzity proudu) na koncentraci oxaliplatiny. Body představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze dvou nezávislých měření. U některých bodů není směrodatná odchylka na grafu patrná, protože velikost bodů je větší než úsečka odpovídající dané odchylce.

Z grafu vyplývá, že tato závislost je lineární v celém rozsahu měřených koncentrací. Pro další měření byly tedy zvoleny koncentrace oxaliplatiny v tomto rozsahu a kalibrační závislost využita k stanovení koncentrací volného komplexu v následujících experimentech.

V dalším experimentu byla studována rychlost vazby oxaliplatiny na DNA z telecího thymu. DNA o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M byla inkubována s oxaliplatinou ($c = 2,0 \cdot 10^{-6}$ M) v 0,01 M NaClO_4 při 37 °C buď ve tmě, nebo za podmínek průběžného ozařování UV zářením (viz. Materiál a metody). V daných časových intervalech byly

z reakční směsi odebírány alikvoty o objemu 5 μ l, každý odebraný vzorek byl přidán k 5 ml základního elektrolytu. Tím došlo k zastavení reakce vysrážením DNA v důsledku výrazného snížení pH roztoku. Změna koncentrace volného komplexu v roztoku během této vazebné reakce byla studována v čase pomocí diferenční pulzní polarografie. Změřená výška signálu byla pomocí kalibrační rovnice (viz obr. 15) přepočtena na koncentraci oxaliplatinu přítomné v roztoku. Koncentrace oxaliplatinu v počátku reakce ($t = 0$) byla vzata jako 100 %.

Závislost množství volné, tj. oxaliplatinu nnavázané na DNA (v %) na reakčním čase ukazuje obr. 16.

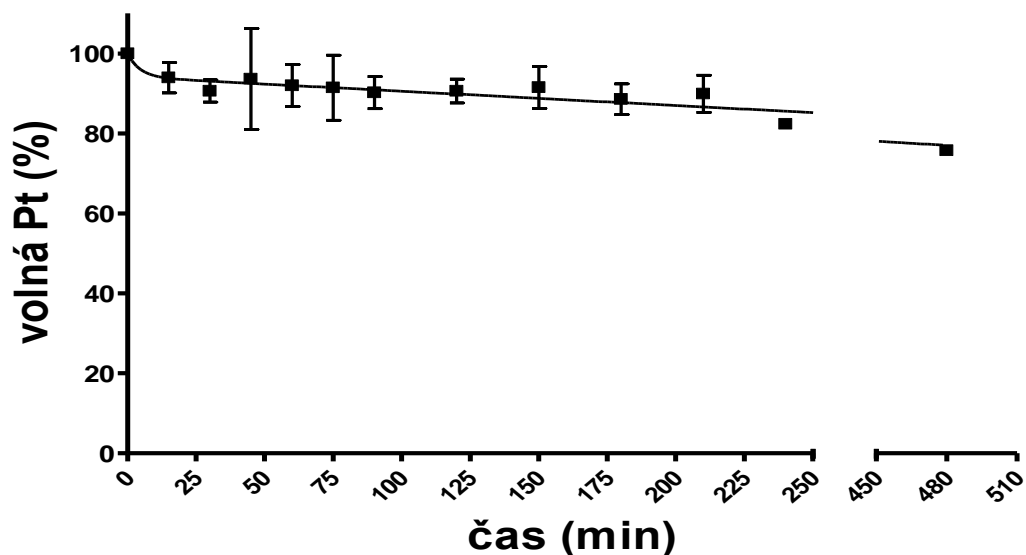


Obr. 16 - Kinetika vazby oxaliplatinu na DNA ($r_i = 0,08$) ve tmě. Body představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze čtyř nezávislých měření.

Výsledek ukazuje, že ani po dlouhé době (cca 51 h) inkubace oxaliplatinu s DNA ve tmě nedochází k významnému úbytku volného komplexu v důsledku vazby na DNA, tj. že oxaliplatin se za těchto podmínek na DNA neváže nebo váže jen nepatrně, takže úbytek volného komplexu je menší než chyba měření. Tento výsledek je ve shodě s údaji uveřejněnými v literatuře (Woynarowski *et al.* 2000). Příčinou pomalé reakce s DNA je pomalá hydrolýza oxalátové skupiny; výměna oxalátové skupiny za molekuly vody je nezbytná pro vazbu oxaliplatinu na DNA a je krokem určujícím rychlost celkové reakce s DNA.

Pro stanovení vlivu UV záření na rychlost vazby oxaliplatinu na DNA byl proveden experiment obdobný předchozímu jen s tím rozdílem, že reakční směs byla

ihned po smísení ozařována UV zářením (viz Materiál a metody). V daných časových intervalech byly ze směsi odebírány vzorky a koncentrace volné oxaliplatiny (tj. nenavázané na DNA) byla stanovena opět metodou diferenční pulsní polarografie. Zjištěné hodnoty byly vyneseny do grafu, který je na obr. 17.

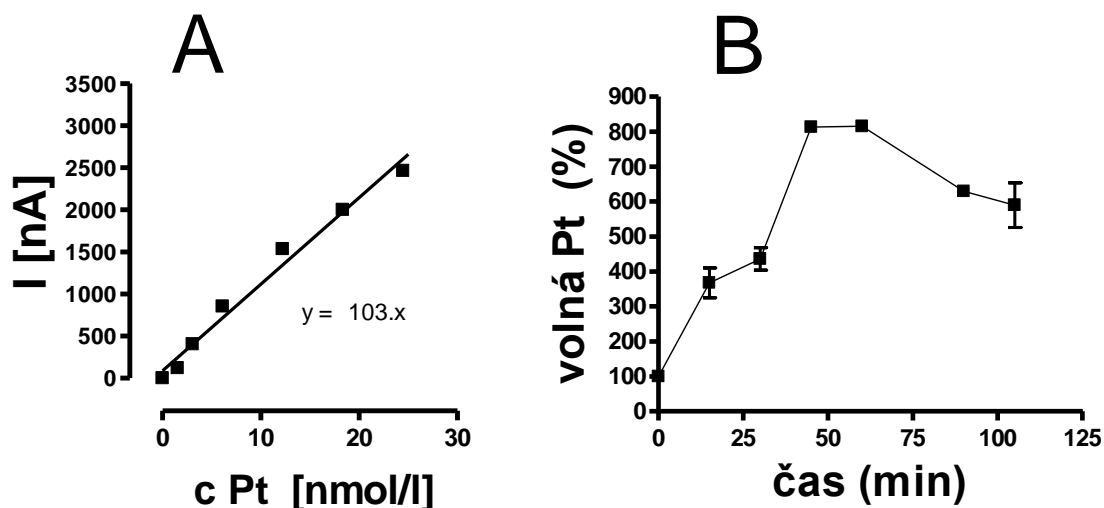


Obr. 17 - Kinetika vazby oxaliplatiny na DNA ($r_i = 0,08$) za současného ozáření UV. Body představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze čtyř nezávislých experimentů.

Výsledky ukazují, že i za podmínek působení UV záření klesá množství volné oxaliplatiny v roztoku velmi pomalu tak, že po 4 hodinách ozáření bylo v reakční směsi přítomno 82 ± 1 % z původního množství oxaliplatiny přidaného do reakce, tj. navázano na DNA bylo 18 % z veškeré oxaliplatiny přítomné v reakční směsi. To ukazuje, že záření mělo na rychlost vazby oxaliplatiny k DNA jen velmi malý vliv. Oproti tomu bylo již dříve ukázáno (Mlcouskova *et al.* 2012), že UV záření za stejných podmínek vede k výraznému zvýšení rychlosti vazby karboplatiny k DNA, kdy po 4 hodinách byla za podmínek ozáření reakční směsi navázano více jak 50 % karboplatiny, zatímco za stejných podmínek po tmě se navázalo pouze 4-5 %. To ukazuje, že oba komplexy platiny, přestože oba obsahují dikarboxylátový odstupující ligand, se chovají odlišně. Zatímco UV záření vede u karboplatiny k aktivaci a potencuje vazbu této látky na DNA a zvyšuje také její biologickou aktivitu, u oxaliplatiny je tento efekt jen velmi malý.

Protože získaný údaj o možné aktivaci oxaliplatinu byl negativní, tj. nepotvrdil se původně předpokládaný výrazný vliv UV záření na urychlení reakce s DNA, byl z důvodu přímého srovnání proveden také totožný experiment s karboplatinou, pro kterou byly údaje o rychlosti vazby na DNA za současného ozařování již dříve publikovány (Mlcouskova *et al.* 2012). Cílem tohoto experimentu bylo potvrdit experimentálně závěr učiněný na základě předchozího měření a jeho srovnání s údaji v literatuře, tj. že oxaliplatinu a karboplatinu jsou UV zářením za naprosto stejných podmínek aktivovány odlišně.

Pro stanovení vlivu UV záření na rychlost vazby karboplatinu k DNA byla reakční směs po smísení ozařována UV zářením stejně jako v případě předešlého experimentu s oxaliplatinou. V daných časových intervalech byly ze směsi odebírány vzorky a koncentrace volné (tj. nenavázané na DNA) karboplatinu byla stanovena opět metodou diferenční pulsní polarografie s využitím kalibrační přímky (obr. 18A) sestavené k tomu účelu. Koncentrace DNA a karboplatinu v reakční směsi byla stejně jako v případě experimentů s oxaliplatinou $2,5 \cdot 10^{-5}$ M (DNA) a $2 \cdot 10^{-6}$ M (karboplatinu). Zjištěné hodnoty byly vyneseny do grafu, který je ukázán na obr. 18B.

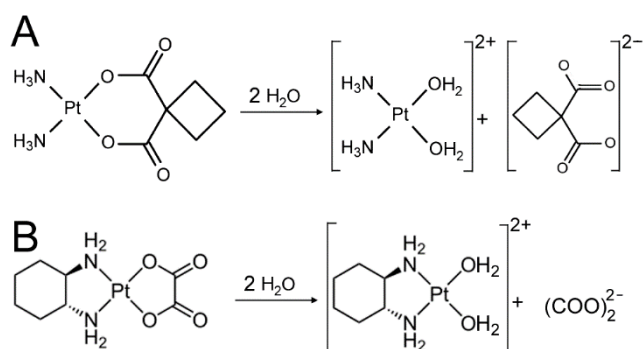


Obr. 18 - Závislost výšky polarografického signálu (intenzity proudu) na koncentraci karboplatinu (A). Závislost množství volné karboplatinu na čase při reakci s DNA ($r_i = 0,08$) za současného ozařování UV (B). Body představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze dvou nezávislých měření. Jako 100% byla vzata koncentrace volné karboplatinu v počátku reakce ($t=0$).

Jak je patrné z grafu 18B, získaný výsledek byl zcela neočekávaný. Jestliže se komplexy platiny váží k DNA, ubývá volný komplex z roztoku právě o ten počet

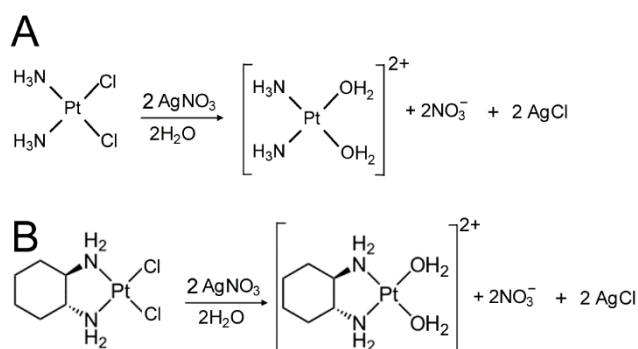
molekul, které se navázaly na DNA, a tedy množství volného komplexu platiny v reakční směsi klesá (a současně roste množství komplexu kovalentně navázaného k DNA). Vazba karboplatiny k DNA by se tedy měla projevit poklesem koncentrace volné karboplatiny v čase; pokud by k vazbě z nějakého důvodu nedocházelo, pak by koncentrace volné karboplatiny měla zůstat nezměněná. Výsledek patrný z grafu 18B však jasně ukazuje, že v průběhu reakce nejprve dochází k nárůstu polarografického signálu (který je úměrný koncentraci karboplatiny v roztoku, jak vyplývá z obr. 18A) s maximem v čase 45-60 min a dále pak signál opět klesá. Vzhledem k tomu, že v průběhu experimentu bylo důsledně kontrolováno, že nedošlo ke změně objemu reakční směsi a nemohlo tedy v žádném případě dojít k nárůstu koncentrace karboplatiny přítomné v reakci, bylo třeba najít pro tento neobvyklý jev racionální vysvětlení.

Je známo, že výška polarografického signálu závisí nejen na koncentraci platiny v měřeném roztoku, ale je ovlivněna také její chemickou formou. Rozdílné sloučeniny platiny mohou poskytovat různou intenzitu proudu v závislosti na oxidačním stupni atomu platiny, na chemickém složení ligandů a dokonce i na prostorovém uspořádání (konformaci) ligandů (Vrana *et al.* 1984, Kim *et al.* 1990), což je dáno jejich rozdílnou interakcí s povrchem elektrody a také rozdílnou rychlostí difuze k povrchu elektrody. U karboplatiny se předpokládá, že UV záření stimuluje její hydrolyzu a rychleji tak dochází k výměně cyklobutandikarboxylátového ligandu za vodu (Mlcouskova *et al.* 2012). Takto vzniklá hydrolyzovaná forma karboplatiny má však odlišnou chemickou strukturu (obr. 19A) a mohla by tedy poskytovat jinou intenzitu signálu při stejné koncentraci než karboplatina samotná.



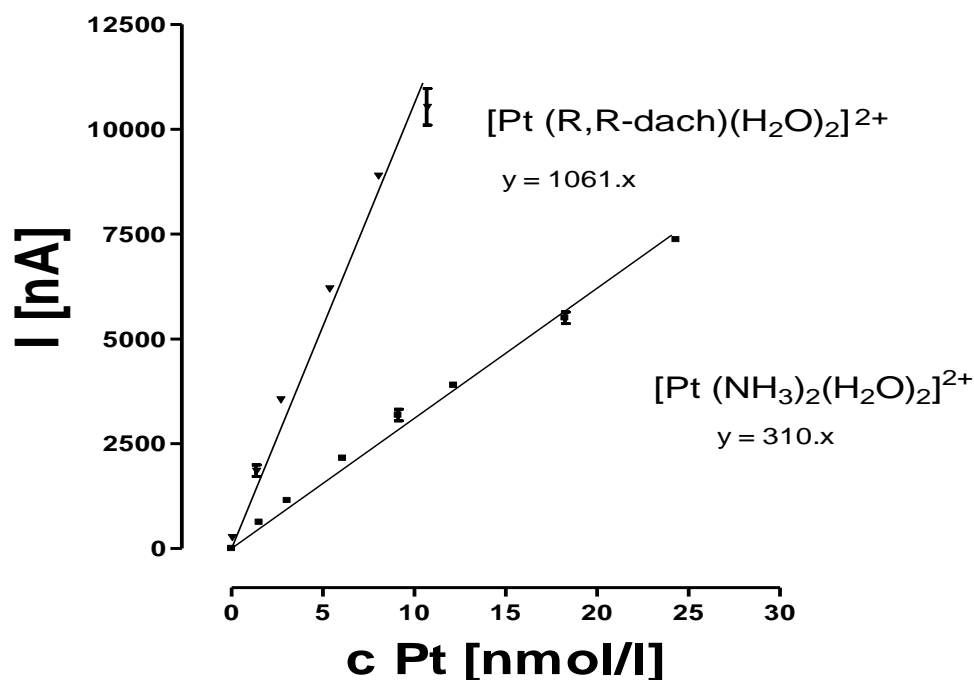
Obr. 19 - Souhrnné schéma hydrolyzy karboplatiny (A) a oxaliplatin (B). Pro přehlednost schéma zachycuje pouze výchozí sloučeniny a produkty, ve skutečnosti je reakce dvojkroková.

Totéž platí také pro oxaliplatinu, která byla v této práci studována. Proto jsme dále připravili sloučeniny, které jsou produktem hydrolyzy karboplatiny a oxaliplatiny a změřili závislost výšky polarografického signálu na koncentraci těchto sloučenin. Tyto diaqua-platnaté sloučeniny jsme připravili reakcí cisplatiny $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ a komplexu $[Pt(R,R-dach)Cl_2]$ (dach=diaminocyklohexan) se dvěma molárními ekvivalenty $AgNO_3$ metodou popsanou dříve (Brabec *et al.* 1992). Reakční schéma této reakce je na obr. 20. Vzniklá sraženina $AgCl$, která je nerozpustná ve vodě a lze ji snadno odstranit centrifugací.



Obr. 20 - Schéma hydrolyzy cisplatiny (A) a komplexu $[Pt(R,R-dach)Cl_2]$ (dach = diaminocyklohexan) pomocí $AgNO_3$.

Závislost výšky polarografického signálu stanoveného metodou diferenční pulsní polarografie pro takto vzniklé hydrolyzované formy platnatých komplexů jsou znázorněny na obr. 21.



Obr. 21 - Závislost výšky polarografického signálu (intenzity proudu) na koncentraci hydrolyzovaných forem karboplatiny – $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ a oxaliplatinu - $[\text{Pt}(\text{R,R-dach})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Body v grafu představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze dvou nezávisle naměřených hodnot.

Z výsledku je patrné, že přestože obě sloučeniny poskytují signál, který je přímo úměrný jejich koncentraci v roztoku, směrnice obou lineárních závislostí je odlišná. Stejně tak i směrnice závislosti výšky polarografického signálu na koncentraci pro oxaliplatinu a karboplatinu se liší navzájem i od hydrolyzovaných forem – viz obr. 15, 18A, 21 a tab. 1.

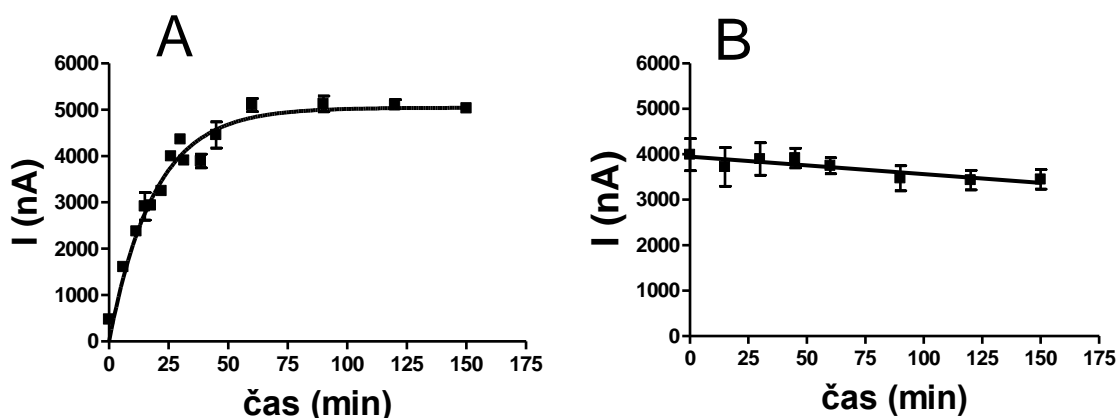
Tab. 1 - Směrnice lineárních závislostí výšky proudu k na koncentraci studovaných komplexů, určených z výsledků experimentů ukázaných na obrázcích 15, 18A a 21.

komplex	k [$\text{A}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]
oxaliplatina	1035 ± 30
$[\text{Pt}(\text{R,R-dach})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	1061 ± 31
karboplatina	103 ± 4
$[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	310 ± 5

Z těchto údajů je zřejmé, že určitá koncentrace karboplatiny poskytne 3 krát nižší signál než tatáž koncentrace hydrolyzované formy. Z toho vyplývá, že pokud UV záření vyvolává hydrolyzu, měla by intenzita proudu měřená pomocí metody diferenční pulsní

polarografie narůstat, i když se koncentrace platiny v roztoku nemění. Pro oxaliplatinu však toto neplatí, výšky signálů pro hydrolyzovanou i nehydrolyzovanou formu oxaliplatinu se v rámci experimentální chyby neliší, a proto by se hydrolyza oxaliplatinu na výšce polarografického signálu neměla projevit.

Abychom ověřili, že tento závěr je správný, provedli jsme experiment, ve kterém byly ozařovány pouze samotné roztoky karboplatiny a oxaliplatinu bez přítomnosti DNA. Veškeré ostatní podmínky (koncentrace komplexů, teplota, pufr, podmínky ozáření) byly identické jako v případě experimentů s DNA (viz obr. 17 a 18B). Roztoky karboplatiny a oxaliplatinu byly ozařovány a v daných časových intervalech byly odebrány z reakčních směsí vzorky o objemu 10 μl , přidány k 5 ml elektrolytu a byla zaznamenána výška polarografického signálu. Data získaná ze tří (oxaliplatinu) nebo čtyř (karboplatinu) nezávislých experimentů jsou uvedena na obr. 22.



Obr. 22 - Změna výšky signálu stanoveného diferenční pulsní polarografií pro karboplatinu (A) a oxaliplatinu (B) v závislosti na době ozařování UV zářením. Body představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze tří (A) nebo čtyř (B) nezávislých měření.

Z grafu je zřejmé, že po ozáření karboplatiny v nepřítomnosti DNA signál vzrůstá, až po čase cca 75 min dosáhne maximální hodnoty, která se již dále nemění. To nasvědčuje tomu, že působením UV záření na karboplatinu dochází k reakci, která po přibližně 75 minutách dosáhne rovnovážného stavu. Produkt reakce poskytuje vyšší signál než výchozí karboplatina, proto výška signálu s dobou ozařování narůstá, přestože se koncentrace platiny v roztoku nemění.

Tento výsledek tak může pomoci vysvětlit neobvyklé pozorování na obr. 18B, kdy při reakci karboplatiny s DNA za současného ozařování koncentrace volného komplexu nejprve zdánlivě rostla a po dosažení maxima začala opět klesat. Nejprve zřejmě docházelo k nárůstu výšky signálu v důsledku změny struktury komplexu platiny, přičemž tento nárůst převažoval nad poklesem signálu vyvolaným snížením koncentrace volného komplexu způsobeným vazbou na DNA. Po ukončení reakce, kdy došlo k dosažení rovnovážného stavu, signál již dále neroste a začíná převažovat pokles signálu v důsledku vazby aktivovaného komplexu na DNA.

Naproti tomu v případě oxaliplatinu, kdy se výška signálu v důsledku ozařování téměř nemění, byl pozorován jen nepatrný pokles výšky signálu (cca o 14 % z původní hodnoty) jako důsledek ozařování samotného komplexu UV zářením. To může být vysvětleno buď tím, že UV záření nemá na oxaliplatinu žádný vliv a tedy nedochází v průběhu ozařování ke změně chemické podstaty nebo struktury komplexu platiny, nebo také tím, že sice ke změně dochází, ale výsledný produkt poskytuje signál stejné intenzity jako původní výchozí oxaliplatinu. Pro první vysvětlení svědčí výsledky získané při reakci oxaliplatinu s DNA (obr. 16 a 17), ze kterých je patrné, že UV záření ovlivňuje reaktivitu oxaliplatinu s DNA jen nepatrně, pro druhé vysvětlení svědčí to, že směrnice závislosti výšky polarografického signálu na koncentraci jsou stejné pro oxaliplatinu i pro produkt její hydrolyzy [Pt (R,R-dach)(H₂O)₂] (viz tab. 1). Kdyby tedy reakcí, která je stimulována UV zářením, byla hydrolyza, ve změně výšky signálu by se to neprojeвило.

K ověření, zda reakcí vyvolanou UV zářením především u karboplatiny by mohla být výše zmíněná hydrolyza, jsme provedli srovnání výšky signálů naměřených a signálů vypočtených z kalibračních závislostí. Toto srovnání je uvedeno v tab. 2.

Tab. 2 - Srovnání experimentálně stanovených výšek polarografického signálu pro karboplatinu, oxaliplatinu a produkty jejich přeměny vyvolané UV zářením a výšek signálu teoreticky vypočítaných s využitím kalibračních závislostí stanovených v této práci.

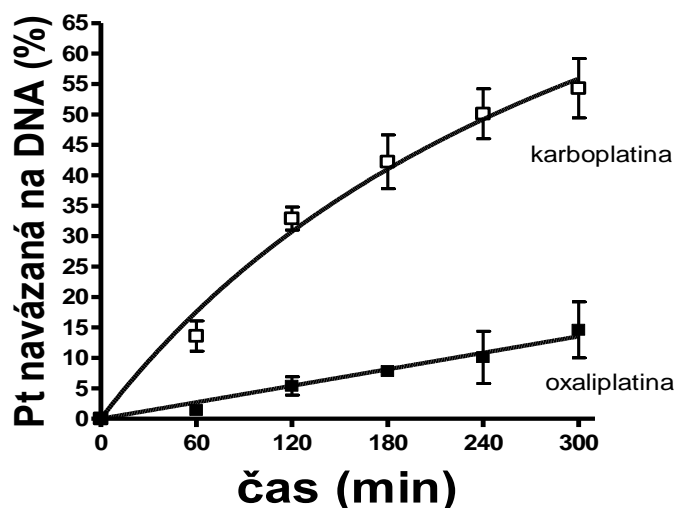
		karboplatina	<i>cis</i> - [Pt(NH ₃) ₂ (H ₂ O) ₂] ²⁺	oxaliplatinu	[Pt(R,R-dach)(H ₂ O) ₂] ²⁺
Koncentrace [mol·l ⁻¹]		4·10 ⁻⁹	4·10 ⁻⁹	4·10 ⁻⁹	4·10 ⁻⁹
Výška signálu [A]	Z kalibrace	432·10 ⁻⁹	1240·10 ⁻⁹	4140·10 ⁻⁹	4244·10 ⁻⁹
	Experiment	(477 ± 51)·10 ⁻⁹	(5114 ± 140)·10 ⁻⁹	(3992 ± 432)·10 ⁻⁹	(3447 ± 263)·10 ⁻⁹

Výšky signálů stanovených experimentálně pro karboplatinu a oxaliplatinu před ozáření UV jsou v dobré shodě s výškami vypočtenými z kalibrační závislosti pro každou z látek. Oproti tomu výšky signálů, zjištěné po ozáření těchto komplexů, se liší od signálů, které by měly poskytovat příslušné hydrolytické produkty. Zvláště je toto patrné u karboplatiny, kde pokud by hydrolyzou vznikal komplex *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺, polarografický signál by se měl zvýšit na 1,24 μA. V experimentu jsme však pozorovali zvýšení na hodnotu vyšší než 5 μA. To naznačuje, že produkt nebo směs produktů, vznikající v důsledku ozáření karboplatiny v prostředí 0,01 M NaClO₄, není totožný s komplexem *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺. Jedno z možných vysvětlení tohoto výsledku by mohlo spočívat ve skutečnosti, že vznikající produkty hydrolyzy potencionálně UV zářením jsou velmi reaktivní a v nepřítomnosti DNA mohou reagovat vzájemně za tvorby dimerních nebo oligomerních sloučenin platiny, které poskytují polarografický signál vyšší, než by odpovídalo prosté hydrolyze. Z experimentů v této práci provedených však nelze chemickou podstatu vznikajícího produktu nebo produktů jednoznačně určit. K přímé identifikaci produktů by bylo zapotřebí použít jiné metody, např. NMR nebo hmotnostní spektroskopii, to však již přesahuje rozsah této bakalářské práce.

Z předchozích výsledků je zřejmé, že metoda diferenční pulsní polarografie nemusí být vždy vhodnou metodou pro stanovení vazby komplexů platiny na DNA. To platí především v případech, kdy v reakční směsi probíhá vícezkroková reakce, přičemž v prvním kroku dochází ke změně ve struktuře komplexu (substituce ligandů, změna oxidačního stavu, změna konformace) a teprve tato pozměněná, tj. “aktivovaná“ forma se dále váže na DNA. V takovýchto případech je třeba vzít v úvahu případné ovlivnění výšky signálu, které může interferovat s poklesem signálu díky vazbě komplexu na DNA.

Z tohoto důvodu byly experimenty, zaměřené na stanovení rychlosti vazby oxaliplatinu a karboplatiny k DNA po aktivaci UV zářením znovu zopakovány stejně, jako tomu bylo v experimentech popsanych výše (viz obr. 17 a 18B), avšak vazba komplexů platiny na DNA byla detekována pomocí bezplamenné atomové absorpční spektrometrie (AAS). Výsledky získané touto metodou nejsou ovlivněny chemickým složením studovaných sloučenin, protože tato metoda je založena na měření absorpce záření volnými atomy platiny v plynném stavu. Vlastní měření vzorků metodou ASS probíhalo na Biofyzikálním ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně s využitím přístroje Varian

AA240Z Zeeman vybaveným grafitovým atomizérem GTA 120. Koncentrace DNA byla určena spektrofotometricky (viz Materiál a metody). Výsledky experimentu jsou znázorněny na obr. 23.



Obr. 23 - Závislost množství platiny navázané na DNA na čase pro reakci oxaliplatin (plné symboly) a karboplatiny (prázdné symboly) s telecí thymovou DNA za současného ozařování UV zářením. Body představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze dvou nezávislých experimentů, každý byl změřen třikrát.

Výsledek potvrdil, že karboplatina je aktivována UV zářením a tedy se váže na DNA výrazně snadněji. Získaná data jsou ve velmi dobrém souladu s dříve uveřejněnými výsledky (Mlcouskova *et al.* 2012). Na rozdíl od karboplatiny, aktivace oxaliplatin UV zářením je mnohem méně účinná. Tento výsledek je ve shodě s tím, co bylo naměřeno pomocí diferenční pulsní polarografie a popsáno výše (obr. 16 a 17).

Toto odlišné chování karboplatiny a oxaliplatin, které bylo zjištěno v této práci, je překvapivé. Protože obě látky obsahují dikarboxylovou odstupující skupinu a měly by tedy být z chemického hlediska podobné, očekávali jsme výsledek, který ukáže podobný vliv UV záření na obě sloučeniny. Získaný výsledek je však odlišný od výsledku očekávaného. Objasnění tohoto zajímavého zjištění vyžaduje proto další, mnohem rozsáhlejší a podrobnější studie, které však dalece přesahují rámec této bakalářské práce.

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit rychlost vazby oxaliplatinu na DNA z telecího thymu ve tmě a po aktivaci UV zářením a získané výsledky poté srovnat s údaji z odborné literatury týkajícími se fotoaktivace karboplatiny a diskutovat je z hlediska biologické aktivity obou sloučenin.

Pomocí metody diferenční pulsní polarografie bylo zjištěno, že oxaliplatinu se za zvolených podmínek ve tmě na DNA váže jen velmi pomalu, i po 52 hodinách byl úbytek volné (nenavázané) platiny daný vazbou na DNA menší než chyba měření. Pokud byla směs oxaliplatinu a DNA současně ozařována UV zářením, rychlost vazby se zvýšila jen mírně. Tento výsledek byl potvrzen také nezávislou metodou pomocí AAS.

Ze srovnání s údaji uveřejněnými dříve v práci Mlcouskova *et al.* (2012) je zřejmé, že efekt UV záření na oxaliplatinu je mnohem nižší, než je tomu u karboplatiny. Tento závěr byl v této bakalářské práci potvrzen i experimentálně. Příčiny rozdílného působení UV záření na obě sloučeniny zatím nejsou známy a jejich přesné stanovení přesahuje rozsah a cíl této bakalářské práce.

Z výsledků dále vyplývá, že zatímco u karboplatiny se využití UV nebo viditelného záření k aktivaci vazby na DNA a tím i ke zvýšení protinádorové účinnosti karboplatiny jeví jako velmi slibné, u oxaliplatinu je však situace odlišná a kombinace tohoto léčiva s ozařováním by zřejmě nepřinesla pro klinické využití žádné výrazné zlepšení.

Kromě toho bylo zjištěno, že výška polarografického signálu karboplatiny a v mnohem menší míře také oxaliplatinu se mění v závislosti na době ozařování UV zářením v případě, že jsou tyto komplexy ozařovány bez přítomnosti DNA. To naznačuje, že UV záření vyvolává změny ve struktuře komplexů, které se projeví změnou interakce s elektrodou a tím ovlivní výšku měřeného proudu. Srovnáním výšky signálů UV-produktů vzniklých ozařováním karboplatiny a oxaliplatinu s výškou signálu odpovídajících stejné koncentraci hydrolytických produktů vyplynulo, že produkty vzniklé po ozáření jsou odlišné od produktů, které by vznikly prostou hydrolyzou. Cíle bakalářské práce tak byly v plné míře splněny.

7. Seznam literatury

- Bednarski P. J., Grünert R., Zielzki M., Wellner A., Mackay F. S. and Sadler P. J. (2006) Light-activated destruction of cancer cell nuclei by platinum diazide complexes. Chemistry and biology **13**, 61-67.
- Bednarski P. J., Korpis K., Westendorf A. F., Perfahl S. and Grünert R. (2013) Effects of light-activated diazido-Pt^{IV} complexes on cancer cells *in vitro*. Phil. Trans. R. Soc. A **371**, 1-15.
- Berners-Price S. J. (2011) Activating platinum anticancer complexes with visible light. Angew. Chem. Int. Ed. **50**, 804-805.
- Boulikas T., Pantos A., Bellis E. and Christofis P. (2007) Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. Cancer Therapy **5**, 537-583.
- Brabec V. (1990) Molekulární aspekty mechanismu protinádorového působení cisplatiny. Biologické listy **55**(1), 42-58.
- Brabec V., Reedijk J. and Leng M. (1992) Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum(II) binding. Biochemistry **31**, 12397-12402.
- Brabec V. (1998) Nové možnosti v léčbě zhoubných nádorů sloučeninami platiny a ruthenia. Živa **4**, 148-149.
- Brabec V. (2002) DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **71**, 1-68.
- Brabec V. and Kasparkova J. (2005a) DNA interaction of platinum anticancer drugs. Recent advances and mechanisms of action. Metal Compounds in Cancer Chemotherapy, 187-218
- Brabec V. and Kasparkova J. (2005b) Modifications of DNA by platinum complexes Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. Drug Resistance Updates **8**, 131-146.
- Brabec V. and Palecek E. (1976) Interaction of nucleic acids with electrically charged surfaces: II. Conformational changes in double-helical polynucleotides. Biophysical Chemistry **10**, 79-92.

- Heringova P., Woods J., Mackay F. S., Kasparkova J., Sadler P. J. and Brabec V. (2006) Transplatin is cytotoxic when photoactivated: enhanced formation of DNA cross-links. J. Med. Chem. **49**, 7792-7798.
- Juarranz A., Jaen P., Sanz-Rodriguez F., Cuevas J. and González S. (2008) Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. Clin Transl Oncol **10**, 148-154
- Jung Y. and Lippard S. J. (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.
- Kim S. D., Vrana O., Kleinwächter V., Niki K. and Brabec V. (1990) Polarographic determination of subnanogram quantities of free platinum in reaction mixture with DNA. Anal. Letters **23**, 1505-1518.
- Lovejoy K. S. and Lippard S. J. (2009) Non-traditional platinum compounds for improved accumulation, oral bioavailability, and tumor targeting. Dalton Trans., 10651-10659.
- McKeage M. J. (2007) Satraplatin in hormone-refractory prostate cancer and other tumour types: pharmacological properties and clinical evaluation. Drugs **67**, 859-869.
- Mlcouskova, J., Stepankova J. and Brabec V. (2012) Antitumor carboplatin is more toxic in tumor cells when photoactivated: enhanced DNA binding. J. Biol. Inorg. Chem. **17**, 891-898.
- Paseto L. M., D'Andrea M. R., Brandes A. A., Rossi E. and Monfardini S. (2006) The development of platinum compounds and their possible combination. Critical Reviews in Oncology/Hematology **60**, 59-75.
- Perviaz S. and Olivo M. (2006) Art and science of photodynamic therapy. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **33**, 551-556.
- Pizarro A. M. and Sadler P. J. (2009) Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. Biochimie **91**, 1198-1211.

Pracharova J., Zerzankova L., Stepankova J., Novakova O., Farrer N. J., Sadler P. J., Brabec V. and 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.

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

Vrana O., Kleinwächter V. and Brabec V. (1984) Polarographic activity of the antitumor drug cis-dichlorodiammineplatinum(II). The effect of hydrolysis and trans-isomerization of the drug. Experientia **40**, 446-451.

Vrana O. and 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.

Weiss R. B. and Christian M. C. (1993) New cisplatin analogs in development. Drugs **46**, 360-377.

Woynarowski J. M., Faivre S., Herzig M. C. S., Arnett B., Chapman W. G., Trevino A. V., Raymond E., Chaney S. G., Vaisman A., Varchenko M. and Juniewicz P. E. (2000) Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. Mol. Pharmacol. **58** (5), 920-927.