

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS PROTINÁDOROVÉHO PŮSOBENÍ
NOVÉHO PLATINOVÉHO CYTOSTATIKA

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

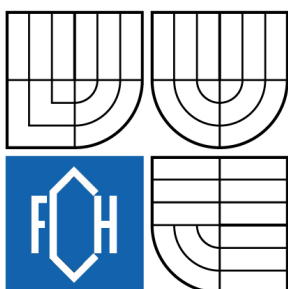
KAMIL JAHN

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS PROTINÁDOROVÉHO PŮSOBENÍ NOVÉHO PLATINOVÉHO CYTOSTATIKA

MOLECULAR MECHANISM OF ANTICANCER EFFECT OF A NEW PLATINUM-BASED DRUG

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

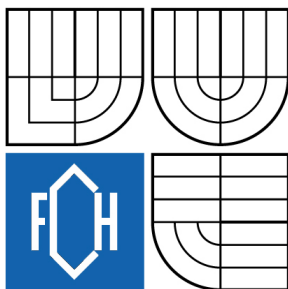
KAMIL JAHN

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

DOC. RNDR. JANA KAŠPÁRKOVÁ,
PH.D

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0160/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Jahn Kamil	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (M2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce		
Konzultanti diplomové práce	Mgr. Dana Vránová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Molekulární mechanismus protinádorového působení
nového platinového cytostatika

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši o současném stavu poznatků o mechanismech účinku komplexů kovů využívaných při léčbě zhoubných nádorů.
2. Osvojit si základní techniky vhodné pro studium reakcí DNA a jejích fragmentů s komplexy kovů, pomocí těchto technik studovat strukturní změny vyvolané v DNA vazbou vybraného komplexu platiny
3. Získané výsledky vyhodnotit a zpracovat formou diplomové práce

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Kamil Jahn
student(ka)

Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem mechanismů protinádorového působení nového platinového cytostatika. Vlastnosti doposud neznámého dinukleárního komplexu platiny s označením BBR3571 – DACH byly paralelně studovány spolu s klinicky prověřeným a užívaným mononukleárním komplexem DACH.

Dřívější studie prokázaly, že cílovým místem působení cytostatik na bázi komplexů platiny je DNA. Po modifikaci DNA výše uvedenými komplexy byly pomocí různých bioanalytických metod (diferenční pulsní polarografie, UV-VIS spektrofotometrie, fluorescenční spektrofotometrie, CD spektroskopie a elektroforézy) sledovány pozměněné vlastnosti této makromolekuly a zkoumán byl také způsob vazby obou komplexů na DNA.

Výsledky ukázaly, že se oba studované komplexy vyznačují poměrně rychlou vazbou na DNA. U obou komplexů je také zřejmá tvorba bifunkčních aduktů. Stabilizační efekt na DNA byl významný zejména po modifikaci dinukleárním komplexem, zatímco denaturační efekt se vůbec neprokázal. Ukázalo se také, že komplex BBR3571-DACH pravděpodobně nevytváří můstky dlouhého dosahu, tak jako jiné dříve studované polynukleární komplexy platiny.

ABSTRACT

This work deals with studying a molecular mechanism of anticancer effect of a new platinum - based drug. The qualities of still unknown dinuclear platinum complex (BBR3571-DACH) were parallelly studied together with clinically time-tested and used mononuclear platinum complex DACH.

Earlier essays demonstrated, that DNA is the critical target for the cytostatic activity of platinum compounds. Altered properties of DNA and binding characteristics of these two platinum compounds were monitored by several different bioanalytical methods (differential pulse polarography, UV-VIS spectrophotometry, fluorescence spectrophotometry, CD spectroscopy and electrophoresis) after modification of DNA by both of platinum complexes.

For the compounds BBR3571-DACH and DACH it was determined that the DNA binding is rapid and bifunctional. The stabilizing effect on DNA was significant particularly after modification of DNA by dinuclear complex, while denaturing effect wasn't proved at all. The results also indicate that dinuclear platinum complex BBR3571-DACH probably does not participate on formation of long-range cross-links like other early studied polynuclear platinum complexes.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Platinová cytostatika, Dinukleární komplex platiny BBR3571-DACH, mononukleární komplex platiny DACH, DNA, bifunkční adukty, stabilizační efekt, můstky dlouhého dosahu

KEYWORDS:

Platinum-based drugs, Dinuclear platinum complex BBR3571-DACH, mononuclear platinum complex DACH, DNA, bifunctional adducts, stabilizing effect, long-range cross-links.

JAHN, K. *Molekulární mechanismus protinádorového působení nového platinového cytostatika*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 55 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval doc. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, cenné rady a konzultace při realizaci této diplomové práce. Zároveň bych chtěl poděkovat Ing. Pavle Heringové, Ph.D. za odborné seznámení s danou problematikou a obětavou pomoc při vlastním měření.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Biologie zhoubných nádorů	8
2.1.1 Definice	8
2.1.2 Vznik nádorového onemocnění	8
2.1.3 Molekulární mechanismy vzniku nádorové přeměny	8
2.1.4 Nádorový růst a metastazování.....	9
2.1.4.1 Základní vlastnosti nádorových buněk.....	9
2.1.4.2 Metastatický proces.....	9
2.1.5 Kancerogeneze.....	9
2.1.5.1 Kancerogenní faktory	10
2.1.5.2 Virová kancerogeneze	10
2.2 Postavení chemoterapie v komplexní léčbě nádorových onemocnění	11
2.2.1 Rozdělení cytostatik podle mechanismů účinku.....	11
2.2.1.1 Alkylační látky.....	11
2.2.1.2 Antimetabolity	11
2.2.1.3 Protinádorová antibiotika	12
2.2.1.3 Rostlinné alkaloidy.....	12
2.2.1.4 Deriváty platiny.....	12
2.3 Protinádorově účinné komplexy platiny	13
2.3.1 Cisplatina.....	13
2.3.1.1 Reaktivita komplexů platiny	13
2.3.1.2 Distribuce cisplatiny v buňkách.....	15
2.3.1.3 DNA	15
2.3.1.4 Vazba cisplatiny na DNA.....	17
2.3.1.5 Strukturální změny indukované vazbou cisplatiny na DNA	18
2.3.1.6 Vliv na replikaci a transkripci DNA	19
2.3.1.7 Odpověď buňky na poškození DNA.....	19
2.3.1.8 Nevýhody použití cisplatiny jako chemoterapeutika	19
2.3.2 Protinádorové komplexy odvozené od cisplatiny.....	20
2.3.2.1 Karboplatina.....	20
2.3.2.2 Oxaliplatina.....	20
2.3.3 Vícejaderné komplexy platiny	21
2.3.3.1 Mechanismus působení a kinetika vazby vícejaderných platinových komplexů na DNA	23
2.3.3.2 DNA jako cílové místo protinádorového účinku vícejaderných komplexů	24
2.4 Základní techniky a metody vhodné pro studium reakcí DNA s komplexy kovů	25
2.4.1 Polarografické metody	25
2.4.1.1 Definice	25
2.4.1.2 Význam DPP pro vazbu komplexů platiny na DNA	26
2.4.2 Chiroptické metody – CD spektroskopie	27

2.4.2.1	Spektra cirkulárního dichroismu	28
2.4.2.2	Využití CD spektroskopie ke sledování konformačních změn DNA	28
2.4.3	Tání DNA	28
2.4.4	Charakterizace DNA aduktů pomocí fluorescence ethidium bromidu	30
2.4.5	Elektroforetická stanovení.....	30
2.4.5.1	Princip elektroforetické detekce.....	30
2.4.5.2	Elektroforéza na agarózovém gelu.....	31
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
3.1	Použité komplexy platiny, chemikálie, pomůcky a přístroje	32
3.1.1	Komplexy platiny	32
3.1.2	Chemikálie.....	33
3.1.3	Pomůcky a přístroje	33
3.2	Příprava používaných komplexů a DNA	34
3.3	Polarografické stanovení kinetiky vazby	34
3.4	Cirkulární dichroismus.....	35
3.5	Teplota tání.....	36
3.6	Fluorescence EtBr.....	36
3.7	Rozvíjení plasmidové DNA	36
3.8	Tvorba meziřetězcových můstků na plasmidové DNA	37
4.	VÝSLEDKY	39
4.1	Kinetika vazby na thymovou DNA	39
4.2	Měření teploty tání.....	41
4.3	Charakterizace aduktů pomocí měření intenzity fluorescence ethidium bromidu v přítomnosti modifikované DNA.....	43
4.4	Cirkulární dichroismus.....	44
4.5	Rozvíjení plasmidové DNA	46
4.6	Tvorba meziřetězcových můstků.....	48
5.	DISKUZE.....	50
6.	ZÁVĚR	51
7.	POUŽITÁ LITERATURA	52
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	55

1. ÚVOD

Rakovina patří stále mezi nejrozšířenější civilizační choroby a není tedy divu, že se jejím výzkumem již po mnoho let zabývá řada vědeckých pracovišť. Jednou z důležitých a účinných léčebných metod je chemoterapie, kdy jsou pacientovi podávány léky (cytostatika), které potlačují růst zhoubných nádorů. Protinádorová chemoterapeutika působí různými mechanismy na struktury, které jsou obecně přítomny ve všech buňkách a jsou nutné pro jejich přežití. Mezi nejefektivnější léky dnes řadíme látky, jejichž cílovým místem působení je DNA.

Schopnost vázat se na DNA a způsobovat konformační změny bránící replikaci DNA a tudíž i dělení buňky (tzv. biologickou aktivitu), vykazují komplexy těžkých kovů. V klinické praxi našly v tomto smyslu uplatnění zejména komplexy platiny a jejich deriváty.

Nejpoužívanějším protinádorovým lékem na bázi komplexu platiny je cisplatina nebo-li *cis*-diammin-dichloroplatinatý komplex. I přes významný úspěch cisplatiny v léčbě některých typů nádorů (jedná se zejména o nádory varlat, vaječnicků a močového měchýře), je její podávání doprovázeno řadou vedlejších účinků.

Výzkum je tedy již delší dobu soustředěn na vývoj nových platinových cytostatik, které by na rozdíl od cisplatiny měly méně nežádoucích účinků a širší spektrum protinádorové účinnosti. Vývoj vícejaderných komplexů platiny je právě jednou z cest tohoto výzkumu.

Předmětem této diplomové práce je seznámení se s mechanismy protinádorového působení nového dinukleárního komplexu platiny.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biologie zhoubných nádorů

2.1.1 Definice

Zhoubné nádorové onemocnění je chorobný stav charakterizovaný nekoordinovaným růstem abnormálních buněk s postupným šířením do okolních tkání, průnikem do mizního a krevního systému a postižením vzdálených orgánů (metastazování). Růst nádorových buněk probíhá samovolně bez projevu regulačních zásahů organismu, na úkor energetických a nutričních potřeb jeho normálních buněk. Nádory se dělí podle různých kritérií. Základní je dělení podle biologického chování na nádory benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Podle výchozí tkáně vzniku (epitel, pojivo, krevtovorná a lymfatická tkáň, nervový systém, zárodečné buňky) se maligní nádory dělí na karcinomy, sarkomy, lymfomy, terminální nádory a další méně často se vyskytující podjednotky [1].

2.1.2 Vznik nádorového onemocnění

Vznik nádorového bujení je mnohastupňový proces, který je výsledkem působení jak vnitřních tak zevních faktorů. Přeměna normální buňky na nádorovou vzniká v důsledku změn genetické informace (mutací) na úrovni genomové deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Mutace vznikají nejčastěji následkem působení zevních faktorů na DNA v buněčném jádře. Mezi tyto zevní faktory patří především ionizující záření, kancerogeny (látky podporující vznik nádorového procesu) a některé viry. Kromě působení zevních faktorů mohou být mutace přenášeny z generace na generaci v zárodečných buňkách, jak je tomu např. u dědičně podmíněných nádorů. Další možností vzniku mutací je jejich spontánní tvorba při replikaci DNA v průběhu buněčného cyklu [1].

2.1.3 Molekulární mechanismy vzniku nádorové přeměny

Nositelem genetické informace ve všech buňkách lidského organismu je kyselina deoxyribonukleová (DNA). Jednotlivé úseky DNA, které jsou vlastními strukturními podjednotkami se nazývají geny.

Geny obsahují genetickou informaci pro vznik proteinů, podílejících se na stavbě buňky a řízení jejích životních pochodů na všech úrovních. Mezi klíčové geny, jejichž poškození vede ke vzniku nádorové transformace, se řadí onkogeny, protoonkogeny, antionkogeny (tumor supresorové geny), geny regulující apoptózu a regulační geny.

Jako onkogen se označuje každý gen, jehož produkt přispívá ke vzniku nádorové transformace.

Geny přítomné v genomové DNA, jejichž fyziologickou úlohou je regulace buněčné proliferace, se nazývají protoonkogeny. Za normálních okolností nemají bezprostřední vztah ke vzniku nádorového procesu. Teprve následkem jejich mutace nebo aktivace v nevhodnou dobu může dojít k rozvoji nádorového bujení.

Opačnou roli z hlediska buněčné proliferace i nádorové transformace zastávají tumor supresorové geny (antionkogeny). Při jejich expresi dochází k inhibici nádorové transformace. Příkladem antionkogenu je gen p53, který bývá označován jako strážce genomu. Brání totiž proliferaci buněk v případě, že by to bylo pro buňky nebezpečné.

Růst masy nádorových buněk může být způsoben nejen absolutním přírůstkem buněčné populace její proliferací, ale též se na něm významně podílí prodloužené přežívání buněk, které ztratily schopnost aktivace sebedestrukčního programu – apoptózy. Za fyziologických okolností je proces apoptózy vysoce specializovaným, aktivním dějem vyžadujícím přítomnost řady specializovaných buněčných bílkovin. Z tohoto důvodu jsou geny kódující regulační proteiny apoptózy místem mutačních změn při buněčné transformaci.

Úkolem regulačních genů je oprava úseků DNA poškozených vlivem působení zevních i vnitřních faktorů s cílem zabránit další kumulaci genetických změn. Poškození reparačních genů se na buněčné proliferaci nebo přežívání buněk projeví nepřímo zvýšením četnosti mutací [1, 2].

2.1.4 Nádorový růst a metastazování

2.1.4.1 Základní vlastnosti nádorových buněk

Nádorové buňky se vyznačují autonomním chováním, ztrátou diferenciací, zvýšenou invazivitou, ztrátou kontroly při kontaktu s okolními buňkami a schopnosti zakládat vzdálená ložiska (metastazování). Autonomní chování spočívá v neregulovaném množení nádorových buněk. Chaoticky se vyvíjející buňky ztrácejí schopnost dospět do zralého (diferencovaného) stavu. Invazivita je schopnost nádorových buněk šířit se bez ohledu na mikroskopické a makroskopické anatomické bariéry.

Pro růst nádoru je rozhodující přítomnost kmenových buněk ve výchozí tkáni. Kmenová buňka je nadána schopností sebeobnovování. Pro růst i reparaci poškození všech tkání je přítomnost kmenových buněk nezbytná. Totéž platí i pro nádory. Jsou to právě kmenové buňky normálních tkání, které jsou častěji a snáze ovlivněny různými mutagenními vlivy, včetně vlivů karcinogenních. Nádorovou mutací jedné nebo více kmenových buněk výchozí tkáně vzniká základ nádoru [1, 2].

2.1.4.2 Metastatický proces

Metastazování je schopnost zhoubného nádoru šířit se do dalších oblastí lidského organismu. K tvorbě metastáz může docházet cestou krevní cirkulace, cestou lymfatických cév, nebo zachycením v tělních dutinách. Nejčastěji se metastázy rozšiřují krevní cirkulací.

Schopnost tvořit metastázy je základní vlastností maligního bujení. Tato vlastnost naopak zcela chybí nezhoubným (benigním) nádorům [1].

2.1.5 Kancerogeneze

Kancerogeneze je proces vzniku nádoru. Nádorová transformace je proces, který probíhá po etapách. Vznik a vývoj nádorového onemocnění má tři hlavní fáze: iniciaci, promoci a progresi.

Ve fázích iniciace a promoce jsou buňky zdravých tkání vystaveny působení různých kancerogenních stimulů. Poruchu buněčné funkce nezpůsobí jedna změna, ale vysoce nepravděpodobné současné působení několika změn, které by samy o sobě nebyly škodlivé. Fáze progresu je výsledkem genetické nestability a aktivace dalších genů vedoucí ke zhoubnému neregulovanému chování transformovaných buněk a plnému rozvoji nádorového onemocnění [1].

2.1.5.1 Kancerogenní faktory

Mezi faktory zevního prostředí, které se podílejí na vzniku nádorů se řadí nejen vlastní kancerogeny (látky, které mají schopnost vyvolat změnu genetické informace), ale též kokancerogeny, které mají schopnost genetické změny prohloubit a tak urychlovat vznik nádoru. Kancerogenní látky lze dělit na fyzikální, chemické a biologické.

- Fyzikální kancerogeny - mezi fyzikální kancerogeny patří především ionizující (X a γ) a neionizující (UV) záření. Kancerogenní účinek záření je vázán na poškození buněčné DNA vyvolané přenosem energie záření na tuto cílovou molekulu. Přenos energie může navodit excitaci nukleotidových bází v DNA a vést k jejímu přímému poškození.
- Chemické kancerogeny - v dnešní době je známo více než 3000 chemických kancerogenních látek. Za nejnebezpečnější skupiny můžeme považovat polycyklické aromatické uhlovodíky, mezi které patří kancerogenní složky dehtu - benzyren a benzantracen. Druhou nejdůležitější skupinou chemických kancerogenů jsou nitrosaminy, které jsou obsaženy v uzených, případně i smažených potravinách.
- Biologické kancerogeny - příkladem biologické látky s kancerogenním potenciálem je aflatoxin (produkt plísně *Aspergillus flavus*). V kontaminované potravě obsažené aflatoxiny jsou zodpovědné za vznik nádorů jater [1, 2].

2.1.5.2 Virová kancerogeneze

Nádorová onemocnění se vyskytují bez vzájemné spojitosti a nechovají se jako infekční choroby. U lidí se předpokládá možný vztah mezi virovou infekcí a vznikem nádorového onemocnění. Prokázáno je to v současné době např. u papilomaviru HPV (karcinom děložního čípku), herpesviru EBV (Burkittův lymfom) a retroviru HIV (Kaposiho sarkom) [2].

2.2 Postavení chemoterapie v komplexní léčbě nádorových onemocnění

K rozvoji chemoterapie došlo až po 2. světové válce a k širšímu použití u solidních nádorů teprve v posledních desetiletích. Na rozdíl od chirurgie a radioterapie, které se uplatňují zejména v lokální léčbě nádorového onemocnění, představují chemoterapie a biologická terapie metody léčby systémové, zaměřené na diseminované (metastatické) onemocnění.

V onkologii se pod pojmem chemoterapie rozumí podávání léků s cytotoxickým účinkem, které mohou být původu syntetického, nebo jde o deriváty přírodních látek. Terčem účinku cytostatik jsou proliferující buňky. Proliferující frakce nádorových buněk vykazuje k chemoterapii největší senzitivitu.

2.2.1 Rozdělení cytostatik podle mechanismů účinku

Mezi základní mechanismy účinku cytostatik na molekulární úrovni patří:

- inhibice biosyntézy
- poškození funkce nukleových kyselin
- inhibice mitózy a proteosyntézy
- blokáda reparačního mechanismu nukleových kyselin
- blokáda topoizomeráz*
- indukce apoptózy

2.2.1.1 Alkylační látky

Alkylační látky obsahují jednu nebo dvě reaktivní alkylové skupiny, které mají schopnost kovalentní vazby s biologickými makromolekulami, zejména DNA. Hlavním mechanismem je rozštěpení řetězců DNA a bránění identické reduplikaci, neboť pro její průběh je důležité bezchybné oddělení jednotlivých DNA vláken.. Řadíme zde např. aziridiny, estery sulfonových kyselin, deriváty nitrosomočoviny a antibiotika s alkylačním účinkem.

2.2.1.2 Antimetabolity

Jedná se o látky strukturálně podobné fyziologickým sloučeninám nutným k syntéze nukleových kyselin. Na základě této podobnosti antimetabolity inhibují enzymy, které se podílejí na syntéze nukleových kyselin, což vede k poškození a smrti buňky. Nejdůležitějšími antimetabolity používanými v protinádorové chemoterapii jsou analoga kyseliny listové, purinů a pyrimidinů.

* Topoizomeráza je enzym, který „rozplétá“ DNA, je nutná k tomu, aby genetická informace mohla být čtena nebo kopírována. Úplná inhibice topoizomeráz by byla pro buňky osudná. Částečná inhibice se mnohem více dotkne množících se buněk (krevních buněk, epitelů, hlavně však nádorových buněk) než ostatních.

2.2.1.3 Protinádorová antibiotika

Protinádorová antibiotika jsou strukturálně rozličné substance, které byly získány z různých druhů *streptomyces*. Tato léčiva mají sice také antibakteriální účinek, jsou ale příliš cytotoxická, než aby se používaly na léčbu infekcí. Cílem jejich cytotoxického působení jsou nukleové kyseliny. K zástupcům této skupiny léčiv řadíme antracyklinová antibiotika, bleomycin, mitomycin C a daktinomycin.

2.2.1.3 Rostlinné alkaloidy

Rostlinné alkaloidy představují menší skupinu protinádorových léčiv, do které jsou řazeny tzv. vinca alkaloidy a taxány, které inhibují tvorbu mitotického vřeténka a dále kamptoteciny, které inhibují topoizomerázu I a epipodofylotoxiny, které inhibují topoizomerázu II.

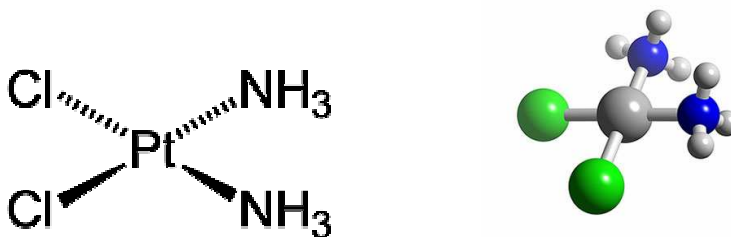
2.2.1.4 Deriváty platiny

Podobně jako u alkylačních látek je mechanismem cytotoxického účinku derivátů platiny tvorba můstků (DNA cross-links). V současné době se v klinické praxi používají následující deriváty platiny: cisplatina, karboplatina, oxaliplatina, nedaplatina (Jap.) a labaplatina (Čína) [1, 2, 3].

2.3 Protinádorově účinné komplexy platiny

2.3.1 Cisplatina

Nejdéle používaným cytostatikem na bázi platiny je *cis*-diamminodichloroplatnatý komplex s generickým názvem cisplatina.



Obr. 1 - Strukturální vzorce cisplatiny [4]

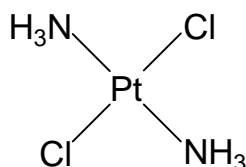
Cisplatinu poprvé syntetizoval v roce 1845 Michel Peyrone [5]. Její schopnosti potlačovat růst nádorů byly objeveny až v roce 1969 Barnettem Rosenbergen během sledování vlivu elektrického pole na růst bakterií [6].

K měření používal platinové elektrody ponořené do roztoku s chloridem amonným. Po jisté době došlo k zastavení buněčného dělení bakterií a k jejich filamentóznímu růstu, čímž se až třistakrát prodloužila jejich délka. Později bylo prokázáno, že příčinou tohoto jevu není elektrické pole, nýbrž tetrachlordiaminplatičitý komplex vzniklý uvolněním malého množství platiny do roztoku elektrolytu. Tento objev vedl k pokusům na experimentálních nádorových modelech, u kterých posléze skutečně došlo k zastavení růstu, jejich redukci a tím i delšímu přežití pokusných zvířat.

Poté, co cisplatina prošla klinickými zkouškami bylo zjištěno, že působí i proti některým pokročilým nádorům. V současné době se léková forma cisplatiny úspěšně využívá zejména k léčbě nádorů varlat. V případě tohoto typu nádorů se úplné remise dosahuje u více než 85 % pacientů. Dále se cisplatina využívá také k léčbě nádorů prostaty, vaječníků, močového měchýře, trávicí trubice a proti některým nádorům v oblasti hlavy a krku [7]. V kombinaci s radioterapií může být cisplatina úspěšně nasazena při léčbě nádorů plic, jícnu, mozku a karcinomu děložního krčku.

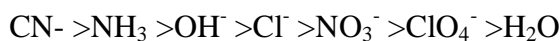
2.3.1.1 Reaktivita komplexů platiny

Pro vlastní funkci komplexu nejsou důležité pouze samotné ligandy navázané na centrální atom platiny, ale rovněž jejich uspořádání. Příkladem změny vlastností komplexu v důsledku rozdílného uspořádání ligandů je *trans* izomer cisplatiny – *trans*platiny (*trans*-diammindichloroplatnatý komplex), která je protinádorově neaktivní a je méně cytotoxická než cisplatina [8].



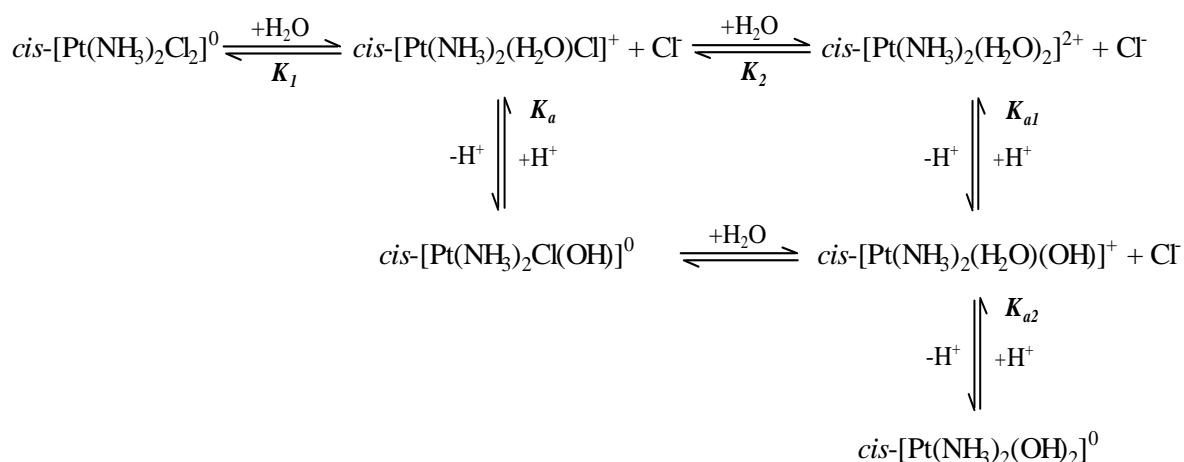
Obr. 2 - Strukturální vzorec transplatiny

Jak cisplatinata tak její trans izomer patří do skupiny komplexů s centrálním atomem platiny v oxidačním stupni II a oba vykazují čtvercově planární symetrii. Chemická stabilita vazby mezi centrálním atomem platiny a ligandem závisí na jeho schopnosti poskytovat elektrony na uskutečnění vazby (elektronodonorním charakteru). Síla vazby vzrůstá s polarizovatelností elektronového obalu ligandu. Afinita ligandů pro vazbu s dvojmocnou platinou klesá v pořadí



Dalším faktorem ovlivňujícím termodynamickou stabilitu vazby mezi platinou a ligandem je tzv. *trans*-efekt, což je schopnost ligandu usnadňovat substituci v poloze *trans* [9]. U cisplatiny vykazuje z obou ligandů (NH_3 a Cl^-) větší *trans* efekt chloridový anion. V případě transplatiny jsou v poloze *trans* vždy dva stejné ligandy a dochází ke vzájemnému vyrušení efektu.

Z těchto vztahů vyplývá, že chloridové ionty u cisplatiny budou ve vodném prostředí odstupovat mnohem rychleji než u transplatiny. Proto bude substituce chloridových iontů molekulami vody (hydrolyza) probíhat snadněji u cisplatiny nežli u transplatiny. Při záměně chloridového iontu za vodu získá cisplatinata kladný náboj, což vede k elektrostatickému přitahování mezi touto formou komplexu a záporně nabitou DNA [10] (obr. 3).



Obr. 3 - Rovnice hydrolyzy a deprotonizace cisplatiny ve vodném prostředí [11]

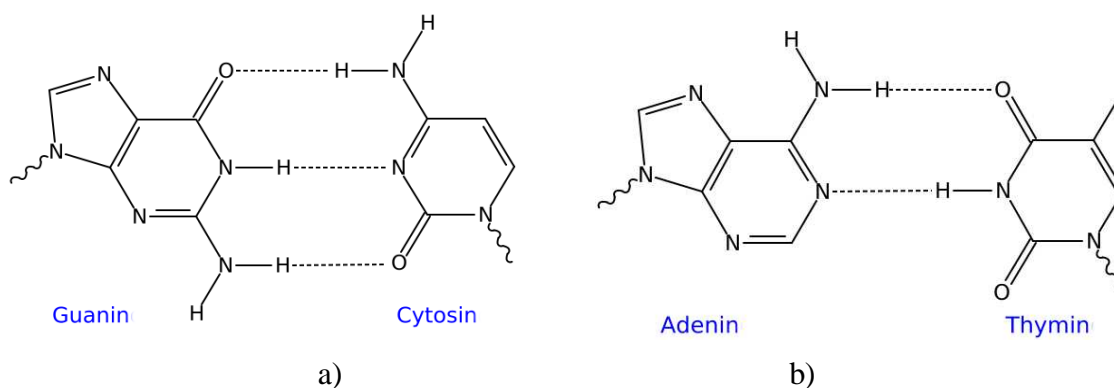
2.3.1.2 Distribuce cisplatiny v buňkách

Cisplatinu je pacientům aplikována intravenózně. V krevní plazmě je relativně vysoká koncentrace chloridových iontů (~100 mM při pH 7.4), při níž se téměř 93 % cisplatinu nachází v dichloro nebo chloro - hydroxo formě. Tento nereaktivní stav komplexu umožňuje průnik z krevního řečiště pasivním transportem přes cytoplazmatickou membránu do buněk. V cytoplazmatickém prostoru uvnitř buňky při stejném pH je koncentrace chloridových iontů výrazně nižší (pouze asi 4 mM). V takto nízké koncentraci chloridových iontů je cisplatinu hydrolyzována asi ze 33 % [12].

Cisplatinu v hydrolyzované formě je elektrofilní molekula, která neselektivně reaguje s různými částmi buněk: 5 – 10 % je vázáno na membrány, 20 % na nukleové kyseliny a nukleoproteiny, 20 – 50 % na proteiny a zbývajících 20 – 55 % se dělí mezi cisplatinu vázanou na malé molekuly a volný komplex [14]. Pouze některé interakce však mají vliv na buněčný růst a dělení. Například vazba platinových komplexů na proteiny sice inhibuje jejich enzymovou aktivitu, nicméně jak dokazuje celá řada experimentů, největší cytostatickou účinnost má vazba cisplatinu na DNA.

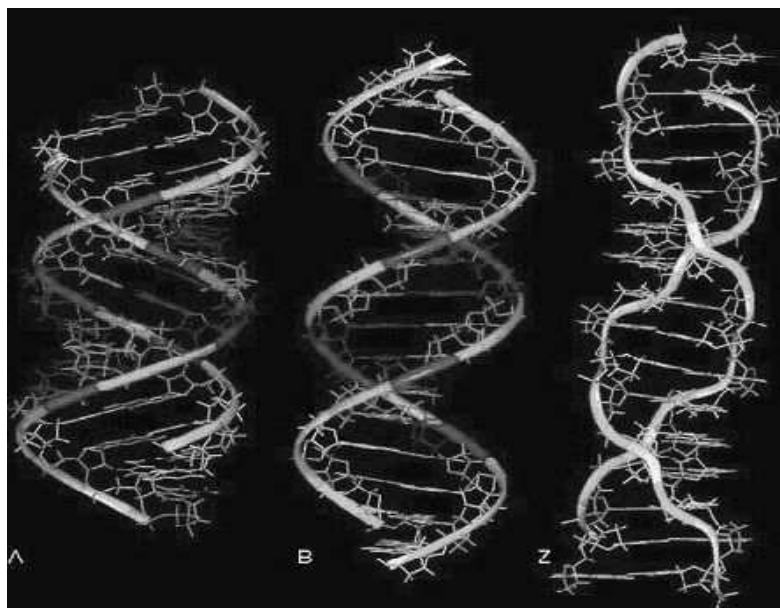
2.3.1.3 DNA

DNA neboli deoxyribonukleová kyselina je biologická makromolekula složená z cukr-fosfátové kostry, na níž jsou prostřednictvím N-glykosidických vazeb v různých kombinacích vázány čtyři nukleové báze: dvě purinové (adenin, guanin) a dvě pyrimidové (cytosin, thymin). Nukleotidy jsou uspořádány do řady za sebou. Jejich spojení v řadě zajišťují fosfátové zbytky, které spojují 3' uhlík jedné deoxyribózy s 5' uhlíkem druhé deoxyribózy. Tzv. polynukleotidový řetězec je vytvářen právě vzájemným propojením nukleotidů 3', 5'-fosfodiesterovou vazbou. Antiparalelní řetězce DNA jsou spojeny vodíkovými můstky mezi bázemi do pravotočivé dvoušroubovice. Párování purinových a pyrimidových nukleotidů opačných řetězců je velice specifické (Watson-Crickův způsob). Je založeno na tzv. komplementaritě bází, kdy se vždy dvěma vodíkovými vazbami váže adenin s thyminem a třemi vodíkovými vazbami jsou k sobě vázány cytosin s guaninem. (obr.4)



Obr. 4 - Schematické znázornění Watson-Crickova párování bází: a) G-C, b) A-T [13]

Konformace, jakou duplex DNA vytvoří závisí na sekvenci jednotlivých nukleotidů a na prostředí v jakém se nachází. Dvouřetězcová DNA existuje ve 3 formách (A, B a Z). V konformacích A a B je DNA je pravotočivá, Z konformace vykazuje levotočivé vnutí dvoušroubovice (obr.5). Základní konformací vyskytující se ve všech prokaryotických a eukaryotických buňkách je B-forma, která vykazuje stabilitu i při vysoké relativní vlhkosti (95 %) [15].



Obr. 5 - Struktury konformací makromolekul DNA (A, B a Z) [16]

2.3.1.3.1 Síly stabilizující DNA

V rovině bází je dvoušroubovice DNA stabilizována vodíkovými můstky, které vznikají mezi bázemi v rámci Watson-Crickova párování bází. Vodíkové můstky jsou vazby elektrostatického typu a jejich velikost je nepřímo úměrná vzdálenosti a přímo úměrná velikosti parciálního náboje na atomech podílejících se na vazbě (atomy N,H a O).

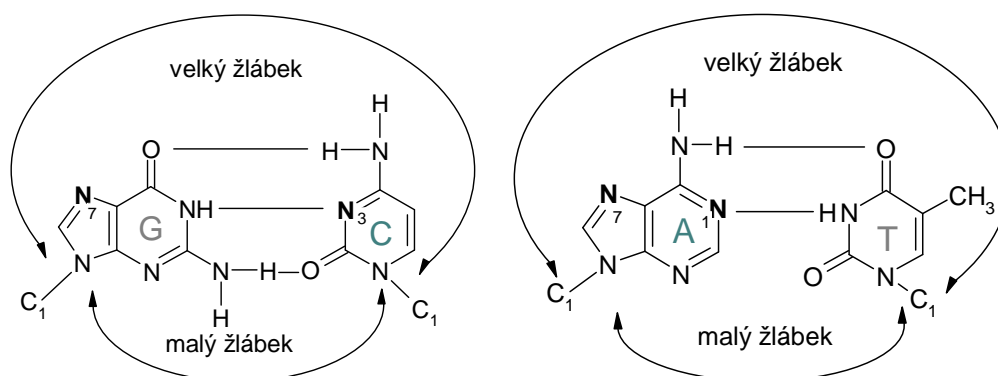
Mezi interakce stabilizující dvoušroubovici ve směru kolmém na rovinu bází patří dipól-dipólová interakce, Londonovy disperzní síly a hydrofobní interakce. Každá báze nukleové kyseliny má permanentní dipólový moment, který ovlivňuje její elektrostatické vlastnosti. Londonovy disperzní síly jsou důsledkem nerovnoměrného rozložení elektrického náboje způsobeného fluktuací elektronové hustoty. Tyto síly spolu s dipól-dipólovou interakcí vedou k přitahování bází umístěných nad sebou.

Pojmem hydrofobní interakce míníme jev, při kterém dochází k minimalizaci kontaktu nepolárních skupin DNA s molekulami vody. Nepolárními částmi DNA jsou báze, které jsou umístěny uvnitř dvoušroubovice. Báze se vrství nad sebe, aby byl minimalizován jejich kontakt s vodou. V anglické literatuře se tyto interakce označují jako „stacking“ interakce. Samotná molekula DNA je destabilizována v důsledku elektrostatického odpuzování záporně nabitých cukrfosfátových koster jednotlivých řetězců. Pokud se v roztoku nacházejí kationy,

kteří vytvářejí kolem DNA iontovou atmosféru, jsou tyto odpudivé síly odstraněny. Příspěvky jednotlivých interakcí jsou velmi malé, ale jejich množství a kooperativita dává vznik stabilní molekule DNA [17].

2.3.1.4 Vazba cisplatinu na DNA

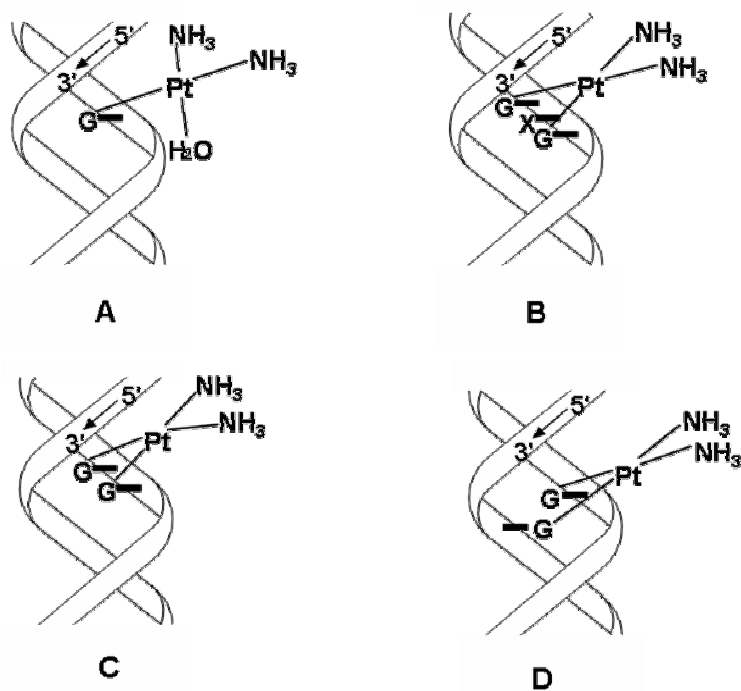
V neutrálním prostředí je DNA díky záporně nabitým fosfátovým zbytkům v její cukrfosfátové kostře polyaniontem. Vazebná místa na DNA můžeme seřadit podle reaktivity s komplexy platiny následovně: guanin-N7 >> adenin-N7 >> cytosin-N3 >> adenin-N1 [14]. Atomy dusíku v poloze N7 guaninu a adeninu jsou vystaveny do prostoru velkého žlábků a jsou tudíž snadno přístupné pro navázání komplexu, zatímco vazba cisplatinu na N3 cytosinu a N1 adeninu je znesnadněna párováním bází [18]. Vazba cisplatinu na DNA probíhá ve dvou fázích. V první fázi vzniká z cisplatinu po odstoupení jednoho Cl⁻ ligandu a jeho výměně za vodu kladně nabitý monoaqua komplex, který je elektrostaticky přitahován k DNA. Voda je nahrazena nukleofilnějším atomem báze, čímž vzniká monofunkční adukt. Ve druhé fázi je hydrolyzován i druhý Cl⁻ ligand a poté opět nahrazen atomem báze za vzniku bifunkčního aduktu. K tvorbě bifunkčních aduktů dochází buď na jednom řetězci DNA (vnitrořetězcové můstky), nebo mezi oběma řetězci DNA (meziřetězcové můstky).



Obr. 6 - Poloha N7 a umístění vazebných míst pro platinové komplexy [11]

Nejvíce zastoupeným aduktem cisplatinu (60 %) je vnitrořetězcový můstek mezi dvěma sousedními guaninovými zbytky v jednom řetězci (1,2-GG-). Další 20 % aduktů tvoří cisplatinu se sousedící adeninovou a guaninovou bází (1,2-AG-). K vnitrořetězcovým typům aduktů řadíme rovněž vazbu mezi dvěma guaninovými zbytky oddělenými od sebe jedním nukleotidem (1,3-GXG-, kde X = A,C,T), tento typ aduktu je zastoupen asi z 10%. Cisplatinu také vytváří meziřetězcové vazby a to mezi dvěma guaninovými bázemi v komplementárních řetězcích v sekvenci 5'-GC-3', což tvoří společně s monofunkčně navázanou cisplatinou 5 – 10 % vytvořených aduktů.

Ve všech typech aduktů je cisplatinu navázána na N7 atom purinových zbytků. Nejčastěji se vyskytujícím typem aduktu je 1,2-GG- vnitrořetězcový můstek, který se považuje za klíčový při působení cisplatinu [7].



Obr. 7 - Znárodnění některých typů aduktů cisplatiny na fragmentu dvouřetězcové DNA [11]:
 - monofunkční adukt (A)
 - 1,3-GG a 1,2-GG vnitrořetězcové můstky (B) a (C)
 - 1,2-GG meziřetězcový můstek (D)

2.3.1.5 Strukturní změny indukované vazbou cisplatiny na DNA

Vazba cisplatiny na DNA způsobuje změnu její konformace v okolí vazby. Rozsah a typ distorze závisí na typu aduktu.

Nejfrekventovanějším aduktem cisplatiny je 1,2-GG- vnitrořetězcový můstek, který způsobuje ohyb DNA o 34° do velkého žlábků a rozvinutí šroubovice o 13° . Dochází k rozšíření a zploštění malého žlábků na opačné straně DNA než je adukt cisplatiny a poškození v rozsahu 4 – 5 pb. DNA vykazuje po vzniku těchto typů aduktů podobné parametry jako její A forma [19].

Meziřetězcový můstek mezi guaninovými zbytky v komplementárních řetězcích způsobuje konformační změny ještě většího rozsahu. Bylo zjištěno, že úhel rozvinutí multimerů dvouřetězcových oligonukleotidů obsahujících jeden meziřetězcový můstek je okolo 79° a ohyb osy je 45° . Meziřetězcový můstek utvořený cisplatinou je umístěn v malém žlábků a dvoušroubovice je v tomto místě přeměněna na levotočivou formu, podobnou Z formě [7].

Jen malá část aduktů tvořených cisplatinou zůstává navázána monofunkčně. Ukázalo se že tento typ aduktů způsobuje distorze silně závislé na sekvenci nukleotidů v okolí vazby, v průměru vedou k rozvinutí dvoušroubovice o 8° [20].

2.3.1.6 Vliv na replikaci a transkripci DNA

Replikace a transkripce DNA jsou základními procesy v rychle proliferujících nádorových buňkách. Inhibice těchto procesů vypovídá o účinnosti cytostatik. Výsledky experimentů prokázaly schopnost cisplatinu zastavovat replikaci DNA *in vitro* a *in vivo*. Tato schopnost však byla prokázána i u protinádorově neúčinné transplatinu, což znamená, že vlastnost cisplatinu blokovat DNA polymerázu zcela nevysvětluje její protinádorovou účinnost. Zájem se tedy obrátil na studium vlivu cisplatinu na transkripci. Zjistilo se, že navázané bifunkční adukty na DNA silně inhibují transkripci této makromolekuly RNA polymerázou. Adukty znemožňují funkčnost RNA polymerázy jednak vytvářením fyzikálních bariér, ale také specifickým pozměňováním vlastností transkripčních komplexů [21].

2.3.1.7 Odpověď buňky na poškození DNA

Poškození DNA je nejprve rozpoznáno senzory proteiny, které následně iniciují transdukční dráhu. Ta aktivuje efektorové proteiny, jež rozhodnou, která z následujících operací proběhne:

- Oprava poškození reparačními mechanismy
- Zastavení buněčného cyklu
- Uskutečnění transkripce i přes poškození DNA
- Aktivace apoptózy - programovaná smrt buňky, indukovaná fyziologickými stimuly (např. nedostatek růstových látek).

Vazba cisplatinu na DNA není sama o sobě dostačující pro smrt buňky. Obvykle buňka zahyne až za několik dní od její inkubace s cisplatinou.

Cisplatinu je obecně považována za látku, která nepůsobí v konkrétní fázi buněčného cyklu. Bylo ale dokázáno, že vykazuje větší toxicitu pro buňky ve fázi dělení než pro buňky v klidové fázi [7].

2.3.1.8 Nevýhody použití cisplatinu jako chemoterapeutika

Ačkoli je cisplatinu jedním z nejúspěšnějších cytostatik, má její využití celou řadu omezení. Limitace v použití cisplatinu při chemoterapii je spojena s vlastní a získanou rezistencí nádorových buněk na toto léčivo. Rezistence může být vyvolána z více příčin. V první řadě je to inaktivace léčiva, způsobená interakcí cisplatinu s různými biomolekulami při cestě k cílovému místu. Jedná se o látky obsahující síru (methioninové a cysteinové zbytky). Příkladem může být glutathion, který svojí interakcí s chemoterapeutikem snižuje množství navázané cisplatinu na DNA [22]. Dalším faktorem rezistence je zvýšená oprava aduktů tvořených cisplatinou na DNA (nejčastěji jde o tzv. excisní nukleotidovou opravu, během které je poškození vystřiženo a vystřižené místo nahrazeno novým nepoškozeným fragmentem DNA) a rovněž zvýšená tolerance k poškození makromolekuly těmito adukty [7].

Dalším omezením tohoto léčiva je skutečnost, že nepotlačuje růst nejčastěji se vyskytujících nádorů, jako jsou nádory prsu, či tlustého střeva. Samotná léčba bývá navíc doprovázena celou řadou vedlejších účinků. Mezi nejčastější komplikace patří nefrotoxicita, myelotoxita, alergické reakce, poruchy krvetvorby a zažívacího traktu. Některé vedlejší

účinky mohou být potlačeny současným podáváním dalších látek, např. diuretik. Cisplatina se také může aplikovat v kombinaci s jinými cytostatiky. [22].

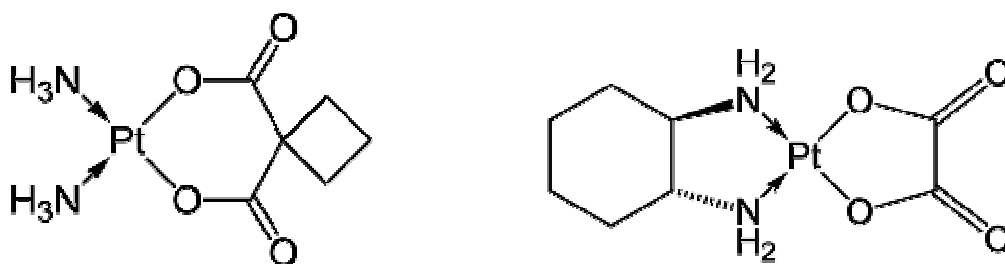
2.3.2 Protinádorové komplexy odvozené od cisplatiny

Velké nežádoucí účinky a rezistence některých druhů nádorů k cisplatině stimulovaly další výzkum biologické aktivity nových komplexů platiny [23]. Výsledkem tohoto výzkumu byla syntéza platinových cytostatik druhé generace se sníženou toxicitou, ale se stejným spektrem protinádorové aktivity [24].

2.3.2.1 Karboplatina

cis-diammin-cyklobutandikarboxylatoplatnatý komplex

Výhodou karboplatiny je snížená nefrotoxicita, v menším rozsahu se také vyskytuje nevolnost a zvracení. Avšak stejně jako cisplatina vykazuje tento komplex poškození krevetvorby, navíc k dosažení stejného protinádorového účinku jako u cisplatiny je potřeba zhruba dvojnásobného množství léčiva [25].



Obr. 8: Strukturní vzorce karboplatiny (vlevo) a oxaliplatin

2.3.2.2 Oxaliplatin

Dalším analogem cisplatiny, který byl zaveden do klinické praxe je oxaliplatin (1R,2R diamincyklohexanoxalátplatnatý komplex). Oxaliplatin je účinná v podobných indikacích jako cisplatina a karboplatina, na rozdíl od těchto léků je však aktivní také u kolorektálního karcinomu, který prozatím představuje její základní indikaci (ostatní deriváty platiny jsou u kolorektálního karcinomu neúčinné), a to převážně u nemocných s metastatickým onemocněním (zejména jaterními metastázami).

Výhodný s ohledem na kombinace s jinými cytotoxickým léky je také profil nežádoucích účinků oxaliplatin. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem oxaliplatin je neurotoxicita, která je však reverzibilní. [26].

Ačkoli přímá analoga cisplatiny vykazují menší vedlejší účinky, nebyl jejich objev zásadním zlomem v léčbě nádorových onemocnění, neboť nejsou účinná proti nejčastěji se vyskytujícím nádorům. Mimoto při léčbě některých typů nádorů je cisplatinu stále nenahraditelná. Vzhledem k těmto skutečnostem je velkou snahou vyvinout preparáty s účinností ke skupině nádorů rezistentních vůči cisplatině.

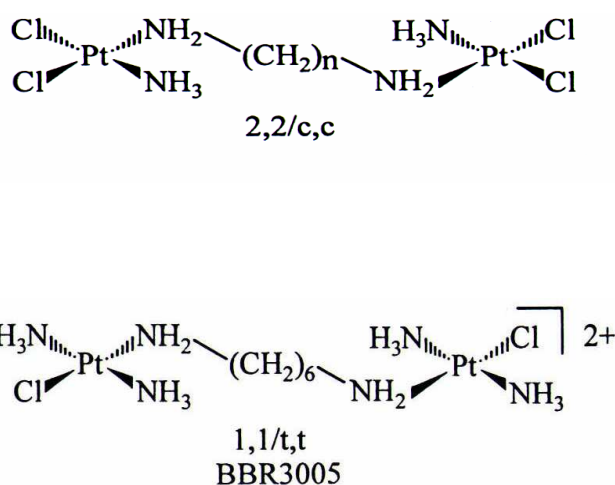
2.3.3 Vícejaderné komplexy platiny

Podstatou cytotoxického působení cytostatik platiny je vazba na DNA a tvorba specifických aduktů, které jsou schopny narušit replikaci a transkripci a indukovat apoptózu [27]. Vývoj vícejaderných komplexů platiny byl tudíž založen na hypotéze, že jedině výrazné změny ve způsobu vazby na DNA mohou vést ke změně protinádorové účinnosti a toho lze dosáhnout jedině podstatnou změnou struktury komplexu.

Vícejaderné komplexy platiny jsou tvořeny spojením dvou nebo tří platinových jednotek prostřednictvím alkandiaminového řetězce o různé délce, kde odstupující chloridové ligandy zaujímají *cis* nebo *trans* konfiguraci. Tyto komplexy tvoří novou skupinu protinádorově účinných látek s chemickými a biologickými vlastnostmi výrazně odlišnými od analogů cisplatiny [28].

Testování protinádorové aktivity bylo provedeno nejdříve na dvojjaderném tetrafunkčním komplexu 2,2/*c,c* (obr. 9), jenž vykazoval protinádorovou aktivitu v buňkách rezistentních vůči cisplatině [28]. Z důvodu nízké rozpustnosti tohoto komplexu, což je charakteristickým rysem u všech komplexů s koordinační sférou PtN₂Cl₂, bylo testování těchto typů komplexů zastaveno.

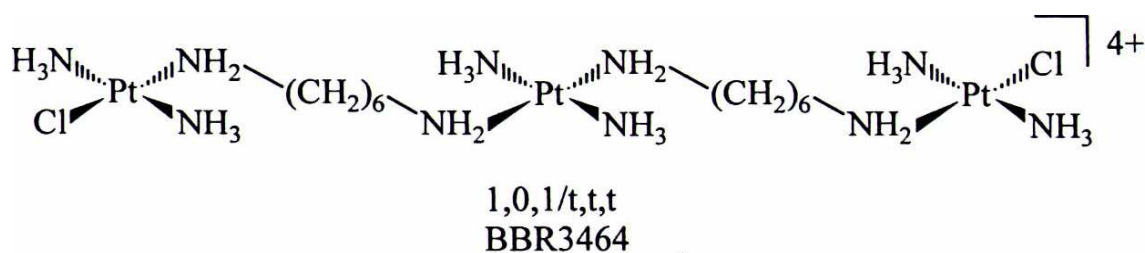
Další výzkum byl proto zaměřen na dvojjaderné komplexy s *cis* a *trans* geometrií obsahující pouze jednu Pt-Cl vazbu na každém atomu platiny, jež se vyznačovaly zlepšenou rozpustností. Hlavní představitel *trans* izomerů 1,1/*t,t* označovaný jako BBR3005 (obr. 9) překvapivě vykazoval protinádorovou aktivitu v buňkách rezistentních vůči cisplatině, zatímco 1,1/*c,c* izomer byl sice protinádorově účinný v buňkách sensitivních k cisplatině při nižších dávkách než BBR3005, ale v buňkách s rezistencí k cisplatině aktivní nebyl [29, 30].



Obr. 9 - Struktura tetrafunkčního komplexu 2,2/*c,c* a komplexu BBR3005

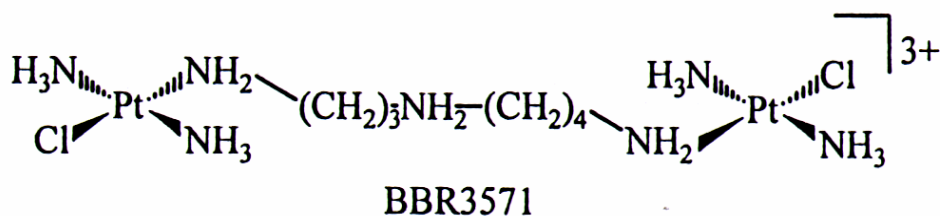
Nežádoucí účinky (zejména plicní toxicita) však znemožnily nasazení *trans* izomeru v klinické praxi. Značné úsilí bylo tedy zaměřeno na hledání komplexů méně toxických, se zlepšenou rozpustností a afinitou k DNA oproti komplexu BBR3005. Ke zvýšení afinity k DNA bylo použito dvou přístupů. První je založen na zvýšení náboje komplexu, čehož se docílí začleněním centrální tetraaminové jednotky platiny do dvojjaderného komplexu za vzniku komplexu trojjaderného. Druhý přístup je založen na zvýšení kapacity pro tvorbu vodíkových můstků. Toho se docílí záměnou alkandiaminového řetězce dvojjaderného komplexu řetězcem polyaminovým, jako je např. spermin nebo spermidin [30].

Vývoj trojjaderných komplexů platiny vedl ke vzniku prozatím nejúčinnějšího komplexu 1,0,1,t,t (BBR3464) (obr. 10). Jeho účinnost byla dosud vyzkoušena na nádorech vaječníků, tlustého stěva, plic, slinivky břišní a zvažuje se využití pro léčbu nádorů mozku. Velká výhoda tohoto cytostatika tkví v tom, že není nefrotoxicke a tudíž jej lze podávat bez předchozí prehydratace. Nebyly pozorovány ani další nežádoucí vedlejší účinky typické pro cisplatinu (neurologické problémy, poškození plic). Nevýhodou komplexu BBR3464 je jeho vysoká toxicita. Maximální tolerovaná dávka je 10 x nižší než u cisplatinu. Byly pozorovány i nepříznivé vedlejší účinky jako porucha krvetvorby a alergické reakce [31].



Obr. 10 - Strukturální vzorec nejvýznamnějšího trojjaderného komplexu

Při studiu dvojjaderných komplexů platiny se spermidinovým, či sperminovým řetězcem se zjistilo, že vykazují podobnou biologickou aktivitu jako trojjaderný komplex BBR3464. Jsou cytotoxické při stejných, ba dokonce i nižších dávkách než BBR3464 [32]. Struktura zástupců této skupiny je patrná ze vzorce komplexu BBR3571.

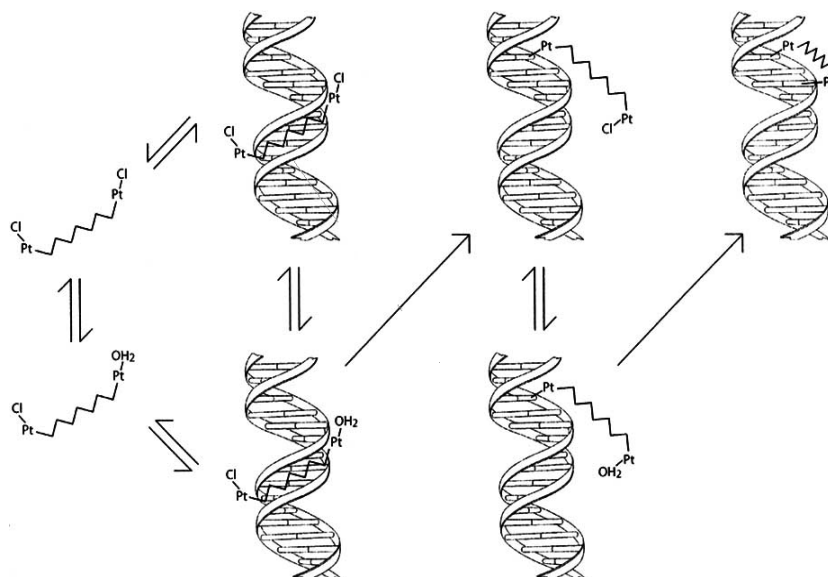


Obr. 11 - Zástupce dvojjaderného komplexu se spermidinovým řetězcem

2.3.3.1 Mechanismus působení a kinetika vazby vícejaderných platinových komplexů na DNA

Mechanismus vazby vícejaderných komplexů na DNA zahrnuje tzv. preasociaci (elektrostatická interakce s povrchem DNA), hydrolýzu prvního chloridového ligandu, monofunkční vazbu na DNA, hydrolýzu druhého chloridového ligandu a uzavření bifunkční vazby [33]. V rámci preasociace se vícejaderné komplexy vážou do malého žlábků, přednostně do oblastí bohatých na adeniny a thyminy. Rychlost tvorby aduktu je závislá na třech faktorech: typu a konformaci DNA, délce spojovacího řetězce a izomeraci komplexu platiny.

Experimenty s dvojjaderným komplexem odhalily, že krok, který především řídí rychlost vazby k DNA, je podobně jako u cisplatinu hydrolýza prvního chloridového ligandu. Další studie prokázaly, že hydrolýza na jednom konci komplexu neovlivňuje rychlost hydrolýzy na jeho druhém konci, tzn. hydrolýzy chloridových ligandů na obou koncových platinových atomech jsou na sobě nezávislé [31]. Poté se komplex částečně nebo úplně přesouvá z malého do velkého žlábků, aby mohlo dojít k tvorbě monofunkčního aduktu na N7 guaninu. Nenavázaná skupina platiny se spojuje s fosfátovou kostrou duplexu elektrostatickou interakcí a také prostřednictvím vodíkových můstků, které vznikají mezi vodíky primárních aminů a kyslíky fosfátové kostry. Mechanismus tvorby bifunkčního aduktu je v případě dvojjaderných komplexů a cisplatinu výrazně odlišný. Uzavření bifunkčního aduktu u cisplatinu vyžaduje rotaci kolem již existující Pt-G(N7) vazby, u dvojjaderných komplexů dochází k pohybu nenavázané skupiny platiny a její vazbě na dusík N7 guaninu komplementárního řetězce [33]. Tvorbou bifunkčního aduktu dochází k fixaci konformace DNA. A to tak, že se celý komplex nachází buď ve velké žlábků, nebo jsou ve velkém žlábků jen koncové platinové skupiny a spojovací řetězec je v malém žlábků.



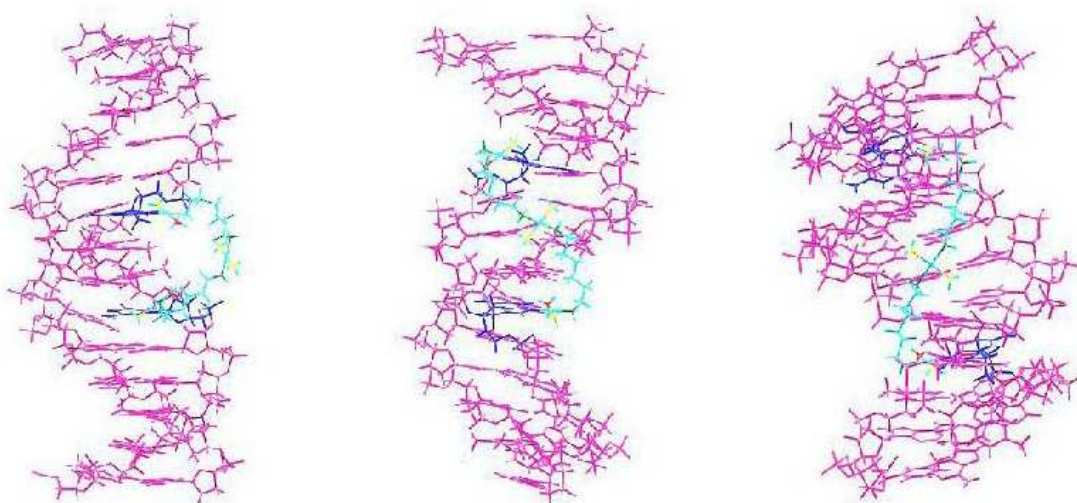
Obr. 12 - Schéma mechanismu vazby vícejaderných komplexů na DNA: Hydrolýza prvního chloridového ligandu následuje nebo předchází nekovalentní vazbě komplexu do malého žlábků DNA. Poté se musí komplex částečně nebo úplně přemístit z malého do velkého žlábků, aby mohl vytvořit monofunkční adukt na N7 guaninu. Hydrolýza druhého chloridového ligandu vede ke tvorbě bifunkčního aduktu [31]

2.3.3.2 DNA jako cílové místo protinádorového účinku vícejaderných komplexů

Výjimečná protinádorová aktivita BBR3464 a dalších vícejaderných komplexů a rozdíly mezi jednotlivými vícejadernými komplexy v biologické aktivitě je možné hledat v struktuře aduktů tvořených těmito komplexy a ve způsobu vazby na DNA.

K obecným charakteristikám vazby vícejaderných komplexů na DNA patří rychlá vazba na DNA, tvorba většího množství meziřetězcových můstků ve srovnání s cisplatinou, rozvíjení nadšroubovicové plasmidové DNA a sekvenční specifita odlišná od cisplatiny.

Při stanovení četnosti vzniku meziřetězcových můstků se prokázalo, že trojjaderný komplex BBR3464 tvoří mnohem méně takovýchto aduktů (20 %) než dvojjaderný BBR3005 (80 %), avšak nepoměrně více než cisplatina (6 %).



Obr. 13 - Modely hlavních meziřetězcových a vnitřetězcových aduktů komplexu BBR3464. 1,4-mezířetězcový můstek (vlevo), 1,5-vnitřetězcový můstek (uprostřed), 1,6-mezířetězcový můstek (vpravo) [34]

Kromě schopnosti tvorby meziřetězcových můstků, byl pozorován i ireverzibilní přechod z B do Z konformace v polynukleotidech modifikovaných komplexem BBR3464. Indukce tohoto přechodu byla zaznamenána i u ostatních vícejaderných komplexů a je sekvenčně podmíněná [31]. Schopnost tvořit Z DNA mají sekvence, na kterých začíná replikace, nebo které se podílejí na regulaci transkripce, proto může mít indukce Z DNA uvnitř buňky na oba dva procesy velký vliv.

Mezi další důležité charakteristiky DNA modifikované komplexy řadíme úhel rozvíjení dvoušroubovice. Hodnoty úhlu rozvíjení jsou ovlivňovány typem ligandů koordinačních sfér atomů platiny a typem aduktů tvořených na DNA. Pro komplexy, které se vážou na DNA bifunkčně je typická hodnota úhlu rozvinutí v rozmezí 10 - 14°. Aduktů komplexů, které se vážou na DNA monofunkčně, rozvíjejí DNA výrazně méně - přibližně o 6°.

Vybrané charakteristiky vazby nejvýznamnějších vícejaderných komplexů jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1: Charakteristiky vazby pro nejvýznamnější vícejaderné komplexy. Pro srovnání jsou uvedeny výsledky cisplatin [31]

	BBR3464 (1,0,1/t,t,t)	BBR3005 (1,1/t,t, n=6)	BBR3571 (1,1/t,t-Spermidin)	Cisplatina
Celkový náboj	4+	3+	2+	0
Kinetika vazby ($t_{1/2}$)	40 min	200-300 min	8.2 min	120 min
Meziřetězcové můstky (%)	20	70-90	33	6
Indukce Z-DNA	Ano	Ano	Ano	Ne
Rozvíjení	14°	10-14°	12.3°	13°
Pokles EtBr fluorescence	Výrazný	Výrazný	Výrazný	Mírný
Teplota tání	Vzestup (max 4°C)	Vzestup (max 8°C)	Nestanoveno	Pokles

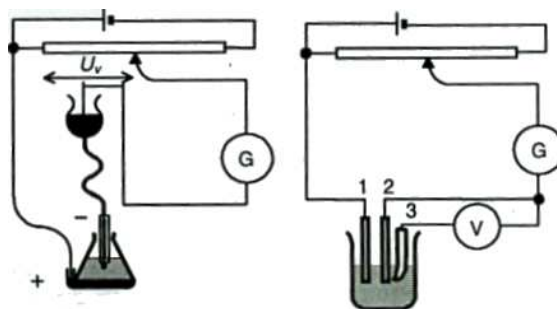
2.4 Základní techniky a metody vhodné pro studium reakcí DNA s komplexy kovů

Jak již bylo zmíněno v předchozích odstavcích, komplexy platiny se kovalentně váží na DNA a touto vazbou indukují strukturní změny ve dvoušroubovici DNA. K charakterizaci vlastností vazeb a následných indukovaných strukturních změn na DNA se využívají metody a techniky, které budou definovány v následujících kapitolách.

2.4.1 Polarografické metody

2.4.1.1 Definice

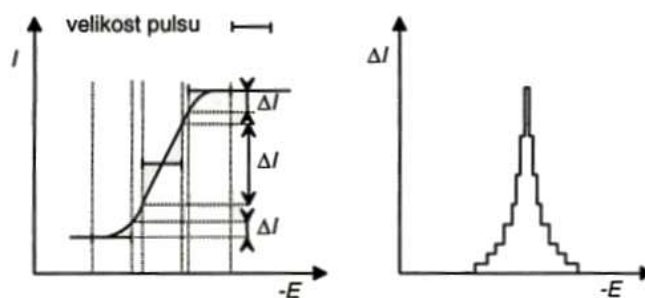
Polarografii řadíme k voltametrickým metodám analýzy, při nichž se sleduje závislost proudu procházejícího pracovní elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku na potenciálu, který se na tuto elektrodu vkládá z vnějšího zdroje. Jako pracovní elektroda se používá rtuťová kapková elektroda (DME). Výsledkem měření závislosti proudu na napětí v systému s DME jsou polarografické vlny, kde výška této vlny (limitní proud I_{lim}) je úměrná koncentraci sledované složky vzorku (depolarizátoru). Potenciál v polovině její výšky (půlvlnový potenciál $E_{1/2}$) odpovídá typu depolarizátoru.



Obr. 14: Základní zapojení: dvouelektrodové v klasické polarografii; tříelektrodové ve voltametrické a polarografii; 1 - pomocná elektroda, 2 - pracovní polarizovatelná elektroda, 3 - srovnávací nepolarizovatelná elektroda [37]

Klasická polarografie umožňuje stanovit koncentrace látek s limitem detekce okolo $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, což je limit pro velkou část analytických operací nedostatečný. V praxi proto nalézají větší uplatnění různé typy modifikací, především tzv. pulzní metody, jejichž limity detekce jsou o několik řádů nižší. Jednou z nejčastěji používaných metod tohoto typu je diferenční pulzní polarografie (DPP).

Při metodě diferenční pulzní polarografie je na rtuťovou kapkovou elektrodu vkládáno stejnosměrné napětí lineárně rostoucí s časem, na které se vždy na konci života kapky vloží napěťový pulz. Zaznamenává se pak rozdíl proudů před vložením pulzu a na konci pulzu. Výsledná závislost proudu na napětí má tvar píku. Potenciál jeho maxima (E_p) je zhruba rovný půlvlnovému potenciálu ($E_{1/2}$). Výška píku je přímo úměrná koncentraci depolarizátoru. Diferenční pulzní polarografie je mnohem citlivější metodou než klasická polarografie. Touto metodou lze stanovovat koncentrace látek s limitem detekce okolo $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [35]. Výhoda diferenční pulzní polarografie tkví také v její jednoduchosti a v rychlosti stanovení.



Obr. 15: Křivka klasické a diferenční pulzní polarografie (velikost pulzu je pro názornost podstatně přeceněna) [37]

2.4.1.2 Význam DPP pro vazbu komplexů platiny na DNA

Většina sloučenin platiny, používaných při chemoterapii, je polarograficky aktivní. Diferenční pulsní polarografie lze tedy použít při studiu kinetiky navázání komplexu platiny na DNA, kde se stanovuje koncentrace volného nenavázaného komplexu platiny v roztoku elektrolytu. Reakční směs obsahuje volný nenavázaný komplex a DNA s navázaným

kompleksem platiny. Polarografický signál však vykazuje pouze nenavázaná sloučenina platiny. Reakční směs tedy může být analyzována přímo bez přídavku jiných látek, které by mohly ovlivnit analýzu. Použije-li se tzv. FSHA elektrolyt (formaldehyd-hydrazin-kyselina sírová), dojde k denaturaci volné DNA i DNA s navázanou platinou. Tato sraženina neinterferuje se stanovovaným nenavázaným komplexem platiny. Srážení DNA ihned zastavuje reakci komplexu platiny s DNA a nezpůsobuje disociaci komplexu již navázaného na DNA [36].

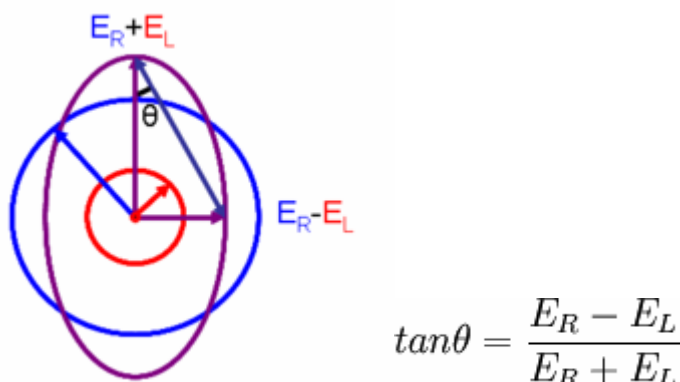
2.4.2 Chiroptické metody – CD spektroskopie

Součástí biologických molekul (DNA) jsou opticky aktivní molekuly cukrů a aminokyseliny. V případě uspořádání monomerních jednotek do šroubovice dochází k výraznému zesílení optické aktivity celé makromolekuly.

Opticky aktivní látka se vyznačuje tím, že stáčí rovinu polarizovaného světla. Rovinně polarizované světlo lze rozložit na levotočivou a pravotočivou složku kruhově polarizovaného světla. Prochází-li levotočivá složka kruhově polarizovaného světla prostředím jinou rychlostí (má jiný index lomu n) než pravotočivá složka kruhově polarizovaného světla, dochází k tzv. stočení roviny polarizovaného světla. Je-li levotočivá složka kruhově polarizovaného světla jinak absorbována než pravotočivá složka kruhově polarizovaného světla, dojde ke změně rovinně polarizovaného světla na elipticky polarizované. Cirkulární dichroismus je pak definován jako rozdíl extinkčního koeficientu (konstanty úměrnosti) pro levo- a pravo-točivou složku kruhově polarizovaného světla, způsobený asymetrií molekulární struktury sledované látky.

$$CD = \Delta\varepsilon = \varepsilon_L + \varepsilon_P$$

Úhel, který charakterizuje míru změny rovinně polarizovaného světla na elipticky polarizované nazýváme elipticitou θ . Jestliže je světlo rovinně polarizováno je $\theta = 0$, u kruhově polarizovaného světla je $\theta = 45^\circ$ [38].



$$\tan\theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L}$$

Obr.16 - Schéma elipticky polarizovaného světla [38]
 E_R – vektor intenzity pravotočivě polarizované složky
 E_L – vektor intenzity levotočivě polarizované složky

2.4.2.1 Spektra cirkulárního dichroismu

Křivka cirkulárního dichroismu je rozdílem mezi absorpčními spektry pro levo- a pravotočivé polarizované světlo. Spektra cirkulárního dichroismu se měří na dichrografu, což je jednopaprskový diferenciální absorpční spektrofotometr. Zkoumaný vzorek je střídavě ozařován vlevo a vpravo kruhově polarizovatelným monochromatickým světlem. Tato periodická změna polarizačního stavu paprsku se po průchodu opticky aktivním prostředím, kde jsou absorpční koeficienty ϵ_L a ϵ_R rozdílné, projeví pravidelnými změnami intenzity prošlého světla. Změny jsou pak přeměněny fotonásobičem na elektrický signál, na jehož zpracování se využívá fázově synchronní detektor.

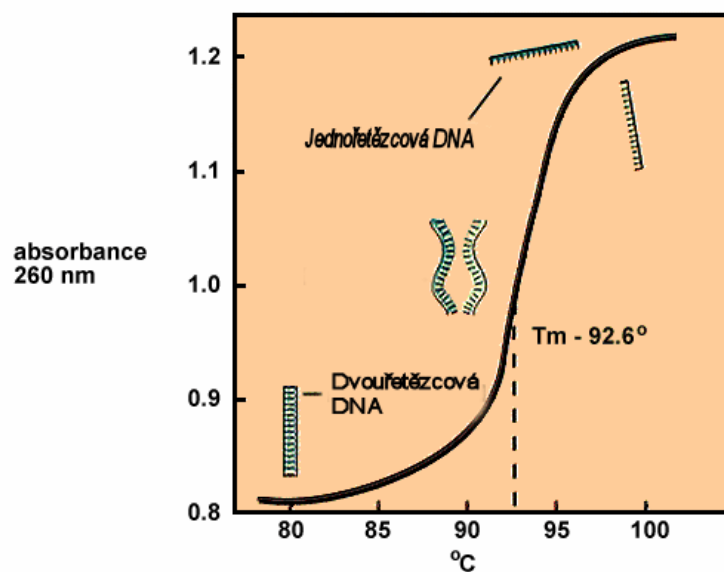
2.4.2.2 Využití CD spektroskopie ke sledování konformačních změn DNA

CD spektroskopie je metoda velmi citlivá na změny ve vzájemné orientaci bází v DNA. Báze samy o sobě nejsou opticky aktivní, jsou však vázány na opticky aktivní deoxyribózu, takže nukleosidy a nukleotidy již optickou aktivitu vykazují. Tato spektroskopická metoda je tedy velmi vhodná ke sledování konformačních a strukturních změn na DNA.

Dosud neexistují žádné spolehlivé explicitní vztahy, pomocí kterých by se mohla z naměřeného CD spektra vypočítat konformace příslušné DNA. Proto se CD spektra vyhodnocují empiricky na základě znalostí CD spekter DNA a syntetických polynukleotidů, jejichž konformace byla zjištěna jinou metodou. Při studiu konformačních přechodů jsou srovnávány CD křivky a hlavně jejich změny. Na základě shodných charakteristik konformačních přechodů za analogických podmínek lze usuzovat na podstatu konformační změny [39].

2.4.3 Tání DNA

Tání neboli denaturace DNA je děj, při němž dochází k přerušení vodíkových vazeb mezi řetězci DNA a k jejich následnému oddělení. Dvouřetězcová struktura DNA může být rozvolněna ohřátím nebo změnou koncentrace soli. Rozpojí se páry bází a báze se volně pohybují v prostoru, i když zůstávají navázány na fosfodiesterovou páteř polymeru. Při této denuraci se zvýší optická absorbance purinových a pyrimidových bází. Jev se nazývá denaturační hyperchromicita a lze jej sledovat spektrofotometricky měřením absorbance při 260 nm. Díky interakcím naskládaných bází („stacking“ interakce) a vodíkovým vazbám mezi nimi, je dvouřetězcová molekula DNA poměrně rigidní útvar a její roztok je viskózní. Viskozita se při denuraci ztratí. Řetězce dané molekuly DNA se oddělují v závislosti na teplotě. Teplota, při které absorbance stoupne o polovinu celkového vzestupu (teplota, při níž je zdenaturována právě jedna polovina molekul DNA), se nazývá bod tání, neboli teplota tání T_m . Tato teplota odpovídá inflexnímu bodu denaturační křivky.



Obr. 17 – Křivka teploty tání DNA

Momentální hodnota T_m je závislá na několika faktorech:

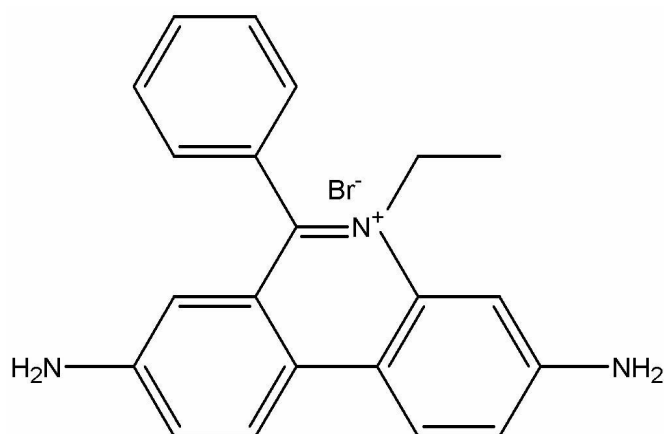
- Sekvence DNA – ovlivňuje jak primární strukturu, tak počet vodíkových vazeb mezi komplementárními řetězci a dále také stabilizaci „stacking“ interakcemi.
- Koncentrace DNA v roztoku – při vyšší koncentraci dochází snadněji ke vzniku dvoušroubovicové DNA.
- Zastoupení bází v DNA – oblasti s větším zastoupením adeninů a thyminů tají snadněji
- Koncentrace kladných iontů v roztoku – teplota tání roste s logaritmem koncentrace kationů.

Na základě změřené teploty tání je možné určit míru poškození DNA modifikované komplexy platiny. Na stabilitu takto modifikované DNA mají vliv:

- Meziřetězcové můstky - komplex platiny se váže mezi oba řetězce DNA a tím znesnadňuje denaturaci. Dochází tedy ke stabilizaci DNA.
- Kladný náboj komplexu platiny – kompenzuje odpuzování dvou negativně nabitých řetězců DNA a tím jí stabilizuje.
- Vzniklá poškození na DNA – způsobují destabilizaci. Některé sloučeniny mohou svými objemnými ligandy výrazně poškodit DNA a tím ji destabilizovat. [11,41].

2.4.4 Charakterizace DNA aduktů pomocí fluorescence ethidium bromidu

Metoda fluorescence se zabývá studiem záření emitovaného molekulami, které přešly do excitovaného stavu díky absorpci záření o vhodné vlnové délce. V biochemii má fluorescence význam ve viditelné a ultrafialové oblasti, jimž odpovídá excitace elektronů valenční sféry. Fluorescence se v biochemii široce využívá především v kvantitativní analýze k detekci nukleových kyselin. Barvení biomolekul (jako např. DNA) fluorescenčními barvivy usnadňuje jejich detekci a kvantifikaci.



Obr.18 - Vzorec ethidium bromidu

Standardní fluorescenční sondou je ethidium bromid. EtBr je polycyklické aromatické barvivo (obr.17), které se váže interkalačně na DNA. Při interkalaci dochází k vmezeření planární molekuly EtBr mezi páry bází nukleové kyseliny nebo oligonukleotidů. Interkalace ovlivní vlastnosti DNA ve smyslu zpevnění, prodloužení a rozplétání helixu [42].

Intekalační navázání EtBr může být blokováno tvorbou bifunkčních aduktů komplexů platiny na DNA. Ethidium bromidu se tudíž využívá k rozlišení, zda je poškození DNA způsobeno monofunkčními nebo bifunkčními adukty platnatých sloučenin.

2.4.5 Elektroforetická stanovení

2.4.5.1 Princip elektroforetické detekce

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů. Principem této techniky je využívání pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Jestliže jsou látky nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrické poli, začnou se pohybovat konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, aniony k anodě a kationy ke katodě.

Snaha po dosažení co nejlepší separace vedla k vypracování značného množství různých technik a jejich modifikací.

2.4.5.2 Elektroforéza na agarózovém gelu

Tato metoda je typem tzv. zónové elektroforézy, kde se elektroforetický proces nerealizuje v roztoku, ale na vhodném nosiči, kterým bývá nejčastěji gel. Pro separaci nukleových kyselin se používají nejčastěji polyakrylamidové nebo agarózové gely, které vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru.

Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od několika set pb po zhruba 50 kpb. Agaróza je přírodní polysacharid červených mořských řas rodu *Gelidium* a tvoří součást agaru, z něhož ji lze izolovat. Pohyb molekul v elektrickém poli (v agarózovém gelu) je brzděn srážkami s molekulami agarózy a velikostí pórů ve struktuře gelu. Princip molekulového síta se při běžně používaných koncentracích agarózy neuplatňuje, čímž je umožněno i dělení velkých molekul. DNA lze totiž dělit pouze na nosiči, jenž umožní separaci podle velikosti molekul.

Jelikož hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny, pohybují se molekuly DNA při konvenční gelové elektroforéze přímočaře od katody k anodě.

Detekce molekul DNA je nejčastěji prováděná pomocí vhodného barviva. Nejčastěji se používá ethidium bromid, jenž se interkalačně váže na DNA. Po vazbě dojde k podstatnému zvýšení kvantového výtěžku fluorescence vázaného barviva. Zóny jednotlivých frakcí směsi DNA se zviditelní po ozáření UV světlem [43].

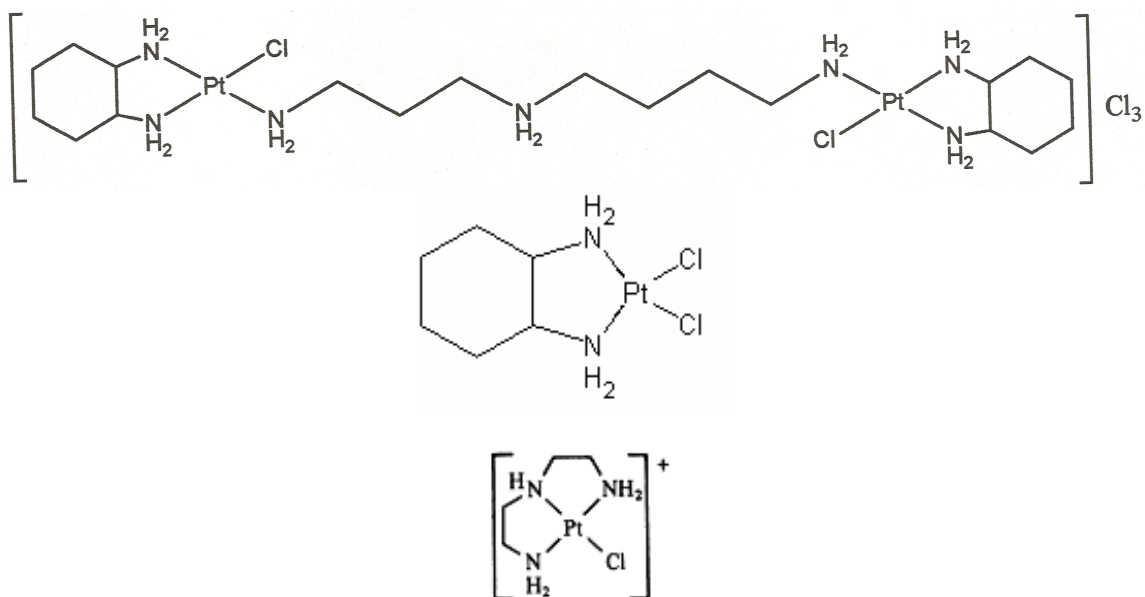
Elektroforéza na agarózovém gelu se využívá při stanovení úhlu rozvíjení DNA. Prostřednictvím této metody se rovněž stanovuje počet meziřetězcových můstků komplexů platiny po navázání na DNA.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité komplexy platiny, chemikálie, pomůcky a přístroje

3.1.1 Komplexy platiny

- dinukleární komplex BBR3571-DACH
(chlorid μ - N¹,N² - spermidino - bis (*trans* - cyklohexandiamin-chloroplatnatý))
(Prof. N. Farrell's Research Group, USA)
- mononukleární komplex DACH (dichloro(1,2-diamincyklohexan)platnatý komplex)
(Sigma, ČR)
- cisplatina (*cis* - diammin-dichloroplatnatý komplex)
(Sigma, ČR)
- dienplatina (diethylentriamin-chloroplatnatý komplex)
(Prof. Natile, University of Bari, Itálie)



Obr.19 - Struktura komplexů BBR3571-DACH (nahore), DACH (uprostřed) a dienplatina (dole)

3.1.2 Chemikálie

- Ethanol (Merck, Německo)
- Fenol (Lach-Ner, ČR)
- Chloroform (Lach-Ner, ČR)
- Hydroxid sodný (Merci, ČR)
- Kyselina sírová (Onex, ČR)
- Chlorid sodný (Merk, Německo)
- Chloristan sodný (Pliva-Lachema, ČR)
- Formaldehyd (Pliva-Lachema, ČR)
- Hydrazin (Pliva-Lachema, ČR)
- Ethidium bromid (Biomedicals MP, Německo)
- EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina (Biomedicals MP, Německo)
- Agaróza (Serva, Německo)
- TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan (Carl Roth, Německo)
- Telecí thymová DNA (BFÚ AV, Brno)
- Plasmidová DNA – pSP73 (BFÚ AV, Brno)
- Endonukleáza EcoRI (New England Bio Labs, USA)
- Enzym DNA polymerasa I (fragment Klenow) (New England Bio Labs, USA)
- Pufr NE Buffer B7002S (New England Bio Labs, USA)
- pufr TAE - 0,04 M acetátový TRIS + 0,001 M EDTA (Biomedicals MP, Německo)
- [α - ^{32}P]dATP (MP Biomedicals, USA)

3.1.3 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy (A&D CO. LTD, Japonsko)
- Mikropipety (Hermo Lab Systems)
- Minicentrifuga (Labnet, Korea)
- Centrifuga (Juan, Francie)
- Vývěva (Heto, Dánsko)
- Lyofilizátor (Heto, Dánsko)
- Dialyzační membrány (Spektrum laboratories, INC., USA)
- Sephadex (Supelco, USA)
- Zařízení na horizontální elektroforézu (Omni-bio, ČR)
- Spektrofotometr DU 7400 (Beckman, USA)
- Polarograf Model 384B (EG&G Princeton Applied Research, USA)
- Spektropolarimetr Model J720 (JASCO, Japonsko)
- Transluminátor (Enprotech, USA)
- Termostat (Grand Boekel, Anglie)
- Fluorescenční spektrofotometr (Varian, USA)
- UV-VIS spektrofotometr (Varian, USA)
- Atomový absorpční spektrofotometr (Varian, USA)
- Zobrazovací zařízení BAS-2500 (Fujifilm, Japonsko)
- Fotoaparát (Canon, Japonsko)
- Software AIDA image analyzer (ImaGenes GmbH, Germany)

3.2 Příprava používaných komplexů a DNA

Ve všech experimentech se pracovalo s dvojjaderným komplexem BBR3571-DACH a mononukleárním komplexem DACH, které byly nejdříve rozpuštěny ve vodě na koncentraci $2,6 \cdot 10^{-4}$ M (BBR3571-DACH) a $4 \cdot 10^{-4}$ M (DACH). Koncentrace byla stanovena pomocí atomové absorpční spektrofotometrie (AAS) na atomovém absorpčním spektrofotometru Varian.

Koncentrace používané telecí thymové DNA byla proměřena na UV-spektrofotometru při vlnové délce 260 nm a její hodnota činila $2,93 \cdot 10^{-3}$ M. K ředění této DNA se používal 0,01 M chloristan sodný. Vzorke modifikované DNA, které byly v této práci analyzovány se připravovaly inkubováním DNA s komplexy platiny po dobu 24 h při 37°C.

3.3 Polarografické stanovení kinetiky vazby

Při stanovování kinetiky vazby bylo použito přístroje EG&G Princeton Applied Research Model 384B Polarographic Analyzer. Přístroj pracoval v tříelektrodeovém systému s rtuťovou kapkovou elektrodou a Ag/AgCl referenční elektrodou, naplněnou chloridem draselným.

Pro měření diferenční pulzní polarografie byly zvoleny následující parametry:

- frekvence spuštění rtuťové kapky: 1 s
- rychlost snímání napětí: 4 mV/s
- hodnota počátečního potenciálu: -0,4 V
- hodnota koncového potenciálu: -1 V

Ke každému měření bylo použito 5 ml elektrolytu, který obsahoval 0,002 M hydrazin, 0,02 M formaldehyd a 0,75 M kyselinu sírovou.

Nejdříve byla sestrojena kalibrační křivka. Ověřilo se tak, zda se zvyšujícím se množstvím sloučeniny platiny v roztoku stoupá hodnota limitního proudu. Zároveň došlo k nalezení nejvyšší možné koncentrace komplexu platiny, pro kterou byla tato závislost ještě lineární. Do roztoku elektrolytu se přidávalo vždy určité množství komplexu platiny (1, 2, 4, 6, 8 a 10 μ l) a sledovala se linearita růstu signálu.

Vazba komplexu na thymovou DNA byla měřena při 37 C° v 0,01 M NaClO₄. Dosáhlo se tak podmínek, které jsou nejbližší podmínkám v lidském těle. Oba komplexy platiny (BBR3571-DACH a DACH) byly naředěny na koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M, takže jejich výsledné koncentrace v elektrolytu se pohybovaly v rozmezí od $1 \cdot 10^{-9}$ M do $1 \cdot 10^{-8}$ M. Thymová DNA byla naředěna na koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M, tak aby r_b (poměr koncentrací komplexu a DNA) bylo rovno 0,05.

Na začátku měření kinetiky byl smíchán komplex s DNA. Ihned poté se z reakční směsi odebralo alikvotní množství do roztoku elektrolytu, kde byla v čase 0 stanovena veškerá volná nenavázaná platina. V následujících časových intervalech (7-20 min) se opakoval odběr alikvotního množství z reakční směsi do elektrolytu a na měřícím přístroji byl sledován úbytek volného nenavázaného komplexu platiny v roztoku.

Koncentrace nenavázané platiny v procentech byla stanovena podle vzorce:

$$C(\%) = \frac{I_p}{I_{p0}} \cdot 100 \quad [36]$$

kde C (%) je koncentrace nenavázané platiny v roztoku, I_p je velikost píku proudu při -0,90 V získaného od nenavázaného komplexu platiny v roztoku a I_{p0} je velikost píku proudu při -0,90 V získaného v čase nula pro 100 % nenavázaného komplexu.

Stanovení procentuálního navázání komplexu platiny po 24 h následovalo ihned po ukončení měření kinetiky vazby. Připravili se roztoky o čtyřech různých r_i (0,005; 0,01; 0,05; 0,1) pro každý komplex (BBR3571-DACH a DACH). Po následné 24 hodinové inkubaci při 37 °C se u jednotlivých vzorků prověřilo 100% navázání na DNA měřením obsahu volné platiny metodou diferenční pulzní polarografie.

Další měření procentuálního navázání platiny na DNA se provedlo pomocí atomové absorpční spektrofotometrie AAS. Touto metodou se nestanovuje volná nenavázaná platina v roztoku, nýbrž koncentrace veškeré platiny, tudíž i platiny již navázané na DNA. Bylo tedy nutné provést dialýzu, a na základě porovnání výsledků naměřených koncentrací platiny v dialyzovaných a nedialyzovaných vzorcích stanovit procento navázání platiny. Pro každý komplex se připravily vzorky o dvou různých r_i (0,05 a 0,1). Po 24 hodinové inkubaci při 37 °C se z každé ependorfky naplněné 500 μ l směsí (DNA, Pt.komplex, NaClO_4) odebrala část vzorku (300 μ l) na dialýzu. Dialyzační membrány se nejdříve ponořily do destilované vody a daly se 2krát na 15 min povařit. Poté se jednotlivé membrány vytvarovaly a bylo možné je naplnit vzorky. Membrány se vzorky se ponořily do kádinky s destilovanou vodou a ta se nechala umístit na třepačku do chladné místnosti. Dialýza probíhala asi 4 hodiny, každou hodinu se obměňovala destilovaná voda v kádince. Veškerá volná nenavázaná platina by měla v průběhu dialýzy difundovat přes membránu do vody. Po ukončení procesu bylo dialyzované množství vzorku spolu s původní zbylou částí vzorku v ependorfce (200 μ l) paralelně proměřeno na AAS.

3.4 Cirkulární dichroismus

Strukturní změny na thymové DNA byly studovány pomocí cirkulárního dichroismu na přístroji JASCO spectropolarimeter, Model J720. Thymová DNA byla modifikována komplexy BBR3571-DACH a DACH na rostoucí r_i (0,01; 0,03; 0,05 a 0,08) v 0,01 M NaClO_4 . Ve všech vzorcích měla DNA koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M. Všechny vzorky byly před započítáním měření inkubovány 24 hodin při 37 °C.

Zvolené parametry měření:

- Rozsah vlnových délek: 320 – 220 nm.
- Odezva signálu: 0,25 s
- Rychlost snímání: 100 nm/min

3.5 Teplota tání

Jak již bylo dříve zmíněno metoda teploty tání se používá při zjišťování teplotní stability a při určování míry poškození DNA. Kladný náboj platinových sloučenin stabilizuje DNA tím, že kompenzuje odpuzování jejich dvou negativně nabitých řetězců. Aby se snížil vliv kladného náboje komplexů platiny, probíhá stanovení teploty tání DNA při dvou různých iontových silách. Pro měření při nižší i vyšší iontové síle byly připraveny vzorky obou komplexů s vzrůstajícím r_i (0,01; 0,03; 0,05 a 0,08). K 1000 μ l směsi (komplex Pt, DNA a NaClO_4) se přidala EDTA na výslednou koncentraci 0,1 mM a TRIS na výslednou koncentraci 1 mM. Pro měření teploty tání s vyšší iontovou silou se pak ještě ke každému vzorku přidá 2,5 μ l 4 M NaCl. DNA měla ve všech vzorcích koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M. Měření probíhalo na UV-VIS spektrofotometru Varian při vlnové délce 260 nm a v teplotním rozmezí 25 °C – 95 °C.

Hodnota teploty tání byla určena jako teplota odpovídající maximu první derivace křivky tání. Hodnota T_m tak může být stanovena s přesností $\pm 0,3$ C°.

3.6 Fluorescence EtBr

Thymová DNA byla modifikována komplexy BBR3571-DACH a DACH na $r_i = 0,01$; 0,03; 0,05 a 0,08. Pro srovnání došlo k modifikaci DNA dalšími dvěma komplexy platiny – cisplatinou a dienplatinou při stejném r_i . Vzorky se připravily na objem 300 μ l, koncentrace thymové DNA byla $1,34 \cdot 10^{-4}$ M. Po 24 h inkubaci při 37 C° se ke každému vzorku přidalo 1 ml EtBr směsi, jež obsahovala 25,95 ml dest H_2O , 3,9 ml 4 M NaCl a 0,156 ml EtBr o koncentraci 10 mg/ml. K měření bylo provedeno pomocí fluorescenčního spektrofotometru Varian s použitím 1 cm křemenné kyvety, do které se pipetovalo vždy 0,8 ml vzorku. Excitační vlnová délka pro měření fluorescence modifikované DNA v přítomnosti EtBr byla 546 nm a emitovaná fluorescence byla měřena při 590 nm.

Intenzita fluorescence byla měřena v 0,4 M NaCl z důvodu zabránění sekundární vazby ethidium bromidu na DNA. Výsledná koncentrace DNA a EtBr v proměřovaných vzorcích byla 0,01 mg/ml resp. 0,04 mg/ml, tato koncentrace odpovídala saturaci všech interkalačních míst ethidium bromidem na DNA.

3.7 Rozvíjení plasmidové DNA

Komplexy rozvíjející DNA snižují v negativně zavinuté superhelikální DNA počet nadšroubovicových závitů, což se projeví snížením superhelikální hustoty. DNA s nižší superhelikální hustotou má menší elektroforetickou mobilitu než neporušená superhelikální DNA. Zvyšováním množství komplexu dochází k rozvíjení DNA až do cirkulární formy, kdy obě formy DNA (relaxovaná i superhelikální) putují gelem stejnou rychlostí.

Plasmid pSP73 použitý v tomto experimentu se upravil na koncentraci $1,5625 \cdot 10^{-4}$ M. Následovala modifikace plasmidu komplexu BBR3571-DACH a DACH na r_i : 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06 a 0,07. Vzorky byly inkubovány po dobu 24 h při 37°C .

Pro analýzu plasmidové DNA byl připraven 1% agarózový gel v TAE pufru (navážka činila 1,3 g agarózy na 130 ml TAE pufru). Gel byl rozvařen v mikrovlnné troubě za občasného míchání. Po ochlazení přibližně na 50°C byl nalit do předem připravené formy s hřebínkem a ponechán k zatuhnutí ve vodorovné poloze po dobu 40 min. Připravený gel s vaničkou byl přenesen do elektroforetické komory, kde byl přelit 1x TAE pufr. Vzorky byly připravovány v celkovém objemu 14 μl , obsahujícím 10 μl inkubované směsi (komplex Pt, DNA, NaClO_4) 3 μl barviva (bromfenolová modř) a 1 μl nanášejícího pufru. Poté byly celé objemy vzniklé směsi napipetovány do jamek gelu. Elektroforetická komora se překryla víkem a byl spuštěn zdroj proudu. Elektroforéza plasmidové DNA probíhala za konstantního proudu 18 A a trvala přibližně 16 hodin. Poté byl gel obarven v lázni s EtBr (200 ml dest H_2O + 40 μl EtBr) a prohlížen na transiluminátoru. Pro dokumentaci byl gel vyfotografován.

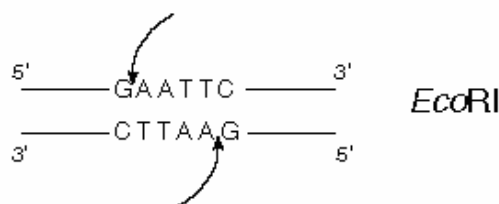
Úhel rozvinutí Φ připadající na jeden adukt se vypočítá ze vztahu:

$$\Phi = 18\sigma/r_b(c),$$

kde σ představuje superhelikální hustotu použitého plasmidu a $r_b(c)$ hodnotu r_b (r_b je definován jako molární poměr navázaného komplexu platiny na DNA), při které dojde ke komigraci proužků odpovídajících DNA v relaxované a rozvinuté superhelikální formě [44].

3.8 Tvorba meziřetězcových můstků na plasmidové DNA

Schopnost sloučenin platiny tvořit meziřetězcové vazby byla studována na plasmidové DNA (pSP73) po její linearizaci endonukleázou EcoRI. Tento enzym štěpí DNA v sekvenci $\text{G}^{\downarrow}\text{AATTC}$ (obr.19). Plasmidová DNA byla inkubována s EcoRI (směs 70 μl plasmidu, 7,7 μl pufru a 7 μl EcoRI) jednu hodinu při 37°C .



Obr. 20 - Schéma štěpení plasmidu endonukleázou EcoRI

Kvalita linearizace byla ověřena na minigelu (elektroforetická vana o délce 10 cm a šířce 7cm). Byl připraven 1% agarózový gel v TAE pufru (50 ml). Po jeho ochlazení na 50°C byl přidán EtBr na výslednou koncentraci 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Gel byl nalit do formy a ponechán k zatuhnutí ve vodorovné poloze po dobu 30 min. Poté se připravily vzorky k nanesení. Z inkubované směsi plasmidu a EcoRI se odebral 1 μl , přidal se 1 μl bromfenolové modři a 0,6 μl 10 x TAE. Z původního plasmidu (735 $\mu\text{g/ml}$) se rovněž odebral 1 μl , přidal se 1 μl

barviva a 0,6 μl 10 x TAE. Vzorky se následně nanaly na gel. Elektroforéza byla prováděna při napětí 30 – 40 mV po dobu 1,5 h. Po skončení elektroforézy se gel opláchl destilovanou vodou, a protože již obsahoval EtBr, mohl být ihned pozorován na transluminátoru.

Ze směsi plasmidu a EcoRI se odstraní enzym a případné další proteiny z roztoku pomocí fenolu. K roztoku DNA byl přidán stejný objem fenolu (84 μl) a roztok byl protřepán a zcentrifugován. Po oddělení vodné a organické fáze byla vodná (horní) fáze odebrána a k ní přidáno stejné množství chloroformu (pro odstranění zbytku fenolu). Opět dojde k oddělení fází a vodná fáze je odebrána. Je nutné plasmidovou DNA převést do vhodného pufru pomocí etanolového srážení. K plasmidové DNA byl přidán octan sodný na výslednou koncentraci 0,3 M. Poté byl přidán 100% ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) na dvojnásobek objemu roztoku, a vzorek byl přemístěn na 30 min do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby došlo k vytvoření sraženiny DNA. Roztok byl poté centrifugován 30 min při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, poté byl odebrán supernatant. Ke sraženině byl přidán stejný objem 80% ethanolu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a opět byl vzorek 30 min centrifugován při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl odebrán supernatant a sraženina DNA byla vysušena a následně rozpuštěna v 0,01 M NaClO_4 . Volné konce lineární DNA pak mohou být radioaktivně označeny $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ na 3' konci pomocí Klenowova fragmentu DNA polymerázy I. Značení proběhlo tak, že se do 10 μl roztoku DNA se přidal 1 μl enzymu DNA polymerasa I (fragment Klenow), 1 μl pufru (NE Buffer B7002S) a 1 μl radioaktivního ATP*. Po hodinové inkubaci při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ se přidal ještě 1 μl enzymu.

Nezareagovaný $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ byl z roztoku odstraněn zachycením na kolonce naplněné Sephadexem. Radioaktivně označená plasmidová DNA byla poté přidána k lineární neradioaktivní DNA. Komplexy BBR3571-DACH, DACH byly inkubovány s takto připravenou plasmidovou DNA po 24 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na požadované r_i (5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 3×10^{-4} , 5×10^{-4} , 7×10^{-4} a $1 \cdot 10^{-3}$). Jako kontrola byla použita cisplatina, která byla s plasmidovou DNA inkubována na $r_i = 0,001$. Byl připraven 1% agarózový gel ve vodě. Navázka činila 1,2 g agarózy na 120 ml destilované vody. Gel byl rozvařen v mikrovlnné troubě za občasného promíchávání. Po ochlazení na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ se upravil pomocí NaCl a EDTA na koncentraci 0,03 M NaCl a 1 mM EDTA. Gel byl promíchán, nalit do gelové formy a ponechán k zatuhnutí ve vodorovné poloze po dobu 1 h. Poté byl gel přelit alkalickým pufrem (0,03 M NaOH a 1 mM EDTA) a ekvilibrován přes noc při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druhý den byl přenesen do elektroforetické vany a zalit čerstvě připraveným alkalickým pufrem. Poté co byly vzorky naneseny na gel, probíhala elektroforéza při pokojové teplotě po dobu 5 h při napětí $1,4\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Za těchto podmínek dojde během elektroforézy k denaturaci DNA. Pokud jsou na DNA vytvořené meziřetězcové vazby, zůstává v dvouřetězcové (ds) formě a migruje na gelu pomaleji než forma jednořetězcová (ss). Po skončení elektroforézy, byl gel vysušen a vyhodnocen pomocí přístroje Fujifilm BAS-2500 a radioaktivita byla kvantitativně vyjádřena pomocí AIDA image analyzer software.

Zastoupení meziřetězcových vazeb % IEC/Pt (počet meziřetězcových můstků připadajících na jeden adukt) se určí ze vztahu:

$$\% \text{IEC/Pt} = XL/N \cdot r_b,$$

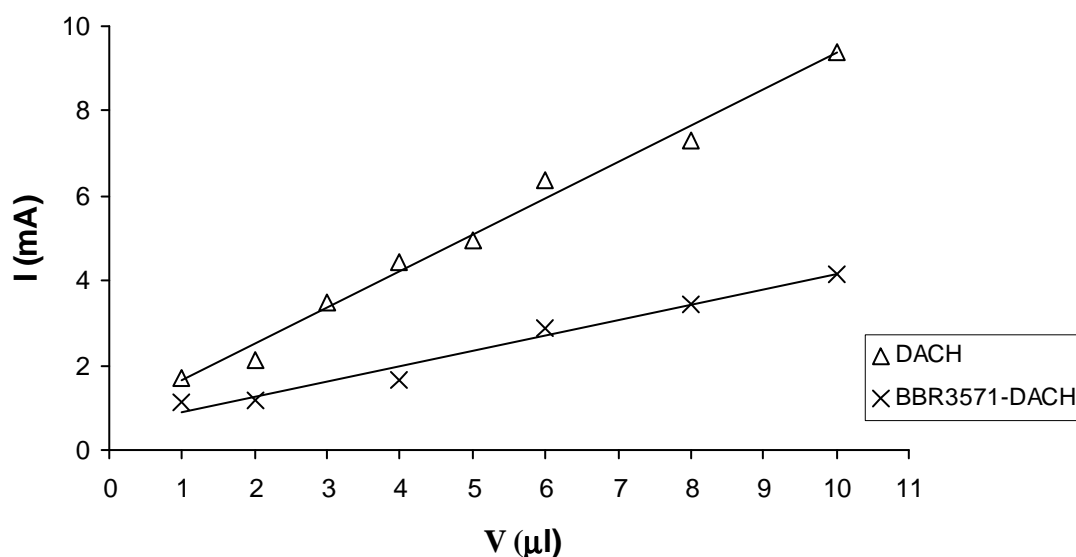
kde N je počet bází plasmidu, XL představuje počet meziřetězcových vazeb připadajících na jednu molekulu linearizovaného plasmidu a určí se na základě Poissonova rozdělení meziřetězcových můstků ze vztahu $XL = -\ln A$, kde A je podíl molekul odpovídajících denaturované DNA zjištěný z měření intenzit proužků. [45].

4. Výsledky

Účelem diplomové práce bylo studium DNA a jejich fragmentů s komplexy kovů pomocí základních biofyzikálních a biochemických technik. Sledovaly se strukturální změny vyvolané v DNA vazbou dvou vybraných komplexů platiny – BBR3571-DACH a DACH.

4.1 Kinetika vazby na thymovou DNA

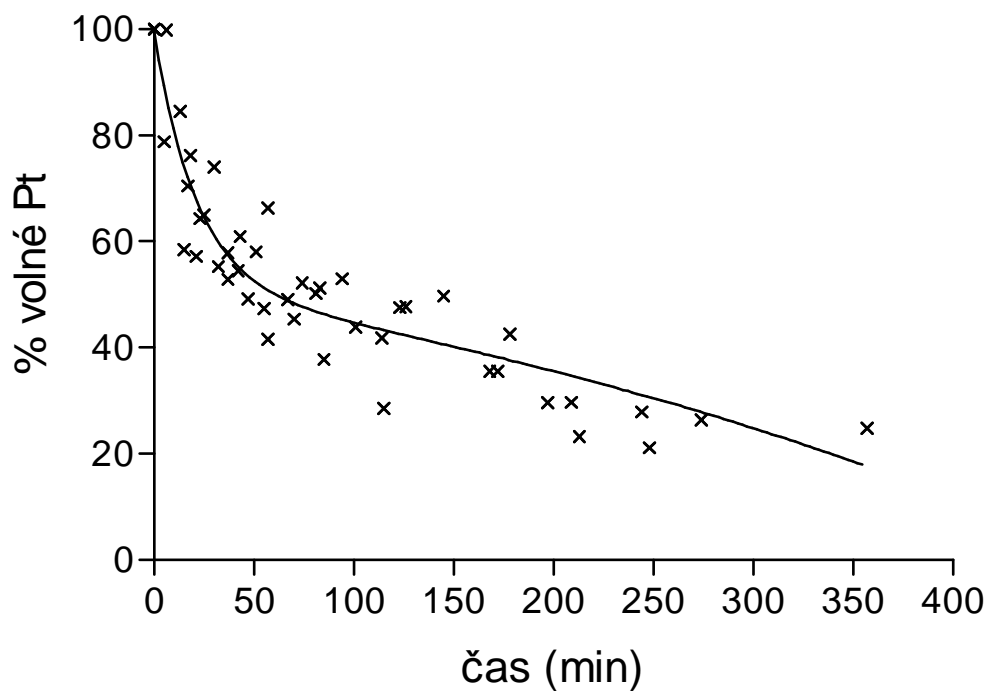
Po vyhodnocení kalibrační křivky se určilo konstantní množství komplexu (6 μl), které se přidávalo do elektrolytu při stanovení kinetiky vazby. Hodnota alikvotu leží uprostřed lineární závislosti kalibračních křivek obou komplexů (obr.21).



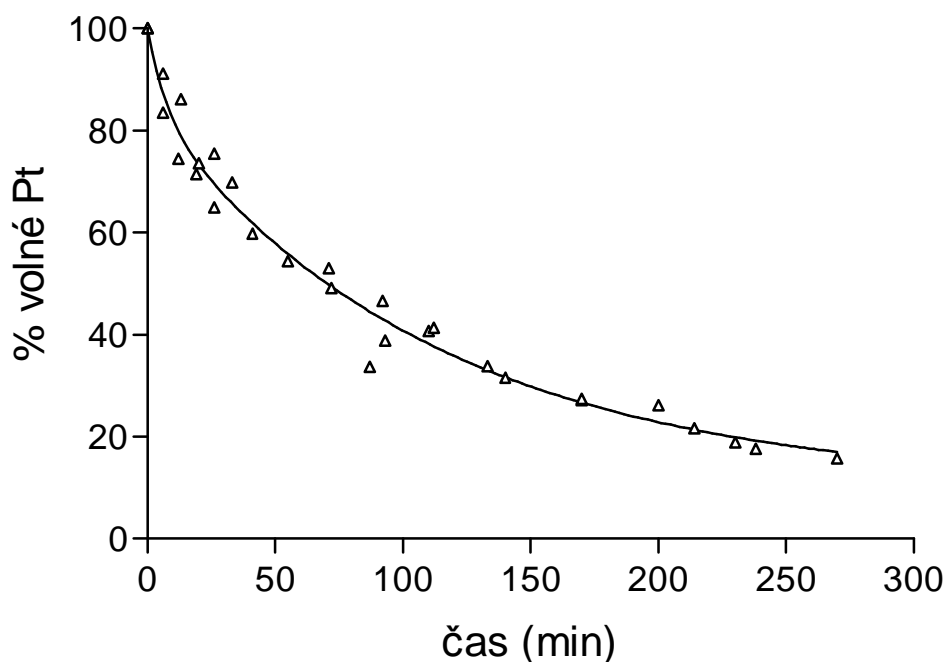
Obr.21 - Kalibrační křivka obou měřených komplexů – závislost proudu (mA) na přidávaném množství komplexu (μl)

Množství platinového komplexu navázaného na telecí thymovou DNA rostlo s postupujícím časem u obou komplexů. Přibližně po 6 h byl komplex BBR3571-DACH z 80% navázán na DNA (obr.22). Oproti tomu komplex DACH dosáhl 80% navázání zhruba již po 4 h (obr.23). Poločas reakce $t_{1/2}$ (čas, za který dojde k navázání polovičního množství komplexu) byl u komplexu BBR3571-DACH stanoven na 67,3 min, pro komplex DACH činila tato hodnota 68,95 min. Rychlost navázání je u obou komplexů výrazně rychlejší než je tomu např. u komplexu BBR3005 ($t_{1/2} \sim 200\text{-}300$ min) nebo cisplatinu ($t_{1/2} \sim 240$ min) za shodných reakčních podmínek.

Oba měřené komplexy platiny se liší svou rychlostí navázání na telecí thymovou DNA v čase. Dinukleární komplex se v první fázi měření kinetiky (prvních 50 min) vázal na telecí thymovou DNA rychleji než komplex DACH. S rostoucím časem se však rychlost navázání zpomalovala více než u mononukleárního komplexu (obr.22). Křivka kinetiky vazby komplexu DACH měla celkově rovnoměrnější klesající průběh, jak je patrné z obr.23. Po 24 h inkubaci obou komplexu při 37 C° bylo na DNA navázáno 98,1 % komplexu DACH a 86,3 % dinukleárního komplexu BBR3571-DACH.



Obr.22 - Kinetika vazby komplexu BBR3571-DACH na telecí thymovou DNA v 0,01 M NaClO₄ při 37 C°, koncentrace DNA byla 1.10⁻⁴ M, r_b = 0,05. V grafu jsou použity hodnoty z tří opakovaných měření.



Obr.23 - Rychlost navázání komplexu DACH na telecí thymovou DNA v 0,01 M NaClO₄ při 37 C°, koncentrace DNA byla 1.10⁻⁴ M a r_b bylo rovno 0,05. Naměřené hodnoty pochází z dvou opakovaných měření.

4.2 Měření teploty tání

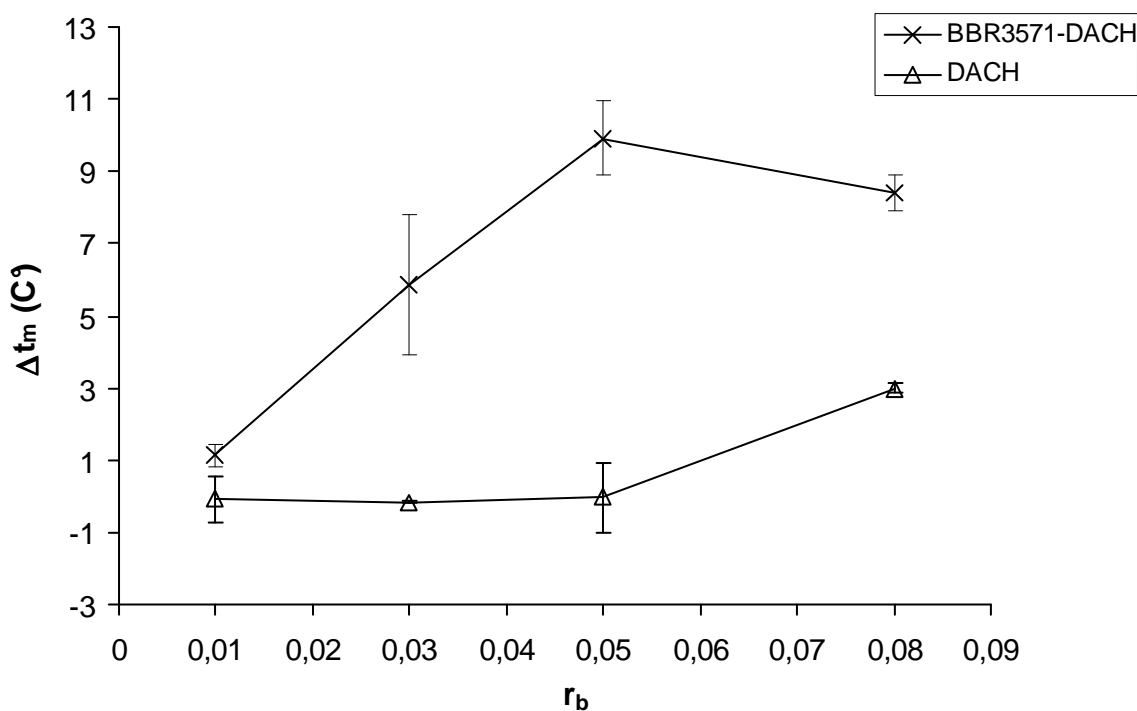
Výsledek měření teploty tání závisí na množství navázaného komplexu platiny a na koncentraci soli v roztoku.

Nejprve se stanovila teplota tání při nižší iontové síle (0,01 M NaClO₄). Modifikací telecí thymové DNA komplexem BBR3571-DACH došlo k významnému nárůstu teploty tání T_m. Maxima T_m (75,1C°) bylo dosaženo při r_b = 0,05; poté došlo k mírnému poklesu. Při měření teploty tání DNA modifikované mononukleárním komplexem DACH byla T_m téměř konstantní až po r_b = 0,05; pak začala mírně stoupat (obr.24).

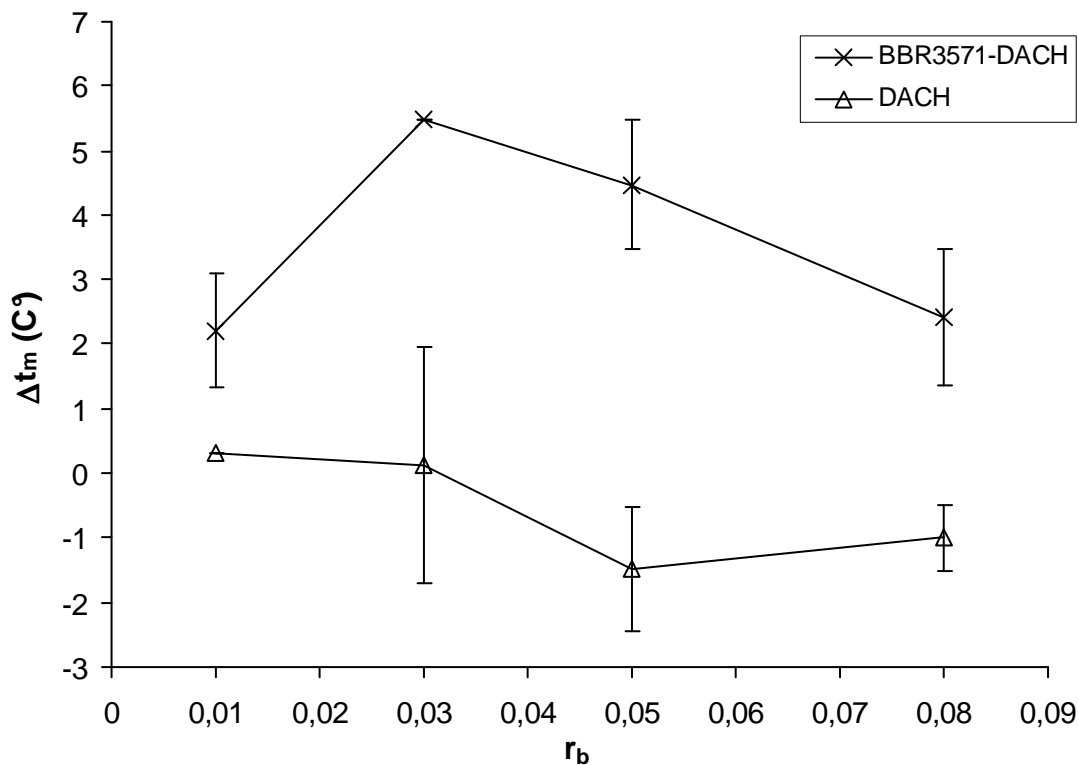
Za podmínek vyšší iontové síly (0,2 M NaClO₄) u DNA modifikované komplexem BBR3571-DACH měla naměřená T_m nejdříve rostoucí průběh, svého maxima dosáhla při r_b = 0,03. S rostoucím r_b (0,05a 0,08) však hodnota T_m rovnoměrně klesala. U komplexu DACH nedošlo oproti předchozímu případu k výrazné změně. Hodnota T_m byla opět téměř konstantní (obr.25).

Sledovaná změna hodnot T_m v podstatě odráží zastoupení a podíl obou typů můstků vytvářených dinukleárním komplexem na DNA. Vnitřetězcové můstky destabilizují DNA, zatímco můstky meziřetězcové svou vazbou mezi oběma vlákny dvoušroubovice DNA stabilizují. Dalším důležitým faktorem, jenž ovlivňuje měnící se hodnoty T_m, je pozitivní náboj komplexu BBR3571-DACH (dinukleární komplex má na rozdíl od neutrálního komplexu DACH v nehydrolyzovaném stavu náboj 3⁺).

Při nízké iontové síle lze usuzovat, že nárůst T_m je způsoben vyšším zastoupením meziřetězcových můstků vytvářených dinukleárním komplexem a pozitivním nábojem sloučeniny platiny. Oproti tomu klesající hodnoty teploty tání za podmínek vyšší iontové síly jsou důsledkem konformačních změn, jež indukují adukty platiny. Stabilizační efekt nábojů komplexů platiny na DNA je za podmínek vyšší iontové síly redukován přítomností Na^+ iontů v roztoku. Pokles hodnot T_m je při vyšší iontové síle způsoben především dominancí vzniklých konformačních změn nad stabilizačním efektem.



Obr.24 - Křivky teploty tání telecí thymové DNA modifikované komplexy BBR3571-DACH a DACH na rostoucí hodnotu r_b (0.01, 0.03, 0.05 a 0.08) za podmínek nižší iontové síly. ΔT_m je definována jako rozdíl hodnot T_m pro modifikovanou a nemodifikovanou DNA. Graficky znázorněná naměřená data jsou průměrem dvou opakovaných měření, rozptyl je vyjádřen chybovými úsečkami.



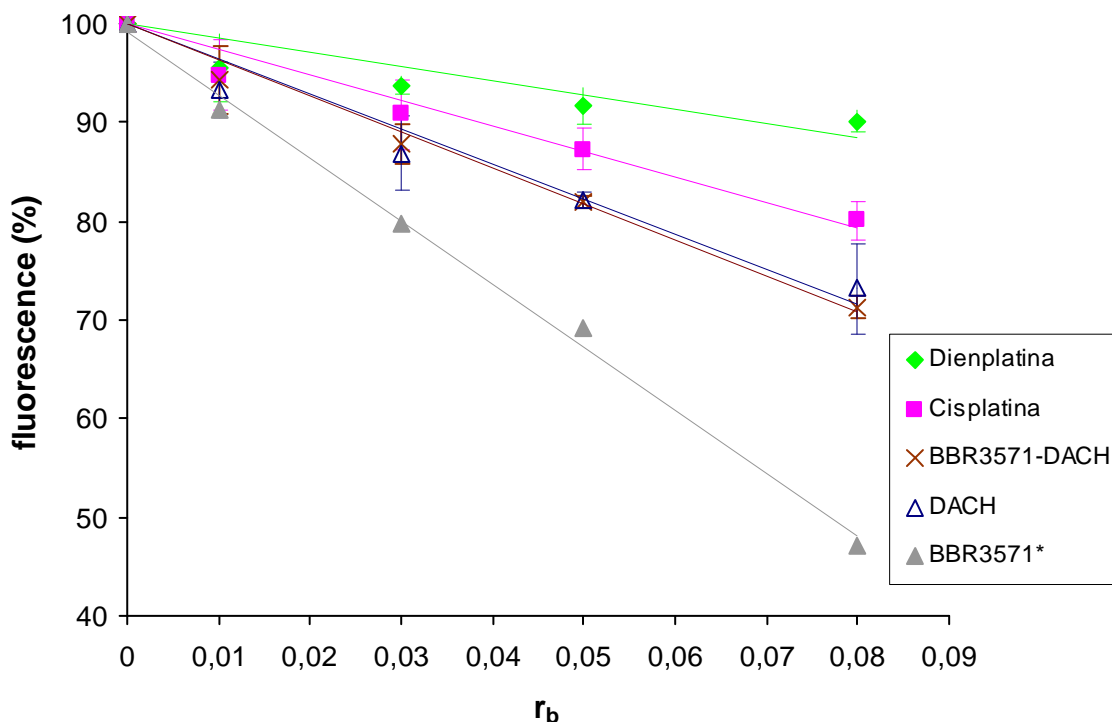
Obr.25 - Křivky teploty tání telecí thymové DNA modifikované komplexy BBR3571-DACH a DACH na rostoucí r_b (0,01, 0,03, 0,05 a 0,08) při vyšší iontové síle. ΔT_m je definována jako rozdíl hodnot T_m pro modifikovanou a nemodifikovanou DNA. Graficky znázorněné hodnoty jsou průměrem dvou měření, rozptyl je vyjádřen chybovými úsečkami.

4.3 Charakterizace aduktů pomocí měření intenzity fluorescence ethidium bromidu v přítomnosti modifikované DNA

Vazba ethidium bromidu na DNA interkalací je u řady komplexů platiny znemožněna tvorbou bifunkčních aduktů, což se projevuje snížením intenzity fluorescence. Na druhou stranu tvorba monofunkčních aduktů se projeví pouze velmi mírným snížením intenzity fluorescence.

V našem případě byla telecí thymová DNA inkubována s komplexy BBR3571-DACH, DACH a pro srovnání také s cisplatinou a dienplatinou. Modifikace DNA těmito komplexy se projevila snížením intenzity fluorescence ethidium bromidu (obr.26). Nejmenší pokles intenzity fluorescence vykazovala dienplatina, jež tvoří monofunkční adukty. K výraznějšímu snížení fluorescence došlo u cisplatinu, což odpovídá dříve publikovaným výsledkům [44]. Ještě větší snížení intenzity fluorescence bylo zjištěno u vzorků s DNA modifikovanou komplexy BBR3571-DACH a DACH. Snížení intenzity fluorescence u komplexu BBR3571-DACH je mnohem menší než u jiných dinukleárních komplexů – např.: BBR3571 (Obr. 26). Pravděpodobně tedy netvoří můstky dlouhého dosahu jako všechny dosud studované polynukleární komplexy.

Na základě těchto experimentů lze taktéž usuzovat, že dinukleární komplex BBR3571-DACH spolu s mononukleárním komplexem DACH tvoří převážně bifunkční adukty.

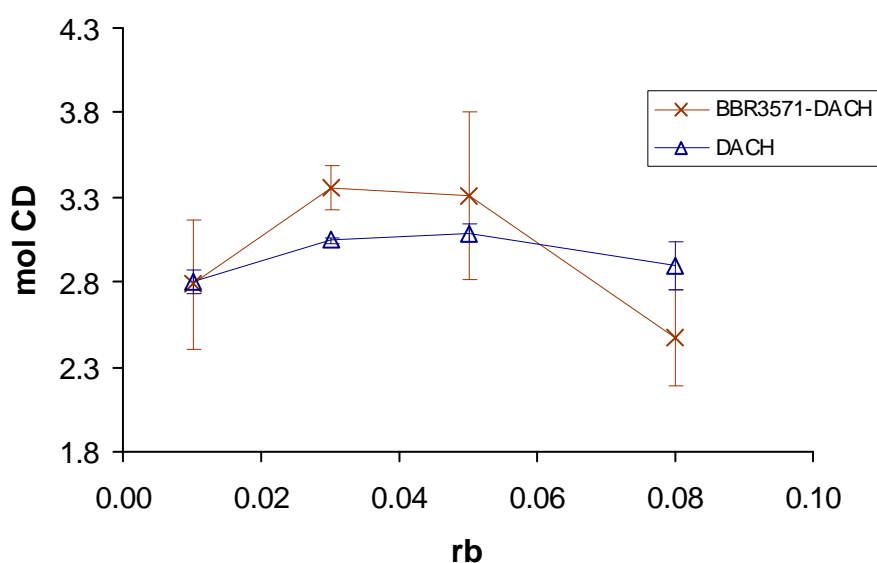


Obr.26 - Závislost fluorescence EtBr na r_b pro DNA modifikovanou pěti různými komplexy platiny v 10 mM NaClO₄ při 37 C° po dobu 24 h. Znázorněná data jsou průměrem 3 opakovaných měření, rozptyl hodnot je znázorněn pomocí chybových úseček.

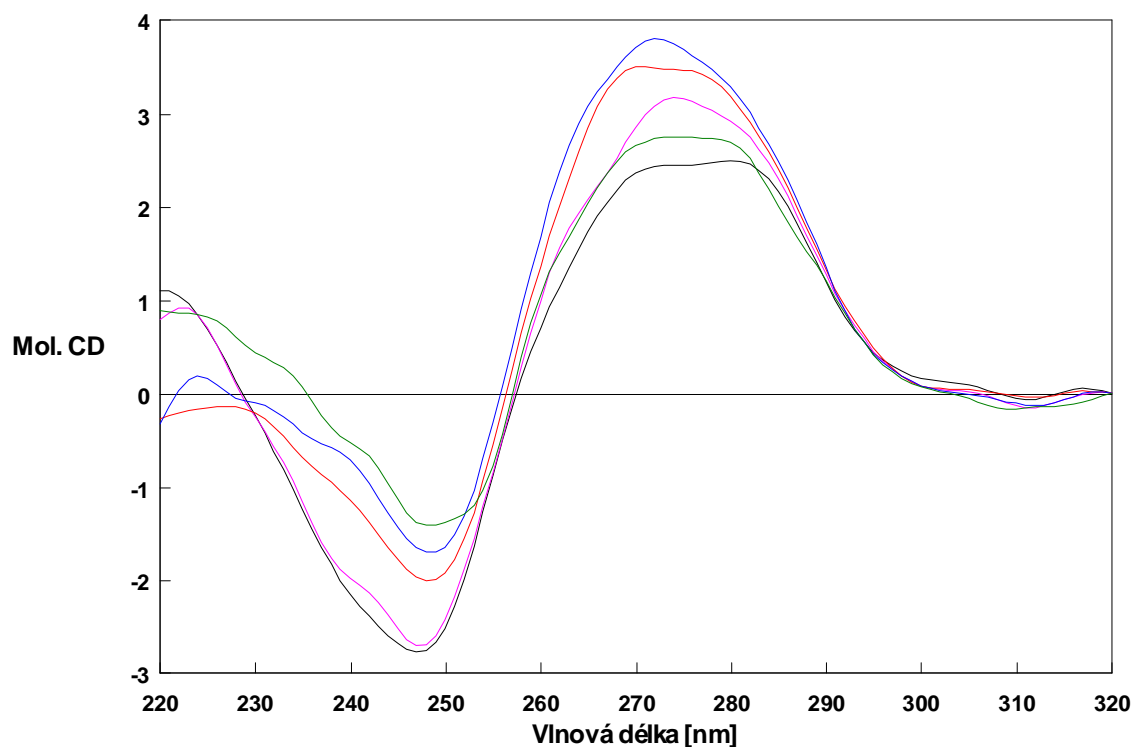
*Hodnoty komplexu BBR3571 byly za účelem porovnání výsledků s jiným dinukleárním komplexem převzaty z [31].

4.4 Cirkulární dichroismus

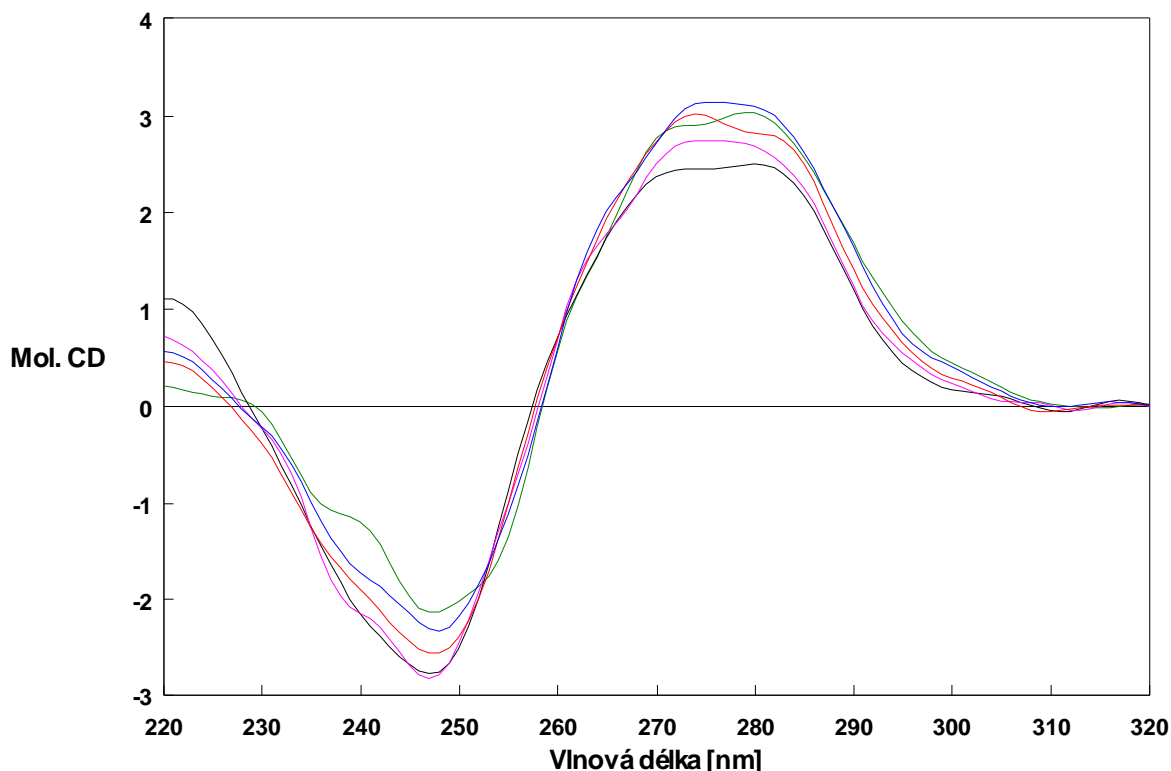
CD spektra telecí thymové DNA modifikované komplexy BBR3571-DACH a DACH byla srovnávána s CD spektry naměřenými pro nedomifikovanou DNA (obr.28 a 29). S rostoucím r_b byla sledována průběžně měnící se hodnota maxima (positive CD band) okolo 280 nm. U DNA modifikované komplexem BBR3571-DACH rostla hodnota maxima strmě až do $r_b = 0,03$. Se zvyšující se modifikací došlo nejdříve k mírnému a pak i k výraznému poklesu maxima až na hodnotu 2,5 mol.CD. Měřená DNA modifikovaná komplexem DACH reagovala na rostoucí r_b mírným zvýšením maxima (280 nm) až do $r_b = 0,05$ (obr.27)



Obr.27 - Grafické znázornění naměřených maximálních hodnot molCD při vlnové délce okolo 280 nm na r_b . Telecí thymová DNA byla modifikována komplexy BBR3571-DACH a DACH na rostoucí r_b (0,01, 0,03, 0,05 a 0,08). Znázorněná data jsou průměrem dvou opakovaných měření, rozptyl hodnot znázorňují chybové úsečky.



Obr.28 - CD spektra telecí thymové DNA modifikované komplexem BBR3571-DACH. Křivky - $r_b = 0,01$ (fialová); $r_b = 0,03$ (červená); $r_b = 0,05$ (modrá); $r_b = 0,08$ (zelená); nemodifikovaná DNA (černá)



Obr.29 - CD spektra telecí thymové DNA modifikované komplexem DACH.

Křivky - $r_b = 0,01$ (fialová); $r_b = 0,03$ (červená); $r_b = 0,05$ (modrá); $r_b = 0,08$ (zelená); nemodifikovaná DNA (černá)

4.5 Rozvíjení plasmidové DNA

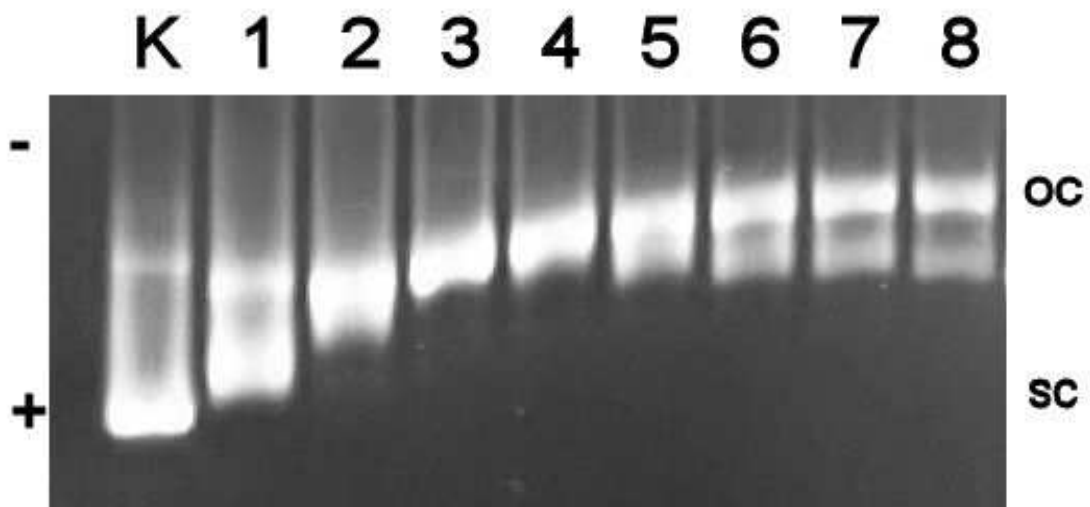
Ke kvantifikaci rozvíjení vyvolaného v negativně zavinuté superhelikální DNA vazbou komplexů BBR3571-DACH a DACH byla použita elektroforéza v agarózovém gelu za nativních podmínek. Na obr. 30 a 31 jsou zachyceny výsledky experimentů, při kterých byla plasmidová DNA modifikována oběma komplexy na různé hodnoty r_b .

Stanovená hodnota nadšroubovicové hustoty σ byla 0,036. Ke komigraci proužků odpovídajících relaxované (OC) a superhelikální (SC) formě DNA došlo při modifikaci na $r_b(c) = 0,037$ pro komplex BBR3571-DACH a $r_b(c) = 0,033$ pro DACH. Těmto hodnotám odpovídají úhly rozvíjení $17,4 \pm 1,2^\circ$ a $20 \pm 2^\circ$.

Na základě experimentálních dat uvedených v literatuře lze komplexy platiny rozdělit podle velikosti úhlu rozvíjení a způsobu vazby na DNA do dvou skupin [44]. Hodnota úhlu rozvinutí v rozmezí $10-14^\circ$ je typická pro komplexy, které se vážou bifunkčně na DNA (např. pro BBR3005, cisplatinu, BBR3464). Adukt komplexy, které se vážou na DNA monofunkčně, rozvíjejí DNA výrazně méně - přibližně o 6° . Na základě těchto poznatků můžeme usoudit, že komplexy BBR3571-DACH a DACH se vážou téměř výhradně bifunkčně.



Obr.30 - Rozvíjení superhelikální plasmidové DNA po vazbě komplexu BBR3571-DACH. Horní proužky (OC) odpovídají relaxované DNA, spodní proužky (SC) odpovídají superhelikální DNA. Plasmidová DNA byla inkubována s komplexem BBR3571-DACH při hodnotách r_b : 0 (kontrola - dráha K), 0.02, 0.025, 0.03, 0.035, 0.04 a 0.05 (dráhy 1 - 6)

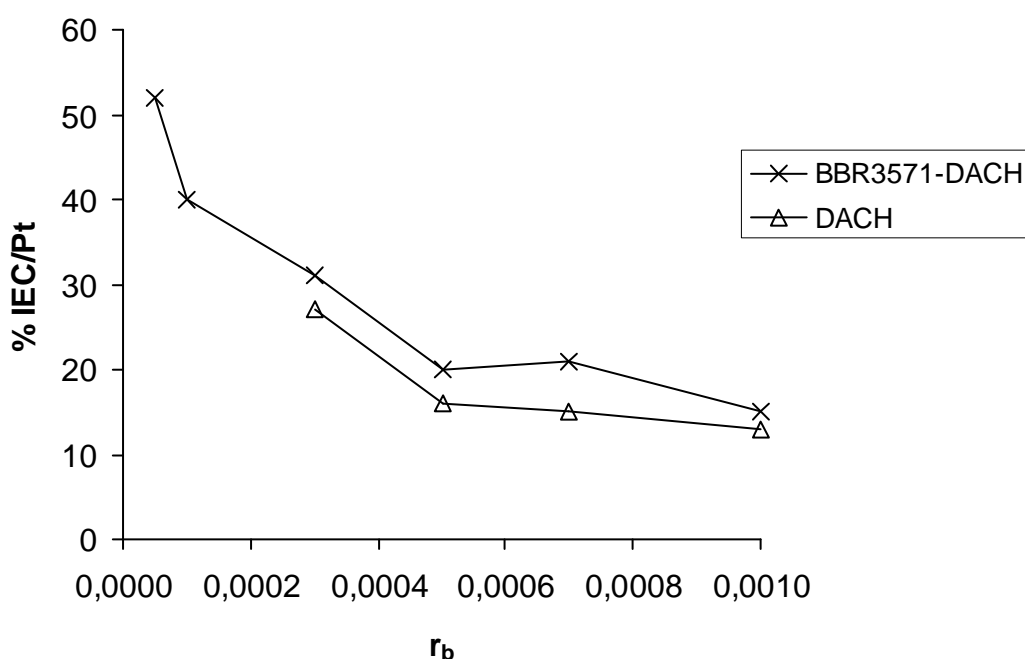


Obr.31 - Rozvíjení superhelikální plasmidové DNA po vazbě komplexu DACH. Plasmidová DNA byla inkubována s komplexem DACH při hodnotách r_b : 0 (kontrola - dráha K), 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 a 0.08 (dráhy 1 - 8)

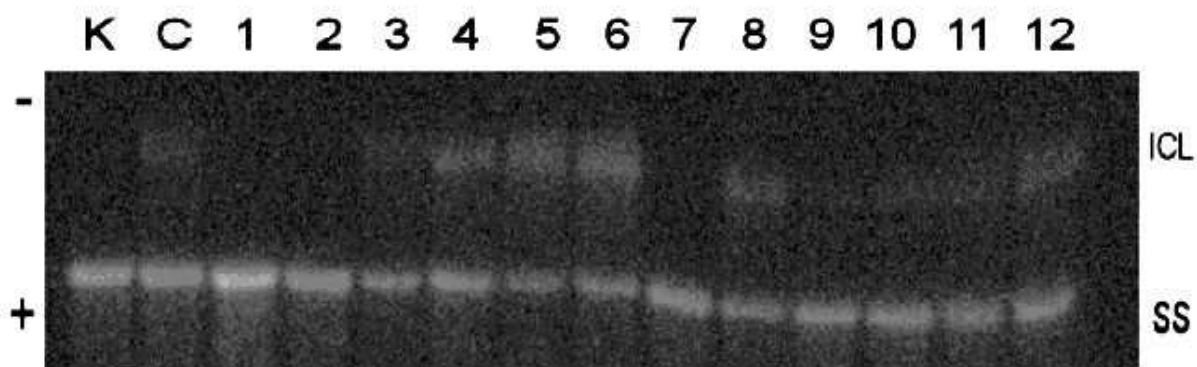
4.6 Tvorba meziřetězcových můstků

Bifunkční platinové sloučeniny, které se vážou kovalentně na DNA, tvoří různé typy meziřetězcových a vnitřetězcových můstků. Následující experiment byl proveden s cílem porovnat zastoupení meziřetězcových vazeb (IEC) mezi ostatními adukty u obou komplexů - BBR3571-DACH a DACH. Pro tento experiment byl použit plasmid pSP73 (2464 pb), který byl nejdříve linearizován endonukleázou *EcoRI* a v linearizovaném stavu modifikován komplexy platiny. Vzorky byly analyzovány na denaturačním agarózovém gelu.

Plasmid neobsahující žádný meziřetězcový můstek putuje jako jednořetězcová DNA o délce 2464 pb, zatímco DNA obsahující meziřetězcové můstky putuje pomaleji. Intenzita pomaleji migrujících DNA bandů se zvyšovala s narůstajícím stupněm modifikace. (obr.33). Četnost meziřetězcových můstků byla vypočtena pomocí Poissonova rozdělení frakcí jednořetězcové DNA v kombinaci s hodnotami r_b a velikostí fragmentů. Schopnost komplexů BBR3571-DACH a DACH vytvářet meziřetězcové vazby se snižovala s rostoucím r_b , jak je patrné z grafu (obr.32). Je zřejmé, že schopnost obou komplexů tvořit meziřetězcové můstky byla vyšší než u cisplatiny (6%), a naopak nižší než např. u dinukleárního komplexu BBR3005 (70 – 90%) [44].



Obr.32 - Závislost množství meziřetězcových můstků na r_b na jeden adukt (% IEC na adukt) u linearizovaného plasmidu pSP73 modifikovaného komplexem BBR3571-DACH a DACH. První dvě hodnoty ($r_b = 5 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-4}$) u DNA modifikované komplexem DACH byly pro velkou nepřesnost, zaviněnou pravděpodobně nedokonalým pipetováním při přípravě vzorků, z grafu odstraněny.



Obr.33 - Tvorba meziřetězcových můsteků na linearizované plasmidové (pSP73 pb) DNA po modifikaci komplexu BBR3571-DACH a DACH. Autoradiogram 1% denaturačního agarózového gelu se vzorky linearizované DNA, která byla naznačena na 3' konci. Horní proužky (ICL) odpovídají DNA obsahující meziřetězcové můstky, která v denaturačním gelu putuje pomaleji než jednořetězcová DNA, které odpovídají spodní proužky (ss).

Dráha K - kontrola (nemodifikovaná DNA); C - plasmidová DNA linearizovaná EcoRI a modifikovaná cisplatinou při $r_b = 1.10^{-3}$.

Dráhy 1 - 6: DNA modifikovaná komplexem BBR3571-DACH na rostoucí r_b :
- 5.10^{-5} , 1.10^{-4} , 3.10^{-4} , 5.10^{-4} , 7.10^{-4} a 1.10^{-3}

Dráhy 7 - 12: DNA modifikována komplexem DACH na rostoucí r_b :
- 5.10^{-5} , 1.10^{-4} , 3.10^{-4} , 5.10^{-4} , 7.10^{-4} a 1.10^{-3}

5. Diskuze

Hlavním cílem diplomové práce bylo studium vlivu vazby dinukleárního komplexu se spermidinovým spojovacím řetězcem BBR3571-DACH a mononukleárního komplexu DACH na DNA. V rámci této práce byla studována kinetika vazby na telecí thymovou DNA, teplota tání, cirkulární dichroismus, fluorescence ethidium bromidu v přítomnosti modifikované DNA, rozvíjení plasmidové DNA a tvorba meziřetězcových můstků na plasmidové DNA.

Prvním a velmi důležitým krokem bylo stanovení kinetiky vazby obou komplexů. I přes značnou objemnost molekulovou hmotnost především dinukleárního komplexu ($M_r = 942$), dochází k vazbě na DNA u obou komplexů. Rychlost této vazby je v obou případech téměř shodná ($t_{1/2} = 67$ min resp. 69 min). V porovnání s cisplatinou ($t_{1/2} = 120$ min) dochází až k 2krát rychlejšímu navázání na DNA.

V další fázi bylo studováno poškození DNA způsobené vazbou těchto sloučenin. Vyhodnocená CD spektra modifikované DNA byla srovnávána se spektry nemodifikované DNA a byl sledován pokles maxima okolo 280 nm, který je přisuzován denaturačním změnám v DNA. Dle naměřených výsledků je zřejmé, že denaturační efekt na DNA se neprokázal ani u jednoho z analyzovaných komplexů.

Zda mají navázané komplexy BBR3571-DACH a DACH na DNA spíše stabilizační nebo naopak destabilizační vliv bylo ověřeno měřením teploty tání DNA modifikované oběma komplexy. Z vyšších teplot tání DNA po modifikaci komplexem BBR3571-DACH jak při nízké, tak při vysoké iontové síle (teplota tání byla o 10 °C resp 5,5 °C vyšší než teplota tání samotné nemodifikované DNA) je patrné, že tento komplex přispívá ke stabilizaci. To se již nedá s určitostí prohlásit u mononukleárního komplexu DACH, kde došlo k navýšení teploty tání modifikované DNA o pouhých 1,7 °C.

Ke stabilizaci DNA pravděpodobně přispívá kladný náboj komplexu a také vyšší počet meziřetězcových můstků. Schopnost komplexů platiny tvořit meziřetězcové můstky byla také předmětem tohoto studia. V porovnání s cisplatinou (6%), tvoří komplex BBR3571-DACH (15% - $r_b = 0,001$) a DACH (13% - $r_b = 0,001$) více meziřetězcových můstků.

Studium aduktů pomocí měření intenzity fluorescence ethidium bromidu v přítomnosti modifikované DNA prokázalo u obou komplexů velmi podobnou strukturu vytvářených aduktů. Modifikace DNA komplexem BBR3571-DACH se projevila výrazným snížením intenzity fluorescence ethidium bromidu. Totéž bylo prakticky pozorováno u mononukleárního komplexu DACH. Na základě tohoto experimentu byla utvořena hypotéza, že komplexy BBR3571-DACH a DACH vytvářejí především bifunkční vazby krátkého dosahu.

Tato hypotéza byla potvrzena dalším experimentem, kterým bylo studium rozvíjení plasmidové DNA vyvolaného vazbou obou komplexů. Zjištěné hodnoty úhlu rozvíjení byly $17^\circ \pm 1^\circ$ pro komplex BBR3571-DACH a $20^\circ \pm 2^\circ$ pro komplex DACH. Z literatury je známo, že takto vysoké stupně rozvíjení jsou charakteristické pro bifunkční vazby komplexu platiny na DNA.

Shrnutí všech výsledků je pro větší přehlednost znázorněno v tab. 2.

Z této tabulky je patrné, že dinukleární komplex BBR3571-DACH modifikuje DNA způsobem, který se podobá modifikaci mononukleárním komplexem DACH spíše než modifikaci komplexem BBR3571. Z toho lze usoudit, že přítomnost diamincyklohexanového ligandu v molekule komplexu BBR3571-DACH ovlivňuje vazebné vlastnosti této látky výrazně více než přítomnost spermidinového řetězce.

Tab.2: Shrnutí výsledků experimentů získaných na DNA modifikované komplexy BBR3571-DACH a DACH. Pro srovnání jsou zde uvedeny i výsledky DNA modifikované cisplatinou a komplexem BBR3571 (získané za shodných experimentálních podmínek)

	BBR3571 DACH	DACH	cisplatina	BBR3571 (1,1/t,t - Spermidin)
Celkový náboj	3+	0	0	2+
Kinetika vazby ($t_{1/2}$)	67 min	69 min	120 min	8.2 min
Meziřetězcové můstky (%)	15	13	6	33
Rozvíjení	16 – 18°	18 – 22°	13°	12°
Pokles EtBr fluorescence	Výrazný	Výrazný	Méně výrazný	Výrazný
Teplota tání	Vzestup (max 11°C)	Vzestup (max 3°C)	Pokles	Nestanoveno

6. Závěr

Výsledky této diplomové práce vyústily v překvapivý závěr. Studium dinukleárního komplexu se spermidiovým řetězcem BBR3571-DACH prokázalo, že se tato sloučenina v mnoha ohledech (kinetika vazby, fluorescence EtBr, CD spektra, rozvíjení DNA a stanovení počtu meziřetězcových můstků) velmi podobá mononukleárnímu komplexu DACH. Zmíněný spermidinový řetězec (spojovací alkandiaminový řetězec mezi dvěma centrálními atomy Pt) pravděpodobně nepřispívá k tvorbě můstků dlouhého dosahu a tím se komplex BBR3571-DACH podstatně liší od jiných, dříve studovaných polynukleárních komplexů platiny.

Na základě těchto zjištění by bylo jistě přínosné, aby se komplex BBR3571-DACH podrobil dalšímu studiu. Není vyloučeno, že by mohl v budoucnu působit na širší spektrum nádorů a vykazovat při tom menší vedlejší účinky, než dosud klinicky schválené a používané komplexy platiny.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Petruželka, L., Konopásek, B. a kolektiv: *Klinická onkologie*. Praha: Karolinum, 2003. 274 s. ISBN 80-246-0395-0.
2. Petera, J. a kolektiv: *Obecná onkologie*. Praha: Karolinum, 2005. 205 s. ISBN 80-246-0968-1.
3. Adam, Z., Vorlíček, J.: *Obecná onkologie*, Masarykova univerzita, Brno, 2004. 442 s. ISBN 80-210-3574-9
4. Cisplatin, [online], poslední revize 24. 4. 2008 [26. 4. 2008]. Dostupné na [www: http://en.wikipedia.org/wiki/Cisplatin](http://en.wikipedia.org/wiki/Cisplatin)
5. Peyrone, M.: *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 1844. Band LI, 1ff.
6. Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko J. E., Mansour V.H., *Nature*, 1969, vol. 222, pp.385.
7. Heringová, P.: *Biofyzikální analýza mechanismu protinádorového působení nových metalofarmak*, Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2007. 100 s. Vedoucí disertační práce doc. RNDr. Jana Kašpárková, PhD.
8. Eastman, A.: *Pharmacol. Ther.*, 1987, vol. 34, pp. 155.
9. Greenwood, N. N., Earnshaw, A.: *chemie prvků svazek II*, Praha: Informatorium, 1993. 1443 s. ISBN: 80-85427-38-9.
10. Holler, E.: *Mechanism of Action of Tumor-Inhibiting Metal Complexes, Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Weinheim: B.K.Keppeler, 1993, pp. 37.
11. Mašek, V., *Charakterizace aduktů platinových komplexů na DNA duplexech pomocí Ramanovy spektroskopie*, Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2007. 101 s. Vedoucí disertační práce Prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
12. Martin, R.B.: *Cisplatin – Chemistry and Biochemistry of the leading Anticancer Drug*, Weinheim: Willey-VCH, 1999, pp. 186.
13. DNA, [online], poslední revize 24. 4. 2008 [cit. 26. 4. 2008]. Dostupné na [www: http://en.wikipedia.org/wiki/DNA](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA)
14. Just, G., Holler, E.: *Cancer. Res.*, 1989, vol. 47, pp. 388.
15. Murray, R.K., Graner, D.G., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.: *Harperova Biochemie*, H & H, 2002, 842 s., ISBN 80 7319 0313 3.
16. DNA structures from A to Z, [online], [cit. 13 .3. 2008]. Dostupné na [www: http://nucleix.mbu.iisc.ernet.in/research.htm](http://nucleix.mbu.iisc.ernet.in/research.htm)
17. Saenger, W.: *Principles of Nucleic Acid Structure*, New York: Springer-Verlag, 1983. ISBN-10: 0387907610.
18. Pulman, A., Pulman, B.: *Q.Rev.Biophys.*, 1981, vol.14, pp. 289.
19. Bellon, S. F., Coleman, J.H., Lippard, S. J. *Biochemistry*, 1991, vol. 31, pp. 8026.

20. Rosypal, S. (autor a vydavatel): *Úvod do molekulární biologie – díl první*, 1998. 300 s. ISBN 80-902562-0-1.
21. Malinge, J.M., Pérez, C., Leng, M.: *Biochemistry*, 1992, vol. 31, pp.12397.
22. Brabec, V., Kašparková, J.: *DNA Interactions of Novel Platinum Anticancer Drugs*, Weinheim, 2002, pp. 178.
23. Mc Keage, M. J., Kelland, L. R.: *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions*, London, S. Neidle a M. Waring, Macmillan, 1993, pp. 169.
24. Harrap, K. R.: *Cancer Treat. Rev.*, 1985, vol. 12, pp. 21.
25. Klener, P.: *Remedia Kompendium*, Praha, Panax, 1996, pp. 351.
26. Farmakoterapie, [online], 2005, č. 8, [cit. 15. 3. 2008] Dostupné na [www: http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/292](http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/292)
ISSN1801-7509
27. Mello, J. A., Lippard, S. J., Essigmann, J. M.: *Biochemistry*, 1995, vol. 34, pp.14783.
28. Farrell, N., Appleton, T. G., Qu, Y., Roberts,,: *Biochemistry*, 1995, vol. 34, pp. 145480.
29. Farrell, N. P., de Almeida, S. G., Skov, K.A. J.: *Am. Chem. Soc.*, 1988, vol. 110, pp. 5018.
30. Qu, Y., Appleton, T. G., Hoeschele, J. D., Farrell, N.: *Inorg. Chem.*, 1993, vol. 32, pp. 2591.
31. Zehnulová, J.: *Interakce DNA s protinádorově účinnými vícejadernými komplexy platiny*, Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2006. 111 s. Vedoucí disertační práce Prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
32. Sessa, C., Capri, G., Gianni, L., Peccatori, F., Graselli, G., Bauer, J.,: *Annals of Oncology* , 2000, vol. 11, pp. 977.
33. Cox, J. W., Berners-Price, S. J., Davies, M. S., Qu, Y., Farrell, N.: *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, pp. 1316.
34. Farrell, N.: *Metal Ions in Biological Systems, Metal complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents*, Sigel, A., Sigel, H., FontisMedia S.A – Marcel Dekker Inc., 2004, vol. 42, pp. 252.
35. Barek, J., Opekar, F., Štulík, K.: *Elektroanalytická chemie*, Praha: Karolinum, 2005. 188 s. ISBN 80-246-1146-5.
36. Kim, S.D., Vrána, O., Kleinwachter, V., Niki, K., Brabec, V.: *Analytical Letters*, 1990, vol. 23, pp. 1505.
37. Klouda, P. (autor a vydavatel): *Moderní analytické metody*, 2003. 132 s. ISBN-10:80-86369-07-2
38. Oficiální výukové stránky Oddělení funkční genomiky a proteomiky Přír.fak. MU Brno, dostupné na [www: http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi7230/um/3973768/07_Abs_a.pdf](http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi7230/um/3973768/07_Abs_a.pdf)

39. Žaludová, R.: *Interakce DNA s vybranými protinádorově účinnými komplexy platiny*, Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 1997. Vedoucí disertační práce Prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
40. DNA Melting, [online], poslední revize 24. 4. 2008, [cit. 27. 4 2008], dostupné na www: <http://www.gen.ufl.edu/>
41. Brabec, V., Christofis, P., Slámová, .: *Biochemical pharmacology*, 2007, vol. 73, pp. 1887.
42. Stibor, I.: *Interakce planárních molekul s nukleovými kyselinami - interkalace*, učební materiál ústavu organické chemie VŠCHT Praha. Dostupné na www: http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/7_Stibor.pdf
43. Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T.: *Bioanalytické metody*, Praha, VŠCHT, 2001. s. 254 ISBN 80-7080-449-1.
44. Brabec, V., Kašpárková, J., Vrána, O., Nováková, O.: *Biochemistry*, 1999, vol. 38, pp. 6781.
45. Najareh, J., Kašpárková, J., Marini, Gibbon, D., Brabec, V.: *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2005, vol. 10, pp. 722.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HPV	lidský papillomavirus (human papillomavirus)
EBV	virus Epstein-Barrové (Epstein-Barr virus)
HIV	virus lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DME	rtuťová kapková elektroda (dropping mercury electrode)
DPP	diferenční pulzní polarografie
EtBr	ethidium bromid
CD	cirkulární dichroismus
IEC	meziřetězcové můstky (interstrand cross-links)
IAC	vnitrořetězcové můstky (intrastrand cross-links)
ss	jednořetězcová DNA (single-stranded DNA)
ds	dvouřetězcová DNA (double-stranded DNA)
pb	pár bází
r_b	molární poměr navázaného komplexu platiny na DNA $\left(r_b = \frac{c_{Pt\text{-navázaná}}(M)}{c_{DNA}(M)} \right)$
r_i	molární poměr ještě nenavázaného komplexu platiny na DNA $\left(r_i = \frac{c_{Pt}(M)}{c_{DNA}(M)} \right)$