

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Kateřina Ječmeňová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Chemicko-fyzikální charakteristiky
schválených léčiv a využití v identifikaci
jejich molekulárních cílů**

Bakalářská práce

Kateřina Ječmeňová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Jarmila Stanková

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Jarmily Stankové.

V Olomouci dne 3. 5. 2018

podpis studenta

Ráda bych poděkovala Mgr. Jarmile Stankové za odborné vedení mé bakalářské práce, za cenné rady, konzultace, za trpělivost a za čas, který mi poskytla během vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu pracoviště Ústavu molekulární a translační medicíny, především Ing. Soně Gurské, Ph.D, za ochotu a pomoc při řešení experimentální části. Děkuji také všem, kteří mě podporovali během celého studia.

Souhrn

Antracyklinová léčiva, která jsou známá svojí protinádorovou aktivitou od roku 1960, byla poprvé izolována ze *Streptomyces peucetius*. Řadí se mezi nejčastěji používané chemoterapeutické látky a za cíl jejich účinku se považuje především DNA v jádře buňky. Jejich schopností je interkalace mezi páry bází DNA a hlavním mechanismem je blokáce funkce jaderného enzymu topoizomerázy II. Mezi nejvýznamnější zástupce antracyklinů patří amrubicin, daunorubicin, doxorubicin, epirubicin a idarubicin. Antracyklinová léčiva mají významné spektrální vlastnosti, kterých bylo využito v experimentální části práce. Práce se věnuje chemicko-fyzikálním charakteristikám schválených léčiv a využití v identifikaci jejich molekulárních cílů. V teoretické části byl vypracován přehled chemicko-fyzikálních vlastností látek vyplývajících ze struktury. Byla popsána skupina antracyklinových léčiv, mechanismů jejich účinků, publikovaných vedlejších účinků a jejich chemicko-fyzikálních vlastností. Cílem experimentální části bylo stanovit spektrální vlastnosti látek a jejich další využití při identifikaci molekulárních cílů v buňce. Byla stanovena hodnota IC_{50} u vybraných antracyklinů na liniích U-2 OS a MDA-MB-231. Pro obě linie byl nejvíce cytotoxický idarubicin a naopak nejméně amrubicin. V další části byla provedena fluorescenční mikroskopie, jejíž pomocí byla detekována lokalizace antracyklinů v buňkách a vliv na jejich morfologii. Dále byly připraveny lyzáty ošetřených buněk, lyzáty byly v poslední části práce separovány pomocí SDS-PAGE a na gelech byly detekovány fluorescenční bandy v oblastech 70 kDa a 70-140 kDa.

Summary

Anthracyclines are known for their antitumor activity since 1960. Firstly, the anthracycline antibiotics were isolated from *Streptomyces* (*Streptomyces peucetius*) and they were known for the antimicrobial effect. The major molecular target of anthracyclines is nuclear DNA, which makes them one of the most commonly used chemotherapeutics. Their ability is intercalation into pairs of DNA and thus they cause an inhibition of the nuclear enzyme topoisomerase II. The most significant representatives of anthracyclines are amrubicin, daunorubicin, epirubicin and idarubicin. The anthracyclines have significant spectral properties, which have been utilized in the experimental part of this thesis. The thesis focuses on the physicochemical characteristics of approved drugs and their use in identification of their molecular targets. In the theoretical part, an overview of the physicochemical properties based on structures was elaborated. The anthracyclines and mechanisms of their effects, their published side effects and their physicochemical properties were described. The aim of the experimental part was to determine the spectral properties and then use them for the identification of their targets in the cells. An IC_{50} value was calculated for selected anthracyclines in the U-2 OS and MDA-MB-231 cell lines. For both cell lines the most cytotoxic agent was idarubicin where as amrubicin was the least. The following part of this work was focused on the fluorescence microscopy of treated cells, localization of anthracyclines and cell morphology affected by them. Lysates from treated cells were prepared, the lysates from treated cells were separated with SDS-PAGE and we detected fluorescent bands near 70 kDa and between 70 and 140 kDa.

Obsah

Seznam obrázků	vii
Seznam tabulek	xi
1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti látek dané jejich strukturou	3
3.2 Antracykliny	6
3.2.1 Spektrální vlastnosti antracyklinů	7
3.3 Mechanismus účinku antracyklinů	9
3.3.1 Daunorubicin.....	9
3.3.2 Doxorubicin	10
3.3.3 Idarubicin	11
3.3.4 Epirubicin.....	12
3.3.5 Amrubicin	13
3.4 Kardiotoxicita antracyklinů	14
3.5 Buněčná rezistence proti antracyklinům	16
4 Materiál a metody	19
4.1 Biologický materiál	19
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	19
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	21

4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	22
4.4.1	Měření spektrálních vlastností léčiv.....	22
4.4.2	Stanovení inhibiční konstanty IC ₅₀ pomocí MTS testu	23
4.4.3	Fluorescenční mikroskopie	23
4.4.4	Příprava vzorků pro SDS-PAGE lyzaci buněk tekutým dusíkem.....	24
4.4.5	Měření koncentrace proteinů ve vzorcích	26
4.4.6	Měření fluorescence vzorků připravených lyzaci tekutým dusíkem.....	26
4.4.7	Příprava vzorků pro SDS-PAGE lyzaci 2×SDS lyzačním pufrem	27
4.4.8	SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného).....	27
5	Výsledky	29
5.1	Naměřené spektrální vlastnosti vybraných léčiv	29
5.2	Stanovená hodnota IC ₅₀ pomocí MTS testu u vybraných léčiv.....	33
5.3	Výsledky fluorescenční mikroskopie	34
5.4	Výsledky měření fluorescence vzorků lyzovaných tekutým dusíkem	36
5.5	Výsledky SDS-PAGE vzorků lyzovaných tekutým dusíkem	38
5.6	Výsledky SDS-PAGE vzorků lyzovaných 2× SDS lyzačním pufrem	41
6	Diskuse.....	42
7	Závěr	45
8	Literatura.....	46

Seznam obrázků

Obr. 1: Chemické struktury typických chromoforů – a) obecný vzorec karbonylové sloučeniny, b) obecný vzorec azosloučeniny, c) aromatické jádro, d) konjugovaný dien (izopren)	4
Obr. 2: Chemické struktury aromatických aminokyselin: a) tryptofan, b) tyrosin, c) fenylalanin.....	4
Obr. 3: a) strukturní vzorec ethidium bromidu, b) strukturní vzorec DAPI	5
Obr. 4: Obecná struktura antracyklinů	6
Obr. 5: Excitační maximum (470 nm) daunorubicinu (daunomycinu – DNM) při emisní vlnové délce 560 nm (převzato z A. Juarranz <i>et al.</i> , 1999).....	8
Obr. 6: Emisní maximum (571 nm) idarubicinu při excitační vlnové délce 482 nm, píky znázorňují závislost intenzity fluorescence na koncentraci navázané látky na DNA (převzato z C. Ozluer <i>et H. E. S. Kara</i> , 2014).....	8
Obr. 7: Strukturní vzorec daunorubicinu	10
Obr. 8: Strukturní vzorec doxorubicinu s vyznačenou hydroxylovou skupinou na 14. uhlíku	11
Obr. 9: Strukturní vzorec idarubicinu	12
Obr. 10: Strukturní vzorec epirubicinu	12
Obr. 11: Strukturní vzorec amrubicinu	13
Obr. 12: Potencionální signální dráhy, které se účastní buněčné smrti kardiomyocytů vyvolané antracykliny (upraveno podle Zhang <i>et al.</i> , 2009)	15
Obr. 13: Schéma P-glykoproteinu procházejícího membránou s vyznačenými ATP-vazebnými místy (převzato z Nielson <i>et al.</i> , 1996).....	16
Obr. 14: UV-VIS absorpční spektrum amrubicinu s maximem intenzity při 485 nm, graf zobrazuje závislost absorbance amrubicinu na vlnové délce	30

Obr. 15 a 16: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra amrubicinu s maximy excitace 254 nm, 287 nm, 458 nm a emise při 507 nm a 576 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence amrubicinu na vlnové délce	30
Obr. 17: UV-VIS absorpční spektrum daunorubicinu s maximem intenzity při 474 nm, graf zobrazuje závislost absorbance daunorubicinu na vlnové délce.....	30
Obr. 18 a 19: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra daunorubicinu s maximy excitace při 254 nm 498 nm a emise při 593 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence daunorubicinu na vlnové délce	31
Obr. 20: UV-VIS absorpční spektrum doxorubicinu s maximem intenzity při 475 nm, graf zobrazuje závislost absorbance doxorubicinu na vlnové délce	31
Obr. 21 a 22: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra doxorubicinu s maximy excitace při 498 nm a emise při 595 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence doxorubicinu na vlnové délce	31
Obr. 23: UV-VIS absorpční spektrum epirubicinu s maximem intenzity při 482 nm, graf zobrazuje závislost absorbance epirubicinu na vlnové délce.....	32
Obr. 24 a 25: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra epirubicinu s maximy excitace při 235 nm a 493 nm a emise při 592 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence epirubicinu na vlnové délce	32
Obr. 26: UV-VIS absorpční spektrum idarubicinu s maximem intenzity při 488 nm, graf zobrazuje závislost absorbance idarubicinu na vlnové délce.....	32
Obr. 27 a 28: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra idarubicinu s maximy excitace při 255 nm a 488 nm a emise při 571 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence idarubicinu na vlnové délce	33
Obr. 29: Buněčná linie MDA-MB- 231 ošetřená léčivý v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ monitorována 6 hodin, fotografie z prvního a třetího sloupce byly pořízeny na počátku monitorování, fotografie ve druhém sloupci po 3 hodinách a fotografie ve čtvrtém sloupci po 1 hodině, doxorubicin nebyl detekován	34

- Obr. 30:** Buněčná linie U-2 OS ošetřená léčivými v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ monitorována 6 hodin, fotografie z prvního a třetího sloupce byly pořízeny na počátku monitorování, fotografie ve druhém sloupci po 3 hodinách a fotografie ve čtvrtém sloupci po 1 hodině, doxorubicin nebyl detekován35
- Obr. 31:** Graf zobrazující intenzity fluorescence vzorků buněčné linie U-2 OS, které byly ošetřeny léčivými (K – kontrola, DAU - daunorubicin, DOX – doxorubicin, EPI – epirubicin, IDA – idarubicin) o koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ a intenzity samotných léčiv koncentračně odpovídající $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ 37
- Obr. 32:** Graf zobrazující intenzity fluorescence vzorků buněčné linie MDA-MB-231, které byly ošetřeny léčivými (K – kontrola, DAU - daunorubicin, DOX – doxorubicin, EPI – epirubicin, IDA – idarubicin) o koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ a intenzity samotných léčiv koncentračně odpovídající $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ 38
- Obr. 33:** Elektroforetogram vzorků buněčné linie MDA-MB-231 ošetřené antracykliny s koncentrací $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$, s popisem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popisem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA).....39
- Obr. 34:** Barvivem Coomassie Brilliant Blue R obarvený elektroforetogram vzorků buněčné linie MDA-MB-231 ošetřené antracykliny s koncentrací $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$, s popisem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popisem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA).....39
- Obr. 35:** Elektroforetogram vzorků buněčné linie U-2 OS ošetřené antracykliny s koncentrací $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$, s popisem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popisem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv amrubicin (AMR), daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA)40
- Obr. 36:** Barvivem Coomassie Brilliant Blue R obarvený elektroforetogram vzorků buněčné linie U-2 OS ošetřené antracykliny s koncentrací $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$, s popisem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad

Range Protein Ladderu a s popiskem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv amrubicin (AMR), daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA)40

Obr. 37: Elektroforetogram vzorků buněčné linie MDA-MB-231 ošetřených antracykliny s popiskem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popiskem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv amrubicin (AMR), daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA).....41

Obr. 38: Elektroforetogram vzorků buněčné linie U-2 OS ošetřených antracykliny s popiskem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popiskem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv amrubicin (AMR), daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA)41

Seznam tabulek

Tab. 1: Excitační a emisní vlnové délky antracyklinových léčiv společně s literárními zdroji	7
Tab. 2: Výsledné koncentrace jednotlivých léčiv pro buněčnou linii U-2 OS stanovené na základě výsledků měření IC_{50}	24
Tab. 3: Výsledné koncentrace jednotlivých léčiv pro buněčnou linii MDA-MB-231 stanovené na základě výsledků měření IC_{50}	24
Tab. 4: Pipetované objemy léčiv, po kterých výsledné koncentrace léčiv v miskách při přípravě vzorků lyzací tekutým dusíkem pro SDS-PAGE odpovídaly výsledkům koncentrací IC_{50}	25
Tab. 5: Časy inkubací jednotlivých buněčných linií po ošetření léčivy při přípravě vzorků lyzací tekutým dusíkem pro SDS-PAGE	25
Tab. 6: Použité roztoky a jejich objemy pro přípravu separačního a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE	28
Tab. 7: Souhrn absorbancí, excitačních a emisních vlnových délek jednotlivých léčiv změřených na spektrofotometru Cary 300 uv/vis a na fluorimetru Cary eclipse, které vyobrazují obrázky č. 14–28.....	29
Tab. 8: Stanovené hodnoty IC_{50} a jejich směrodatné odchylky pro antracyklinová léčiva na buněčných liniích U-2 OS a MDA-MB-231	33
Tab. 9: Tabulka časových údajů, zjištěných fluorescenční mikroskopií, kdy byly pozorovány apoptické a morfologické změny buněk.....	36
Tab. 10: Tabulka s naměřenými intenzitami fluorescence vzorků společně s vlnovou délkou jejich maxim u buněčných linií U-2 OS a MDA-MB-231 ošetřených léčivy (AMR – amrubicin, DAU – daunorubicin, DOX – doxorubicin, EPI – epirubicin, IDA – idarubicin) o koncentraci $1\times$ a $10\times$ IC_{50} a jejich kontrol	36
Tab. 11: Intenzita fluorescence léčiv v koncentrační řadě odpovídající $1\times$ IC_{50} , $5\times$ IC_{50} , $10\times$ IC_{50} , $15\times$ IC_{50} a $50\ \mu\text{mol/l}$ u buněčné linie U-2 OS.....	37

Tab. 12: Intenzita fluorescence léčiv v koncentrační řadě odpovídající $1 \times IC_{50}$, $5 \times IC_{50}$, $10 \times IC_{50}$, $15 \times IC_{50}$ a $50 \mu\text{mol/l}$ u buněčné linie MDA-MB-231.....	37
--	----

1 Úvod

Tématem práce byly chemicko-fyzikální charakteristiky schválených léčiv a využití v identifikaci jejich molekulárních cílů. Bakalářská práce je rozdělena na část literární a část experimentální. Cílem teoretické části bylo vypracovat přehled chemicko-fyzikálních vlastností látek vyplývajících ze struktury, vypracovat přehled komerčně dostupných kovalentně se vázajících inhibitorů, mechanismů jejich účinků, publikovaných vedlejších účinků a jejich chemicko-fyzikálních vlastností. Mezi kovalentně se vázající inhibitory patří skupina léčiv náležících do antracyklinů, které jsou izolované ze *Streptomyces peucetius* a jsou známé svojí protinádorovou aktivitou od roku 1960. Řadí se mezi nejčastěji používané chemoterapeutické látky a za cíl jejich účinku se považuje především DNA v jádře buňky. Jejich schopností je interkalace mezi páry bází DNA a hlavním mechanismem je blokáce funkce jaderného enzymu topoizomerázy II. Mezi nejvýznamnější zástupce antracyklinů patří amrubicin, daunorubicin, doxorubicin, epirubicin a idarubicin. Antracyklinová léčiva mají významné spektrální vlastnosti, kterých bylo využito v experimentální části práce.

Cílem experimentální části bylo stanovit spektrální vlastnosti látek, které byly dále využity při identifikaci jejich cílů v buňce. Byla stanovena hodnota IC_{50} u vybraných antracyklinů na buněčných liniích U-2 OS a MDA-MB-231. V další části byla provedena fluorescenční mikroskopie buněk ošetřených látkami. Dále byly vytvořeny lyzáty ošetřených buněčných linií. U vzorků byla změřena koncentrace proteinů a fluorescence. Vzorky byly v poslední části práce separovány pomocí elektroforézy, na základě separace a pomocí molekulárního markeru byla stanovena jejich pravděpodobná velikost.

2 Cíle práce

- 1) Vypracování přehledu chemicko-fyzikálních vlastností látek vyplývajících ze struktury.
- 2) Vypracování přehledu komerčně dostupných kovalentně se vázajících inhibitorů, mechanismů jejich účinků, publikovaných vedlejších účinků a jejich chemicko-fyzikálních vlastností.
- 3) Stanovit spektrální vlastnosti vybraných látek a použít je pro identifikaci jejich molekulárních cílů.

3 Literární přehled

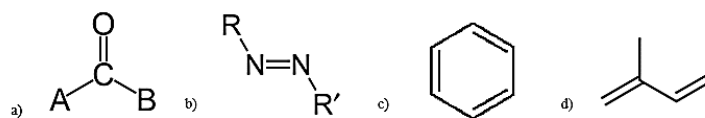
3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti látek dané jejich strukturou

Mezi chemické vlastnosti látek jsou zahrnuty například rozpustnost, pH, barevnost, toxicita, elektronegativita nebo vaznost. Mezi fyzikální vlastnosti patří elektrické, magnetické nebo spektroskopické vlastnosti látek. V textu budou dále vysvětleny chemické a fyzikální vlastnosti, které udávají optické vlastnosti látky.

Barevnost, která se řadí mezi chemické vlastnosti, je způsobena přechody elektronů mezi rozdílně energeticky bohatými elektronovými hladinami v atomech dané látky. Tyto přechody jsou spojeny s vyzářením energie v podobě fotonů. Pokud spadá vlnová délka těchto fotonů do viditelné oblasti spektra, můžeme ji vnímat jako barvu. Barevné látky většinou obsahují násobné vazby. Energetický přechod je způsoben převážně excitací π elektronů. Naopak látky obsahující výhradně jednoduché vazby jsou bezbarvé.

Významnými fyzikálními vlastnostmi jsou vlastnosti spektroskopické. Spektroskopie je založená na vzájemném působení elektromagnetického záření se zkoumanou látkou, při kterém dochází k výměně energie. Atom nebo molekula mohou záření pohltit, tento děj se nazývá absorpce. Zeslabení intenzity světla dané poměrem světla prošlého a světla dopadajícího se nazývá transmitance. Pro záporný dekadický logaritmus transmitance byla zavedena veličina absorbance. Při dané vlnové délce je podle Lambertova-Beerova zákona absorbance úměrná molární koncentraci roztoku a tloušťce absorbující vrstvy. Tento vztah tedy lze využít i při výpočtu molární koncentrace. Při průchodu světla homogenním prostředím dochází k interakci, při které elektrony atomů absorbují fotony vhodné vlnové délky a přecházejí tedy do excitovaného stavu. Dalším dějem je tedy excitace, při které dochází k přechodu energetického stavu molekuly na vyšší energetickou hladinu. Atom nebo molekula poté mohou energii uvolnit ve formě záření, což se nazývá emise. Vlnová délka vyzářeného světla je vyšší než vlnová délka světla dopadajícího na látku.

Chromofor je část molekuly (funkční skupina), která je odpovědná za absorpci záření a uděluje také molekule barvu. Mezi typické chromofory (Obr. 1) patří karbonyl, azo skupina, aromatická jádra nebo konjugované dieny.

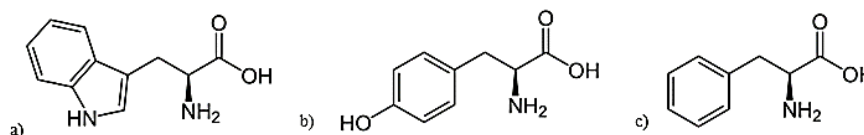


Obr. 1: Chemické struktury typických chromoforů – a) obecný vzorec karbonylové sloučeniny, b) obecný vzorec azosloučeniny, c) aromatické jádro, d) konjugovaný dien (izopren)

Luminiscence je emise světelného záření látky, které převyšuje její tepelné záření. Je to vyzařování světla látkou, aniž by byla zahřátá. Může být vyvolána různými zdroji, pokud se jedná o chemickou reakci, nazývá se děj chemiluminiscence, jestliže jde o světlo, pak fotoluminiscence. Luminiscence vyvolána světelným zářením z oblasti viditelného světla nebo pomocí ultrafialového záření se dělí na fosforescenci a fluorescenci.

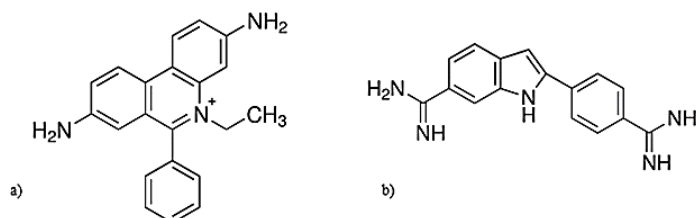
Fosforescence je charakteristická tím, že záření u ní přetrvává po určitou dobu od odstranění zdroje ozáření. Naopak k fluorescenci dochází, když emise záření z excitovaného elektronového stavu nastává jedním nebo i vícero spontánními energetickými přechody. Vyzáření světla je u fluorescence po excitaci rychlé, v řádu nanosekund. Pokud odstraníme zdroj záření, fluorescence vymizí.

Fluorochromy jsou látky, které jsou schopné po ozáření světlem určité vlnové délky světlo vyzářit zpátky. Absorpcí světla u nich dochází k excitaci elektronů a po jejich návratu do základního stavu je jejich přebytečná energie vyzářena formou světla. Jestliže vzorek sám o sobě vykazuje určitou fluorescenci, nazýváme jej jako autofluorescenční. Obsahuje tedy strukturu, která je zdrojem autofluorescence. Mezi tyto struktury patří například proteiny s aromatickými aminokyselinami (Obr. 2) tryptofanem, tyrosinem nebo fenylalaninem. Autofluorescenční jsou dále také hemoglobin, cytochromy nebo vitamín A.



Obr. 2: Chemické struktury aromatických aminokyselin: a) tryptofan, b) tyrosin, c) fenylalanin

Naopak existují nevlastní, uměle zaváděné, fluorochromy využívané například při studiu proteinů či nukleových kyselin, které se váží na cílové struktury. Do této skupiny patří například (Obr. 3) ethidium bromid nebo 4',6-diamidin-2'-fenyлиндol dihydrochlorid (DAPI).



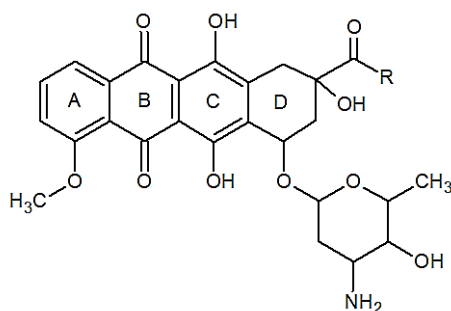
Obr. 3: a) strukturální vzorec ethidium bromidu, b) strukturální vzorec DAPI

Spektroskopické vlastnosti látek lze využít například k monitoringu distribuce látky v buňce, jako tomu je u Ramanovy spektroskopie nebo u laserové time-resolved fluorescence, nebo k pozorování interakce látky s DNA v buňce infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací, při UV-vis spektroskopii nebo při CD spektroskopii (E. Szafraniec *et al.*, 2016, V. Malatesta and A. Andreoni, 1989, S. Charak *et R. Mehrotra*, 2013, C. Ozluer *et H. E. S. Kara*, 2014). Spektroskopických vlastností se využívá také v souvislosti s neurologickými komplikacemi po kardiologické chirurgii, pro sledování cerebrální oxymetrie a umožnění přiměřené obnovy cerebrální perfúze metodou blízké infračervené spektroskopie (NIRS), která představuje nástroj k monitorování obsahu kyslíku v mozkové tkáni během kardiochirurgie (A. Nenna *et al.*, 2017). Fluorescenční diagnostika je rychlá a neinvazivní metoda pro zobrazování prekancerózních a rakovinných tkání. Mnoho aplikací této metody bylo projednáno v širokých oblastech onkologie, dermatologie, laryngologie, pulmonologie, gynekologie a gastroenterologie (A. Sieroń *et al.*, 2013). Fluorescence a chemiluminiscence byly využity také k detekci peroxynitridu, endogenně produkovaného oxidantu a nukleofilu, který má význam v procesu stárnutí (C. Prolo *et al.*, 2018). Fluorescenčních vlastností se využívá i při fluorescenční anizotropii, což je jedna z hlavních metod využívána při studiu mechanismu léčiv. Hraje důležitou roli při objevování a vývoji nových generací léčiv a diagnostických látek (H. Zhang *et al.*, 2016).

3.2 Antracykliny

Antracykliny jsou izolované ze *Streptomyces* (*Streptomyces peucetius*). Jsou známé svojí protinádorovou aktivitou od roku 1960 (R. B. Weiss, 1992). Řadí se mezi nejčastěji používané chemoterapeutické látky (P. Shaul *et al.*, 2013). Antracykliny patří mezi protinádorová léčiva s velmi širokým spektrem účinnosti v lidských nádorech, pouze několik nádorů (například rakovina tlustého střeva a konečníku) je proti nim rezistentní (R. B. Weiss, 1992). Mezi významná antracyklinová léčiva se řadí daunorubicin, doxorubicin, epirubicin a idarubicin (SÚKL, 2018).

Pro molekuly antracyklinů je charakteristická glykosidická struktura, která je tvořena planárním tetracyklickým aglykonem, krátkým postranním řetězcem s karbonylovou skupinou a glykosidicky vázaným aminocukrem, který se nazývá daunosamin (Regev *et al.*, 2005). Antracyklinová skupina (Obr. 4) sloučenin má planární antrachinonový chromofor, který může interkalovat mezi páry bází DNA. Chromofor je spojen s daunosaminovým cukerným fragmentem (D. M. Rayner *et S. M. Cutts*, 2014). Antracykliny jsou lipofilní látky, ale za fyziologického pH mají spíše amfifilní charakter a to díky kladnému náboji na primárním aminu daunosaminu (Regev *et al.*, 2005). Skupina antracyklinových léčiv má významné spektrální vlastnosti vycházející z jejich struktury (E. Szafraniec *et al.*, 2016, V. Malatesta *et A. Andreoni*, 1989, C. M. Camaggi *et al.*, 1992).



Obr. 4: Obecná struktura antracyklinů

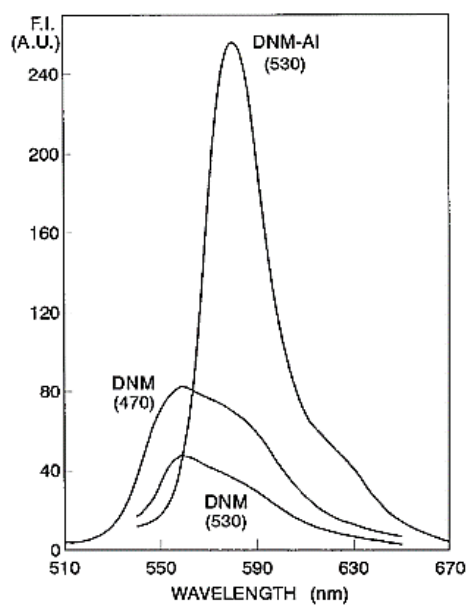
3.2.1 Spektrální vlastnosti antracyklinů

Spektrální vlastnosti antracyklinů jsou využívány k monitorování *in vitro* absorpce a distribuce léčiv v buňkách za použití například Ramanovy spektroskopie. Tato metoda je vhodná i k monitorování mechanismů interakce s buněčnými složkami na subcelulární úrovni (E. Szafraniec *et al.*, 2016). Dané vlastnosti jsou využívány také při vysokoúčinné kapalinové chromatografii, pro stanovení idarubicinu a metabolitů (idarubicinolu) v biologických tekutinách, plazmě a moči (C. M. Camaggi *et al.*, 1992). Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se používá ke stejnému účelu také u epirubicinu a epirubicinolu (W. I. Dodde *et al.*, 2003). Přímé stanovení doxorubicinu v lidské plazmě bylo provedeno také na základě měření fluorescence excitační emisní matrice a vícecestných chemometrických metod založených na analýze paralelních faktorů (M. G. Trevisan *et R. J. Poppi*, 2003). Spektroskopické vlastnosti byly také využity při studiu interakce idarubicinu s DNA při metodách infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, při UV-vis spektroskopii nebo při CD spektroskopii (S. Charak *et R. Mehrotra*, 2013). Fluorescenční vlastnosti antracyklinů lze také využít při studiu mnohočetné lékové rezistence metodou kapilární elektroforézy spojenou s fluorescencí indukovanou laserem a při metodě micelární elektrokinetické chromatografie (J. Mbuna *et T. Kaneta*, 2015).

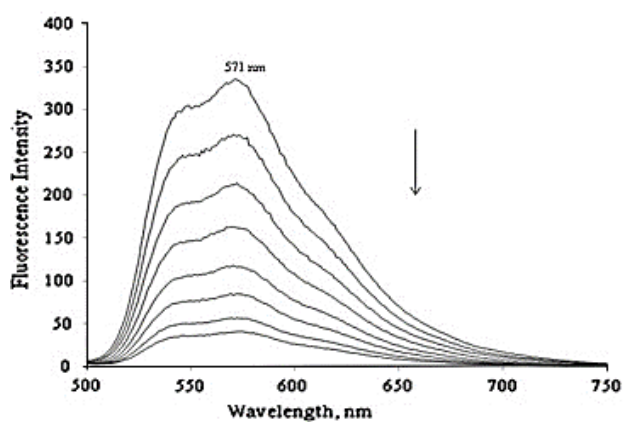
U antracyklinových léčiv byly proměřeny vlnové délky pro excitaci a emisi. Jejich hodnoty jsou shrnuty v tabulce č. 1. Excitační maximum daunorubicinu zobrazuje obrázek 5 (Obr. 5) a emisní maximum idarubicinu obrázek 6 (Obr. 6).

Tab. 1: Excitační a emisní vlnové délky antracyklinových léčiv společně s literárními zdroji

Léčivo	Excitační vlnová délka [nm]	Emisní vlnová délka [nm]	Literární zdroj
Daunorubicin	470	560	A. Juarranz <i>et al.</i> , 1999
Doxorubicin	480	560–590	J. H. de Lange <i>et al.</i> , 1992
Idarubicin	482	571	C. Ozluer <i>et H. E. S. Kara</i> , 2014
Epirubicin	474	551	W. I. Dodde <i>et al.</i> , 2003
Amrubicin	465	560	Noguchi T. <i>et al.</i> , 1998



Obr. 5: Excitační maximum (470 nm) daunorubicinu (daunomycinu – DNM) při emisní vlnové délce 560 nm (převzato z A. Juarranz *et al.*, 1999)



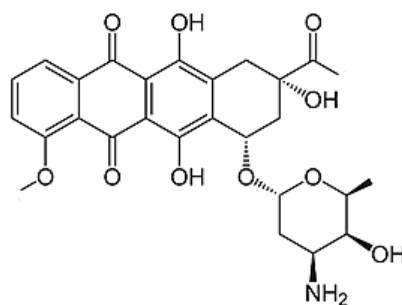
Obr. 6: Emisní maximum (571 nm) idarubicinu při excitační vlnové délce 482 nm, píky znázorňují závislost intenzity fluorescence na koncentraci navázané látky na DNA (převzato z C. Ozluer *et H. E. S. Kara*, 2014)

3.3 Mechanismus účinku antracyklinů

Za cíl účinku antracyklinů se považuje především DNA v jádře buňky. Jejich schopností je interkalace, neboli vmezezení se mezi páry bází DNA, a blokáce funkce například jaderného enzymu topoizomerázy II, což je hlavním mechanismem antracyklinů (F. Belloc *et al.*, 1992, B. K. Sinha *et P. M. Politi*, 1990). Topoizomeráza II způsobuje přechodné dvouřetězcové zlomy a přidává negativní nadšroubovicové otáčky nebo odstraňuje pozitivní nadšroubovicové otáčky. To provádí tak, že štěpí oba řetězce DNA, převede neštěpenou dvoušroubovici místem štěpení a znovu ji uzavře. Topoizomeráza II také odděluje propletené kružnicové molekuly DNA (D. P. Snustad *et M. J. Simmons*, 2009). Při interakci s buňkou antracykliny působí stabilizací reakčního meziprojektu, ve kterém jsou DNA řetězce stříhány a kovalentně vázány na tyrosinové zbytky topoizomerázy II, což případně brání DNA znovu uzavřít. Po poškození DNA zprostředkované topoizomerázou II následuje zastavení růstu v G1 a G2 fázi buněčného cyklu a následuje buněčná smrt (G. Minotti *et al.*, 2004). Antracykliny také způsobují jedno-řetězcové nebo dvou-řetězcové zlomy v DNA. Dokáží modifikovat schopnost jaderných helikáz, disociovat duplexní DNA do jednotlivých řetězců (N. R. Bachur *et al.*, 1992). Antracykliny mohou podstoupit jedno- a dvou-elektronové redukce, protože jsou členy chinonové rodiny produkující reaktivní sloučeniny, které poškozují makromolekuly a lipidové membrány (H. Mizutani *et al.*, 2005).

3.3.1 Daunorubicin

Daunorubicin (DAU, Obr. 7), také používán pod názvem daunomycin nebo rubidomycin, byl vyvinut v 60. letech minulého století (R. B. Weiss, 1992). Byl izolován z bakterie kmenu *Streptomyces* (J. Huk *et M. Blumauerova*, 1989). Daunorubicin se používá k léčbě akutní lymfatické leukémie, chronické myeloidní leukémie nebo Kaposiho sarkomu (X. Du *et al.*, 2017, H. Yan *et al.*, 2015, M. Bendle *et al.*, 2014).

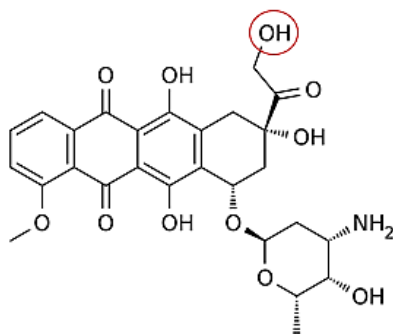


Obr. 7: Strukturální vzorec daunorubicinu

Daunorubicin se interkaluje do DNA, tím v buňkách inhibuje syntézu makromolekul - proteinů, RNA nebo DNA (M. R. Momparler *et al.*, 1976). Toto léčivo také způsobuje poškození DNA, jako je například fragmentace (G. Aubel Sadron *et al.*, 1984). Dochází k tvorbě volných radikálů, které rovněž způsobují poškození DNA nebo peroxidaci lipidů. Kovalentní vazba léčiva na DNA a alkylace DAU ovlivňuje rozvíjení jednovláknové DNA a separaci řetězců helikázovou aktivitou. Daunorubicin způsobuje poškození DNA nádorové buňky prostřednictvím inhibice topoizomerázy II (D. A. Gerwitz, 1999).

3.3.2 Doxorubicin

Doxorubicin (DOX, Obr. 8), dříve nazýván jako adriamycin, byl stejně jako daunorubicin vyvinut v 60. letech minulého století. Od DAU se liší pouze jednou hydroxylovou skupinou (v obrázku 8 je označena červeně), je to jeho 14-hydroxy derivát. Doxorubicin byl v roce 1974 v USA schválen pro léčebné účely (R. B. Weiss, 1992). Toto léčivo je používáno na celém světě při léčbě některých leukémií, rakoviny plic, prsou, žaludku, vaječníků, močového měchýře, štítné žlázy, sarkomů měkkých tkání a nebo Hodgkinovy choroby (F. M. Muggia *et M. D. Green*, 1991). I přes několikaletý výzkum antracyklinů zůstává DOX pořád jedním z nejčastěji využívaných protinádorových léčiv. Doxorubicin je do těla vpravován intravenózně či intravezikálně (SÚKL, 2018).

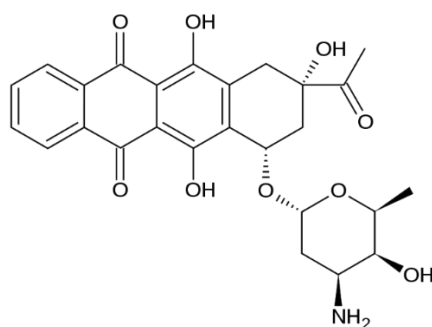


Obr. 8: Strukturní vzorec doxorubicinu s vyznačenou hydroxylovou skupinou na 14. uhlíku

Při interakci nádorové buňky s DOX vykazuje lék své cytotoxické účinky tím, že se váže a interkaluje se do její DNA (F. A. Fornari *et al.*, 1994). Stejně jako u DAU dochází k tvorbě volných radikálů, které poškozují DNA. Kovalentní vazba léčiva na DNA ovlivňuje rozvíjení DNA a její helikázovou aktivitu. Rovněž dochází k inhibici topoizomerázy II (D. A. Gerwitz, 1999). U DOX navíc dochází k inhibici topoizomerázy I (G. Minotti *et al.*, 2004).

3.3.3 Idarubicin

Idarubicin (IDA, Obr. 9), známý také pod názvem idamycin, je analogem daunorubicinu. Chemický název IDA je 4 – demethoxydaunorubicin. Idarubicin nemá silnější protinádorovou účinnost než dva dříve zmíněné antracykliny, ale existují u něj určité rozdíly v toxicitě (R. B. Weiss, 1992). Vykazuje vlastnosti, které ho činí unikátním mezi antracykliny. Vyšší lipofilnost vede k rychlejší akumulaci v jádrech, vyšší kapacitě vazby DNA a následně k vyšší cytotoxicitě ve srovnání například s DAU. Jeho výrazným pozitivem je, že se může podávat perorálně, avšak podává se i nitrožilně. Idarubicin se používá k léčbě akutních myeloidních leukémií a akutních lymfoblastických leukémií (SÚKL, 2018).

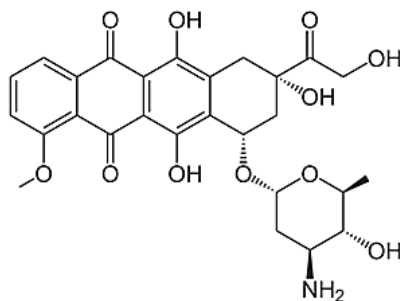


Obr. 9: Strukturální vzorec idarubicinu

Idarubicin má stejně jako ostatní antracyklinová léčiva silnou vazebnou kapacitu vůči DNA (T. Fukushima, 1993). Při interakci s nádorovou buňkou se IDA váže na hlavní drážku duplexu DNA pomocí guaninových cytosinových bází. Bylo zjištěno, že IDA se interkaluje mezi báze DNA (S. Charak *et R.* Mehrotra, 2013).

3.3.4 Epirubicin

Epirubicin (EPI, Obr. 10) má chemický název 4'-epidoxorubicin. První studie s ním byly zahájeny v roce 1980. Epirubicin byl stejně jako dříve zmíněný IDA odvozen od DOX. Na rozdíl od DOX byl u EPI zaznamenán nižší výskyt zvracení, stomatitidy, alopecie a myelosuprese (V. Bonfante *et al.*, 1980). Toto léčivo je používáno především k léčbě rakoviny prsu a žaludku. Do těla je podáván intravenózně nebo intravezikálně (SÚKL, 2018).

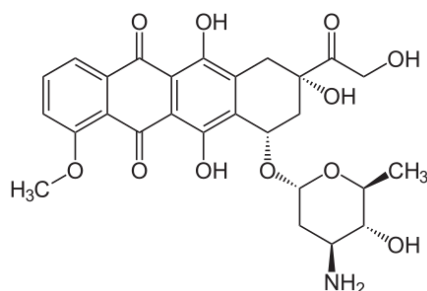


Obr. 10: Strukturální vzorec epirubicinu

Epirubicin vykazuje antimitotickou a cytotoxickou aktivitu, váže se na DNA a inhibuje její funkci a syntézu. Rovněž inhibuje syntézu proteinů. Epirubicin tvoří komplexy s DNA interkalací mezi páry bází a inhibuje aktivitu enzymu topoizomerázy II. Narušuje také replikaci a transkripci DNA tím, že inhibuje enzym DNA helikázu (F. Ganzina, 1983).

3.3.5 Amrubicin

Amrubicin (AMR, Obr. 11), také pod chemickým názvem 9-aminoantracyklin, byl první antracyklinový derivát vytvořený syntézou *de novo*. Poprvé byl publikován v roce 1989 vědci ze Sumitomo (S. Morisada *et al.*, 1989). Amrubicin se používá k léčbě malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic (Kurata *et al.*, 2007). Studie na zvířatech u AMR prokázaly, že nezpůsobuje typickou antracyklinovou kardiotoxicitu (Ettinger D. S. *et al.*, 2010).



Obr. 11: Strukturní vzorec amrubicinu

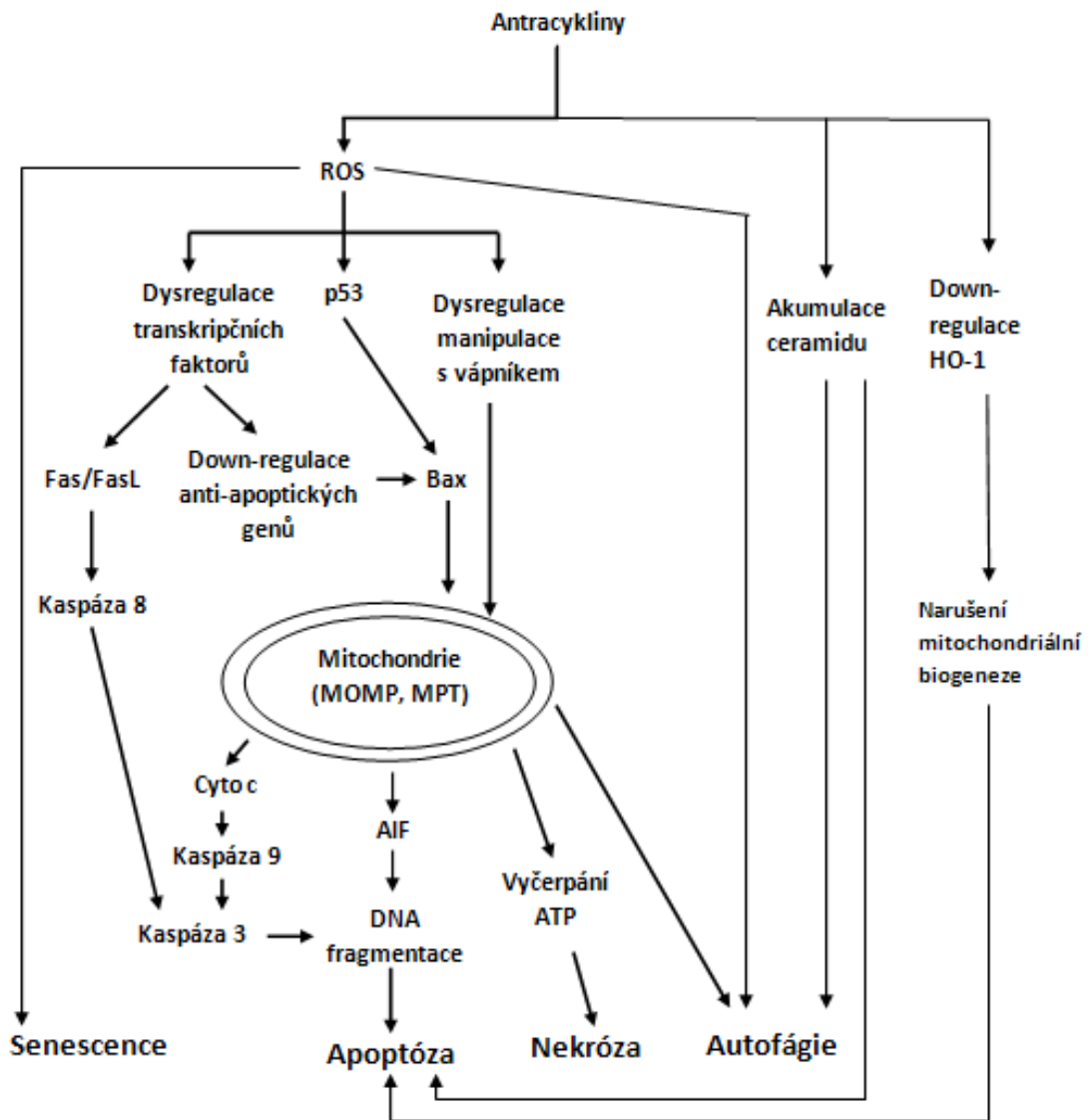
Amrubicin v buňkách inhibuje aktivitu enzymu topoizomerázy II a tvoří komplexy s DNA tím, že se interkaluje mezi páry bází. Amrubicin v buňkách indukuje dvouřetězcové zlomy DNA, čímž je způsobený inhibiční efekt růstu buněk (S. Gupta *et al.*, 2016, M. Hanada *et al.*, 1998). Od ostatních antracyklinů se odlišuje kratším eliminačním poločasem, jež je dlouhý 2 až 4 hodiny. Amrubicin je v těle redukován na sekundární metabolit, alkoholový amrubicinol, který je asi 100krát účinnější než samotný amrubicin a má zvýšenou inhibiční aktivitu topoizomerázy II (Ettinger D. S. *et al.*, 2010).

3.4 Kardiotoxicita antracyklinů

Obdobně jako i jiná cytostatika způsobují antracykliny přechodnou nauzeu, zvracení, mukozitidu a alopecii, které však nepředstavují natolik závažné komplikace v protinádorové léčbě (Chabner *et al.*, 2006).

Kardiotoxicita je hlavním limitujícím faktorem v protinádorové terapii (Singal *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 2004). Antracykliny indukovaná kardiotoxicita může existovat buď jako akutní, nebo chronická kardiomyopatie. Akutní kardiotoxicita je vzácná, vyskytuje se po podání vysoké dávky léčiva a může se objevit jako akutní tachyarytmie nebo akutní srdeční selhání. Naproti tomu chronická kardiotoxicita závisí na dávce léčiva. V takovém případě se může u pacienta po dlouhé době od poslední léčby vyvinout dilatační kardiomyopatie. V obou případech kardiotoxicity může docházet k srdeční dysfunkci, kardiomyopatii, srdečnímu selhání nebo dokonce k úmrtí (Wallace, 2003; Yeh *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2009).

Ačkoliv byla kardiotoxicita v zájmu studií po mnoha let, nedošlo se k úplnému objasnění přesného mechanismu, na kterém je kardiotoxicita vyvolaná antracykliny (doxorubicinem) založena. Většina studií upřednostňuje oxidativní stres způsobený volnými radikály, jenž hraje klíčovou roli, protože může být interpretován chemickou strukturou doxorubicinu, která má tendenci k vytváření reaktivních forem kyslíku (ROS) během metabolismu léčiva (Iarussi *et al.*, 2001; Neilan *et al.*, 2007; Wallace, 2003). Další poznatky ukazují, že endotelová oxidázová syntáza oxidu dusnatého reductázové domény přeměňuje doxorubicin na nestabilní semichinonový meziprodukt, který podporuje generaci ROS (Neilan *et al.*, 2007). Také mitochondriální DNA léze indukované ROS nebo přímo doxorubicinem vedou k selhání respiračního řetězce a uvolnění ROS (Lebrecht *et al.*, 2007). K dalšímu příspěvku ke kardiotoxicitě patří disregulace manipulace s vápníkem, andrenergická dysfunkce a selektivní inhibice genové exprese kardiomyocytů (Iarussi *et al.*, 2001; Takemura *et al.*, 2007). Většina těchto příhod přispívá k apoptóze kardiomyocytů, což je primární mechanismus kardiomyopatie. Studie *in vitro* i *in vivo*, které proběhly během několika desetiletí, naznačují, že kardiotoxicita vyvolaná doxorubicinem je spojena s apoptózou a nekrotizací kardiomyocytů (Zhang *et al.*, 2009). Potencionální signální dráhy, které se účastní smrti kardiomyocytů vyvolané antracykliny, jsou znázorněny ve schématu (Obr. 12).

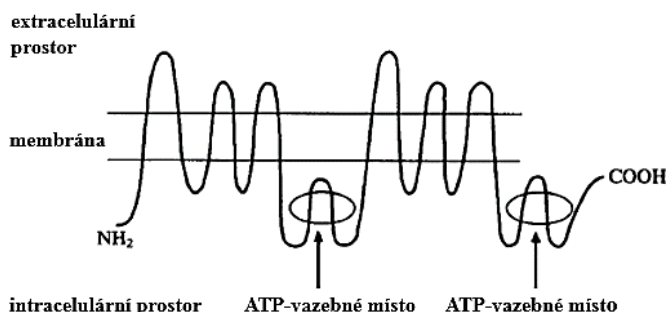


Obr. 12: Potencionální signální dráhy, které se účastní buněčné smrti kardiomyocytů vyvolané antracykliny (upraveno podle Zhang *et al.*, 2009)

3.5 Buněčná rezistence proti antracyklinům

Většina informací o buněčné rezistenci proti antracyklinům pochází z *in vitro* modelů buněk, které podlely expozici léčiva v dávce, již nemůže být dosaženo klinicky. Studie ukázaly, že mechanismů rezistence existuje mnoho a je často multifaktoriální. Mezi hlavní mechanismy rezistence patří (1) klasický MDR (mnohočetná léková rezistence) fenotyp, (2) MDR, která není zprostředkována PGP (P-glykoprotein 1), (3) změny v intracelulární distribuci léčiva, (4) zvýšený GST (glutathion S-transferáza) obsah a detoxikační mechanismy, (5) změny v topoizomeráze II a (6) zvýšená reparace DNA (Nielson *et al.*, 1996).

Klasický MDR fenotyp je dobře charakterizovaný experimentální fenomén (Gottesmann *et Pastan*, 1993, Skvosgaard *et al.*, 1994). Buňky s mnohočetnou lékovou rezistencí jsou rezistentní vůči některým léčivům (například vůči antracyklinům, vinca alkaloidům nebo epipodofylotoxinům) a jsou charakteristické sníženou akumulací léčiv a expresí transmembránového 170-kDa glykoproteinu, který se nazývá PGP. Tento protein má 12 hydrofóbních domén a obsahuje dvě ATP-vazebná místa (Obr. 13). Amplifikace nebo zvýšená transkripce genu *mdrl*, který je umístěn na chromozomu 7, má za následek zvýšenou expresi PGP. Experimenty jednoznačně ukázaly, že zvýšená exprese genu *mdrl* je dostatečná k tomu, aby způsobila MDR. Exprese PGP je zřejmě regulována na mnoha různých úrovních. Kvůli rozmanitosti environmentálních stresů a okolností, které ovlivňují buněčný stav, bylo prokázáno, že diferenciací indukuje expresi genu *mdrl*. P-glykoprotein je proto indukovatelný pomocí přírodních léčivých přípravků, tepleným šokem nebo nespecifickým stresem (Nielson *et al.*, 1996).



Obr. 13: Schéma P-glykoproteinu procházejícího membránou s vyznačenými ATP-vazebnými místy (převzato z Nielson *et al.*, 1996)

Bylo odvozeno několik MDR buněčných linií, které nevykazují nadměrnou expresi PGP. Nicméně tyto linie vykazují typickou MDR rezistenci vůči léčivům. Dále transportní studie prokázaly sníženou akumulaci a zvýšený, na energii závislý, eflux (Nielson *et al.*, 1996).

V klasické i non-PGP MDR bylo u subcelulární distribuce antracyklinů prokázáno, že přechází z typu buňky hlavně nukleárního do typu buňky převážně cytoplazmatické s větším množstvím volných léčiv obsažených v kyselých váčcích nebo vázajících se na membrány vezikul (Coley *et al.*, 1993, Shuurhuis *et al.*, 1989). Vezikulární kompartmentalizace léčiv by tedy mohla být dalším mechanismem rezistence v obou typech MDR (Nielson *et al.*, 1996).

Izoenzymy glutathion S-transferázy působí převážně přes nukleofilní thioether nebo oxidačně-redukční reakce. Byla zjištěna nadměrná exprese enzymů v několika buněčných liniích MDR, zejména v DOX-odolných liniích. I když je glutathion považován za velmi důležitý mechanismus rezistence vůči alkylačním činidlům, důkazy v roli rezistence proti antracyklinům jsou méně přesvědčivé (Tew, 1994). Tím pádem glutathionovou deplecí s buthionin sulfoximinem, blokátorem glutathionové syntézy, má ve většině PGP-pozitivních liniích se zvýšenou GST transferázou bez účinku nebo pouze částečně zvrácenou rezistenci. To naznačuje, že PGP je dominantním mechanismem v rezistenci (Nielson *et al.*, 1996).

Změny topoizomerázové aktivity léčiva lze rozdělit do dvou skupin. Kvantitativní změny, například snížení úrovně topoizomerázy II prostřednictvím downregulace transkripce a kvalitativní změny, například mutace, které mohou vést ke změně interakce lék-DNA-protein, ke změně vazby ATP, ke změnám poměrů izoenzymů nebo ke změně enzymatických funkcí posttranslační modifikace. Topoizomeráza II má fosforylovaná místa dostupná na serinových zbytcích a posttranslační modifikace fosforylovaného stavu proteinu může hrát významnou roli při regulaci (Sullivan *et Ross*, 1991, Nielson *et al.*, 1996).

Při reparaci DNA dochází nejčastěji k vystřihnutí, které je zodpovědné za mnoho typů lézí. Postupně dochází k rozpoznání léze, vystřihnutí a následné opravě podle rodičovského vlákna DNA, které zde slouží jako templát (Skvosgaard *et al.*, 1994). Poté následuje ligace. Při složitějším poškození DNA, jako jsou kupříkladu dvouvláknové

zlomy DNA, může být mezeru vyplněna postreplikacemi, které využívají informace ze sesterského duplexu (Nielson *et al.*, 1996).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V experimentech byly použity buněčné linie U-2 OS a MDA-MB-231. Obě buněčné linie byly získány od společnosti American Tissue Culture Collection. Buněčná linie U-2 OS je odvozena od osteosarkomu a buněčná linie MDA-MB-231 je odvozena od adenokarcinomu prsu. Mezi experimenty byly buňky kultivovány v kultivačních láhvích v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ atmosféře, v McCOY's médiu v případě U-2 OS a RPMI médiu v případě MDA-MB-231. Buňky byly pasážovány 2–3krát týdně ve sterilním flowboxu.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Aceton 100% (kat. č. 20001-ATO, LECH-NER)
- Acetonitril (kat. č. 271004, SIGMA ALDRICH)
- Akrylamid/Bis roztok (30%) 29:1 (kat. č. 161-0156, BIO-RAD)
- Amrubicin hydrochlorid (kat. č. HY-B0067A, MEDCHEMEXPRESS)
- Benzonáza (kat. č. 70746-3, MERCK)
- β-merkapt ethanol (kat. č. M3148, SIGMA ALDRICH)
- Bromfenolová modř (kat. č. B0126, SIGMA ALDRICH)
- Butanol (kat. č. 281549, SIGMA ALDRICH)
- Coomassie Brilliant Blue R (kat. č. B7920, SIGMA ALDRICH)
- Daunorubicin hydrochlorid (kat. č. 1164700, SIGMA ALDRICH)
- Deionizovaná voda (dH₂O)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (kat. č. APO-30016, LECH-NER)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (kat. č. D8418, SIGMA ALDRICH)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (kat. č. 71729, SIGMA ALDRICH)
- Doxorubicin hydrochlorid (kat. č. 1225703, SIGMA ALDRICH)
- Epirubicin hydrochlorid (kat. č. 1237382, SIGMA ALDRICH)
- Ethanol (kat. č. 437433T, VWR)
- Fetální bovinní sérum (FCSI) (kat. č. P110704, PAN-Biotech)

- Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) (kat. č. 20203, USB)
- Fluorid sodný (NaF) (kat. č. 450022, SIGMA ALDRICH)
- Glycerol (kat. č. G5516, SIGMA ALDRICH)
- Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (kat. č. 30388APO, LECH-NER)
- Hydroxid sodný (NaOH) (kat. č. 757527, SIGMA ALDRICH)
- Chlorid sodný (NaCl) (kat. č. A131428, MIKROCHEM)
- Chlorid draselný (KCl) (kat. č. APO-30076, SIGMA ALDRICH)
- Idarubicin (kat. č. 1335701, SIGMA ALDRICH)
- Kapalný dusík (kat. č. 7727-37-9, SIAD)
- McCOY's médium (kat. č. M8403, SIGMA ALDRICH)
- Merkaptoethanol (kat. č. M6250, SIGMA ALDRICH)
- Methanol (kat. č. 10202LP20-10000, MIKROCHEM)
- Octová kyselina (kat. č. W200611, SIGMA ALDRICH)
- Ortovanadičnan sodný (Na_3VO_4) (kat. č. S6508, SIGMA ALDRICH)
- Peroxodisíran amonný (APS) (kat. č. A3678, SIGMA ALDRICH)
- Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablety (kat. č. 05892970001, ROCHE)
- Protease Inhibitor Cocktail Tablety (kat. č. 05892791001, ROCHE)
- Pyrofosfát sodný ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (kat. č. P8010, SIGMA ALDRICH)
- RPMI médium (kat. č. R8758, SIGMA ALDRICH)
- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (kat. č. 26634, THERMOFISHER SCIENTIFIC)
- Sterilní deionizovaná voda
- Tetramethylethylendiamin (TEMED) (kat. č. 15524-010, INVITROGEN)
- Trichloroctová kyselina (kat. č. BP80, CHEMAPOL)
- Tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris) (kat. č. TRIS-RO. SIGMA ALDRICH)
- TRYPLE Tryple express (kat. č. 12604, GIBCO)

Použité roztoky

- 1,5M Tris-HCl separační gel pufr, pH=8,8 (kat. č. 161-0798, BIO-RAD)
- 0,5M Tris-HCl zaostřovací gel pufr, pH=6,8 (kat. č. 161-0799, BIO-RAD)

- 2× SDS lyzační pufr (10 ml glycerolu, 2 g SDS, 1 ml merkaptoethanolu, 0,5 mg bromfenolové modři, 20 ml H₂O, 40 µl 1 M NaOH na 1,5 ml, doplnit vodou na objem 50 ml)
- 10× Tris-glycin-SDS (10× TGS) elektrodotový pufr (kat. č. 1610772, BIO-RAD)
- 10% SDS
- 10% APS
- Fixační pufr (metanol, voda, kyselina octová v poměru 50:45:5)
- Fosfátový pufr (PBS) (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 1000 ml dH₂O)
- Mc COY's médium (Mc COY's + 50 ml 100% FCSI)
- PBS pufr s inhibitory (2,23 g Na₂P₂O₇, 183,9 mg Na₃VO₄, 210 mg NaF, 174,19 mg PMSF rozpuštěného v 1 ml 100% methanolu, 1000 ml 1× PBS, pH = 7,4)
- Promývací pufr (metanol, deionizovaná voda, 1:1)
- RPMI médium (RPMI + 50 ml 10% FCSI)
- TGS pufr (100 ml 10× TGS, 900 ml dH₂O)

Použité soupravy

- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (kat. č. 23225, THERMOFISHER SCIENTIFIC)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Použité přístroje

- Analytické váhy (SCALTECH)
- Cell Voyager CV7000 (YOKOGAWA)
- Centrifuga 5810 R (EPPENDORF)
- Centrifuga Mini Spin (EPPENDORF)
- Centrifuga 5430 (EPPENDORF)
- Echo®550 liquid handler (LABCYTE)
- Elektroforetické vybavení (BIO-RAD)
- Fluorimetr Cary eclipse (VARIAN)
- Inkubátor s CO₂ atmosférou (THERMOSCIENTIFIC)

- Inkubátor s termostatem (MAJOR SCIENCE)
- Kalibrovaný Denzitometr GS-800 (BIO-RAD)
- Laminární box HeraSafe (THERMOSCIENTIFIC)
- Laserový skener pro biomolekulární zobrazování FLA 9000 (TYPHOON)
- Magnetická míchačka MSH3 (BIOSAN)
- pH metr UltraBasic (DENVER INSTRUMENT)
- Počítadlo buněk Vi-Cell XR (BECKMAN COULTER)
- Sonikátor Sonoplus (BANDELIN)
- Spektrofotometr Cary 300 uv/vis (AGILENT)
- Spektrofotometr EnSpire Multimode Plate Reader (PERKIN ELMER)
- Světelný inverzní mikroskop Olympus IX51 (OLYMPUS)
- Termoblok Bio TDB-100 (BIOSAN)
- Třepačka Vortex Genie 2T (SCIENTIFIC INDUSTRIES)

Software

- Dotmatics
- EnSpireManager
- Image J
- Microsoft Office Excel
- Operační program fluorimetru Cary eclipse
- Quantity One
- Operační program skeneru Typhoon FLA 9000

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Měření spektrálních vlastností léčiv

Jednotlivá léčiva byla rozpuštěna v DMSO na požadovanou koncentraci 10 mmol/l. Poté byla léčiva proměřena na spektrofotometru Cary 300 uv/vis a na fluorimetru Cary eclipse. Do kyvety bylo vždy napipetováno 10 μ l 10 mmol/l léčiva s výjimkou amrubicinu, kterého se do kyvety kvůli slabému signálu pipetovalo 30 μ l. K léčivu se přidaly 3 ml vody. Jako slepý vzorek byl použit roztok 10 μ l DMSO a 3 ml vody. Data ze spektrofotometru byla převedena do Microsoft Office Excel a byly

vytvořeny grafy. Grafy z fluorimetru byly staženy a jsou vyobrazeny s grafy z Excelu ve výsledcích.

4.4.2 Stanovení inhibiční konstanty IC₅₀ pomocí MTS testu

Tento test je založen na principu přeměny 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium (MTS) na ve vodě rozpustný formazan, ke které dochází pomocí mitochondriálních dehydrogenáz v metabolicky aktivních buňkách při teplotě 37 °C. Formazan se kvantifikuje pomocí spektrofotometrie a má maximální absorpenci při 490 nm. Množství přeměněného formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk, které jsou přítomny ve vzorku (A. H. Cory *et al.*, 1991).

Pro testování byly připraveny buňky o koncentraci $2,7 \times 10^4$ /ml (buněčná linie U-2 OS) a $1,3 \times 10^5$ /ml (buněčná linie MDA-MB-231) a byly napipetovány na 384jamkový panel. Panely byly na 24 hodin uloženy v inkubátoru při 37 °C, 95% vlhkosti a 5% obsahu oxidu uhličitého. Po inkubaci byly k buňkám přidány testované látky o koncentraci 10–0,001 mmol/l a panel byl opět inkubován, tentokrát 72 hodin. Po inkubaci byl ke vzorkům přidán 1 µl MTS (8,5 mmol/l) a destičky byly 90 minut inkubovány. Poté byla na přístroji EnVision Multimode Plate Reader změřena absorbance při vlnové délce 490 nm. Výsledky byly následně vyhodnoceny v programu Dotmatics.

4.4.3 Fluorescenční mikroskopie

Buňky byly vysazeny na 384jamkový panel pro zobrazení fluorescence živých buněk. Na jamku bylo vysazeno 2500 buněk v objemu 30 µl. Panel se nechal inkubovat 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂ atmosféře. Následně byly buňky ošetřeny objemy látek, které odpovídaly daným koncentracím stanoveným na základě výsledku měření hodnoty IC₅₀, (Tab. 2 a 3). Léciva byla přenesena přístrojem Echo®550 liquid handler. Po ošetření buněk byla destička uložena do inkubátoru přístroje Cell Voyager CV7000, který slouží k zobrazování živých buněk. Živé buňky byly monitorovány 6 hodin 60× objektivem s vodní imerzí. Snímky byly následně upraveny pomocí Image J programu.

Tab. 2: Výsledné koncentrace jednotlivých léčiv pro buněčnou linii U-2 OS stanovené na základě výsledků měření IC₅₀

Léčivo	c ₁ [μmol/l]	c ₂ [μmol/l]	c ₃ [μmol/l]	c ₄ [μmol/l]	c ₅ [μmol/l]
Amrubicin	50				
Daunorubicin	0,83	3,65	7,47	11,78	50
Doxorubicin	4,15	22,41	44,82	50	
Epirubicin	2,49	12,45	24,07	36,52	50
Idarubicin	0,83	1,66	3,65	4,15	50

Tab. 3: Výsledné koncentrace jednotlivých léčiv pro buněčnou linii MDA-MB-231 stanovené na základě výsledků měření IC₅₀

Léčivo	c ₁ [μmol/l]	c ₂ [μmol/l]	c ₃ [μmol/l]	c ₄ [μmol/l]	c ₅ [μmol/l]
Amrubicin	41,5	50	-	-	-
Daunorubicin	0,83	0,83	1,66	3,65	50
Doxorubicin	1,66	5,81	11,62	16,6	50
Epirubicin	0,83	3,65	7,47	11,78	50
Idarubicin	0,83	0,83	1,66	2,49	50

4.4.4 Příprava vzorků pro SDS-PAGE lyzací buněk tekutým dusíkem

Na kulturační misky byly nasazeny 3 milióny buněk v celkovém objemu 10 ml. Misky byly uloženy na 24 hodin do inkubátoru, kde došlo k jejich naadherování. Po 24 hodinách byly buňky ošetřeny léčivem tak, aby výsledná koncentrace léčiva v misce odpovídala výsledkům IC₅₀ jednotlivých léčiv (Tab. 4). Misky byly po ošetření uloženy opět do inkubátoru na 60–180 minut v závislosti na čase jejich apoptózy, který byl zjištěn fluorescenční mikroskopií (Tab. 5).

Tab. 4: Pipetované objemy léčiv, po kterých výsledné koncentrace léčiv v miskách při přípravě vzorků lyzací tekutým dusíkem pro SDS-PAGE odpovídaly výsledkům koncentrací IC₅₀

Léčivo	Objem látky k ošetření buněčné linie U-2 OS [μl]		Objem látky k ošetření buněčné linie MDA-MB-231 [μl]	
	1 × IC ₅₀	10 × IC ₅₀	1 × IC ₅₀	10 × IC ₅₀
Amrubicin	41,35	-	-	-
Daunorubicin	0,19	1,9	0,71	7,1
Doxorubicin	1,12	11,2	4,51	45,1
Epirubicin	0,73	7,3	2,43	24,3
Idarubicin	0,14	1,4	0,29	2,9

Tab. 5: Časy inkubací jednotlivých buněčných linií po ošetření léčivy při přípravě vzorků lyzací tekutým dusíkem pro SDS-PAGE

	Čas inkubace u buněčné linie U-2 OS	Čas inkubace u buněčné linie MDA-MB-231
1 × IC₅₀	3 hodiny	3 hodiny
10 × IC₅₀	90 minut	60 minut

Po inkubaci bylo odpipetováno z misek médium, buňky ze dna misek byly uvolněny roztokem TRYPLE, poté se k uvolněným buňkám přidalo původní médium. Buněčná suspenze se nechala 5 minut centrifugovat při 450 g. Poté byly buňky propláchnuty 10 ml ledového PBS pufru a po centrifugaci byly resuspendovány do 1,2 ml ledového PBS pufru s inhibitory. Objem byl přenesen do mikrozkuhavek. Buňky v mikrozkuhavekách byly 7 minut centrifugovány při 450 g a 4 °C. Poté byl odebrán supernatant tak, aby ho nad peletou zůstalo 20 μl. Obsah mikrozkuhavek byl zamrazen

tekutým dusíkem a následně rozmrazen při 25 °C. Zamrazení a rozmrazení se poté provedlo ještě dvakrát, mezi tím byly vzorky vždy protřepány na třepačce. Dále byly vzorky přeneseny na led, kde byly uchovávány po dobu sonifikace. Sonifikace probíhala po dobu 2 minut, 25% amplitudě a pulzem o intervalu 0,5 s. Poté byla u vzorků změřena koncentrace proteinů BCA metodou a změřena fluorescence. Takto charakterizované vzorky byly použity pro SDS-PAGE.

4.4.5 Měření koncentrace proteinů ve vzorcích

K měření koncentrace proteinů ve vzorcích byl použit Pierce™ BCA Protein Assay Kit, což je dvousložkové, vysoce přesné detergentně kompatibilní testovací činidlo určené k měření celkové koncentrace proteinů při vlnové délce 562 nm ve srovnání s proteinovým standardem. Principem testu je redukce Cu^{2+} na Cu^{1+} proteinem v alkalickém prostředí s vysoce citlivou a selektivní kolorimetrickou detekcí měďnatého kationtu kyselinou bicinchoninovou.

Na 96jamkový panel bylo napipetováno ve dvou opakováních 25 μl vody jako slepého vzorku, 25 μl standardních roztoků (1–7), 25 μl PBS pufru s inhibitory a 1 μl jednotlivých vzorků, ke kterým bylo vždy přidáno 24 μl PBS pufru s inhibitory. Poté bylo do každé jamky přidáno 200 μl reakční směsi, která byla naředěna ze dvou roztoků sady (Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A a B) v poměru 50:1. Poté byl panel uložen na 30 minut do inkubátoru s termostatem, kde byla nastavena teplota 37 °C. Po uplynutí byla na spektrofotometru změřena absorbance panelu při 562 nm.

Z naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační křivka standardů proteinů. Do rovnice kalibrační křivky byly za hodnotu y dosazeny hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků. Po dosazení hodnoty do rovnice a po provedení přepočtu vyšla koncentrace proteinů v daném vzorku. Vzorky byly dále naředěny tak, aby bylo na gel napipetováno 10 μg proteinů.

4.4.6 Měření fluorescence vzorků připravených lyzací tekutým dusíkem

Na 384jamkový panel bylo napipetováno 15 μl jednotlivých vzorků a byla změřena jejich fluorescence na spektrofotometru EnSpire Multimode Plate Reader. Na stejný panel byly napipetovány pomocí přístroje Echo®550 liquid handler léčiva v koncentrační řadě odpovídající $1 \times \text{IC}_{50}$, $5 \times \text{IC}_{50}$, $10 \times \text{IC}_{50}$, $15 \times \text{IC}_{50}$ a 50 $\mu\text{mol/l}$ a byla u nich také změřena fluorescence. Výsledky byly zpracovány v programu MicrosoftOffice Excel.

4.4.7 Příprava vzorků pro SDS-PAGE lyzací 2×SDS lyzačním pufrem

Na kultivační misky byly nasazeny 2 milióny buněk a objem na miskách byl doplněn na 10 ml. Misky byly na 24 hodin uloženy v inkubátoru, aby opět došlo k naadherování buněk k povrchu misky. Po 24 hodinách bylo z misek odpipetováno 5 ml média. Poté byly buňky ošetřeny jednotlivými léčivy. Do každé misky bylo přidáno 25 μ l 10 mmol/l léčiva. Výsledná koncentrace léčiva v misce se tedy rovnala 50 μ mol/l. Misky byly po ošetření uloženy na 3 hodiny do inkubátoru.

Po 3 hodinách inkubace byly misky vytaženy z inkubátoru. Bylo odpipetované médium s léčivem. Buňky byly dvakrát promyté PBS pufrem s inhibitory a dvakrát samostatným PBS pufrem. Dále byl v poměru 1:2 naředěn 2×SDS lyzační pufr s PBS pufrem s inhibitory a byly přidány Phosphatase Inhibitor Cocktail tablety a Protease Inhibitor Cocktail tablety. Objem 300 μ l tohoto roztoku byl přidán do každé misky s ošetřenými buňkami. Po zlyzování buněk byl jejich obsah přenesen do mikrozkušavek. Mikrozkušavky se povařily 10 minut při 95 °C na termoblotu. Poté se nechaly mikrozkušavky se vzorky vychladnout. Po vychladnutí byly do všech mikrozkušavek napipetovány 2 μ l benzonázy. Mikrozkušavky se vzorky se nechaly 1 hodinu při pokojové teplotě. Takové vzorky byly připraveny pro další postupy a byly zamrazeny.

4.4.8 SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného)

Elektroforéza je biochemická metoda, při které ionty migrují v elektrickém poli. Je používána pro separaci molekul (proteinů, DNA nebo RNA). Elektroforéza probíhá na polyakrylamidovém gelu. Polyakrylamidový gel vzniká polymerizací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu. Polymerizace je vyvolána volnými radikály vznikajícími při chemickém rozkladu persíranu amonného (APS). Do roztoku je přidáván také N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), což je stabilizátor volných radikálů. Dodecylsírán sodný (SDS), který je do roztoku rovněž přidáván, maskuje skutečný náboj proteinu. Proteiny mají záporný náboj přímo úměrný jejich velikosti a mají také podobný tvar. Proteiny se v průběhu SDS-PAGE rozdělí na základě své molekulové hmotnosti, přičemž menší, lehčí proteiny doputují dále než proteiny větší, těžší, které se nachází blíže k počátku.

Vzorky připravené podle předchozích postupů se nechaly rozmrazit. Mezitím byla připravena elektroforetická aparatura a byly připraveny 1,5 mm polykarylamidové gely podle tab. 6. Mezi elektroforetická skla byl nejprve nalit separační gel, který byl převrstven tenkou vrstvou butanolu vytřepaného s vodou. Gel se nechal ztuhnout, po ztuhnutí byl připraven zaostřovací gel. Butanol byl vypláchnut vodou a zaostřovací gel byl napipetován na separační, do kterého byl zanořen hřebínek. Gel se opět nechal ztuhnout. Ztuhlý gel mezi skly byl přemístěn do aparatury pro elektroforézu. Byl nalit 1x TGS pufr a na gel byly naneseny vzorky a standard. Elektroforéza byla spuštěna a na zdroji stejnosměrného proudu byla nastavena hodnota 110 V. Jakmile vzorky doputovaly na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu, byla hodnota napětí nastavena na 130 V. Jakmile bromfenolová modř dorazila ke spodnímu okraji gelu, byla elektroforéza ukončena. Skla byla vyjmuta z vany, odtlačena od sebe a gel byl přenesen do fixačního pufru. Následně byly gely skenovány na laserovém skeneru pro biomolekulární zobrazování FLA 9000. Poté byly gely obarveny barvivem Coomassie Brilliant Blue R, po obarvení byly promyty promývacím pufrům a skenovány na kalibrovaném denzitometru GS-800.

Tab. 6: Použité roztoky a jejich objemy pro přípravu separačního a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE

Roztok	Separací gel (12%) [μl]	Zaostřovací gel [μl]
30% akrylamid / 0,8% bis-akrylamid	3000	412,5
1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8)	1875	-
1 M Tris-HCl (pH = 6,8)	-	312,5
10% SDS	75	25
10% APS	75	25
Deionizovaná voda	2475	1750
TEMED	3	5

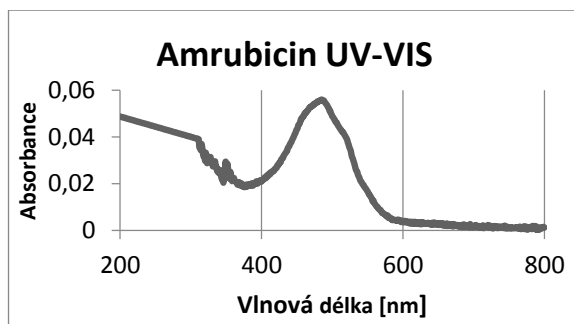
5 Výsledky

5.1 Naměřené spektrální vlastnosti vybraných léčiv

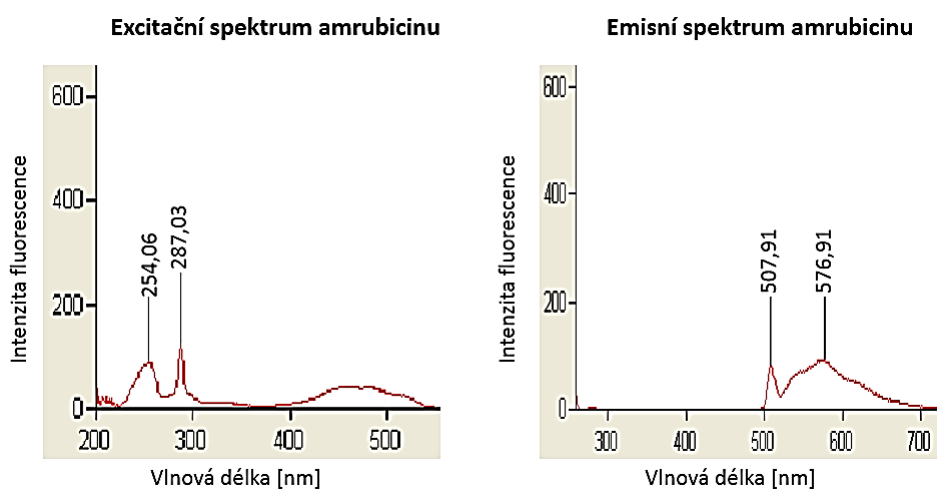
Dle popisu metodiky byla získána a vyhodnocena data, která určují absorbanci, excitační a emisní vlnové délky jednotlivých léčiv. Nejdříve byla změřena na spektrofotometru Cary 300 uv/vis absorbance jednotlivých látek. Absorbance pro amrubicin je rovna 485 nm, pro daunorubicin 474 nm, pro doxorubicin 475 nm, pro epirubicin 482 nm a pro idarubicin 488 nm. Na základě výsledků absorbance se změřila emisní spektra látek na fluorimetru Cary eclipse. Emisní maximum u amrubicinu se rovnalo 507 nm a 576 nm, u daunorubicinu 593 nm, u doxorubicinu 595 nm, u epirubicinu 592 nm a u idarubicinu 571 nm. Poté se na základě těchto výsledků zpětně proměřila spektra excitační. Excitační maximum se u amrubicinu rovnalo 254 nm, 287 nm a 458 nm, u daunorubicinu 254 nm a 498 nm, u doxorubicinu rovněž 498 nm, u epirubicinu 235 a 493 nm a u idarubicinu bylo rovno 255 nm a 488 nm. Výsledky jsou ukázány v obrázcích č. 14–28 a shrnuty v tab. 7. Grafy byly vytvořeny v programu MicrosoftOffice Excel a v programu fluorimetru Cary eclipse.

Tab. 7: Souhrn absorbancí, excitačních a emisních vlnových délek jednotlivých léčiv změřených na spektrofotometru Cary 300 uv/vis a na fluorimetru Cary eclipse, které vyobrazují obrázky č. 14–28

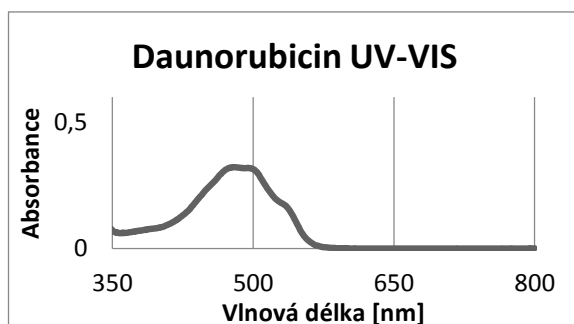
Léčivo	Absorbance [nm]	Excitační vlnová délka [nm]	Emisní vlnová délka [nm]
Amrubicin	485	254, 287, 458	507, 576
Daunorubicin	474	254, 498	593
Doxorubicin	475	498	595
Epirubicin	482	235, 493	592
Idarubicin	488	255, 488	571



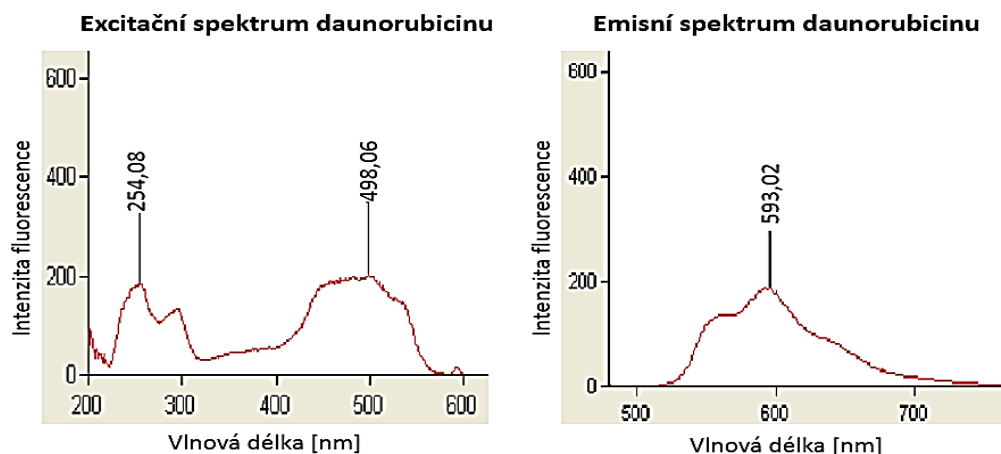
Obr. 14: UV-VIS absorpční spektrum amrubicinu s maximem intenzity při 485 nm, graf zobrazuje závislost absorbance amrubicinu na vlnové délce



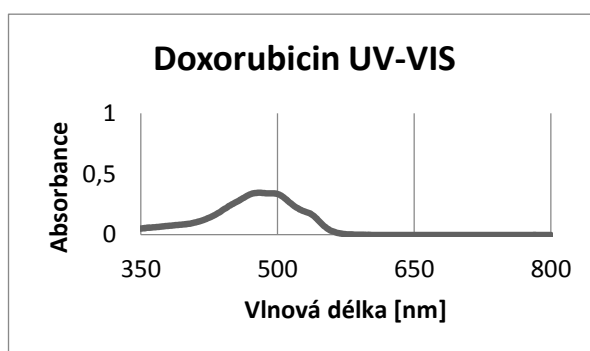
Obr. 15 a 16: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra amrubicinu s maximy excitace 254 nm, 287 nm, 458 nm a emise při 507 nm a 576 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence amrubicinu na vlnové délce



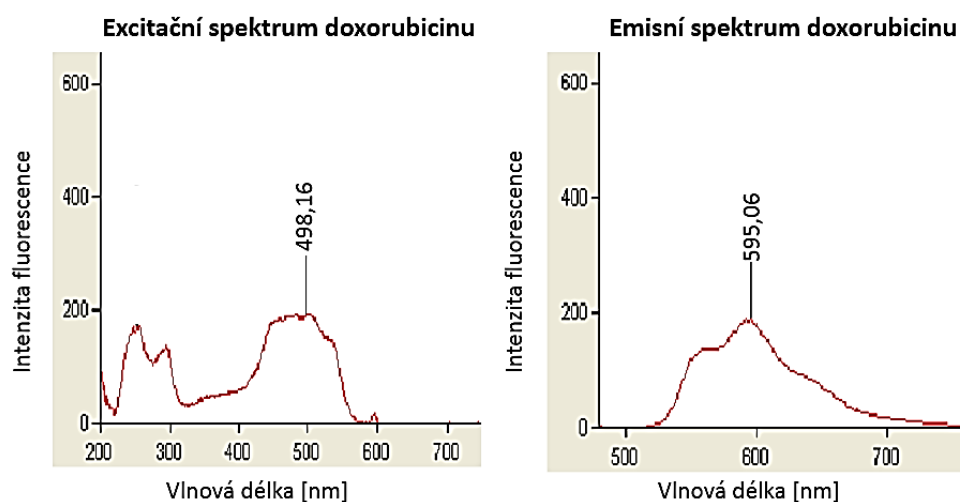
Obr. 17: UV-VIS absorpční spektrum daunorubicinu s maximem intenzity při 474 nm, graf zobrazuje závislost absorbance daunorubicinu na vlnové délce



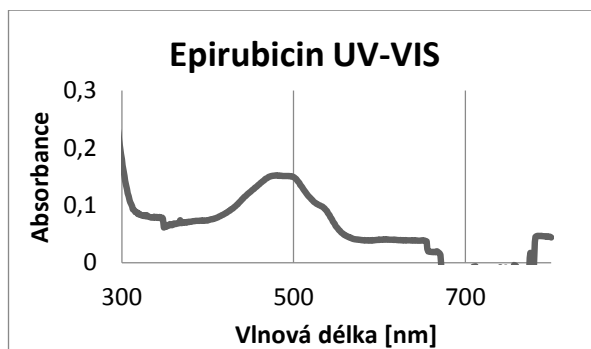
Obr. 18 a 19: Excitacionní (vlevo) a emisní (vpravo) spektra daunorubicinu s maximy excitace při 254 nm 498 nm a emise při 593 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence daunorubicinu na vlnové délce



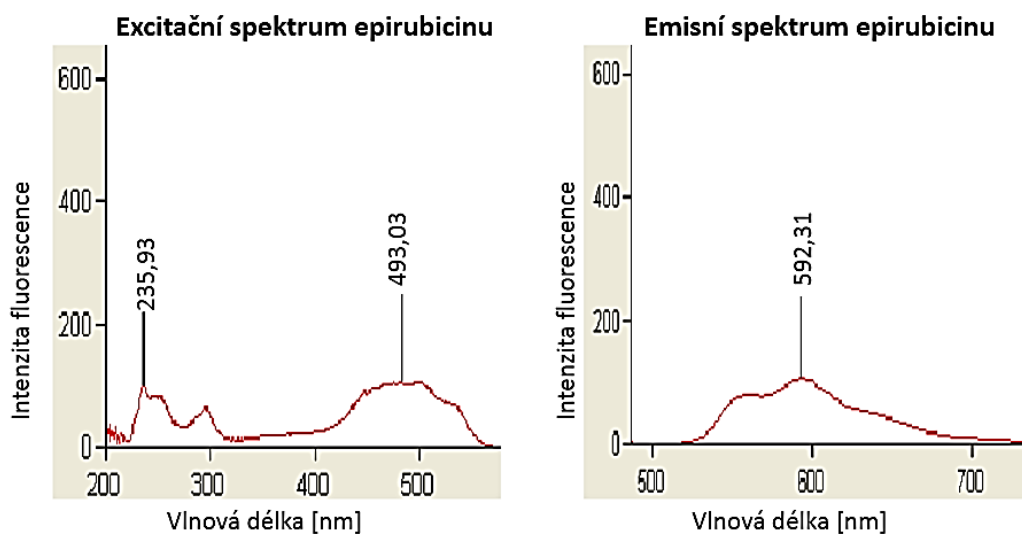
Obr. 20: UV-VIS absorpční spektrum doxorubicinu s maximem intenzity při 475 nm, graf zobrazuje závislost absorpce doxorubicinu na vlnové délce



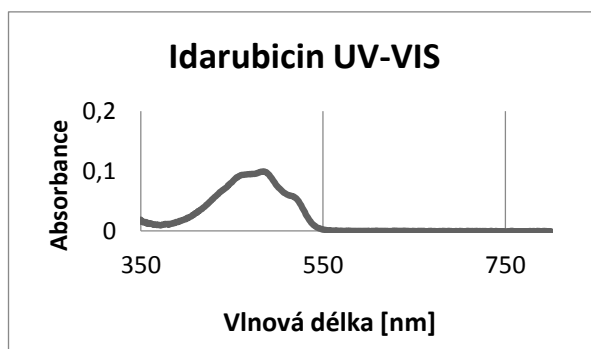
Obr. 21 a 22: Excitacionní (vlevo) a emisní (vpravo) spektra doxorubicinu s maximy excitace při 498 nm a emise při 595 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence doxorubicinu na vlnové délce



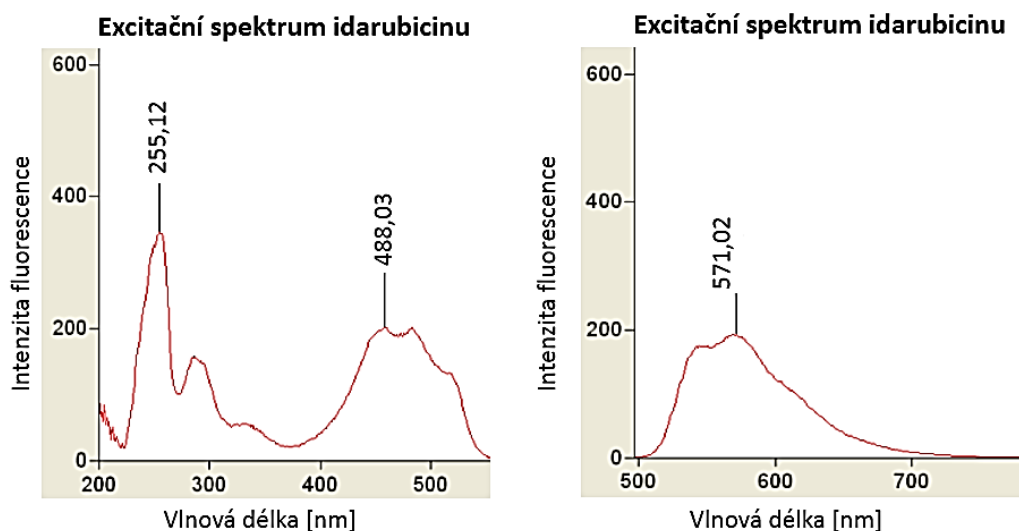
Obr. 23: UV-VIS absorpční spektrum epirubicinu s maximem intenzity při 482 nm, graf zobrazuje závislost absorbance epirubicinu na vlnové délce



Obr. 24 a 25: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra epirubicinu s maximy excitace při 235 nm a 493 nm a emise při 592 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence epirubicinu na vlnové délce



Obr. 26: UV-VIS absorpční spektrum idarubicinu s maximem intenzity při 488 nm, graf zobrazuje závislost absorbance idarubicinu na vlnové délce



Obr. 27 a 28: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra idarubicinu s maximy excitace při 255 nm a 488 nm a emise při 571 nm, graf zobrazuje závislost intenzity fluorescence idarubicinu na vlnové délce

5.2 Stanovená hodnota IC_{50} pomocí MTS testu u vybraných léčiv

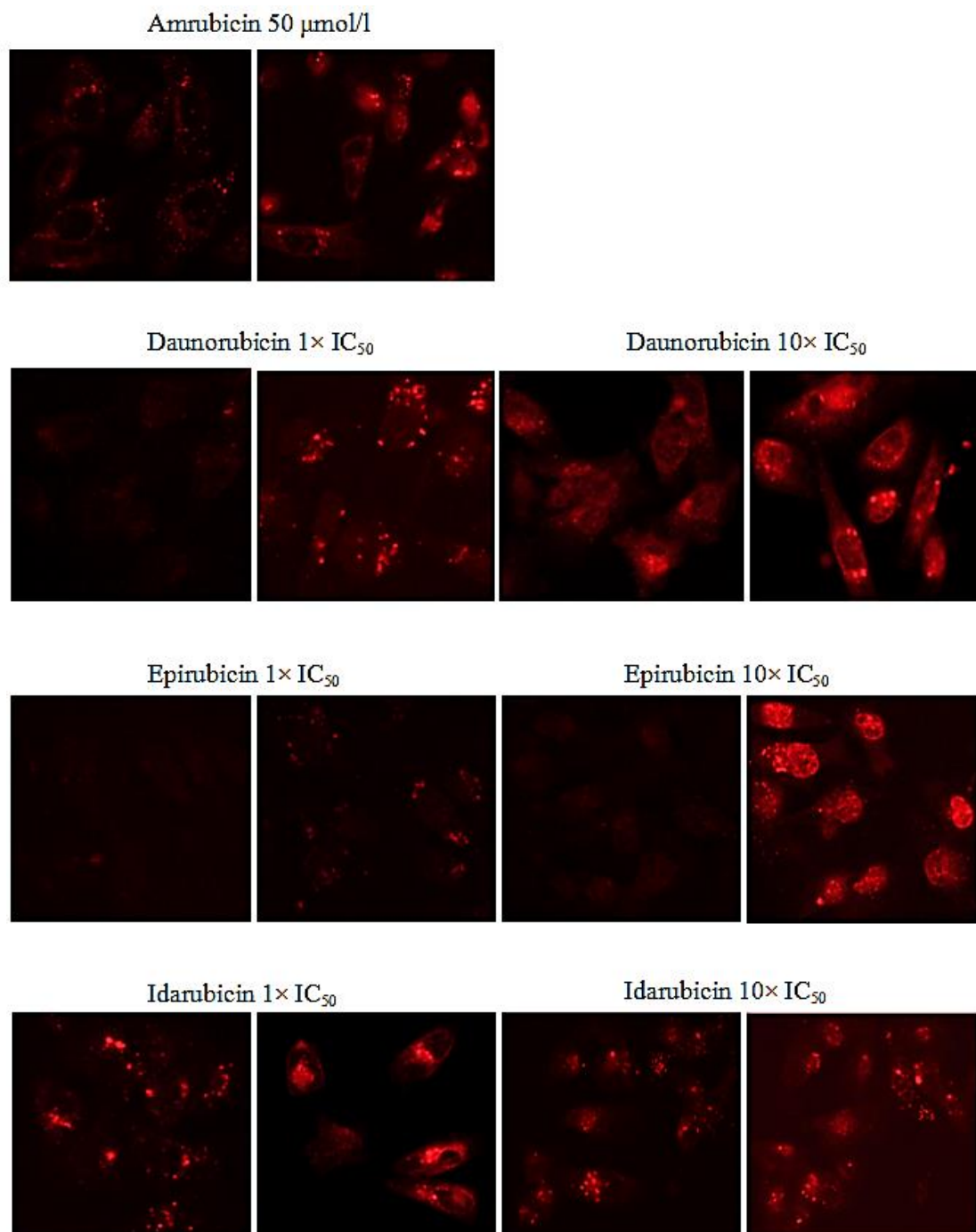
Byla stanovena hodnota IC_{50} , střední inhibiční koncentrace, která udává koncentraci látky, která vyvolá 50 % maximálního buněčného poškození nebo apoptózu. Měření proběhlo na buněčných liniích U-2 OS a MDA-MB-231. Testovala se léčiva amrubicin, daunorubicin, doxorubicin, epirubicin a idarubicin. Testování proběhlo na třech technických a na třech biologických replikátech za pomoci Ing. Soni Gurské, Ph.D., stejně tak výsledky, které byly zprůměrovány, a byla stanovena směrodatná odchylka. Vyhodnocení IC_{50} proběhlo v programu Dotmatics.

Tab. 8: Stanovené hodnoty IC_{50} a jejich směrodatné odchylky pro antracyklinová léčiva na buněčných liniích U-2 OS a MDA-MB-231

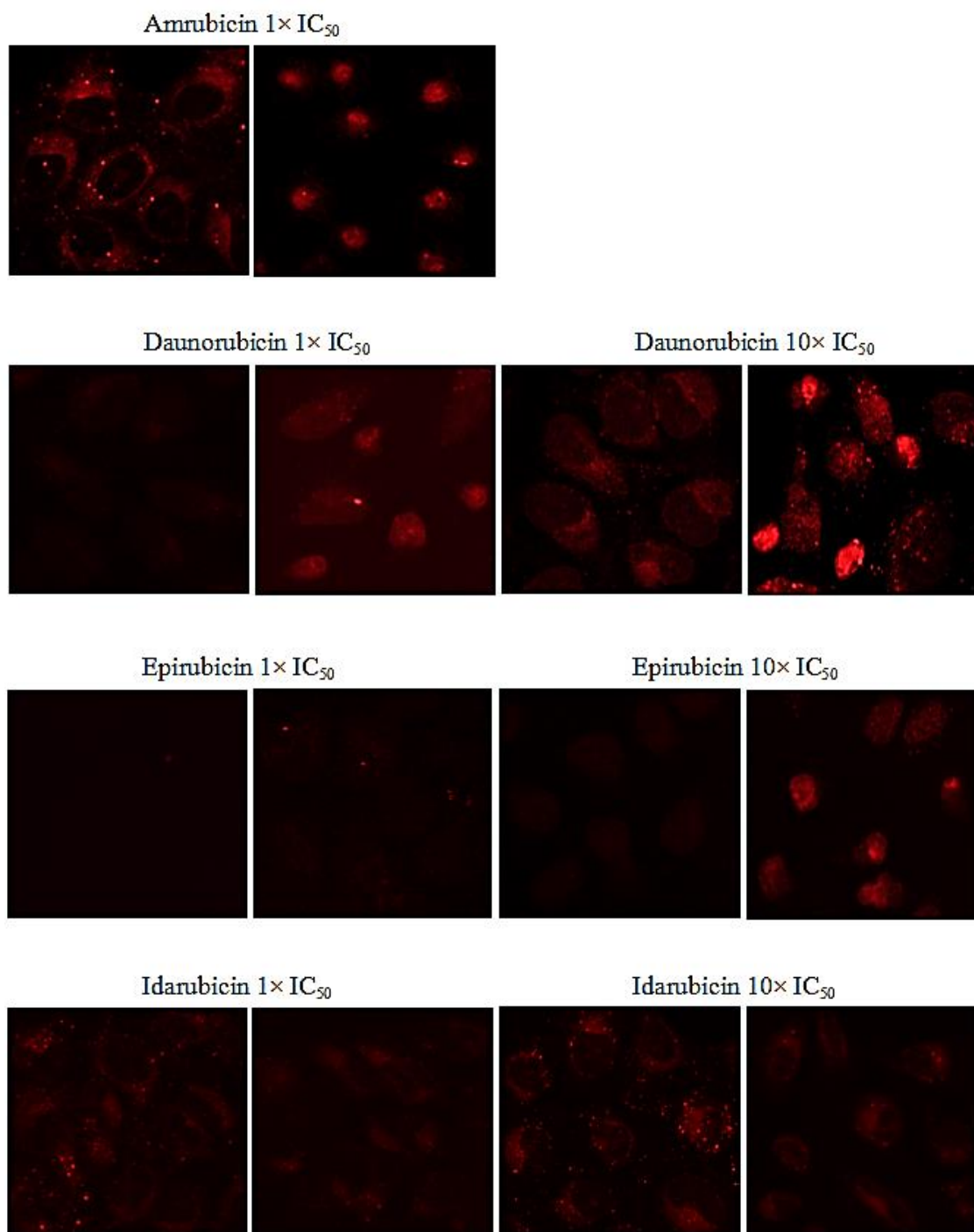
Léčivo	IC_{50} buněčné linie U-2 OS [$\mu\text{mol/l}$]	Směrodatná odchylka měření	IC_{50} buněčné linie MDA-MB-231 [$\mu\text{mol/l}$]	Směrodatná odchylka měření
Amrubicin	41,35	3,82	> 50	0
Daunorubicin	0,19	0,03	0,71	0,19
Doxorubicin	1,12	0,03	4,51	0,39
Epirubicin	0,73	0,1	2,43	0,42
Idarubicin	0,14	0,07	0,29	0,02

5.3 Výsledky fluorescenční mikroskopie

Buňky po ošetření léčivou byly monitorovány 6 hodin 60× objektivem s vodní imerzí v mikroskopu Cell Voyager CV7000, snímky byly následně upraveny pomocí Image J programu. Snímky jsou sjednoceny do kumulativních obrázků (obr. 29 a 30).



Obr. 29: Buněčná linie MDA-MB- 231 ošetřená léčivou v koncentracích 1× IC₅₀ a 10× IC₅₀ monitorována 6 hodin, fotografie z prvního a třetího sloupce byly pořízeny na počátku monitorování, fotografie ve druhém sloupci po 3 hodinách a fotografie ve čtvrtém sloupci po 1 hodině, doxorubicin nebyl detekován



Obr. 30: Buněčná linie U-2 OS ošetřená léčivými v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ monitorována 6 hodin, fotografie z prvního a třetího sloupce byly pořízeny na počátku monitorování, fotografie ve druhém sloupci po 3 hodinách a fotografie ve čtvrtém sloupci po 1 hodině, doxorubicin nebyl detekován

Z fotografií byl odečten časový úsek, kdy se 50 % pozorovaných buněk nacházelo v apoptóze. Časové údaje byly shrnuty do tabulky (Tab. 9). Dále byly použity pro inkubační dobu po ošetření buněk.

Tab. 9: Tabulka časových údajů, zjištěných fluorescenční mikroskopií, kdy byly pozorovány apoptické a morfologické změny buněk

	Čas u buněčné linie U-2 OS	Čas u buněčné linie MDA-MB-231
$1 \times IC_{50}$	3 hodiny	3 hodiny
$10 \times IC_{50}$	90 minut	60 minut

5.4 Výsledky měření fluorescence vzorků lyzovaných tekutým dusíkem

Byla změřena fluorescence vzorků lyzovaných tekutým dusíkem a léčiv v koncentrační řadě odpovídající $1 \times IC_{50}$, $5 \times IC_{50}$, $10 \times IC_{50}$, $15 \times IC_{50}$ a $50 \mu\text{mol/l}$ na spektrofotometru EnSpire Multimode Plate Reader. Výsledky (Tab. 10–12) byly zpracovány v programu MicrosoftOffice Excel. Na obrázcích č. 31 a 32 jsou grafy, které ve sloupcích zobrazují naměřené hodnoty vzorků buněčných linií U-2 OS a MDA-MB-231 ošetřené koncentracemi léčiv odpovídající $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ a dále naměřené hodnoty intenzity fluorescence samotných léčiv o koncentracích odpovídajících $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$.

Tab. 10: Tabulka s naměřenými intenzitami fluorescence vzorků společně s vlnovou délkou jejich maxim u buněčných linií U-2 OS a MDA-MB-231 ošetřených léčivy (AMR – amrubicin, DAU – daunorubicin, DOX – doxorubicin, EPI – epirubicin, IDA – idarubicin) o koncentraci $1 \times$ a $10 \times IC_{50}$ a jejich kontrol

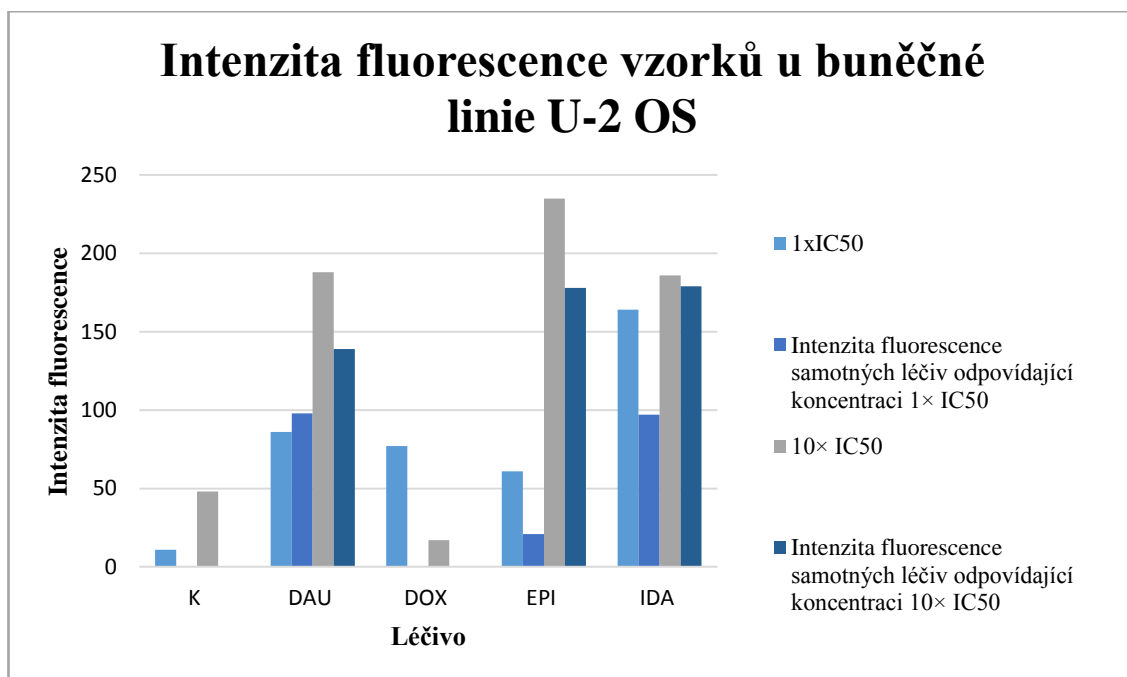
Vzorek	Maximum intenzity fluorescence u U-2 OS	Maximum intenzity fluorescence u MDA-MB-231
K 10	48	77
AMR 10	3646	-
DAU 10	188	1754
DOX 10	17	1418
EPI 10	235	733
IDA 10	186	839
K 1	11	81
DAU 1	86	882
DOX 1	77	365
EPI 1	61	418
IDA 1	164	332

Tab. 11: Intenzita fluorescence léčiv v koncentrační řadě odpovídající $1 \times IC_{50}$, $5 \times IC_{50}$, $10 \times IC_{50}$, $15 \times IC_{50}$ a $50 \mu\text{mol/l}$ u buněčné linie U-2 OS

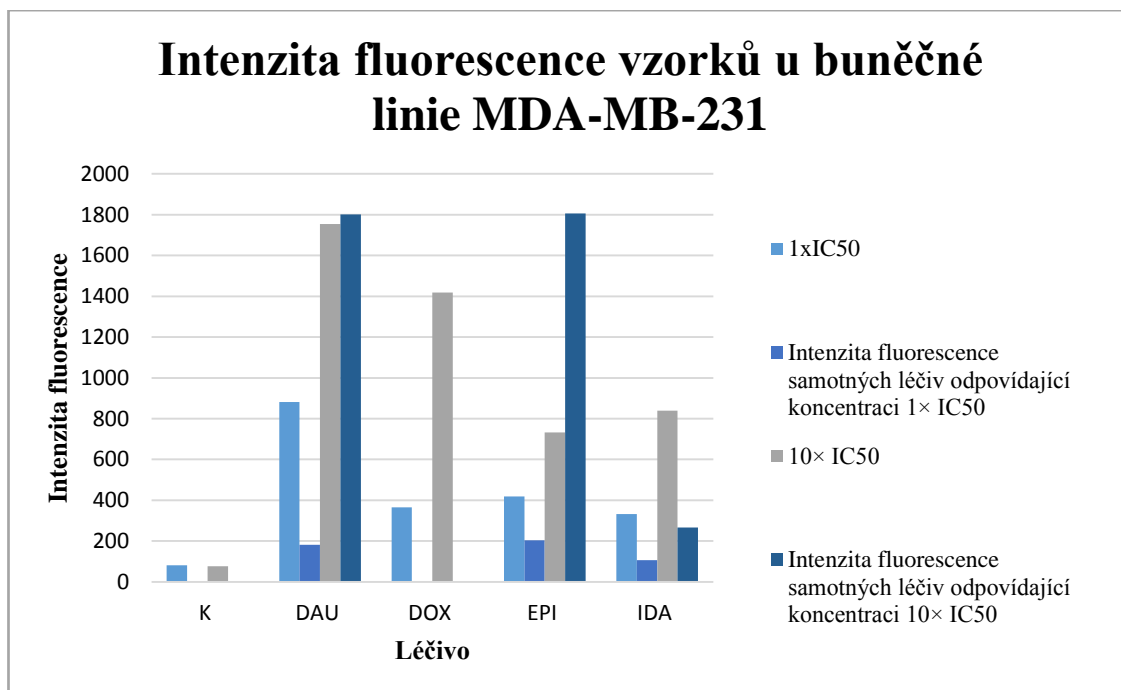
Vzorek	$1 \times IC_{50}$	$5 \times IC_{50}$	$10 \times IC_{50}$	$15 \times IC_{50}$	$50 \mu\text{mol/l}$
PBS s inhibitory (kontrola)	0	-	-	-	-
AMR	453	749	-	-	-
DAU	98	88	139	175	3050
EPI	21	61	178	284	1167
IDA	97	100	179	206	2214

Tab. 12: Intenzita fluorescence léčiv v koncentrační řadě odpovídající $1 \times IC_{50}$, $5 \times IC_{50}$, $10 \times IC_{50}$, $15 \times IC_{50}$ a $50 \mu\text{mol/l}$ u buněčné linie MDA-MB-231

Vzorek	$1 \times IC_{50}$	$5 \times IC_{50}$	$10 \times IC_{50}$	$15 \times IC_{50}$	$50 \mu\text{mol/l}$
PBS s inhibitory (kontrola)	0	-	-	-	-
AMR	489	-	-	-	-
DAU	181	183	1801	2340	7673
EPI	203	987	1806	2601	3362
IDA	107	185	267	465	7268



Obr. 31: Graf zobrazující intenzity fluorescence vzorků buněčné linie U-2 OS, které byly ošetřeny léčivy (K – kontrola, DAU - daunorubicin, DOX – doxorubicin, EPI – epirubicin, IDA – idarubicin) o koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ a intenzity samotných léčiv koncentračně odpovídající $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$

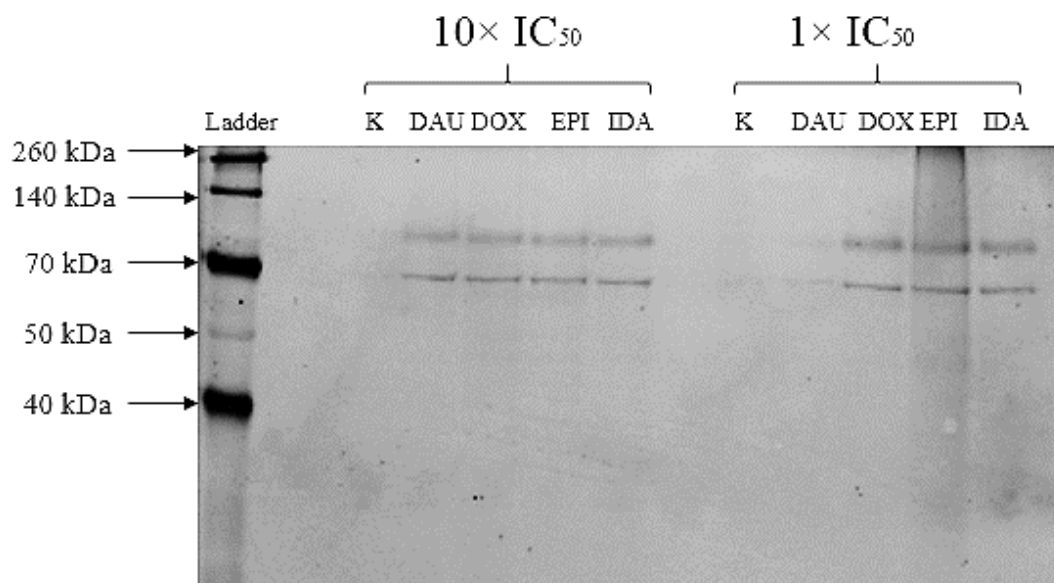


Obr. 32: Graf zobrazující intenzity fluorescence vzorků buněčné linie MDA-MB-231, které byly ošetřeny léčivy (K – kontrola, DAU - daunorubicin, DOX – doxorubicin, EPI – epirubicin, IDA – idarubicin) o koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$ a intenzity samotných léčiv koncentračně odpovídající $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$

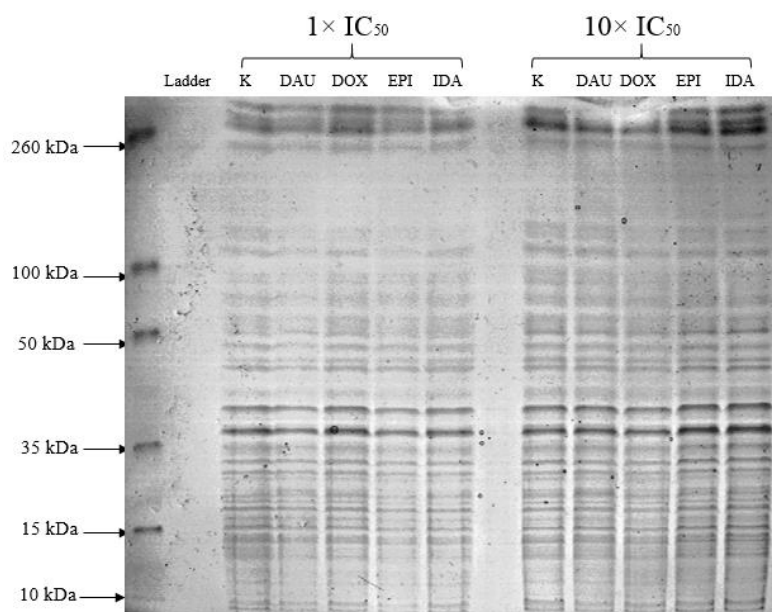
5.5 Výsledky SDS-PAGE vzorků lyzovaných tekutým dusíkem

Byla provedena SDS-PAGE na 1,5mm polyakrylamidovém gelu. Na gel bylo pipetováno 15 μ l vzorku (10 μ g proteinů) a 3 μ l Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu, pomocí něhož byla po separaci stanovena velikost molekulové hmotnosti. Separace proteinů probíhala při napětí 110–130 V. Vyhodnocení gelů bylo provedeno na laserovém skeneru pro biomolekulární zobrazování FLA 9000 za použití LPG filtru. Dále byly gely barveny pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue R. Po promytí byly skenovány na kalibrovaném denzitometru GS-800. Pro vizualizaci gelů byl použit operační program skeneru Typhoon FLA 9000 a Quantity One.

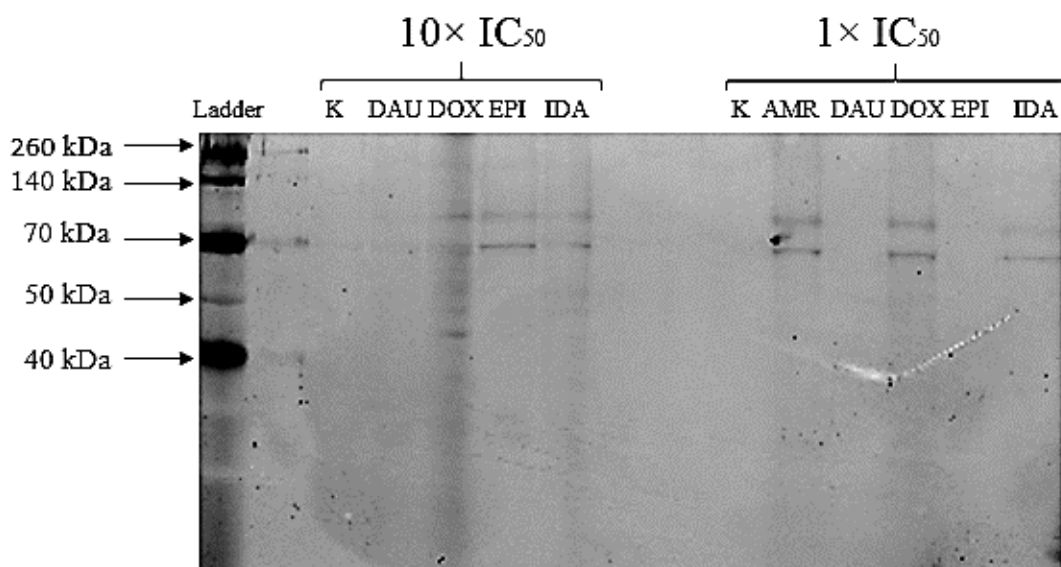
Výsledky SDS-page elektroforézy vyobrazují obrázky č. 33 a č. 34. Obarvené gely barvivem Coomassie Brilliant Blue R vyobrazují obrázky č. 35 a 36.



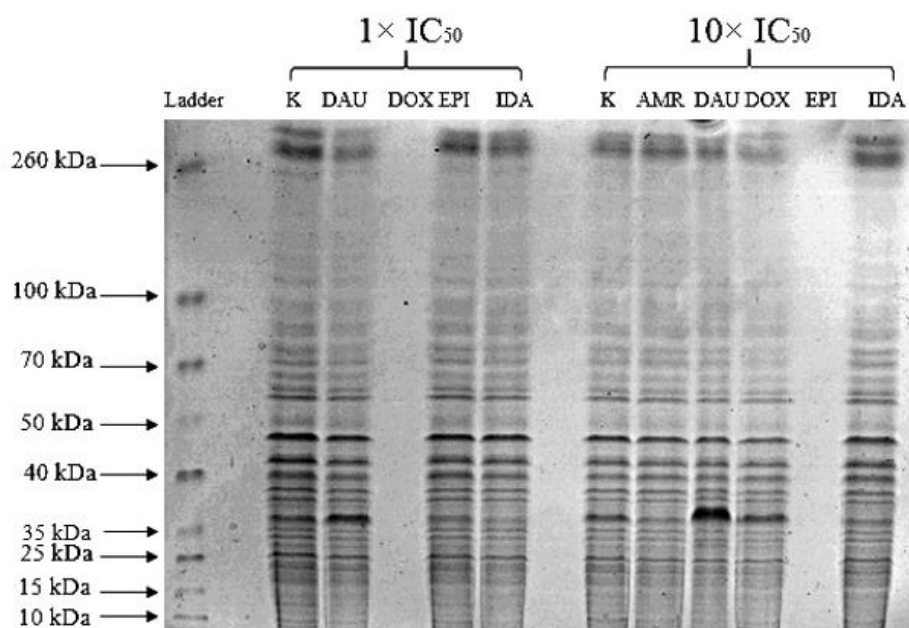
Obr. 33: Elektroforetogram vzorků buněčné linie MDA-MB-231 ošetřené antracykliny s koncentrací $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$, s popisem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popisem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA)



Obr. 34: Barvivem Coomassie Brilliant Blue R obarvený elektroforetogram vzorků buněčné linie MDA-MB-231 ošetřené antracykliny s koncentrací $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$, s popisem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popisem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA)



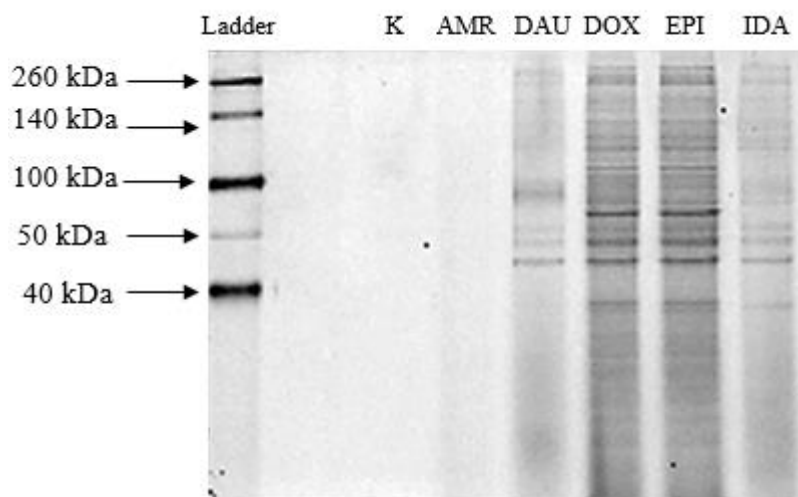
Obr. 35: Elektroforetogram vzorků buněčné linie U-2 OS ošetřené antracykliny s koncentrací $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$, s popisem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popisem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv amrubicin (AMR), daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA)



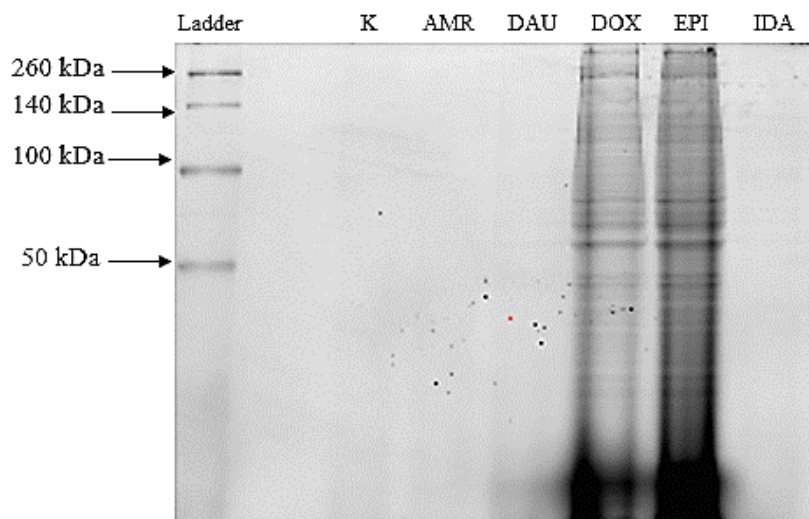
Obr. 36: Barvívem Coomassie Brilliant Blue R obarvený elektroforetogram vzorků buněčné linie U-2 OS ošetřené antracykliny s koncentrací $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$, s popisem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popisem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv amrubicin (AMR), daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA)

5.6 Výsledky SDS-PAGE vzorků lyzovaných 2× SDS lyzačním pufrem

Byla opět provedena SDS-PAGE jako v předchozí části výsledků. Vyhodnocení gelů bylo opět provedeno na laserovém skeneru pro biomolekulární zobrazování FLA 9000 za použití LPG laseru. Výsledky SDS-PAGE vyobrazují obrázky č. 37 a č. 38.



Obr. 37: Elektroforetogram vzorků buněčné linie MDA-MB-231 ošetřených antracykliny s popiskem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popiskem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv amrubicin (AMR), daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA)



Obr. 38: Elektroforetogram vzorků buněčné linie U-2 OS ošetřených antracykliny s popiskem velikostí bandů ladderu, které byly určeny podle Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu a s popiskem jednotlivých jamek – kontrol (K) a léčiv amrubicin (AMR), daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA)

6 Diskuse

Tato práce se zabývá studiem a využitím chemicko-fyzikálních, v mém případě spektrálních, vlastností léčiv v identifikaci jejich molekulárních cílů. Pro účely práce byla využita léčiva patřící do skupiny antracyklinů. Léčiva z této skupiny jsou kovalentními inhibitory, což jsou sloučeniny navrženy tak, aby se kovalentně navázaly na specifický molekulární cíl, kterým mohou být například DNA a proteiny, a potlačily tak jeho biologickou aktivitu (T. A. Baillie, 2016).

Při měření spektrálních vlastností léčiv byly naměřeny vlnové délky, které se téměř vždy shodovaly s vlnovými délkami uvedenými v literatuře, ale také maxima v UV oblasti, která nejsou v publikacích zmíněna. Podle (A. Juarranz *et al.*, 1999) se vlnové délky daunorubicinu rovnaly 470 nm pro excitaci a 560 nm pro emisi. Vlnové délky naměřeny v mojí práci se u tohoto léčiva rovnaly 254 nm a 498 nm pro excitaci a 593 nm pro emisi. Dle (J. H. de Lange *et al.*, 1992) byly vlnové délky doxorubicinu rovny u excitace 480 nm a pro emisi 560–590 nm. V mojí práci se délky zmíněného léčiva rovnaly 498 nm a 595 nm. Článek (C. Ozluer *et H. E. S. Kara*, 2014) uvádí vlnové délky idarubicinu pro excitaci 482 nm a pro emisi 571 nm. Výsledek v mojí práci u idarubicinu byl rovný pro excitaci 255 nm a 488 nm a pro emisi se rovnal výsledku z literatury 571 nm. U epirubicinu uvádí (W. I. Dodde *et al.*, 2003) naměřené vlnové délky 474 nm pro excitaci a 551 nm pro emisi. Výsledky v mojí bakalářské práci jsou rovny pro excitaci 235 nm a 493 nm, pro emisi 592 nm. Podle (Noguchi T. *et al.*, 1998) byly vlnové délky amrubicinu uvedené v literatuře rovny u excitace 465 nm a u emise 560 nm. Hodnoty uvedené v praktické části mé práce udávají 254 nm, 287 nm a 458 nm pro excitaci a 507 nm a 576 nm pro emisi. Příčinou odlišnosti mých výsledků oproti literatuře může být využití jiného měřicího přístroje, kterým byly v mém případě fluorimetr Cary eclipse a spektrofotometr Cary 300 uv/vis. Další příčinou může vycházet z odlišnosti použitého rozpouštědla, poněvadž může docházet k interakcím mezi rozpouštědlem a molekulami rozpouštěné látky (N. Mataga *et al.*, 1956).

Hodnocené látky byly u linie MDA-MB-231 více cytotoxické než u linie U-2 OS. U linie MDA-MB-231 měl nejvyšší cytotoxicitu idarubicin (0,29 $\mu\text{mol/l}$) a naopak nejnižší amrubicin (více než 50 $\mu\text{mol/l}$). Stejně tomu bylo u linie U-2 OS, nejvyšší cytotoxicitu měl idarubicin (0,14 $\mu\text{mol/l}$) a naopak nejnižší amrubicin (41,35 $\mu\text{mol/l}$). Hodnota IC_{50} pro doxorubicin u linie MDA-MB-231 je podle (Yang L. *et al.*, 2011) rovna

0,83869 $\mu\text{mol/l}$, mnou naměřená hodnota je rovna 4,51 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty mohou být rozdílné v důsledku použití jiného testu na měření IC_{50} , kterým byl v mém případě MTS test, v článku to byl MTT test a také v důsledku experimentálního uspořádání, například v počtu použitých buněk, dále se také mohla lišit pasáž buněk nebo jejich rozdílná kultivace. Jak již bylo zmíněno, linie U-2 OS je odvozena od osteosarkomu a linie MDA-MB-231 od adenokarcinomu prsu. Pro léčbu obou typů nádorů se v klinické praxi používá doxorubicin nebo epirubicin, ale ten však jen pro léčbu karcinomu prsu (SÚKL, 2018). Doporučená dávka při monoterapii doxorubicinem se obecně doporučuje v rozmezí 110–165 $\mu\text{mol/m}^2$ tělesného povrchu intravenózní injekcí jednou za tři týdny, podobně tomu je u daunorubicinu i epirubicinu, kdy je doporučená dávka daunorubicinu 151 $\mu\text{mol/m}^2$ a epirubicinu 110–165 $\mu\text{mol/m}^2$. U idarubicinu se dávkování liší a to v tom, že se doporučená dávka 24 $\mu\text{mol/m}^2/\text{den}$ podává intravenózně po dobu 3 dnů (SÚKL, 2018). Z toho vyplývá, že i námi zvolená koncentrace léčiv pro ošetření buněk, která se rovnala 50 $\mu\text{mol/l}$, byla v souladu s dávkami podávanými pacientům při léčbě.

Fluorescenční mikroskopie byla provedena na mikroskopu Cell Voyager CV7000. Měření se provádělo s koncentracemi látek, které odpovídaly hodnotám $1 \times \text{IC}_{50}$ a $10 \times \text{IC}_{50}$. Na fotografiích je možné pozorovat látky akumulované v cytoplazmě, například u buněčné linie MDA-MB-231, u léčiva amrubicinu, při jeho koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ na počátku monitorování. Dále jsou patrné látky akumulované v jádře buňky například u buněčné linie MDA-MB-231, u léčiva daunorubicinu, při jeho koncentraci odpovídající $1 \times \text{IC}_{50}$, po třech hodinách monitorování. Na fotografiích lze také vidět, jak u buněk dochází k postupnému smršťování například u buněčné linie MDA-MB-231, u léčiva epirubicinu, při jeho koncentraci odpovídající $10 \times \text{IC}_{50}$, po třech hodinách monitorování. U buněčné linie U-2 OS, u léčiva amrubicinu, při jeho koncentraci odpovídající $1 \times \text{IC}_{50}$, po třech hodinách monitorování dochází dokonce k apoptóze. V článku (T. Yamaoka *et al.*, 1999) zmiňují, že amrubicin má například ve srovnání s doxorubicinem nižší afinitu k DNA, což tedy znamená, že se léčivo akumuluje více v cytoplazmatické membráně. Výsledky stanovené v mojí práci tedy odpovídají výsledkům uvedeným v článku.

Bylo provedeno ošetření buněčných linií koncentracemi léčiv vyplývajících z měření hodnoty IC_{50} . Poté byla provedena lyzace buněk dvojím způsobem. Prvním byla lyzace tekutým dusíkem. Takto připravené lyzáty byly použity k měření koncentrace

proteinů a vzorky jsou takto připraveny i pro práci na kapalinové chromatografii s hmotnostním spektrometrem. U takto připravených lyzátů dochází k zachování struktury proteinů, kdežto při přípravě vzorků lyzací 2× SDS lyzačním pufrem, která byla pro porovnání také provedena, dochází k jejich denaturaci.

U vzorků, které byly lyzovány tekutým dusíkem, byla změřena jejich intenzita fluorescence. Intenzita fluorescence byla změřena také u samostatných léčiv, které koncentrací odpovídaly 1× IC₅₀ a 10× IC₅₀. Výsledky ukazují, že ač některé ze vzorků ošetřených léčivy, například daunorubicin a epirubicin u linie MDA-MB-231 nebo daunorubicin u linie U-2 OS, nebyly detekovány na gelu kvůli nízké intenzitě fluorescence, tak tyto vzorky, když jsou měřeny samostatně bez přidání 2× SDS lyzačního pufru, který se přidává ke vzorkům před nanesením na gel, vykazují poměrně vysokou intenzitu fluorescence, ba dokonce vyšší, než samostatné léčivo. Je tedy možné, že fluorescence těchto látek ve vzorcích lyzovaných dusíkem je ovlivněna kupříkladu dodecylsíránem sodným nebo jinou chemikálií, která je obsažena ve 2× SDS lyzačním pufru nebo také kovalentními a nekovalentními interakcemi.

Vzorky byly separovány pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Pomocí Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu byla stanovena velikost separovaných proteinů. U vzorků linie MDA-MB-231 lyzovaných tekutým dusíkem jsou viditelné proteiny, které mají velikost mezi 70–140 kDa a proteiny, jež mají velikost přibližně 70 kDa. U vzorků buněčné linie U-2 OS rovněž lyzovaných tekutým dusíkem jsou výsledky stejné až na doxorubicin, u kterého lze vidět i proteiny, které mají velikost mezi 40–50 kDa. Hodnota velikosti enzymu topoizomerázy I uvedená v databázi je rovna 90,726 kDa a hodnota velikosti topoizomerázy II je rovna 170,679 kDa (UniProt, 2018). Tyto gely byly obarveny barvivem Coomassie Brilliant Blue R a byly tak vizualizovány všechny proteiny, na které se barvivo navázalo, a které bylo díky jeho absorbanci detekováno skenerem. U vzorků lyzovaných 2× SDS lyzačním pufrem je počet separovaných viditelných proteinů po detekci fluorescenčním skenerem podstatně vyšší. Pravděpodobně v důsledku vyšší koncentrace léčiva, kterým byly buňky ošetřené. Nejvyšší fluorescenci vykazují léčiva doxorubicin a epirubicin u buněčné linie U-2 OS. U buněčné linie MDA-MB-231 vykazují fluorescenci všechna léčiva kromě amrubicinu, což může být ve spojitosti s jeho nízkou cytotoxicitou.

7 Závěr

V teoretické části byla vypracovaná rešerše o chemicko-fyzikálních vlastnostech látek vyplývajících z jejich struktury, dále byl zpracován seznam komerčně dostupných kovalentně se vázajících inhibitorů (antracyklinů), mechanismů jejich účinků, publikovaných vedlejších účinků jako je kardiotoxicita a jejich chemicko-fyzikálních vlastností. V rámci práce tedy byly splněny stanovené cíle.

V experimentální části byly proměřeny spektrální vlastnosti léčiv, které byly využity pro jejich detekci v dalších experimentech. Dále byla stanovena hodnota IC_{50} , ze které byl stanoven objem a koncentrace léčiva k ošetření buněk. Nejvyšší cytotoxicitu vykazoval u obou buněčných linií idarubicin a naopak nejnižší amrubicin. Celkově měly hodnocené látky u buněčné linie MDA-MB-231 vyšší cytotoxicitu než u buněčné linie U-2 OS. Byla provedena fluorescenční mikroskopie na přístroji Cell Voyager CV7000, který slouží k zobrazování živých buněk. Tím byly stanoveny časy inkubací buněk, které byly následně využity při ošetření buněk léčivy. Je důležité zmínit, že v tomto experimentu nebyl změřen doxorubicin kvůli špatným fluorescenčním vlastnostem. Dále byla sledována distribuce léčiva v buňce, zda se tedy nachází v cytoplazmě nebo v jádře. Dalším úkolem bylo ošetření buněk a následná příprava buněčných lyzátů. Ty byly připraveny dvojitým způsobem, tekutým dusíkem a klasickou lyzací $2\times$ SDS-lyzačním pufrem. U vzorků lyzovaných tekutým dusíkem byla změřena koncentrace proteinů a intenzita fluorescence. Tyto vzorky lze využít i pro další experimenty. Závěrečnou fází práce bylo provedení SDS-PAGE, kdy byly připravené vzorky separovány na polyakrylamidových gelech, které byly následně skenovány na laserovém skeneru pro biomolekulární zobrazování. Pomocí Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladderu byla stanovena velikost separovaných proteinů, která se rovnala přibližně 70 kDa, což je velikost odpovídající velikosti enzymu topoizomerázy I, která je jedním z cílů léčiv v buňce, avšak je nutné tuto skutečnost ověřit například Western blotem nebo kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem.

8 Literatura

Aubel-Sadron G., Londos-Gagliardi D. (1984): Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*, 66(5), 333–352.

Bachur N. R., Yu F., Johnson R., Hickey R., Wu Y., Malkas L. (1992): Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Molecular Pharmacology*, 41 (6), 993–998.

Baker N. M., Rajan R., Mondragon A. (2009): Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Research*, 37(3), 693–701.

Belloc F., Lacombe F., Dumain P., Lopez F., Bernard P., Boisseau M. R., Reifers J. (1992): Intercalation of anthracyclines into living cell DNA analyzed by flow cytometry. *Cytometry*, 13(8), 880-885.

Bendle M., Pealing J., Papanastasopoulos P., Bower M. (2014): Liposomal anthracycline chemotherapy and the risk of second malignancies in patients with Kaposi's sarcoma (KS). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(3), 611–615.

Bonfante V., Bonadonna G., Villani F., Martini A. (1980): Preliminary clinical experience with 4-epidoxorubicin in advanced human neoplasia. *Recent Results in Cancer Research*, 74, 192–199.

Coley H. M., Amos W. B., Twentyman P. R., Workman P. (1993): Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of the subcellular localisation of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines. *British Journal of Cancer*, 67, 1316–1323.

Cory A. H., Owen T. C., Barltrop J. A., Cory J. G. (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*, 3(7), 207–212.

Dodde W. I., Maring J. G., Hendriks G., Wachters F. M., Groen H. J., de Vries E. G., Uges D. R. (2003): Determination of epirubicin and its metabolite epirubicinol in saliva and plasma by HPLC. *Therapeutic Drug Monitoring*, 25(4), 433–440.

- Du X., Tong J., Lu H., He C., Du S., Jia P., Zhao W., Xu H., Li J., Shen Z., Wu Y., Tong J., Zhou L. (2017): Combination of bortezomib and daunorubicin in the induction of apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Medicine*, 16(1), 101–108.
- Ettinger D. S., Jotte R., Lorigan P., Gupta V., Garbo L., Alemany C., Conkling P., Spigel D. R., Dudek A. Z., Shah C., Salgia R., McNally R., Renschler M. F., Oliver J. W. (2010): Phase II Study of Amrubicin As Second-Line Therapy in Patients With Platinum-Refractory Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(15), 2598–2603.
- Fornari F. A., Randolph J. K., Yalowich J. C., Ritke M. K., Gewirtz D. A. (1994): Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology*, 45(4), 649–656.
- Fukushima T., Ueda T., Uchida M., Nakamura T. (1993): Action mechanism of idarubicin (4-demethoxydaunorubicin) as compared with daunorubicin in leukemic cells. *International Journal of Hematology*, 57(2), 121–130.
- Ganzina F. (1983): 4'-epi-doxorubicin, a new analogue of doxorubicin: a preliminary overview of preclinical and clinical data. *Cancer Treatment Reviews*, 10(1), 1–22.
- Gerwitz D. A. (1999): A critical evaluation of the mechanism of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(7), 727–741.
- Gottesman M. M., Pastan I. (1993): Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry*, 62, 385–427.
- Gupta S., Gouw L., Wright J., Chawla S., Pitt D., Wade M., Boucher K., Sharma S. (2016): Phase II study of amrubicin (SM-5887), a synthetic 9-aminoanthracycline, as first line treatment in patients with metastatic or unresectable soft tissue sarcoma: durable response in myxoid liposarcoma with TLS-CHOP translocation. *Investigational New Drugs*, 34(2), 243–252.
- Hanada M., Mizuno S., Fukushima A., Saito Y., Noguchi T., Yamaoka T. (1998): A new antitumor agent amrubicin induces cell growth inhibition by stabilizing topoisomerase II-DNA complex. *Japanese Journal of Cancer Research*, 89(11), 1229–1238.

Huk J., Blumauerova M. (1989): Streptomycetes producing daunomycin and related compounds: do we know enough about them after 25 years?. *Folia Microbiologica*, 34(4), 324–349.

Chabner B. A., Amrein P.C., Druker B., Michaelson M.D., Mitsiades C.S., Goss P.E., Ryan D.P., Ramachandra S., Richarson P.G., Supko J.G., Wilson W.H. (2006): Antineoplastic Agents. In: Brunton LL (Ed.). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed., New York: McGraw-Hill, 2006.

Charak S., R. Mehrotra (2013): Structural investigation of idarubicin–DNA interaction: Spectroscopic and molecular docking study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 213-218.

Iarussi D., Indolfi P., Casale F., Coppolino P., Tedesco M. A., Di Tullio M. T. (2001): Recent advances in the prevention of anthracycline cardiotoxicity in childhood. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 1649–1660.

Juarranz A., Villanueva A., Cañete M., Polo S., Domínguez V., Stockert (1999): Microscopical and Spectroscopic Studies on the Fluorescence of a Daunomycin–aluminum Complex. *The Histochemical Journal*, 3, 201–208.

Kong K., Kendall C., Stone N., Notingher I. (2015): Raman spectroscopy for medical diagnostics - From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Drug Delivery Reviews*, 89, 121–124.

Kurata T., Okamoto I., Tamura K., Fukuoka M. (2007): Amrubicin for non-small-cell lung cancer and small-cell lung cancer. *New Drugs*, 25(5):499–504.

Lange de J. H., Schipper N. W., Schuurhuis G. J., Kate ten T. K., Heijningen van T. H., Pinedo H. M., Lankelma J., Baak J. P. (1992): Quantification by laser scan microscopy of intracellular doxorubicin distribution. *Cytometry*, 13(6), 571–576.

Lebrecht D., Walker U. A. (2007): Role of mtDNA lesions in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular Toxicology*, 7, 108–113.

- Malatesta V., Andreoni A. (1989): Laser time-resolved fluorescence study of the interaction between anthracyclines and cardiolipin, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 3(2), 157–164.
- Mataga N., Kaifu Y., Koizumi M. (1956): Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 29(4), 465-470.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. (2004): Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185–229.
- Mizutani H., Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Kojima M., Kawanishi S. (2005): Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sciences*, 76(13), 1439–1453.
- Motlagh N. S. H., Parvin P., Ghasemi F., Atyabi F. (2016): Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin. *Biomedical Optics Express*, 7(6), 2400–2406.
- Mompalmer R. L., Karon M., Siegel S. E., Avila F. (1976): Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Research*, 36(8), 2891–2895.
- Morisada S., Yanagi Y., Noguchi T., Kashiwazaki Y., Fukui M. (1989): Antitumor activities of a novel 9-aminoanthracycline (SM-5887) against mouse experimental tumors and human tumor xenografts. *Japanese Journal of Cancer Research*, 80(1), 69–76.
- Neilan T. G., Blake S. L., Ichinose F., Raheem M. J., Buys E. S., Jassal D. S., Furutani E., Perez-Sanz T. M., Graveline A., Janssens S. P., Picard M. H., Scherrer-Crosbie M., Bloch K. D. (2007): Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. *Circulation*, 116, 506–514.
- Nenna A., Barbato R., Greco S. M., Pugliese G., Lusini M., Covino E., Chello M. (2017): Near-infrared spectroscopy in adult cardiac surgery: between conflicting results and unexpected uses. *Journal of Geriatric Cardiology*, 14(11), 659–661.

- Nielsen D., Maare C., Skovsgaard T. (1996): Cellular resistance to anthracyclines. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(2), 251–255.
- Noguchi T., Ichii S., Morisada S., Yamaoka T., Yanagi Y. (1998): Tumor-selective Distribution of an Active Metabolite of the 9-Aminoanthracycline Amrubicin, *Japanese Journal of Cancer Research*, 89, 1061–1066.
- Ozluer C., Kara H. E. S. (2014): In vitro DNA binding studies of anticancer drug idarubicin using spectroscopic techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 138, 36-42.
- Shaul P., Frenkel M., Goldstein E. B., Mittelman L., Grunwald A., Ebenstein Y., Tsarfaty I., Fridman M. (2013): The Structure of Anthracycline Derivatives Determines Their Subcellular Localization and Cytotoxic Activity. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(3), 323–328.
- Shuurhuis G. J., Broxterman H. J., Cervantes H., van Heijningen T. H. M., de Lange J. H. M., Baak J. P. A., Pinedo H. M., Lankelma J. (1989): Quantitative determination of factors contributing to doxorubicin resistance in multidrug-resistant cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 81, 1887–1892.
- Singal P. K., Iliskovic N. (1998): Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, 339, 900–905.
- Sinha B. K., Politi P. M. (1990): Anthracyclines. *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, 11, 45–47.
- Skovsgaard T., Nielsen D., Maare C., Wassermann K. (1994): Cellular resistance to cancer chemotherapy. *International Review of Cytology. A Survey of Cell Biology*, 77–157. Academic Press, San Diego.
- Snustad D. P., Simmons M. J., Relichová J. (2009): Genetika. Masarykova univerzita, Brno.
- Szafraniec E., Majzner K., Farhane Z., Byrne H. J., Lukawska M., Oszczapowicz I., Chlopicki S., Baranska M. (2016): Spectroscopic studies of anthracyclines: Struktural

characterization and *in vitro* tracking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 169, 152–160.

Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 26. 4. 2018]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/>.

Rayner D. M., Cutts S. M. (2014): A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions. Elsevier, New York.

Regev R., Yeheskely-Hayon D., Katzir H., Eytan G. D. (2005): Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 70(1), 161–169.

Takemura G., Fujiwara H. (2007): Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 49, 330–352.

UniProt [online]. [cit. 29. 4. 2018]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/>.

Wallace K. B. (2007): Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovascular Toxicology*, 7, 101–107.

Weiss R. B. (1992): The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *Seminars in oncology*, 19 (6), 670–686.

Yan H., Zhao R. M., Wang Z. J., Zhao F. R., Wang S. L. (2015): Knockdown of PRAME enhances adriamycin-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(24), 4827–4834.

Yamaoka T., Hanada M., Ichii S., Morisada S., Noguchi T., Yanagi Y. (1999): Uptake and Intracellular Distribution of Amrubicin, a Novel 9-Aminoanthracycline, and Its Active Metabolite Amrubicinol in P388 Murine Leukemia Cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90, 685–690.

Yang, L., Wei, L., Zhao, W., Wang, X., Zheng, G., Zheng, M., Song X., Zuo, W. (2012): Down-regulation of osteopontin expression by RNA interference affects cell proliferation and chemotherapy sensitivity of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Molecular Medicine Reports*, 5, 373-376.

Yeh E. T., Tong A. T., Lenihan D. J., Yusuf S. W., Swafford J., Champion C., Durand J. B., Gibbs H., Zafarmand A. A., Ewer M. S. (2004): Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation*, 109, 3122–3131.

Zhang Y. W., Shi J., Li Y. J., Wei L. (2009): Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 57(6), 435–445