

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium interakcí protirakovinových polosendvičových
Ru(II) a Os(II) komplexů obsahujících ve své struktuře
ligandy na bázi 1,2-diaminoethanu s polyaromatickými
substituenty s DNA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petra Andršová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Lukáš Masaryk
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Chtěla bych velmi poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Márii Škrabišové, Ph.D. za cenné rady, milý přístup a ochotu mi vždy pomoci. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Janě Slivkové za pomoc v laboratoři a přípravu biologického materiálu. Dále děkuji Mgr. Lukáši Masarykovi a doc. Mgr. Pavlu Štarhovi, Ph.D. za poskytnutí anorganického materiálu a za pomoc při vypracování práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petra Andršová
Název práce	Studium interakcí protirakovinových polosendvičových Ru(II) a Os(II) komplexů obsahujících ve své struktuře ligandy na bázi 1,2-diaminoethanu s polyaromatickými substituenty s DNA
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Lukáš Masaryk
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Terapeutický úspěch cisplatiny a jejích derivátů dal podnět pro vytvoření nových chemoterapeutik na bázi komplexních sloučenin obsahujících jako centrální atom nejen platinu, ale také ruthenium, osmium či iridium. Pro bližší určení biologické aktivity nově syntetizovaných látek slouží řada biotestů, mezi které se řadí i ty zkoumající jejich interakce s DNA. Interakce nově připravených polosendvičových Ru(II) a Os(II) komplexů obsahujících biologicky aktivní polyaromatický substituent, cisplatiny a vybraných organických molekul s DNA byly v experimentální části zkoumány s využitím agarosové elektroforézy, a to pomocí dvou typů experimentů determinujících schopnost komplexů štěpit molekulu DNA a také schopnost se na ni vázat. Teoretická část obsahuje hlavně pojednání o některých protinádorových komplexních sloučeninách a jejich mechanismu účinku, metodách pro zkoumání jejich cytotoxické aktivity v buňkách a o způsobu vazby komplexů na DNA.

Klíčová slova	Komplexní sloučeniny, DNA, plasmid, protinádorová aktivita, vazebné interakce s DNA, agarosová elektroforéza, nukleasová aktivita, mobilita
Počet stran	51
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Petra Andršová
Title	Study of interactions of anticancer Ru(II) and Os(II) complexes containing ligands based on 1,2-diaminoethane with polyaromatic substituents with DNA
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Adviser	Mgr. Lukáš Masaryk
The year of presentation	2022

Abstract

Therapeutical success of cisplatin and its derivatives prompted the effort to synthesize new anticancer complex compounds containing not only platinum as a central atom but also ruthenium, osmium or iridium. To better understand their biological activity, the compounds must undergo a whole range of biotests which also include those examining their ability to interact with DNA. Interactions of newly synthesized half-sandwich Ru(II) and Os(II) complexes containing biologically active polyaromatic substituents, cisplatin and selected organic molecules with DNA were studied in the experimental part using gel agarose electrophoresis. In this thesis, the interactions of complex compounds with DNA were explored by two types of experiments which determine their ability to cleave DNA and their ability to bind to it. The theoretical part is mainly focused on some anticancer complex compounds and their mechanism of action, on methods which determine their cytotoxic activity in cells and on their modes of binding to DNA.

Keywords	Complex compounds, DNA, plasmid, anticancer activity, interactions with DNA, gel agarose electrophoresis, nuclease activity, mobility
Number of pages	51
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Chemoterapie jako léčba nádorových chorob	2
2.1.1	Historie chemoterapie a současně používaná chemoterapeutika	2
2.2	Komplexy na bázi Pt	3
2.2.1	Cisplatina	4
2.2.1.1	Vstup do organismu a do buněk.....	4
2.2.1.2	Mechanismus účinku.....	5
2.2.1.3	Vazba s některými proteiny	6
2.2.1.4	Rezistence a nežádoucí účinky.....	7
2.2.2	Karboplatina	7
2.2.3	Oxaliplatina	7
2.2.4	Nedaplatina, lobaplatina a heptaplatina	8
2.3	Komplexy na bázi Ru a Os	8
2.3.1	Ruthenium jako centrální atom	8
2.3.1.1	NAMI-A a KP1019	9
2.3.1.2	Ru(II) komplexy obsahující areny	10
2.3.1.3	Další komplexy obsahující Ru	11
2.3.2	Osmium jako centrální atom	11
2.3.2.1	Os(II) komplexy obsahující areny.....	11
2.3.3	Komplexy s biologicky aktivním substituentem.....	12
2.4	Testování biologické aktivity potenciálních protinádorových sloučenin .	13
2.5	Testování interakcí potenciálních protinádorových sloučenin s DNA	14
2.5.1	Vlastnosti plasmidové DNA a její příprava pro studium vazebných interakcí s cytostatiky.....	14
2.5.2	Způsoby interakce komplexu s DNA.....	15
2.5.2.1	Interkalativní vazba.....	16
2.5.2.2	Další typy vazeb	17
2.5.3	Testování změny v mobilitě plasmidové DNA po interakci s komplexy ...	17
2.6	Testování nukleasové aktivity potenciálních protinádorových sloučenin	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1	Komplexní sloučeniny	20
3.2	Biologický materiál a reagentie pro molekulárně biologické metody	21
3.3	Přístrojové vybavení a další pomůcky	21
3.4	Roztoky pro agarosovou elektroforézu	22

3.5	Metody	22
3.5.1	Izolace plasmidové DNA metodou přečištění na vrstvě silikátu	22
3.5.2	Detekce vlivu cytostatik na DNA (agarosová elektroforéza)	22
3.5.2.1	Analýza nukleasové aktivity	23
3.5.2.2	Analýza mobility plasmidové DNA po interakci s cytostatiky.....	24
3.5.2.3	Image Lab 6.0.1.....	24
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	25
4.1	Negativní kontroly – identifikace konformací plasmidové DNA pro pUC19	25
4.2	Detekce nukleasové aktivity v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku	26
4.2.1	Vliv H ₂ O ₂ a vychytávačů volných radikálů na nukleasovou aktivitu	26
4.2.2	Test nukleasové aktivity cisplatinu jako pozitivní kontroly	27
4.2.3	Test nulové nukleasové aktivity kontrolních organických molekul L ¹ a L ²	28
4.2.4	Test nukleasové aktivity Ru-CYM jako pozitivní kontroly	29
4.2.5	Nukleasová aktivita komplexních sloučenin 2a , 2b	30
4.2.6	Nukleasová aktivita komplexních sloučenin 3a , 3b	31
4.2.7	Nukleasová aktivita komplexu 4a	33
4.3	Analýza mobility plasmidové DNA po interakci s komplexem	34
4.3.1	Pozitivní kontrola vlivu cisplatinu na mobilitu plasmidu	34
4.3.2	Negativní kontrola vlivu organických molekul L ¹ a L ² na mobilitu plasmidu.....	35
4.3.3	Pozitivní kontrola vlivu komplexu Ru-CYM na mobilitu plasmidu.....	36
4.3.4	Mobilita plasmidu s navázanými komplexem 2a , 2b	37
4.3.5	Mobilita plasmidu s navázanými komplexem 3a , 3b	38
4.3.6	Mobilita plasmidu s navázaným komplexem 4a	40
4.4	Srovnání studovaných látek pro oba experimenty	41
5	ZÁVĚR	43
6	LITERATURA	45
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	50

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- popsat protinádorové komplexní sloučeniny obsahující platinu, ruthenium a osmium
- zpracovat stručný přehled biotestů používaných při testování biologické aktivity komplexů
- popsat plasmidovou DNA včetně jejích konformací a způsoby vazby komplexních sloučenin na DNA
- charakterizovat nukleasovou aktivitu komplexů

Praktická část:

- izolovat plasmidovou DNA z bakterie *Escherichia coli*
- pomocí agarosové elektroforézy stanovit nukleasovou aktivitu protinádorových komplexních sloučenin a změnu v mobilitě plasmidové DNA po interakci s komplexem
- charakterizovat vazebné interakce studovaných komplexních sloučenin s DNA
- charakterizovat vliv peroxidu vodíku na komplexní sloučeniny a organické molekuly

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou celosvětově jednou z nejčastějších příčin úmrtí. V roce 2020 přibylo na světě odhadem 19,3 mil. nových případů a asi 10 mil. osob tomuto onemocnění podlelo. Počet lidí, kterým je diagnostikováno nádorové onemocnění, každoročně roste a přibývá také úmrtí, což odráží stárnutí a růst monitorované populace, ale také socioekonomický rozvoj společnosti. Zatím je také neznámý dopad pandemie onemocnění SARS-CoV-2, která způsobila pozdržení léčby a diagnózy pacientů a omezení provozu zdravotnických zařízení včetně pozastavení screeningových programů (Sung et al., 2021).

Chemoterapie pomocí komplexních sloučenin je jednou z možností léčby nádorových onemocnění a velmi často používaným protinádorovým léčivem je cisplatina. Šťastná náhoda vedla v minulém století k objevu cytotoxických vlastností této látky v průběhu experimentu, jehož cílem bylo prozkoumat vliv elektrického pole na růst bakterie *Escherichia coli*. Mechanismus účinku cisplatiny je relativně dobře známý a spočívá v její vazbě na DNA (Pizarro & Sadler, 2009).

U nově připravených potencionálních protinádorových sloučenin je však jejich mechanismus působení málo prozkoumaný. Proto je u těchto látek systematicky testována jejich biologická aktivita. Při studiu protinádorové aktivity je především stanovována *in vitro* cytotoxicita na vhodných nádorových i nenádorových buněčných liniích. Získaná hodnota IC₅₀ (koncentrace testované látky inhibující růst 50 % použitých buněk) je rozhodujícím kritériem pro provedení následných experimentů poskytujících vhled do mechanismu účinku těchto látek (Štarha & Trávníček, 2018).

A právě interakce s DNA (jako možný mechanismus účinku) byly zkoumány v této práci u nově připravených Ru(II) a Os(II) polosendvičových komplexních sloučenin za pomoci agarosové elektroforézy. Kromě těchto látek byl stejný experiment proveden pro dvě organické molekuly, které jsou součástí studovaných komplexních sloučenin, a také pro komplex Ru-CYM (vzorec a název uvedeny dále v textu) a cisplatinu, které sloužily jako pozitivní kontroly. Byla stanovována schopnost komplexu štěpit molekulu DNA (nukleasová aktivita) a také změna v mobilitě plasmidové DNA v agarosovém gelu po interakci s komplexy. Cílem provedených experimentů pak bylo charakterizovat vliv komplexních sloučenin na molekulu DNA. Byl zkoumán také vliv přítomnosti peroxidu vodíku na interakci komplexů s DNA.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Chemoterapie jako léčba nádorových chorob

Podle Národního onkologického ústavu (USA) chemoterapie často probíhá v kombinaci s ozařováním či mechanickým odstraněním nádoru a odvíjí se od typu a rozšíření nádorového onemocnění a od jiných zdravotních problémů pacienta. Léčebný proces probíhá většinou v cyklech a pacientovi je podáváno chemoterapeutikum intravenózně, intratékálně (do mozkomíšního moku) či orálně v podobě tablet nebo tekutiny. Jelikož v průběhu léčby dochází nejen k ničení nádorových buněk, ale i zdravých buněk organismu, chemoterapii často doprovází vedlejší účinky (např. nevolnost, únava či ztráta vlasů).

Nejčastěji se u pacientů vyskytují karcinomy prsu, plic, kolorekta, prostaty a žaludku (Sung et al., 2021). Nádory plic se dělí na dvě velké skupiny, a to na malobuněčný karcinom plic (maligní nádor odvozený od neuroendokrinních buněk) a nemalobuněčných karcinom plic, který lze rozdělit na adenokarcinom, karcinom skvamózních buněk a velkobuněčný karcinom (Dela Cruz et al., 2011).

2.1.1 Historie chemoterapie a současně používaná chemoterapeutika

Počátek novodobé protinádorové terapie lze zasadit do 40. let 20. století (Oktábec & Jampílek, 2013). Goodman et al. (1946) si všimli výrazné hypoplasie lymfoidních a myeloidních buněk jednoho z námořníků, který byl vystaven účinkům bojového plynu yperitu (bis(2-chlorethyl)sulfid). Následně byla vyvinuta různá analoga této látky, z nichž některá, jako např. cyklofosfamid, se používají dodnes (Oktábec & Jampílek, 2013).

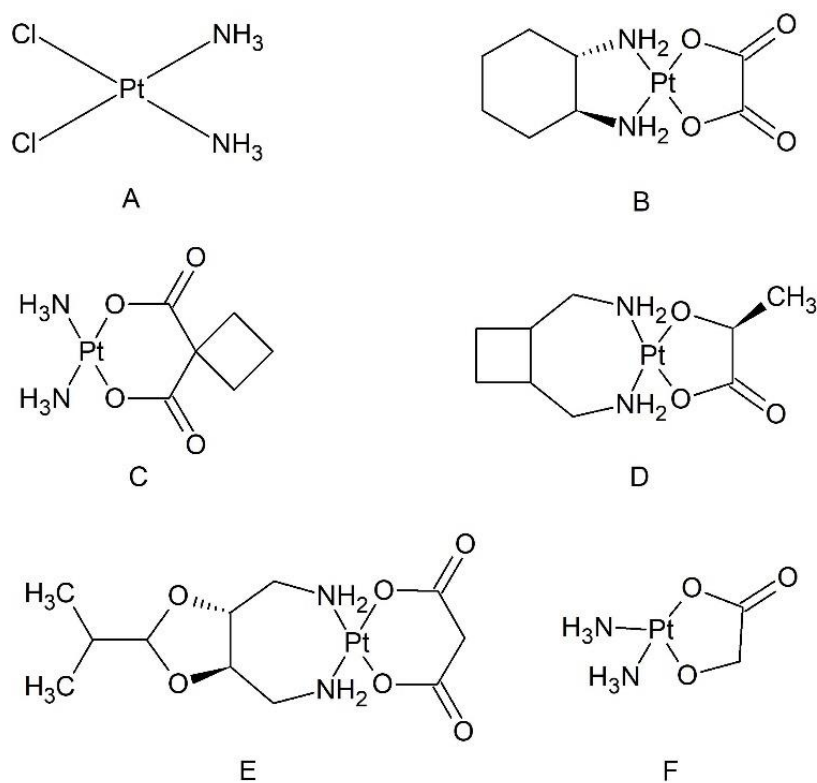
Farber et al. (1948) publikovali studii, ve které byly popsány účinky antagonistů kyseliny listové aminopterinu a ametopterinu (dnes známý jako methotrexát) u dětských pacientů s leukemií. Naskytla se tak první možnost léčby tohoto onemocnění. Ve své době se Farber neseťkal s pochopením, avšak již v roce 1958 popsali pracovníci Národního onkologického ústavu (USA) vyléčení choriokarcinomu methotrexátem (Oktábec & Jampílek, 2013).

Chemoterapeutika používaná v onkologické praxi jsou např. alkylační činidla (chlorambucil, cyklofosfamid, thiotepa), antimetabolity (methotrexát, 6-merkaptopurin, 5-fluorouracil), taxany (paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel) či komplexy na bázi platiny (cisplatina, oxaliplatina, karboplatina) (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643176/>). Pro

léčbu jednoho typu nádoru se mohou používat různé druhy chemoterapeutik. Podle webové stránky UpToDate (<https://www.uptodate.com/contents/treatment-protocols-for-non-small-cell-lung-cancer>) se pro léčbu např. nemalobuněčného karcinomu plic používá karboplatina v kombinaci s docetaxelem, cisplatina s gemcitabinem či víceléková terapie zahrnující karboplatinu, paclitaxel, atezolizumab a bevacizumab.

2.2 Komplexy na bázi Pt

V této kapitole je především popsána cisplatina jako první používané léčivo na bázi platiny, dále je pojednáno o karboplatině, oxaliplatině, lobaplatině, heptaplatině a nedaplatině, které byly připraveny jako méně toxická analoga cisplatiny (viz Obr. 1) (Dilruba & Kalayda, 2016). Cisplatina a její deriváty jsou používány v klinické praxi řadu let a studium jejich vazebných interakcí s DNA může vést k vývoji nových léčiv (Reedijk, 2009).



Obr. 1: Struktura cisplatiny (cis-diaminodichloroplatnatý komplex) (A), oxaliplatiny ([*trans*-1R,2R-diamincyklohexan]oxaláto platnatý komplex) (B), karboplatiny (*cis*-diamin-[1,1-cyklobutan dikarboxyláto] platnatý komplex) (C), lobaplatiny (2-cyklobutandimethanamin(2-hydroxypropanáto) platnatý komplex) (D), heptaplatiny (2-isopropyl-1,3-dioxolanáto-4,5-dimethanamin(propandioáto) platnatý komplex) (E) a nedaplatiny (diamin(hydroxyacetáto) platnatý komplex) (F).

2.2.1 Cisplatina

Cisplatina byla poprvé syntetizována v roce 1844 Michele Peyronem (Dasari & Tchounwou, 2014). Její cytotoxické účinky jsou však známy až od 60. let 20. století, kdy tým profesora Barnetta Rosenberga dokázal, že tato sloučenina inhibuje buněčné dělení bakterie *Escherichia coli* (Rosenberg et al., 1965). V roce 1971 byly zahájeny klinické testy a roku 1979 americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv jako první schválil tuto látku pro léčbu nádorového onemocnění varlat a vaječníků (Dilruba & Kalayda, 2016). Cisplatina se dále používá pro léčbu karcinomů hlavy, krku, močového měchýře, prostaty či plic a odhaduje se, že téměř 50 % všech onkologických pacientů je léčeno tímto chemoterapeutikem (Dasari & Tchounwou, 2014; Ghosh, 2019).

Podle RxList (<https://www.rxlist.com/cisplatin-drug.htm#description>) sterilní vodný roztok cisplatinu k intravenóznímu podání obsahuje v každém mililitru 1 mg cisplatinu a 9 mg NaCl. Pro léčbu např. metastazujícího karcinomu vaječniku se používá cisplatina v kombinaci s cyklofosfamidem – víceléková terapie je účinnější než cisplatina samotná (McGuire et al., 1996). Dávkování je podle RxList 75 až 100 mg·m⁻² cisplatinu v rámci jednoho cyklu, který je opakován obecně jednou za čtyři týdny (cisplatina a cyklofosfamid jsou dávkovány postupně – cyklofosfamid v množství 600 mg·m⁻²). Cisplatina je rozpuštěna ve 2 l solného roztoku, aby došlo k dostatečnému naředění a vstřebání do organismu. Do dané směsi je ještě přidána glukosa a 37,5 g manitolu. Použitím manitolu se snižuje nefrotoxicita cisplatinu. Intravenózní podání trvá 6 až 8 h.

2.2.1.1 Vstup do organismu a do buněk

Cisplatina zůstává po intravenózním podání neutrální, protože koncentrace chloridů je v krevním řečišti relativně vysoká (přibližně 100 mM). 65–95 % cisplatinu je deaktivováno v prvních 24 h od podání, protože se v krevní plasmě váže na proteiny a zbývající léčivo je dopraveno do nádorových buněk díky pasivní difuzi přes plasmatickou membránu či pomocí proteinových transportérů na bázi mědi (CTR1) nebo protonové ATPasy typu P (Jung & Lippard, 2007; Dilruba & Kalayda, 2016; Ghosh, 2019).

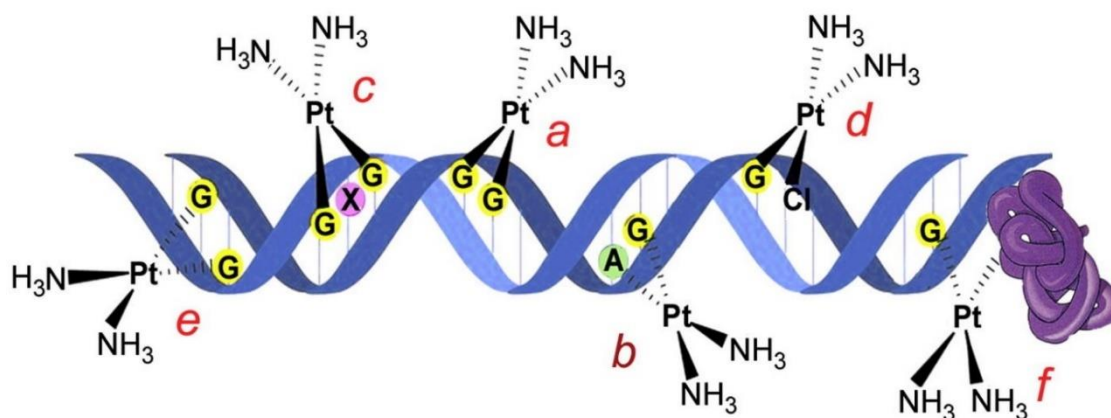
Důležitost transportérů na bázi mědi (CTR1) pro vyvolání protinádorové aktivity je však stále nejasná (Jung & Lippard, 2007). Podle Ivy & Kaplan (2013) CTR1 není pro cisplatinu hlavním vstupem do buňky, vstup této látky je podle autorů pravděpodobně zprostředkován jinými proteiny.

Jakmile cisplatina vstoupí do buňky, neutrální molekula $cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ je aktivována nahrazením jednoho nebo dvou chloridových ligandů za ligandy vody díky výrazně nižší vnitrobuněčné koncentraci chloridových aniontů (4–20 mM). Vytvoří se tak $cis-[Pt(NH_3)_2Cl(H_2O)]^+$ a $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ kationty, které jsou velmi reaktivní, jelikož voda je mnohem lepší odstupující skupina než Cl^- . Produkují se tak silné elektrofilní, které mohou reagovat s nukleofily, jako jsou např. sulfhydrylové skupiny proteinů či atomy dusíku na nukleových kyselinách. Kladný náboj těchto aquakomplexů tak zvyšuje jejich afinitu k negativně nabitě DNA molekule. *In vitro* studie dokázaly, že monohydratovaný platinový komplex je více reaktivní při vazbě na DNA než dihydratovaný komplex (Ghosh, 2019; Andrezálová & Országhová, 2021). Hydrolytická reakce je rychlost limitujícím krokem pro vazbu DNA, kdy poločas reakce jsou asi 2 h (Jamieson & Lippard, 1999).

2.2.1.2 Mechanismus účinku

Při projevu protinádorových účinků je hlavním cílem cisplatinou vazba s DNA. Nejčastěji tvoří cisplatina kovalentní vazbu mezi dvěma sousedícími guaniny na jednom vlákně molekuly DNA (60–65 % všech aduktů). 20–25 % všech aduktů cisplatinou s DNA tvoří vazba mezi přilehlým adeninem a guaninem na jednom vlákně DNA (1,2-vnitrořetězcové adukty). Dále se také cisplatina může vázat na jednom vlákně na dva nesousedící guaniny (1,3-vnitrořetězcové adukty), vytvářet mezivláknové a DNA-Pt-proteinové adukty, nebo se může vázat pouze na guanin na jednom vlákně (Andrezálová & Országhová, 2021).

Vyjmenované adukty cisplatinou s DNA jsou zobrazeny na Obr. 2. Ve všech uvedených případech se hydratovaná cisplatina váže na *N7* atom/atomy purinových bází (Jamieson & Lippard, 1999). Vazba na *N7* atomy není překvapivá, jelikož tato místa jsou nejvíce elektronově bohatá a také nejvíce dostupná pro elektrofilní atak. Nachází se ve velkém žlábků molekuly DNA a nepodílí se na párování bází pomocí vodíkových můstků (Pizarro & Sadler, 2009).



Obr. 2: Schematické znázornění aduktů cisplatiny s DNA. Jedná se o 1,2-vnitrořetězcový GG adukt (a), 1,2-vnitrořetězcový AG adukt (b), 1,3-vnitrořetězcový GXG adukt (c), monoadukt (d), meziřetězcový GG adukt (e) a adukt DNA-cisplatina-protein (f). Obrázek převzat z Brabec et al., 2017.

Stále se vedou debaty o tom, které adukty cisplatiny s DNA mají největší význam při usmrcení nádorové buňky. Většina odborníků se shoduje na tom, že 1,2-vnitrořetězcové adukty vyvolávají cytotoxicitu lépe než 1,3-vnitrořetězcové adukty. Tento argument podporuje fakt, že enzymy opravující poškození DNA jsou schopny lépe odstranit 1,3-adukty (Ghosh, 2019).

Vazba cisplatiny na DNA vede k narušení sekundární struktury této molekuly, kdy dochází např. k lokálnímu rozvinutí či ohybu helixu (stupeň ohnutí závisí na typu aduktu). Tyto strukturní změny jsou důležitým faktorem protinádorové aktivity cisplatiny (Andrezálová & Országhová, 2021).

2.2.1.3 Vazba s některými proteiny

Inhibice replikace a transkripce DNA cisplatinou je pouze jedním z mechanismů protinádorové aktivity této látky, důležité je také rozpoznání aduktů s DNA buněčnými proteiny (Brabec et al., 2017).

Snahou buňky je vzniklé poškození DNA opravit pomocí NER (z anglického nucleotide excision repair) a MMR (z anglického mismatch repair) proteinů. NER systém obsahuje 17 různých proteinů, které rozpoznávají vnitrořetězcové adukty Pt-DNA a poté odstraní 20 až 29 párů bází v molekule DNA. Pokud se buňce nepodaří opravit poškození, nastane apoptóza (Ghosh, 2019).

Některé HMG (z anglického high mobility group) proteiny rozpoznávají vazbu cisplatinu na DNA. HMG1 protein selektivně rozpoznává 1,2-cisplatinu-DNA adukt, váže se na něj a je schopen jej chránit před opravami (Ghosh, 2019). TBP protein

(z anglického TATA-binding protein) se s vyšší specifitou váže na DNA, která je poškozena cisplatinou, než na TATA box, což vede k inhibici *in vitro* transkripce (Pizarro & Sadler, 2009).

2.2.1.4 Rezistence a nežádoucí účinky

Rezistence souvisí se změnami v buněčném vstřebávání, zvýšenou biotransformací a detoxifikací v játrech, inaktivací léčiva připojením na proteiny, zvýšením oprav DNA a zvýšením anti-apoptických mechanismů, ale je také spojena s polyklonálním charakterem nádoru (Dasari & Tchounwou, 2014; Ghosh, 2019).

Nežádoucími vedlejšími účinky při použití cisplatiny jsou nefrotoxicita, protože 90 % veškeré exkrece cisplatiny se děje prostřednictvím ledvin, dále ototoxicita (díky nevratné změně vlasových buněk v Cortiho orgánu), hepatotoxicita či také gastrointestinální toxicita (nauzea a zvracení) a mnohé další (Dilruba & Kalayda, 2016; Ghosh, 2019).

2.2.2 Karboplatina

Mechanismus účinku karboplatiny je podobný cisplatině, ale díky tomu, že obsahuje stabilnější cyklobutandikarboxylátový ligand, reaguje s nukleofily v menším rozsahu než cisplatinou a nevykazuje výraznou nefrotoxicitu (Pizarro & Sadler, 2009).

Karboplatina vytváří podobné spektrum DNA aduktů jako cisplatinou, formuje je však mnohem pomaleji (Brabec et al., 2017). Tato látka je schopna nahradit cisplatinu při kombinované léčbě rakoviny vaječníku (s chemoterapeutikem paclitaxel) díky své schopnosti snížit vedlejší účinky (Dilruba & Kalayda, 2016).

2.2.3 Oxaliplatina

Oxaliplatina byla poprvé syntetizována roku 1978 (Pizarro & Sadler, 2009). Většinou je podávána v kombinaci s 5-fluorouracilem a leucovorinem pro léčbu metastazujícího kolorektálního karcinomu. V porovnání s cisplatinou jsou u oxaliplatiny dvě aminové skupiny nahrazeny *trans*-1,2-diaminocyklohexanem a chloridové ligandy jsou vyměněny za oxalátové skupiny (Brabec et al., 2017).

Oxaliplatina netvoří DNA adukty tak dobře jako cisplatinou, i přesto vykazuje tato látka podobnou nebo dokonce vyšší cytotoxicitu v několika lidských nádorových buněčných liniích. Oxaliplatina tak inhibuje buněčný růst stejně jako cisplatinou, i když nezpůsobuje tak velké poškození DNA (Brabec et al., 2017).

U oxaliplatinu dochází po vytvoření aduktů s DNA k ohybu této nukleové kyseliny o jiný úhel, než je tomu u cisplatinu, proto tyto adukty mohou být rozpoznávány jinými vnitrobuněčnými proteiny a oxaliplatinu tak může být aktivní i v buněčných liniích, které jsou na cisplatinu rezistentní (Pizarro & Sadler, 2009). Konformační změny DNA způsobené meziřetězcovými vazbami oxaliplatinu hrají významnější roli v protinádorovém účinku než stejné vazby vytvořené cisplatinou (Brabec et al., 2017).

2.2.4 Nedaplatina, lobaplatina a heptaplatina

Stejný mechanismus účinku jako u karboplatiny je očekáván i u nedaplatiny, u níž jsou jako nosné ligandy opět použity aminové skupiny (Pizarro & Sadler, 2009). Použití tohoto léčiva je povoleno pouze v Japonsku pro léčbu malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic, nádorových onemocnění hlavy, krku a jícnu. Mezi další léčiva na bázi platiny se řadí lobaplatina, která je schválena pro použití pouze v Číně pro léčbu metastazujícího karcinomu prsu, chronické myeloidní leukémie a malobuněčného karcinomu plic, a heptaplatina, která je povolena pouze v Jižní Koreji pro léčbu karcinomu žaludku (Dilruba & Kalayda, 2016).

2.3 Komplexy na bázi Ru a Os

Rezistence a vedlejší účinky cisplatinu jsou hlavním limitujícími faktory použití tohoto léčiva, a proto je snaha syntetizovat nové komplexní sloučeniny obsahující jako centrální atom nejen platinu, ale také ruthenium, osmium, rhodium či měď (Andrezálová & Országhová, 2021).

Komplexy na bázi ruthenia a osmia byly nejprve navrženy tak, aby napodobovaly mechanismus účinku komplexů obsahujících platinu. Dnes je známo, že komplexy s Ru a Os mají velký potenciál jako cytotoxická léčiva a vykazují jiný mechanismus účinku než konvenční chemoterapeutika (Meier-Menches et al., 2018).

2.3.1 Ruthenium jako centrální atom

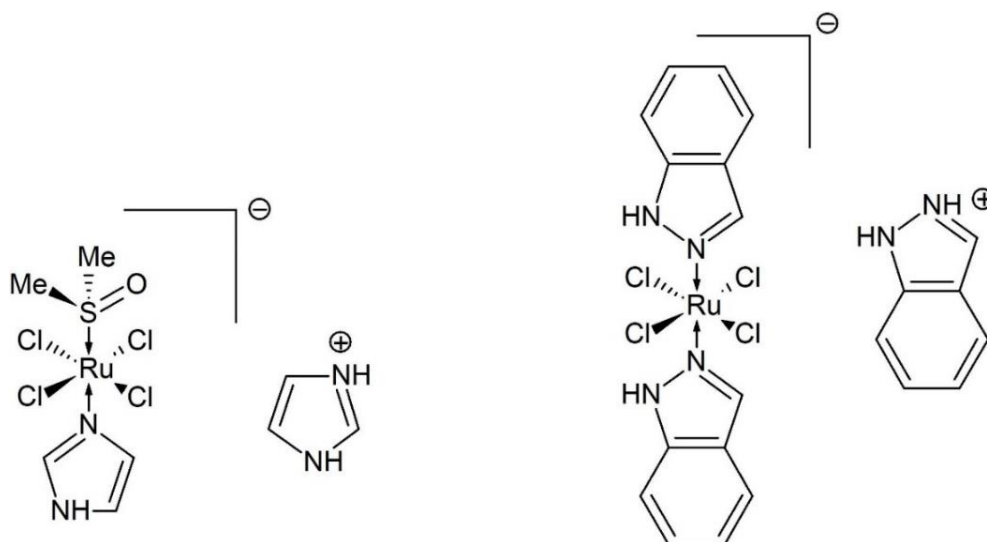
Za fyziologických podmínek je ruthenium stabilní ve dvou oxidačních stavech, a to jako ruthenatý a ruthenitý kation, které vytváří oktahedrální konfiguraci (Lee et al., 2020). Naproti tomu platnaté komplexy mají čtvercově planární geometrii, z čehož lze usuzovat na jiný mechanismus účinku (Brabec & Nováková, 2006).

2.3.1.1 NAMI-A a KP1019

NAMI-A a KP1019 jsou koordinační sloučeniny na bázi ruthenia, které mají podobnou strukturu (viz Obr. 3) (Alessio & Messori, 2019). KP1019 působí přímo na primární nádorové buňky, a to především u nemalobuněčného karcinomu plic či kolorektálního karcinomu, a jeho hlavním mechanismem účinku pravděpodobně není vazba na DNA (Andrezálová & Országhová, 2021). KP1019 se právě nachází ve fázi klinického testování (Paprocka et al., 2022).

Léčivo NAMI-A vstoupilo do fáze 1 klinického testování v roce 1999 jako vůbec první látka na bázi ruthenia, která kdy byla testována na lidech. V další fázi testování bylo NAMI-A použito v kombinaci s gemcitabinem u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Bylo však zjištěno, že tato terapie je u pacientů méně účinná než gemcitabin samotný. Léčba NAMI-A byla označena za nedostatečně efektivní a v dalším testování se nepokračuje (Alessio & Messori, 2019).

Při studiu interakcí NAMI-A s DNA bylo zjištěno, že tato látka je méně cytotoxická než cisplatina, což podporuje fakt, že množství 1,2-GG a 1,2-GA meziřetězcových aduktů vytvořených NAMI-A je mnohem menší (Brabec & Nováková, 2006). Proto vazba na DNA není považována u NAMI-A za klíčovou vlastnost zodpovědnou za její cytotoxickou aktivitu vůči metastázám (Brabec & Kašpárková, 2018).

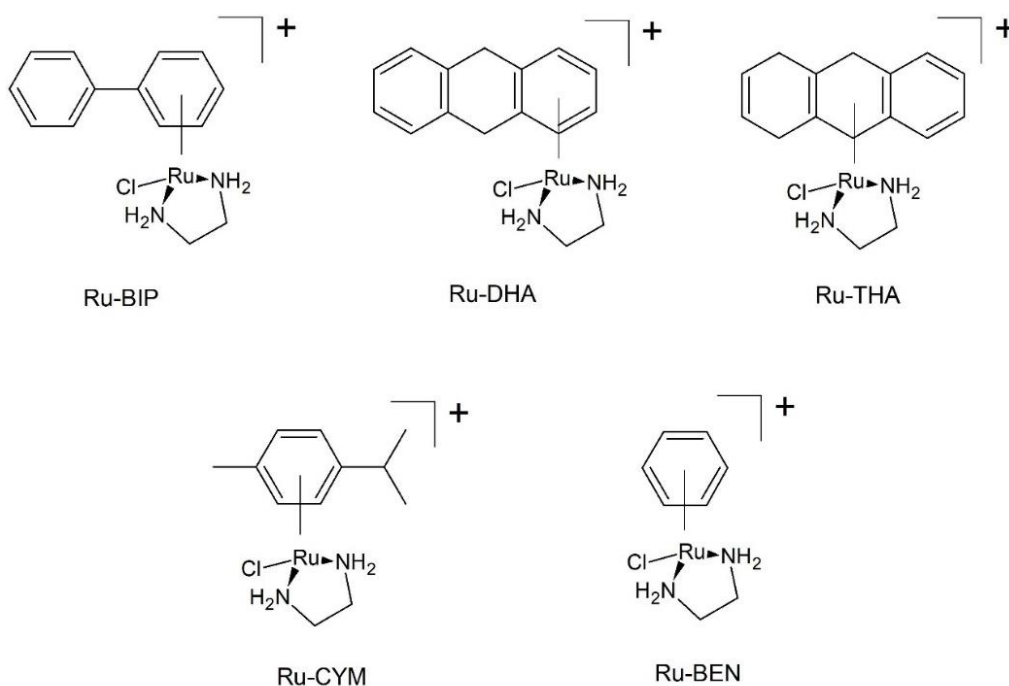


Obr. 3: Struktura NAMI-A, [ImH][trans-RuCl₄(DMSO)(Im)] (Im=imidazol) (vlevo) a KP1019, [InH][trans-RuCl₄(In)₂] (In=indazol) (vpravo)

2.3.1.2 Ru(II) komplexy obsahující areny

Koordinační sloučeniny o obecném vzorci $[(\eta^6\text{-aren})\text{Ru}(\text{II})(\text{en})(\text{Cl})]^+$, kde en znamená ethylendiamin a aren je zkratkou pro bifenyl (BIP), dihydroantracen (DHA), tetrahydroantracen (THA), *p*-cymen (CYM) a benzen (BEN), jejichž struktura je znázorněna na Obr. 4, se přednostně váží na *N7* atom guaninu na dvoušroubovici DNA, která je pravděpodobně hlavním cílem pro tyto komplexy. Komplex Ru-BIP je v některých studiích (Hanif et al., 2014) označován jako RM175. Vazba na DNA pro komplexy obsahující BIP, DHA nebo THA sestává jednak z koordinace na *N7* atom guaninu a také z hydrofobní interakce mezi ligandem arenu a DNA, která může zahrnovat vmezeření komplexu nebo jeho vazbu na malý žlábek v molekule DNA (Nováková et al., 2003).

Komplexní sloučenina Ru-CYM se není schopna vmezeřit do molekuly DNA, vytváří tak koordinační vazby mezi rutheniem a *N7* atomem guaninových bází. Tento komplex se také váže na DNA pomaleji než cisplatina (Nováková et al., 2003). Aduktý komplexních sloučenin obsahujících CYM více narušují konformaci a destabilizují dvoušroubovici DNA než komplexy obsahující tři aromatické cykly (Brabec & Nováková, 2006).



Obr. 4: Struktura komplexních sloučenin o obecném vzorci $[(\eta^6\text{-aren})\text{Ru}(\text{II})(\text{en})(\text{Cl})]^+$, kde en znamená ethylendiamin a aren je zkratkou pro bifenyl (BIP), dihydroantracen (DHA), tetrahydroantracen (THA), *p*-cymen (CYM) nebo benzen (BEN).

2.3.1.3 Další komplexy obsahující Ru

Cis- a *trans*-[Ru(II)(DMSO)₄Cl₂] jsou komplexy obsahující dimethylsulfoxid a vykazující schopnost vazby na DNA. I když *cis*-izomer této sloučeniny je strukturně podobný cisplatině, *trans*-izomer se na DNA váže s větší efektivitou. *Trans*-izomer je také schopný inhibovat RNA syntézu, zatímco *cis*-izomer ne (Brabec & Nováková, 2006).

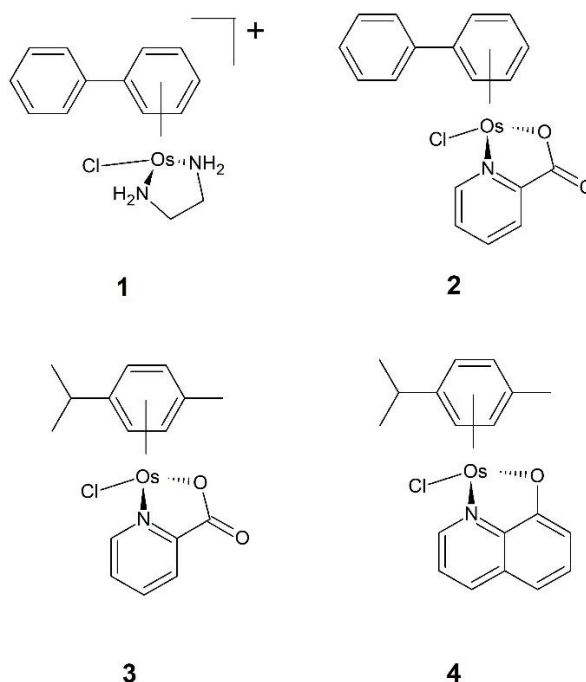
Mezi další koordinační sloučeniny s rutheniem patří látky obsahující jako ligand polypyridyl, jež se interkalují do molekuly DNA (Brabec & Kašpárková, 2018). Zajímavostí je, že v březnu roku 2017 látka s označením TLD1433 obsahující polypyridyl vstoupila do klinického testování (Monro et al., 2019). Protinádorovou aktivitu vykazují také některé dvoujaderné Ru(II) komplexy, které, kromě meziřetězcových a vnitřetězcových vazeb v jedné molekule DNA, vytváří také příčné vazby mezi dvěma dvoušroubovicemi DNA a také mezi proteiny a DNA, což je vlastnost, která není pozorována u žádných jiných protinádorových komplexů s rutheniem (Brabec & Kašpárková, 2018).

2.3.2 Osmium jako centrální atom

Koordinační sloučeniny obsahující osmium jsou považovány za alternativu ke komplexům s rutheniem díky tomu, že jsou relativně inertní a dostatečně stabilní za fyziologických podmínek (Hanif et al., 2014).

2.3.2.1 Os(II) komplexy obsahující areny

Kostrhunová et al. (2008) se zabývali Os(II) koordinačními sloučeninami a jejich schopností vazby na DNA. Pro svou studii vybrali čtyři komplexy (viz Obr. 5), kdy jedním z nich je Os(II) analog komplexní sloučeniny Ru-BIP (RM175). Vzorce zkoumaných komplexů jsou $[(\eta^6\text{-bifenyl})\text{Os(II)}(\text{ethylendiamin})(\text{Cl})]^+$ (**1**), $[(\eta^6\text{-bifenyl})\text{Os(II)}(\text{pikolinát})(\text{Cl})]$ (**2**), $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymen})\text{Os(II)}(\text{pikolinát})(\text{Cl})]$ (**3**), $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymen})\text{Os(II)}(\text{oxinát})(\text{Cl})]$ (**4**). Zjistili, že komplex **1** se na DNA váže 28x pomaleji než jeho Ru(II) analog. Tato pomalejší kinetika však může být výhodnější, protože komplex s Ru je reaktivnější a náchylnější k deaktivaci díky interakci s jinými biomolekulami před tím, než dosáhne cílové molekuly DNA. Na DNA se komplex **1** váže podobným způsobem jako Ru(II) analog – selektivně se váže na guaniny (Kostrhunová et al., 2008).



Obr. 5: Struktura Os(II) komplexních sloučenin obsahujících areny: $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{Os}(\text{II})(\text{ethylenediamin})(\text{Cl})]^+$ (1), $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{Os}(\text{II})(\text{pikolinát})(\text{Cl})]$ (2), $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymen})\text{Os}(\text{II})(\text{pikolinát})(\text{Cl})]$ (3), $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymen})\text{Os}(\text{II})(\text{oxinát})(\text{Cl})]$ (4)

Dále se v práci Kostrhunová et al. (2008) uvádí, že na rozdíl od cisplatiny všechny Os(II) komplexy zkoumané v této práci nezpůsobily ohnutí DNA, které hraje významnou roli při cytotoxickém účinku cisplatiny, což naznačuje, že mechanismus účinku Os(II) komplexů je jiný. Komplexy 1, 2 a 3 byly schopny rozvinout vlákna dvoušroubovice DNA více než komplexy s Ru, což se na elektroferogramu projevilo jako nezaostřený pás o nejasné velikosti. Tyto komplexy se na DNA mohou vázat jednak pomocí nekovalentních vazeb, jednak pomocí interkalačních či koordinačních vazebných módů. Stejní autoři zkoumali také cytotoxicitu těchto komplexů. Zjistili, že komplex Os-BIP vykazuje vysokou aktivitu u linie buněk rezistentních na cisplatinu. Komplex 4 neinteragoval s DNA stejně jako ostatní komplexy. Tato koordinační sloučenina nebyla schopna rozvinout dvoušroubovici DNA, což pravděpodobně značí, že se na DNA neváže pomocí nekovalentních vazeb (Kostrhunová et al., 2008).

2.3.3 Komplexy s biologicky aktivním substituentem

V této práci byly pro studium vlivu koordinačních sloučenin na DNA použity komplexy s Ru a Os obsahující biologicky aktivní substituent. Tyto komplexy nabízí nejen možnost vylepšení terapeutického efektu, ale také možnost snížení dávky při distribuci do organismu (nižší toxicita pro organismus). Kombinovaný mechanismus působení je

výhodný k překonání vnitřní rezistence, stejně tak k zabránění vzniku získané rezistence. Důležitá je dostatečná stabilita daných komplexů z toho důvodu, aby se dvě (nebo více) biologicky aktivních forem dostalo do cílové buňky (Štarha & Trávníček, 2019).

Tyto protinádorové komplexy mohou uvolňovat bioaktivní ligand a cytotoxickou formu obsahující kov, mohou uvolňovat pouze bioaktivní ligand z inaktivní formy obsahující kov (komplex představuje nosič léčiva) nebo nemusí uvolňovat bioaktivní ligand vůbec (Štarha & Trávníček, 2019). Disociace biologicky aktivního ligandu může být aktivována redukcí, interakcí se specifickým enzymem či viditelným světlem (Renfrew, 2014).

2.4 Testování biologické aktivity potenciálních protinádorových sloučenin

Jak již bylo uvedeno v Úvodu, nově připravené komplexní sloučeniny musí být podrobeny nejrůznějším měřením biologické aktivity. Jedná se zejména o stanovení cytotoxicity *in vitro*, studium apoptózy, detekci reaktivních forem kyslíku (ROS) či studium interakcí s DNA (pomocí agarosové elektroforézy, mikroskopie atomárních sil či fluorescenční emisní spektrometrie) (Zhao et al., 2019). Agarosová elektroforéza je blíže popsána v souvislosti s provedenými experimenty v kapitole 3.5.2. Uvedený výčet metod není vyčerpávající, jejich popis však přesahuje rozsah této práce.

Test cytotoxicity je jednou z nejdůležitějších metod pro zhodnocení biologické aktivity. Používá tkáňové buňky *in vitro* k pozorování buněčného růstu, dělení či morfologických změn (Li et al., 2015). Pro stanovení *in vitro* cytotoxicity slouží MTT test (MTT je zkratkou pro 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), test laktát dehydrogenasové aktivity, test životaschopnosti buněk neutrální červení nebo také test stanovení obsahu proteinů v živých buňkách pomocí Bradfordovy metody (Fotakis & Timbrell, 2006).

Další možnost testování biologické aktivity se např. opírá o stanovení apoptózy a kvantifikuje se nejčastěji pomocí průtokové cytometrie. Analýza tohoto mechanismu využívá dějů, které jsou spojovány s tímto procesem. Jedná se o translokaci látek na plasmatické membráně, aktivaci kaspas či o rozklad DNA endonukleasami (McKinnon, 2018).

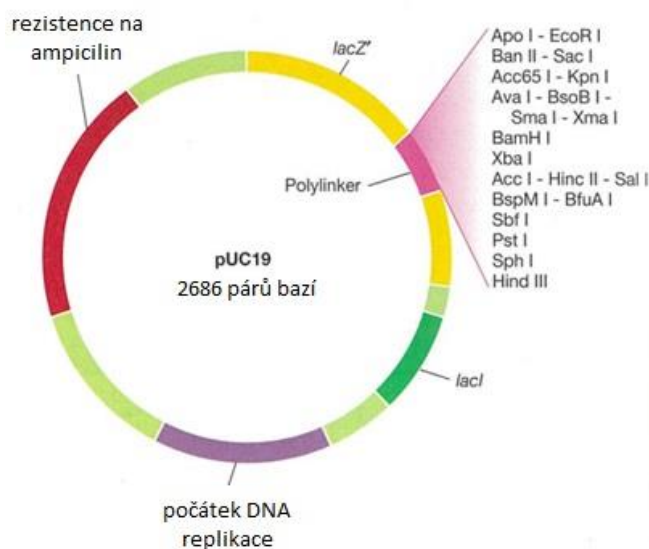
2.5 Testování interakcí potenciálních protinádorových sloučenin s DNA

Zjištění, že hlavním cílem cisplatiny po vstupu do organismu je molekula DNA, vedlo k tomu, že u nově připravených komplexních sloučenin s Ru a Os byly nejprve testovány právě jejich interakce s DNA (viz původní články Nováková et al., 2003; Kostrhunová et al., 2008). Tato práce se zabývá dvěma metodami studia interakcí komplexních sloučenin s DNA, a to detekcí nukleasové aktivity komplexních sloučenin (viz kapitola 2.6) a studiem změn v mobilitě plasmidové DNA v agarosovém gelu po interakci s komplexy. Experimenty mají za cíl co nejvíce prozkoumat vazebné možnosti komplexů na molekulu DNA.

2.5.1 Vlastnosti plasmidové DNA a její příprava pro studium vazebných interakcí s cytostatiky

Komplexní sloučeniny mohou s DNA interagovat různě (Pages et al., 2015) – viz kapitola 2.5.2. Pro charakterizaci vazebných interakcí slouží jako model DNA plasmidová DNA, která je dostatečnou náhradou genomické DNA. Plasmidy jsou stabilní molekuly, které se replikují nezávisle na chromosomální DNA hostitele a díky své relativně malé velikosti i velmi rychle. Plasmidy se běžně používají jako klonovací vektory. Genomická DNA naproti tomu má větší velikost a nelze ji použít jako klonovací vektor (Madigan et al., 2009).

Většina izolované plasmidové DNA se nachází v superhelikální formě (SC forma). V buňce je však většinou ve formě cirkulární, někdy i lineární. Plasmidy obsahují geny, které zajišťují jejich vlastní replikaci. Přestože neobsahují geny nezbytné pro hostitele, mohou nést informace ovlivňující fenotyp hostitele. Nejrozšířenější a nejvíce studovanou skupinou jsou plasmidy udělující hostiteli schopnost rezistence k antibiotikům a jiným růstovým inhibitorům, což činí selekci klonů obsahujících daný plasmid jednodušší. Jedním z klasických plasmidů používaných v klonování je plasmid pUC19, jehož struktura je znázorněna na Obr. 6 (Madigan et al., 2009).



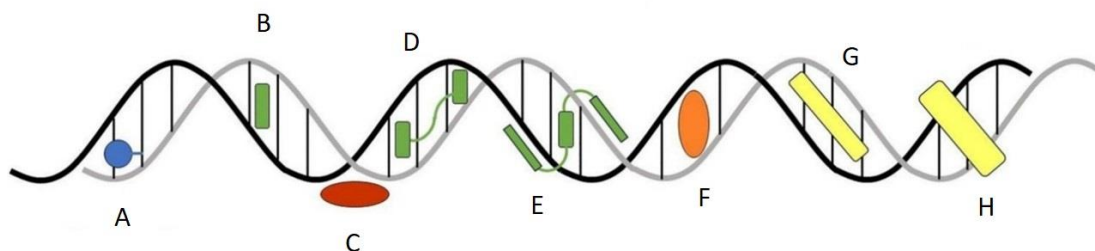
Obr. 6: Mapa plasmidu pUC19. Obsahuje geny kódující rezistenci k antibiotiku ampicilinu. Uvnitř genu *lacZ* je klonovací místo, které může být naštěpeno restričními endonukleasami, a do kterého může být vložen zvolený insert. Pro kontrolu transformace se využívá blue-white screening, který využívá genu *lacZ* a jeho schopnosti produkovat β -D-galaktosid galaktohydrolasu (β -galaktosidasa, EC 3.2.1.23). Obrázek upraven podle Madigan et al, 2009.

Pro experimenty vyžadující DNA lze tuto molekulu nejen klonovat v hostitelském organismu (Miles & Wolf, 1989), ale lze také různě dlouhé oligonukleotidy *de novo* syntetizovat (Song et al., 2021). *Escherichia coli* je jednou z nejčastěji používaných bakterií pro produkci plasmidové DNA (Miles & Wolf, 1989). Při přípravě plasmidu pomnožením v hostitelské buňce je DNA různými způsoby methylována. To proto, že bakterie obsahují restriční modifikační systém, jež rozpoznává vlastní methylovanou DNA a cizí nemethylovanou DNA, kterou odstraňují za pomoci restričních endonukleas (Johnston et al., 2019).

Existuje mnoho kmenů *E. coli* – např. DH5 α , FHK12, GM124, JM108 či K12 3000. Velmi používaným je kmen TOP10, který je rezistentní na streptomycin. Kmen Top10F' je navíc oproti kmenu TOP10 rezistentní na tetracyklin (https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes).

2.5.2 Způsoby interakce komplexu s DNA

Existuje mnoho způsobů, kterými se mohou komplexy na DNA vázat (viz Obr. 7). O některých z nich bylo pojednáno v souvislosti s konkrétními koordinačními sloučeninami již v kapitolách 2.2 a 2.3. Výhodou komplexů je jejich variabilita, která může být dána typem kovu, jeho oxidačním stavem, koordinovanými ligandy či velikostí a tvarem komplexu (Andrezálová & Országhová, 2021).



Obr. 7: Možnosti vazby komplexní sloučeniny na molekulu DNA. Koordinačně-kovalentní vazba (A), vmezeření sloučeniny mezi páry bází (B), elektrostatické interakce (C), bisinterkalace (D), vláknitá interkalace (z anglického threading intercalation) (E), inserce (F), vazba na malý žlábek (G), vazba na velký žlábek (H). Obrázek upraven podle Andrežalová & Országhová, 2021.

Komplexní sloučeniny se mohou na DNA vázat kovalentně (např. cisplatina) nebo nekovalentně pomocí vratné vazby, a to díky vmezeření sloučeniny, elektrostatickým interakcím se záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou nebo interakcím s velkým či malým žlábkem na molekule DNA (Strekowski & Wilson, 2007). Jednotlivé způsoby interakce (viz Obr. 7) jsou popsány dále.

2.5.2.1 Interkalativní vazba

Jedná se o typ nekovalentní vazby. Dochází k vmezeření planárního aromatického kruhu mezi páry bází v molekule DNA. Lerman (1961) popsal jako první tento typ vazby, čímž vysvětlil silnou afinitu jistých heterocyklických aromatických barviv k DNA. Interkalaci doprovází stabilizace, prodloužení či rozvinutí molekuly DNA. Úhel, o který dojde k rozvinutí dvou vláken, závisí na typu sloučeniny (např. ethidiový kation rozvine DNA o 26°) (Strekowski & Wilson, 2007).

U některých komplexů se může jejich aromatická část vmezeřit mezi DNA báze, zatímco druhý ligand interaguje se žlábkem na DNA. Příkladem takovýchto sloučenin s duálním módem interakce jsou polosendvičové Ru(II)-aren komplexy (Andrežalová & Országhová, 2021).

Některé komplexní sloučeniny se mohou vázat na DNA pomocí vláknité interkalace (z anglického threading intercalation), kdy se aromatická část komplexu vmezeří mezi páry bází a ostatní substituenty stejné sloučeniny interagují s malým a zároveň i velkým žlábkem (Strekowski & Wilson, 2007).

Tzv. bisinterkalace je vmezeření mezi dva páry bází v molekule DNA. Sloučeniny, které se na DNA vážou tímto způsobem mají dva planární aromatické kruhy kovalentně spojené např. uhlovodíkovým řetězcem o různé délce. Tito tzv. bisinterkalátoři se často

vážou na DNA s větší afinitou než sloučeniny, které se vmezeřují pouze jedním aromatickým ligandem (Andrezálová & Országhová, 2021).

2.5.2.2 Další typy vazeb

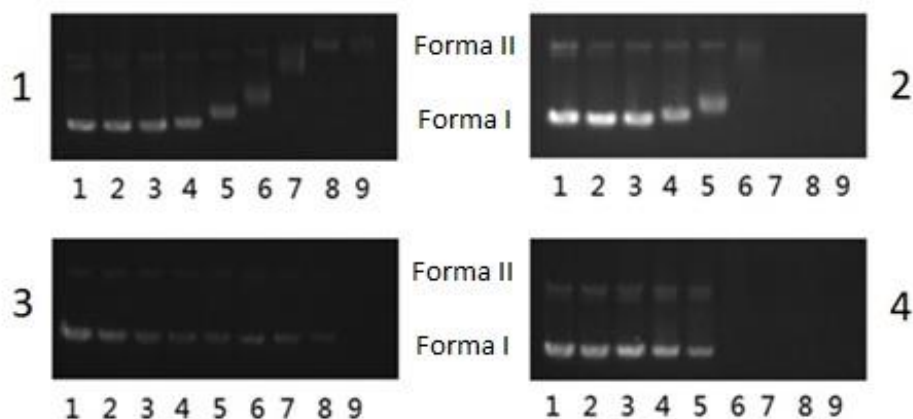
Inserce je dalším typem vazby komplexních sloučenin na molekulu DNA. Rozdíl mezi sloučeninami s tímto typem vazby a interkalátory je ten, že interkalátoři se vmezeřují mezi páry bází, aniž by je narušily, zatímco sloučeniny, které se insertují, pár bází v molekule DNA nahradí. Některé komplexy na bázi rhodia se na DNA vážou pomocí tohoto unikátního typu vazby (Zeglis et al., 2007).

Vazba na žlábký na molekule DNA je stabilizována elektrostatickými silami, van der Waalsovými silami, hydrofobními interakcemi a vodíkovými vazbami. S velkým žlábkem většinou interagují velké molekuly proteinů, zatímco s malým žlábkem menší molekuly (Andrezálová & Országhová, 2021).

2.5.3 Testování změny v mobilitě plasmidové DNA po interakci s komplexy

Jak je uvedeno výše, komplexní sloučeniny mohou interagovat s DNA pomocí koordinačně-kovalentní vazby, elektrostatických interakcí či vmezeřením mezi páry bází v molekule DNA (vazebné možnosti jsou zkoumány např. v člancích Fang et al., 2013; Zhao et al., 2019). Tyto interakce je možné detekovat díky změně v mobilitě plasmidové DNA při agarosové elektroforéze.

Zhao et al. (2019) studovali dvoujaderné Ru(II) komplexy, jejichž elektroferogramy jsou znázorněny na Obr. 8. Pro koordinační sloučeniny **1** a **2** je patrný pokles rychlosti migrace superhelikální formy plasmidu pBR322, což značí kovalentní vazbu komplexů k plasmidové DNA. Pro komplexy **3** a **4** nebyla pozorována změna v mobilitě u žádné z testovaných koncentrací. Pro všechny komplexy platí, že intenzita fragmentů se se zvyšující se koncentrací komplexu snižovala, což podle autorů naznačuje, že se komplexy vmezeřují do DNA místo interkalačního barviva ethidium bromidu. Pozorovaný posun v mobilitě je způsoben vyšší relativní molekulovou hmotností DNA s navázaným komplexem. Zhao et al. (2019) na základě provedené agarosové elektroforézy odvozují, že komplexy **1** a **2** se na DNA váží kovalentně, zatímco komplexy **3** a **4** se do DNA vmezeřují.



Obr. 8: Elektroferogramy znázorňující změnu mobility plasmidu pBR322, který byl inkubován s různými koncentracemi Ru(II) komplexů. Dráha 1-9: komplex (0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 a 1280 μM) + DNA. Forma I plasmidové DNA odpovídá superhelikální formě, forma II plasmidu odpovídá otevřené kruhové formě. Obrázek upraven podle Zhao et al., 2019.

2.6 Testování nukleasové aktivity potenciálních protinádorových sloučenin

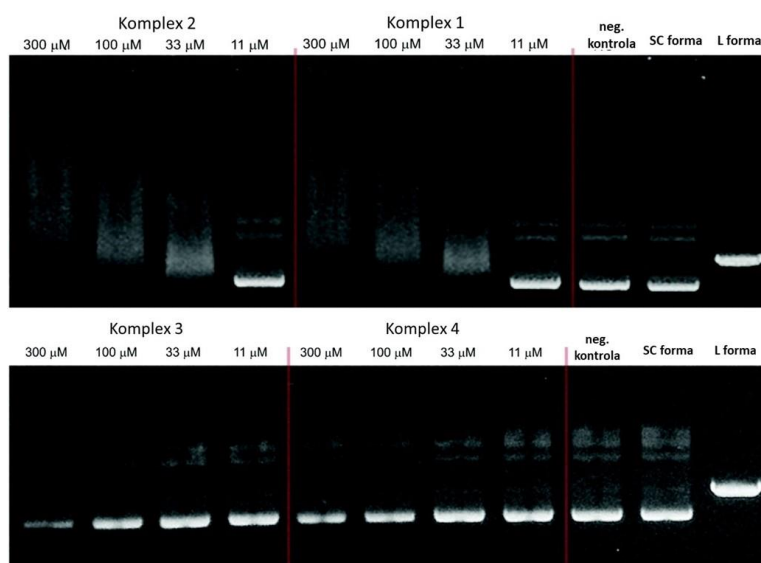
Koordinační sloučeniny se nemusí na molekulu DNA pouze vázat, ale mohou také vykazovat nukleasovou aktivitu, tedy schopnost štěpit molekulu DNA. Komplexy se pak označují jako tzv. umělé nukleasy, které mohou DNA štěpit hydrolyticky nebo oxidativně. Oxidativní štěpení obvykle zahrnuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (Yu & Cowan, 2018).

Pokud je superhelikální forma plasmidové DNA štěpena na jednom vlákně (anglicky se toto štěpení označuje jako „nicking“), dochází k vytvoření uvolněné otevřené kruhové formy plasmidu (z anglického open circular form, též se označuje jako „nicked form“, OC forma). Pokud je štěpeno i komplementární vlákno přibližně do vzdálenosti 16 bp od štěpu na prvním vlákně, vytvoří se lineární plasmidová DNA (L forma) (viz Obr. 9). V agarosovém gelu se nejrychleji pohybuje superhelikální forma, pak lineární forma a nejpomalejší je otevřená kruhová forma plasmidové DNA (Ragheb et al., 2015). Pokud nejsou na elektroferogramu pozorovány žádné fragmenty, dochází podle Vančo, et al. (2021) k úplnému štěpení molekuly DNA na nukleotidy, které nemohou být detekovány.



Obr. 9: Konformace plasmidové DNA

Historicky se většinou interakce komplexů s DNA studovaly v kombinaci s nukleasovou aktivitou v závislosti na koncentraci. Massoud et al. (2016) ve své práci zkoumali interakce dvoujaderných Ni(II) komplexů (**1** a **2**) a Cu(II) komplexů (**3** a **4**) s DNA. Z Obr. 10 podle autorů vyplývá, že komplexy **1** a **2** rozvinuly plasmidovou DNA, což lze na elektroferogramu pozorovat jako nezaostřený pás o nejasné velikosti. Komplexy **3** a **4** nevykazovaly podle autorů žádnou nukleasovou aktivitu. Snížení intenzity fragmentu odpovídajícího SC formě plasmidu u nejvyšší koncentrace je pravděpodobně způsobeno vmezeřením komplexu mezi páry bází namísto ethidium bromidu. Massoud et al. (2016) provedli experimenty také v přítomnosti vychytávačů volných radikálů či chelatujícího činidla EDTA pro lepší porozumění mechanismu účinku komplexních sloučenin při interakci s DNA (vliv vychytávačů ROS podrobněji rozebrán v části Výsledky a diskuse v kapitole 4.2.1).

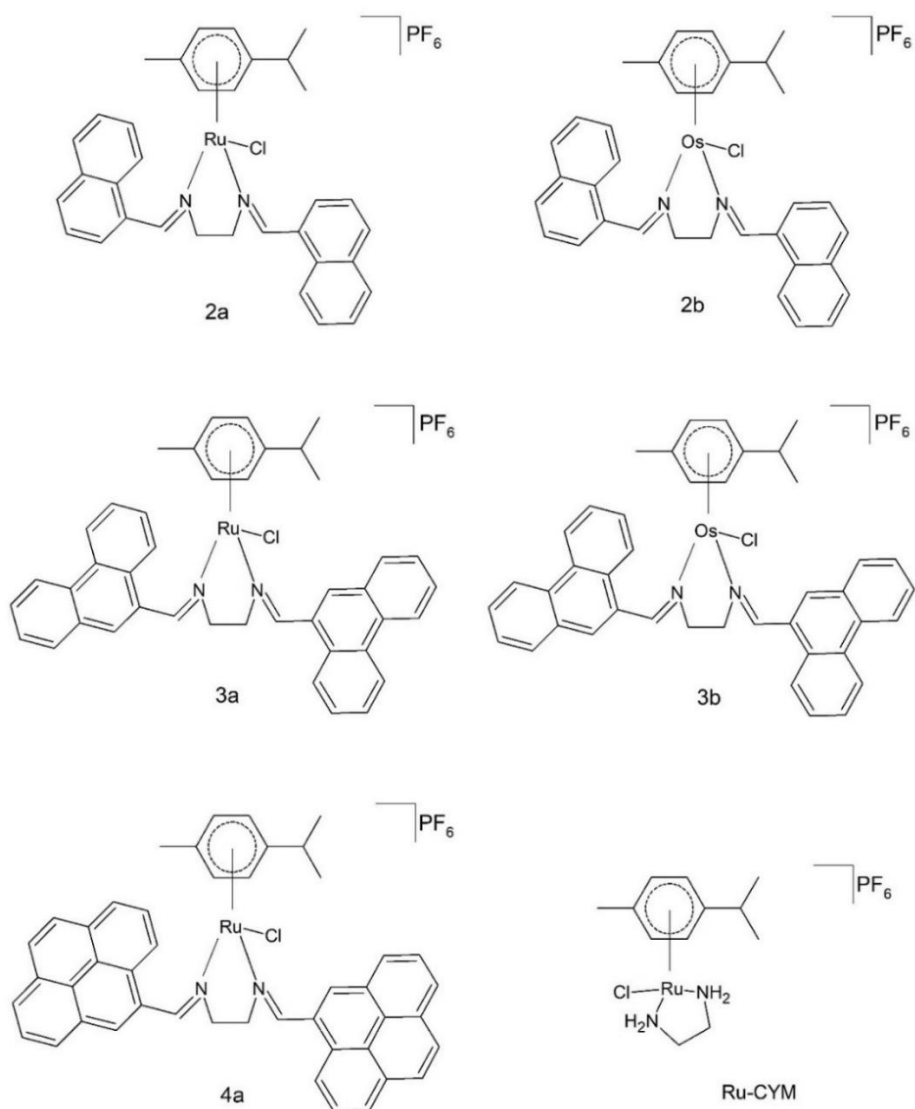


Obr. 10: Elektroferogramy znázorňující interakci komplexů **1**, **2**, **3** a **4** o koncentracích 11–300 μM s plasmidem pUC19 (koncentrace párů bází 23 μM). L forma plasmidu byla linearizována endonukleasou *HindIII*. Obrázek upraven podle Massoud et al., 2016.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Komplexní sloučeniny

V této práci byly studovány nově nasyntetizované komplexní sloučeniny $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{L})\text{Cl}]\text{PF}_6$ a $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{L})\text{Cl}]\text{PF}_6$ s různými ligandy, kde L^1 znamená N,N'-ethandiylbis(1-(1-naftyl)methanimin), L^2 je zkratkou pro N,N'-ethandiylbis(1-(9-fenantryl)methanimin) a L^3 znamená N,N'-ethandiylbis(1-(4-pyrenyl)methanimin). Vzorce těchto komplexů jsou uvedeny na Obr. 11. Dále byla pro experimenty použita cisplatina a komplex $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$, kde en je zkratkou pro ethylendiamin.



Obr. 11: Komplexní sloučeniny použité v této práci. $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{L}^1)\text{Cl}]\text{PF}_6$ (**2a**), $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{L}^1)\text{Cl}]\text{PF}_6$ (**2b**), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{L}^2)\text{Cl}]\text{PF}_6$ (**3a**), $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{L}^2)\text{Cl}]\text{PF}_6$ (**3b**), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{L}^3)\text{Cl}]\text{PF}_6$ (**4a**) a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (Ru-CYM).

3.2 Biologický materiál a reagentie pro molekulárně biologické metody

Pro molekulárně biologické metody bylo pracováno s bakteriální kulturou *Escherichia coli* kmen TOP10 nesoucí plasmid pUC19 (Thermo Fisher Scientific, USA). Dále byly použity tyto reagentie – 6x DNA Loading Dye a GeneRuler 1 kb DNA Ladder od firmy Thermo Fisher Scientific (USA), GelRed Nucleic Acid (Biotium, USA), *NdeI* spolu s puřrem NEB 2.1 (New England Biolabs, USA). Pro izolaci plasmidové DNA bylo pracováno s kitem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, SRN).

Byly použity také následující chemikálie od firmy Sigma-Aldrich (USA): glycerol, EDTA, kyselina octová, dimethylsulfoxid, ethanol, modř bromfenolová, Tris a voda prostá nukleas. Dále bylo pracováno se SeaKem LE agarosou (Lonza Group, CHE) a peroxidem vodíku (Sigma-Lachema, ČR).

3.3 Přístrojové vybavení a další pomůcky

- Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)
- SafeBlue Illuminator/Electrophoresis System, MBE-150 (Major Science, Taiwan)
- centrifuga Multi-Spin MSC-6000 (Biosan, USA)
- minicentrifuga (Benchmark, USA)
- vortex V-1 Plus (Biosan, USA)
- centrifuga 5418R (Eppendorf, SRN)
- magnetická míchačka Intelli-Stirrer MSH 300i (Biosan, USA)
- analytické váhy (Denver Instrument, USA)
- analytické váhy 440-35N (Kern & Sohn GmbH, SRN)
- laboratorní váhy PS 210.R2 (Radwag, Polsko)
- pH metr – pH 50 + DHS (XS Instruments, Indie)
- spektrofotometr Synergy microplate reader (Biotek Instruments, USA)
- inkubátor (Mettler, SRN)
- mikrovlnná trouba (Panasonic, JPN)
- elektroforetická cela B1A-10 s hřebínky (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.4 Roztoky pro agarosovou elektroforézu

- TA pufr
 - 20 mM Tris/kyselina octová pH=7,4 (roztok připraven 10x koncentrovaný)
- TAE pufr
 - 40 mM Tris/kyselina octová pH=8,0; 1,3 mM EDTA (roztok připraven 10x koncentrovaný)
- Nanášecí pufr
 - 60% (v/v) glycerol; 0,03% (w/v) bromfenolová modř

3.5 Metody

3.5.1 Izolace plasmidové DNA metodou přečištění na vrstvě silikátu

Plasmidová DNA byla izolována pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, SRN). Postup byl s modifikacemi prováděn podle protokolu výrobce (<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiaprep-spin-miniprep-kit/>).

Po izolaci plasmidové DNA je pro další práci nutné změřit její koncentraci. K tomuto účelu byl použit přístroj Synergy microplate reader, který přímo spektrofotometricky měří koncentraci dvouvláknové DNA při vlnových délkách 260 a 280 nm pomocí Gen5 softwaru (protokol dostupný na stránkách výrobce: <https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>).

3.5.2 Detekce vlivu cytostatik na DNA (agarosová elektroforéza)

Pro pozorování interakcí komplexních sloučenin a vybraných organických molekul s DNA byla provedena agarosová elektroforéza. Při studiu nukleových kyselin pomocí této metody dochází k pohybu záporně nabitě cukr-fosfátové kostry DNA ke kladně nabitě anodě (Pingoud et al., 2002). Elektroforéza probíhá za konstantního napětí (Sanderson et al., 2014).

V této práci byly vykonány dva experimenty zaměřující se na detekci nukleasové aktivity komplexních sloučenin a na pozorování změny v mobilitě plasmidu v agarosovém gelu po interakci s komplexy. Dvěma hlavními rozdíly mezi těmito experimenty je přidavek EDTA a kratší doba inkubace u experimentu pro pozorování

nukleasové aktivity. EDTA se do pufru přidává, protože chelatuje hořčičnaté kationty, čímž inaktivuje potenciální DNA nukleasy (Mg^{2+} je jejich esenciálním kofaktorem). Při pH okolo 8 jsou tři COOH skupiny na EDTA ve formě COO^- , čímž přispívají k vodivosti roztoku (Sanderson et al., 2014).

Byly použity nižší koncentrace agarosy, které separují fragmenty o vyšších molekulových hmotnostech (Pingoud et al., 2002), a to konkrétně 0,8% (w/v) agarosový gel v 1x TAE pufru pro detekci nukleasové aktivity a 1% (w/v) agarosový gel v 1x TA pufru pro experimenty stanovující změnu v mobilitě DNA v agarosovém gelu. Pro vizualizaci DNA fragmentů bylo použito barvivo GelRed (1,5/4 μ l podle velikosti gelu). Podle výrobce (<https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/>) se, na rozdíl od ethidium bromidu (Pingoud et al., 2002), nejedná o cytotoxické či mutagenní barvivo, protože neprochází buněčnou membránou a nemůže tak interagovat s DNA.

Pro porovnání velikostí fragmentů DNA byly použity 3 μ g markeru. Negativní kontrola obsahovala ve všech experimentech 250 ng plasmidu pUC19. Pro experiment stanovující nukleasovou aktivitu elektroforéza probíhala 60 min při 120 V za laboratorní teploty, zatímco pro experiment stanovující změnu v mobilitě plasmidové DNA elektroforéza probíhala 100 min při 90 V a při teplotě 4 °C. K vizualizaci fragmentů v agarosovém gelu byl gel vložen do přístroje Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad, USA).

3.5.2.1 Analýza nukleasové aktivity

Objemy všech reakčních směsí byly nastaveny na 10 μ l pomocí vody prosté nukleas. Do každé reakční směsi bylo přidáno 250 ng plasmidu pUC19. Pro přípravu reakčních směsí byly dále použity roztoky komplexních sloučenin 10x koncentrované a rozpuštěné ve 100% (v/v) DMSO. Finální koncentrace těchto roztoků odpovídala koncentracím – 10 mM, 5 mM, 1 mM, 500 μ M, 100 μ M, 50 μ M a 10 μ M. Finální koncentrace DMSO v reakční směsi činila 10 % (v/v). Pro experiment v přítomnosti peroxidu vodíku byl do reakční směsi přidán 3% (v/v) H_2O_2 o finální koncentraci 0,3 % (v/v). Vzorky byly inkubovány 1 h při 37 °C. Před aplikací na agarosový gel byly k jednotlivým vzorkům přidány 2 μ l barviva 6x DNA Loading Dye.

Následující text v tomto odstavci je věnován přípravám kontrolních reakčních směsí. Pro přípravu roztoku obsahujícího restriční endonukleasu *NdeI* bylo do reakční směsi přidáno 10 U enzymu a pufr NEB 2.1 o finální koncentraci 1x ze zásobního roztoku 10x, pro negativní kontrolu s peroxidem vodíku byl přidán 3% (v/v) H_2O_2 o finální koncentraci 0,3 % (v/v) a pro negativní kontrolu s DMSO byl přidán 100% (v/v) DMSO o finální

koncentraci 10 % (v/v). Negativní kontrola bez DMSO obsahovala pouze plasmid pUC19 a vodu prostou nukleas.

3.5.2.2 Analýza mobility plasmidové DNA po interakci s cytostatiky

Objemy všech vzorků byly nastaveny na 10 µl. Každá reakční směs obsahovala 250 ng plasmidu pUC19. Pro přípravu reakčních směsí byly dále použity roztoky komplexních sloučenin 10x koncentrované a rozpuštěné ve 100% (v/v) DMSO. Finální koncentrace těchto roztoků odpovídala koncentracím – 10 mM, 5 mM, 1 mM, 500 µM, 200 µM, 150 µM, 100 µM, 75 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM a 1 µM. Finální koncentrace DMSO v reakční směsi činila 10 % (v/v). Vzorky byly inkubovány 24 h při 37 °C. Před aplikací na gel byly k jednotlivým vzorkům přidány 2 µl bromfenolové modři.

3.5.2.3 Image Lab 6.0.1

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Image Lab 6.0.1 od firmy Bio-Rad (verze softwaru 6.1 dostupná z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z>).

Pro vybrané komplexní sloučeniny byl za pomoci tohoto programu proveden výpočet procentuálního zastoupení jednotlivých forem vzhledem k negativní kontrole. Výpočty byly provedeny podle vzorce

$$\frac{\text{Adjusted Band Volume (Intensity)}}{\text{Adjusted Total Band Volume (Intensity)}_{neg.ctr}} \cdot 100$$

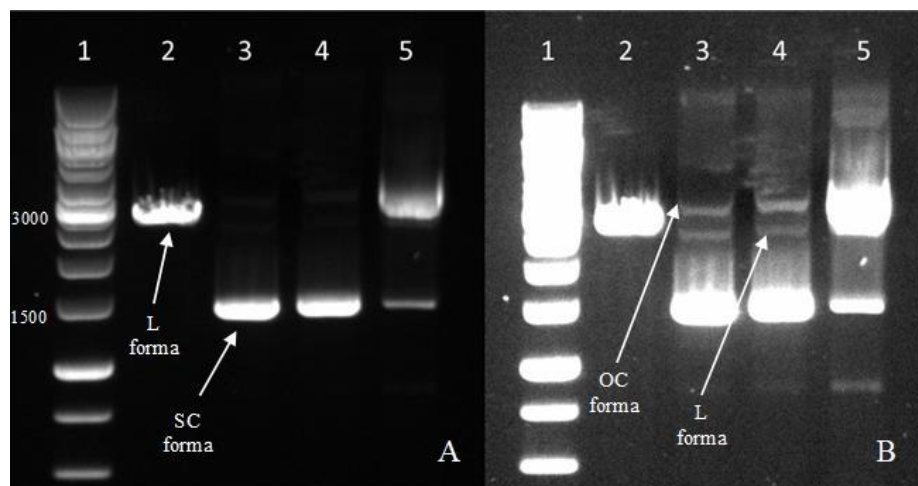
kde Adjusted Band Volume (Intensity) je objem fragmentu, od kterého je odečteno pozadí, a Adjusted Total Band Volume (Intensity) je objem všech fragmentů v dráze pro negativní kontrolu, od kterých je také odečteno pozadí. Objem (volume) je v tomto softwaru vyjádřen jako počet pixelů.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Následující kapitoly jsou věnovány nejprve kontrolním analýzám s cisplatinou, organickými molekulami L^1 a L^2 a komplexem Ru-CYM v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku za podmínek, jež byly definovány v Experimentální části pro experimenty zaměřující se na detekci nukleasové aktivity a změny v mobilitě plasmidové DNA s navázanými komplexními sloučeninami v agarosovém gelu tak, aby mohly být následně odhaleny vazebné interakce nově připravených Ru(II) a Os(II) komplexů pod označeními **2a**, **2b**, **3a**, **3b** a **4a** s DNA. Čistota testovaných preparátů byla v kompetenci Katedry anorganické chemie.

4.1 Negativní kontroly – identifikace konformací plasmidové DNA pro pUC19

Pro identifikaci, standardizaci a porovnání vzorů za reakčních podmínek podle článků (Massoud et al., 2016; Zhao et al., 2019), byl proveden experiment s negativními kontrolami. Na Obr. 12 se v 1. dráze nachází 1 kbp marker (použit ve všech experimentech), u kterého je označen počet bází, které odpovídají superhelikální formě (SC, 1500 bp) a lineární formě (L, 3000 bp) plasmidové DNA. Ve 2. dráze je kontrola L formy plasmidu – plasmidová DNA linearizovaná restriční endonukleasou *NdeI*. Ve 3. a 4. dráze se nachází negativní kontroly, které se liší přidavkem DMSO ve 4. dráze. Fragменты, které odpovídají SC formám pro dráhy číslo 3 a 4, mají zastoupení SC formy v rámci dané dráhy velmi podobné (pro 3. – 97 %, pro 4. – 97,8 %). Linearizovaná forma plasmidu ve 2. dráze přesně neodpovídá lineární formě plasmidu v dráhách číslo 3 a 4 (je v nich obsažena v nižší koncentraci – není v agarosovém gelu tak zpomalována). V 5. dráze se nachází negativní kontrola obsahující peroxid vodíku, který, jak je patrné z Obr. 12, štěpí plasmid na jednom vlákně a vzniká OC forma plasmidové DNA.



Obr. 12: Elektroferogram: Levá část obrázku (A) bez úprav. Pravá část obrázku (B) byla zesvětlena pomocí programu Image Lab 6.0.1. 1 kbp marker (1), plasmid linearizovaný *NdeI* (2), negativní kontrola pouze ve vodném prostředí (3), negativní kontrola s přidavkem DMSO (4) a negativní kontrola s přidavkem H_2O_2 (5). Vyznačena SC, OC a L forma plasmidu.

4.2 Detekce nukleasové aktivity v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku

Experimenty byly provedeny ve vodném prostředí a v přítomnosti standardního přidavku volných kyslíkových radikálů ve formě peroxidu vodíku o finální koncentraci v reakční směsi 0,3 % (v/v).

4.2.1 Vliv H_2O_2 a vychytávačů volných radikálů na nukleasovou aktivitu

Peroxid vodíku jako reaktivní forma kyslíku (ROS) je schopen štěpit DNA (měla by tak vzniknout OC forma plasmidu) (Gökçe & Gup, 2013; Raza et al., 2016). Pro zjištění vlivu ROS v mechanismu štěpení Cu(II) komplexů byla v práci Gökçe & Gup (2013) agarosová elektroforéza provedena v přítomnosti peroxidu vodíku a vychytávačů volných radikálů. Samotné komplexy v nepřítomnosti H_2O_2 a vychytávačů ROS štěpily jedno vlákno na molekule DNA. V přítomnosti H_2O_2 docházelo ke štěpení jednoho nebo dvou vláken na plasmidu (OC forma převažovala nad L formou). Autoři z toho vyvodili, že buď mohlo docházet v tomto případě k hydrolytickému štěpení, nebo i v nepřítomnosti oxidačního činidla ke štěpení oxidativnímu. Oxidativní štěpení DNA mohlo být způsobeno ligandem.

Jako vychytávače volných radikálů byly v práci Gökçe & Gup (2013) použity DMSO (vychytávač hydroxylových radikálů), KI (vychytávač H_2O_2), NaN_3 (vychytávač reaktivního kyslíku) a EDTA (chelatající činidlo). V přítomnosti DMSO nebyla na

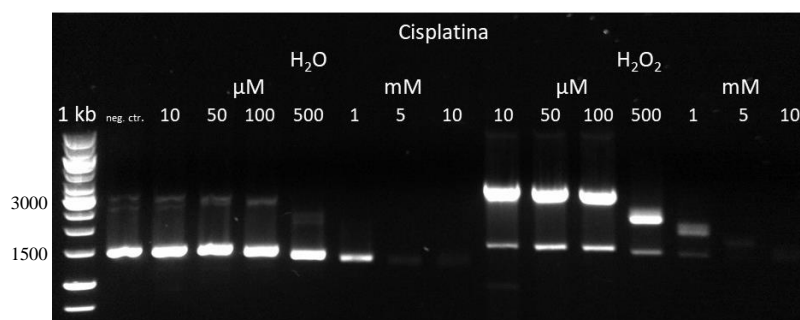
elektroferogramu pozorována žádná změna ve štěpení DNA komplexem, z čehož vyplývá, že hydroxylové radikály nemají u zkoumaných komplexů vliv na nukleasovou aktivitu. V přítomnosti KI došlo k významnému snížení schopnosti komplexu štěpit DNA, což značí, že H_2O_2 hraje určitou roli při štěpení DNA.

Jiné vychytávače reaktivních forem kyslíku byly použity v práci Raza et al. (2016), ve které se autoři zabývali Fe(II) komplexy obsahujícími quercetin. Aby hlouběji prozkoumali jejich mechanismus štěpení DNA, použili glycerol (vychytávač hydroxylových radikálů), superoxid: superoxid oxidoreduktasu (superoxiddismutasa, SOD, EC 1.15.1.1) (vychytávač superoxidových radikálů), H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreduktasu (katalasa, CAT, EC 1.11.1.6) (odstraňuje H_2O_2) a samotný peroxid vodíku. Autoři porovnali, jak je DNA štěpena samotným komplexem a co se děje v přítomnosti jednotlivých vychytávačů a H_2O_2 (stejně jako u předchozího článku). Samotný komplex štěpí DNA na jednom vlákně (stejně jako peroxid vodíku). Zjistili, že po přidavku katalasy ke štěpení DNA nedošlo, což značí, že H_2O_2 hraje důležitou roli v nukleasové aktivitě komplexu.

4.2.2 Test nukleasové aktivity cisplatiny jako pozitivní kontroly

Vzhledem k tomu, že vazebné interakce cisplatiny s DNA již historicky pomocí agarosové elektroforézy studovány byly (Keck & Lippard, 1992) a mechanismus jejího účinku je známý (viz přehledové články – Dasari & Tchounwou, 2014; Dilruba & Kalayda, 2016; Brabec et al., 2017; Ghosh, 2019), byla tato látka použita jako pozitivní kontrola pro studium interakcí nově připravených komplexních sloučenin s DNA.

Z Obr. 13 pro experiment v nepřítomnosti peroxidu vodíku je patrné, že se neprojevila změna v mobilitě fragmentů, které odpovídají SC formě plasmidové DNA. Tento elektroferogram však neodpovídá tomu, co je známé z literatury (Keck & Lippard, 1992). Důvod vzniku tohoto neobvyklého výsledku zatím nemá vysvětlení, mohlo se jednat o chybu v provedení experimentu. U koncentrace 1 mM došlo k zeslabení intenzity fragmentu, který odpovídá SC formě plasmidu, a u koncentrací 5 a 10 mM k degradaci DNA na nukleotidy. To je s největší pravděpodobností způsobeno vysokými koncentracemi komplexu, které převyšují terapeutické dávky (Tsang et al., 2009).



Obr. 13: Elektroferogram testování nukleasové aktivity pro cisplatinu – experiment v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku.

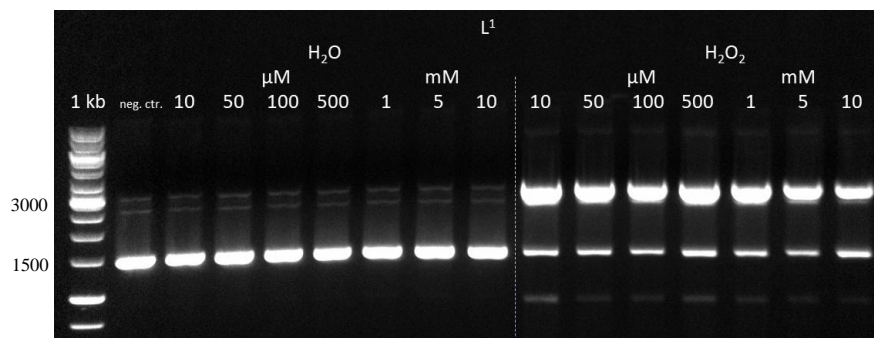
V přítomnosti peroxidu vodíku bylo v rozmezí koncentrací 10 μM – 1 mM naštěpeno jedno vlákno plasmidové DNA. Se zvyšující se koncentrací komplexu se zeslabovala intenzita fragmentů odpovídajících SC formám plasmidu. U fragmentů, jež odpovídají OC formám plasmidu, došlo ke stejnému jevu, a navíc i ke zrychlování fragmentů v agarosovém gelu. U koncentrací 5 a 10 mM byla plasmidová DNA zcela degradována.

V Teoretické části této práce byl popsán mechanismus účinku cisplatinu při vazbě na jadernou DNA. Cisplatin se však také může vázat na mitochondriální DNA, což způsobuje oxidativní stres a tvorbu reaktivních forem kyslíku (Aminuddin et al., 2020). Na základě tohoto experimentu lze však konstatovat, že cisplatin tvorbu volných radikálů nevyvolává, protože v nepřítomnosti peroxidu vodíku tato látka neštěpila jedno vlákno dvoušroubovice DNA, jako tomu bylo v přítomnosti H_2O_2 .

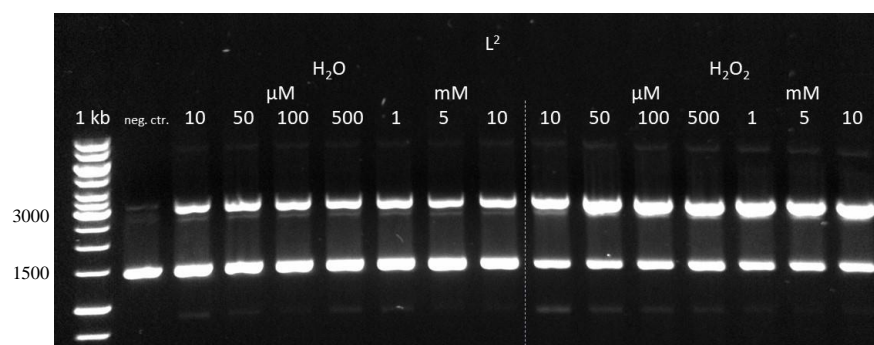
4.2.3 Test nulové nukleasové aktivity kontrolních organických molekul L^1 a L^2

Kontrolní experimenty byly provedeny také s organickými molekulami L^1 a L^2 , které jsou součástí komplexních sloučenin **2a**, **2b**, **3a** a **3b**. Pro sloučeninu L^1 platí, že zastoupení SC, OC a L formy je u všech koncentrací včetně negativní kontroly stejné (SC forma – 96 %, OC forma – 2 %, L forma – 2 %). Tato molekula tedy s DNA neinteraguje (viz Obr. 14). Jak je patrné z Obr. 15, u molekuly L^2 bylo naštěpeno jedno vlákno plasmidové DNA (zastoupení SC formy – 72 %, L formy – 1 % a OC formy – 27 %).

V přítomnosti peroxidu vodíku došlo k přechodu z SC formy plasmidové DNA na OC formu (pro látku L^1 – 14 % SC formy a 86 % OC formy). Z provedeného experimentu ve vodném prostředí a v přítomnosti H_2O_2 vyplývá, že molekula L^1 nevyvolává tvorbu volných radikálů. U molekuly L^2 byl plasmid štěpen v přítomnosti i nepřítomnosti H_2O_2 , proto je teoreticky možné, že tato sloučenina tvorbu volných radikálů vyvolává.



Obr. 14: Elektroferogram testování nukleasové aktivity pro organickou molekulu L¹ – experiment v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku.

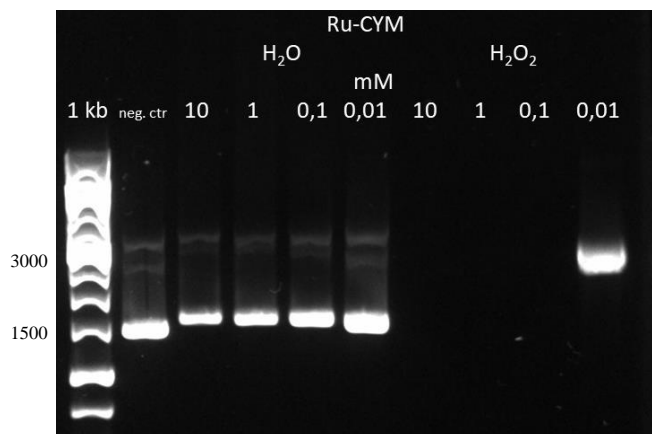


Obr. 15: Elektroferogram testování nukleasové aktivity pro organickou molekulu L² – experiment v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku.

4.2.4 Test nukleasové aktivity Ru-CYM jako pozitivní kontroly

Jak je uvedeno v Teoretické části této práce, komplex Ru-CYM se do molekuly DNA neinterkaluje a na DNA se váže pomocí koordinační vazby. Z Obr. 16 je patrné, že se zvyšující se koncentrací se fragmenty v agarosovém gelu zpožďovaly. To je zřejmě způsobeno rozvinutím dvoušroubovice DNA po navazání komplexu, což se projevilo snížením superhelikální hustoty (Nováková et al., 2003). V Tab. 1 je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých forem plasmidové DNA v rámci jedné dráhy.

V přítomnosti H₂O₂ došlo k naštěpení plasmidu na nukleotidy u všech koncentrací kromě té nejnižší, u které je patrná OC forma plasmidu pUC19. Pokud by byl u tohoto experimentu použit jemnější přechod mezi koncentracemi 0,1 a 0,01 mM nebo i nižší koncentrace komplexu, bylo by možné pozorovat více fragmentů, které odpovídají OC formám plasmidové DNA, případně i změnu v mobilitě v agarosovém gelu. Na základě provedeného experimentu lze však konstatovat, že komplex Ru-CYM nevyvolává tvorbu volných radikálů.



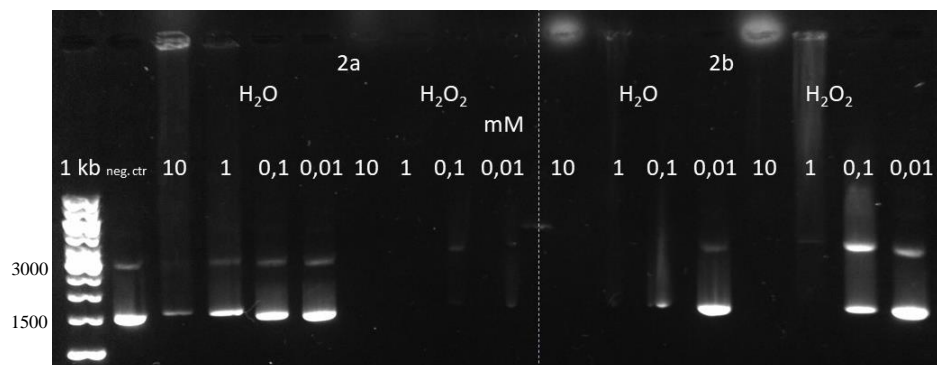
Obr. 16: Elektroferogram testování nukleasové aktivity pro komplexní sloučeninu Ru-CYM – experiment v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku.

Tab. 1: Procentuální zastoupení OC, L a SC formy plasmidu pro komplex Ru-CYM pro experiment v nepřítomnosti peroxidu vodíku, jež je vztaženo k celkovému množství (objemu) fragmentů v dané dráze (v programu Image Lab 6.0.1 se jedná o sloupec Band %). Není zohledněno zastoupení fragmentů v ostatních drahách.

	Negativní kontrola	10 mM	1 mM	0,1 mM	0,01 mM
% OC formy	2,80	4,50	4,60	3,50	2,60
% L formy	1,20	1,20	-	0,90	0,80
% SC formy	96,10	94,40	95,40	95,50	96,60

4.2.5 Nukleasová aktivita komplexních sloučenin 2a, 2b

Na Obr. 17 je zobrazen výsledek experimentu pro komplexy s označením **2a** a **2b** (pro tento experiment byla použita Thermo Scientific pUC19 DNA). Z Tab. 2 vyplývá, že procentuální zastoupení OC a SC formy plasmidové DNA je u koncentrací 0,1 a 0,01 mM podobné negativní kontrole, z čehož lze usoudit, že při těchto koncentracích komplex neštěpí molekulu DNA. U koncentrace 10 mM se sice poměr liší, ale jak je patrné z Obr. 17, velká část plasmidu (konkrétně 70,20 % z celkového množství fragmentů na danou dráhu) zůstala v jamce, což bylo způsobeno vysrážením komplexu díky jeho vysoké koncentraci. Částečně i u koncentrace 1 mM zůstal plasmid v jamce. Tento jev značně zkresluje vyhodnocení výsledků. Zde lze spekulovat, že pokud by ke srážení komplexů nedocházelo, nebyla by část plasmidu zadržována v jamce, a tudíž by bylo možné předpokládat, že by DNA putovala v gelu stejně rychle jako SC forma. To by mělo za následek, že by poměry OC a SC formy byly podobné negativní kontrole a závěrem by bylo, že komplex **2a** nevykazuje nukleasovou aktivitu. Se zvyšující se koncentrací je také částečně patrné zpomalování fragmentů, které odpovídají SC formě plasmidu – komplex se na DNA navázal (Zhao et al., 2019).



Obr. 17: Elektroferogram testování nukleasové aktivity pro komplexní sloučeniny **2a** a **2b** – experiment v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku.

Tab. 2: Procentuální zastoupení OC a SC formy plasmidu pro komplex **2a** pro experiment v nepřítomnosti peroxidu vodíku, jež je vztaženo k celkovému množství fragmentů v dané dráze. Není zohledněno zastoupení fragmentů v ostatních drahách. Uvedeny také poměry OC formy a SC formy plasmidové DNA.

	Negativní kontrola	10 mM	1 mM	0,1 mM	0,01 mM
% OC formy	4,40	13,10	6,60	4,60	4,30
% SC formy	95,60	86,90	93,40	95,40	95,70
poměr	1:21,73	1:6,63	1:14,15	1:20,74	1:22,26

Pro komplex **2b** platí, že u koncentrací 10 a 1 mM nelze na elektroferogramu pozorovat žádný fragment. Jak je patrné z Obr. 17 plasmidová DNA zůstala u koncentrace 10 mM v jamce díky tomu, že se komplex vysrážel. U koncentrace 0,1 mM došlo ke snížení intenzity obou fragmentů (jak OC formy, tak SC formy plasmidové DNA). Vzorek o koncentraci 0,1 mM byl také na gel zřejmě chybně nanesen, protože není patrný celý fragment SC formy plasmidu. U nejnižší koncentrace je fragment SC formy téměř stejně intenzivní jako fragment negativní kontroly.

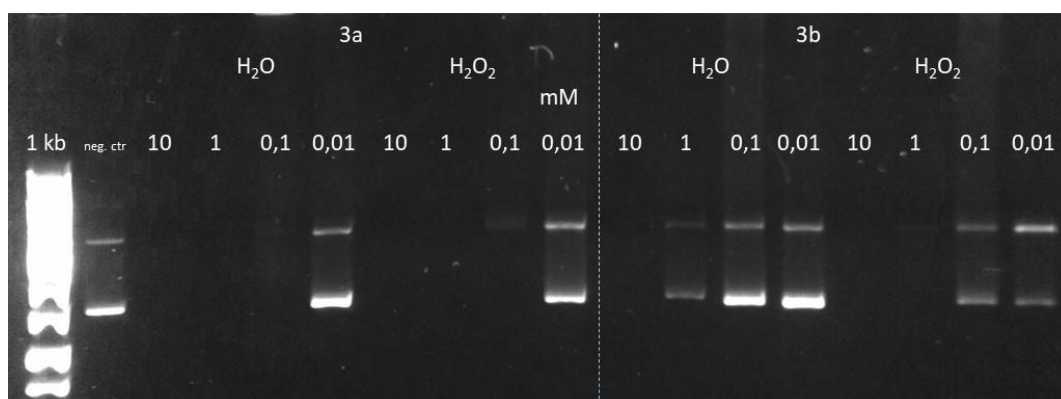
V přítomnosti peroxidu vodíku byla u komplexu **2a** plasmidová DNA úplně degradována na nukleotidy u všech koncentrací. Pro komplex **2b** je tento experiment s H_2O_2 téměř analogický experimentu ve vodném prostředí, jen došlo k částečnému přechodu z SC formy plasmidu na OC formu u koncentrací 0,1 a 0,01 mM. Je však možné, že u tohoto experimentu nebyl peroxid vodíku přidán správně, protože u koncentrace 0,01 mM se velké množství plasmidové DNA nachází v SC formě. Pro vyvození závěru pro komplex **2b** by bylo třeba celý experiment zopakovat.

4.2.6 Nukleasová aktivita komplexních sloučenin **3a**, **3b**

Na Obr. 18 je znázorněn elektroferogram pro komplexní sloučeniny **3a** a **3b**. Komplex **3a** je aktivnější ve štěpení DNA než komplex **2a** (i **3b**). U koncentrací 10; 1 a 0,1 mM

byl plasmid naštěpen na nukleotidy. Z Tab. 3 vyplývá, že poměry obou forem u koncentrace komplexu 0,01 mM a u negativní kontroly jsou téměř stejné – nedošlo k naštěpení jednoho vlákna SC formy plasmidu.

Komplex **3b** je schopen štěpit DNA na nukleotidy pouze při nejvyšší koncentraci. U koncentrace 1 mM je z elektroferogramu patrné výrazné snížení intenzity obou fragmentů, což je způsobeno vmezeřením komplexu mezi páry bází v molekule DNA místo interkalačního barviva GelRed (Massoud et al., 2016). Z Tab. 3 lze vyvodit, že u této koncentrace došlo také k naštěpení SC formy plasmidu na OC formu, protože procentuální zastoupení OC formy je u této koncentrace vyšší než u negativní kontroly. U koncentrací 0,1 a 0,01 mM zůstal poměr SC a OC formy plasmidu téměř stejný. Se zvyšující se koncentrací je z Obr. 18 patrné zpomalování fragmentů, které odpovídají SC a OC formám plasmidové DNA, což je způsobeno navázáním části komplexní sloučeniny na DNA (Zhao et al., 2019).



Obr. 18: Elektroferogram testování nukleasové aktivity pro komplexní sloučeniny **3a** a **3b** – experiment v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku.

Tab. 3: Procentuální zastoupení OC a SC formy plasmidu pro komplexy **3a** a **3b** pro experiment v nepřítomnosti peroxidu vodíku, jež je vztaženo k celkovému množství fragmentů v dané dráze. Není zohledněno zastoupení fragmentů v ostatních drahách. Uvedeny také poměry OC formy a SC formy plasmidové DNA.

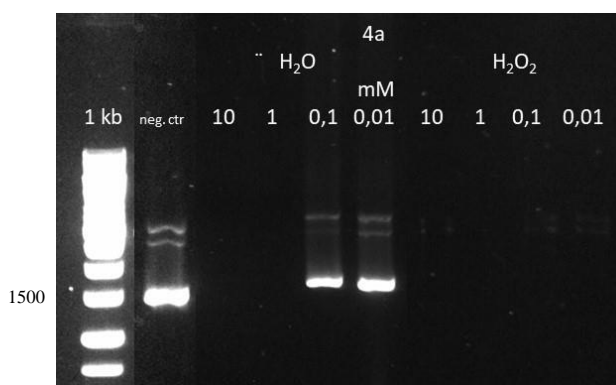
	3a					3b			
	Negativní kontrola	10 mM	1 mM	0,1 mM	0,01 mM	10 mM	1 mM	0,1 mM	0,01 mM
% OC formy	10,20	-	-	-	9,80	-	17,00	10,70	9,20
% SC formy	89,80	-	-	-	90,20	-	83,00	89,30	90,80
poměr	1:8,80	-	-	-	1:9,20	-	1:4,88	1:8,35	9,87

Pro komplex **3a** v přítomnosti peroxidu vodíku platí, že u koncentrace 0,01 mM došlo k částečnému přechodu SC formy plasmidu na OC formu a u koncentrace 0,1 mM je na agarosovém gelu patrná pouze OC forma plasmidu (u ostatních koncentrací byla plasmidová DNA degradována na nukleotidy). Pro experiment s H₂O₂ u komplexu **3b** platí, že plasmidová DNA byla úplně naštěpena na nukleotidy u koncentrací 10 a 1 mM. U koncentrace 0,1 mM lze pozorovat snížení intenzity obou fragmentů a u koncentrace 0,01 mM bylo naštěpeno jedno vlákno plasmidové DNA.

4.2.7 Nukleasová aktivita komplexu 4a

Pro komplex **4a** platí, že při koncentracích 10 a 1 mM degraduje DNA na nukleotidy (viz Obr. 19). Při koncentracích 0,1 a 0,01 mM se tato sloučenina pravděpodobně vmežeřila mezi páry bází v molekule DNA, jelikož došlo ke snížení intenzity fragmentů (Massoud et al., 2016). Je patrná také změna v mobilitě plasmidové DNA – komplex se tedy na DNA vázal (Zhao et al., 2019). Zastoupení jednotlivých forem v rámci dané dráhy je u obou koncentrací velmi podobné negativní kontrole, akorát bylo sníženo procentuální zastoupení L formy (viz Tab. 4).

V přítomnosti H₂O₂ byl plasmid naštěpen na nukleotidy u všech koncentrací komplexu.



Obr. 19: Elektroferogram testování nukleasové aktivity pro komplexní sloučeninu **4a** – experiment v přítomnosti a nepřítomnosti peroxidu vodíku.

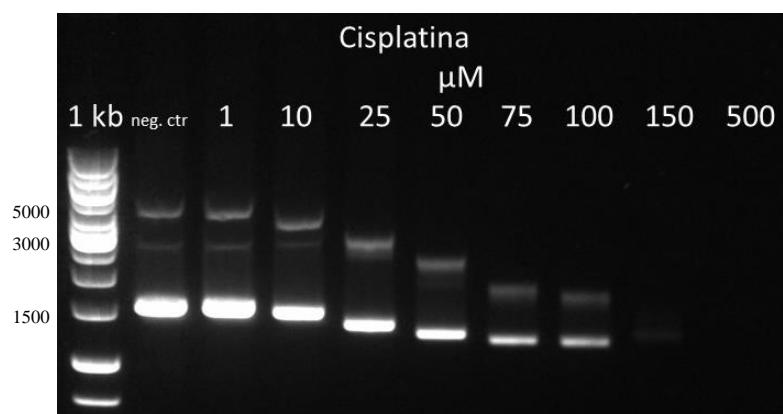
Tab. 4: Procentuální zastoupení OC, L a SC formy plasmidu pro komplex **4a** pro experiment v nepřítomnosti peroxidu vodíku, jež je vztaženo k celkovému množství fragmentů v dané dráze. Není zohledněno zastoupení fragmentů v ostatních drahách.

	Negativní kontrola	10 mM	1 mM	0,1 mM	0,01 mM
% OC formy	3,70	-	-	3,00	2,60
% L formy	2,20	-	-	0,50	1,20
% SC formy	94,00	-	-	96,10	96,20

4.3 Analýza mobility plasmidové DNA po interakci s komplexy

4.3.1 Pozitivní kontrola vlivu cisplatinu na mobilitu plasmidu

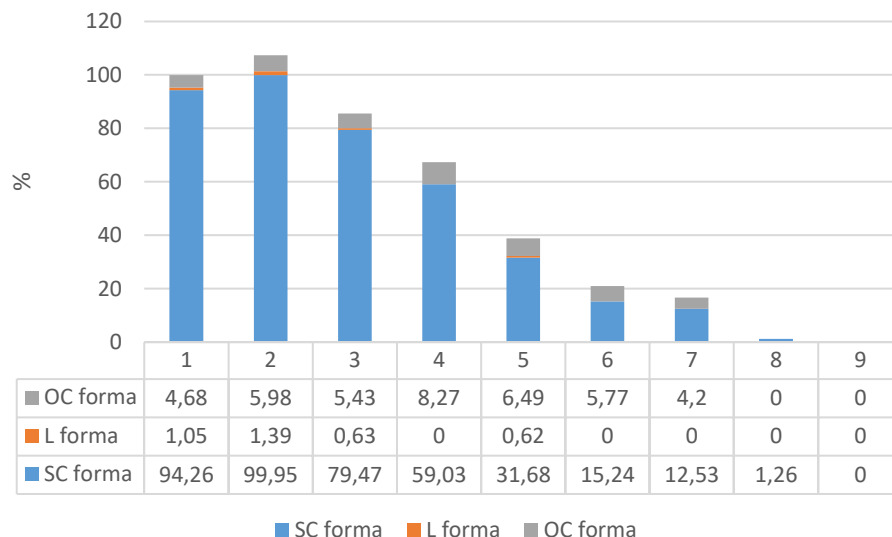
Z Obr. 23 je patrné, že intenzita fragmentů, které odpovídají SC i OC formě plasmidu, se se zvyšující se koncentrací komplexu snižuje. SC i OC forma plasmidové DNA byla také v agarosovém gelu postupně zrychlována, což (jak je uvedeno i v kapitole 4.2.2) neodpovídá literatuře (Keck & Lippard, 1992). U nejvyšších koncentrací 150 a 500 μM byla plasmidová DNA úplně degradována na nukleotidy pravděpodobně z toho důvodu, že se jedná již o příliš vysoké koncentrace (Tsang et al., 2009). V Tab. 5 je znázorněn procentuální podíl OC, L a SC formy v rámci jedné dráhy. Na Obr. 24 je znázorněn graf, který zobrazuje zastoupení jednotlivých forem plasmidu vzhledem k negativní kontrole (viz výpočet v kapitole 3.5.2.3). Z Obr. 23 a Obr. 24 je patrné, že fragment plasmidové DNA u koncentrace 1 μM má větší intenzitu než fragment odpovídající negativní kontrole. Je to pravděpodobně způsobeno možnou nezachycenou chybou při pipetování.



Obr. 23: Elektroferogram testování změny mobility plasmidové DNA po interakci s cisplatinou.

Tab. 5: Procentuální zastoupení OC, L a SC formy plasmidu pro cisplatinu, jež je vztaženo k celkovému množství fragmentů v dané dráze. Není zohledněno zastoupení fragmentů v ostatních drahách.

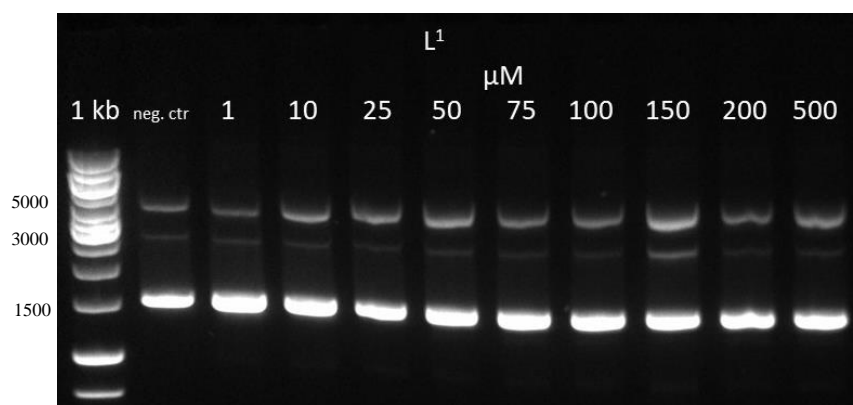
	Negativní kontrola	1 μM	10 μM	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM	150 μM	500 μM
% OC formy	4,7	5,6	6,4	12,3	16,7	27,5	25,1	-	-
% L formy	1,1	1,3	0,7	-	1,6	-	-	-	-
% SC formy	94,3	93,1	92,9	87,7	81,7	72,5	74,9	100	-



Obr. 24: Graf znázorňující procentuální zastoupení OC, L a SC formy plasmidové DNA, jež je vztaženo k negativní kontrole, pro cisplatinu pro experiment detekující změnu v mobilitě plasmidové DNA. Sloupec č. 1 odpovídá negativní kontrole a sloupce č. 2-9 odpovídají zvyšující se koncentraci cisplatinu (koncentrace 1 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM a 500 μM).

4.3.2 Negativní kontrola vlivu organických molekul L^1 a L^2 na mobilitu plasmidu

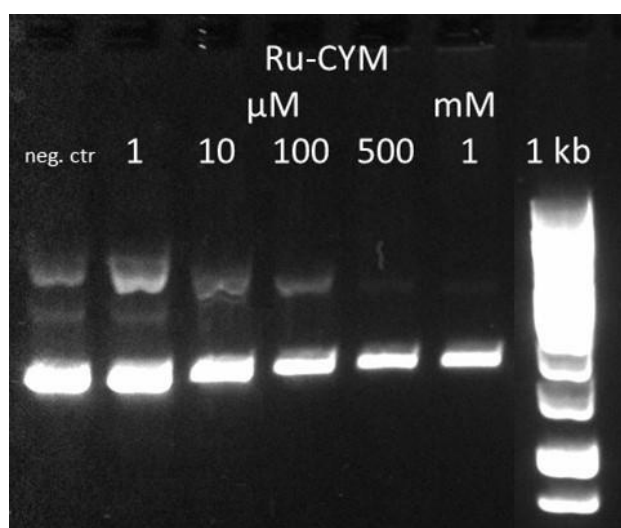
Látky L^1 a L^2 pravděpodobně s DNA žádným způsobem neinteragují. Z Obr. 25 je sice částečně patrná mobilita fragmentů plasmidové DNA, ale ta je pravděpodobně způsobena prohnutím gelu, nikoliv samotnou sloučeninou. Pro organickou molekulu L^2 vyšel elektroferogram velmi podobně.



Obr. 25: Elektroferogram testování změny mobility plasmidové DNA po interakci s organickou molekulou L^1 .

4.3.3 Pozitivní kontrola vlivu komplexu Ru-CYM na mobilitu plasmidu

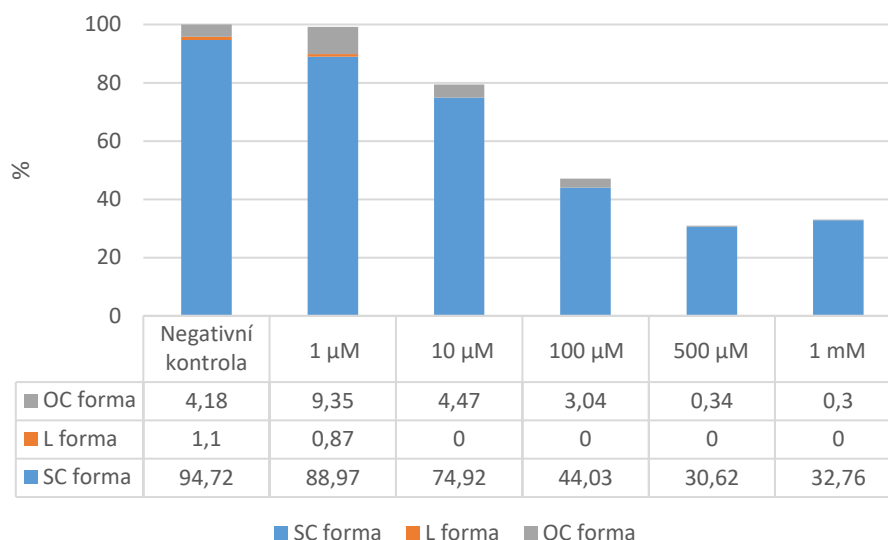
Pro komplex Ru-CYM je výsledek elektroforézy pro změnu mobility plasmidové DNA stejný jako u experimentu zkoumajícím nukleasovou aktivitu, akorát bylo v tomto případě použito více koncentrací (vyhodnocení viz kapitola 4.2.4). Opět je z Obr. 26 patrné, že se zvyšující se koncentrací komplexu dochází k opožďování fragmentů, které odpovídají SC formám plasmidu. Z Obr. 27 a Tab. 6 je patrné, že u nejnižší koncentrace komplexu (i u koncentrací 10 a 100 μM) došlo k přechodu z SC formy plasmidové DNA na OC formu.



Obr. 26: Elektroferogram testování změny mobility plasmidové DNA po interakce s komplexem Ru-CYM.

Tab. 6: Procentuální zastoupení OC, L a SC formy plasmidu pro komplex Ru-CYM, jež je vztaženo k celkovému množství fragmentů v dané dráze. Není zohledněno zastoupení fragmentů v ostatních drahách.

	Negativní kontrola	1 μM	10 μM	100 μM	500 μM	1 mM
% OC formy	4,2	9,4	5,6	6,5	1,1	0,9
% L formy	1,1	0,9	-	-	-	-
% SC formy	94,7	89,7	94,4	93,5	98,9	99,1

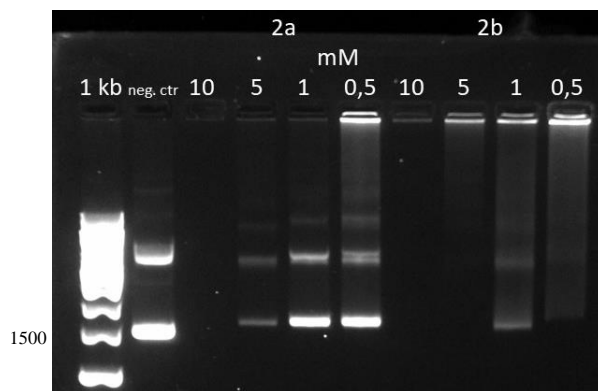


Obr. 27: Graf znázorňující procentuální zastoupení OC, L a SC formy plasmidové DNA, jež je vztaženo k negativní kontrole, pro komplex Ru-CYM pro experiment detekující změnu v mobilitě plasmidové DNA.

4.3.4 Mobilita plasmidu s navázanými komplexy 2a, 2b

Pro komplex **2a** platí, že poměry OC formy a SC formy se příliš neliší od negativní kontroly (viz Tab. 7). Pro koncentraci 10 mM nejsou patrné na gelu žádné fragmenty (viz Obr. 28), ani komplex nezůstal v jamce, z čehož lze usuzovat, že se při této koncentraci komplexu plasmidová DNA štěpí na nukleotidy, které nejsou v agarosovém gelu detekovatelné. U koncentrace 5 mM byla naštěpena SC forma plasmidové DNA na OC formu. Pro koncentrace 1 a 0,5 mM je poměr podobný jako u negativní kontroly (pro koncentraci 0,5 mM to nelze tvrdit s úplnou jistotou, protože část plasmidu zůstala v jamce). U koncentrací 5; 1 a 0,5 mM je z elektroferogramů patrné snížení intenzity fragmentů, což je zřejmě způsobeno vmezeřením komplexu mezi páry bází ve dvoušroubovici DNA (Massoud et al., 2016). Změna v mobilitě plasmidu není patrná.

Výsledky o procentuálním zastoupení OC formy a SC formy pro komplex **2b** byly získány pouze pro koncentraci 1 mM (viz Tab. 7). Je patrné, že při této koncentraci bylo naštěpeno jedno vlákno SC formy plasmidové DNA. U koncentrace 10 mM byl plasmid degradován na nukleotidy. U koncentrací 5 a 0,5 mM však plasmidová DNA zůstala v jamce, nepohybovala se tedy v elektroforetickém poli – u 5mM koncentrace to mohlo být způsobeno vysrážením komplexu díky jeho vysoké koncentraci, u koncentrace 0,5 mM je to pravděpodobně způsobeno chybou v provedení experimentu. Pro vyvození závěru by bylo potřeba celý experiment zopakovat.



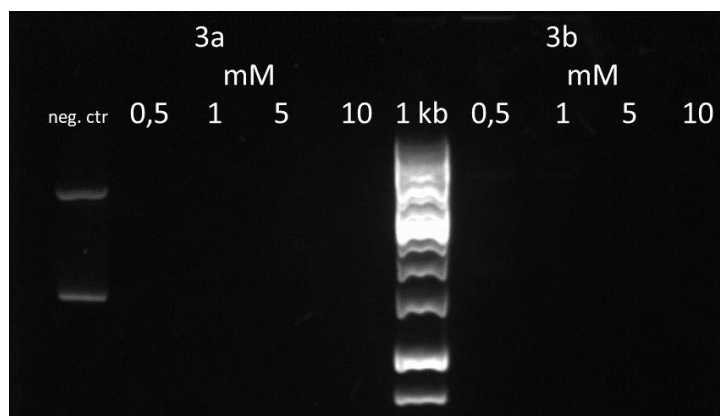
Obr. 28: Elektroferogram testování změny mobility plasmidové DNA po interakci s komplexy **2a** a **2b**.

Tab. 7: Procentuální zastoupení OC a SC formy plasmidu pro komplexy **2a** a **2b**, jež je vztaženo k celkovému množství fragmentů v dané dráze. Není zohledněno zastoupení fragmentů v ostatních drahách. Uvedeny také poměry OC formy a SC formy plasmidové DNA.

	2a					2b			
	Negativní kontrola	10 mM	5 mM	1 mM	0,5 mM	10 mM	5 mM	1 mM	0,5 mM
% OC formy	21,8	0	44,0	21,5	20,8	0	0	31,1	0
% SC formy	78,2	0	56,0	78,5	79,2	0	0	68,9	0
poměr	1:3,59	-	1:1,27	1:3,65	1:3,81	-	-	1:2,22	-

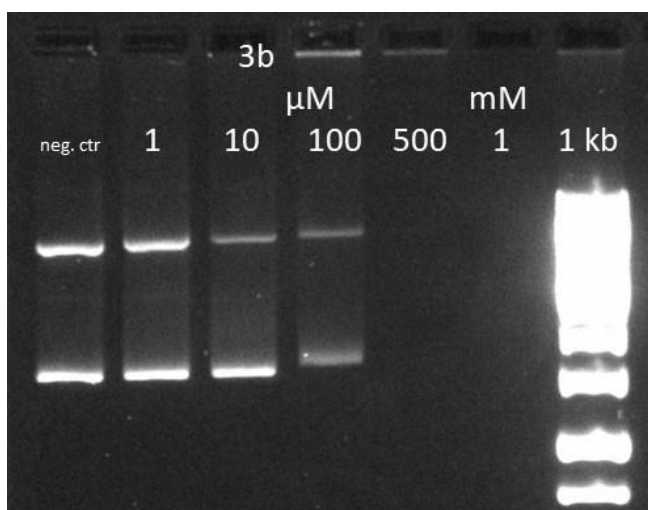
4.3.5 Mobilita plasmidu s navázanými komplexy **3a**, **3b**

Z Obr. 29 je patrné, že byly zvoleny příliš vysoké koncentrace pro komplexy **3a** a **3b**, což je v souladu i s experimentem, který se zabývá nukleasovou aktivitou (viz kapitola 4.2.6). U všech koncentrací tak byla plasmidová DNA úplně degradována na nukleotidy. Z tohoto elektroferogramu tedy nelze vyvodit žádný závěr.

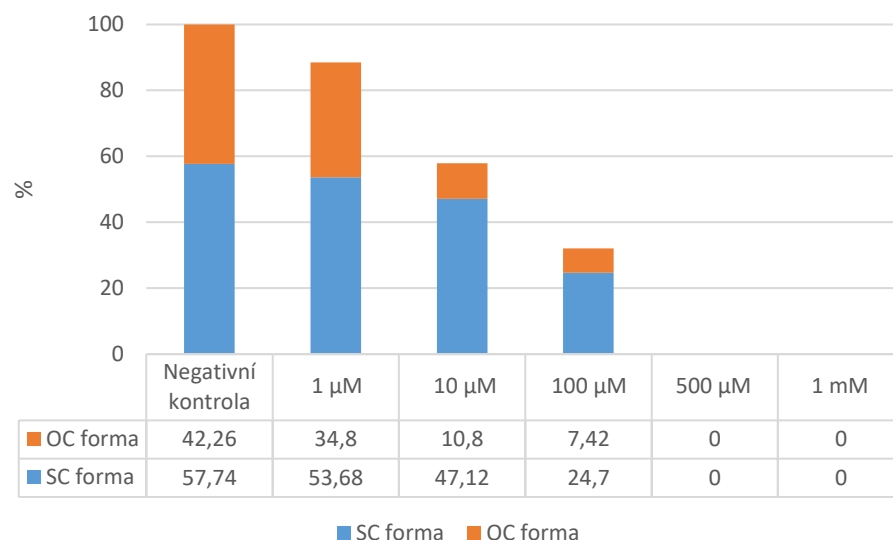


Obr. 29: Elektroferogram testování změny mobility plasmidové DNA po interakci s komplexy **3a** a **3b**.

Z Obr. 30 je patrné, že při zvolení nižších koncentrací pro komplex **3b** je pozorovatelná změna v mobilitě fragmentů způsobená vazbou komplexu na DNA (Zhao et al., 2019). Z Obr. 31 lze zjistit, že se procentuální zastoupení OC a SC formy se zvyšující se koncentrací snižovalo (u OC formy je tento trend více patrný). U koncentrací 1, 10 a 100 μM došlo ke snížení intenzity fragmentů, což zřejmě značí, že se komplex **3b** vmezeřil do molekuly DNA (Massoud et al., 2016). U koncentrace 100 μM zůstala část plasmidu v jamce, což zkrusluje stanovení. U koncentrací 500 μM a 1 mM byl plasmid pUC19 naštěpen na nukleotidy. Z použitých koncentrací lze tedy usoudit, že se komplex **3b** do DNA vmezeřuje a zároveň se na danou dvoušroubovici váže díky pozorované změně v mobilitě fragmentů v agarosovém gelu.



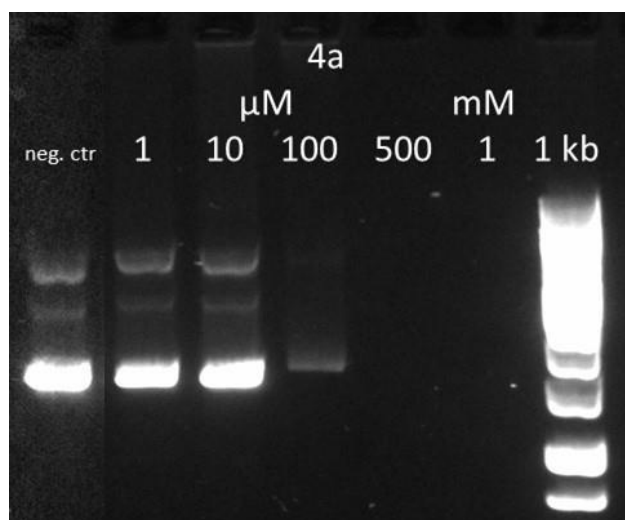
Obr. 30: Elektroferogram testování změny mobility plasmidové DNA po interakci s komplexem **3b** (použití nižších koncentrací).



Obr. 31: Graf znázorňující procentuální zastoupení SC a OC formy plasmidové DNA, jež je vztaženo k negativní kontrole, pro komplex **3b** pro experiment detekující změnu v mobilitě plasmidové DNA.

4.3.6 Mobilita plasmidu s navázaným komplexem 4a

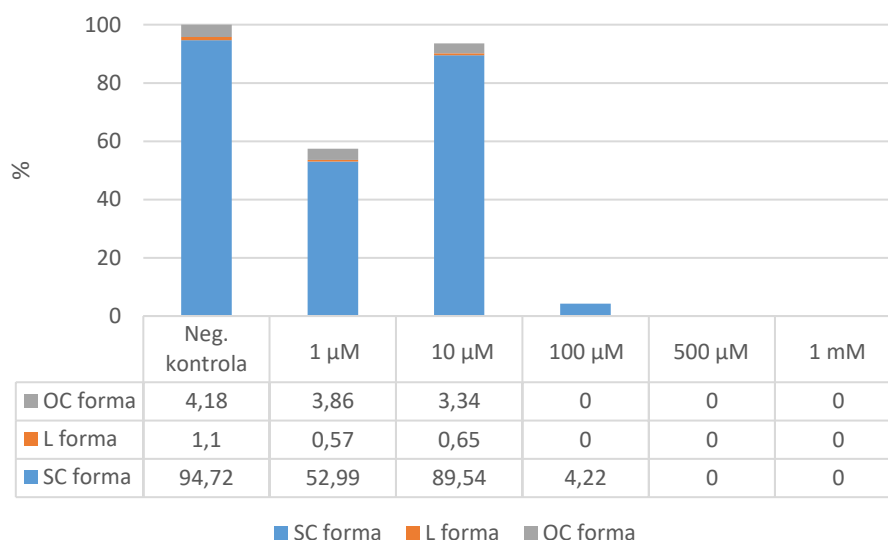
U komplexu **4a** (viz Obr. 32) nedošlo při koncentracích 1 a 10 μM ke změně mobility fragmentů DNA v agarosovém gelu. Procentuální zastoupení SC, L a OC formy plasmidové DNA je podle Tab. 8 u těchto koncentrací téměř stejné. U koncentrace 100 μM byla snížena intenzita fragmentu, který odpovídá SC formě plasmidu, a u koncentrací 500 μM a 1 mM byla plasmidová DNA degradována na nukleotidy (viz Obr. 33).



Obr. 32: Elektroferogram testování změny mobility plasmidové DNA po interakci s komplexem **4a**.

Tab. 8: Procentuální zastoupení OC, L a SC formy plasmidu pro komplex **4a**, jež je vztaženo k celkovému množství fragmentů v dané dráze. Není zohledněno zastoupení fragmentů v ostatních drahách.

	Negativní kontrola	1 μ M	10 μ M	100 μ M	500 μ M	1 mM
% OC formy	4,2	6,7	3,6	-	-	-
% L formy	1,1	1,0	0,7	-	-	-
% SC formy	94,7	92,3	95,7	100	-	-



Obr. 33: Graf znázorňující procentuální zastoupení OC, L a SC formy plasmidové DNA, jež je vztaženo k negativní kontrole, pro komplex **4a** pro experiment detekující změnu v mobilitě plasmidové DNA.

4.4 Srovnání studovaných látek pro oba experimenty

Z výsledků experimentů uvedených v kapitolách 4.2 a 4.3, které byly s modifikacemi provedeny podle publikovaných postupů (Massoud et al., 2016; Zhao et al., 2019), vyplývá, že rozdíl v metodice není pro odlišení vlivu nukleasové aktivity od vlivu na změnu v mobilitě plasmidu relevantní. V obou typech experimentů se totiž většinou projevují oba zmíněné mechanismy. Je tedy zřejmé, že rozdíl v přidavku EDTA a rozdíl v době inkubace nemá vliv na stanovení vazebných interakcí komplexních sloučenin. Z experimentů však také vyplývá, že za pomoci vhodně zvolených koncentrací lze do jisté míry ovlivnit, jestli na elektroferogramech bude pozorována nukleasová aktivita nebo změna v mobilitě plasmidové DNA.

Nově připravené polosendvičové Ru(II) a Os(II) komplexní sloučeniny pravděpodobně vykazují jiný mechanismus účinku než pozitivní kontroly. Z elektroferogramů pro cisplatinu a komplex Ru-CYM vyplývá, že došlo k navázání

DNA (i když výsledky experimentu pro cisplatinu zcela neodpovídají literatuře). Kontrolní molekuly L^1 a L^2 nevykazovaly vůči molekule DNA téměř žádnou aktivitu. U nově syntetizovaných komplexů je patrné, že se zřejmě vmezeřují mezi páry bází v molekule DNA a zároveň se částí své struktury vážou na DNA. Pro komplexní sloučeniny **2b** a **3a** nelze konstatovat tento výrok s úplnou jistotou – pro tyto komplexy by bylo potřeba alespoň jeden z experimentů zopakovat, protože u komplexu **2b** došlo pravděpodobně k neznámé chybě v provedení experimentu a pro koordinační sloučeninu **3a** nebyl zvolen vhodný rozsah koncentrací. Nejmenší toxicitu vůči plasmidové DNA vykazovala koordinační sloučenina **2a**. Komplexy **3b** a **4a** se v rámci provedených experimentů chovaly velmi podobně – se zvyšující se koncentrací u nich došlo k opožďování fragmentů odpovídajících SC formám plasmidové DNA a také ke snížení intenzity fragmentů, což značí již zmíněný duální mechanismus těchto koordinačních sloučenin.

V přítomnosti peroxidu vodíku je z elektroferogramů patrné, že žádná ze studovaných komplexních sloučenin nevykazovala tvorbu volných radikálů. Některé komplexy sice byly schopny v nepřítomnosti peroxidu vodíku štěpit superhelikální formu plasmidu na jednom vlákně, avšak tento přechod z SC formy na OC formu byl pouze v rámci jednotek procent.

5 ZÁVĚR

Hlavní cíl této bakalářské práce, tedy vyhodnocení vazebných interakcí nově připravených Ru(II) a Os(II) komplexních sloučenin s DNA, byl naplněn. Byla otestována nukleasová aktivita komplexních sloučenin a také jejich schopnost vázat se na DNA. Uvedené metodiky lze pro studium vazebných možností komplexů použít, což bylo ověřeno díky pozitivním kontrolám.

Z výsledků je patrné, že metodika zvolená pro objasnění mechanismu interakce s DNA sice detekuje nukleasovou aktivitu i vliv na změnu v mobilitě plasmidu, ale není schopna jednoznačně diskriminovat mezi těmito dvěma typy vlivů komplexních sloučenin na DNA.

Nově připravené komplexní sloučeniny vykazují nukleasovou aktivitu při vysokých koncentracích a při nižších koncentracích se projevuje změna v mobilitě plasmidové DNA. Po porovnání s literaturou lze tak obecně konstatovat, že polosendvičové Ru(II) a Os(II) komplexy vykazují při interakci s DNA duální mechanismus účinku – na DNA se vážou a zároveň se do této molekuly vmezeřují. Kontrolní organické molekuly L¹ a L² neinteragují s molekulou DNA, z čehož vyplývá, že se pravděpodobně neúčastní mechanismu cytotoxicity zkoumaných komplexů.

Pro lepší posouzení interakcí nově syntetizovaných koordinačních sloučenin s DNA by bylo nutné provést agarosovou elektroforézu ve větším rozsahu koncentrací a také s nižšími koncentracemi komplexů, protože u některých sloučenin je ve zvoleném rozsahu koncentrací patrný pouze jeden nebo dva fragmenty. Ačkoliv detekovaná nukleasová aktivita u vysokých koncentrací komplexních sloučenin nemá terapeutický význam, protože koncentrace chemoterapeutik podávané intravenózně se pohybují v μM či nM koncentracích (<https://www.rxlist.com/cisplatin-drug.htm#description>), byly tyto koncentrace nutné pro detekci vazebných interakcí komplexů s DNA zvolenou metodikou.

Mechanismus účinku těchto komplexů pravděpodobně nezahrnuje tvorbu volných radikálů. Pro lepší posouzení role ROS v degradaci DNA komplexními sloučeninami by bylo potřeba experiment provést s vychytávači ROS, což by mohlo být uskutečněno enzymaticky např. pomocí katalasy či superoxiddismutasy (Raza et al., 2016).

Látka DMSO, ve které byly rozpuštěny komplexní sloučeniny, je také vychytávačem volných hydroxylových radikálů. Hydroxylové radikály však nezpůsobují štěpení DNA,

proto lze konstatovat, že v této práci DMSO neovlivnilo provedené experimenty (Gökçe & Gup, 2013).

Výsledky v této práci ukazují, že dva odlišné metodické přístupy pro studium interakcí komplexních sloučenin s DNA poskytují velmi podobné výsledky, což je důležité pro další experimenty. Porozumění vazebným interakcím s DNA v rámci studia biologické aktivity komplexních sloučenin je zásadní pro vývoj dalších protinádorových látek, které budou schopny překonat omezení vyplývající z použití komplexních sloučenin na bázi platiny.

6 LITERATURA

- Alessio, E., & Messori, L. (2019). NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/molecules24101995>
- Aminuddin, A., Ng, P. Y., Leong, C. -O., & Chua, E. W. (2020). Mitochondrial DNA alterations may influence the cisplatin responsiveness of oral squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64664-3>
- Andrezálová, L., & Országhová, Z. (2021). Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 225. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111624>
- Biotium (barvivo GelRed). <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/> (11. 3. 2022).
- Brabec, V., Hrabina, O., & Kasparkova, J. (2017). Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 351, 2-31. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.04.013>
- Brabec, V., & Kašpárková, J. (2018). Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 376, 75-94. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.07.012>
- Brabec, V., & Nováková, O. (2006). DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates*, 9(3), 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2006.05.002>
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 605-644. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001>
- Dilruba, S., & Kalayda, G. V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(6), 1103-1124. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z>
- Fang, L., Gou, S., Zhao, J., Sun, Y., & Cheng, L. (2013). Platinum(II) complexes with N-monoalkyl 1R,2R-diaminocyclohexane derivatives as carrier ligands and 3-hydroxycyclobutane-1,1-dicarboxylate as a leaving group: Potent cytotoxicity and DNA binding ability. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 842-847. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.07.004>
- Farber, S., Diamond, L. K., Mercer, R. D., Sylvester, Jr., R. F., & Wolff, J. A. (1948). Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *The New England Journal of Medicine*, 238, 787-793. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm194806032382301>
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
- Gen software (Biotek). <https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/> (4. 4. 2022).
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>

- Gökçe, C., & Gup, R. (2013). Synthesis, characterization and DNA interaction of new copper(II) complexes of Schiff base-arylohydrazones bearing naphthalene ring. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *122*, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.02.014>
- Goodman, L. S., Wintrobe, M. M., Dameshek, W., Goodman, M. J., Gilman, A., & McLennan, M. T. (1946). Nitrogen mustard therapy: Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *Journal of the American Medical Association*, *132*(3), 126-132. <https://www.jameslindlibrary.org/goodman-ls-wintrobe-mm-dameshek-w-goodman-mj-gilman-a-and-mclennan-mt-1946/>
- Hanif, M., Babak, M. V., & Hartinger, C. G. (2014). Development of anticancer agents: wizardry with osmium. *Drug Discovery Today*, *19*(10), 1640-1648. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.016>
- Image Lab 6.1 software – manuál. <https://www.bio-rad.com/en-cz/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z> (27. 3. 2022).
- Ivy, K. D., & Kaplan, J. H. (2013). A Re-Evaluation of the Role of hCTR1, the Human High-Affinity Copper Transporter, in Platinum-Drug Entry into Human Cells. *Molecular Pharmacology*, *83*(6), 1237-1246. <https://doi.org/10.1124/mol.113.085068>
- Izolace plasmidové DNA pomocí kitu. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiaprep-spin-miniprep-kit/> (25. 2. 2022).
- Jamieson, E. R., & Lippard, S. J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chemical Reviews*, *99*(9), 2467-2498. <https://doi.org/10.1021/cr980421n>
- Johnston, C. D., Cotton, S. L., Rittling, S. R., Starr, J. R., Borisy, G. G., Dewhirst, F. E., & Lemon, K. P. (2019). Systematic evasion of the restriction-modification barrier in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(23), 11454-11459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820256116>
- Jung, Y., & Lippard, S. J. (2007). Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage. *Chemical Reviews*, *107*(5), 1387-1407. <https://doi.org/10.1021/cr068207j>
- Keck, M. V., & Lippard, S. J. (1992). Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society*, *114*(9), 3386-3390. <https://doi.org/10.1021/ja00035a033>
- Kostrhunová, H., Florian, J., Nováková, O., Peacock, A. F. A., Sadler, P. J., & Brabec, V. (2008). DNA Interactions of Monofunctional Organometallic Osmium(II) Antitumor Complexes in Cell-Free Media. *Journal of Medicinal Chemistry*, *51*(12), 3635-3643. <https://doi.org/10.1021/jm701538w>
- Lee, S. Y., Kim, C. Y., & Nam, T. G. (2020). Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives. *Drug Design, Development and Therapy*, *14*, 5375-5392. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S275007>
- Lerman, L. S. (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*, *3*(1), 18-30. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80004-1)
- Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, *3*(5), 617-620. <https://doi.org/10.3892/br.2015.481>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock biology of microorganisms* (12th ed). Pearson.

- Massoud, S. S., Ledet, C. C., Junk, T., Bosch, S., Comba, P., Herchel, R., Hošek, J., Trávníček, Z., Fischer, R. C., & Mautner, F. A. (2016). Dinuclear metal(II)-acetato complexes based on bicompartamental 4-chlorophenolate: syntheses, structures, magnetic properties, DNA interactions and phosphodiester hydrolysis. *Dalton Transactions*, 45(32), 12933-12950. <https://doi.org/10.1039/C6DT02596J>
- McGuire, W. P., Hoskins, W. J., Brady, M. F., Kucera, P. R., Partridge, E. E., Look, K. Y., Clarke-Pearson, D. L., & Davidson, M. (1996). Cyclophosphamide and Cisplatin Compared with Paclitaxel and Cisplatin in Patients with Stage III and Stage IV Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 334(1), 1-6. <https://doi.org/10.1056/NEJM199601043340101>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Meier-Menches, S. M., Gerner, C., Berger, W., Hartinger, C. G., & Keppler, B. K. (2018). Structure–activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents – towards clinical development. *Chemical Society Reviews*, 47(3), 909-928. <https://doi.org/10.1039/C7CS00332C>
- Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) – nomenklatura enzymů. <https://iubmb.qmul.ac.uk/> (2. 5. 2022).
- Miles, J. S., & Wolf, C. R. (1989). Principles of DNA cloning. *BMJ (Clinical research ed.)*, 299(6706), 1019-1022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1837892/>
- Mohan, N., Mohamed Subarkhan, M. K., & Ramesh, R. (2018). Synthesis, antiproliferative activity and apoptosis-promoting effects of arene ruthenium(II) complexes with N, O chelating ligands. *Journal of Organometallic Chemistry*, 859, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2018.01.022>
- Monro, S., Colón, K. L., Yin, H., Roque, J., Konda, P., Gujar, S., Thummel, R. P., Lilge, L., Cameron, C. G., & McFarland, S. A. (2019). Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chemical Reviews*, 119(2), 797-828. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00211>
- Národní onkologický ústav (USA). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy> (27. 3. 2022).
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) – on-line kniha LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548022/> (6. 3. 2022).
- Nováková, O., Chen, H., Vrána, O., Rodger, A., Sadler, P. J., & Brabec, V. (2003). DNA Interactions of Monofunctional Organometallic Ruthenium(II) Antitumor Complexes in Cell-free Media. *Biochemistry*, 42(39), 11544-11554. <https://doi.org/10.1021/bi034933u>
- Oktábec, Z., & Jampilek, J. (2013). Stručná historie chemoterapie. *Chemické listy*, 107, 151-159. http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_02_151-159.pdf
- Open WetWare (*E. coli* Genotypes). https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes (30. 4. 2022).
- Pages, B. J., Ang, D. L., Wright, E. P., & Aldrich-Wright, J. R. (2015). Metal complex interactions with DNA. *Dalton Transactions*, 44(8), 3505-3526. <https://doi.org/10.1039/C4DT02700K>
- Paprocka, R., Wiese-Szadkowska, M., Janciauskiene, S., Kosmalski, T., Kulik, M., & Helmin-Basa, A. (2022). Latest developments in metal complexes as anticancer agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 452. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214307>
- Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J., & Jeltsch, A. (2002). *Biochemical methods: a concise guide for students and researchers*. Wiley-VCH.

- Pizarro, A. M., & Sadler, P. J. (2009). Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie*, *91*(10), 1198-1211. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.017>
- Ragheb, M. A., Eldesouki, M. A., & Mohamed, M. S. (2015). DNA binding, photo-induced DNA cleavage and cytotoxicity studies of lomefloxacin and its transition metal complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *138*, 585-595. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.11.046>
- Raza, A., Xu, X., Xia, L., Xia, C., Tang, J., & Ouyang, Z. (2016). Quercetin-Iron Complex: Synthesis, Characterization, Antioxidant, DNA Binding, DNA Cleavage, and Antibacterial Activity Studies. *Journal of Fluorescence*, *26*(6), 2023-2031. <https://doi.org/10.1007/s10895-016-1896-y>
- Reedijk, J. (2009). Platinum Anticancer Coordination Compounds: Study of DNA Binding Inspires New Drug Design. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *2009*(10), 1303-1312. <https://doi.org/10.1002/ejic.200900054>
- Renfrew, A. K. (2014). Transition metal complexes with bioactive ligands: mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery. *Metallomics*, *6*(8), 1324-1335. <https://doi.org/10.1039/C4MT00069B>
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, *205*, 698-699. <https://www.nature.com/articles/205698a0>
- RxList. <https://www.rxlist.com/cisplatin-drug.htm#description> (6. 3. 2022).
- Sanderson, B. A., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, *454*, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003>
- Song, L. -F., Deng, Z. -H., Gong, Z. -Y., Li, L. -L., & Li, B. -Z. (2021). Large-Scale de novo Oligonucleotide Synthesis for Whole-Genome Synthesis and Data Storage: Challenges and Opportunities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.689797>
- Strekowski, L., & Wilson, B. (2007). Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *623*(1-2), 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.008>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Štarha, P., & Trávníček, Z. (2018). Protinádorově účinné komplexy přechodných kovů: historie a současnost. *Chemické listy*, *112*(7), 412-420. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3128>
- Štarha, P., & Trávníček, Z. (2019). Non-platinum complexes containing releasable biologically active ligands. *Coordination Chemistry Reviews*, *395*, 130-145. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.06.001>
- Tsang, R. Y., Al-Fayea, T., & Au, H. -J. (2009). Cisplatin Overdose. *Drug Safety*, *32*(12), 1109-1122. <https://doi.org/10.2165/11316640-000000000-00000>
- UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/treatment-protocols-for-non-small-cell-lung-cancer> (4. 4. 2022).

- Vančo, J., Trávníček, Z., Hošek, J., Malina, T., & Dvořák, Z. (2021). Copper(II) Complexes Containing Natural Flavonoid Pomiferin Show Considerable *In Vitro* Cytotoxicity and Anti-inflammatory Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147626>
- Yu, Z., & Cowan, J. A. (2018). Metal complexes promoting catalytic cleavage of nucleic acids — biochemical tools and therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 43, 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.029>
- Zeglis, B. M., Pierre, V. C., & Barton, J. K. (2007). Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chemical Communications*, (44). <https://doi.org/10.1039/b710949k>
- Zhang, D. -Y., Nie, Y., Sang, H., Suo, J. -J., Li, Z. -J., Gu, W., Tian, J. -L., Liu, X., & Yan, S. -P. (2017). Three structurally related Copper complexes with two isomers: DNA/BSA binding ability, DNA cleavage activity and excellent cytotoxicity. *Inorganica Chimica Acta*, 457, 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.12.002>
- Zhao, J., Li, S., Wang, X., Xu, G., & Gou, S. (2019). Dinuclear Organoruthenium Complexes Exhibiting Antiproliferative Activity through DNA Damage and a Reactive-Oxygen-Species-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Inorganic Chemistry*, 58(3), 2208-2217. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b03447>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BEN	benzen
bp	počet párů bází
BIP	bifenyl
CTR1	transportér na bázi mědi (z anglického copper transporter 1)
CYM	<i>p</i> -cymen (isopropyltoluen)
DHA	dihydroantracen
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
en	ethylendiamin
HMG	skupina proteinů s vysokou mobilitou (z anglického high mobility group)
IC ₅₀	inhibiční koncentrace
kbp	počet párů bází krát tisíc
L forma	lineární forma plasmidu
<i>lacZ</i>	gen kódující enzym β-galaktosidasu
mM	milimolární koncentrace
MMR	korekce správného párování bází (z anglického mismatch repair)
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
neg. ctr	negativní kontrola
NER	nukleotidová excizní oprava (z anglického nucleotide excision repair)
OC forma	otevřená kruhová forma plasmidu (z anglického open circular form)
pcym	<i>p</i> -cymen (isopropyltoluen)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (z anglického reactive oxygen species)
SC forma	superhelikální forma plasmidu (z anglického superhelical form)
TA	trisacetátový
TAE	trisacetátový s přidavkem EDTA

TBP	protein vážící se na sekvenci zvanou TATA box (z anglického TATA-binding protein)
THA	tetrahydroantracen
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
μM	mikromolární koncentrace