

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium DNA nádorových buněk vystavených doxorubicinu

The Study of the DNA of Tumor Cells Exposed to Doxorubicin

Bakalářská práce

Marie Belhajová

Vedoucí práce: RNDr. Jitka Poljaková, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením mé školitelky RNDr. Jitky Poljakové, Ph.D. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

V Praze dne

Podpis.....

Poděkování

Děkuji tímto RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a trpělivost při vypracování bakalářské práce. A dále pak také panu prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, Csc. za umožnění izolace DNA a spektrofotometrického měření. Můj dík také patří kolektivu pracovníků laboratoře Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze – Motole za cenné rady a vytvoření příjemných pracovních podmínek.

Abstrakt

Nádorová onemocnění patří mezi nejzávažnější problémy současné medicíny a jejich incidence neustále stoupá. I přes velký rozvoj terapeutických metod během posledních let jsou tato onemocnění stále obtížně léčitelná. Neuroblastom (NB) je maligní embryonální nádor dětí, vycházející z periferního nervového systému a jedná se o nejčastější nádor v dětské populaci. Pro jeho léčbu se využívá jak chirurgického zákroku, tak chemoterapie pomocí cytostatik. Doxorubicin je protinádorové léčivo, jehož cytotoxický účinek je založen na mnoha mechanismech a jedním z nich je interkalace do molekuly DNA. Spektrofotometricky byla stanovována přítomnost doxorubicinu v DNA, která byla izolována z lidských neuroblastomových linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO}, vystavených působení tohoto cytostatika. Touto metodou se však nepodařilo přítomnost doxorubicinu detekovat.

Klíčová slova: neuroblastom, doxorubicin, interkalace, spektrofotometrie

Abstract

Cancerous diseases are among the most serious problems of modern medicine and their occurrence is constantly increasing. Despite the significant development of therapeutic methods during recent years, this disease remains difficult to treat. Neuroblastoma (NB) is a malignant embryonal tumor in children, emerging from the peripheral nervous system and is the most frequent tumor in children. It is treated surgically and also with chemotherapy using cytostatic drugs. The cytostatic drug Doxorubicin has become very significant in treating cancer. Doxorubicin is a anticancer medication whose cytotoxic effect is based on a number of mechanisms, one of which is the intercalation into DNA molecules. Spectrophotometry was used to detect the presence of doxorubicin in the DNA derived from human neuroblastoma cell lines UKF-NB-4 and UKF-NB-4^{DOXO}, exposed to this substance. This method, however, failed to detect the presence of doxorubicin.

Keywords: neuroblastoma, doxorubicin, intrecalation, spectrophotometry

OBSAH

Seznam použitých zkratké.....	6
1. Úvod	8
1.1. DNA	9
1.2. Konvenční protinádorová chemoterapie	12
1.3. Rezistence	14
1.4. Doxorubicin	15
1.4.1. Mechanismus účinku doxorubicinínu	17
1.4.2. Nežádoucí účinky doxorubicinínu	19
1.5. Nádorová onemocnění dětí	20
1.5.1. Neuroblastom.....	21
2. Cíl práce.....	24
3. Materiál a metody.....	25
3.1. Materiál.....	25
3.2. Metody:.....	26
3.2.1. Kultivace neuroblastomových buněčných linií.....	26
3.2.2. Počítání buněk.....	26
3.2.3. Příprava vzorků	26
3.2.4. Izolace DNA	27
3.2.5. Elektroforéza na agarosovém gelu.....	28
3.2.6. Spektrofotometrické stanovení přítomnosti doxorubicinínu v DNA	28
4. Výsledky a diskuse.....	30
4.1. Izolace DNA	30
4.2. Elektroforeza na agarosovém gelu.....	32
4.3. Spektrofotometrické stanovení přítomnosti doxorubicinínu v molekule DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000.....	34
4.4. Spektrofotometrické stanovení přítomnosti doxorubicinínu v molekule DNA pomocí spektrofotometru Helios α	36
5. Závěr.....	40
Seznam literatury.....	41

Seznam použitých zkratk:

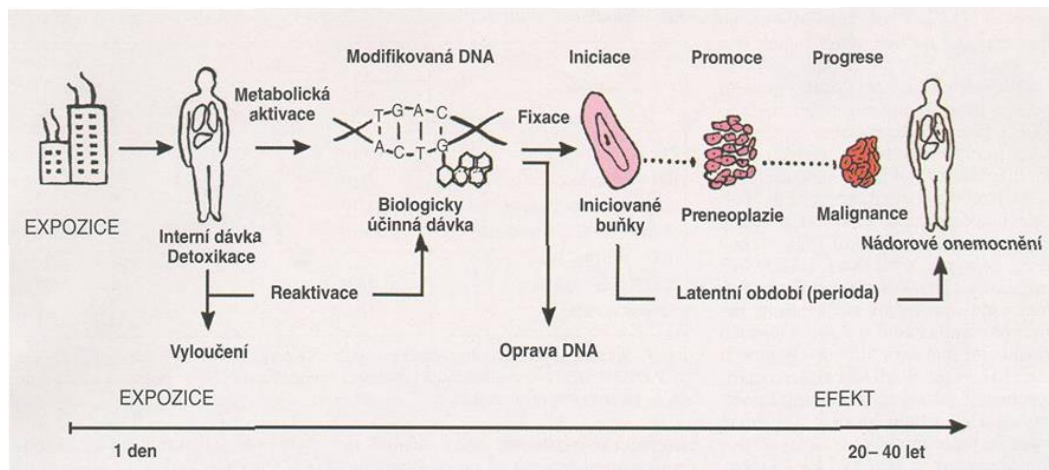
ATB	antibiotikum
BAX	proapoptotický protein „Bcl-2 associated-X“
BCL2	antiapoptotický protein „B-cell lymphoma-2“
BCLX	antiapoptotický protein „B-cell lymphoma-extra large“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNR	daunorubicin
DOXO	doxorubicin
DOXOL	doxorubicinol
dsDNA	double-strand DNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAS	receptor, též znám jako apoptotický antigen 1 (APO-1)
FBS	fetální hovězí sérum
IM	infarkt myokardu
IMDM	kultivační medium „Iscove’s Modified Dulbeccos Medium“
LDH	laktátdehydrogenáza
MALDI	z anglického „Matrix-assisted laser desorption/ionization“
MIBG	metajódbenzylguanin
MPEG	methoxy-polyethylenglykol
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie „tandem mass spektrometry“
MYCN	onkogen, z angl. „myelocytomatosis viral related, neuroblastoma derived gen“
p53	protein o molekulové hmotnosti 53 kDa (dle metody SDS-PAGE)
p.a.	pro analýzu
pb	páry bazí
PBS	sodno-fosfátový pufr s obsahem NaCl („phosphate-buffered saline“)
PCR	z anglického „polymerase chain reaction“
PEG	polyethylenglykol
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace H ⁺ iontů

RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku „reactive oxygen species“
SHELLDI	z anglického „Surface-enhanced laser desorption/ionization“
TBE pufr	pufr obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA
UV	z anglického „ultra violet“
UV-RRS	UV-rezonanční Ramanova spektroskopie

1. Úvod

Zhoubné novotvary patří hned po onemocnění kardiovaskulárního systému k nejčastějším příčinám úmrtí ve všech civilizovaných zemích [1]. Incidence nádorových onemocnění narůstala v průběhu druhé poloviny 20. století mimořádnou rychlostí. V České republice takto onemocní každý třetí občan a příčinou každého čtvrtého úmrtí je nádor. Nádorová onemocnění postihují jedince každého věku, tedy od narození až po vysoké stáří [2]. Ovšem tato choroba postihuje stále mladší ročníky, což je dáno zejména odlišnou skladbou potravy, ale rovněž stresem a kontaminací životního prostředí [3]. Nádorové buňky se od normálních buněk liší především tím, že se trvale a nekontrolovatelně množí. Jedná se o složitý, vícestupňový proces (Obr. 1, str. 9). Vznik nádorového onemocnění (karcinogeneze) je výrazem narušení přísně udržované rovnováhy mezi buněčnou proliferací, diferenciací, migrací a programovanou smrtí buňky, čili apoptozou [2]. Léčba nádorových onemocnění je komplikovaná z důvodu, že její pomocí potřebujeme zničit buňky těla vlastní a nikoli cizorodé. Nádorové buňky se více či méně liší od buněk normálních, ale odlišnosti jsou buď příliš malé, takže jsou imunitním systémem ignorovány nebo nádorové buňky využívají mechanismy, které jim umožňují paralyzovat některé zbraně imunitního systému. Cílem veškerých opatření je co nejdříve diagnóza, aby se nádor zastihl v počátečních stádiích a bez generalizace, tedy ještě kurabilní [1, 3]. Pro léčbu nádorových onemocnění se využívá větší počet různých léčebných metod, z nichž tři lze považovat za hlavní a to jsou chirurgická léčba, radioterapie (včetně terapie radionuklidy) a chemoterapie (včetně megaterapie zajištěné transplantací kostní dřeně nebo hematopoetických kmenových buněk) [2]. Až do 20. let 20. století zůstávala chirurgická léčba jedinou protinádorovou léčebnou metodou. Objev a využití rentgenových paprsků představoval zcela nový způsob protinádorové terapie. Až ve 40. letech minulého století se začala využívat chemoterapie pomocí cytostatik a z původně doplňkové metody se v průběhu 60. let stala jedna z hlavních léčebných metod [4]. Z chemického hlediska se jedná o velmi pestrou skupinu látek, jenž různými mechanismy zpomalují nebo zastavují růst a množení nádorových buněk. Ideální protinádorová látka by měla zcela zničit nádorové buňky, aniž by došlo k poškození buněk normálních, nicméně žádné z dosud používaných cytostatik bohužel takové vlastnosti nemá [5]. Mezi nejběžněji používaná cytostatika patří sloučeniny na bázi platiny, jako je cisplatina, karboplatina nebo oxaliplatina. Druhou významnou skupinou protinádorových léčiv jsou sloučeniny

generující radikály jako doxorubicin a epirubicin, jež patří do skupiny cytostatik inhibující replikaci a transkripci DNA svojí nekovalentní vazbou do této dvoušroubovice [6]. Nejčastěji se však uplatňuje kombinace různých metod protinádorové léčby.



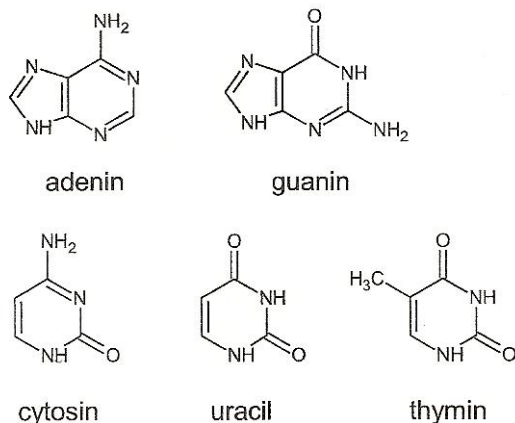
Obr. 1: Schéma víceetapového procesu karcinogeneze - nejprve dochází k vystavení organismu různým druhům karcinogenních látek, což může mít za následek modifikaci DNA a pokud nedojde k opravě, nastupují tři fáze karcinogeneze a to iniciace, promoce a progrese, kdy dochází ke vzniku malignancí [7].

1.1. DNA

Zjištění, že genetická informace je uložena v polymerní molekule ve formě kódu zprostředkovaného pouze čtyřmi typy monomerních jednotek, patří k jednomu z nevýznamnějších objevů 20. Století [8].

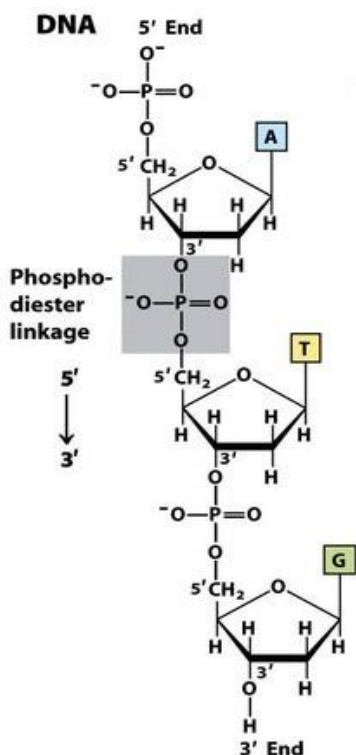
Schopnost uchovávat a přenášet genetickou informaci mají nukleové kyseliny, které rozlišujeme na dva základní typy a to kyselinu ribonukleovou (RNA) a kyselinu deoxyribonukleovou (DNA). Lidskou DNA tvoří $3 \cdot 10^9$ párů bází (pb), které jsou uspořádány do 23 párů chromosomů. Přesná sekvence všech 3 miliard pb je u každého jedince unikátní [8].

Základní stavební jednotkou je nukleotid, který vzniká spojením dusíkaté báze, cukerné složky (pentosy) a zbytku kyseliny trihydrogenfosforečné. Nejdůležitější báze nukleových kyselin jsou adenin, guanin (purinové báze), cytosin a thymin (pyrimidinové báze) a v molekule RNA je místo thyminu uracil (Obr. 2, str. 10) [8, 9].



Obr. 2: Nejdůležitější purinové a pyrimidinové báze nukleových kyselin [9]

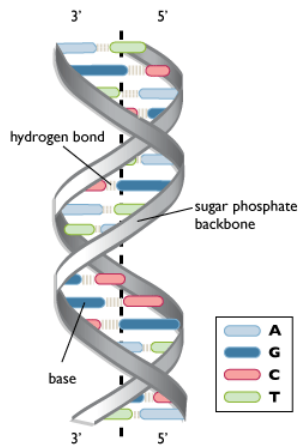
Jednotlivé báze jsou s cukernou složkou vázány prostřednictvím N-glykosidové vazby na prvním uhlíku pentosy [8, 9]. Tyto monomerní jednotky jsou v DNA spolu spojeny pomocí 3', 5'-fosfodiesterových vazeb, přičemž tvoří lineární řetězec (Obr. 3) [8].



Obr. 3: Část řetězce molekuly DNA. Purinové a pyrimidinové báze, adenin (A), thymin (T) a guanin (G), jsou pomocí N-glykosidových vazeb navázány na kostru DNA, která je tvořena jednotkami 2'-deoxyribosy spojenými fosfodiesterovými vazbami [10].

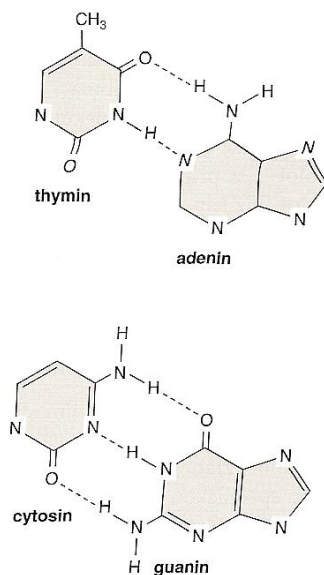
V roce 1950 byl navržen model dvoušroubovicové DNA (Obr. 4, str. 11) Watsonem, Crickem a Wilkinsnem, kteří vycházeli z předpokladu, že koncentrace deoxyadenosinu

v DNA je ekvivalentní koncentraci doxythymidinu a koncentrace deoxyguanosinu je ekvivalentní koncentraci deoxycytidinu [8].



Obr. 4: Dvoušroubovice DNA [11]

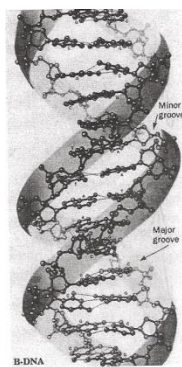
Mezi příslušnými purinovými a pyrimidinovými bázemi na protilehlých vláknech jsou vodíkové můstky, které drží oba řetězce pohromadě, ale také se zde uplatňují van der Waalsovy a hydrofobní interakce. Mezi deoxyadenosinem a doxythymidinem jsou dvě vodíkové vazby, které vznikají mezi vysoce elektronegativními atomy N a O, zatímco deoxyguanosin s deoxycytidinem jsou spojeny pomocí tří vodíkových můstků, z čehož je patrné, že tato vazba je silnější a odolnější vůči denaturaci (Obr. 5) [8].



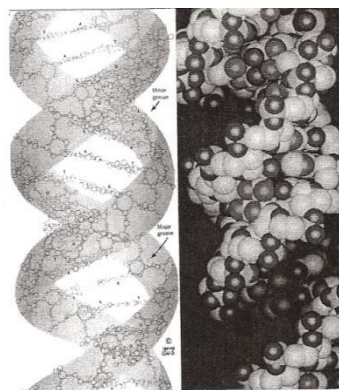
Obr. 5: Párování mezi adeninem a thyminem zahrnuje vznik dvou vodíkových můstků. Mezi guaninem a cytosinem vznikají tři vodíkové můstky. Na obrázku jsou vodíkové interakce znázorněny přerušovanými čarami. [8]

Dva řetězce DNA, takto spojené pomocí vodíkových vazeb, společně obtáčí středovou osu a vytvářejí tak dvoušroubovici. Mluvíme tedy o dvouvláknové DNA („double stranded

DNA“-dsDNA). Vlákna v dvoušroubovicové DNA jsou antiparalelní, což znamená, že směr fosfodiesterových vazeb jednoho řetězce v DNA ($5' \rightarrow 3'$) je opačný oproti směru vazeb druhého řetězce ($3' \rightarrow 5'$) [8]. Jako všechny makromolekuly, jsou i molekuly nukleových kyselin vedle primární struktury charakterizovány ještě strukturami vyššími, a to konformací v prostoru. Běžná forma DNA je pravotočivá dvoušroubovice a za fyziologických podmínek, tedy při relativně nízké koncentraci solí a vysokém stupni hydratace, existuje DNA ve formě B (Obr. 6). Pokud však snížíme relativní obsah vody na 75 % přechází do konformačního uspořádání A, kdy tvoří širší a více plochou pravotočivou šroubovici (Obr. 7) [9].



Obr. 6: Struktura B-DNA [9]

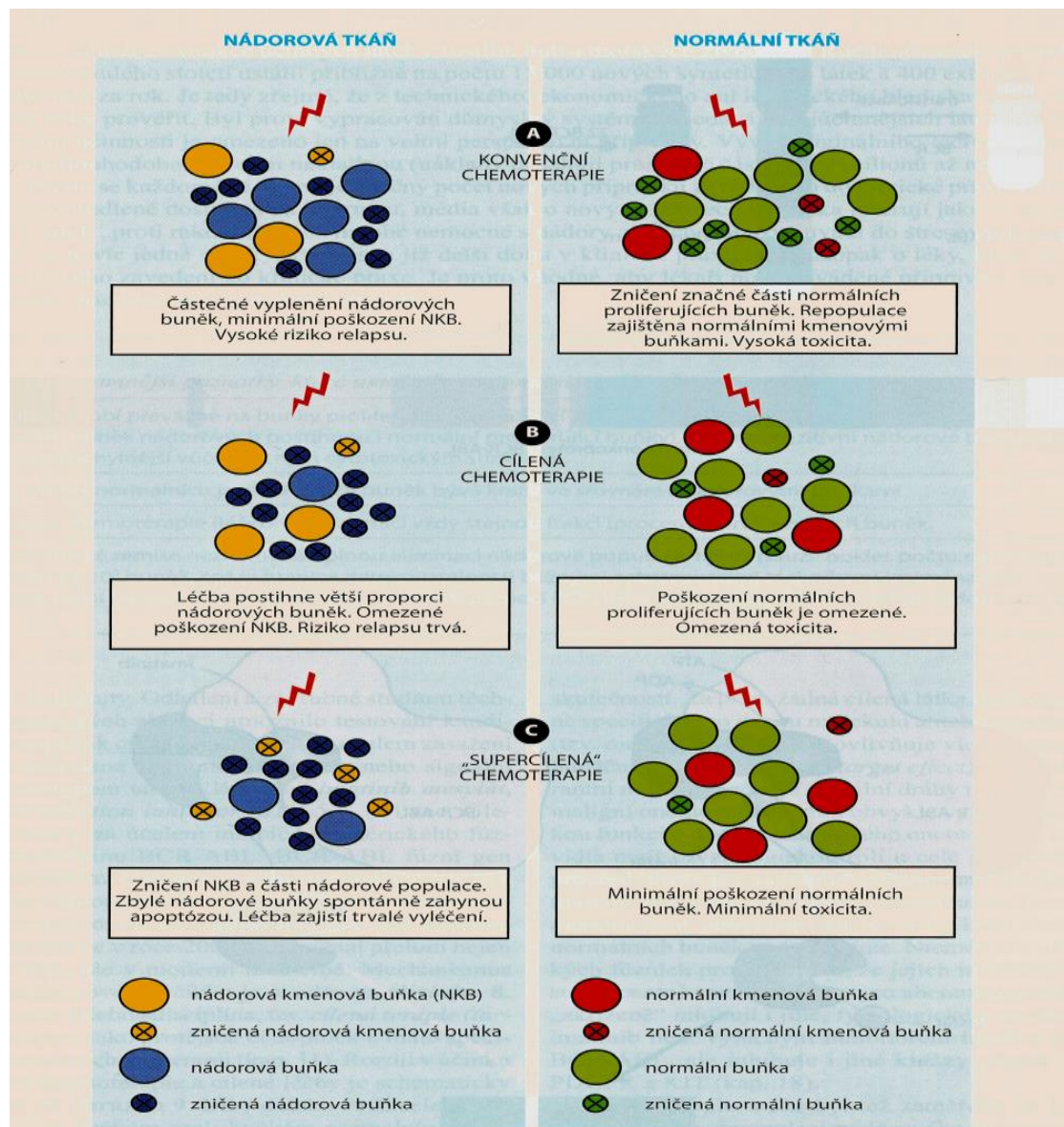


Obr. 7: Struktura A-DNA [9]

1.2. Konvenční protinádorová chemoterapie

Pokroky molekulární biologie a genetiky nám umožnily hlubší poznání patogeneze nádorového bujení, které vedlo k identifikaci klíčových struktur podílejících se na maligní transformaci. Tyto objevy obohatily léčebné možnosti, to vedlo k zavedení nových léčebných modalit, ale též k možnostem individualizované léčby. Vedle konvenční (klasické) chemoterapie jsou dnes již k dispozici další modalities, zejména cílená léčba. Konvenční (necílená) chemoterapie byla zavedena do klinické praxe na základě preklinických a klinických zkušeností s protinádorovou účinností určitého přípravku u různých typů nádorových onemocnění. Používaná cytostatika lze označit jako širokospektrá a jen zřídka je cytostatikum určeno k léčbě jednoho druhu nádoru. Konvenční cytostatika se váží na určité buněčné struktury (DNA, RNA, cytoskelet, proteiny) a inhibují jejich funkci, ale jen slabě inhibují interakce mezi proteiny [12]. Jen nepřímo indukují apoptózu (druhotně cestou genotoxického stresu a zástavy buněčného

cyklu) [13]. K těmto cytostatikům se řadí antimetabolity, genotoxická cytostatika, kam patří právě zkoumaný doxorubicin, antimitotika, modifikované formy konvenčních cytostatik a další. Jako protějšek či doplněk k málo specifické konvenční chemoterapii vznikla nová léčebná metoda, tzv. cílená chemoterapie. Rozdíl v účinku konvenční chemoterapie a cílené léčby je znázorněn na Obr. 8 [4]. Problémy konvenční léčby jsou vedlejší účinky cytostatik a také možný vznik rezistence.

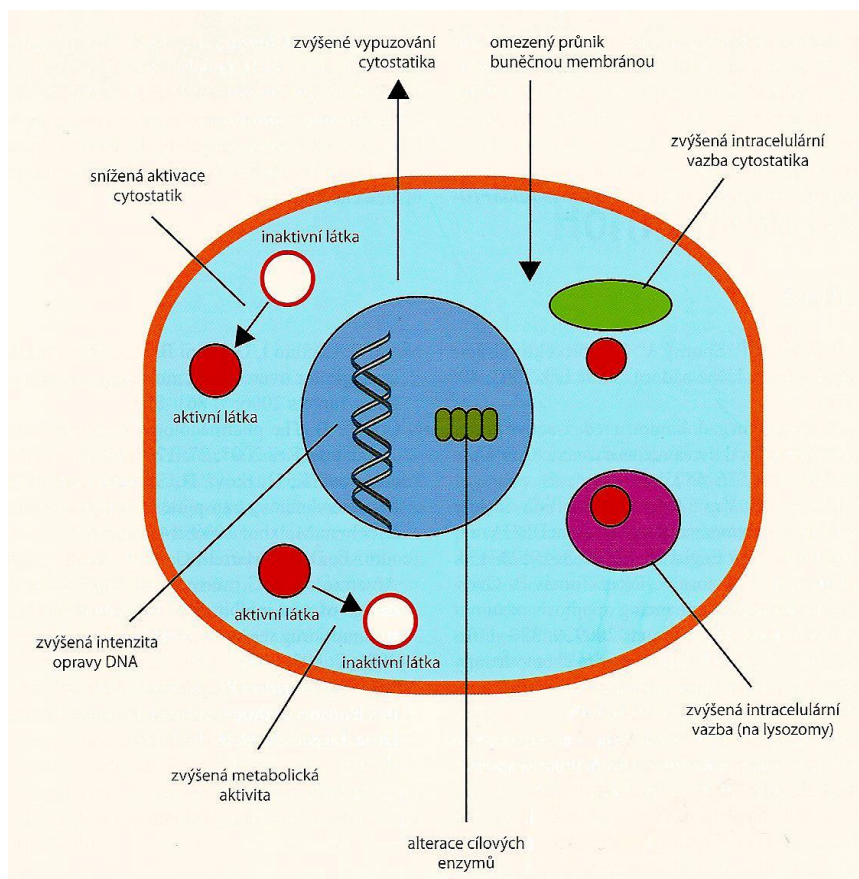


Obr. 8: Znázornění základních rozdílů v účinku mezi konvenční (A), cílenou (B) a supercílenou (C) chemoterapií. Zobrazena je toxicita chemoterapie jak vůči nádorovým buňkám (levý sloupec), tak vůči zdravé tkáni (pravý sloupec) včetně účinku na kmenové buňky [4].

1.3. Rezistence

Účinnost protinádorové léčby je často výrazně omezena vznikem rezistence. Může se jednat o primární necitlivost nádorových buněk určitého histopatologického typu k cytostatiku (tzv. primární rezistence), nebo mnohem častěji se setkáváme s druhotnou rezistencí, což je rezistence získaná, která vzniká až v průběhu cytostatické léčby, kdy se původně citlivá nádorová populace stává rezistentní a účinnost této léčby je snížena.[4]

Mechanismy látkové rezistence mají komplexní povahu a jsou vázány na tyto základní pochody (Obr. 9, str. 15) – změnu farmakokinetiky (snížená resorpce, zvýšené vylučování, popř. urychlený katabolismus) a změnu cytokinetiky. Změny cytokinetiky nastávají s narůstající populací nádoru, kdy větší část buněk přechází do fáze G_0 , ve které je citlivost na chemoterapii omezená a s přibývajícím populací nádorových buněk vznikají následně sekundární mutace buněk, které jsou příčinou vzniku rezistentních buněčných klonů. Může docházet ke snížení koncentrace nebo aktivity enzymů, které jsou nutné pro konverzi cytostatika v účinnou látku, nebo naopak zvýšení koncentrace enzymů, jenž se podílejí na biodegradaci cytostatika. Omezení průniku chemoterapeutika buněčnou membránou či porušení nitrobuněčné distribuce (např. do lysosomů) mohou být další z příčin vzniku rezistence. Rezistenci může působit i zvýšená rychlost opravy DNA. Velmi důležitým mechanismem vzniku rezistence je porucha mechanismů apoptózy způsobená zvýšenou expresí apoptotických molekul (BCL2, BCLX aj.) nebo inaktivací proapoptotických efektorů (např. p53, BAX, FAS) [4].

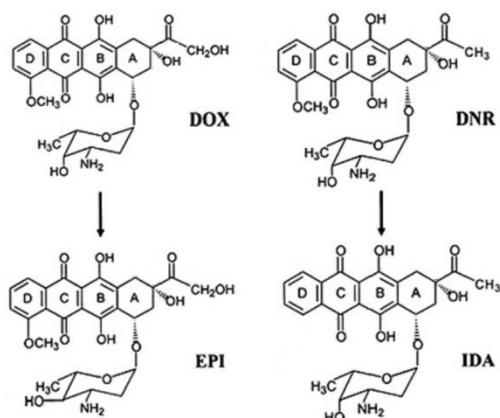


Obr. 9: Schématické znázornění možných mechanismů rezistence na cytostatika [4]

1.4. Doxorubicin

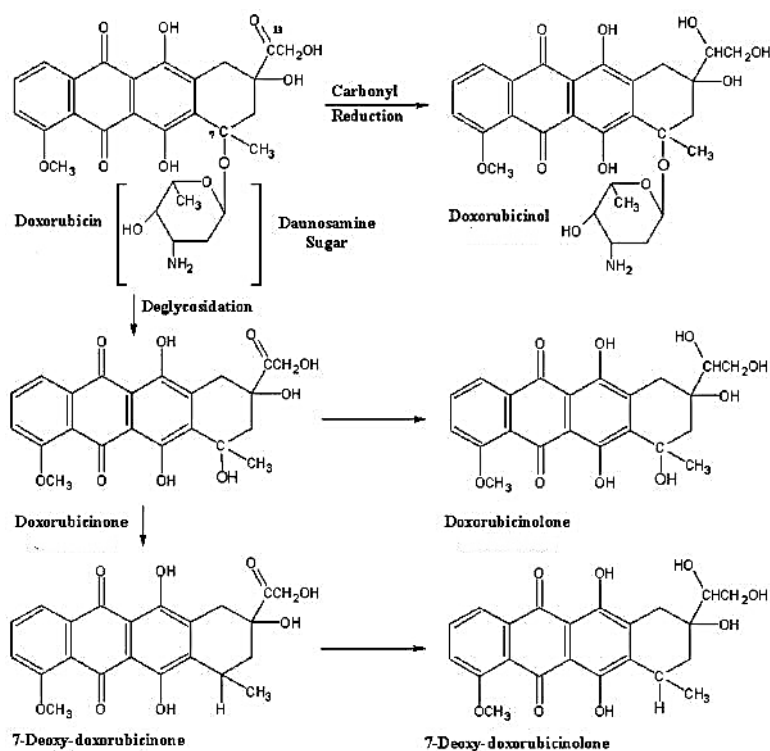
Doxorubicin (DOXO) je antracyklinové antibiotikum (ATB). Antracyklinová ATB patří do skupiny genotoxických konvenčních cytostatik, jenž působí inhibici replikace a transkripce DNA a jedná se o jedny z neúčinnějších cytostatik. Inhibice replikace DNA vzniká následkem alterace DNA způsobené cytostatikem (genotoxický účinek). Jde o přímé poškození struktury již hotových nukleových kyselin. Právě k tomuto strukturálnímu poškození nukleových kyselin může dojít rozmanitým způsobem: alkylací, rozštěpením molekuly DNA a nebo interkalací, kam se řadí již zmiňovaná antracyklinová antibiotika [4]. Pro interkalační látky je charakteristická lineárně anelovaná molekula a to umožňuje její vsunutí do dvoušroubovice DNA, kde se v úsecích obsahujících guanin váže vodíkovými vazbami. Biochemickým důsledkem této vazby je již zmíněná inhibice replikace DNA a inhibice syntézy RNA [5]. Tato skupina ATB zahrnuje daunorubicin (DNR), epirubicin (EPI), idarubicin (IDA) a v neposlední řadě nejvýznamnějším

zástupcem je doxorubicin (DOXO). Jde o látku, jež byla izolována v 60. letech 20. století z kultur plísně *Streptomyces peucetius* [14]. DOXO je též znám pod názvem adriamycin. Jedná se o hydroxyderivát DNR (14-hydroxydaunorubicin). Chemický vzorec DOXO je: (8S,10S) – 10 - [(3 – amino - 2,3,6 – trideoxy – α – L – lyxo - hexapyranosyl)oxy] - 6,8,11 – trihydroxy – 8 - (hydroxyacetyl) – 1 – methoxy - 5,7,8,9,10,12 – hexahydrotetracen - 5,12– dion (Obr. 10). Tato molekula se skládá z chinonového aglykonu, který je odvozen od částečně hydrogenovaného tetracenu a z bazického cukru daunosaminu, jež je připojen v poloze 10 pomocí glykosidické vazby. Konjugovaný systém aglykonu je chromoforem pro viditelnou oblast. Díky tomu se DOXO vyznačuje charakteristickým červeným zbarvením [5].



Obr. 10: Chemické vzorce antracyklinových antibiotik - doxorubicin (DOX), daunorubicin (DNR), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA) [15]

Jako hydrochlorid je doxorubicin podáván intravenózně (i. v.) rozpuštěn ve fyziologickém roztoku. Po perorálním podání se vstřebává velmi málo [16]. Ve velké míře je metabolizován především v játrech a je vylučován žlučí, malá frakce je pak vylučována močí. Existují dvě důležité metabolické přeměny DOXO a to na primární metabolit Doxorubicinol (DOXOL), který vzniká redukcí postranního řetězce karbonylové skupiny v pozici C-13. Druhá metabolická cesta představuje redukční deglykosidaci za vzniku 7-deoxydoxorubicinonu a 7-deoxydoxorubicinolonu (Obr. 11, str. 17) [17]. Má široké uplatnění v klinické praxi především u hematologických malignit, lymfomů i celé řady solidních nádorů. Podává se převážně v kombinacích s jinými cytostatiky ve formě krátkodobé nebo kontinuální infuze. Nejzávažnější je jeho kardiotoxicita, jejíž riziko roste s kumulativní dávkou doxorubicinu, především po překročení 300 mg/m² [2].



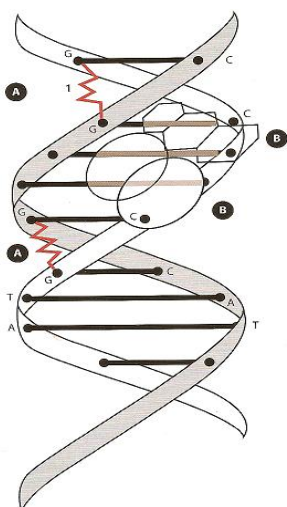
Obr. 11: Metabolismu doxorubicinu [17]

1.4.1. Mechanismus účinku doxorubicinu

Cílem cytostatické léčby je omezení růstu nádoru, tedy omezení buněčné proliferace nádorových buněk. Hlavním mechanismem účinku DOXO a antracyklinových ATB je interkalace, tedy nekovalentní vazba cytostatika na molekulu DNA (Obr. 12, str. 18) [4].

Pro sledování interakcí a vztahů proteinů, nukleových kyselin a nízkomolekulárních látek se využívá řada analytických technik a postupů. Současné technologie se zaměřují především na hmotnostní spektrometrii MALDI a SHELDI či tandemové detekce MS/MS. Nevýhody jsou však v nutné úpravě vzorku před provedením analýzy. Další intenzivně rozvíjenou oblastí jsou techniky array technologií a v rámci těchto technik nachází uplatnění elektrochemická detekce. Využitím této metody byla sledována interakce protinádorového léčiva doxorubicinu s nukleovými kyselinami. Interkalovaný doxorubicin snižoval redoxní signály CA (cytosin/adenin) dsDNA a pravděpodobně též docházelo k dalším strukturálním změnám, které se projevily v různé tvorbě vrstev na povrchu pracovní elektrody. Kromě signálu CA dsDNA byl také pozorován signál odpovídající

doxorubicinu. Pomocí elektrochemických metod lze detekovat interkalaci DOXO do molekuly DNA [18]. Pro další výzkum interkace doxorubicinu a DNA bylo využito metody SERS (povrchem zesílený Ramanův rozptyl) a UV-rezonanční Ramanovy spektroskopie (UV-RRS), kdy bylo zjištěno, že interakce doxorubicinu a DNA je realizována vazbou tohoto léčiva na adenin a guanin [19]. Výzkum, při kterém byla použita metoda ^{32}P -postlabeling, prokázal, že oproti elliptycinu, který tvoří kovalentní adukty, nebyly žádné kovalentní adukty detekovány u DNA vystavené právě působení doxorubicinu [20].



Obr. 12: Znáznornění účinku cytostatik A) alkylačního B) interkalačního [4]

Interkalace daného cytostatika do struktury DNA způsobí ztrátu funkce polymeráz a dalších enzymů a proteinů vázících se na DNA, čímž je zablokována replikace a transkripce, ale také může docházet ke vzniku mutací DNA [14]. Kromě interkalačního mechanismu se DOXO dokáže vázat na buněčnou membránu (vazba na bílkovinu a fosfolipid membrány) a zintenzivňuje tak svůj cytotoxický účinek [2]. Dále funguje jako blokáda funkcí topoizomerázy II [4]. Topoizomerázy jsou enzymy, které se podílejí na změnách v prostorovém uspořádání DNA, při její replikaci před dělením buňky. Topoizomeráza II se váže na oba řetězce DNA a působí jejich přerušování a opětné spojení. Při blokáde tohoto enzymu se nespojují jednotlivé části DNA a ta se proto rozpadá [4, 21]. Topoisomerázou II indukované poškození DNA je doprovázeno zástavou buněčného růstu v G_1 a G_2 fázi a apoptozou [22]. V neposlední řadě dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku tedy tvorbě volných radikálů, které se podílejí na nejzávažnějším vedlejších účinku doxorubicinu, a tím je kardiotoxicita [2].

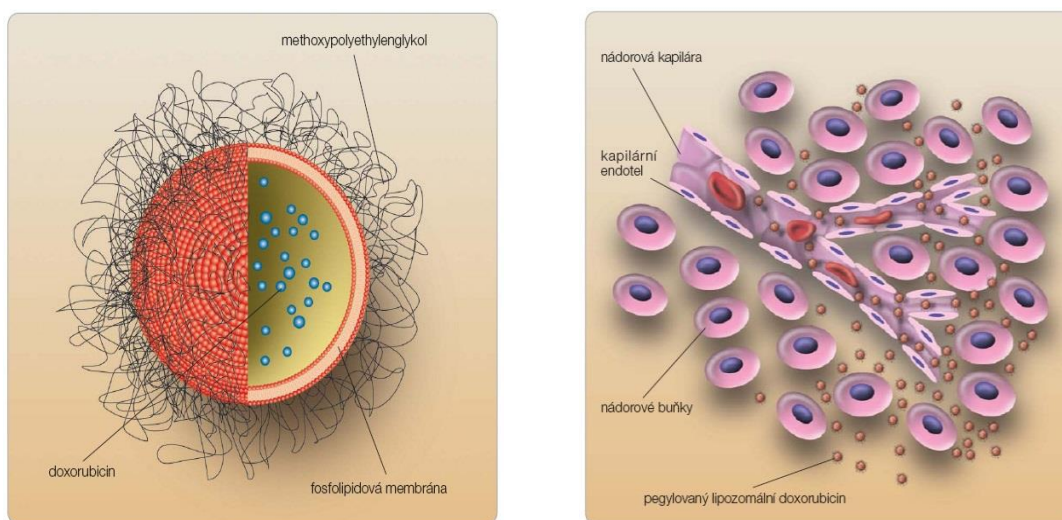
1.4.2. Nežádoucí účinky doxorubicinu

I přes své široké využití je tento lék stále méně atraktivní vzhledem ke kardiotoxickým vedlejším účinkům po ukončení léčby [23, 24]. Navíc některé studie zjistily, že pacienti léčení DOXO měli zvýšené riziko infarktu myokardu a že toto riziko přetrvává až 25 let po léčbě DOXO [25]. Léčba DOXO vykazuje srdeční remodelaci, která má za následek srdeční fibrózy a apoptózy myocytů [26]. Bylo zjištěno, že doxorubicin indukuje tvorbu komplexů s aminokyselinami v myokardu [22]. Použití DOXO je proto limitováno právě vysokou kardiotoxicitou v důsledku vzniku reaktivních sloučenin kyslíku a při překročení dávky může tedy dojít k selhání srdce. Navíc kardiotoxicita roste s věkem, neboť ve vyšším věku se tělo zbavuje toxických látek pomaleji. K selhání srdce může dojít při překročení dávky 300 mg/m^2 (některé zdroje uvádějí 400 mg/m^2 i 450 mg/m^2). Při dosažení takového množství je nutné volit jinou, mnohdy méně účinnou léčbu [2, 6].

Snaha omezit toxicitu používaných a účinných cytostatik je často realizována vazbou na nosiče, které výhodným způsobem mění farmakokinetiku cytostatik a omezují jejich nežádoucí účinky. Nejčastěji se používá enkapsulace cytostatik v liposomech, pegylace cytostatik, případně pegylace liposomů, vzácněji pak vazba na jiné nosiče. Liposomy jsou lipidové partikule o velikosti 1-2 μm s vnější lipidovou vrstvou tvořenou zpravidla dvěma lipidovými membránami a vnitřním izolovaným kompartmentem obsahujícím vodný roztok, do kterého je inkorporováno cytostatikum. Liposomy snadněji pronikají do tkáně nádoru, jehož nově tvořené cévy nemají souvislou endotelovou výstelku a prakticky postrádají pericyty, zatímco únik do tkání parenchymatózních orgánů s nefenestrovaným endotelem je ztížen. Do této skupiny patří liposomální doxorubicin, kdy se cytostatikum uvolňuje z liposomů přímo v nádorové tkáni a v metastázách, což zvyšuje protinádorový účinek. Ve dvou klinických studiích byl sledován signifikantní pokles kardiotoxicity u liposomální formy doxorubicinu ve srovnání s klasickým doxorubicinem při expozici stejným dávkám cytostatika [4].

Další možností modifikace konvenčních cytostatik je pegylace, tedy vazba cytostatika na polyethylenglykol (PEG). Pegylace omezuje degradaci látky v cirkulaci, zaručuje delší poločas vylučování a významně omezuje toxicitu při nezměněné efektivitě. Tato metoda je vhodná i pro liposomální formy (např. liposomální pegylovaný doxorubicin), které polyethylenglykolový potah chrání před degradací a omezuje jejich rozpoznání a pohlcení mononukleárním fagocytárním systémem. Liposomální pegylovaný doxorubicin (Obr. 13, str. 20) je oproti liposomálnímu doxorubicinu ošetřen právě touto

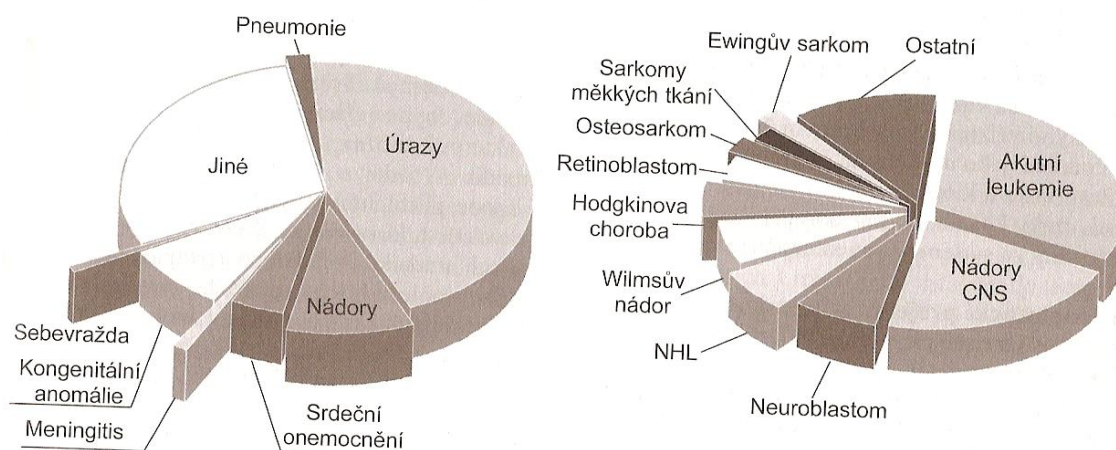
pegylací, kdy vnější vrstva lipidové dvojvrstvy je pokryta methoxy-polyethylenglykolovou (MEPG) vrstvou. Pegylace snižuje clearance liposomálního doxorubicinu a prodlužuje jeho biologický poločas. Díky své malé velikosti proniká většina pegylovaných liposomů velmi dobře do nitra nádorové masy, kdežto cévní stěna normálních tkání je pro ně mnohem méně přístupná. (Obr. 13). To zajišťuje poměrně selektivní průnik DOXO do nádorových buněk s nízkou toxicitou vůči zdravým tkáním, včetně kardiotoxicity [4].



Obr. 13: Schéma Struktury pegylovaného liposomálního doxorubicinu (vlevo) a akumulace pegylovaného liposomálního doxorubicinu v solidních nádorech [27]

1.5. Nádorová onemocnění dětí

Nádorová onemocnění u dětí jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí po úrazech a nejčastější příčinou úmrtí u dětí mezi chorobami vůbec (Obr. 14, str. 21). Zhoubné nádory u dětí se od zhoubných nádorů v dospělosti zásadně odlišují a to tím, že u dětí se jedná o rychle rostoucí nádory s vysokým podílem růstové frakce a také mnohem dříve dochází k metastázám. Nicméně právě díky těmto vlastnostem jsou nádory u dětí daleko více chemosenzitivní a radiosenzitivní než nádory, které se typicky vyskytují v dospělosti [28].



Obr. 14: Příčiny úmrtí v dětském věku (vpravo) a typy nádorů v dětském věku (vlevo) [29]

1.5.1. Neuroblastom

Jedná se o maligní embryonální nádor dětí, vycházející z periferního nervového systému (neuronů autonomních ganglií sympatiku, prekursorovou buňkou je neuroblast neurální lišty). Neuroblastom je jedním z nejčastějších solidních nádorů dětského věku, častější jsou jen nádory mozku a míchy, tvoří přibližně 6-8 % všech nádorových onemocnění u dětí a u kojenců je nejčastější malignitou vůbec. 90 % případů je diagnostikováno do 5 let věku dítěte a v České republice každoročně zjištěno 25-30 dětí postižených neuroblastomem. Jednou z charakteristik tohoto onemocnění je jednak věkově specifická incidence klesající s věkem, ale také vysoká heterogenita biologického chování. Pravděpodobnost vyléčení závisí na věku při stanovení diagnózy, rozsahu onemocnění a biologických charakteristikách nádoru. Neuroblastom může být diagnostikován kdekoli v těle, kde je přítomen sympatický autonomní nervový systém. Primární nádor se nejčastěji vyskytuje v retroperitoneu, přičemž více než v polovině těchto případů je postižena dřeň nadledviny. Dalšími typickými lokalizacemi jsou krk, zadní mediastinum a malá pánev [30]. Lokalizace metastáz je závislá na věku, což je právě jednou z biologických zvláštností neuroblastomu. V novorozeneckém a časném kojeneckém věku se jedná o typické metastázy do jater, kostní dřeně a kůže. V pozdějším věku jsou typické metastázy do kostí a to zejména kalvy (klenba lebeční), orbity (očnice) a do dlouhých kostí [28].

Neuroblastom se projevuje systémovými příznaky, mezi které typicky patří únava, nechutenství, slabost, změny chování, anemie. Paraneoplastické projevy, tedy projevy nádorového onemocnění, které jsou různě vzdálené od vlastního místa nádoru, ale souvisejí s ním a někdy na něj mohou upozornit. U neuroblastomu se setkáváme s protilátkami související akutní myoklonickou encefalopatií. Ta se projevuje jako opsoklonus myoklonus. Jedná se o rychlé, mimovolní pohyby očních bulbů všemi směry (opsoklonus) a motorická dyskoordinace končetin a trupu projevující se myoklonickými záškuby svalů (myoklonus). Dále se setkáváme s příznaky související se sekrecí vasoaktivního intestinálního polypeptidu (VIP), což má za následek neprospívání a vodnaté průjmy. Také se sem řadí příznaky spojené s nadměrnou produkcí katecholaminů (pocení, návaly zarudnutí, bolesti hlavy) [28].

Dle nových poznatků je neuroblastom charakterizován nenáhodnými chromozomálními změnami v nádorových buňkách, z nichž některé jsou asociovány s agresivitou onemocnění. Nejdůležitější genetickou abnormalitou u neuroblastomu je amplifikace onkogenu MYCN v nádorové tkáni u 20-25 % případů, která je nezávislým negativním prognostickým znakem. Další prognosticky významné změny zahrnují chromozomy 1, 11 a 17 (delece 1p, delece 11q, zisk 17q) [30]. Mezi další nádorové markery patří především katecholaminy a jejich metabolity stanovené v moči (kyselina vanilmandlová a homovanilová, dihydroxyfenylalanin), které pomáhají potvrdit diagnózu [28]. Mezi další ukazatele patří zvýšené hodnoty laktátdehydrogenázy (LDH), ferritinu či chromograninu. Vysokou senzitivitu a specifitu pro detekci kostních metastáz a metastatického postižení v lymfatických uzlinách a měkkých tkáních má scintigrafické vyšetření pomocí metajódbenzylguaninu ($^{123}\text{-I}$ MIBG, popř. $^{131}\text{-I}$ MIBG) [30].

Aktuální revize „International Neuroblastoma Pathology Classification“ rozlišuje periferní neuroblastické nádory neuroblastom, ganglioneuroblastom, nodulární ganglioneuroblastom a ganglioneurom. Zásadní je vyšetření genetických markerů z nádorové tkáně molekulárně biologickými metodami (ploidita, amplifikace MYCN a další). Ohledně terapie se na základě mezinárodního konsensu, který zahrnuje jak klinické, tak histopatologické a molekulárně genetické znaky, jsou pacienti rozděleni do skupin nízkého, středního a vysokého rizika. Pacienti nízkého rizika vyžadují po operaci pouze pozorování nebo jsou léčeni relativně málo zatěžujícími bloky konvenční chemoterapie a trvalé vyléčení je možné ve více než 95 % případů. U pacientů se středním rizikem je vyléčeno přibližně 85 % a je žádoucí operace a konvenční chemoterapie, popřípadě

radioterapie. Nemocní vysokého rizika mají i přes veškerou intenzifikaci léčby prognózu relativně špatnou, přežívá méně než 50 % těchto pacientů a jejich léčba sestává z konvenční chemoterapie, vysocedávkované chemoterapie s podporou autologních buněk krvetvorby, radioterapie a diferenciační bioterapie retinoidy, popřípadě také terapeutického MIBG [30].

Na vznik neuroblastomu může mít vliv působení některých toxických látek, kterým jsou ženy vystaveny během těhotenství a to především látky obsažené v tabákovém kouři, marihuaně nebo alkoholických nápojích [31]. Nicméně některé studie neprokázaly spojitost mezi požíváním těchto látek a vnikem neuroblastomu, ovšem při požívání marihuany v prvním trimestru těhotenství bylo prokázáno zvýšení rizika vzniku neuroblastomu. Jiné studie uvádějí případnou možnost zvýšení rizika vzniku tohoto onemocnění při používání barev na vlasy během těhotenství [32, 33].

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda dochází k vazbě doxorubicinu na molekulu DNA buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4 rezistentní na doxorubicin (UKF-NB-4^{DOXO}). K dosažení výsledků bylo postupováno podle následujících kroků:

- Kultivace buněčných linií
- Izolace DNA
- Spektrofotometrické stanovení přítomnosti doxorubicinu v molekule DNA

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Ebwe Pharma (Rakousko): doxorubicin

Gibco (USA): sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (PBS), agarosa

Invitrogen (USA): READY-LOAD 1 Kb PLUS DNA Ladder

Lonza (Švýcarsko): fetální hovězí sérum (FBS)

PAA (Rakousko): Trypsin-kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

Penta (ČR): ethanol, izopropylalkohol

Quiagen (Německo): Pergen Core Kit A pro izolaci DNA

Therma Scientific (USA): „Iscove’s Modified Dulbeccos Medium“ (IMDM) s L-Glutaminem

Top-Bio (ČR): PCR vkládací pufr bromofenolová modř a xylen cyanol)

TBE pufr: pH 8,0-8,1 (1 M Tris, 0.9 M kyselina boritá, 0.01 M EDTA) připraveno v lékárně FN Motol

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. (pro analýzu) nebo lepší.

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} byla darem profesora Jindřicha Činátla, DrSc. z Goetheho univerzity ve Frankfurtu nad Mohanem.

3.2. Metody:

3.2.1. Kultivace neuroblastomových buněčných linií

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4 rezistentní na doxorubicin (UKF-NB-4^{DOXO}) byly kultivovány v IMDM médiu, obohaceném 10% hovězím fetálním sérem (FBS). Kultivace probíhala v inkubátoru Shel lab (USA) při 37 °C s 5% CO₂ a 95% vlhkosti vzduchu. Buňky UKF-NB-4^{DOXO} byly kultivovány s doxorubicinem, aby jeho koncentrace v mediu byla 92nM. Buněčné linie byly pasážovány v pravidelných intervalech 2x týdně. Buňky byly promyty PBS a poté byly z povrchu kultivačních lahvíček uvolňovány pomocí 0,05% roztoku trypsinu v PBS a resuspendovány v dostatečném množství média.

Buněčné linie byly kultivovány v lahvičkách o kultivační ploše 25 cm² a 75 cm².

3.2.2. Počítání buněk

Po trypsinaci a resuspendování buněk, bylo odebráno 20 µl buněčné suspenze, která byla dále 9x ředěna PBS. Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce umístěné v mikroskopu. Počet buněk v jednom mililitru média odpovídá počtu buněk spočítaných v 9 čtvercích Bürkerovy komůrky násobeném ředěním a 10⁴.

3.2.3. Příprava vzorků

Dále byly linie kultivovány na Petriho miskách o kultivační ploše 60,1 cm². Do média byl přidáván doxorubicin, jehož koncentrace byla 2 mg/ml tak, aby výsledná koncentrace v médiu byla: 1µM, 10µM a 120µM. Dvě misky byly ponechány bez přídavku cytostatika. Kultivace UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} v prostředí doxorubicinu probíhala 24 hodin, popřípadě 4 hodiny.

Po inkubaci byly buňky pomocí kultivační škrabky uvolněny ze dna Petriho misky. Buněčná suspenze byla centrifugována po dobu 2 minut při 1200 RMP při 25 °C na centrifuze Universal 320 R (Hettich, Německo). Poté byla většina supernatantu odebrána a buněčná peleta byla resuspendována v 1ml PBS s následnou centrifugací za stejných podmínek. Opět byla odstraněna většina supernatantu, k peletě bylo přidáno 700 µl PBS a následně byla přenesena do mikrozkuřavky a opět proběhla centrifugace po dobu 2 minut

při 1200 RMP při 25 °C. Supernatant byl odstraněn a pro další práci byla použita peleta buněk byla pro další použití uskladněna při -20 °C.

3.2.4. Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna pomocí kitu Pregen Core Kit A.

K peletě buněk bylo přidáno 300 μ l „Cell Lysis Solution“ a promíseno na vortexu Biosan Combi-Spin. Poté bylo do zkumavky přidáno 1,5 μ l „Puregene Proteinase K“ a invertováním 25 krát byla směs promíchána a inkubována přes noc při teplotě 55°C a 700 RPM na přístroji Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo). Následující den bylo k této směsi přidáno 1,5 μ l „RNase A Solution“ a opět došlo k promíchání invertováním 25 krát. Mikrozkušavky byly umístěny do vodní lázně Grant a inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C. Následně byl vzorek umístěn 1 minutu na led, aby se rychle zchladil. Ke vzorku bylo přidáno 100 μ l „Protein Precipitation Solution“ a 20 sekund vortexováno. Poté byly vzorky umístěny do centrifugy Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Německo) a centrifugovány po dobu 3 minut při 13 200 RPM a 4°C. Došlo k vysrážení proteinů, které se usadily na dně zkumavky. Byl tedy opatrně odebrán supernatant tak, že menší množství bylo ponecháno ve zkumavce, aby nedošlo k nabrání pelety s proteiny. Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky a byla provedena centrifugace při stejných podmínkách. Opět došlo k odebrání supernatantu do nové zkumavky a bylo k němu přidáno 300 μ l izopropanolu. Poté byl vzorek velmi opatrně invertován zhruba 50 krát, dokud nedošlo k vysrážení bílého viditelného vlákna (DNA). V případě vzorku, který původně obsahoval koncentraci doxorubicinu 10 μ M bylo vlákno zbarveno červeně. Byla provedena centrifugace po dobu 2 minut při pokojové teplotě a 13 200 RPM. Supernatant byl opatrně odstraněn tak, aby nedošlo k poškození pelety a zkumavka s peletou byla vysušena buničinou. Následně bylo přidáno 300 μ l 70% ethanolu a promícháno v ruce, aby se peleta rozpustila. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 2 minut při 13 200 RPM a pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a zkumavka s peletou byla ponechána po dobu 5 až 10 minut na buničině, aby došlo k vysušení (než peleta zprůsvitněla). Nakonec bylo přidáno 20 až 100 μ l „DNA Hydration Solution“ podle velikosti pelety a vortexováno po dobu 5 sekund. Následně byly vzorky inkubovány po dobu 1 hodiny ve vodní lázni o teplotě 65 °C. Poté byla ověřena kvalita pomocí elektroforézy na agarosovém gelu. Koncentrace izolované DNA byla určena spektrofotometricky na základě absorbance vzorku při 260

nm, a to podílem $A_{260}/0,02$. Jednotky koncentrace DNA jsou $\text{ng}/\mu\text{l}$. Čistota DNA byla také stanovena spektrofotometricky. Čistotu udávají poměry absorbancí A_{260}/A_{280} . Poměr A_{260}/A_{280} by měl být pro čistou DNA v rozmezí 1,8-2. Všechna tato stanovení byla provedena na spektrofotometru ND-1000 (Nanodrop, USA).

3.2.5. Elektroforéza na agarosovém gelu

Tato metoda byla použita k ověření kvality DNA a také jako kontrola délky fragmentů dané DNA.

Pro přípravu gelu bylo použito 0,4 g agarosy a 25 ml TBE pufru. Tato směs byla zahřáta pro rozpuštění agarosy a poté se nechala vychladnout. Roztok byl zamíchán a nalit do elektroforetické vany s hřebenem a gel se nechal zatuhnout. Poté byla vana s gelem, ze které byl vyjmut hřeben vložena do elektroforetické aparatury a byla naplněna TBE pufrem. Do jamek bylo aplikováno 7 μl vzorku DNA s PCR vkládacím pufrem, který usnadňuje monitorování průběhu elektroforézy DNA fragmentů. Aparatura byla uzavřena, připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza se nechala probíhat při 90 V po dobu 30-40 minut. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut a vložen do nádoby s ethidium bromidem (10 mg/ml) a následně promyt vodou. Poté byl vyhodnocen v přístroji Geldock darkroom kabinet (Bio-Rad, USA) pomocí UV lampy.

3.2.6. Spektrofotometrické stanovení přítomnosti doxorubicinu v DNA

Toto stanovení probíhalo na spektrofotometru NanoDrop ND-1000. Nejprve bylo proměřeno absorpční spektrum doxorubicinu o koncentraci 0,2 mg/ml v rozmezí vlnových délek 220 – 800 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda.

Poté byly stejným způsobem změřeny všechny vzorky, které byly naředěny tak, aby měly koncentraci 300 $\text{ng}/\mu\text{l}$ a jako blank bylo použito DNA Hydration Solution. Měření proběhlo 3x.

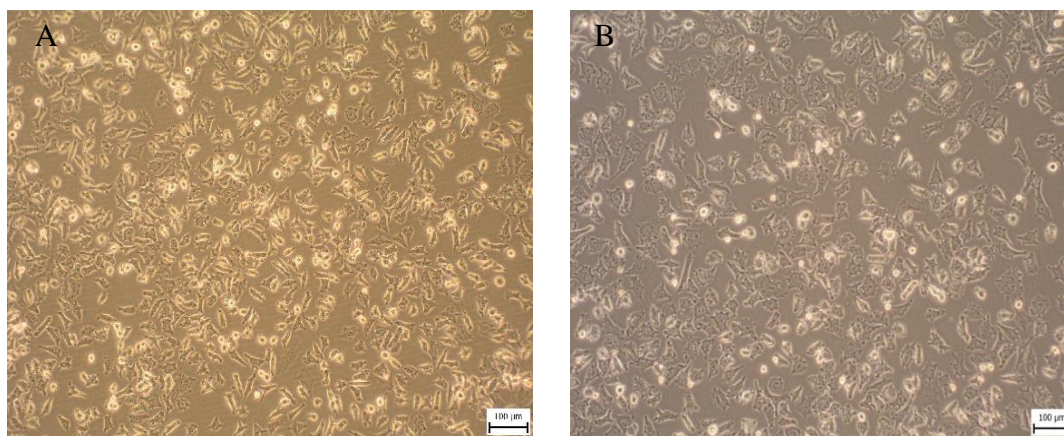
Stejně měření bylo prováděno na spektrofotometru Helios α (Thermo Scientific, USA). Nejprve bylo tedy změřeno absorpční spektrum samotného doxorubicinu o koncentraci 0,03 mg/ml v rozmezí vlnových délek 220-800 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda.

Poté byly stejným způsobem změřeny všechny vzorky a jako blank bylo použito DNA Hydration Solution. Koncentrace všech vzorků byla 30 ng/μl. Všechny vzorky byly změřeny 3x.

4. Výsledky a diskuse

Tato práce se zabývá vazbou doxorubicinu na DNA. Buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} byly vystaveny působení tohoto cytostatika (1 μ M a 10 μ M) po dobu 24 hodin a (120 μ M) po dobu 4 hodin. Doxorubicin je jedno z neúčinnějších antracyklinových antibiotik. Má široké uplatnění v klinické praxi a to zejména při léčbě rakoviny prsu, plic, vaječníků, Hodgkinova lymfomu a dalších v kombinaci s jinými léky. Dále se využívá k léčbě neuroblastomu (nádorové onemocnění vyskytující se zejména u dětí). Působí tak, že zpomalí nebo zastaví růst nádorových buněk v těle a to interkalací do molekuly DNA [34, 35]. Výsledky publikované v několika studiích udávají, že doxorubicin vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 480 nm [36, 37]. Těchto vlastností bylo využito v předkládané bakalářské práci.

Z neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} byla izolována DNA a spektrofotometricky byla detekována přítomnost doxorubicinu. Snímky buněčné linie UKF-NB-4 inkubované bez doxorubicinu a UKF-NB-4 inkubované s 10 μ M doxorubicinem jsou na Obr. 15.

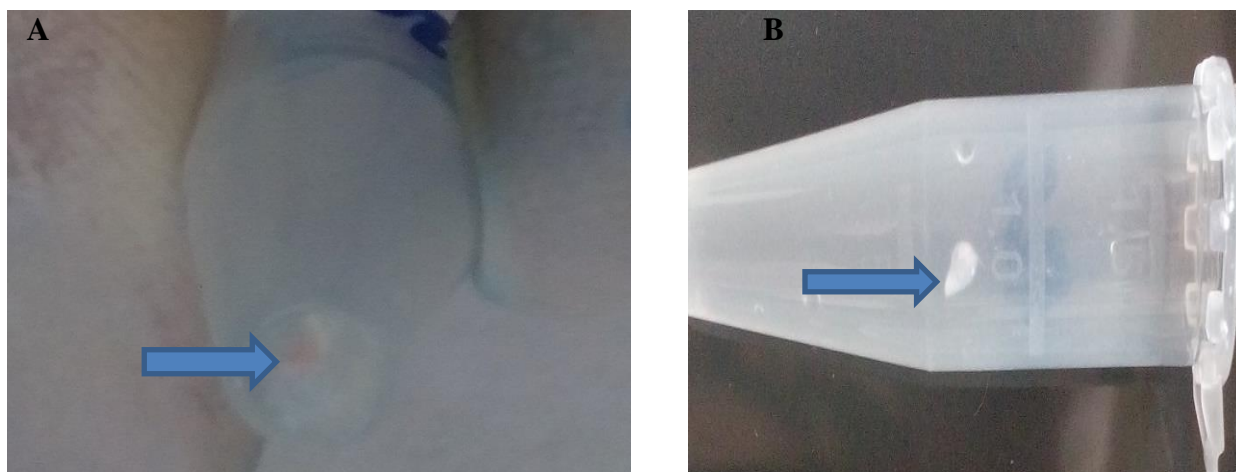


Obr. 15: Snímky lidských neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 (A), UKF-NB-4 vystavené působení doxorubicinu (10 μ M po dobu 24 hodin), (B), pořízené mikroskopem Olympus IX51, zvětšeno 200x.

4.1. Izolace DNA

Pro naše měření bylo nezbytné izolovat DNA z lidských neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO}. Izolace probíhala podle postupu, uvedeném v kapitole 3.2.4. na straně 27. Již při získání pelety DNA z buněčných linií UKF-NB-4, které byly kultivovány s 10 μ M doxorubicinem po dobu 24 hodin bylo patrné, že došlo

k vazbě doxorubicinu do její struktury, což se projevilo změnou barvy pelety (Obr. 16). Peleta DNA izolovaná z buněčných linií UKF-NB-4^{DOXO}, které byly kultivovány se stejnou koncentrací doxorubicinu nevykazovala takové zbarvení, ale byla čistě bílá. Z toho lze soudit, že nedošlo k navázání tohoto cytostatika do rezistentní linie vůbec nebo velmi malého množství.



Obr. 16: Modrou šipkou je označena peleta DNA buněčné linie UKF-NB-4 inkubované po dobu 24 hodin s 10 μ M DOXO (A), peleta DNA buněčné linie UKF-NB-4^{DOXO} inkubované po dobu 24 hodin s 10 μ M DOXO (B)

Čistota a koncentrace vzorků byly zjištěny spektrofotometricky na přístroji NanoDrop ND-1000. Pro měření na tomto spektrofotometru je zapotřebí pouze 1 μ l studovaného roztoku.

Jelikož různé látky absorbují při různých vlnových délkách různě, byly vybrány vlnové délky 280nm, 260nm. Při 280 nm absorbují nejvíce proteiny, při 260 nm nukleové kyseliny.

Čistotu udávají poměry absorbancí A_{260}/A_{280} . Poměr A_{260}/A_{280} by měl být pro čistou DNA v rozmezí 1,8-2. Získaná data jsou uvedena v Tabulce 1, strana 32. Čistota všech měřených vzorků byla v tomto intervalu, a tedy splňovala veškeré podmínky pro další práci. Všechny vzory byly upraveny tak, aby měly stejnou koncentraci 300 ng/ μ l.

Tabulka 1: Koncentrace a čistota DNA

Koncentrace izolované DNA byla určena spektrofotometricky na základě absorbance vzorku při 260 nm a poté byla upravena tak, aby byla u všech vzorků stejná (300 ng/μl).

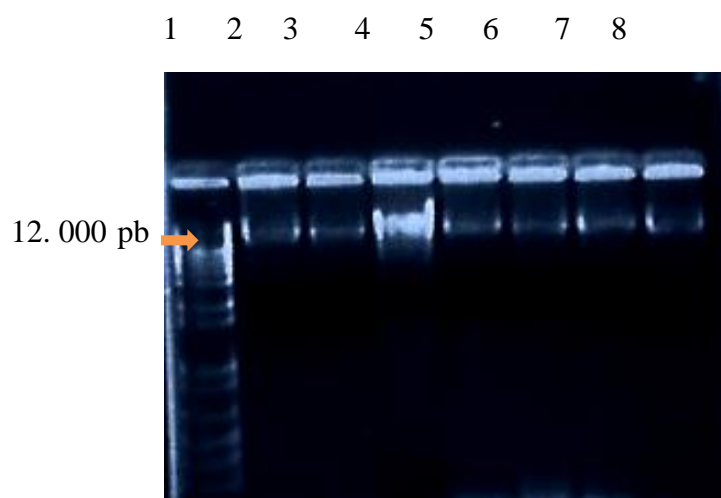
DNA izolovaná z linií	Koncentrace [ng/μl]	čistota
UKF-NB-4	562,0	1,90
UKF-NB-4 s 1μM doxorubicinem	302,4	1,92
UKF-NB-4 s 10μM doxorubicinem	805,8	1,86
UKF-NB-4 s 120μM doxorubicinem	389,6	1,93
UKF-NB-4^{DOXO}	368,5	1,90
UKF-NB-4^{DOXO} s 1μM doxorubicinem	510,3	1,92
UKF-NB-4^{DOXO} s 10μM doxorubicinem	1014,3	1,97

4.2. Elektroforeza na agarosovém gelu

Podle postupu popsaném v kapitole 3.2.3. na straně 26 byly buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} připraveny pro experiment a poté z nich byla získána DNA pomocí kitu pro izolaci DNA „Pregen Core Kit A“. K izolaci DNA bylo použito přibližně $2,5 \times 10^6$ buněk. Kvalita DNA byla analyzována pomocí agarosové elektroforezy podle

postupu uvedeném v kapitole 3.2.5. na straně 28. Fotografie výsledného gelu je zobrazena na Obr. 17.

Do jamky č. 1 bylo nanášeno 5 μ l markeru „READY-LOAD 1 Kb PLUS DNA Ladder“ pro určení velikosti fragmentu DNA a do jamky č. 2-5 pak 7 μ l směsi vzorku DNA z buněčné linie UKF-NB-4 se vzrůstající koncentrací doxorubicinu (0 μ M, 1 μ M, 10 μ M a 120 μ M). Do jamky č. 6-8 bylo nanášeno stejné množství DNA z buněčných linií UKF-NB-4^{DOXO} rovněž se vzrůstající koncentrací doxorubicinu (0 μ M, 1 μ M a 10 μ M). Z Obr. 17 je patrné, že při izolaci DNA nedošlo k její fragmentaci a tudíž je vhodná pro experimentální stanovení.



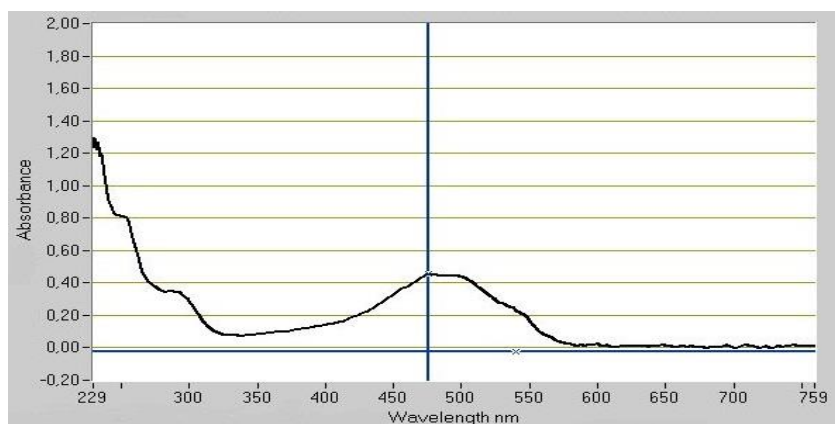
Obr. 17: Fotografie agarosového gelu se vzorky DNA:

- 1-marker,
- 2- DNA izolovaná z UKF-NB-4,
- 3- DNA izolovaná z UKF-NB-4 24h inkubované s 1 μ M DOXO,
- 4- DNA izolovaná z UKF-NB-4 24h inkubované s 10 μ M DOXO,
- 5- DNA izolovaná z UKF-NB-4 4h inkubované s 120 μ M koncentrací DOXO,
- 6- DNA izolovaná z UKF-NB-4^{DOXO},
- 7- DNA izolovaná z UKF-NB-4^{DOXO} 24h inkubované s 1 μ M DOXO,
- 8- DNA izolovaná z UKF-NB-4^{DOXO} 24h inkubované s 10 μ M DOXO

4.3. Spektrofotometrické stanovení přítomnosti doxorubicinu v molekule DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000

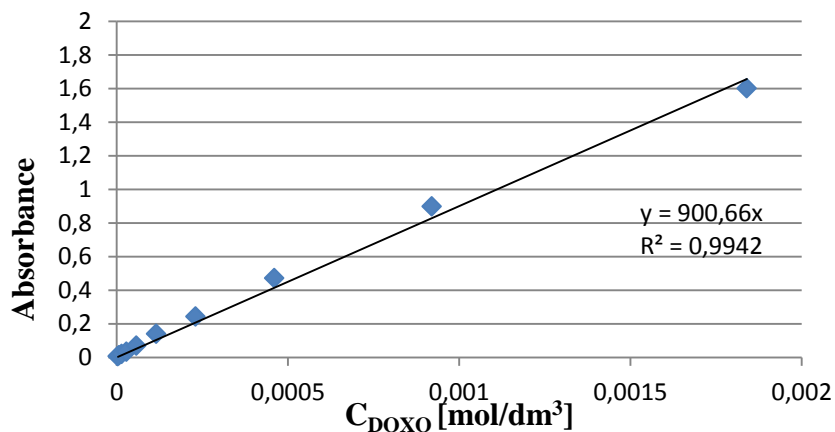
Při tomto stanovení bylo využito vlastností doxorubicinu, který je charakteristický svojí červenou barvou a proto má schopnost absorbovat i ve viditelné oblasti. Naproti tomu DNA má charakteristické absorpční maximum v oblasti UV, konkrétně při vlnové délce 260 nm. Pokud by tedy došlo k vazbě doxorubicinu do molekuly DNA, měl by tento jev být detekovatelný pomocí spektrofotometru, kdy by mělo dojít ke zvýšené absorbanci DNA izolované z buněčných linií, které byly kultivovány v přítomnosti tohoto cytostatika. Jako kontrola byla vždy použita linie bez přídavku cytostatika.

Ve viditelné oblasti bylo zjištěno absorpční maximum doxorubicinu (0,2 mg/ml) při vlnové délce 480 nm $A_{480} = 0,476$ (Obr. 18).



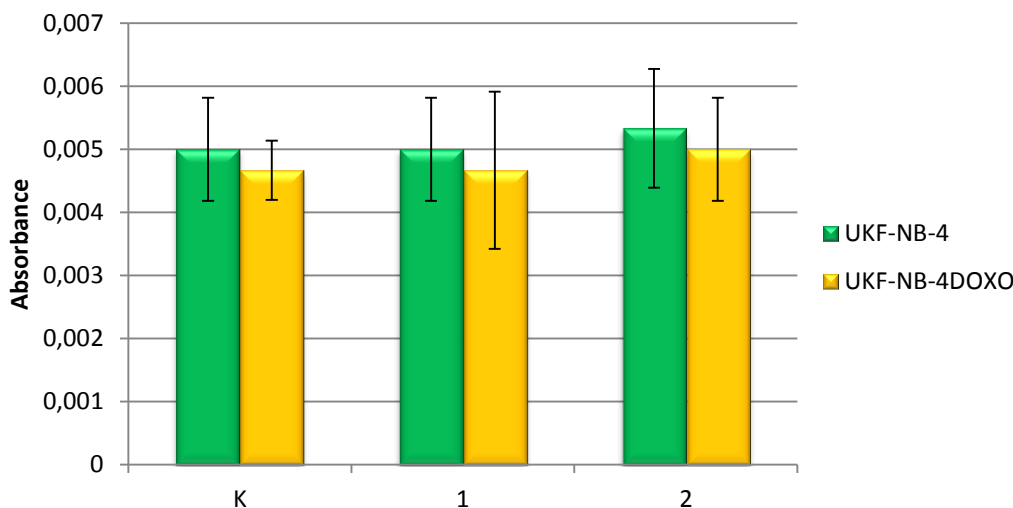
Obr. 18: Absorpční spektrum doxorubicinu o koncentraci 0,2 mg/ml v UV/VIS oblasti

Poté byla změřena závislost absorbance samotného doxorubicinu na jeho koncentraci a tato křivka byla použita jako kalibrační (Obr. 19, str. 35). Doxorubicin byl ředěn dvojkovou řadou. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací doxorubicinu roste jeho absorbance.



Obr. 19: Kalibrační křivka doxorubicinu

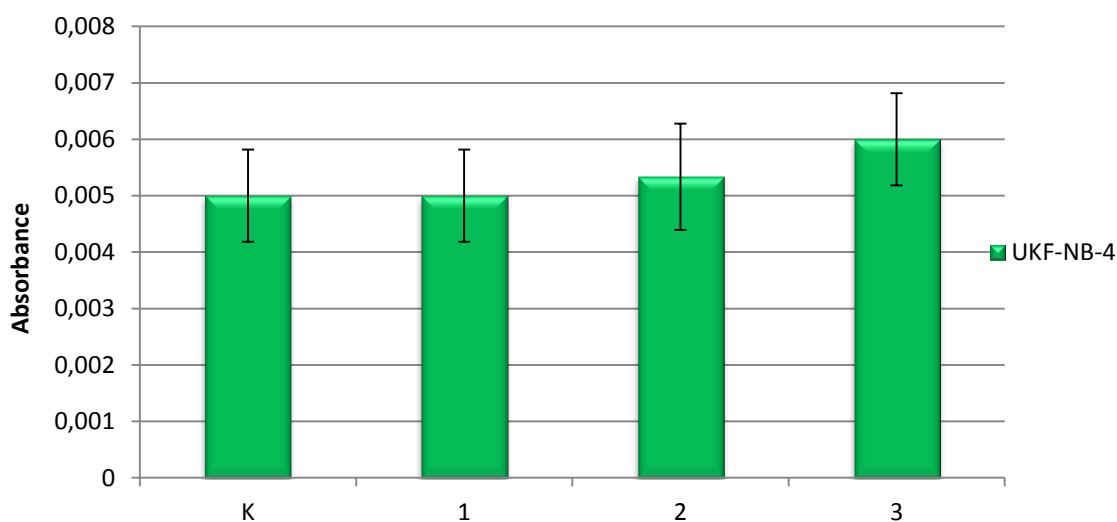
Spektrum DNA bylo měřeno v oblasti vlnových délek 220-800 nm. Zaznamenána byla hodnota absorbance při 480 nm, kdy samotný doxorubicin vykazoval absorpční maximum. Změřené hodnoty byly zaneseny do grafu (Obr. 20) a byly porovnány rozdíly mezi linií lidských neuroblastomových buněk UKF-NB-4 a linií rezistentní na doxorubicin UKF-NB-4^{DOXO}.



Obr. 20: Absorbance (A_{480}) DNA izolované z K -UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO}
 1- UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} 24h inkubované s 1 μ M DOXO
 2- UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} 24h inkubované s 10 μ M DOXO

Linie kultivované bez doxorubicinu a linie kultivované s doxorubicinem nevykazují žádné signifikantní rozdíly v absorbancích. Také rozdíly v absorbanci u buněčných linií rezistentních (UKF-NB-4^{DOXO}) a linií, které nemají tuto schopnost rezistence (UKF-NB-4)

nejdou téměř žádné. Z grafu na Obr. 20, str. 35 je též patrné, že hodnoty absorbancí jsou velice nízké. Nedá se tedy mluvit o detekci doxorubicinu. Proto byla pomocí kalibrační křivky stanovena vyšší koncentrace doxorubicinu. Byla tedy připravena buněčná linie UKF-NB-4, která byla po dobu 4 hodin inkubována s doxorubicinem, aby jeho koncentrace v mediu byla $120\mu\text{M}$. Následně proběhla izolace DNA a vzorky byly spektrofotometricky měřeny (Obr. 21). Nicméně i při takové koncentraci byly rozdíly hodnot absorbance minimální. Tato metoda není pravděpodobně dostatečně citlivá, aby zaznamenala přítomnost doxorubicinu v DNA.

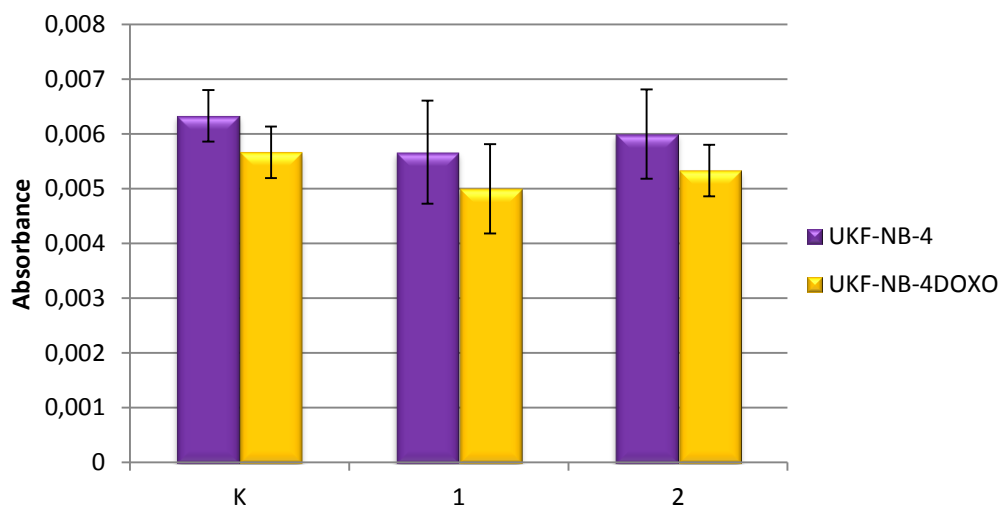


Obr. 21: Absorbance (A_{480}) DNA izolované z K -UKF-NB-4
 1- UKF-NB-4 24h inkubované s $1\mu\text{M}$ DOXO
 2- UKF-NB-4 24h inkubované s $10\mu\text{M}$ DOXO
 3- UKF-NB-4 4h inkubované s $120\mu\text{M}$ DOXO

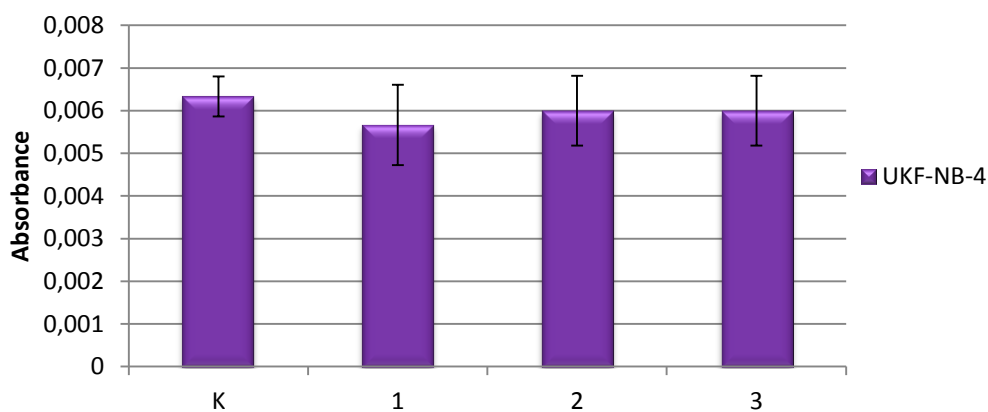
4.4. Spektrofotometrické stanovení přítomnosti doxorubicinu v molekule DNA pomocí spektrofotometru Helios α

Absorpční spektrum doxorubicinu o koncentraci $0,03\text{ mg/ml}$ bylo měřeno také na spektrofotometru Helios α . Doxorubicin vykazoval absorpční maximum $0,784$ při vlnové délce 480 nm . Z naměřené hodnoty absorbance lze soudit, že spektrofotometr Helios α je citlivější než NanoDrop. Dále pak byly proměřeny všechny vzorky DNA z předešlého měření a zaznamenány hodnoty absorbancí při vlnové délce 480 nm (Obr. 22, str. 37) a

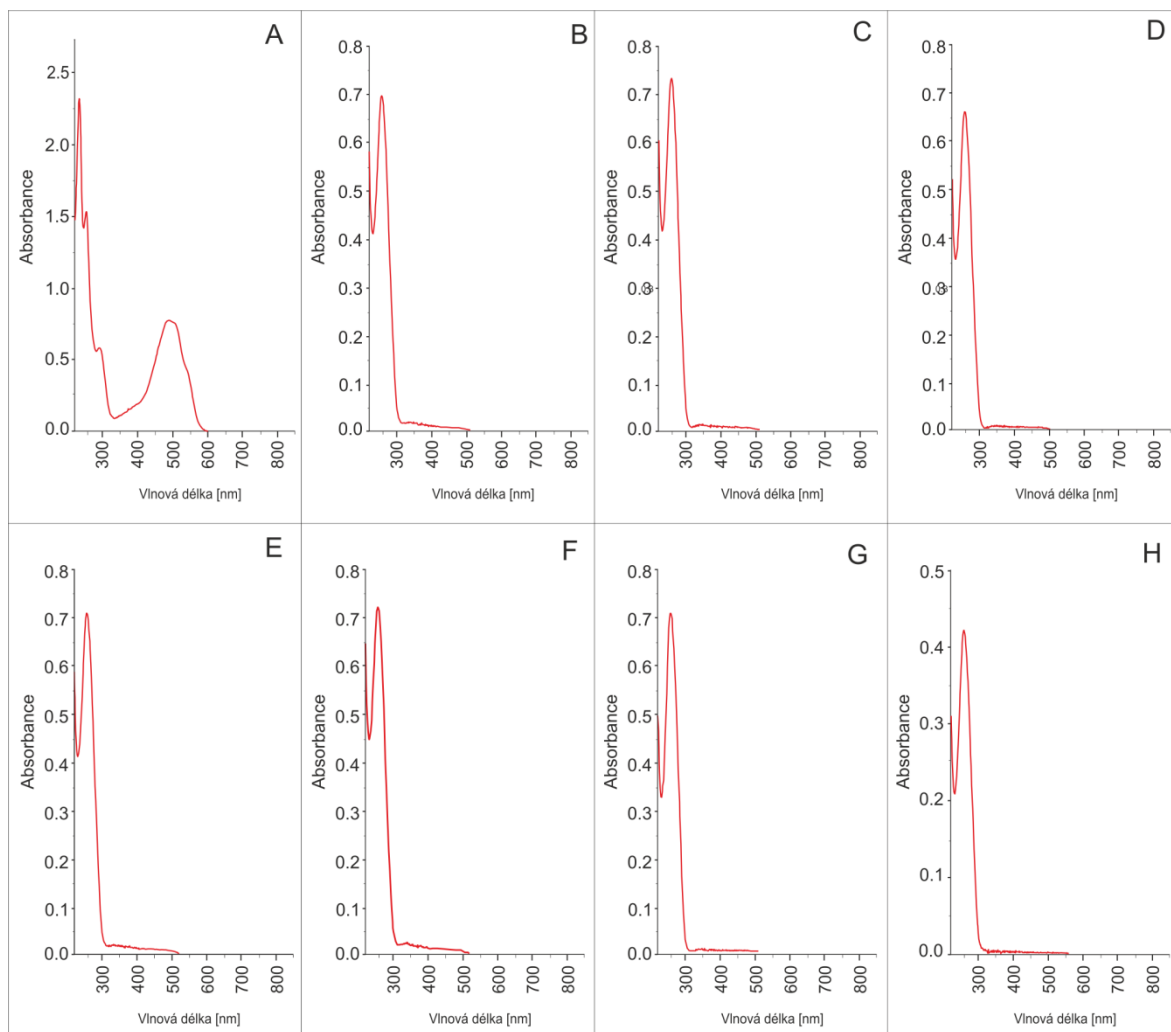
(Obr. 23). Z grafů je zjevné, že výsledky se nijak neliší od výsledků změřených na přístroji NanoDrop. Absorpční spektra doxorubicinu a vzorků (Obr. 24, str. 38) také nevykazují přítomnost „peaku“ v této oblasti.



Obr. 22: Absorbance (A_{480}) DNA izolované z *K -UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO}*
1- UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} 24h inkubované s 1 μ M DOXO
2- UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} 24h inkubované s 10 μ M DOXO



Obr. 23: Absorbance (A_{480}) DNA izolované z *K -UKF-NB-4*
1- UKF-NB-4 24h inkubované s 1 μ M DOXO
2- UKF-NB-4 24h inkubované s 10 μ M DOXO
3- UKF-NB-4 4h inkubované s 120 μ M DOXO



Obr. 24: Absorpční spektra jednotlivých vzorků

- A- doxorubicin,*
- B- DNA izolovaná z UKF-NB-4,*
- C- DNA izolovaná z UKF-NB-4 24h inkubované s 1 μ M DOXO,*
- D- DNA izolovaná z UKF-NB-4 24h inkubované s 10 μ M DOXO,*
- E- DNA izolovaná z UKF-NB-4 4h inkubované s 120 μ M koncentrací DOXO,*
- F- DNA izolovaná z UKF-NB-4^{DOXO},*
- G- DNA izolovaná z UKF-NB-4^{DOXO} 24h inkubované s 1 μ M DOXO*
- H- DNA izolovaná z UKF-NB-4^{DOXO} 24h inkubované s 10 μ M DOXO*

Na Obr. 24 A vidíme, že doxorubicin má charakteristický „peak“ ve viditelné oblasti. Pokud tedy měříme spektrum DNA v UV/VIS oblasti a dojde k navázání doxorubicinu do molekuly DNA, měli bychom zaznamenat přítomnost tohoto „peaku“. Nicméně tyto grafy nevykazují přítomnost doxorubicinu. To ovšem neznamená, že nedošlo k jeho navázání do molekuly DNA. Důkazem přítomnosti tohoto cytostatika ve struktuře

DNA byla červeně zbarvená peleta. Pro měření na spektrofotometru Helios α bylo potřeba vzorky výrazně naředit, což může být důvodem, že se tato metoda jeví jako nedostatečně citlivá.

5. Závěr

Z lidských neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO}, které byly po dobu 24 hodin vystaveny doxorubicinu o koncentraci 1 μ M a 10 μ M, byla izolována DNA a podrobena spektrofotometrickému stanovení na dvou různých spektrofotometrech NanoDrop ND-1000 a Helios α . Navzdory určitým předpokladům, se nepodařilo prokázat přítomnost tohoto cytostatika v DNA. Daná metoda se tedy nejví dostatečně citlivá pro toto stanovení.

Seznam literatury:

- [1] Racek J., Eiselt J., Friedecký B., Holeček V., Nekulová M., Pittrová H., Rušavý Z., Senft V., Šavlová M., Těšínský P., Verner M.: *Klinická biochemie*, Galén, Praha (2006)
- [2] Koutecký J.: *Klinická onkologie I*, Riopress, Praha (2004)
- [3] Stiborová M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, (2004), ke stažení z <http://archiv.otevrena-veda.cz> [cit. 25.11.2013]
- [4] Klener P., Klener Jr. P.: *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*, GRADA Publishing, Praha (2010)
- [5] Hartl J., Doležal M., Miletín M. et al.: *Farmaceutická chemie IV.*, nakladatelství Karolinum, Praha (2006)
- [6] Blažková I., Dostálová S., Šmerková K., Ryvolová M., Adam V., Eckschlager T., Stiborová M., Kizek R.: Protinádorové léčivo doxorubicin a jeho in vivo analýza fluorescenční mikroskopií, *Chemmagazín*, 5, 8-10 (2012)
- [7] Stiborová M., *Biochemie jako teoretický základ biomedicíny, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie* (2013)
- [8] Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J., Rodwell V. W., Weil P. A.: *Harperova ilustrovaná biochemie*, Galén, Praha (2012)
- [9] Kolektiv autorů: *Biochemie Základní kurz*, Karolinum, Praha (2009)
- [10] Nalson D. L., Cox M. M.: *Lehninger principles of biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York (2008)
- [11] http://cyberbridge.mcb.harvard.edu/dna_1.html (cit. 8.5.2014)
- [12] <http://www.linkos.cz/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/abstrakta/cislo/5614/> (cit. 8.5.2014)
- [13] Airley R.: *Cancer chemotherapy*, Willey-Blackwell, Chichester (2009)
- [14] http://web.lfhk.cuni.cz/farmakol/predn/cz/2006/2006_2007-seminar-Chladek-protinadorova-chemoterapie.ppt (cit. 8.5.2014)

- [15] Shevchuk O. O., Posokhova E. A., Sakhno L. A., Nikolaev V. G.: Theoretical ground for adsorptive therapy of anthracyclines cardiotoxicity, *Exp. Oncol.*, 34, 314-322 (2012)
- [16] Martinková J. a kolektiv: Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, Grada, Praha (2007)
- [17] Arnold R. D., Slack J. E., Straubinger R. M.: Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 808, 141-152 (2004)
- [18] <http://www.linkos.cz/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/abstrakta/cislo/3606/> (cit. 15.6.2014)
- [19] Lee CH. J., Kang J. S., Kim M. S., Lee K. P., Lee M. S.: The study of Doxorubicin and its complex with DNA by SERS and UV-resonance Raman Spectroscopy, - *Bull. Korean Chem. Soc.*, 8, 1211-2016 (2004), ke stažení z http://journal.kcsnet.or.kr/main/j_search/j_download.htm?code=B040822 (cit. 2.4.2014)
- [20] Stiborová M., Poljaková J., Eckschlager T., Kizek R., Frei E.: Analysis of covalent ellipticine- and doxorubicin-derived adducts in DNA of neuroblastoma cells by the ³²P-postlabeling technique., *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*, 156, 115-121 (2012)
- [21] <http://www.linkos.cz/farmakoterapie/databaze-onkologickych-leciv/lecivo/id/25/> (cit. 8.5.2014)
- [22] Heger Z., Cernei N., Konar J., Gumelec J., Blažková I., Zitka O., Eckschlager T., Stiborová M., Adam V., Kizek R.: A novel insight into the cardiotoxicity of antineoplastic drug doxorubicin., *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 21629-21646 (2013)
- [23] Singal P. K., Iliskovic N.: Doxorubicin-induced cardiomyopathy., *N. Engl. J. Med.*, 339, 900–905 (1998)
- [24] Miranda C. J., Makui H., Soares R. J., Bilodeau M., Mui J., et al.: Hfe deficiency increases susceptibility to cardiotoxicity and exacerbates changes in iron metabolism induced by doxorubicin., *Blood* 102, 2574–2580 (2003)
- [25] Swerdlow A. J., Higgins C. D., Smith P., Cunningham D., Hancock B. W., Horwich A., Hoskin P. J., Lister A., Radford J. A., Rohatiner A. Z., Linch D. C.: Myocardial infarction mortality risk after treatment for Hodgkin disease: a collaborative British cohort study. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 99, 206–214 (2007)

- [26] Merino H., Singla D. K.: Notch-1 mediated cardiac protection following embryonic and induced pluripotent stem cell transplantation in doxorubicin-induced heart failure., *PLoS One*, 9, e101024 (2014)
- [27] <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Pegylovany-lipozomalni-doxorubicin/6-I-jZ.magarticle.aspx> (cit. 8.5.2014)
- [28] Adam Z., Vorlíček J. a spolupracovníci: Speciální onkologie, Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta 2002
- [29] Adam Z., Vorlíček J., Vaniček J. a kolektiv: Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob, Grada, Praha 2004
- [30] Vorlíček, J.: Onkologie, Triton, Praha (2012)
- [31] Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J.: Speciální onkologie, diagnostika a léčba maligních chorob, Galen, Praha (2010)
- [32] Yang Q., Olshan A. F., Bondy M. L., Shah N. R., Pollock B. H., Seeger R. C., Look A. T., Cohn S. L.: Parental smoking and alcohol consumption and risk of neuroblastoma., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9, 967-972 (2000)
- [33] Carachi R., Grosfeld J.L., Azmy A.F.: The surgery of childhood tumors, Springer, Berlin (2008)
- [34] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682221.html> (cit. 8.5.2014)
- [35] Manasa E., Prashak K. V., Pratap P. R., Susena S.: Method development and validation of doxorubicin HCl in API and its formulation by spectrophotometry, *IJPCBS*, 3, 1006-1009 (2013)
- [36] Manocha B., Margaritis A.: Controlled release of doxorubicin from doxorubicin/ γ -polyglutamic acid ionic complex, *J. Nanomater.* 2010, 1–9 (2010)
- [37] Albright C.F., Graciani N., Han W., Yue E., Stein R., Lai Z.H., Diamond M., Dowling R., Grimminger L., Zhang S.Y., et al.: Matrix metalloproteinase-activated doxorubicin prodrugs inhibit HT1080 xenograft growth doxorubicin with less toxicity., *Mol. Cancer Ther.*, 4, 751–760 (2005)

