

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**AKTIVITA NOVÝCH AKRIDINOVÝCH BARVIV
– *IN VITRO* STUDIE**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.
Konzultanti: Mgr. Filip Kostelanský, Mgr. Jan Kubeš

Hradec Králové 2021

Dominika Pavlová

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Miloslavu Macháčkovi, PhD. za vedení mé diplomové práce, za ochotu, cenné rady, trpělivost a čas, který mi během vypracování práce věnoval.

Poděkování patří také konzultantovi Mgr. Janu Kubešovi za pomoc a vysvětlení metody týkající se gelové elektroforézy. Mgr. Filipovi Kostelanskému za rady v oblasti chemických struktur a vlastností studovaných látek a také Mgr. Marii Halaškové za pomoc v laboratoři při stanovení buněčné smrti.

V neposlední řadě chci poděkovat svým nejbližším, rodině a partnerovi, za jejich trpělivost a podporu během celého studia.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá použitá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Abstrakt

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Dominika Pavlová

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Název diplomové práce: Aktivita nových akridinových barviv – *in vitro* studie

Akridinové deriváty jsou zkoumány pro svůj potenciál v léčbě mnoha nemocí, například nádorů, bakteriálních infekcí či malárie. V klinické praxi se v konvenční protinádorové chemoterapii uplatňuje například amsakrin působící jako topoisomerasový jed, který interaguje s DNA i s lidskou topoisomerasou II. Podobně působí i deriváty 9-aminoakridin-4-karboxamidů. V diplomové práci byla testována *in vitro* aktivita nově syntetizovaných derivátů 9-aminoakridin-4-karboxamidů a jiných derivátů odvozených od akridinu.

Cílem práce bylo zjištění, zda jsou studované látky s označením FK-8-HCl, FK-20-HCl, FK-27-HCl, FK-36-HCl, FK-42-HCl, FK-46-HCl, FK-48, FK-78-HCl, FK-97-HCl a FK-106 cytotoxické, v jaké koncentraci vykazují inhibici proliferace, jaký typ buněčné smrti indukují, a jestli inhibují lidskou topoisomerasu II.

Pro cytotoxicitní experimenty byla použita lidská epiteliální buněčná linie HeLa. Životaschopnost buněk byla stanovena metodou vychytávání neutrální červeně. Buňky byly vystaveny látkám v různých koncentracích po dobu 24 hodin při 37 °C. Jako parametr hodnotící cytotoxicitu byla vybrána hodnota IC₅₀. Pomocí gelové elektroforézy a testu dekatence kDNA byla zjišťována inhibice lidské topoisomerasy II. Typ buněčné smrti jsme stanovili na buněčné linii HeLa pomocí luminiscenční metody pro určení apoptózy nebo nekrózy. Buňky byly vystaveny působení experimentálních látek po dobu 24 hodin, během kterých byl sledován nárůst luminiscence a fluorescence.

Z výsledků jednotlivých metod bylo určeno, že všechny studované akridinové deriváty inhibují proliferaci buněčné linie HeLa. Nejvyšší cytotoxicitu vykazovala látka FK-78-HCl s IC₅₀ = 1,06 ± 0,22 μM. S výjimkou FK-106 všechny látky působily inhibici topoisomerasy II. U většiny látek byla pozorována indukce apoptózy. S jistotou se nepodařilo určit typ buněčné smrti pouze u látek FK-27-HCl, FK-36-HCl a FK-106.

Abstract

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Dominika Pavlová

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Title of diploma thesis: Activity of novel acridine dyes – *in vitro* study

Acridine derivatives are being investigated for their potential in the treatment of many diseases, such as cancer, bacterial infections, and malaria. For example, amsakrin, acting as a topoisomerase poison that interacts with both DNA and human topoisomerase II, is used in clinical practice in conventional antitumor chemotherapy. Derivatives of 9-aminoacridine-4-carboxidoamide act similarly. The master's thesis investigates the *in vitro* activity of the newly synthesized 9-aminoacridine-4-carboxidoamide derivatives and other derivatives of acridine.

The purpose of the thesis was to determine whether the studied compounds FK-8-HCl, FK-20-HCl, FK-27-HCl, FK-36-HCl, FK-42-HCl, FK-46-HCl, FK-48, FK-78-HCl, FK-97-HCl and FK-106 are cytotoxic, what concentration induce inhibition of proliferation, what type of cell death is triggered and whether they inhibit the human topoisomerase II.

The human epithelial cell line HeLa was used for cytotoxicity experiments. The neutral red uptake assay was used to determine the cell viability. Cells were exposed to different concentrations of studied compounds for 24 hours at 37 °C. The IC₅₀ was selected as a parameter to evaluate the cytotoxicity. Inhibition of human topoisomerase II was evaluated by gel electrophoresis and kDNA decatenation assay. The identification of apoptosis or necrosis on the HeLa cell line was determined using a luminescence method. The cells were exposed to the studied compounds for 24 hours with continuous measurement of luminescence and fluorescence.

The results show that all studied acridine derivatives inhibit the proliferation of the HeLa cell line. The highest cytotoxicity was shown by the FK-78-HCl with IC₅₀ = 1,06 ± 0,22 μM. Except for FK-106, all substances caused inhibition of topoisomerase II. Except for FK-27-HCl, FK-36-HCl and FK-106, all substances induce apoptosis.

OBSAH

Seznam zkratk	8
1 Úvod	10
2 Současný stav řešené problematiky	11
2.1 Nádorové bujení – karcinogeneze	11
2.2 Konvenční chemoterapeutika	12
2.2.1 Antimetabolity	12
2.2.2 Antimitotika	14
2.2.3 Genotoxická cytostatika inhibující replikaci a transkripci DNA	15
2.3 Akridinová barviva	20
2.3.1 Struktura	20
2.3.2 Terapeutický potenciál	21
2.3.3 Genotoxické a mutagenní účinky	28
3 Cíle práce	31
4 Metodická část	32
4.1 Materiál	32
4.1.1 Buněčná linie HeLa	32
4.1.2 Chemikálie a reagenty	32
4.1.3 Experimentální látky	34
4.1.4 Přístrojové vybavení	36
4.1.5 Laboratorní materiál	36
4.2 Pracovní postupy	37
4.2.1 Kultivace buněk in vitro	37
4.2.2 Pasážování	37
4.2.3 Počítání buněk	38
4.2.4 Nasazení buněk na experimenty	38
4.2.5 Přidání experimentálních látek	38

4.2.6	Test vychytávání neutrální červeně.....	39
4.2.7	Test dekatence kDNA s využitím elektroforézy.....	39
4.2.8	Detekce buněčné smrti pomocí annexinu V.....	42
5	Výsledky	45
5.1	Stanovení cytotoxicity experimentálních látek.....	45
5.1.1	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-8-HCl	45
5.1.2	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-20-HCl.....	46
5.1.3	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-27-HCl.....	47
5.1.4	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-36-HCl.....	48
5.1.5	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-42-HCl.....	49
5.1.6	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-46-HCl.....	50
5.1.7	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-48.....	51
5.1.8	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-78-HCl.....	52
5.1.9	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-97-HCl.....	53
5.1.10	Stanovení hodnoty IC ₅₀ pro FK-106.....	54
5.2	Elektroforéza	55
5.3	Buněčná smrt.....	56
5.3.1	Pozitivní kontroly	56
5.3.2	Buněčná smrt po vystavení studovaných látek.....	60
6	Diskuse.....	71
7	Závěry.....	75
8	Literatura	76

SEZNAM ZKRATEK

5-FU	5-fluorouracil
AD	Alzheimerovo onemocnění (z angl. Alzheimer disease)
AChE	Acetylcholinesterasa
AML	Akutní myeloidní leukemie
ANOVA	Analýza rozptylu (z angl. Analysis of variance)
AO	Akridinová oranž
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintrifosfát
AzaPc	Azaftalocyanin
CJD	Creutzfeldtova–Jakobova choroba (z angl. Creutzfeldt–Jakob disease)
DACA	N-[2-(dimethylamino)ethyl]-9-aminoakridin-4-karboxamid
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSB	Dvouřetězcové zlomy (z angů. double strand breaks)
FasL	Fas ligand
FBS	Fetální bovinní sérum (z angl. fetal bovine serum)
FDA	Food and Drug Administration
GABA	γ -aminomáselná kyselina
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
HIV	Lidský virus imunologické nedostatečnosti (z angl. Human immunodeficiency virus)
HPV	Lidský papilomavirus (z angl. human papillomavirus)
IC ₅₀	Střední inhibiční koncentrace
LE	<i>Lupus erythematoses</i>
m-AMSA	Amsakrin
MDR	Mnohočetná rezistence k lékům (z angl. multidrug resistance)
MQ-voda	Ultra-čistá voda
NR	Neutrální červeň (z angl. neutral red)
NRU	Neutral red uptake
P/S	Penicilin/Streptomycin

PBS	Fosfátový pufr (z ang. phosphate buffered saline)
PDT	Fotodynamická terapie (z angl. photodynamic therapy)
PS	Fotosenzitizér
RA	Revmatoidní artritida
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SCM	Kultivační médium (z angl. serum containing medium)
STEB	Reaction Stop Buffer
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TOP 1	Topoisomerasa I
TOP 2	Topoisomerasa II
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRBP	Trans-activation response RNA binding protein
UV	Ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)

1 ÚVOD

Zhoubným nádorům je připisována čtvrtina všech úmrtí v ČR a představují druhou nejčastější příčinu smrti – v roce 2018 bylo téměř u 26 000 pacientů nově diagnostikováno nádorové onemocnění (ÚZIS ČR 2019).

Přestože se medicína neustále posouvá vpřed, stále ještě jsou onemocnění, která neumí zcela vyléčit. Některé nádory jsou natolik agresivní, že běžně dostupná konvenční protinádorová chemoterapeutika nepřináší dostatečný efekt. Navíc jsou konvenční chemoterapeutika spojována s řadou nežádoucích účinků pramenících z jejich nescifického působení na všechny rychle se dělící buňky (Marek a Vrablík, 2019). S problematikou léčby nádorů souvisí také mutace nádorových buněk, na základě kterých se stávají resistantní vůči farmakoterapii, jinými slovy protinádorová léčiva přestanou být účinná. Vývoj a hledání nových bezpečnějších léčivých látek a nových bezpečnějších léčebných strategií je proto velkou výzvou (Klener a Klener, 2010).

I přes možnosti moderních strategií v terapii nádorů nemůžeme na konvenční chemoterapeutika zanevřít. Pro některé pacienty a některé typy nádorů jsou tato léčiva stále jedinou efektivní léčbou s šancí na uzdravení (Klener a Klener, 2010).

Výzkum se nezabývá pouze novými molekulami léčiv, mnohdy totiž využije již známé struktury, které se různě modifikují (Hughes et al. 2011). Jednou takovou skupinou látek jsou deriváty odvozené od akridinu, které vedle nádorů vykazují potenciál v léčbě i jiných nemocí. Tato zajímavá skupina látek by se v budoucnu mohla uplatnit i v některých moderních léčebných postupech (Zhang et al. 2014).

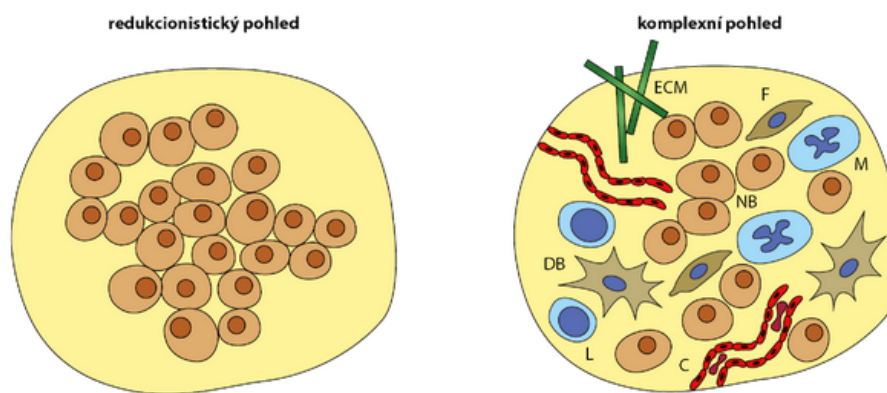
Abychom zjistili, zda studovaná látka je (nebo není) zajímavá pro další výzkum, je nutné ji nejprve podrobit *in vitro* studii její aktivity. To zahrnuje zjištění, v jaké koncentraci je látka cytotoxická (resp. aktivní) a jakým mechanismem působí na buňku (Hughes et al.).

Cílem této práce je zjištění *in vitro* aktivity nově syntetizovaných akridinových barviv. Práce vznikla s podporou SVV 260 550 a SVV 260 547.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Nádorové bujení – karcinogeneze

Na nádor bylo dlouho nahlíženo jako na seskupení téměř homogenních maligních buněk, jejichž růst je výsledkem neregulované proliferace. Díky pokrokům v poznání patofyziologie nádorových onemocnění a samotných mechanismů karcinogeneze je však nutné na nádor nahlížet více komplexně, tedy i ve vztahu k nádorovému mikroprostředí, jež pro lepší představu ukazuje Obr.1 (Klener a Klener, 2013).



Obr. 1 Redukcionistický vs. komplexní pohled na nádor (Klener a Klener, 2013)
NB – nádorová buňka, ECM – extracelulární matrix, F – fibroblast, M – makrofág, DB – dendritická buňka, L – lymfocyt, C – céva

Solidní tumor je kromě vlastních nádorových buněk složen také z několika typů buněk nenádorových, např. fibroblastů, endotelových buněk a buněk imunitního systému (T-lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky). Společně s nebuněčnými faktory, jimiž jsou mj. extracelulární matrix (ECM), hladina kyslíku a pH, vytvářejí nádorové mikroprostředí, které se neustále vyvíjí a v mnoha ohledech ovlivňuje vlastní karcinogenezi i odpověď na terapii nádorů (Hirata a Sahai, 2017).

Vlastní karcinogeneze je několikastupňový proces. Na samém začátku karcinogeneze je fáze iniciace, kdy dochází ke genetickým a epigenetickým změnám, tj. indukci mutací. Změny genetického materiálu buňky mění normální buňku v buňku preneoplastickou, zpravidla nevratně (Hofmanová, 2013).

Přímým podkladem ke vzniku maligní buňky jsou tzv. kritické mutace, mezi které řadíme např. aktivaci onkogenů, inaktivaci tumor supresorových genů nebo zvýšenou expresi inhibitorů apoptózy apod. Ke genetickým mutacím může dojít na základě

kancerogenních podnětů, z nichž nejvíce rizikové jsou ionizující záření, chemické kancerogeny, viry a chronický zánět (Klener a Klener, 2013).

Promoce je označení pro fázi, kdy dochází působením nádorově promočních podnětů (růstové signály, působení vnějších signálů – látky z potravy, chemické, fyzikální faktory, aj.) ke klonálnímu růstu preneoplastické buňky a výsledkem je maligní klon. Začátek této fáze je ještě vratný (Hofmanová 2013).

Progrese do plně maligní formy je následkem akumulace kritických mutací a v této fázi již nelze proces karcinogeneze zastavit (Klener a Klener, 2013). Dochází ke změně počtu chromozomů, jejich přestavbám, zvyšuje se rychlost proliferace nádorových buněk, benigní (nezhoubné) stádium přechází ve stádium maligní (zhoubné) se schopností se rozšiřovat do vzdálených míst – vzniku metastáz (Hofmanová 2013). Růst nádoru je doprovázen také indukci angiogeneze a vaskulogeneze a v neposlední řadě vztahy mezi nenádorovými buňkami nádorového mikroprostředí (Klener a Klener, 2013).

2.2 Konvenční chemoterapeutika

Terapie nádorových onemocnění za použití protinádorových chemoterapeutik se v současné době zakládá především na inhibici buněčné proliferace a na indukci apoptózy. Protinádorová chemoterapeutika jsou látky definované chemické struktury s cytotoxickým účinkem. Jelikož působí neselektivně, jejich účinek je pozorován i u buněk zdravých tkání, což s léčbou přináší řadu nežádoucích účinků (Marek a Vrablík, 2019). Protinádorové látky můžeme dle jejich mechanismu účinku rozdělit do tří základních skupin, a to na antimetabolity, antimitotika a genotoxická cytostatika (Švihovec et al. 2018).

2.2.1 Antimetabolity

Jako antimetabolity označujeme látky, které se svou strukturou podobají přirozeným metabolitům. A právě díky této podobnosti mohou inhibovat klíčové enzymy metabolismu, což vyústí v poruchu biosyntézy nukleových kyseliny a v následnou inhibici buněčného dělení. Antimetabolity lze rozdělit dle cílové struktury, substrátu, na který působí. Označujeme je pak jako analoga kyseliny listové, analoga pyrimidinu a purinu a analoga adenosinu a deoxycytidinu (Švihovec et al. 2018).

Antifoláty

Analoga kyseliny listové dosahují farmakologického účinku působením odchylek v metabolismu kyseliny listové. Kyselina listová není sama o sobě fyziologický folát, avšak je jejích důležitým zdrojem. Hlavním folátem přijímaným z potravy je 5-methyltetrahydrofolát (5-methylTHF), který je absorbován z tenkého střeva a v játrech se přeměňuje na aktivní derivát, který se pomocí přenašeče dostává do periferní tkáně. Za přítomnosti vitamínu B12 poskytuje 5-methylTHF svou methylovou skupinu homocysteinu k syntéze methioninu. Vzniklý tetrahydrofolát (THF) pak prochází celou řadou reakcí k získání dalšího uhlíku za vzniku rodiny folátových kofaktorů. Díky jejich schopnosti přenášet uhlík dávají vzniku např. thymidilátu a účastní se syntézy purinů, tedy v konečném důsledku ovlivňují syntézu DNA a RNA (Visentin et al. 2012).

Analoga kyseliny listové, z nichž jsou v klinické praxi současně využívány především metotrexát a pemetrexed, narušují buněčnou proliferaci inhibicí dihydrofolátreduktasy, která katalyzuje přeměnu dihydrofolátu na THF. V případě pemetrexedu je cílem navíc ještě thymidylátsynthasa a 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotidformyltransferasa (Visentin et al. 2012).

Analoga pyrimidinu a purinu

Mezi pyrimidinová analoga řadíme látky strukturně odvozené od pyrimidinové báze uracilu. Právě tato báze je totiž upřednostňována při syntéze DNA a RNA v nádorových buňkách, na rozdíl od zdravých buněk, které využívají kyselinu orotovou (Švihovec et al. 2018). Prvním představitelem této skupiny léčiv byl 5-fluorouracil (5-FU). Jeho mechanismus účinku spočívá v inkorporaci do DNA, což v její molekule vyvolá zlomy, které nakonec povedou k zástavě replikace DNA a indukci apoptózy. Proléčivý 5-FU jsou kapecitabin a tegafur (Klener a Klener, 2013).

Analoga purinu jsou odvozena od molekuly purinové báze guaninu. Do této skupiny řadíme 6-merkaptopurin zasahující i do syntézy purinů *de novo*, thioguanin a azathioprin, který ovšem řadíme spíše mezi imunosupresiva. Po enzymatických přeměnách jsou thiopuriny schopny včlenit se do nukleových kyselin, což zvýší jejich cytotoxicitu. Využívají se především v léčbě akutní leukemie (Klener a Klener, 2013).

Purinová analoga odvozená od adenosinu se v klinické praxi začala užívat během posledních 30 let. Zástupcem této skupiny léčiv je např. fludarabin, který po přeměně na aktivní metabolit inhibuje DNA-polymerasu α a ribonukleotidreduktasu. Oproti jiným

skupinám protinádorových léčiv působí poměrně selektivně v lymfatické tkáni, což je dáno mj. rychlejší intracelulární fosforylací za vzniku aktivního metabolitu právě v této tkáni (Adam et al. 2011).

Analoga deoxycytidinu

Poslední skupinou antimetabolitů jsou analoga deoxycytidinu. Původně se jednalo o nukleotidy izolované z některých druhů mořských hub, v nichž cukernou složku zastává arabinosa. Odvozením byl syntetizován cytosin-arabinosid aj. V důsledku přeměny na cytosinarabinosidtrifosfát, který inhibuje DNA-polymerasu a poškozuje DNA, dochází k zástavě buněčného cyklu (Švihovec et al. 2018).

2.2.2 *Antimitotika*

Mitóza je složitý proces probíhající v dělicích se buňkách a jehož výsledkem je rozdělení dvou sad chromozomů a vznik dvou identických dceřiných buněk. Pokud dojde k poškození buněčného cyklu, a to ať na úrovni narušení funkce dělicího vřeténka, anebo omezení klíčových mitotických regulačních proteinů, je buňka velice náchylná k navození buněčné smrti (Chan et al. 2012).

První a nejstarší podskupinou látek, které řadíme mezi tzv. antimitotika, jsou taxany a vinca alkaloidy, jejichž cílem je ovlivnění polymerace mikrotubulů (Chan et al. 2012). Mikrotubuly jsou součástí cytoskeletu buňky a bez nich by při mitóze nebyla možná správná migrace chromozómů. Vinca alkaloidy, např. vinkristin, vinblastin a vinorelbin, inhibují mikrotubulární polymeraci. Taxany, např. paklitaxel a docetaxel, poškozují tvorbu a funkci mikrotubulů inhibicí depolymerace, následkem čehož dojde k urychlení tvorby mikrotubulů, narušení mitózy v kontrolním bodě G2/M a následně k indukci apoptózy (Švihovec et al. 2019).

Separace chromozómů během mitózy je ovlivněna řadou dalších regulačních procesů, při jejichž inhibici rovněž docílíme zástavy buněčného cyklu či navození buněčné smrti. Jsou jimi například rodina aurora kinas, která reguluje zahájení mitózy, formování dělicího vřeténka a separaci chromozómů. Také správná funkce cyklin-dependentních kinas (CDK) hraje stěžejní roli v regulaci buněčného cyklu. Je jich velké množství a každá se uplatňuje jen v určitém úseku buněčného cyklu. Jsou jeho hlavními pozitivními regulátory a mj. regulují transkripci RNA (Klener a Klener, 2013).

2.2.3 *Genotoxická cytostatika inhibující replikaci a transkripci DNA*

Molekula DNA je jedním z hlavních cílů působení genotoxických léčiv. Poškození struktury nukleových kyselin a inhibice replikace aktivují ve zdravých buňkách tzv. DDR (DNA damage response) a kontrolní body buněčného cyklu, které mají za úkol opravit či úplně zastavit buněčné dělení, aby nedocházelo k předání poškozené informace do dceřiné buňky (Swift a Golsteyn, 2014). Jedná se o různé typy signálních drah snažící se opravit různé typy poškození DNA. Aktivací DDR dráhy může dojít k inhibici translace, zastavení buněčného cyklu, ale i k navození buněčné smrti (Woods a Turchi, 2014). Nádorové buňky jsou schopny ignorovat kontrolní body buněčného cyklu, aby se mohly rychleji a nekontrolovatelně dělit. Díky tomu jsou však více náchylné k poškození DNA navozenému genotoxickými protinádorovými látkami (Cheung-Ong et al. 2013).

Mechanismy účinku léčiv vedoucí k poškození DNA jsou různé, nejvýznamnějšími jsou alkylace, interkalace a inhibice DNA topoisomeras (Swift a Golsteyn, 2014).

Alkylační cytostatika

Alkylující látky jsou elektrofilní částice, které přenášejí alkylové skupiny na molekulu DNA a utvoří s ní kovalentní vazby (Obr. 2). Mezi alkylující genotoxická cytostatika řadíme dusíkaté yperity, deriváty nitrosomočoviny, ale i deriváty aziridinu, alkylsulfonáty či triazinové sloučeniny (Swift a Golsteyn, 2014).

Dusíkaté yperity, z nichž jsou klinicky využívány např. cyklofosfamid, chlorambucil nebo melfalan, zastavují tvorbu replikační vidlice s následnou indukcí apoptózy přímou alkylací purinových bází v molekule DNA (Cheung-Ong et al. 2013). Utvoří se guanin-guanin a guanin-adenosin spojení mezi oběma řetězci molekuly DNA. Podobné vlastnosti mají mitomycin C a thiotepa, deriváty odvozené od aziridinu (Swift a Golsteyn, 2014).

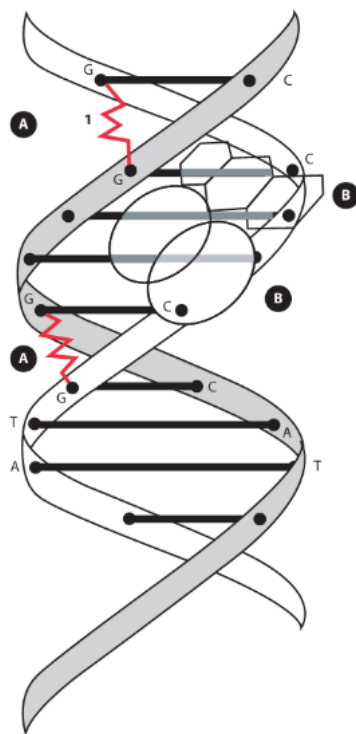
Deriváty nitrosomočoviny, např. karmustin, lomustin, semustin, poskytují chlorethylovou skupinu na N⁷ a O⁶ guaninu. Vzniklé O⁶-chlorethylguanin meziproducty jsou cytotoxické, reagují s cytosinem a vytvářejí guanin-cytosin spojení mezi oběma řetězci, které vede k zablokování replikace s následnou buněčnou smrtí. Triazinové sloučeniny, např. dakarbazin, prokarbazin, temozolomid, jsou cytotoxické z důvodu

tvorby toxického O⁶-methylguaninu. Busulfan jako zástupce alkylsulfonátů vytváří guanin-guanin meziřetězcové a vnitřetězcové můstky (Swift a Golsteyn, 2014).

Interkalační cytostatika

Jako interkalaci (Obr. 2) označujeme děj, kdy se do dvoušroubovice DNA vmezeří molekula cytostatika za pomoci vodíkových můstků. Narušení struktury DNA vede opět k inhibici replikace a transkripce. U interkalačních látek se často setkáváme ještě s jiným mechanismem účinku, a to s inhibicí jednoho z dvou typů topoisomeras. Interkalačním mechanismem se vyznačují například antracyklinová antibiotika, dále pak deriváty antrachinonu a deriváty akridinů, které se však používají jen velmi omezeně (Švihovec et al. 2018).

Antracyklinová antibiotika patří v klinické praxi stále k nejpoužívanějším cytostatikům. Jejich použití je však limitováno silnými kardiotoxickými účinky. Doxorubicin, daunomycin i novější epirubicin a idarubicin jsou toxické zejména díky jejich několika mechanismům účinku. Kromě interkalace působí také na tvorbu volných radikálů, inhibici aktivity topoisomeras či interferují s aktivitou helikas (Cheung-Ong et al. 2013).



Obr. 2 Alkylační (A) a interkalační (B) účinek konvenčních cytostatik (Klener a Klener, 2010)

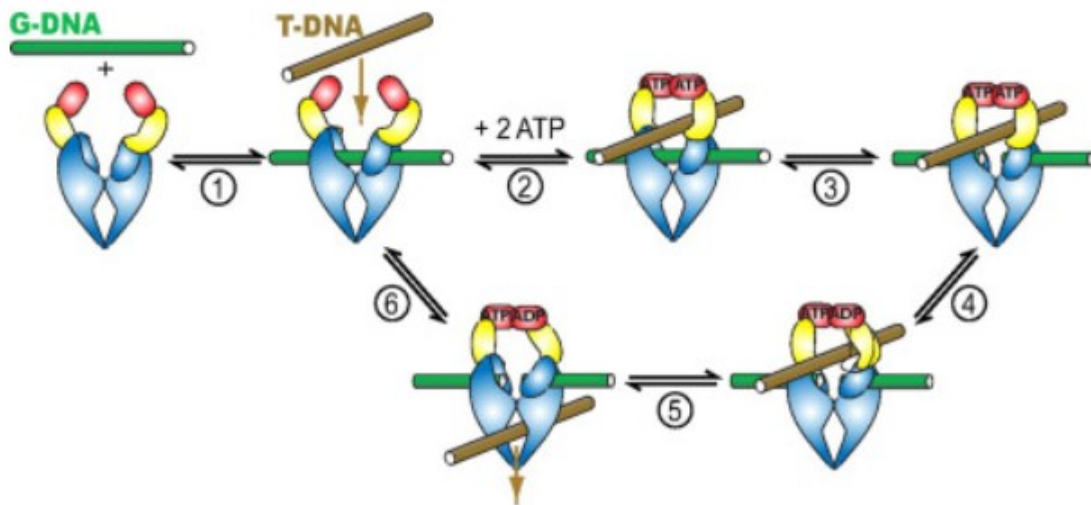
Platinová cytostatika

Cisplatina a karboplatina jsou léčiva, která nemůžeme zařadit mezi typické alkylující látky, protože nepřenáší uhlík. Na DNA se vážou pomocí platiny skrze koordinačně kovalentní vazbu (Woods a Turchi, 2014). Cisplatina obsahuje atom platiny s dvěma navázanými chlóry jako odstupujícími skupinami a dvěma aminoskupinami. Po vstupu do buňky dochází k odštěpení odstupující skupiny a navázání vody, díky čemuž se platina lépe naváže na N⁷ guaninu a adeninu za vzniku aduktů na DNA. Pokud se vytvoří dva adukty na sousedních bázích v rámci jednoho řetězce, dochází k tvorbě vnitřetězcového můstku, který následně zablokuje replikaci a transkripci (Cepeda et al. 2007).

Inhibitory topoisomeras

Replikace DNA během S-fáze buněčného cyklu zajišťuje, aby se do dceřiných buněk dostala genetická informace identická s buňkou mateřskou. Prostřednictvím helikasy dochází k rozvolnění vodíkových můstků spojující oba řetězce dvoušroubovice DNA a vzniká replikační vidlice (Ledvina et al. 2009). Kvůli rozplétání DNA na dva samostatné řetězce, podléhá časem zbytek molekuly nadměrnému pnutí a vytváří nadšroubovicové vinutí tzv. supercoiling, superhelix. Tento stav by časem vedl k zástavě tvorby replikační vidlice, pokud by nezasáhla skupina enzymů DNA-topoisomeras (Nitiss, 1998).

DNA-topoisomerasy jsou enzymy mající nezastupitelnou funkci v mnoha biologických procesech zahrnujících DNA. Uplatňují se nejen při replikaci DNA, ale také při transkripci a segregaci chromozomů (Nitiss, 1998). Rozlišujeme dva základní typy lidských topoisomeras, a to topoisomerasa I (TOP1) a topoisomerasa II (TOP2), které lze dále rozdělit do několika podtypů (např. TOP2 α a TOP2 β). Jejich hlavní funkcí je odvinutí DNA, čímž se sníží nadměrné pnutí superhelixu. TOP1 rozštěpí jeden ze dvou řetězců svinuté DNA a skrze vzniklý zlom provlékne druhý řetězec DNA, nakonec zlom opětovně spojí. Výsledkem je dvoušroubovice odvinutá o jeden závit. TOP2 přeruší dvoušroubovici na obou řetězcích (G-segment, gate) a skrze zlom se protáhne další dvoušroubovice (T-segment, transfer). Dochází k opětovnému spojení dvoušroubovice, která je o dva závity odvinutá. Proces protažení T-segmentu skrze G-segment a opětovné spojení závisí na dodávce ATP (Delgado et al. 2018). Schéma mechanismu TOP2 je znázorněno na Obr.3.



Obr. 3 Katalytický mechanismus TOP2 (Mueller-Planitz a Herschlag, 2008)

ATP-asové domény (červené), transdukční domény (žluté), domény štěpící DNA (modré), G-segment (zelený), T-segment (hnědý)

- ① G-segment je vázán na štěpící doménu, T-segment se váže v transdukční doméně
- ② Vazba ATP na ATP-asové domény způsobí konformační změnu a uvězní T-segment uvnitř enzymu
- ③ Rozštěpení G-segmentu, 5' konce DNA se kovalentně reversibilně vážou na tyrosinové zbytky topoisomerasy
- ④ ⑤ Hydrolyza ATP a protažení T-segmentu skrze zlom G-segmentu
- ⑥ Hydrolyza ATP, opětovné spojení G-segmentu, odloučení dvou molekul ADP a T-segmentu, opětovné otevření ATP-asových domén

Důležitost topoisomeras v rámci zajištění integrity genomu je nepopíratelná, a proto je narušení jejich funkce efektivní strategií pro léčbu rakoviny (Nitiss, 2009). Inhibitory topoisomeras jsou léčiva, která řadíme ke klasickým chemoterapeutikům s genotoxickým účinkem. Nejvíce inhibitorů topoisomeras působí jako tzv. topoisomerasové jedy. Dalším (méně častým) mechanismem účinku je katalytická inhibice topoisomeras (Delgado et al. 2018).

První jmenovaný mechanismus je založen na tvorbě ternárního komplexu [topoisomerasa-DNA-léčivo], který způsobí, že se zlom na jednom či obou řetězcích DNA opětovně nespojí, přičemž je nutné zdůraznit, že k vazbě léčiva dochází až po

navázání enzymu na DNA (Delgado et al. 2018). Poškozením DNA během S-fáze dojde k zablokování replikační vidlice, což může mít za následek vznik dvouřetězcových zlomů (DSB; z angl. DNA double strand breaks), které se řadí mezi nejzávažnější typ poškození molekuly DNA a které vedou k buněčné smrti (Cheung-Ong et al. 2013).

Mezi TOP1 inhibitory řadíme kamptotecin, topotekan a irinotekan, které se využívají v terapii například plicního nebo kolorektálního karcinomu. TOP1 inhibitory po vazbě na DNA-TOP1 komplex způsobí nejprve jednořetězcové zlomy, které následně přechází až v závažné DSB (Swift a Golsteyn, 2014).

Do skupiny TOP2 jedů řadíme léčiva etoposid a teniposid odvozená od epipodofylotoxinů a dále již dříve v souvislosti s interkalací zmiňovaná antracyklinová antibiotika – doxorubicin a daunorubicin (Delgado et al. 2018). Tyto látky vedou ke zvýšení hladin TOP2-DNA komplexu, a tím ke vzniku zlomů ve dvoušroubovici DNA s následnou apoptózou (Nitiss, 2009).

U katalytických inhibitorů TOP2 se předpokládá, že snižují enzymatickou aktivitu TOP2. Na rozdíl od TOP2 jedů dvoušroubovici nepoškodí přímo, protože ovlivňují topoisomerasu tehdy, kdy není vázaná na DNA (Nitiss, 2009). Jediným klinicky využívaným zástupcem, u kterého byl popsán tento mechanismus, je dexrazoxan. Pro jeho kardioprotektivní účinky je využíván jako kardioprotektivum během léčby antracyklinovými antibiotiky (Delgado et al. 2018).

Zvýšené hladiny topoisomeras v rakovinných buňkách vytvářejí více příležitostí pro TOP1 a TOP2 jedy, na rozdíl od katalytických inhibitorů, kterým zvýšené hladiny topoisomeras účinnost snižují. I to může být jedna z příčin, proč se (tolik) nesetkáváme se zástupci katalytických inhibitorů topoisomeras v klinické praxi. Inhibitory TOP2 působí na oba podtypy enzymu. V nádorových buňkách lze pozorovat zvýšenou expresi TOP2 α , což vysvětluje protinádorový efekt TOP2 jedů. Naopak řada nežádoucích účinků (kardiotoxicita, sekundární malignity) jsou spojovány s inhibicí TOP2 β . Ideálním inhibitorem, jedem nebo katalytickým inhibitorem, bez závažné kardiotoxicity a sekundárních malignit, by pak byla látka, která by cílila pouze na isoformu TOP2 α (Delgado et al. 2018).

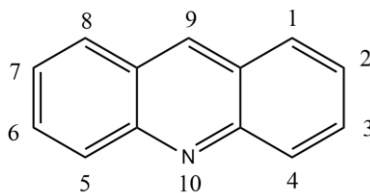
2.3 Akridinová barviva

Akridin je tricyklický heterocyklus, který byl objeven v druhé polovině 19. století při zkoumání frakcí uhelného dehtu. Název odvozený z anglického slova *acrid* vystihuje jeho štiplavý charakter, který dráždil výzkumníky ke kýchání a způsoboval slzení. Brzy po objevení byl akridin izolován ve formě světle žlutých krystalů (Albert, 1949).

Látky odvozené od akridinu se nejprve využívaly jako průmyslové barvy. Žlutě a oranžově (ale i fialově, modře, zeleně, aj.) barvicí akridinové deriváty byly využívány především k barvení kůže, ke které vykazovaly vysokou afinitu a stálost. Na přelomu 19. a 20. století se vědci snažili přijít na využití akridinových derivátů v oblasti medicíny, což vedlo k objevům nových antibiotik a antimalarik (Albert, 1949). Avšak pozdější objasnění mechanismu účinku a struktury akridinových derivátů ukázalo jejich velký potenciál v léčbě mnoha nemocí, například nádorů a Alzheimerovy choroby. Díky tomu bylo syntetizováno již velké množství molekul na bázi akridinu lišících se pozicí jednotlivých substituentů na akridinovém jádře. Vznikla tak rozsáhlá skupina látek, které obecně označujeme jako akridiny (Zhang et al. 2014).

2.3.1 *Struktura*

Akridin (Obr. 4) jako tricyklický heterocyklus připomíná svou strukturou anthracen, jehož atom uhlíku v poloze 10 je nahrazen atomem dusíku. Molekula je planární a stabilizována π -konjugovaným systémem. Slabě bazický charakter lze připodobnit molekulám pyridinu a chinolinu. Krystalizuje v bezbarvé jehličkovité krystaly, slabě rozpustné v horké vodě. Díky konjugovanému systému vazeb řadíme akridiny mezi tzv. chromofory, nejčastěji žlutě až oranžově zbarvené, které vykazují fluorescenci po vystavení UV záření (PubChem 2021, Albert 1949). Uhlík v poloze 9 je místem s největším deficitem elektronů a je proto nejvhodnější pozicí pro substituci nukleofilním činidlem (Kozurkova et al. 2021).



Obr. 4 *Struktura a systém číslování akridinu*

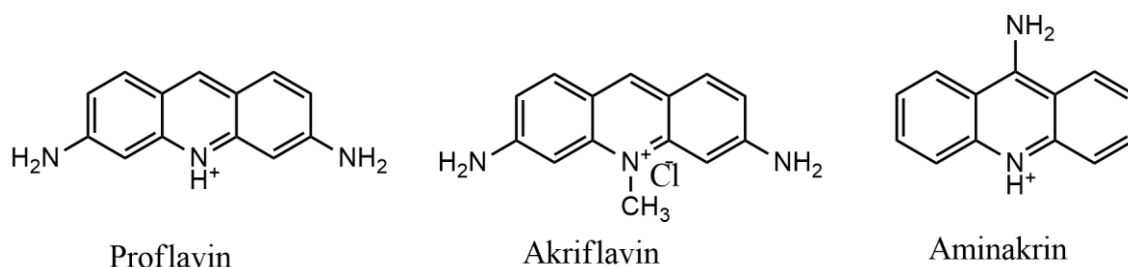
2.3.2 *Terapeutický potenciál*

Antibakteriální

První využití akridinů v medicíně se datuje do doby mezi světovými válkami, kdy byly využívány jako antibakteriální látky. Proflavin, akriflavin a aminakrin (Obr. 5) byly aplikovány především lokálně k ošetření vnějších ran, které byly často infikovány gram-negativními bakteriemi. Oproti tehdy používaným penicilinům a sulfonamidům byly akridiny více účinné právě proti gram-negativním bakteriím (Albert, 1949). S akriflavinem a aminakrinem se i dnes můžeme setkat pro jejich antiseptické vlastnosti při ošetření kůže a ran (Kumar et al.2012).

Naproti tomu vnitřní užití akridinů bylo velmi toxické, přijatelné pouze ve vysokém zředění a k jejich perorálnímu užití se přicházelo až tehdy, kdy ostatní dostupná léčiva nevykazovala dostatečný účinek. Lze se tak setkat s informacemi o historickém užití některých akridinových derivátů v terapii komplikované cystitidy (Albert, 1949).

Ačkoliv se v současnosti akridiny jako antibakteriální látky nevyužívají, jejich výzkum v oblasti terapie bakteriálních infekcí znovu nabývá na síle. Důvodem je zvyšující se rezistence běžně užívaných antibiotik, a tedy snaha najít látky, vůči kterým si bakterie nejsou schopny rezistenci vyvinout. Zkoumány byly akridiny substituované v poloze 9, a to amino-, hydrazino-, methoxy nebo thioalkylovou skupinou. Zatím ovšem bez většího úspěchu s výjimkou lokálně aplikovaných aminoakridinů v rámci fotodynamické terapie (PDT). Jako potenciální fotosenzitizéry (PS) vykazují baktericidní účinek po vystavení světlu o specifické vlnové délce, a to za mnohem nižších koncentrací než bez ozáření (Denny, 2002).



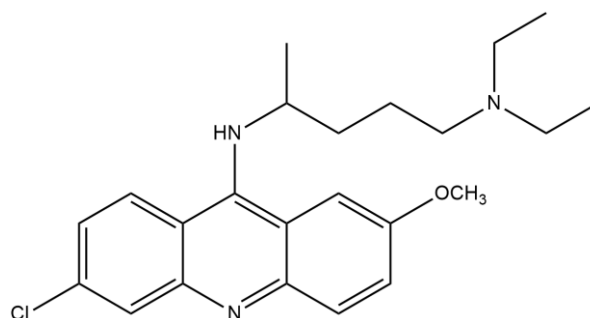
Obr. 5 *Struktury akridinových derivátů s antibakteriálním účinkem*

Antiprotozoální

Jedním z nejčastějších a nejzávažnějších onemocnění způsobeným prvky je malárie. Malárie je akutní i chronické onemocnění přenášené komárem rodu *Anopheles*. Způsobuje horečnaté záchvaty, které si lze představit jako periodické vzestupy a poklesy tělesné teploty (Rozsypal, 2015). Ačkoliv se s onemocněním setkáme především v tropických oblastech Afriky, podobné rizikové oblasti najdeme po celém světě. V roce 2019 způsobila malárie přibližně 400 000 úmrtí celosvětově (WHO, 2021).

Původcem nemoci jsou intracelulární parazité, prvoci rodu *Plasmodium*. Jejich intracelulární vývoj probíhá v hepatocytech a následně v erytrocytech hostitele (Aly et al. 2009). Bylo zjištěno, že některé deriváty akridinů působí gametocytocidně v erytrocytární fázi životního cyklu plasmodií a jsou proto zkoumány jako potenciální antimalarická léčiva (Kumar et al. 2012).

Nejvýznamnější antimalarikum ze skupiny akridinů je chinakrin (Obr. 6), znám také pod názvem mepakrin či obchodním názvem Atebrin. Začal se užívat v rámci terapie malárie za druhé světové války, kdy došlo k přerušení dodávek do té doby užívaného chininu (Albert, 1949). Později byl však nahrazen chlorochinem s lepším farmakodynamickým profilem. Zkoumání imunomodulačních vlastností chinakrinu a jeho vlivu na jiné patogenní prvky pokračovalo i nadále (LiverTox, 2017). Řada úspěšných studií poukázala na jeho potenciál v léčbě některých autoimunitních chorob (LE, RA), epilepsie, Chagasovy choroby, teniázy, prionových infekcí (CJD), a dokonce i nádorů (Zhang et al. 2014).



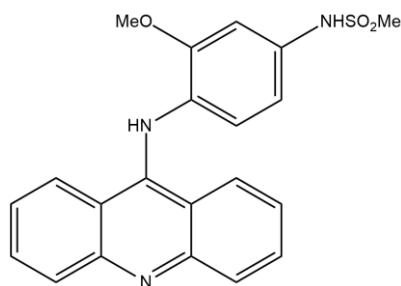
Obr. 6 Chinakrin (mapakrin, Atebrini)

Protinádorové

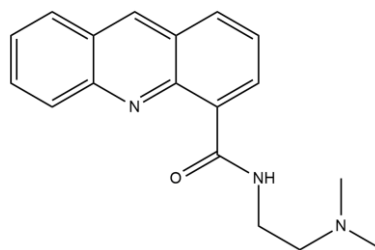
Na základě zjištění, že akridiny jsou schopné interagovat s molekulou DNA za vytvoření komplexů [akridin-DNA] a [akridin-DNA-topoisomera] s následným poškozením DNA a zástavou buněčného dělení, se od 70. let minulého století syntetizují deriváty akridinů s antiproliferačním potenciálem (Denny, 2002). Přestože je za hlavní příčinu cytotoxicity akridinů považována interkalace molekuly akridinového derivátu mezi páry bází dvouřetězcové DNA, nelze opomenout i další mechanismy, které k cytotoxicitě přispívají, jsou jimi například inhibice topoisomeras a telomeras, iniciace ROS a oxidativního stresu, schopnost zástavy buněčného cyklu či interakce s P-glykoproteiny (Prasher a Sharma, 2018).

Antiproliferační účinek akridinů závisí na jejich struktuře. Vznikly tak potenciální protinádorové látky, které lze dle hlavních substituentů akridinového jádra zjednodušeně rozdělit do několika skupin (Prasher a Sharma, 2018).

Nejstarší skupinou akridinových derivátů s cytotoxickým účinkem jsou 9-anilinoakridiny (Prasher a Sharma, 2018). Do klinické praxe se dostal amsakrin (m-AMSA) (Obr. 8), topoisomerasový jed, který interaguje s DNA i s lidskou TOP2. Dvojí mechanismus lze vysvětlit tak, že akridinový skelet molekuly je zodpovědný za interkalaci sloučeniny, zatímco zbytek molekuly interaguje s TOP2 za vzniku ternárního komplexu. Předpokládá se, že m-AMSA je aktivní vůči oběma isoformám TOP2 (α i β). Amsakrin vykazuje účinek proti akutní myeloidní leukemii (AML), akutní lymfoblastické leukemii, akutní promyelocytické leukemii, Hodgkinově lymfomu a non-Hodgkinským maligním lymfomům (Ketrón et al. 2012). V České republice je registrován léčivý přípravek Amsidyl 75 mg/1,5 ml určený k infuznímu podání v indikaci záchranné léčby refrakterní AML u dospělých v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky, například s cytarabinem (SPC, SUKL).



Obr. 8 Amsakrin (m-AMSA)

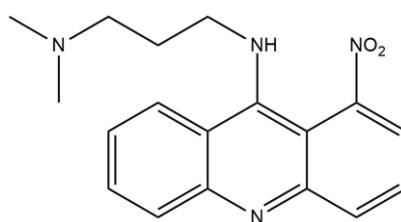


Obr. 7 DACA

Další studovanou skupinou derivátů akridinů s antiproliferační aktivitou jsou látky odvozené od N-[2-(dimethylamino)ethyl]-9-aminoakridin-4-karboxamidu, v literatuře označovaného zkratkou DACA (Obr. 8). Výhodou akridinů s karboxamidovou skupinou je jejich stabilita a dobrá rozpustnost ve vodě (Graham et al. 1984). Vedle schopnosti interkalace je pozorován jejich vliv na aktivitu obou typů topoisomeras, podobně jako tomu je u amsakrinu (Belmont et al. 2007).

Pro zvýšení protinádorové aktivity akridinových karboxamidových derivátů byly syntetizovány bis-akridiny. V *in vitro* studii na buněčné linii kolorektálního karcinomu bylo zjištěno, že k potlačení proliferace buněk stačí nižší koncentrace bis(akridin-4-karboxamidu) oproti DACA, a vznikla tak další podskupina inhibitorů topoisomeras odvozených od akridinu (Gamage et al. 1999).

Nitrakrin (ledakrin) (Obr. 9) 1-nitro-9-(3',3'-dimethylaminopropylamino)-akridin byl poprvé syntetizován v 70. letech v Polsku, přibližně ve stejné době, kdy se na Novém Zélandu rozvíjel výzkum amsakrinu. Obě látky spojovalo jejich využití v klinické praxi jako chemoterapeutik v léčbě maligních nádorů (Denny, 2002). Pozice nitroskupiny v poloze 1 akridinového jádra je pro účinek léčiva klíčová a její absence či umístění v jiné poloze vede ke snížení aktivity léčiva (Belmont et al. 2007). Přestože byl nitrakrin v terapii nádorů překonán novými chemoterapeutiky, jeho selektivita k hypoxické tkáni *in vitro* se stala podnětem k dalšímu zkoumání. Byl pak zkoumán například nitrakrin N-oxid, proléčivo s nízkou afinitou k DNA i nízkou toxicitou, které se v hypoxickém prostředí rostoucího nedokonale vaskularizovaného nádoru redukuje na účinný nitrakrin (Demeunynck et al. 2001).



Obr. 9 Nitrakrin

Pro antiproliferační, cytotoxické vlastnosti byly zkoumány i tzv. hybridní sloučeniny akridinu. Jedná se o sloučeniny sestávající se ze základního akridinového skeletu, na který je navázána další významná molekula. Vzniklý konjugát pak může cílit na specifické struktury a působit přes více mechanismů účinku. Spojením akridinu a porfyrinu vznikají PS uplatňující se v PDT nádorů. Akridin-purin/pyrimidinové

konjugáty se chovají jako nukleasy a selektivně rozpoznávají a štěpí DNA na tzv. abazické straně. Dále byly zkoumány například komplexy akridinu a platiny nebo konjugáty s peptidy (Prasher a Sharma, 2018).

Antivirotické a antiretrovirotické

V terapii herpetických infekcí a AIDS se rovněž nabízí příležitost uplatnění akridinových derivátů. Herpetické viry totiž využívají při své replikaci lidskou TOP1 a TOP2 a jejich cílená inhibice pomocí akridinových derivátů by tak mohla přinést výsledky v terapii některých herpetických infekcí, u nichž přestávají být konvenční léčiva z důvodu rezistence účinná (Goodell et al. 2006). Pro léčbu syndromu získané imunodeficiencie (AIDS) způsobeného retrovirem HIV je ve studiích věnována pozornost pyridoakridinům. Tyto mořské alkaloidy získané ze žlutě zbarvených pláštěnců třídy *Ascidiae* (sumky) obsahují strukturu kondenzovaného tetracyklického 7H-pyrido[2,3,4-k,l]akridinu (Kumar et al. 2012). Byl u nich sledován antivirotický, anti-HIV, antibakteriální, antimykotický, imunosupresivní, insekticidní, antiparazitický, anticholinesterasový a cytotoxický efekt (Ibrahim a Mohamed, 2016). Předpokládá se, že anti-HIV efekt je způsoben vazbou pyridoakridinu na specifické místo v molekule virové RNA, čímž zabrání navázání a vytvoření komplexu virové RNA s tzv. TRBP (trans-activation response RNA binding protein), následně nedochází k replikaci viru (Demeunyk et al. 2001).

Antimykotické

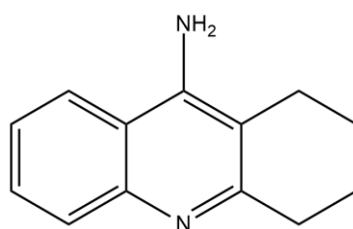
Není mnoho studií, které by poukazovaly na antimykotické vlastnosti akridinových derivátů. V terapii mykotických infekcí narážíme obecně na několik problémů. Jedním z nich je skutečnost, že buňky hub jsou eukaryotické, stejně jako buňky savců, a proto najít terapeuticky specifický cíl v buňkách hub je mnohem složitější oproti prokaryotním buňkám bakterií. V souvislosti s akridiny se nabízí cílit na fungální topoisomerasy. Z doposud zkoušených akridinových derivátů jen málo zástupců inhibovalo fungální topoisomerasy. Vyšší aktivitu doposud vykazovaly k lidským topoisomerasám. Systémové mykotické infekce mohou být u rizikových skupin pacientů velmi nebezpečné a se zvyšující se rezistencí na běžně užívaná antimykotika (MDR, multidrug resistance) je nutné hledat další potenciální antimykotika, mimo jiné i mezi

deriváty akridinů. Naděje jsou vkládány například do výzkumu nových PS pro PDT (Gabriel, 2020).

Neuroprotektivní

Demence je onemocnění, syndrom, se kterým se setkáme především u pacientů v seniorském věku (vyskytuje se ale i u mladších jedinců). Rozvíjí se na základě makroskopického i mikroskopického poškození mozku, což se projevuje poruchami kognitivních funkcí, chování, emotivity a spánku. Rozlišujeme několik druhů demence, z nichž nejčastější (z 50-70 %) je Alzheimerova choroba (AD), při které dochází k úbytku neuronů a snížení synaptické plasticity. Zásadní z hlediska patofyziologie je jednak tvorba a ukládání beta-amyloidu ve formě extracelulárních amyloidních plaků a jednak akumulace τ -proteinu uvnitř neuronu jako intracelulární neurofibrilární klubíčka. Oba jevy vedou k degeneraci a odumírání neuronů, a tedy poruchám neurotransmise. Nejvíce je poškozen acetylcholinergní a glutamátový systém (Jirák, 2013, Zvěřová, 2017).

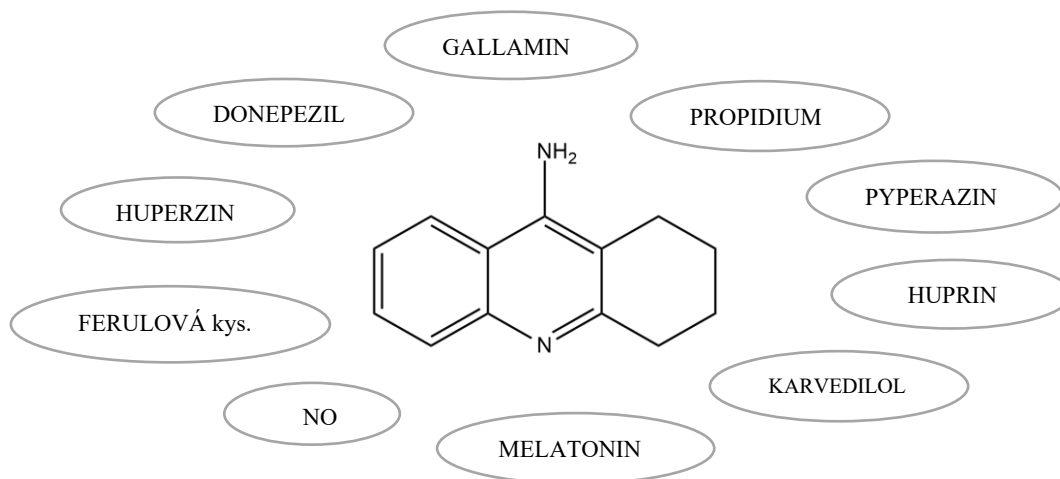
Jelikož doposud neexistuje léčba AD, farmakoterapie se zakládá na zmírnění příznaků a progresu choroby (Jirák, 2013). V praxi se ke kompenzaci cholinergního deficitu používají reverzibilní inhibitory cholinesteras. Právě tento mechanismus účinku lze pozorovat i u takrinu (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridinu, Obr. 10), který byl dokonce prvním léčivem k léčbě AD schváleným FDA (Demeunynck et al. 2001). Kvůli závažné hepatotoxicitě a gastrointestinálnímu diskomfortu jsou však hledány deriváty s lepším bezpečnostním profilem (Korábečný et al. 2012).



Obr. 10 Takrin – první léčivo schválené k léčbě AD

Poslední léta ukázala, že největší potenciál by mohly mít homodimery a heterodimery takrinu, které jsou schopny duální inhibice acetylcholinesterasy (AChE). Jejich výhodou je dlouhodobější působení a efektivní koncentrace již v řádech nM. Díky spojení takrinu se sloučeninou s odlišnými farmakodynamickými vlastnostmi vznikají látky ovlivňující AD i na úrovních inhibice periferního anionického místa AChE, čímž dochází k zamezení shlukování β -amyloidu do fibril. U těchto látek můžeme očekávat

i protizánětlivé a antioxidační vlastnosti nebo schopnost alosterické modulace muskarinových, nikotinových a GABA receptorů. Příklady některých sloučenin tvořících s molekulou takrinu heterodimery jsou znázorněny na Obr. 11 (Korábečný et al. 2012).



Obr. 11 Příklady některých heterodimerů takrinu s anticholinesterasovým efektem

Fotodynamická terapie

V posledních dekádách dochází k rozvoji různých typů PS, které se uplatňují v PDT nádorů či ve fotodynamické inaktivaci patogenních mikroorganismů. Na konci 90. let 19. století byl poprvé, pozorován vliv viditelného záření na trepky (*Paramecium*), které byly předtím vystaveny působení akridinové červeni. Kombinace akridinového derivátu a světla byla pro tyto vodní prvky smrtící. Tento efekt později dovysvětlil rakouský farmakolog Hermann von Tappeiner, podle kterého se na výsledném efektu podílí také kyslík. Jako první použil termín „fotodynamická terapie“ a také jako první vyzkoušel PDT lokálně na lidech (Zhang et al. 2018).

PDT je založena na excitaci PS světlem o specifické vlnové délce. Vznikají tak vysoce reaktivní formy kyslíku (ROS), které následně reagují například s proteiny, nukleovými kyselinami a lipidy v buňce. Poškození biomolekul následně vede k nevratnému poškození nádorových buněk a k buněčné smrti. Lze pozorovat poškození cév nádoru a aktivaci imunitní odpovědi. Velkou výhodou PDT oproti konvenční protinádorové terapii je její schopnost limitovat toxický efekt vůči okolní zdravé tkáni (Zhang et al. 2018).

Díky citlivosti na světlo našly některé akridinové deriváty uplatnění v rámci PDT nádorů. Mezi nimi například akridinová oranž (AO), jejíž použití v rámci PDT v kombinaci s chirurgickým odstraněním periostálního Ewingova sarkomu vykazovalo velmi dobré výsledky. Výhodou je i fakt, že AO se mnohem více kulminuje v maligní tkáni, což je pravděpodobně způsobeno pH gradientem mezi intracelulárním a extracelulárním pH (Čížeková et al. 2014). V *in vitro* studiích projevuje potenciál mimo jiné v léčbě glioblastomu (Osman et al. 2018).

Kromě působení na nádorové buňky jsou ROS velmi toxické vůči mikrobiálním buňkám a nabízí se tak možnost jejich dalšího uplatnění. Někteří původci mykotických onemocnění vykazují fotodynamickou citlivost vůči imidazoakridonu. Nebyl při tom pozorován genotoxický nebo mutagenní efekt na buňky hub či lidské buňky. Výhodou fotodynamické terapie z hlediska inaktivace patogenních mikroorganismů je neschopnost mikroorganismů vyvinout resistenci vůči ROS (Gabriel, 2020).

2.3.3 *Genotoxické a mutagenní účinky*

Mechanismus účinku akridinů je znám již od první poloviny 20. století. Díky planární struktuře molekuly akridinů se léčivo interkaluje mezi páry bází v DNA s pomocí donor-akceptorové interakce mezi molekulou léčiva a bázemi DNA (Denny, 2002). Kvůli vmezezení akridinového jádra dochází k pokřivení cukr-fosfátové kostry DNA a inhibici topoisomerasy (Zhang et al. 2014). Z hlediska vazby derivátů akridinů na DNA nás zajímá její síla a doba, po kterou bylo léčivo navázáno na určité místo v molekule DNA, tedy kinetika vazby. Oba faktory společně s typem interakce, zde interkalace, jsou důležité pro chemoterapeutický účinek potenciálního léčiva (Denny, 2002).

Cytotoxicita akridinových derivátů spočívá v utvoření ternárního komplexu sestávajícího se z DNA, TOP2 a akridinového derivátu (Denny, 2002). Jak již bylo zmíněno v podkapitole o inhibitech topoisomeras, TOP2 je nepostradatelná při replikaci, transkripci a dekatenci DNA. Inhibitory topoisomeras rozdělujeme do dvou skupin, a to na topoisomerasové jedy a méně zastoupené katalytické inhibitory topoisomeras. TOP2 jedy stabilizují ternární komplex [DNA-TOP2-akridin]. Vzniklé kovalentní spojení enzymu s DNA vede k tvorbě DSB během S-fáze buněčného cyklu, kdy je hladina TOP2 vyšší. Katalytické inhibitory působí v jakékoliv jiné fázi katalytického cyklu topoisomerasy s cílem zabránit topoisomerase navázat se na DNA.

Vystavení TOP 2 jedům se projeví morfologickou změnou jádra na malé apoptické jádro s fragmentovanou DNA, kdežto po působení katalytických inhibitorů je patrné zvětšení jádra obsahující propletenou DNA. Většina doposud známých akridinových derivátů s protinádorovým účinkem, např. amsakrin, jsou řazeny mezi topoisomerasové jedy, nicméně vývoj katalytických inhibitorů s sebou nese mnohé výhody pramenící z jejich neschopnosti vytvářet ternární komplex s DNA, a tedy potenciálně větší bezpečnosti použití (Goodell et al. 2008).

Dostupné studie inhibitorů topoisomeras poukazují na to, že jsou induktory programované buněčné smrti, apoptózy. Kondenzace a fragmentace chromatinu spolu s internukleosomálním štěpením DNA pomocí endonukleas vede k rozpadu buňky na buněčné fragmenty a následné buněčné smrti. U amsakrinu bylo zjištěno, že může indukovat apoptózu jak přes p53-dependentní cestu, tak přes p53-nezávislou cestu (Ferguson a Baguley, 1996).

Indukce apoptózy zajišťuje integritu genomu a zabraňuje mutagenizi. V *in vitro* studiích topoisomerasových inhibitorů bylo zjištěno, že si buňka „vybírá“ dle okolních podmínek, jestli zvolí cestu apoptózy nebo mutagenize, přičemž apoptóza bude upřednostněna v případě, že se v mediu nenachází dostatek sera a buňky jsou vystaveny zkoumané látce po dostatečně dlouhou dobu. Je však nutné zdůraznit, že se podmínky pro vstup do apoptózy či mutagenize mohou lišit pro každou buněčnou linii. Obecně lze ale říct, že mnoho lidských leukemických linií je náchylných k apoptóze způsobené TOP2 jedy (Ferguson a Baguley, 1996).

Interkalační mechanismus akridinů byl prostudován velmi pečlivě. Vazba je reversibilní, nekovalentní a interkalační látky obecně působí na savčí buňky jen jako velmi slabé klastogeny, proto s největší pravděpodobností samotná interkalace nezpůsobuje mutagenitu akridinových derivátů. Jinak to bude s vytvořenými adukty DNA, u kterých mutagenní a kancerogenní efekt pozorován byl. Větší mutagenní aktivitu budou mít akridinové deriváty, které kromě interkalace ještě zasahují do metabolismu DNA, např. na úrovni již zmíněné inhibice topoisomeras (Ferguson a Denny, 2007).

Při studiích karcinogenity amsakrinu na laboratorních myších byla prokázána vysoká incidence malého intestinálního adenokarcinomu a v samičí populaci vzrostla navíc incidence karcinomu prsu. V klinických studiích amsakrinu v kombinaci s cytosin-arabinosidem a antracykliny u pacientů s AML však nárůst sekundárních malignit nebyl pozorován (Denny, 2002).

Objev inhibitorů topoisomeras dával naději v méně karcinogenní a mutagenní chemoterapeutika oproti do té doby používaným alkylačním cytostatikům. Avšak i u této skupiny látek byl pozorován zvýšený mutagenní potenciál způsobující změny na úrovni chromozomů i genů. Je proto obecně nutné označit inhibitory topoisomeras, včetně akridinů, jako mutagenní a karcinogenní (Ferguson a Baguley, 1996).

3 CÍLE PRÁCE

- Studium cytotoxicity nových akridinových derivátů FK-8-HCl, FK-20-HCl, FK-27-HCl, FK-36-HCl, FK-42-HCl, FK-46-HCl, FK-48, FK-78-HCl, FK-97-HCl a FK-106 na buněčné linii HeLa stanovením hodnot IC_{50} po 24 h inkubaci.
- Zjistit, zda studované látky inhibují lidskou topoisomerasu II.
- Stanovit typ buněčné smrti studovaných látek v reálném čase.
- Zhodnotit vlastnosti nových akridinových barviv v kontextu s dosavadními poznatky o 9-aminoakridin-4-karboxamidech.

4 METODICKÁ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 *Buněčná linie HeLa*

V *in vitro* studiích na cytotoxicitu látek se využívá nádorových buněčných linií, které rychle rostou, snadno se kultivují a nejsou náročné na růstové faktory, hormony a jiná k proliferaci potřebná aditiva. Těmto podmínkám vyhovuje i buněčná linie HeLa získaná v roce 1951 z agresivního cervikálního adenokarcinomu pacientky Henrietty Lacksové (Snustad et al. 2009 str 40). Agresivní růst nádorových buněk této linie je spojován s lidským papilomavirem HPV18, jehož přítomnost v epiteliálních buňkách vede k potlačení tumor supresorových genů p53 a Rb (Singh et al. 2007). Nevýhodou HeLa buněčné linie je její schopnost snadno kontaminovat jiné buněčné linie (Capes-Davis et al. 2010). Kvůli přítomnosti HPV a riziku kontaminace jiných buněčných linií bylo proto při práci v laboratoři nutné dodržovat veškerá pravidla prevence kontaminace buněčnou linií HeLa a chránit sebe vhodnými ochrannými pomůckami. Buněčná linie HeLa byla získána z Americké banky buněčných linií (ATCC, USA).

4.1.2 *Chemikálie a reagensie*

- DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium (Lonza, Belgie)
- FBS, fetální bovinní sérum teplem inaktivované (Sigma-Aldrich, Německo)
- P/S, Penicilin/Streptomycin 100× (Lonza)
- HEPES pufr 1M (Lonza)
- Ultraglutamin I (Lonza)
- PBS, fosfátový pufr tablety (MP Biomedicals, USA a Sigma)
- Trypsin/EDTA 10× (Lonza)
- Trypanová modř 0,4 % (Sigma-Aldrich)
- NR, neutrální červeň (Sigma-Aldrich)
- Chlorid vápenatý (Penta, Česká republika)
- Formaldehyd (Penta)
- Ledová kyselina octová p.a. ≥ 99,9 % (Penta)

- Ethanol $\geq 99,9$ % (Penta)
- Peroxid vodíku 3 % (Sigma-Aldrich)
- CO₂-independentní medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- Kit RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega, USA)
 - Annexin V-SmBiT činidlo (1 000×)
 - CaCl₂ (1 000×)
 - Annexin V-LgBiT činidlo (1 000×)
 - Annexin V NanoBiT® substrát (1 000×)
 - Detekční činidlo pro nekrozu (1 000×)
- Digitonin (Millipore, USA)
- Bortesomib (Millipore)
- FasL (Sigma-Aldrich)
- TRAIL (Sigma-Aldrich)
- Human Topoisomerase II Decatenation Assay Kit (Inspiralis, Velká Británie)
 - Human Topo II assay pufr (50 mM Tris.HCl pH=7,5; 125 nM NaCl; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 100 µg/ml albumin) 10×
 - Zředovací pufr (50 mM Tris.HCl pH=7,5; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 50 % v/v glycerol; 50 µg/ml albumin)
 - ATP (30mM)
 - Lidská topoisomerasa II
- kDNA (100 ng/µL; izolovaná z *Crithidia fasciculata* dr. Jirkovskou na KBV, FaF UK)
- Sacharosa (Penta)
- Tris.HCl (Penta)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich)
- DMSO, dimethylsulfoxid $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich)
- Ultradestilovaná voda (MQ, přístroj Milli-Q RG, Merck Millipore, USA)
- SYBR safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Agarosa (The Carl Roth GmbH, Německo)
- Chloroform (Penta)
- N-amyalkohol (Penta)

4.1.3 *Experimentální látky*

Experimenty se týkaly akridinových derivátů syntetizovaných skupinou prof. Zimčička z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy.

Struktury studovaných látek jsou vyobrazeny na Obr. 12. Látky jsou označeny následujícími pracovními názvy: FK-8-HCl, FK-20-HCl, FK-27-HCl, FK-36-HCl, FK-42-HCl, FK-46-HCl a FK-48. Na tyto látky byla podána patentová přihláška (PV 2020-154). Dále jsme studovali ještě látky FK-78-HCl, FK-97-HCl a FK-106. Struktury těchto látek zde neuvádíme, a to z důvodu připravované patentové přihlášky.

Zkoumané deriváty se vyznačují přítomností 9-aminoakridinového jádra. Aminoskupina v poloze 9 je dále substituována 6-azidohexylovým řetězcem. V poloze 4 9-aminoakridinového jádra je charakteristická karboxamidová skupina, na kterou je navázána dvou až tří-uhlíkatým spojovacím řetězcem bazická skupina. Tou je nejčastěji terciární alifatický amin nebo dusík nasyceného heterocyklu. Výjimku tvoří akridin FK-20-HCl, v jehož struktuře najdeme bazickou funkci zastoupenou guanidinem a dále akridin FK-27-HCl s absencí celé karboxamidové skupiny.

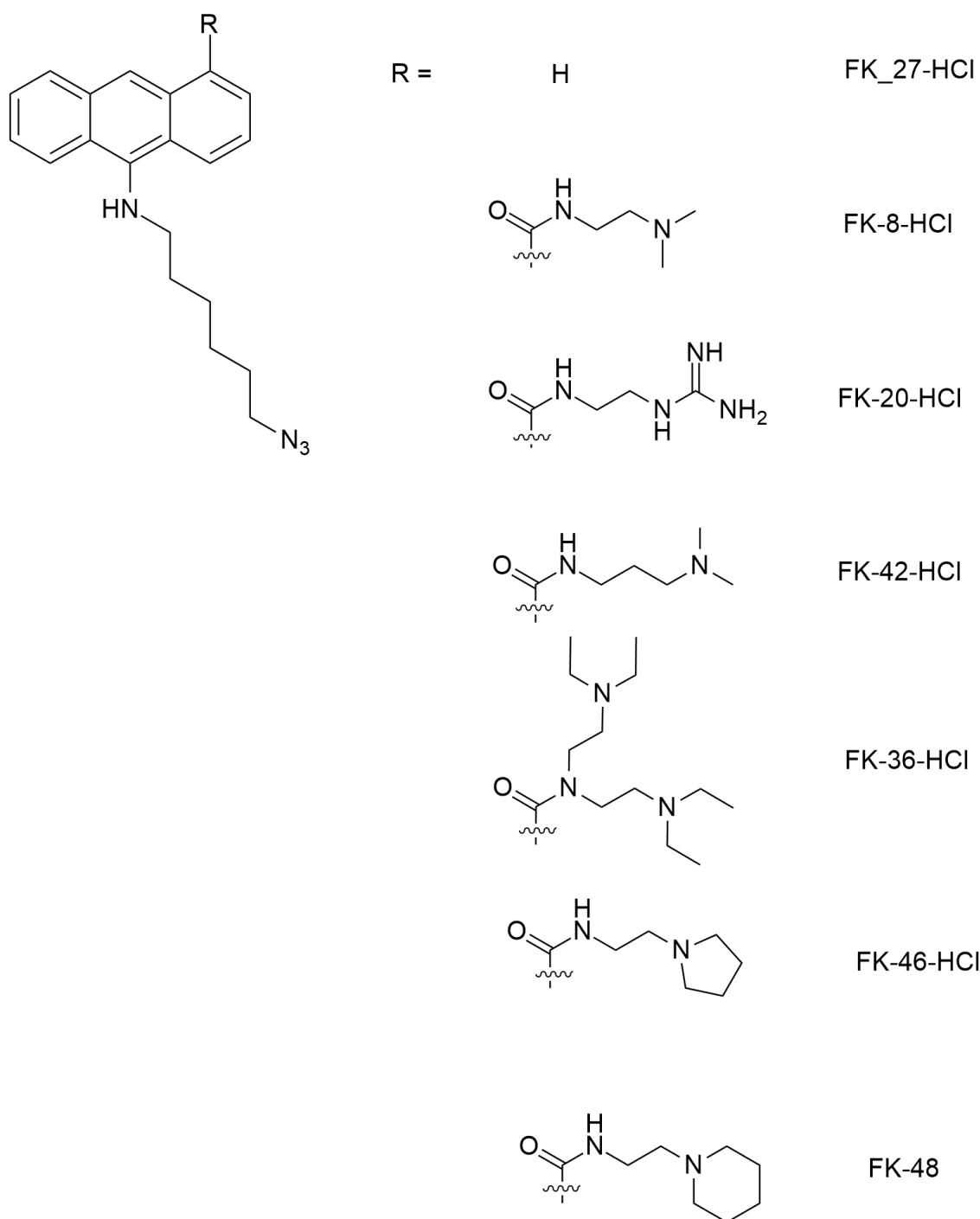
Zbylé tři zkoumané látky FK-78-HCl, FK-97-HCl a FK-106 je možné popsat jen velmi stručně, a to jako různě substituované akridinové deriváty.

Zásobní roztoky byly připraveny o koncentracích a za pomoci rozpouštědel uvedených v Tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled zásobních roztoků studovaných látek

Označení akridinu	Molární hmotnost (kg.mol ⁻¹)	Koncentrace zásobního roztoku (mM)	Rozpouštědlo
FK-8-HCl	506,47	5	H ₂ O (ultračistá)
FK-20-HCl	520,46	5	H ₂ O (ultračistá)
FK-27-HCl	355,87	10	DMSO
FK-36-HCl	670,17	5	SCM
FK-42-HCl	520,50	5	H ₂ O (ultračistá)
FK-46-HCl	532,51	5	H ₂ O (ultračistá)
FK-48	546,54	20	DMSO
FK-78-HCl	Neuvedeno	10	DMSO*
FK-97-HCl	Neuvedeno	20	DMSO
FK-106	Neuvedeno	20	DMSO

* zásobní roztok ve formě suspenze – látku nebylo možné v dané koncentraci zcela rozpustit



Obr. 12 Obměny chemické struktury některých studovaných 9-aminoakridinů

4.1.4 *Přístrojové vybavení*

- Box s laminárním prouděním BioAir TopSafe 1.2 (BioAir, Itálie)
- Vodní lázeň (Memmert, Německo)
- Buněčný CO₂ inkubátor (ESCO, Singapur)
- Invertovaný mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- Čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd. Švýcarsko)
- Čtečka mikrotitračních destiček Tecan SPARK (Tecan Group Ltd.)
- Laboratorní třepačka Biosan Vortex V-1 plus (Biosan, Litva)
- Desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instrumentals, Německo)
- Pipetovací nástavce Biohit Midi Plus (Biohit, Finsko)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Elektronická multikanálová pipeta Picus (Biohit, Finsko)
- Multikanálová pipeta, 8-kanálová a 12-kanálová (Eppendorf, Německo)
- Elektroforéza EasyCast (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- Thermomixer (Eppendorf, Německo)
- ChemiDoc (Biorad, USA)
- Analytické váhy (Boeco Germany)
- Třepací inkubátor (N-Biotek, Korejská republika)

4.1.5 *Laboratorní materiál*

- Kultivační lahev sterilní T75 (TPP, Švýcarsko)
- Mikrotitrační destičky 96-jamkové (TPP)
- Bílé sterilní 96-jamkové destičky s průhledným dnem (Corning, USA)
- Plastové sterilní mikrozkušavky 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Německo)
- Sterilní pipety serologické 10 ml (TPP)
- Sterilní špičky (Eppendorf)
- Bürkerova komůrka (Assistent, Německo)
- Pasteurova pipeta sterilní (Brand, Německo)
- Sterilní laboratorní sklo (Simax, Česká republika)
- Sterilní plastové vaničky (Eppendorf)
- Protein LoBind zkumavka (Eppendorf)
- Nízkoretenční pipetovací špičky (Eppendorf)

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 *Kultivace buněk in vitro*

Ke kultivaci HeLa buněčné linie jsme použili medium DMEM doplněné o FBS, P/S, HEPES pufr a L-glutamin, jejichž finální koncentrace v kultivačním médiu je uvedena v Tabulce 2. Kromě posledních dvou zmíněných bylo nutné všechny látky před smísením předehřát ve vodní lázni na 37 °C. Příprava konečného media i následná manipulace s buňkami probíhaly v laminárním boxu. Buňky byly kultivovány ve sterilních kultivačních lahvích v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, v atmosféře s 5 % CO₂ a při zachování konstantní vlhkosti).

Tabulka 2 Složení kultivačního média.

Látky doplňující DMEM	Koncentrace látek ve výsledném médiu
FBS	10 obj. %
P/S	1 obj. %
HEPES pufr	10 mM
L-glutamin	4 mM

4.2.2 *Pasážování*

Pasážování buněk bylo prováděno přibližně po 3 až 4 dnech. Nejprve jsme zkontrolovali buňky pod mikroskopem, abychom zjistili, zda nedošlo ke kontaminaci buněk a zda buňky dorostly do požadované 80-90% konfluence. Za sterilních podmínek, v laminárním boxu, jsme z kultivační láhve odsáli pipetou staré medium. Buňky přichycené na adherentní straně láhve byly dvakrát opláchnuty 5 ml předehřátého PBS, a poté na ně byl rozprostřen 1 ml předehřátého roztoku trypsinu-EDTA. Láhev jsme uzavřeli a uložili do inkubátoru max. na 5 min. Pod mikroskopem jsme kontrolovali, jestli jsou buňky uvolněny ode dna nádoby. Trypsinizaci jsme zastavili přidáním 9 ml předehřátého kultivačního média. Pro vznik homogenní suspenze buněk bylo třeba obsah láhve několikrát nasát a vypustit kolmo o dno nádoby. Část suspenze (dle poslední pasáže a míry konfluence) byla pipetována do nové sterilní kultivační láhve obsahující 15 ml předehřátého media a vložena do inkubátoru na další 3-4 dny. Zbytek suspenze byl využit ke stanovení počtu živých buněk a k experimentům na stanovení cytotoxicity látek.

4.2.3 *Počítání buněk*

Stanovení počtu živých buněk probíhalo za využití Bürkerovy komůrky. Z kultivační lahve s rovnoměrnou suspenzí buněk bylo do mikrozkušavky odpipetováno 100 μ l, ke kterým jsme následně přidali 100 μ l trypanové modři (0,4% roztok) a důkladně promíchali. Trypanová modř difunduje do buněk, přičemž živé buňky ji aktivně vylučují ven na rozdíl od mrtvých buněk, které zůstávají obarvené (Strober, 2001). Na každou stranu Bürkerovy komůrky jsme pipetovali 10 μ l suspenze a pod mikroskopem jsme spočítali počet buněk, abychom získali počet buněk v 1 ml suspenze. Výsledek byl použit pro výpočet potřebného množství buněk na experimenty.

4.2.4 *Nasazení buněk na experimenty*

Buněčnou suspenzi bylo třeba naředit předehřátým (37 °C) médiem na koncentraci 100 000 buněk/ml a důkladně ve sterilní vaničce promíchat. Pro experimenty na stanovení cytotoxicity byly použity sterilní 96-jamkové mikrotitrační destičky. Do každé z jamek bylo multikanálovou pipetou pipetováno 100 μ l naředěné suspenze tak, aby každá jamka obsahovala přibližně 10 000 buněk. Destičky jsme následně umístili do inkubátoru na 24 hodin. Celý postup byl proveden v laminárním boxu za sterilních podmínek.

4.2.5 *Přidání experimentálních látek*

Po inkubaci jsme na destičce vyznačili část jamek, do kterých budeme přidávat studované látky v širokém koncentračním rozpětí. Další část destičky byla určena pro neovlivněné kontroly, tzn. pro živé buňky bez přidané studované látky a poslední sloupec byl vyčleněn pro stanovení pozadí (peroxid vodíku v letální dávce). Neovlivněným kontrolám bylo vyměněno médium za nové předehřáté kultivační médium. Zásobní roztoky akridinových barviv jsme naředili médiem dle rozpisu na finální koncentrace. Z jamek jsme odsáli staré médium, nahradili ho naředěnými roztoky studovaných látek v množství 100 μ l a destičku následně umístili do inkubátoru na 24 hodin.

Veškerá práce s akridinovými barvivy probíhala v laminárním boxu za tmy, jelikož jsou akridiny obecně považovány za látky citlivé na světlo (Albert, 1949).

4.2.6 *Test vychytávání neutrální červeně*

Po 24 hodinách jsme si do vaničky připravili pracovní roztok ze zásobního roztoku neutrální červeně (NR) a předeřátého DMEM. Pomocí multikanálové pipety jsme přidali 100 μ l pracovního roztoku NR do každé jamky (jeho výsledná koncentrace v jamce byla 30 μ g/ml). Destičku s buňkami jsme nechali inkubovat při 37 °C 3-4 hodiny. Poté jsme vyměnili médium s NR za 100 μ l fixačního roztoku (1 % CaCl₂ v 0,5% formaldehydu) a nechali 15 minut inkubovat (laboratorní teplota). Následně jsme odstranili fixační roztok a přidali 100 μ l PBS, abychom z jamek odstranili zbytek fixačního roztoku, opakovali jsme dvakrát. Po odstranění PBS jsme pipetovali 100 μ l lyzačního roztoku (1 % ledové kyseliny octové v 50% ethanolu) a nechali buňky lyzovat po dobu 30 minut na deskové třepačce.

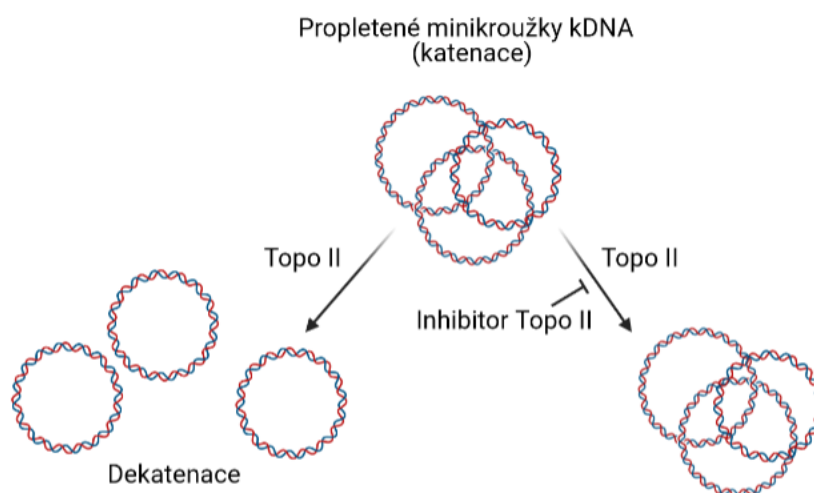
Pokus byl vyhodnocen na multifunkční čtečce mikrotitračních destiček TECAN Infinite 200M při vlnové délce 540 nm. V MS Excel jsme od naměřených hodnot absorbance odečetli průměrnou hodnotu sloupce pro odečtení pozadí (letální dávka peroxidu vodíku) a z výsledných hodnot jsme vyjádřili životaschopnost buněk jako procenta neovlivněné kontroly (100% životaschopnost). Grafy byly vytvořené v programu GraphPad Prism (GraphPad Software, USA), ve kterém byly také stanoveny hodnoty IC₅₀ a statistická významnost (metodou ANOVA s Bonferroniho *post hoc* korekcí analýzy).

Stanovení životaschopnosti buněk pomocí testu vychytávání neutrální červeně (NRU) je jednou z nejběžnějších metod k zjištění cytotoxicity látek. NR je barvivo, které vstupuje do živých buněk a je koncentrováno v lyzosomech, v nichž je pH oproti cytosolu kyselejší a NR je zde protonizována. Když v buňce probíhá buněčná smrt, integrita lyzozomu je narušena a nemůže dále zadržovat NR. Množství zadrženého barviva je tedy úměrné počtu živých buněk (Repetto et al. 2008).

4.2.7 *Test dekatence kDNA s využitím elektroforézy*

Z dostupné literatury víme, že většina akridinových derivátů působí inhibiči topoisomeras. Princip metody s využitím elektroforézy spočívá ve schopnosti lidské TOP2 způsobit dekatenci propletených dvouřetězcových DNA molekul. Pro experiment byla využita kinetoplastová DNA (kDNA – izolovaná dr. Jirkovskou z *Crithidia fasciculata* dle Shapiro et al. 1999) skládající se ze sítě minikroužků a maxikroužků.

Na Obr. 13 je znázorněno zjednodušené schéma působení TOP 2 na propletené minikroužky kDNA, inhibice TOP2 a jejich důsledky. Enzym způsobí, že se minikroužky uvolní a během elektroforézy jsou unášeny skrze póry gelu. Pokud je enzym inhibován, například akridinovým barvivem, minikroužky se neuvolní a zůstávají v propleteném stavu.



Obr. 13 Schéma vlivu TOP2 a jejich inhibitorů na dekatenci kDNA

Všechny vzorky zkoušených látek jsme naředili na koncentraci 100 μM , což je nejvyšší dosažitelná koncentrace vzhledem k rozpustnosti studovaných látek. Při ředění bylo ke vzorkům přidáno DMSO. Kvůli jeho potenciálu inhibovat TOP2 byla jeho finální koncentrace v reakci 1 %. Důvodem přidání DMSO bylo sjednocení reakčních podmínek všech vzorků včetně pozitivní a negativní kontroly.

Dále jsme připravili 1% agarosový gel, a to zahřátím 0,5 g agarosy v 50 ml TAE (Tris, kyselina octová, EDTA) v mikrovlnné troubě do rozpuštění pevných částic. Po ochlazení gelu na přibližně 60 $^{\circ}\text{C}$ jsme jím vyplnili ohraničenou část vaničky se vsazenými hřebínky o tloušťce 1,0 mm. Jakmile gel ztuhl, vyndali jsme hřebínky a vaničku naplnili pufrem (TAE) s hladinou těsně zakrývající jamky.

Na jeden vzorek bylo třeba připravit 24 μl tzv. MIXu skládajícího se z 3 μl Human Topo II assay buffer (složení uvedeno v podkapitole o reagentech), 18 μl MQ vody, 2 μl kDNA (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$) a 1 μl ATP (30 mM). Přičemž všechny položky je nutné uchovávat na ledu. ATP pipetujeme jako poslední, těsně před vložením studovaných látek a enzymu.

Aktivita enzymu závisí na teplotě, při čemž nejvyšší by měla být v teplotním optimu okolo 37 °C. Proto jsme enzym po celou dobu pokusu uchovávali na suchém ledu a pracovali s ním rychle. Enzym jsme naředili zřed'ovacím pufrem (složení uvedeno v podkapitole o reagentiích) v poměru 1:150 v Protein LoBind zkumavce pro maximální výtěžnost vzorku.

Do každé z 12 zkumavek jsme pipetovali nejprve hotový MIX spolu se studovanou látkou o koncentraci 100 µM. Do zkumavek označených jako pozitivní a negativní kontrola jsme místo účinné látky pipetovali 10 % DMSO ve vodě. Enzym jsme kromě pozitivní kontroly pipetovali do všech zkumavek, a to s opatrností na stranu zkumavky, aby nedošlo k předčasnému zahájení reakce. Přesné složení jednotlivých vzorků shrnuje Tabulka 3.

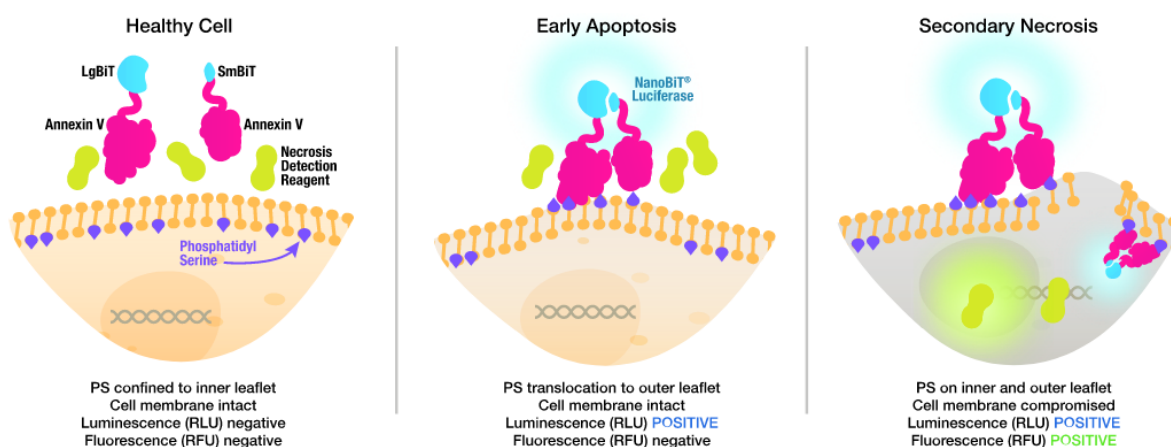
Tabulka 3 Finální složení vzorků studovaných látek pro test dekatence kDNA

Vzorek	(-)	(+)	FK - 27	FK - 97	FK - 78	FK - 48	FK - 106	FK - 8	FK - 20	FK - 42	FK - 36	FK - 46
MIX (µl)	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Stud. látka (µl)			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
DMSO (µl)	3	3										
Diluční pufr (µl)		3										
Enzym (µl)	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Reakce byla spuštěna smísením enzymu s MIXem a akridinovými barvivy. Proces smísení a vložení vzorků do předehřátého thermomixéru (37 °C) probíhal v 20 s intervalech. Po 30 min byla opět přesně v 20 s intervalech zastavována reakce přidáním 30 µl STEB (40 % w/v sacharosa, 100 mM Tris.HCl pH=8, 1 mM EDTA, 0,5 mg/ml bromfenolová modř) a protřepáním. Pro odstranění rušivého náboje akridinů jsme vytřepali vzorky do směsi chloroformu a n-amylalkoholu v poměru 24:1 a centrifugovali 2 min při 2000 rpm. Do jamek v agarosovém gelu jsme pipetovali z každého vzorku 8 µl vrchní vodné fáze. Poté byla spuštěna elektroforéza při konstantním napětí 9 V/cm. Po přibližně 60 min jsme elektroforézu ukončili a gel barvili roztokem tvořeným 5µl SYBR Safe ve 100 ml MQ vody po dobu 15 minut. Po celou dobu byl gel chráněn před světlem. Pomocí přístroje ChemiDoc MP (BioRad) byla získána obrazová dokumentace.

4.2.8 *Detekce buněčné smrti pomocí annexinu V*

Metoda je zaměřena na živé buňky a určena k vyhodnocení buněčné smrti v čase. Detekční činidlo se skládá ze dvou fúzních proteinů (Annexin V LgBiT a Annexin V SnBiT), které obsahují komplementární podjednotky NanoBiT[®]-Luciferasy. Reagent obsahuje rovněž substrát pro luciferasu, vápenaté ionty (Ca²⁺-dependentní vazba annexin V-fosfatidylserin) a činidlo pro detekci nekrózy. Princip reakce s použitím detekční směsi je znázorněn na Obr. 14.



Obr. 14 Princip bioluminiscenční metody s využitím annexinu V po vystavení induktoru apoptózy (Doyle, 2017)

V živých buňkách, kdy se molekuly fosfatidylserinu nacházejí pouze na vnitřní straně buněčné membrány, nedochází ke komplementárnímu spojení podjednotek annexinu V na základě vazby s fosfatidylserinem, a tudíž nedochází ani k uvolnění luminiscenčního signálu. Při apoptóze není sice ještě buněčná membrána narušena, ale k translokaci fosfatidylserinu na povrch buňky dochází. Podjednotky annexinu V se vážou na fosfatidylserin a umožňují tvorbu luminiscenčního signálu. Nekróza je charakteristická poškozením buněčné membrány, činidlo detekující nekrózu proniká do buňky a interakcí s DNA vyvolá fluorescenční signál. Pomocí výsledků měřených signálů luminiscence a fluorescence můžeme stanovit pravděpodobný mechanismus buněčné smrti po vystavení cytotoxické látky. V případě, že jde o apoptózu, nárůst fluorescenčního signálu (sekundární nekróza) je opožděný oproti nárůstu luminiscenčního signálu. U primární nekrózy dochází k nárůstu obou signálů zároveň (Doyle, 2017).

Pro experimenty týkající se stanovení typu buněčné smrti jsme použili CO₂-independentní medium s přídavkem FBS, ultraglutaminu a P/S. CO₂-independentní medium umožní kultivaci a přežití buněk v zařízeních, které disponují zajištěním konstantní teploty 37 °C, nikoliv však CO₂.

Pasážování HeLa buněčné linie probíhalo obdobně jako při stanovení cytotoxicity, pouze s tím rozdílem, že se kultivační lahev se suspenzí buněk ukládala ke kultivaci do třepacího inkubátoru (37 °C, bez regulace CO₂, bez třepání). Buňky bylo nutné na CO₂-independentní medium adaptovat. Množství CO₂-independentního média se při pasážování postupně vůči DMEM navyšovalo, a to v poměrech 1:1, 3:1 a nakonec jsme provedli pasáž buněk pouze v CO₂-independentním mediu.

Buňky jsme tentokrát nasadili na sterilní bílou 96-jamkovou destičku s průhledným dnem (Corning) speciálně určenou pro současné měření fluorescence a luminiscence (neprůhledné stěny jamek eliminují nežádoucí přenos signálu mezi jamkami). Do každé jamky, s výjimkou jednoho sloupce, bylo pipetováno 100 µl suspenze buněk v předehřátém CO₂-independentním mediu (100 000 buněk/ml), v každé jamce tedy bylo 10 000 buněk. Destičku s buňkami jsme inkubovali při 37 °C v třepacím inkubátoru 24 hodin bez regulace CO₂ a bez třepání.

Pracovní roztoky zkoušených akridinů jsme připravili naředěním CO₂-independentním médiem (37 °C) na koncentraci odpovídající jejich IC₈₅. Připravili jsme detekční směs (2×) v dostatečném množství z předehřátého CO₂-independentního média, Annexin V NanoBit[®]-Substrate (1000×), CaCl₂ (1000×), Necrosis Detection Reagent (1000×), Annexin V-SmBiT (1000×) a Annexin V-LgBiT (1000×). Připravili jsme pracovní roztoky pozitivních kontrol – látky indukující apoptózu či nekrózu. Jako pozitivní kontrola pro nekrózu byl použit digitonin (10 µg/ml), jako kontrola pro vnitřní cestu apoptózy byl použit bortezomib (5 µM) a vnější cestu apoptózy TRAIL (400 ng/ml).

Na prázdnou 96-jamkovou destičku (TPP) jsme vyznačili oblast pro studované akridiny (každý v triplikátu), pozitivní kontroly pro detekci apoptózy a nekrózy (každá v triplikátu) a oblasti kontrol bez látek a kontrol bez látek a buněk (odpovídá sloupečku bez nasazených buněk na bílé destičce s buňkami). Do každé jamky jsme dle rozpisu pipetovali 150 µl pracovních roztoků nebo čistého CO₂-independentního media. Medium v bílé destičce jsme vyměnili za 100 µl pracovního roztoku nebo media z 96-jamkové destičky s předpřipravenými roztoky a následně k nim rychle přidali 100 µl detekční směsi multikanálovou pipetou, aby reakce začala ve všech jamkách ve stejnou dobu. Destičku jsme třepali 30 s na deskové třepače a následně nechali měřit luminiscenci

a fluorescenci v předeřtém přístroji při excitační vlnové délce 485 ± 20 nm a emisní vlnové délce 530 ± 20 nm pro fluorescenci po dobu 24 hodin.

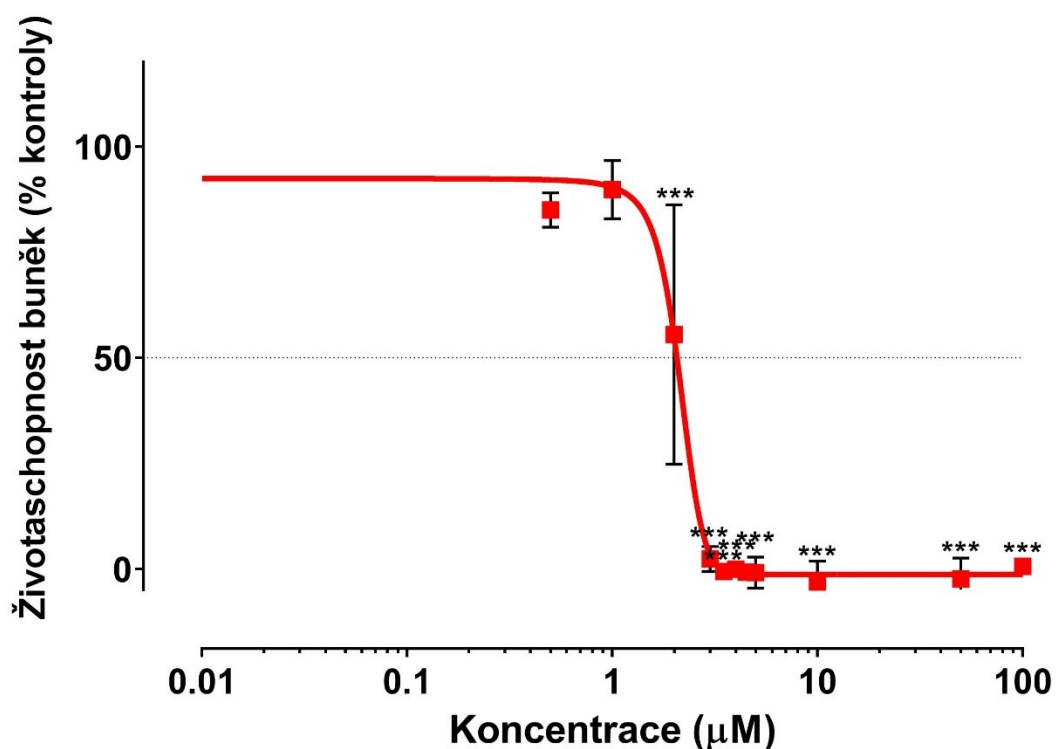
Průměrná hodnota luminiscence/fluorescence ze sloupečku bez buněk byla použita k odečtení pozadí (přirozená změna signálů v čase). Následně jsme vypočítali průměrné hodnoty pro každou studovanou látku a korigovali je příslušnou neovlivněnou kontrolou pro daný časový bod. Z výsledných hodnot byly vytvořeny grafy závislosti intenzity signálů na době expozice v programu GraphPad Prism.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení cytotoxicity experimentálních látek

5.1.1 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-8-HCl

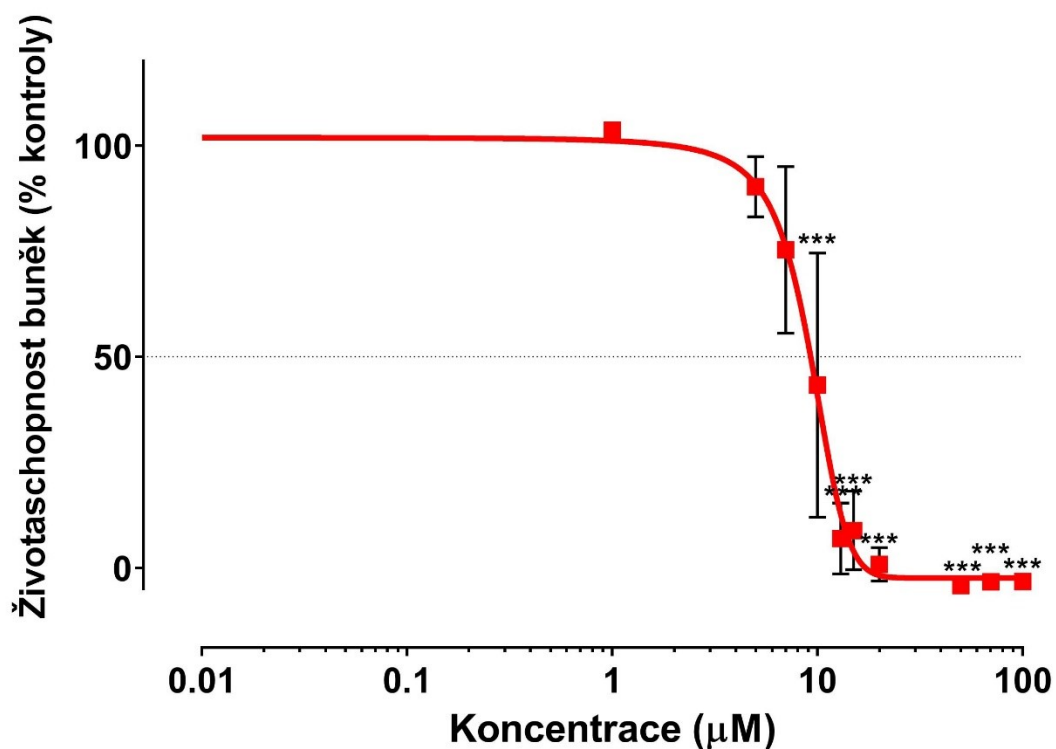
Experimenty byly vyhodnoceny pomocí NRU na buněčné linii HeLa. Buňky byly vystaveny po dobu 24 hodin působení akridinového derivátu s označením FK-8-HCl. Látky byly studovány v širokém rozsahu koncentrací od 0,5 do 100 μM ke stanovení hodnoty IC_{50} . Proliferace buněk byla statisticky významně snížena od koncentrace 2 μM . Hodnota IC_{50} , při které došlo k poklesu životaschopnosti buněk na 50 % oproti neovlivněné kontrole (100 %), byla $2,03 \pm 0,43 \mu\text{M}$. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 15).



Obr. 15 Graf závislosti životaschopnosti HeLa buněk na koncentraci FK-8-HCl po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=5$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ a *** $p<0.001$ (ANOVA).

5.1.2 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-20-HCl

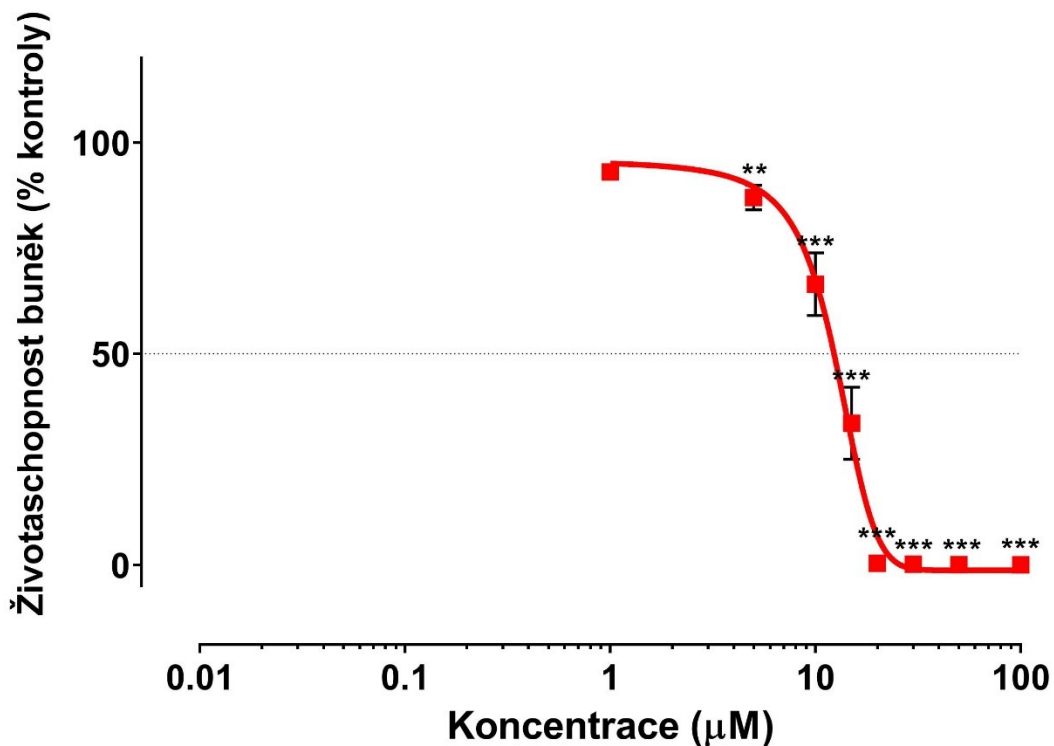
Cytotoxicita akridinového derivátu s označením FK-20-HCl byla vyhodnocena pomocí NRU na buněčné linii HeLa. Buňky byly vystaveny studované látce po dobu 24 h v koncentracích od 1 do 100 μ M. Proliferace buněk byla statisticky významně snížena od koncentrace 10 μ M. Hodnota IC_{50} studované látky byla $9,68 \pm 2,23$ μ M. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 16).



Obr. 16 Graf závislosti životaschopnosti HeLa buněk na koncentraci FK-20-HCl po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=5$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ a *** $p<0.001$ (ANOVA).

5.1.3 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-27-HCl

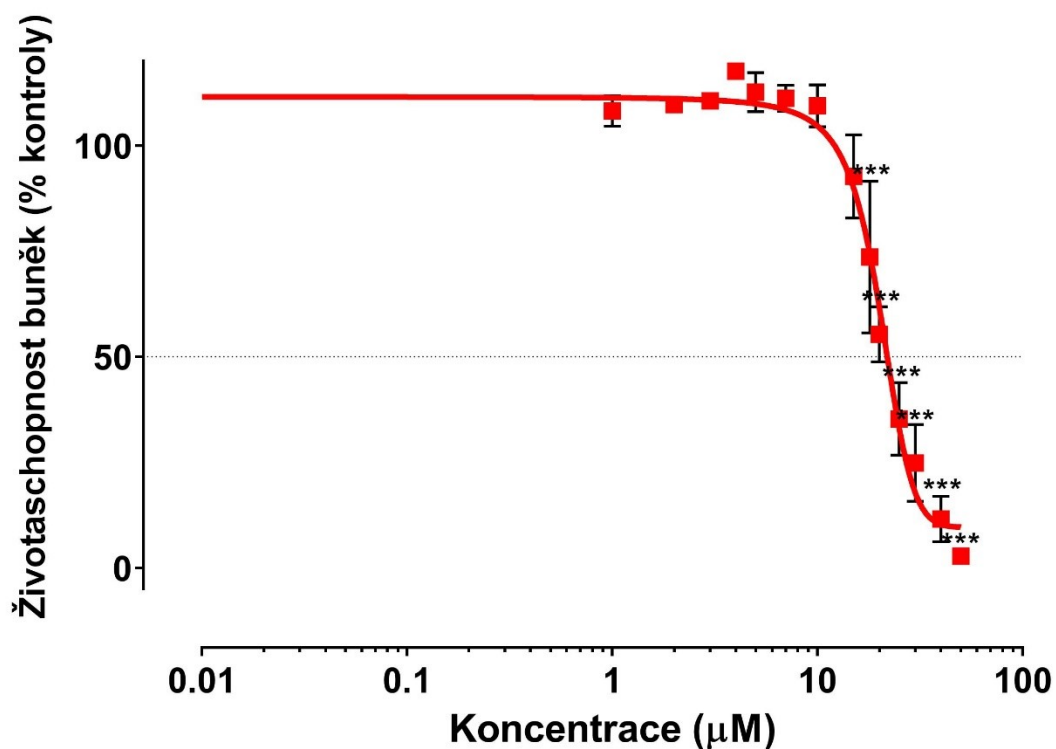
Cytotoxicita akridinového derivátu s označením FK-27-HCl byla rovněž vyhodnocena pomocí NRU na buněčné linii HeLa. Buňky byly vystaveny studované látce po dobu 24 h v koncentračním rozpětí od 1 do 100 μ M. Životaschopnost buněk byla statisticky významně snížena od koncentrace 5 μ M. Hodnota IC_{50} studovaného derivátu byla $12,73 \pm 1,29 \mu$ M. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 17).



Obr. 17 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci FK-27-HCl po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=3$, $*p<0.05$, $**p<0.01$ a $***p<0.001$ (ANOVA).

5.1.4 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-36-HCl

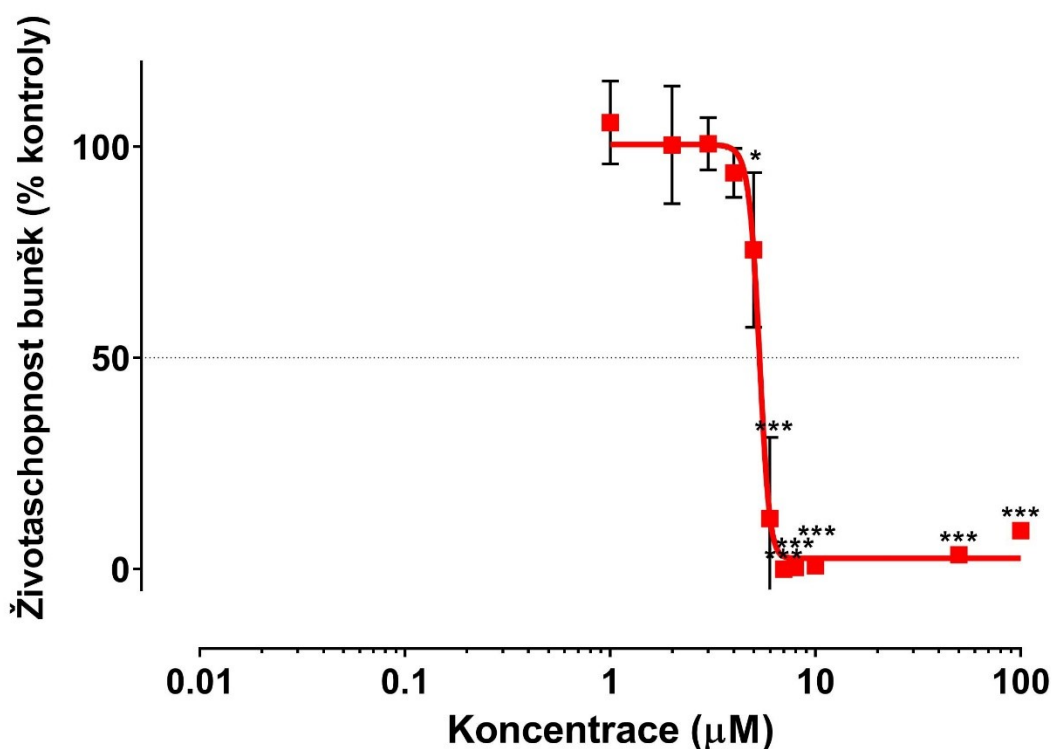
Cytotoxicita akridinového derivátu s označením FK-36-HCl byla vyhodnocena pomocí NRU s využitím buněčné linie HeLa. Buňky byly vystaveny studované látce po dobu 24 h v koncentraci od 1 do 100 μ M. Životaschopnost buněk byla statisticky významně snížena od koncentrace 18 μ M. Hodnota IC_{50} studovaného akridinového derivátu byla $20,49 \pm 1,58 \mu$ M. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 18).



Obr. 18 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci FK36-HCl po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=4$, $*p<0.05$, $**p<0.01$ a $***p<0.001$ (ANOVA).

5.1.5 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-42-HCl

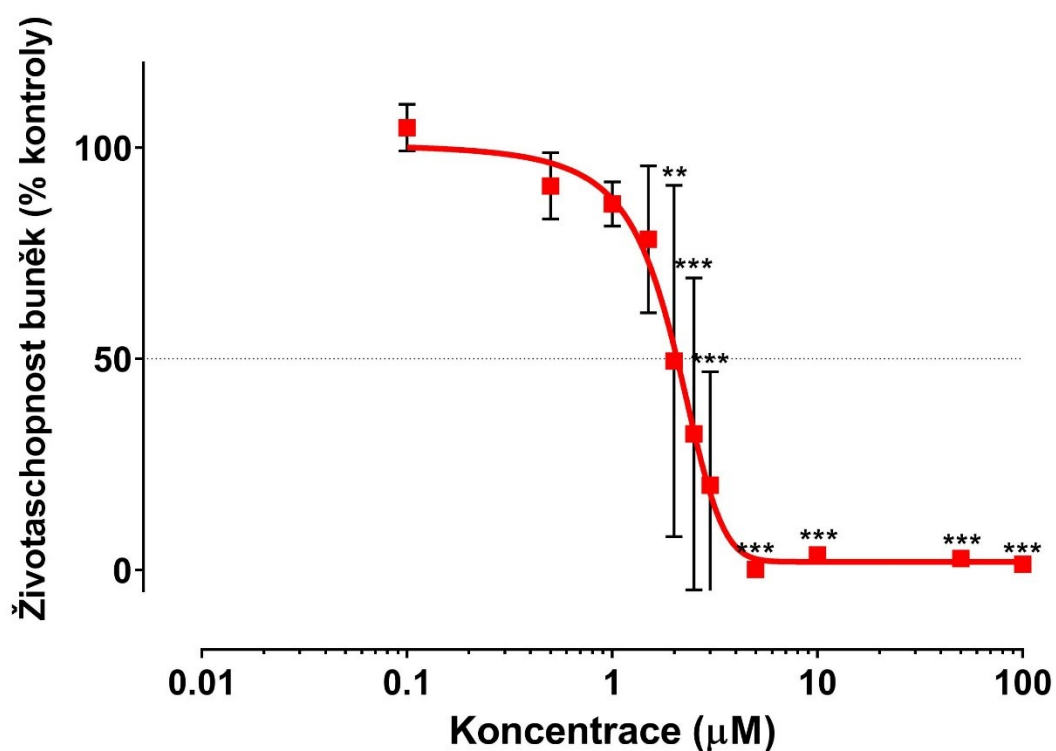
Cytotoxicita akridinového derivátu s označením FK42-HCl byla vyhodnocena pomocí NRU s využitím buněčné linie HeLa. Buňky byly vystaveny studované látce po dobu 24 h v koncentrační řadě od 1 do 100 μ M. Životaschopnost buněk byla statisticky významně snížena od koncentrace 5 μ M. Hodnota IC_{50} studovaného akridinového derivátu byla $5,39 \pm 0,36 \mu$ M. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 19).



Obr. 19 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci FK-42-HCl po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=5$, $*p<0.05$, $**p<0.01$ a $***p<0.001$ (ANOVA).

5.1.6 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-46-HCl

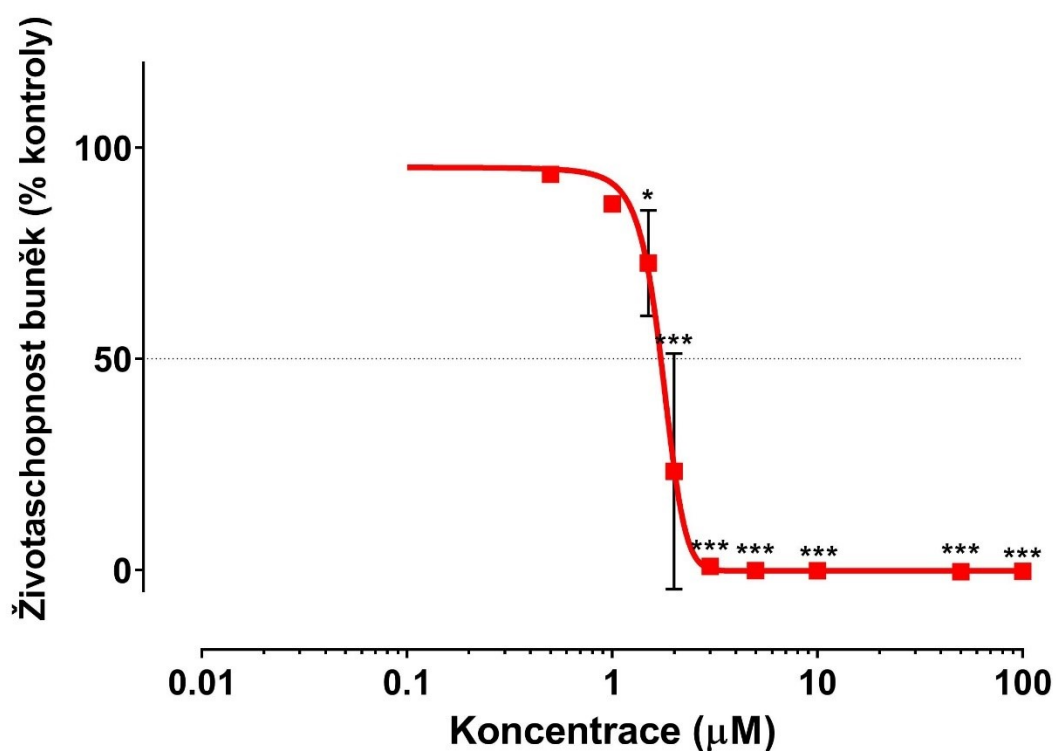
Cytotoxicita akridinového derivátu s označením FK-46-HCl byla vyhodnocena pomocí NRU s využitím buněčné linie HeLa. Buňky byly vystaveny studované látce po dobu 24 h v koncentracích od 0,1 do 100 μ M. Životaschopnost buněk byla statisticky významně snížena od koncentrace 2 μ M. Hodnota IC_{50} studovaného derivátu byla $2,26 \pm 0,72$ μ M. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 20).



Obr. 20 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci FK-46-HCl po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=8$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ a *** $p<0.001$ (ANOVA).

5.1.7 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-48

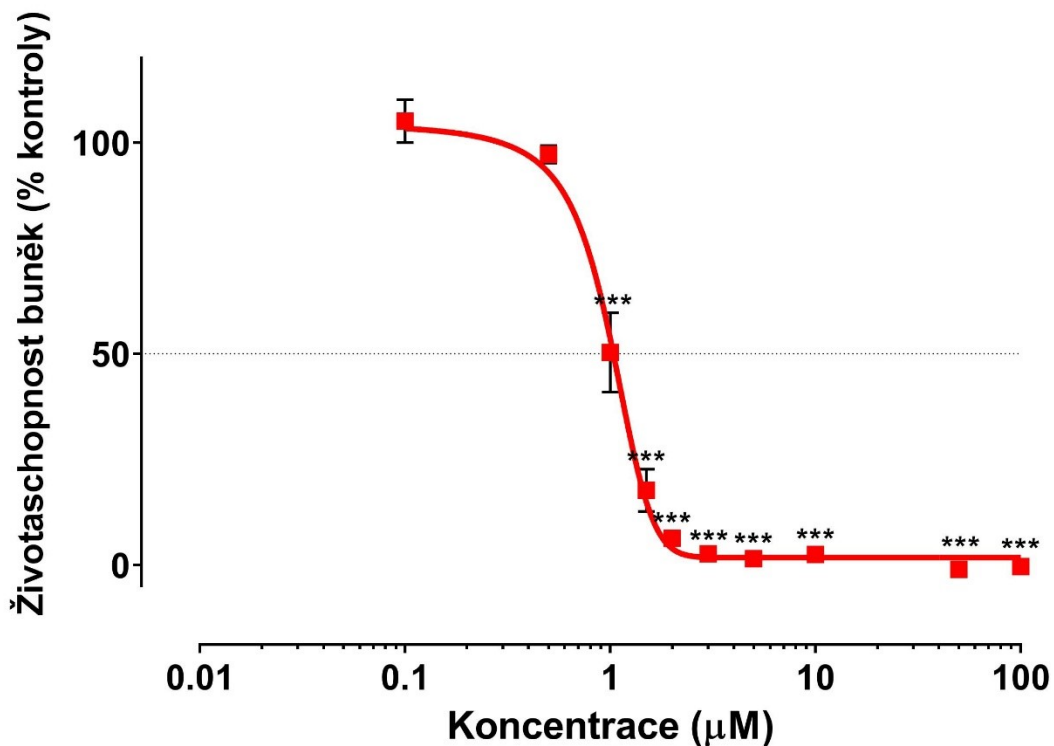
Cytotoxicita akridinového derivátu s označením FK-48 byla vyhodnocena pomocí NRU s využitím buněčné linie HeLa. Buňky byly vystaveny stuované látce po dobu 24 h v koncentracích od 0,5 do 100 μM . Životaschopnost buněk byla statisticky významně snížena od koncentrace 1,5 μM . Hodnota IC_{50} studovaného akridinového derivátu byla $1,69 \pm 0,25 \mu\text{M}$. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 21).



Obr. 21 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci FK-48 po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=3$, $*p<0.05$, $**p<0.01$ a $***p<0.001$ (ANOVA).

5.1.8 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-78-HCl

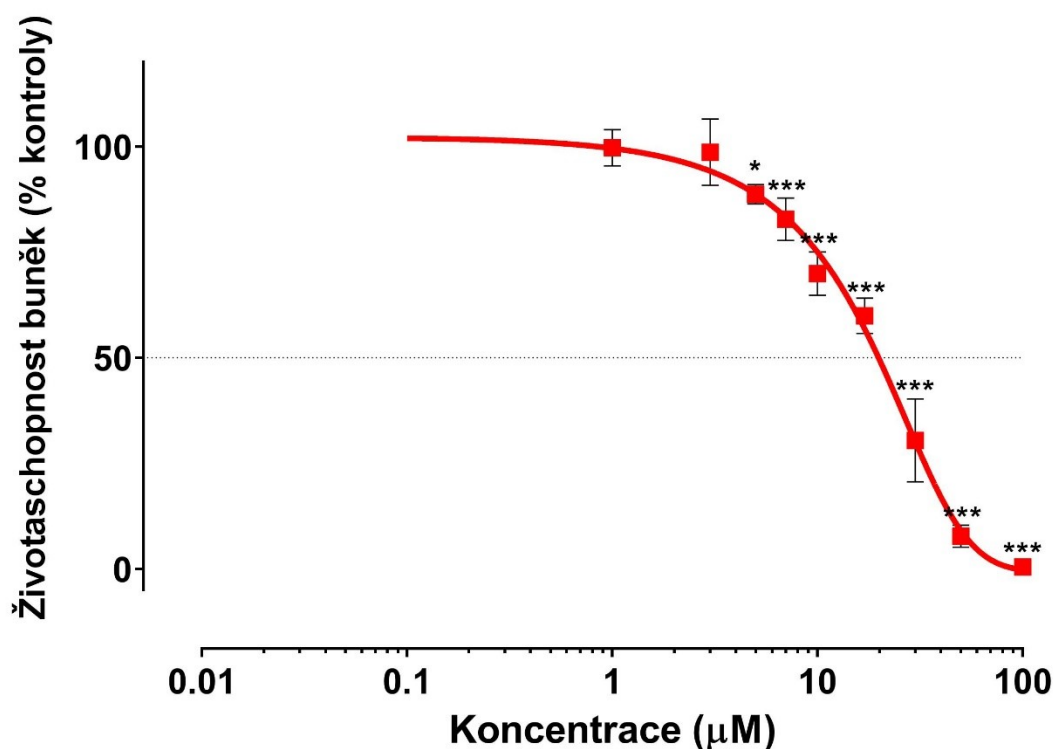
Cytotoxicita akridinového derivátu s označením FK-78-HCl byla vyhodnocena pomocí NRU s využitím buněčné linie HeLa. Buňky byly vystaveny studované látce po dobu 24 h v koncentraci od 0,1 do 100 μ M. Životaschopnost buněk byla statisticky významně snížena od koncentrace 1 μ M. Hodnota IC_{50} studovaného akridinového derivátu byla $1,06 \pm 0,22$ μ M. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 22).



Obr. 22 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci FK-78-HCl po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ a *** $p<0.001$ (ANOVA).

5.1.9 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-97-HCl

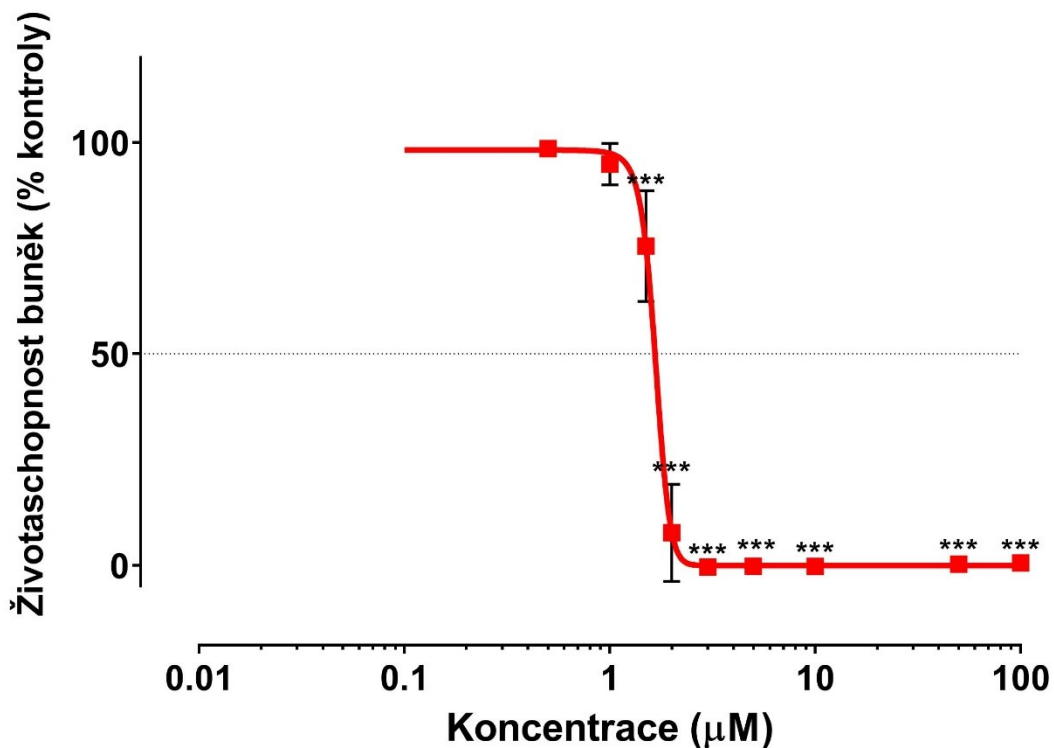
Cytotoxicita akridinového derivátu s označením FK-97-HCl byla vyhodnocena pomocí NRU s využitím buněčné linie HeLa. Buňky byly vystaveny studované látce po dobu 24 h v koncentracích od 1 do 100 μM . Životaschopnost buněk byla snížena statisticky významně od koncentrace 5 μM . Hodnota IC_{50} studovaného akridinového derivátu byla $18,72 \pm 4,61 \mu\text{M}$. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 23).



Obr. 23 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci FK-97-HCl po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=4$, $*p<0.05$, $**p<0.01$ a $***p<0.001$ (ANOVA).

5.1.10 Stanovení hodnoty IC_{50} pro FK-106

Cytotoxicita akridinového derivátu s označením FK-106 byla vyhodnocena pomocí NRU s využitím buněčné linie HeLa. Buňky byly vystaveny studované látce po dobu 24 h v koncentraci od 0,5 do 100 μM . Životaschopnost buněk byla statisticky významně snížena od koncentrace 1,5 μM . Hodnota IC_{50} studovaného akridinového derivátu byla $1,61 \pm 0,16 \mu\text{M}$. Výsledky jsou znázorněny v grafu (Obr. 24).



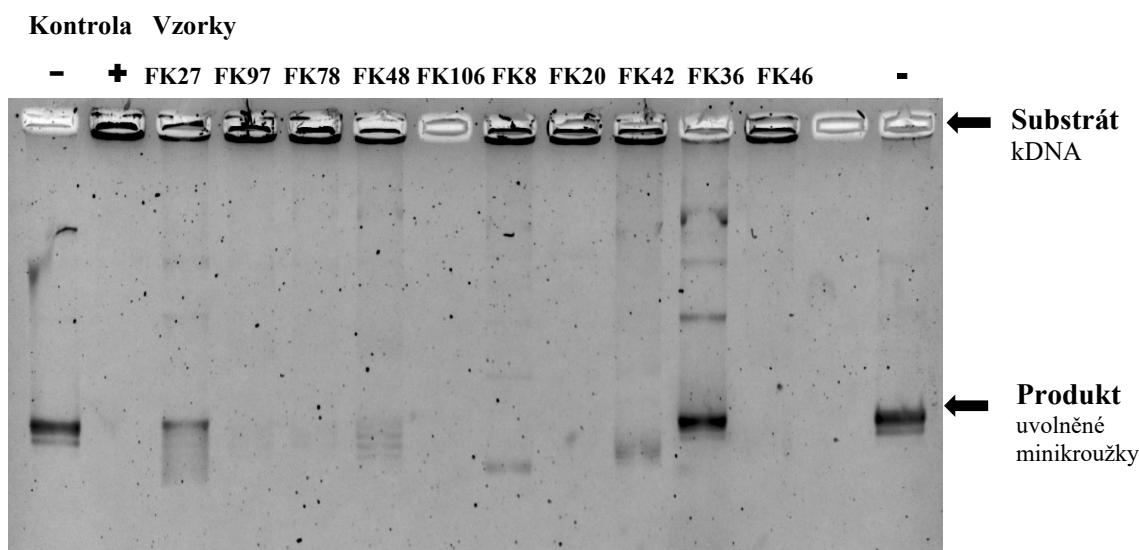
Obr. 24 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci FK-106 po 24 h inkubaci. Vyhodnoceno pomocí testu vychytávání neutrální červeně. Počet opakování $n=3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ a $***p < 0.001$ (ANOVA).

5.2 Elektroforéza

Ke zjištění, zda studované akridinové deriváty inhibují lidskou TOP2 byl použit test dekatence kDNA s lidskou TOP2.

Dle Obr. 25 jsou v první a poslední jamce negativní kontroly obsahující kDNA (substrát), MIX a lidskou TOP2. Díky nepřítomnosti inhibitoru TOP2 došlo k rozpletení minikroužků kDNA a jejich uvolnění v průběhu elektroforézy. Na obrázku je identifikujeme jako uvolněný proužek, produkt. Druhá jamka neobsahuje enzym a v pokusu slouží jako pozitivní kontrola.

Látky FK-97-HCl, FK-78-HCl, FK-48, FK-8-HCl, FK-20-HCl, FK-42-HCl a FK-46-HCl byly spolu se substrátem zadrženy v jamce, nedošlo k uvolnění produktu. U látek FK-27-HCl a FK-36-HCl došlo k částečnému uvolnění produktu. Výsledek FK-106 nelze přesně určit. V jamce substrát nezůstal, avšak produkt nevidíme.



Obr. 25 Vizualizace gelové elektroforézy, test dekatence kDNA pomocí lidské TOP2 po vystavení akridinovým derivátům. Barvení pomocí SYBR Safe, po vytřepání do směsi chloroformu a *n*-amylalkoholu v poměru 24:1, obrazová dokumentace pomocí ChemiDoc MP.

- negativní kontrola (obsahuje enzym, neobsahuje akridinové deriváty);

+ pozitivní kontrola (neobsahuje enzym, neobsahuje akridinové deriváty).

Pozn. FK-106 migrovala na opačnou stranu.

5.3 Buněčná smrt

5.3.1 *Pozitivní kontroly*

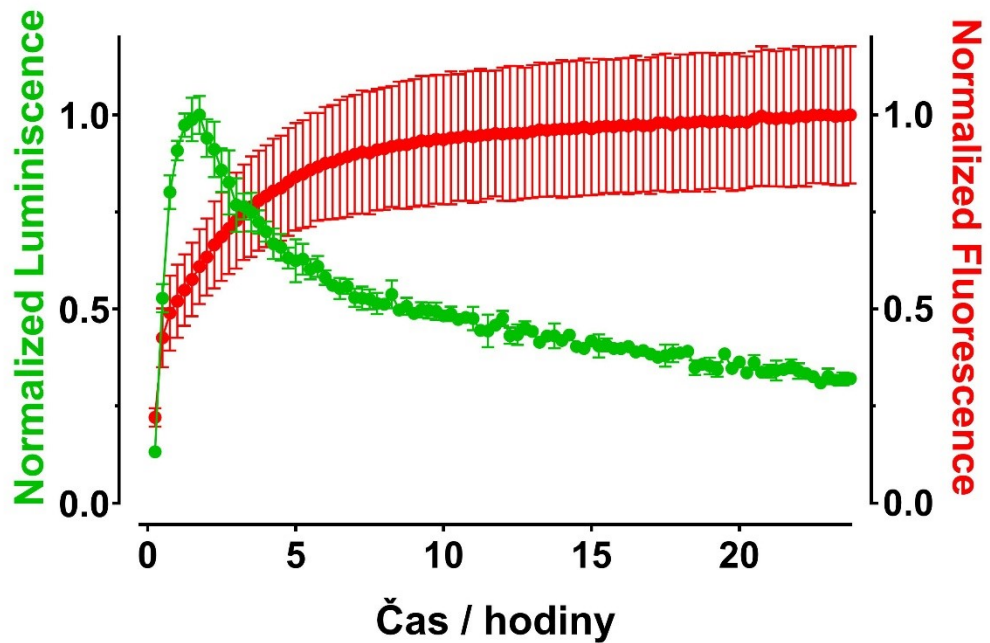
Během apoptózy dochází k translokaci fosfatidylserinu na povrch buněčné membrány, kde se na něj může navázat annexin V. Navázáním obou Annexin V fúzních proteinů obsahujících komplementární podjednotky NanoBiT® luciferasy (Annexin V-LgBiT a Annexin V-SmBiT) na fosfatidylserin dochází v jejich vzájemné blízkosti k vytvoření funkční luciferázy a tvorbě luminiscenčního signálu. Při porušení integrity buněčných membrán se do buňky dostává detekční činidlo pro nekrózu, které interaguje s DNA v jádře a vytváří tak fluorescenční signál. V případě indukce nekrózy s rozsáhlým poškozením plazmatické membrány nemusí docházet k dostatečné vazbě obou fúzních proteinů, a tudíž ke vzniku luminiscenčního signálu. Z naměřených hodnot byly vytvořeny grafy časového profilu průběhu buněčné smrti.

Signály byly měřeny po dobu 24 h při 37 °C v multifunkční čtečce mikrotitračních destiček s možností kontroly teploty (Tecan SPARK). Buněčná linie HeLa byla kultivovaná v CO₂-independentním médiu, jehož pufrací schopnost není závislá na vyšší atmosférické hladině CO₂ (5 %), jako tomu je u klasických kultivačních médií určených pro kultivaci v CO₂ inkubátorech.

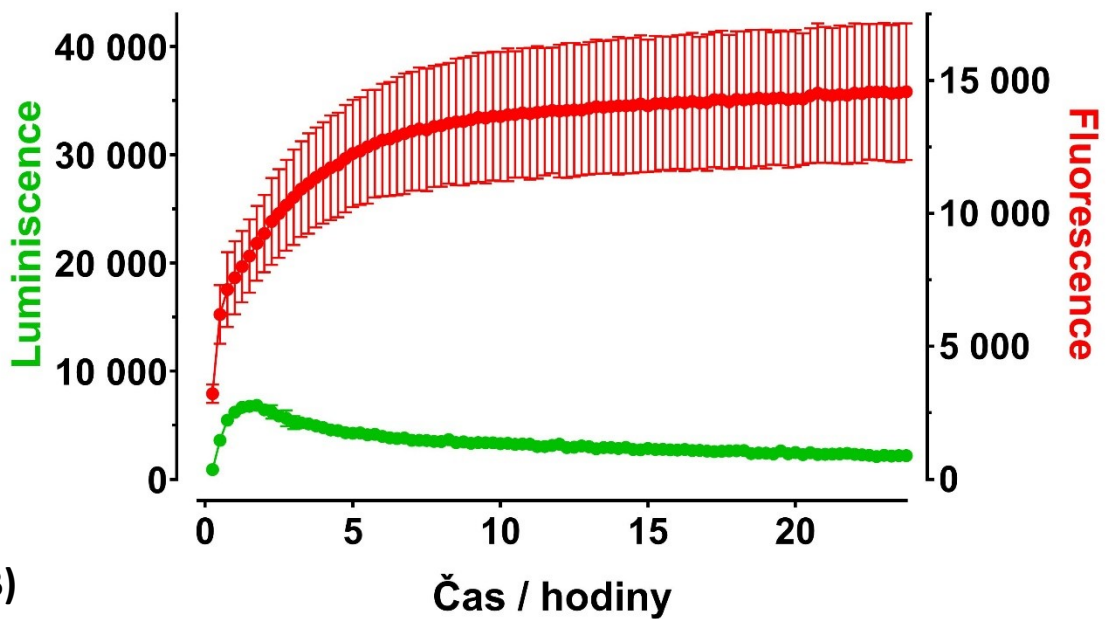
Pro stanovení typu buněčné smrti na buněčné linii HeLa po vystavení studovaným látkám jsme jako pozitivní kontrolu nekrózy zvolili digitonin v koncentraci 10 µg/mL. Z grafu je patrné, že signály luminiscence a fluorescence začínají narůstat souběžně, což potvrzuje nekrózu – viz Obr. 27.

Pozitivní kontrolou pro vnitřní cestu apoptózy byl zvolen bortezomib v koncentraci 5 µM. Časová prodleva začátku nárůstu křivky luminiscence a fluorescence potvrzuje apoptózu s následnou sekundární nekrózou, ke které v prostředí *in vitro* dochází vždy. Časový profil průběhu buněčné smrti po vystavení bortezomibu je znázorněn na Obr. 28.

TRAIL v koncentraci 400 ng/mL byl vybrán jako pozitivní kontrola vnější cesty apoptózy. I zde je na grafu (Obr. 29) patrná časová prodleva mezi začátky růstu signálu luminiscence a fluorescence.



A)



B)

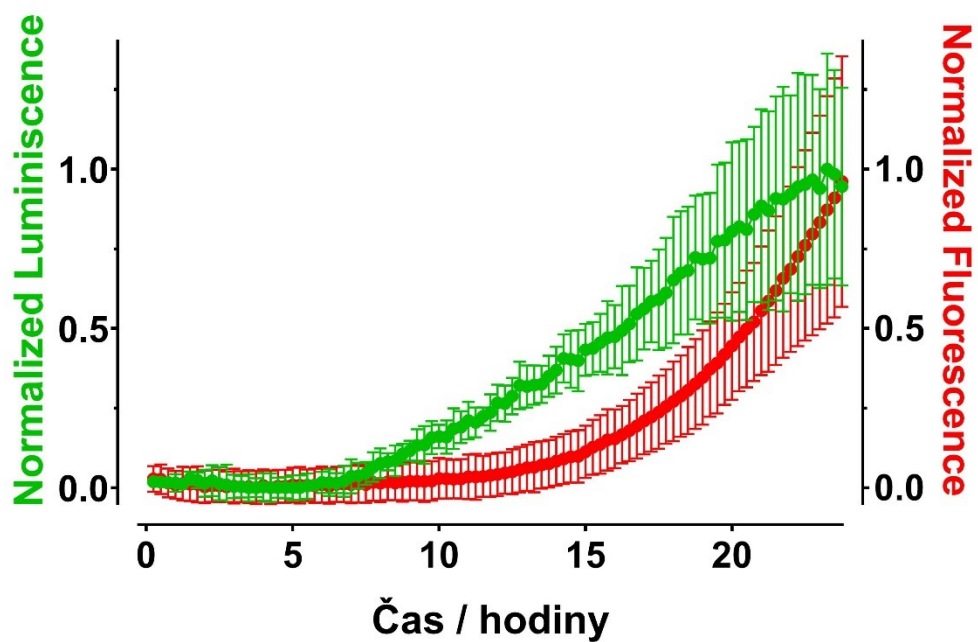
Obr. 26 Časový profil průběhu buněčné smrti – primární nekrózy indukované digitoninem (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

- A) Normalizované hodnoty signálů.
 B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

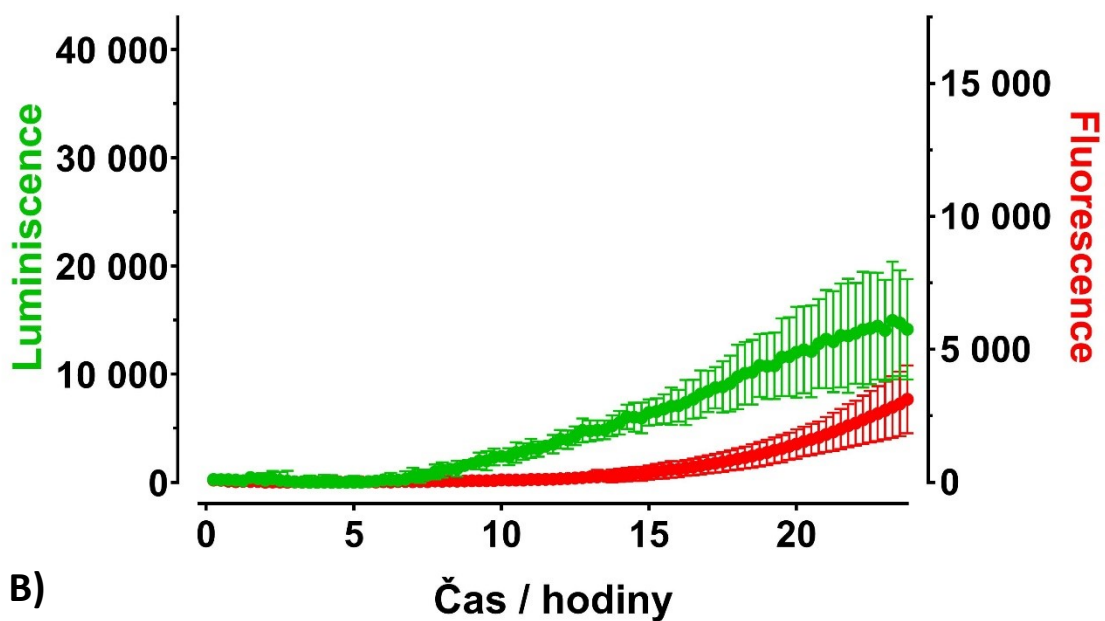
Luminiscence – zelená – apoptóza

Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplikátu.



A)



B)

Obr. 27 Časový profil průběhu buněčné smrti – vnitřní cesty apoptózy indukované bortezomibem ($5 \mu\text{M}$). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 8 h.

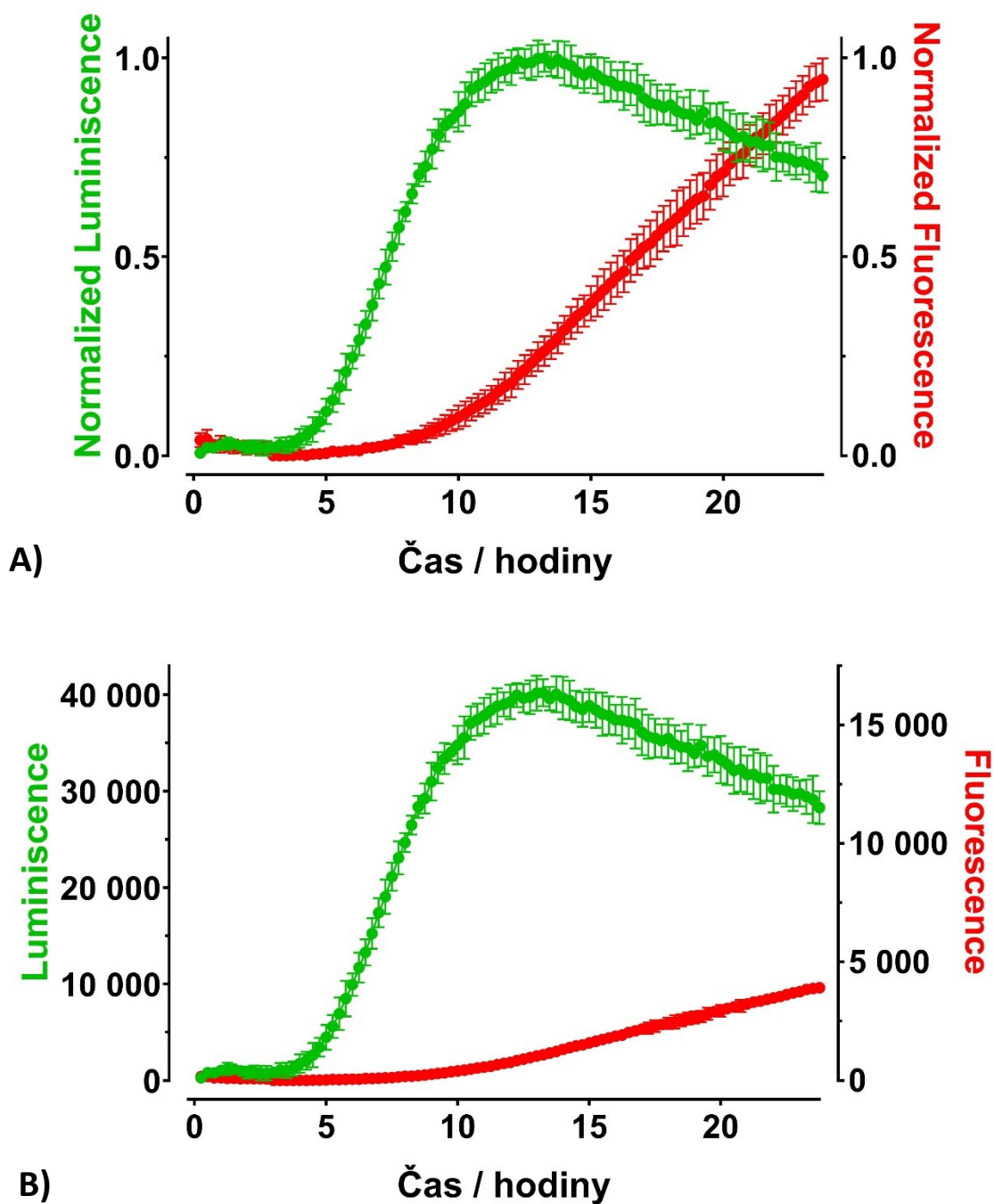
A) Normalizované hodnoty signálů.

B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza

Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplikátu.



Obr. 28 Časový profil průběhu buněčné smrti – vnější cesty apoptózy indukované TRAIL (400 ng/mL). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 5 h.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
- B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplikátu.

5.3.2 *Buněčná smrt po vystavení studovaných látek*

Typ buněčné smrti byl stanoven pomocí bioluminiscenční metody s využitím kitu RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay na buněčné linii HeLa. Doba měření byla 24 h při 37 °C. Pomocí programu GraphPad Prism byly vytvořeny grafy závislosti intenzity signálu luminiscence (apoptózy) a fluorescence (nekrózy) na čase. Všechny látky byly studovány v koncentraci odpovídající jejich IC₈₅. Hodnoty koncentrací, ve kterých byly látky studovány jsou uvedeny v Tabulce 4.

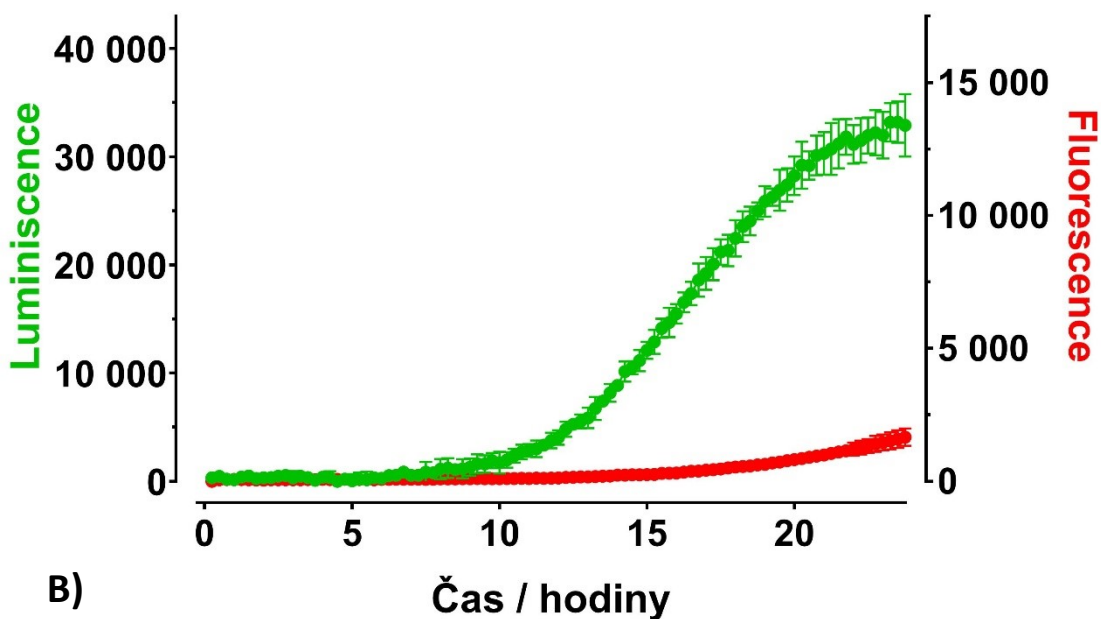
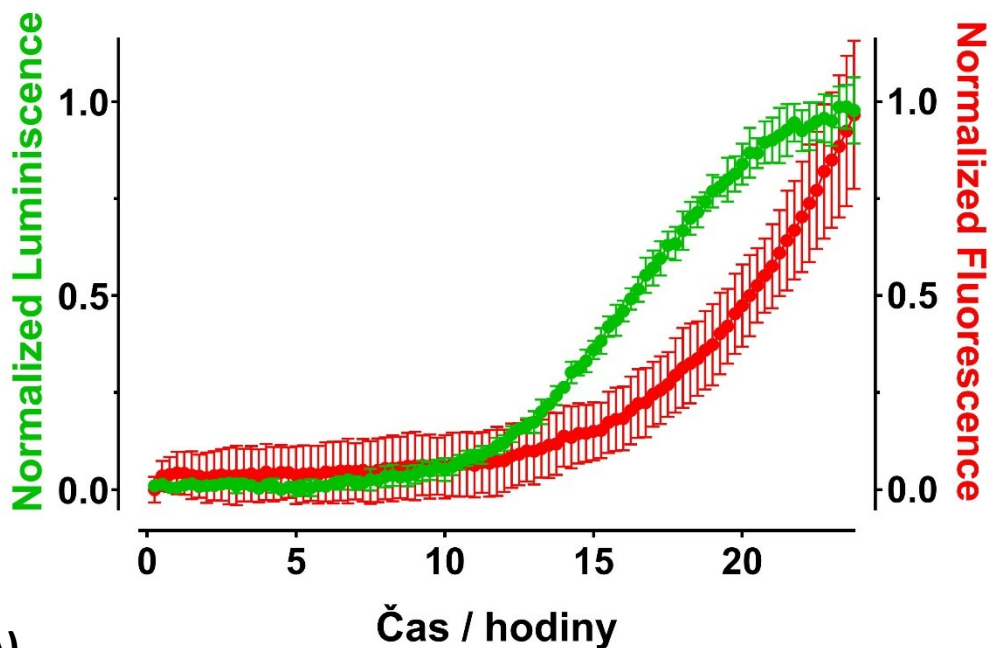
Tabulka 4 Koncentrace studovaných akridinových derivátů

Zkoušená látka	Koncentrace (μM)	Grafy
FK-8-HCl	2,6	Obr. 29
FK-20-HCl	13	Obr. 30
FK-27-HCl	17,7	Obr. 31
FK-36-HCl	31	Obr. 32
FK-42-HCl	5,9	Obr. 33
FK-46-HCl	3,2	Obr. 34
FK-48	2,2	Obr. 35
FK-78-HCl	1,5	Obr. 36
FK-97-HCl	41,9	Obr. 37
FK-106	1,9	Obr. 38

Z grafů časového profilu průběhu buněčné smrti látek FK-8-HCl, FK-20-HCl, FK-42-HCl, FK-46-HCl, FK-48, FK-78-HCl a FK-97-HCl je patrná časová prodleva mezi začátkem růstu intenzity signálu luminiscence a fluorescence. Tento stav je charakteristický pro apoptózu.

Časový profil průběhu buněčné smrti látky FK-27-HCl (Obr. 31) vykazuje jen nepatrný signál luminiscence. S grafickým vyjádřením za použití normalizovaných hodnot je patrná časová prodleva mezi začátkem růstu signálu luminiscence a fluorescence, která poukazuje na apoptózu. K masivnímu poškození membrány, jako tomu je u digitoninu, pravděpodobně nedochází. Nízký signál luminiscence může být způsoben interakcí studované látky s luciferasou a inhibicí její aktivity. Obdobný problém byl zaznamenán i u látky FK-36-HCl. Zde jsou však jak luminiscenční, tak i fluorescenční signály po indukci buněčné smrti způsobené touto látkou (Obr. 32) velmi slabé a nelze s jistotou určit typ buněčné smrti na základě této metody. Nízký signál luminiscence, i když ne v takové míře, byl zaznamenán také u látky FK-106 (Obr. 38).

Experimenty s těmito třemi látkami byly proto opakovány, avšak se stejným výsledkem.

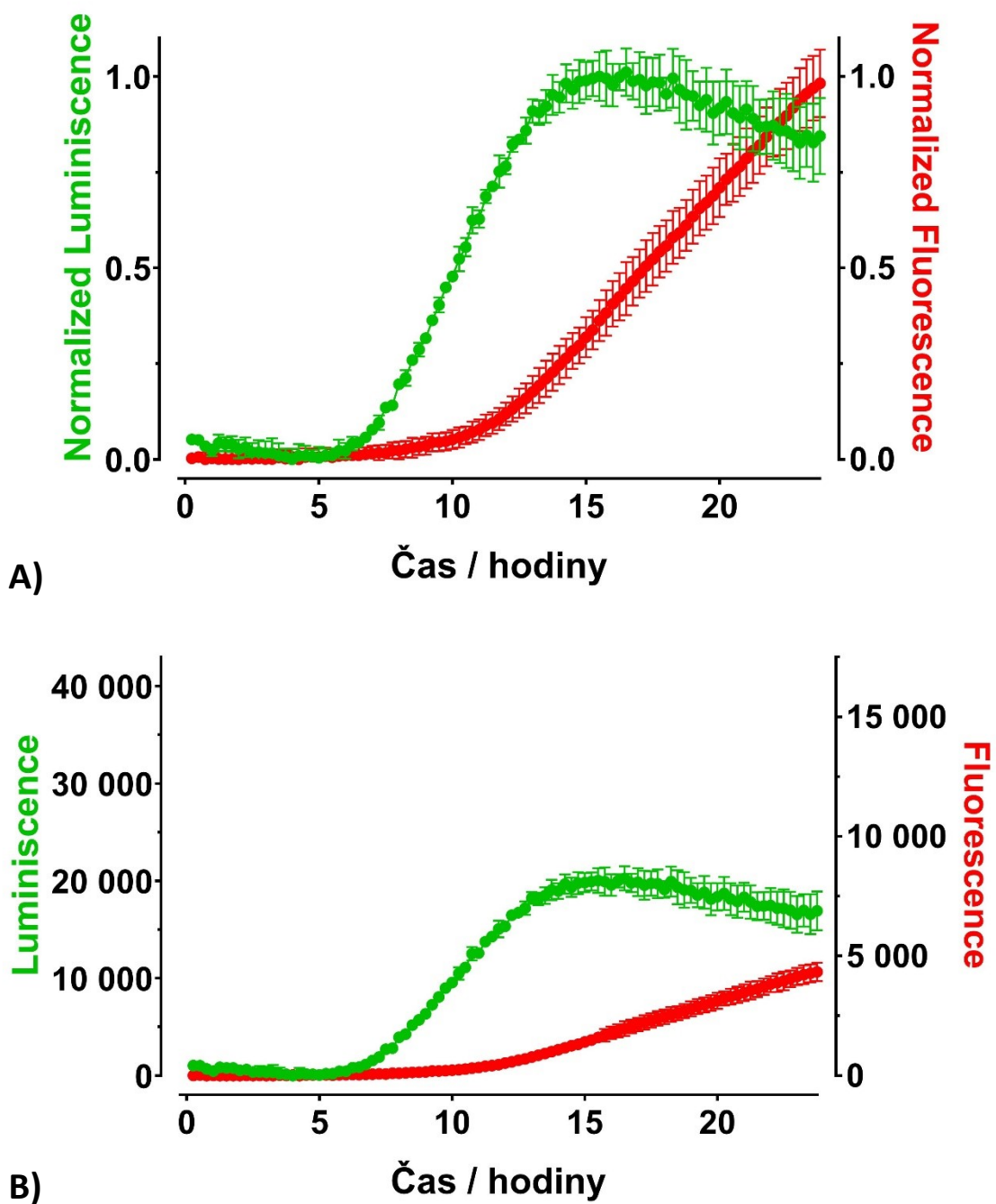


Obr. 29 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-8-HCl (2,6 μ M). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 10 h. Nízký signál fluorescence poukazuje na pozdní a velmi pozvolný nástup sekundární nekrózy.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
 B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 h, měřeno v triplicátu.

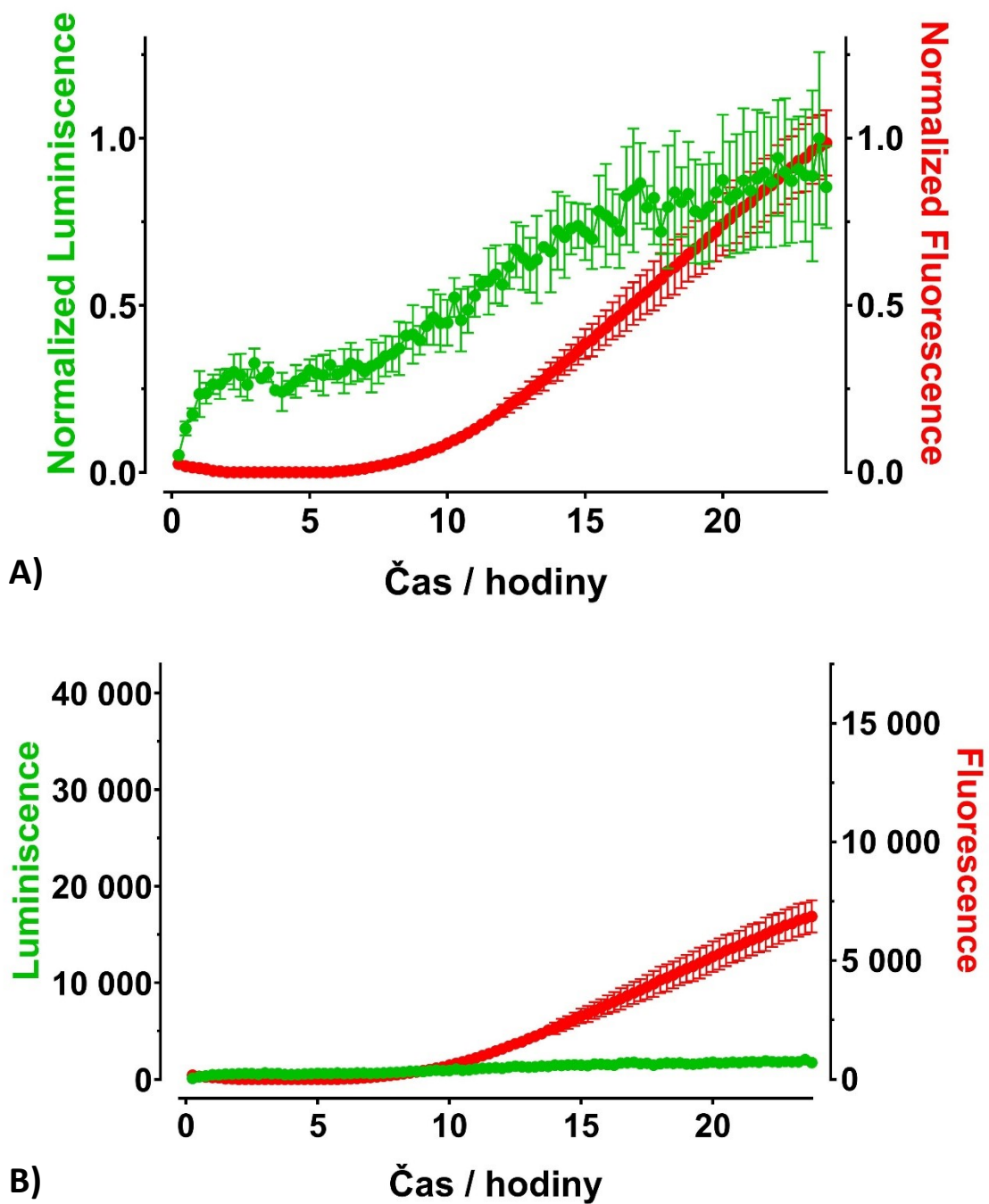


Obr. 30 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-20-HCl ($13 \mu\text{M}$). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 4 h.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
- B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplicátu.

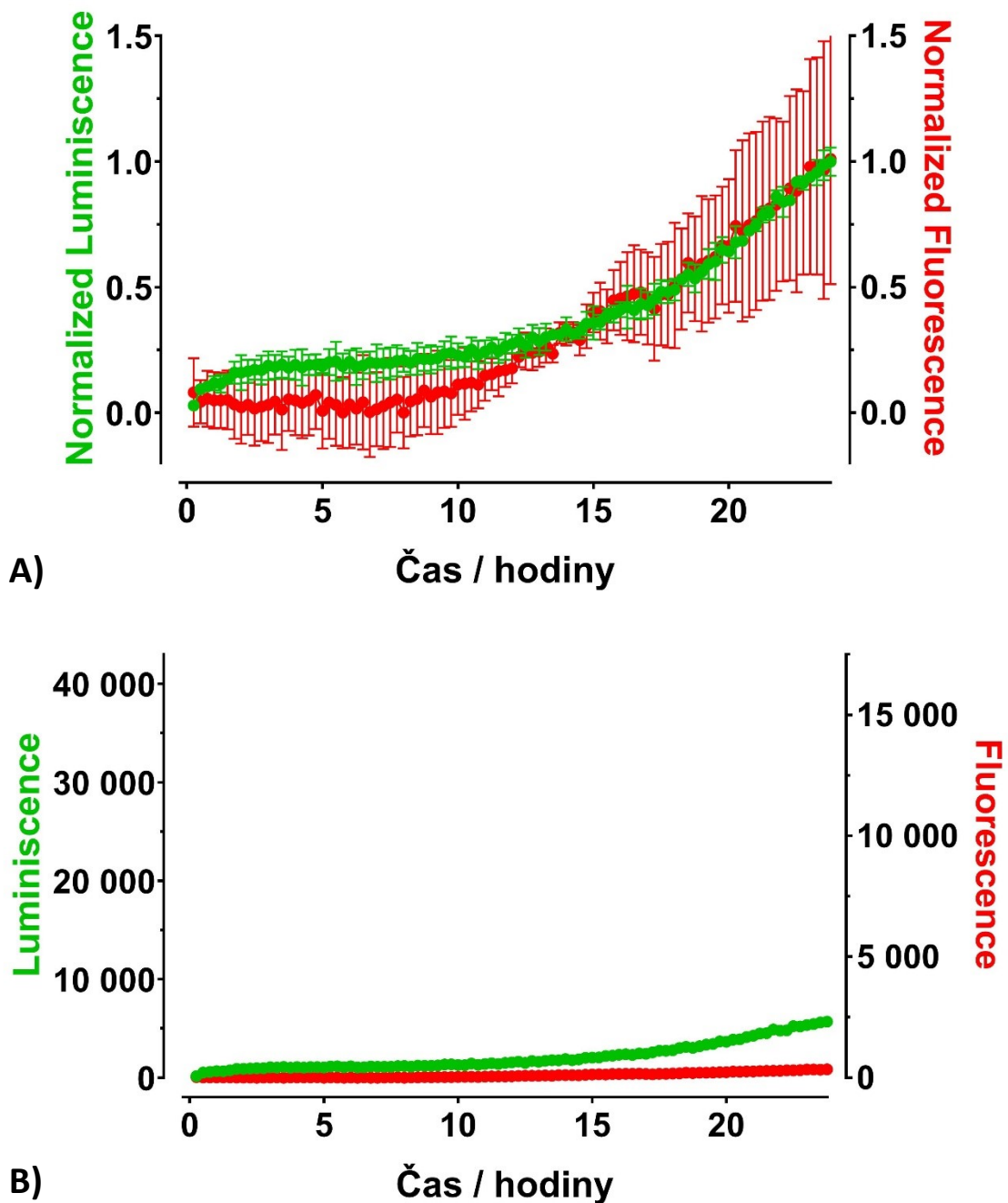


Obr. 31 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-27-HCl (17,7 μ M). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 3 h – bohužel, díky nízkému signálu luminiscence, nelze tuto hodnotu brát jako průkaznou.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
- B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplicátu.

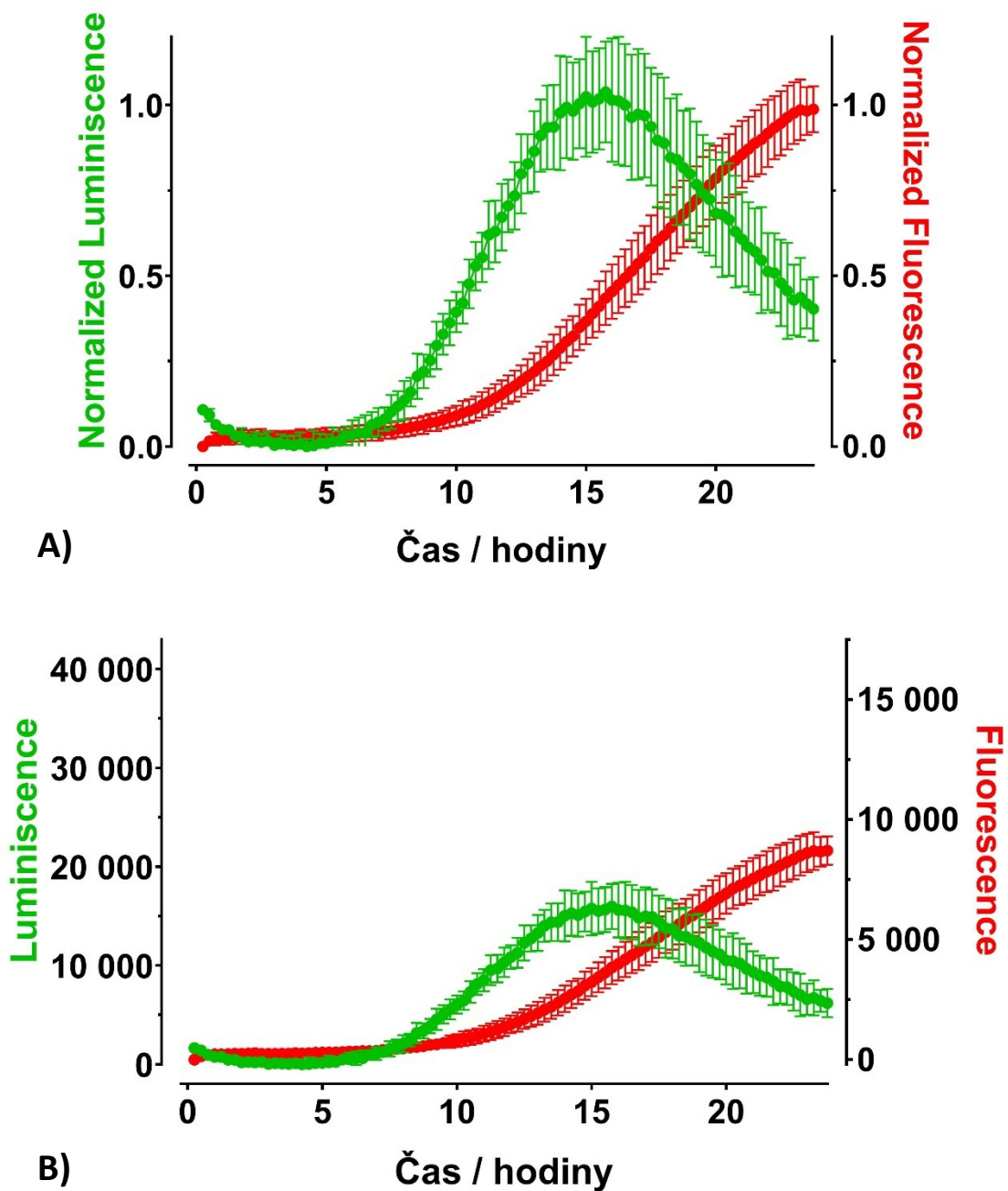


Obr. 32 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-36-HCl (31 μ M). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů není zřetelná, protože jak u luminiscence, tak u fluorescence nedošlo k významnému nárůstu signálů. Velmi nízký signál fluorescence poukazuje na pozdní a velmi pozvolný nástup sekundární nekrózy, která zde pravděpodobně nebyla vůbec zaznamenána.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
 B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplikátu.

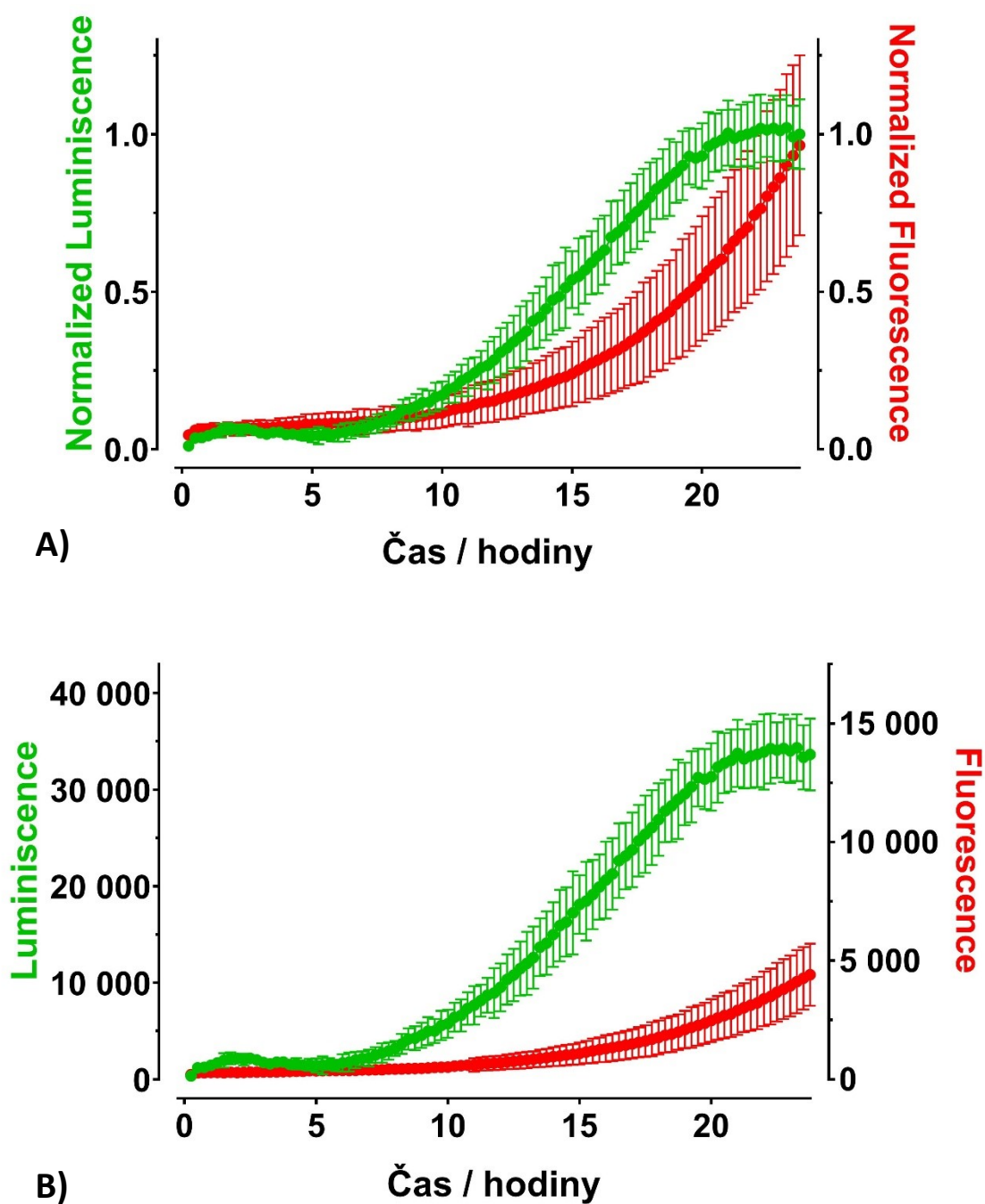


Obr. 33 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-42-HCl (5,9 μ M). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 3,5 h.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
- B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplikátu.



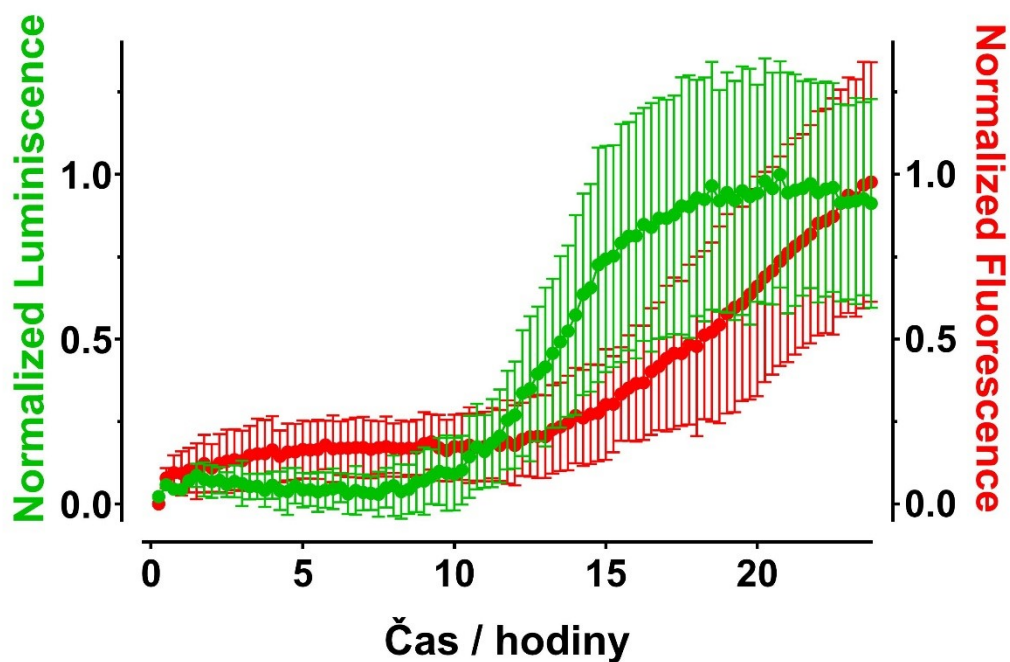
Obr. 34 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-46-HCl (3,2 μ M). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 5 h.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
- B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

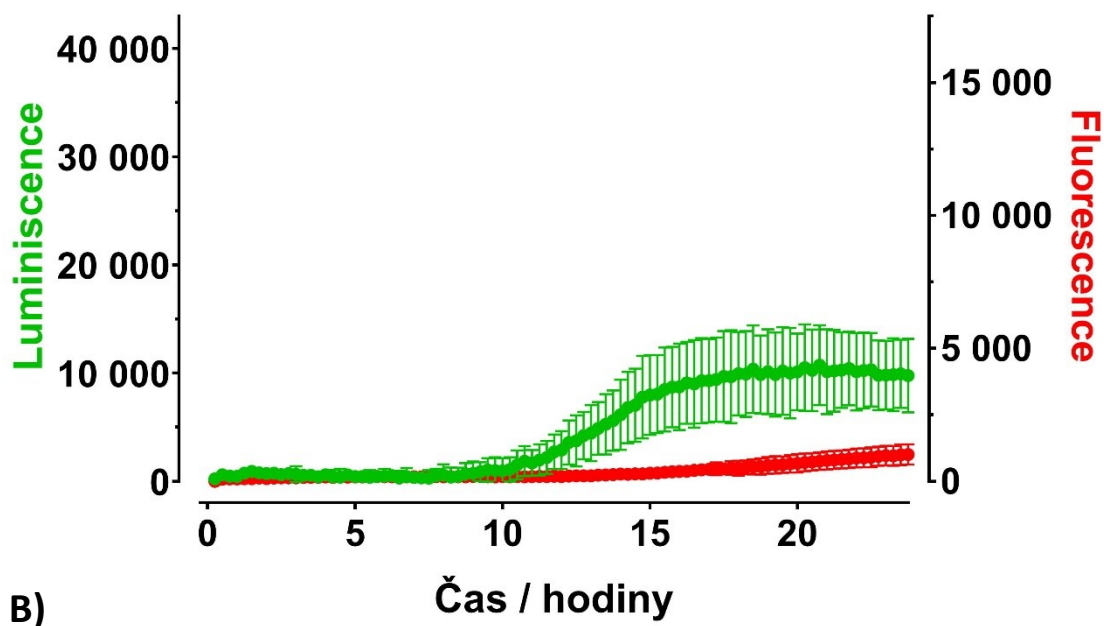
Luminiscence – zelená – apoptóza

Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplicátu.



A)



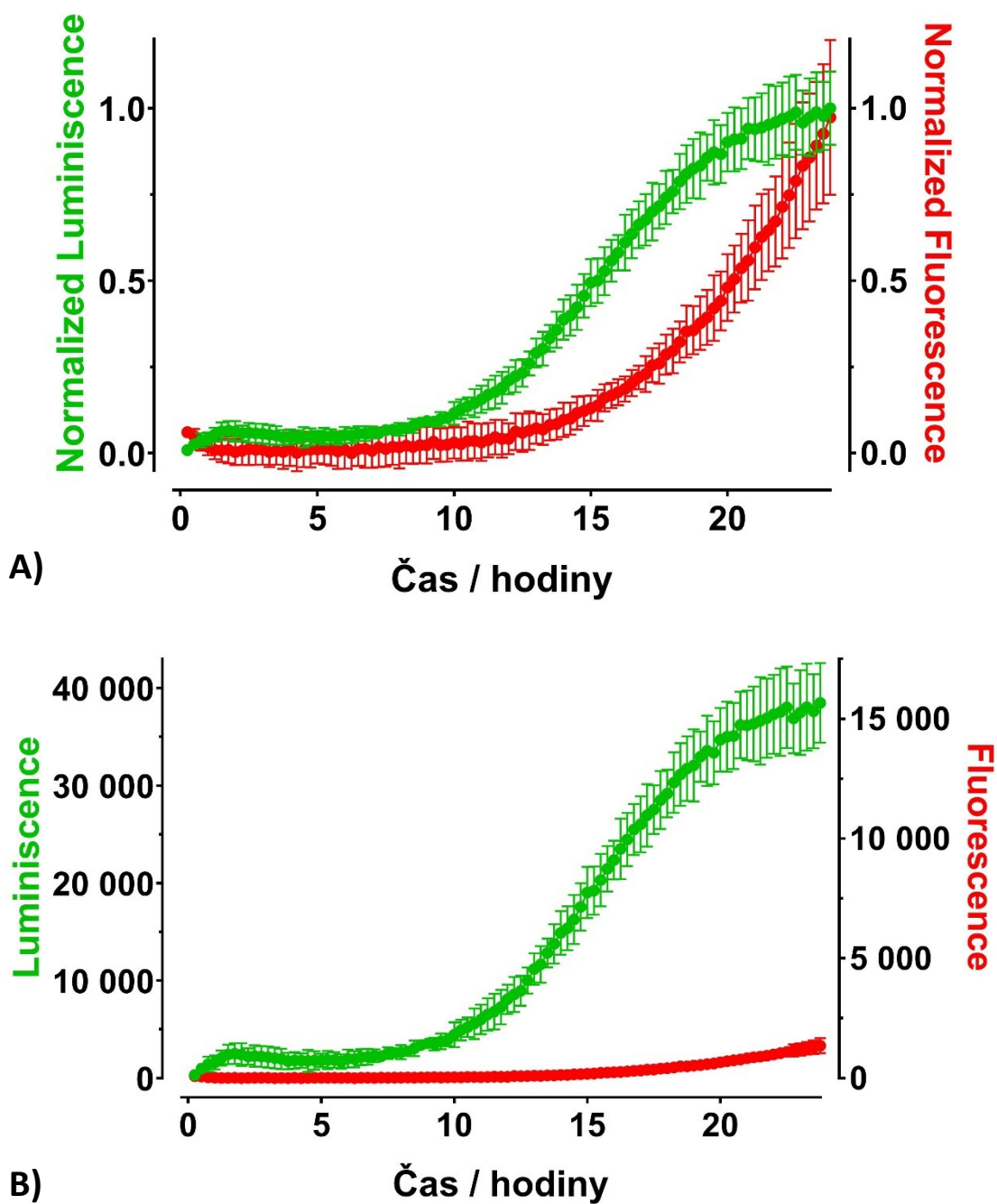
B)

Obr. 35 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-48 ($2,2 \mu\text{M}$). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 4 h. Nizký signál fluorescence poukazuje na pozdní a velmi pozvolný nástup sekundární nekrózy – daná prodleva tak může být výrazně delší.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
- B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplikátu.

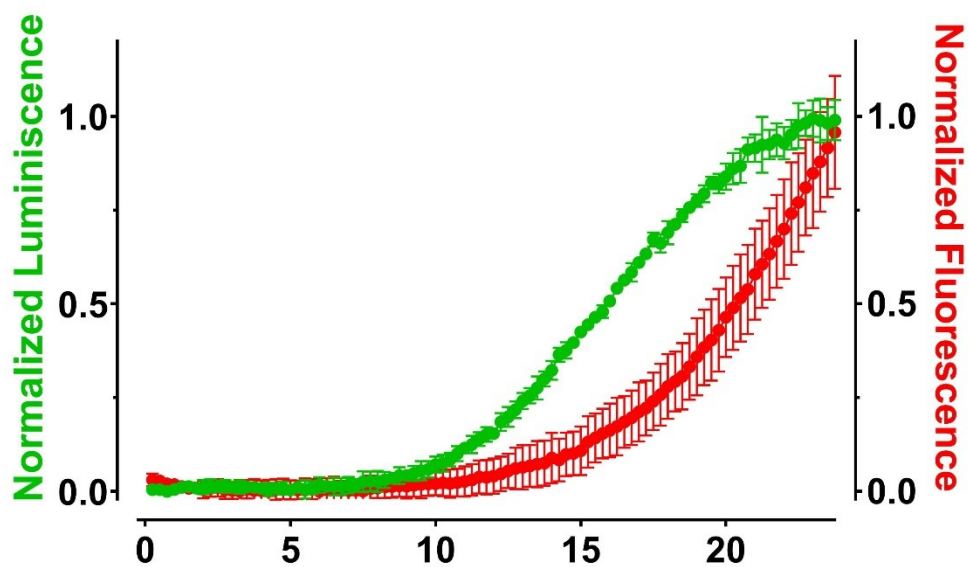


Obr. 36 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-78-HCl ($1,5 \mu\text{M}$). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 5 h. Nízký signál fluorescence poukazuje na pozdní a velmi pozvolný nástup sekundární nekrózy – daná prodleva tak může být výrazně delší.

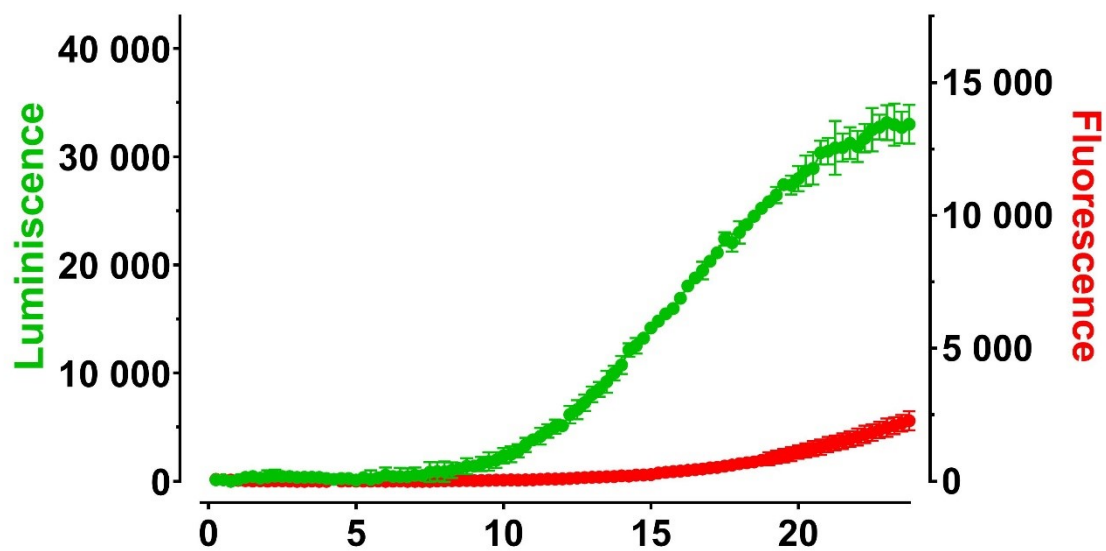
- A) Normalizované hodnoty signálů.
 B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplicátu.



A) Čas / hodiny



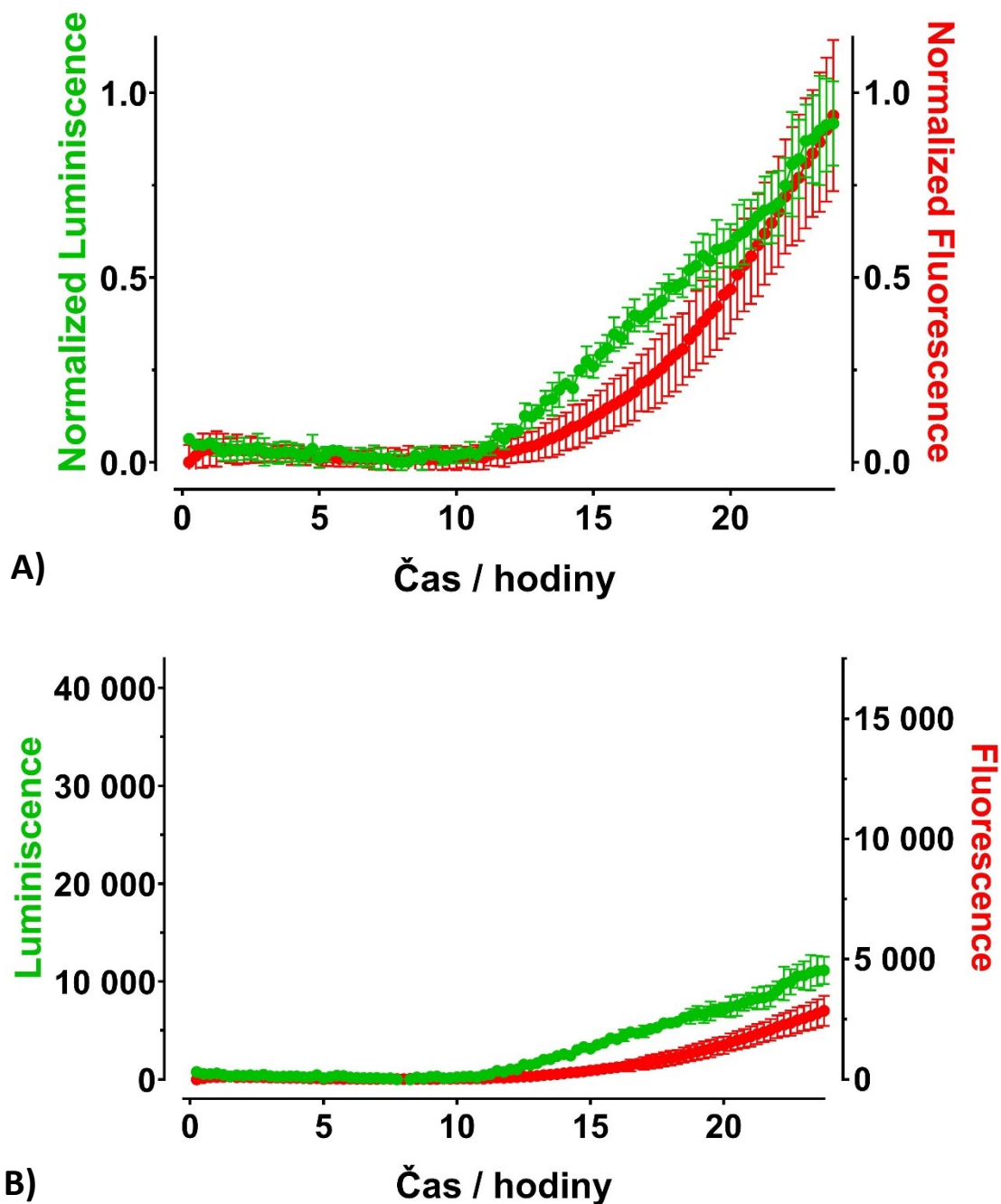
B) Čas / hodiny

Obr. 37 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-97-HCl ($41,9 \mu\text{M}$). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 5 h. Nízký signál fluorescence poukazuje na pozdní a velmi pozvolný nástup sekundární nekrózy.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
- B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplicátu.



Obr. 38 Časový profil průběhu buněčné smrti indukované FK-106 ($1,9 \mu\text{M}$). Časová prodleva mezi nárůsty obou signálů je přibližně 3 h. Nárůst obou signálů je však nízký.

- A) Normalizované hodnoty signálů.
- B) Graf v měřítku stejném pro všechny studované látky.

Luminiscence – zelená – apoptóza
 Fluorescence – červená – nekróza

Buněčná linie HeLa, doba expozice 24 hodin, měřeno v triplikátu.

6 DISKUSE

Zhoubné nádory patří mezi nejčastější příčiny úmrtí celosvětově, v České republice jsou dokonce druhou nejčastější příčinou (ÚZIS ČR, 2019). Vznikají na podkladě deregulovaného buněčného růstu a dělení a mohou být způsobeny mutacemi genů, které řídí např. buněčný cyklus či jsou důsledkem poruchy programované buněčné smrti (Snustad, 2009). Solidní tumor ale není jen seskupení maligních nekontrolovatelně se dělících buněk. Na jeho růstu se totiž podílí řada faktorů vytvářející nádorové mikroprostředí, které může ovlivňovat účinek konvenčních chemoterapeutik (Wu a Yun, 2017). Je proto nutné hledat nová potenciální léčiva a léčebné strategie, které by na nádor působily více cíleně a komplexně.

V rámci konvenční chemoterapie nádorů se dnes užívají látky zasahující do biosyntézy nukleových kyselin, tzv. antimetabolity (antifoláty, analoga purinů a pyrimidinů aj.), dále látky inhibující mitózu (např. vinca alkaloidy a taxany) a také látky označované jako genotoxická cytostatika, kam řadíme alkylační, platinová i interkalační cytostatika a také inhibitory TOP1 a 2 (Klener a Klener, 2010). Interkalace a inhibice topoisomeras je mechanismus spojovaný s účinkem především antracyklinových antibiotik (Cheung-Ong et al. 2013). Nicméně výzkum se dlouhá léta zabývá i akridinovými deriváty, z nichž například amsakrin je užíván i v klinické praxi (Ketrón et al. 2012).

Akridin je planární tricyklický heterocyklus s atomem dusíku místo uhlíku v poloze 10. Díky konjugovanému systému dvojných vazeb jej řadíme mezi chromofory, nejčastěji žlutě až oranžově zbarvené vykazující fluorescenci po vystavení UV záření (Albert, 1949). Akridinové jádro je nejčastěji substituováno v poloze 9 nukleofilním činidlem (Kozurková et al. 2021). Akridinové deriváty jsou zkoumány již více než sto let. Během této dlouhé doby bylo syntetizováno velké množství derivátů lišících se různými modifikacemi základního akridinového jádra. Nejdříve se používaly jako průmyslová barviva a později našly své uplatnění i v medicíně jako antibakteriální látky, antimalarika, ale i v terapii nádorů (Zhang et al. 2014). Potenciál vykazují i v oblasti terapie virových a mykotických infekcí (Goodell et al. 2006, Gabriel 2020). Neuroprotektivní účinek některých akridinových derivátů (př. 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridinu) je sice způsoben odlišným mechanismem účinku, inhibicí acetylcholinesterasy, nicméně to jen přidává na významu a potenciálnímu uplatnění této široké skupiny látek (Demeunynck et al. 2001).

V rámci diplomové práce byla testována skupina 9-aminoakridinů. Obsažená aminoskupina je substituována 6-azidohexylovým řetězcem a v poloze 4 9-aminoakridinového jádra se nachází karboxamidová skupina. Jednotlivé látky se od sebe liší bazickou funkcí vycházející s karboxamidového substituentu. Touto strukturou se vyznačují konkrétně látky FK-8-HCl, FK-20-HCl, FK-27-HCl, FK-36-HCl, FK-42-HCl, FK-46-HCl a FK-48. Látky s označením FK-78-HCl, FK-97-HCl a FK-106, které byly rovněž studovány, jsou různě substituované akridinové deriváty, jejichž struktury nebyly více popisovány z důvodu připravované patentové přihlášky. Všechny látky byly syntetizovány skupinou prof. Zimčíka z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Látky byly testovány na cytotoxicitu, typ indukované buněčné smrti a zda inhibují lidskou TOP2.

Jako zástupce maligních buněk pro *in vitro* studii cytotoxicity byla použita buněčná linie HeLa. Cytotoxicitu jsme stanovili po 24 h expozici studovaným látkám pomocí NRU a výsledky vyjádřili graficky jako závislost životaschopnosti buněk (% kontroly) na rostoucí koncentraci (μM) studovaných látek. Jako parametr hodnotící cytotoxicitu byla vybrána hodnota IC_{50} . Jednotlivé hodnoty IC_{50} studovaných látek se liší v jednotkách, maximálně v desítkách μM . Z pokusu vyplývá, že nejvyšší cytotoxický efekt vykazuje akridin s označením FK-78-HCl ($\text{IC}_{50} = 1,06 \pm 0,22 \mu\text{M}$). Oproti zbylým látkám se liší například tím, že jeho zásobní roztok byl jako jediný ve formě suspenze. Látku se nepodařilo zcela rozpustit v kultivačním médiu, PBS, ultračisté vodě ani v DMSO, ani po zahřátí ve vodní lázni na 37°C , termobloku na 70°C či za použití ultrazvuku. Pracovali jsme proto s homogenní suspenzí (10 mM v DMSO), které jsme dosáhli pomocí ultrazvuku a třepačky. V pracovním roztoku (100 μM v kultivačním médiu) již krystalky látky pozorovány nebyly a během experimentu tak nebylo u žádné studované koncentrace dosaženo limitu rozpustnosti. Dále se liší substitucí na různých místech akridinového jádra. Více se ale ke struktuře FK-78-HCl kvůli připravované patentové přihlášce nelze vyjádřit.;

Z hlediska závislosti cytotoxicity, resp. hodnoty IC_{50} , na struktuře ostatních zkoušených látek lze pozorovat, že absence karboxamidové skupiny v FK-27-HCl a objemný rozvětvený substituent na karboxamidové skupině v FK-36-HCl pravděpodobně způsobují mírné snížení cytotoxicity. Prodloužení spojovacího řetězce o jeden uhlík mezi karboxamidovou a dimethylaminovou skupinou v FK-42-HCl může také mít za následek mírné snížení cytotoxicity v porovnání s FK-8-HCl. Guanidinová skupina v FK-20-HCl je nejvíce bazická díky delokalizaci kladného náboje mezi třemi

atomy dusíku. Hodnota IC_{50} ale neukazuje na souvislost mezi zvýšenou bazicitou a cytotoxicitou. Z dostupných výsledků se můžeme domnívat, že se na výsledné cytotoxicitě zkoušených akridinových derivátů podílí spíše objemnost bazického substituentu než samotná síla bazicity.

Denny et al. (1986) ve své studii studovali aktivitu N-[2-(dimethylamino)ethyl]-9-aminoakridin-4-karboxamidu na buněčné linii myší leukocytární leukemie (L1210) a lidského střevního adenokarcinomu (HCT-8). Hodnoty IC_{50} uvedené v publikaci se pohybovaly v desítkách nM, což nás přivádí k myšlence, že by 6-azidohexylový řetězec na aminoskupině v poloze 9 akridinového jádra mohl snižovat cytotoxicitu studovaných látek.

Antiproliferační účinek akridinových derivátů je spojován s interkalací akridinového jádra do molekuly DNA a také s inhibicí TOP1 a 2 (Prasher a Sharma, 2018). Topoisomerasy jsou nepostradatelné pro správnou funkci replikace, transkripce i dekatence a její inhibitory rozlišujeme na topoisomerasové jedy stabilizující ternární komplex [DNA-TOP2-akridin] a katalytické inhibitory, které ovlivňují topoisomerasu v jakékoli jiné fázi katalytického cyklu, aby nedošlo k jejímu navázání na DNA (Goodel et al. 2008).

V diplomové práci byla zjišťována inhibice lidské TOP2. S pomocí gelové elektroforézy a testu dekatence kDNA bylo na základě zadržení substrátu v jamce agarosového gelu zjištěno, že u převážné většiny studovaných akridinových derivátů došlo k inhibici lidské TOP2. Slabší inhibice byla pozorována u FK-27-HCl a FK-36-HCl. I zde by mohla být souvislost s jejich strukturou, konkrétně u FK-27-HCl absence karboxamidové skupiny a u FK-36-HCl objemný rozvětvený bazický substituent na karboxamidové skupině. Látka FK-106 pravděpodobně inhibici TOP 2 nezpůsobuje, jelikož v jamce nezůstal substrát, produkt ovšem migroval opačným směrem. K jevu mohlo dojít například na základě rozdílné struktury FK-106 od ostatních akridinů nebo nedostatečným odstraněním kladného náboje při třepání do směsi chloroform a n-amyalkohol v poměru 24:1.

Zjištěná data z inhibice TOP2 jsou zatím pouze předběžná (experiment proveden jen jednou). Pokus bude nutné ještě zopakovat, abychom mohli jednoznačně určit, zda tyto látky (ne)inhibují TOP2. Výsledky experimentu nám neříkají nic o tom, jestli se látky interkalují do DNA, zda působí jako TOP2 jedy nebo jako katalytické inhibitory a zda například inhibují také TOP1. Bylo by vhodné tyto mechanismy do budoucna ověřit.

V literatuře se stále více setkáváme s tvrzením, že inhibitory topoisomeras indukují programovanou buněčnou smrt, apoptózu, která je tak považována za hlavní příčinu smrti buňky (Ferguson a Baguley, 1996). Také Denny (2002) uvádí, že amsakrin a jiné TOP2 jedy indukují buněčnou smrt apoptózou. Goodell et al. (2008) studovali aktivitu některých derivátů odvozených od 9-aminoakridin-4-karboxamidů na třech pankreatických buněčných liniích. Zjistili, že látky nejenže inhibovaly proliferaci buněk, ale také indukovaly apoptózu.

V diplomové práci byl typ buněčné smrti zjišťován na buněčné linii HeLa inkubované v CO₂-independentním mediu, protože v klasickém DMEM by docházelo k výrazné buněčné smrti v prostředí mimo CO₂ inkubátor.

Ke stanovení typu buněčné smrti byla zvolena bioluminiscenční metoda s použitím fúzních proteinů annexinu V, který se váže na fosfatidylserin. Fosfatidylserin se vystavuje na vnějším povrchu buněčné membrány během apoptózy a jeho spojení s annexinem V nesoucí luciferasu vyvolá luminiscenční signál. Dojde-li k poškození buněčných membrán, dostává se do buňky fluorescenční sonda pro nekrózu, která je spolu s annexinem V součástí detekční směsi. Z naměřených hodnot luminiscence a fluorescence byl vytvořen graf časového profilu buněčné smrti pro jednotlivé látky.

Jako pozitivní kontrolu nekrózy jsme zvolili digitonin (10 µg/ml). Pozitivní kontrolou vnitřní cesty apoptózy byl zvolen bortezomib (5 µM) a pro vnější cestu apoptózy byl induktorem TRAIL (400 ng/mL). Jednotlivé studované látky byly aplikovány v koncentraci odpovídající jejich IC₈₅. Na základě časové prodlevy mezi začátkem růstu signálu luminiscence a fluorescence lze říct, že všechny studované látky indukují apoptózu. Výjimkou jsou látky FK-27-HCl, FK-36-HCl a FK-106, u kterých byly naměřené signály nízké, a tudíž nelze s jistotou typ buněčné smrti stanovit. Důvod může být interference těchto akridinů s reagensy obsaženými v kitu.

Na základě této metody ale nelze určit např. o jakou cestu apoptózy se jedná či v jaké fázi buněčného cyklu studované akridinové deriváty působí. Dle Goodell et al. (2008) je pravděpodobné, že by akridiny mohly bránit přechodu G1→S fáze, což vyplývá i z funkce TOP2, která je zásadní pro odvinutí DNA před samotnou replikační fází.

Výsledky práce korespondují s dosavadními informacemi o většině akridinových derivátů. Potvrdili jsme, že působí cytotoxicky, indukují apoptózu a nastínili jsme mechanismus účinku spočívající v možné inhibici TOP2. K prohloubení znalostí o studovaných nových akridinových derivátech je však nutné provést další experimenty zaměřující se především na upřesnění mechanismu inhibice topoisomeras.

7 ZÁVĚRY

- U látek FK-8-HCl, FK-20-HCl, FK-27-HCl, FK-36-HCl, FK-42-HCl, FK-46-HCl, FK-48, FK-78-HCl, FK-97-HCl a FK-106 bylo zjištěno, že inhibují proliferaci buněk. Nejvyšší cytotoxicitu vykazovala látka FK-78-HCl.
- Z pilotních dat pravděpodobně inhibují topoisomerasu II všechny studované akridiny s výjimkou FK-106.
- U většiny studovaných látek byla prokázána apoptóza jako hlavní typ buněčné smrti. Nekróza jako hlavní typ buněčné smrti nebyla detekována.
- Výsledky studia aktivity nových akridinových barviv *in vitro* odpovídají dosavadním znalostem o většině derivátů 9-aminoakridin-4-karboxamidů – jsou cytotoxické, indukují apoptotickou buněčnou smrt a s největší pravděpodobností také inhibují topoisomerasu II. Přítomnost 6-azidohexylového řetězce na dusíku v poloze 9 akridinového jádra může být důvodem snížené cytotoxicity v porovnání s jinými zástupci 9-aminoakridin-4-karboxamidů.

8 LITERATURA

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie*. 1. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-715-8.

ALBERT, Adrian. THE CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF ACRIDINES. *Science Progress*. 1949, 1933-(Vol. 37 147), 418-434. Dostupné také z: <https://www.jstor.org/stable/43413129>

ALY, Ahmed S.I., Ashley M. VAUGHAN a Stefan H.I. KAPPE. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2009, 63(1), 195-221 [cit. 2021-2-20]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.091208.073403

BELMONT, Philippe, Johann BOSSON, Thomas GODET a Martin TIANO. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* [online]. 2007, 7(2), 139-169 [cit. 2021-3-9]. ISSN 18715206. Dostupné z: doi:10.2174/187152007780058669

CAPES-DAVIS, Amanda, George THEODOSOPOULOS, Isobel ATKIN, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *International Journal of Cancer* [online]. 2010, 127(1), 1-8 [cit. 2021-4-20]. ISSN 00207136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.25242

CEPEDA, Victoria, Miguel FUERTES, Josefina CASTILLA, Carlos ALONSO, Celia QUEVEDO a Jose PEREZ. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* [online]. 2007, 7(1), 3-18 [cit. 2020-12-29]. ISSN 18715206. Dostupné z: doi:10.2174/187152007779314044

ČIŽEKOVÁ, L., A. GROLMUSOVÁ, Z. IPÓTHOVÁ, et al. Novel 3,6-bis(imidazolidine)acridines as effective photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2014, 22(17), 4684-4693 [cit. 2021-3-6]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2014.07.013

DELGADO, Justine L., Chao-Ming HSIEH, Nei-Li CHAN a Hiroshi HIASA. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochemical Journal* [online]. 2018, 475(2), 373-398 [cit. 2020-12-30]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BCJ20160583

DEMEUNYNCK, Martine, Franck CHARMANTRAY a Alain MARTELLI. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2001, 7(17) [cit. 2021-4-25]. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/1381612013397131

DENNY. Acridine Derivatives as Chemotherapeutic Agents. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2002, 9(18) [cit. 2021-3-2]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/0929867023369277

DENNY, William A., Graham J. ATWELL, Gordon W. REWCASTLE a Bruce C. BAGULEY. Potential antitumor agents. 49. 5-Substituted derivatives of N-[2-(dimethylamino)ethyl]-9-aminoacridine-4-carboxamide with in vivo solid-tumor activity. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 1987, 30(4), 658-663 [cit. 2021-4-24]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm00387a013

DOYLE, Ken. Detecting Apoptosis in Real Time: One-Step Annexin V Binding Assay Illuminates Apoptosis Progression. *Promega* [online]. Madison, WI USA: Promega, 2021, 15.9.2017 [cit. 2021-4-24]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/features/introduction-to-luminescent-annexin-v-apoptosis-detection/>

FERGUSON, Lynnette R. a Bruce C. BAGULEY. Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 1996, 355(1-2), 91-101 [cit. 2021-3-2]. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/0027-5107(96)00024-3

FERGUSON, Lynnette R. a William A. DENNY. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 2007, 623(1-2), 14-23 [cit. 2021-3-2]. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.03.014

GABRIEL, Iwona. 'Acridines' as New Horizons in Antifungal Treatment. *Molecules* [online]. 2020, 25(7) [cit. 2021-3-6]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25071480

GAMAGE, Swarna A., Julie A. SPICER, Graham J. ATWELL, Graeme J. FINLAY, Bruce C. BAGULEY a William A. DENNY. Structure–Activity Relationships for

Substituted Bis(acridine-4-carboxamides): A New Class of Anticancer Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 1999, 42(13), 2383-2393 [cit. 2021-3-10]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm980687m

GOODELL, John R., Avni A. MADHOK, Hiroshi HIASA a David M. FERGUSON. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2006, 14(16), 5467-5480 [cit. 2021-4-4]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2006.04.044

GOODELL, John R., Andrei V. OUGOLKOV, Hiroshi HIASA, Harneet KAUR, Rory REMMEL, Daniel D. BILLADEAU a David M. FERGUSON. Acridine-Based Agents with Topoisomerase II Activity Inhibit Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2008, 51(2), 179-182 [cit. 2021-3-14]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm701228e

HIRATA, Eishu a Erik SAHAI. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2017, 7(7) [cit. 2021-4-22]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a026781

HOFMANOVÁ, Jiřina. Genotoxicita a karcinogeneze. Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2013 [cit. 2020-11-30]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html

HUGHES, JP, S REES, SB KALINDJIAN a KL PHILPOTT. Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2011, 162(6), 1239-1249 [cit. 2021-5-11]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x

CHAN, K-S, C-G KOH a H-Y LI. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. *Cell Death & Disease* [online]. 2012, 3(10), e411-e411 [cit. 2020-12-12]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2012.148

CHEUNG-ONG, Kahlin, Guri GIAEVER a Corey NISLOW. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chemistry & Biology* [online]. 2013, 20(5), 648-659 [cit. 2020-12-14]. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2013.04.007

IBRAHIM, Sabrin R. M. a Gamal A. MOHAMED. Marine Pyridoacridine Alkaloids: Biosynthesis and Biological Activities. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2016, 13(1), 37-47 [cit. 2021-4-4]. ISSN 16121872. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.201400434

JIRÁK, Roman. *Gerontopsychiatrie*. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7262-873-5.

KETRON, Adam C., William A. DENNY, David E. GRAVES a Neil OSHEROFF. Amsacrine as a Topoisomerase II Poison: Importance of Drug–DNA Interactions. *Biochemistry* [online]. 2012, 51(8), 1730-1739 [cit. 2021-3-10]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi201159b

KLENER, Pavel a Pavel KLENER. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4171-0.

KLENER, Pavel a Pavel KLENER. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2808-7.

KORÁBEČNÝ, Jan, Katarína ŠPILOVSKÁ, Ondřej BENEK, Kamil MUSÍLEK, Ondřej SOUKUP a Kamil KUČA. Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská farmacie*. 2012, 2012(5), 210-221.

KOZURKOVA, Maria, Danica SABOLOVA a Pavol KRISTIAN. A new look at 9-substituted acridines with various biological activities. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 2021, 41(1), 175-189 [cit. 2021-2-20]. ISSN 0260-437X. Dostupné z: doi:10.1002/jat.4072

KUMAR, Puneet, Rajesh KUMAR a Deo Nandan PRASAD. Synthesis and biological evaluation of new 9-aminoacridine-4-carboxamide derivatives as anticancer agents. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2013, 6(1), 59-65 [cit. 2021-4-23]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2011.03.003

KUMAR R, KAUR M, KUMARI M. Acridine: a versatile heterocyclic nucleus. *Acta Pol Pharm*. 2012 Jan-Feb;69(1):3-9. PMID: 22574501

LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1415-1.

LIVERTOX: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Mepacrine. [aktualizovano 2017-2-1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547866/>

MAREK, Josef, VRABLÍK, Michal, ed. Markova farmakoterapie vnitřních nemocí. 5. Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-247-5078-1.

MUELLER-PLANITZ, Felix a Daniel HERSCHLAG. Coupling between ATP Binding and DNA Cleavage by DNA Topoisomerase II. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, 283(25), 17463-17476 [cit. 2021-4-23]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M710014200

PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information (2021). Compound Summary for CID 9215, Acridine [cit. 2021-1-23] from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acridine>.

NITISS, John L. Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* [online]. 1998, 1400(1-3), 63-81 [cit. 2020-12-30]. ISSN 01674781. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4781(98)00128-6

NITISS, John L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2009, 9(5), 338-350 [cit. 2020-12-14]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2607

OSMAN, Hany, Deena ELSAHY, M. Reza SAADATZADEH, Karen E. POLLOK, Steven YOCOM, Eyas M. HATTAB, Joseph GEORGES a Aaron A. COHEN-GADOL. Acridine Orange as a Novel Photosensitizer for Photodynamic Therapy in Glioblastoma. *World Neurosurgery* [online]. 2018, 114, e1310-e1315 [cit. 2021-3-7]. ISSN 18788750. Dostupné z: doi:10.1016/j.wneu.2018.03.207

PRASHER, Parteek a Mousmee SHARMA. Medicinal chemistry of acridine and its analogues. *MedChemComm* [online]. 2018, 9(10), 1589-1618 [cit. 2020-11-8]. ISSN 2040-2503. Dostupné z: doi:10.1039/C8MD00384J

REPETTO, Guillermo, Ana DEL PESO a Jorge L ZURITA. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* [online]. 2008, 3(7), 1125-1131 [cit. 2021-4-20]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2008.75

ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. Praha: Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2932-2.

SHAPIRO, T. A.; V. A. KLEIN; P. T. ENGLUND. Isolation of Kinetoplast DNA. In *DNA Topoisomerase Protocols: Volume I: DNA Topology and Enzymes*; Bjornsti, M.-A.; Osheroff, N., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 1999; pp 61– 67.

SINGH, Mayank, Himani SHARMA a Neeta SINGH. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion* [online]. 2007, 7(6), 367-373 [cit. 2021-4-20]. ISSN 15677249. Dostupné z: doi:10.1016/j.mito.2007.07.003

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. *Genetika*. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.

SÚKL. SPC přípravku AMSIDYL. [internet]. pdf; 2018 [cit. 10.4.2021] Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0235069&tab=texts>

SWIFT, Lucy a Roy GOLSTEYN. Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, 15(3), 3403-3431 [cit. 2020-12-12]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15033403

ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZENBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří SLÍVA a Martin VOTAVA, ed. *Farmakologie*. Ilustroval Miroslav BARTÁK. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

ÚZIS. *Zdravotnická ročenka České republiky 2018* [online]. 2019 [cit. 2020-11-29]. ISSN 1210-9991. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=vystupy--knihovna&id=275>

VISENTIN, Michele, Rongbao ZHAO a I. David GOLDMAN. The Antifolates. Hematology/Oncology Clinics of North America [online]. 2012, 26(3), 629-648 [cit. 2021-4-22]. ISSN 08898588. Dostupné z: doi:10.1016/j.hoc.2012.02.002

WHO. Malaria [online]. Geneva: WHO, 2021 [cit. 2021-4-10]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>

WOODS, Derek a John J. TURCHI. Chemotherapy induced DNA damage response. Cancer Biology & Therapy [online]. 2014, 14(5), 379-389 [cit. 2020-12-14]. ISSN 1538-4047. Dostupné z: doi:10.4161/cbt.23761

WU, Ting a Yun DAI. Tumor microenvironment and therapeutic response. Cancer Letters [online]. 2017, 387, 61-68 [cit. 2021-4-25]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2016.01.043

ZHANG, Bin, Xi LI, Bin LI, Chunmei GAO a Yuyang JIANG. Acridine and its derivatives: a patent review (2009 – 2013). Expert Opinion on Therapeutic Patents [online]. 2014, 24(6), 647-664 [cit. 2021-3-14]. ISSN 1354-3776. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2014.902052

ZHANG, Juan, Chengshi JIANG, João Paulo FIGUEIRÓ LONGO, Ricardo Bentes AZEVEDO, Hua ZHANG a Luis Alexandre MUEHLMANN. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. Acta Pharmaceutica Sinica B [online]. 2018, 8(2), 137-146 [cit. 2021-3-6]. ISSN 22113835. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2017.09.003

ZVĚŘOVÁ, Martina. Alzheimerova demence. Praha: Grada Publishing, 2017. Psyché (Grada). ISBN 978-80-271-0561-8.