

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**VLIV RESVERATROLU A KYSELINY GAMBOGOVÉ
NA POŠKOZENÍ DNA NEONATÁLNÍCH POTKANÍCH
KARDIOMYOCYTŮ VYVOLANÉ DAUNORUBICINEM**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Veronika Keresteš

Hradec Králové, 2023

Martin Mašín

Prohlášení

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

V Hradci Králové, dne

Martin Mašín

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Anně Jirkovské, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a cenné rady. Velké díky patří také Mgr. Veronice Keresteš za její ochotu, trpělivost a praktické rady nejen při práci v laboratoři. Za přínosné konzultace či poskytnutí výsledků z výzkumu děkuji panu Prof. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D., PharmDr. Lence Applové, Ph.D. a Mgr. Janu Kubešovi. Děkuji i ostatním zaměstnancům a studentům Katedry biochemických věd a za finanční podporu projektům GA UK 1674119, SVV 260 664 a GA ČR 21-16195S. V neposlední řadě děkuji mým nejbližším za podporu a důvěru během celého studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Martin Mašín

Školitel: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv resveratrolu a kyseliny gambogové na poškození DNA neonatálních potkaních kardiomyocytů vyvolané daunorubicinem.

DNA topoizomerasy jsou skupinou enzymů, které jsou schopny měnit topologii DNA pomocí přechodných jednořetězcových nebo dvouřetězcových zlomů (DSB) během fundamentálních procesů jako je replikace a transkripce. Inhibice topoizomerasy II (TOP II) je hlavním mechanismem účinku některých protinádorových léčiv, včetně antracyklinových antibiotik (ANT; např. daunorubicin). Jejich působením dochází k tvorbě DSB a později k apoptóze. Některé další inhibitory TOP II, které působí jiným mechanismem, mohou ovlivňovat vznik DSB nebo jiného poškození DNA, a tak modulovat také účinek ANT.

V této diplomové práci jsme studovali poškození DNA v neonatálních potkaních kardiomyocytech vyvolané daunorubicinem (DAU) a jeho hlavním metabolitem daunorubicinolem (DAUnol) a vliv dvou přírodních látek a inhibitorů TOP II, resveratrolu (RES) a kyseliny gambogové (GA), na poškození DNA vyvolané DAU dvěma odlišnými metodami. Stanovovali jsme míru fosforylace histonu H2AX (γ -H2AX) pomocí imunoblotu a porovnali s výsledky získanými pomocí kometového testu. Sledovali jsme jak míru poškození vyvolanou jednotlivými látkami, tak i kombinace RES a GA s DAU.

Na základě výsledků lze konstatovat, že DAU i DAUnol (1,2 μ M) způsobují poškození DNA, které je závislé na čase expozice – stoupá ve sledovaném rozmezí od 1,5 do 6 hod. Nicméně tento trend je patrný pouze u γ -H2AX. Samotný RES (1, 10, 100 μ M) nevyvolal poškození DNA a v koncentraci 100 μ M statisticky signifikantně snížil γ -H2AX způsobenou DAU. To bylo patrné také v kometovém testu, přestože rozdíl byl menší a nedosáhl signifikance. Samotná GA (1 μ M) významně zvýšila signál γ -H2AX i kometového testu a zvýšila i poškození DNA způsobené DAU.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Martin Mašín

Supervisor: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of resveratrol and gambogic acid on the DNA damage caused by daunorubicin in neonatal rat cardiomyocytes.

DNA Topoisomerases comprise a family of enzymes that are able to alter DNA topology by transient single- or double-strand breaks (DSB) during fundamental processes such as replication and transcription. Inhibition of topoisomerase II (TOP II) is the main mechanism of action of some antitumour drugs, such as anthracyclines (ANT; e.g., daunorubicin). They stabilize the DNA-TOP II complex, leading to the formation of DSBs and later to apoptosis. Other inhibitors, that interact with the enzyme without the DSB formation, can modulate the effect of ANT.

In this thesis, we studied the DNA damage caused by daunorubicin (DAU) and its main metabolite daunorubicinol (DAUnol) and the effect of two naturally-derived compounds and TOP II catalytic inhibitors resveratrol (RES) and gambogic acid (GA) in neonatal rat cardiomyocytes. The DNA damage was determined as the extent of histone H2AX phosphorylation (γ -H2AX) and by Comet Assay.

It can be concluded that both DAU and DAUnol (1,2 μ M) exhibit DNA damage that is dependent on the time of exposure – increases during the 6h period. Nevertheless, this trend was detected only by the γ -H2AX. RES (1, 10, 100 μ M) alone did not induced DNA damage and at a concentration of 100 μ M it reduced DAU-induced γ -H2AX. GA at higher concentration (1 μ M) independently increased both γ -H2AX and Comet Assay signal and also increased DAU-induced DNA damage.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	DNA TOPOIZOMERASY	9
2.2	KATALYTICKÝ CYKLUS TOP II	11
2.3	LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ FUNKCI TOP II	12
2.3.1	TOP II jedy	13
2.3.2	Katalytické inhibitory TOP II	17
2.4	METODY STANOVENÍ POŠKOZENÍ DNA	22
2.4.1	Metody detekující a kvantifikující fosforylovaný histon H2AX	23
2.4.2	Kometový test	23
3	CÍLE PRÁCE	25
4	MATERIÁL A METODIKA	26
4.1	MATERIÁL	26
4.1.1	Neonatální potkaní kardiomyocyty.....	26
4.1.2	Přístrojové vybavení	26
4.1.3	Chemikálie	27
4.2	METODIKA	29
4.2.1	Izolace neonatálních potkaních kardiomyocytů	29
4.2.2	Příprava vzorků.....	30
4.2.3	Stanovení množství proteinu metodou BCA	30
4.2.4	Separace proteinů pomocí SDS-PAGE.....	32
4.2.5	Přenos proteinů na membránu – western blotting	33
4.2.6	Imunodetekce.....	34
4.2.7	Zpracování experimentálních dat z imunodetekce	34
4.2.8	Kometový test	35
4.2.9	Zpracování experimentálních dat z kometového testu	36
5	VÝSLEDKY	38
5.1	IMUNODETEKCE FOSFORYLOVANÉHO HISTONU H2AX	38
5.1.1	Stanovení fosforylace H2AX po inkubaci s 1,2 μ M DAU a DAUnol.....	38

5.1.2	Stanovení poškození DNA po preinkubaci s 1, 10 a 100 μM RES a následné expozici 1,2 μM DAU.....	39
5.1.3	Stanovení poškození DNA po preinkubaci s 0,1 a 1 μM GA a následné expozici 1,2 μM DAU.....	40
5.2	KOMETOVÝ TEST	41
5.2.1	Stanovení poškození DNA po inkubaci s 1,2 μM DAU a DAUnol	41
5.2.2	Stanovení poškození DNA po preinkubaci s 1, 10 a 100 μM RES a následné expozici 1,2 μM DAU.....	42
5.2.3	Stanovení poškození DNA po preinkubaci s 0,1 a 1 μM GA a následné expozici 1,2 μM DAU.....	43
6	DISKUZE	45
7	ZÁVĚR	52
8	SEZNAM ZKRATEK	53
9	LITERATURA	55

1 Úvod

Výzkumná skupina molekulární a buněčné toxikologie vedená prof. T. Šimůnkem se již řadu let věnuje studiu mechanismů léčivy indukované kardiovaskulární toxicity, především kardiotoxicitě antracyklinových antibiotik (ANT; daunorubicinu a doxorubicinu) a roli redoxně aktivního železa a ostatních kovů při oxidačním stresu a toxicitě. Mimo jiné se podílí i na vývoji a zkoumání potenciálních kardioprotektivních a protinádorových látek. Tato diplomová práce navazuje na předchozí výzkum týkající se kardiotoxického působení ANT, původně přisuzovaného působení reaktivních forem kyslíku na myokard. Tato teorie však byla vyvrácena a jako nové vysvětlení tohoto působení je diskutována interakce ANT s enzymem topoizomerasou II (TOP II), konkrétně izoformou II β .

TOP II je enzym, který mění topologii DNA za pomoci tvorby dvouřetězcových zlomů. U člověka se nacházejí dvě izoformy tohoto enzymu, které se příliš neliší svou strukturou, avšak liší se četností výskytu v různých typech buněk. Isoforma II α je exprimována především v dělicích se buňkách, jež mohou být i buňky nádorové, naproti tomu izoforma II β , se vyskytuje především v diferencovaných buňkách, kterými jsou právě například kardiomyocyty. Obě izoformy jsou poté cílem protinádorových léčiv, a to ze dvou skupin inhibitorů TOP II – topoizomerasových jedů a katalytických inhibitorů. Neselektivní působení jedu daunorubicinu na TOP II by mohlo být potenciální příčinou nežádoucí toxicity na srdeční buňky. Zástupcem katalytických inhibitorů je léčivo dexrazoxan, které je jedinou klinicky užívanou látkou pro prevenci a léčbu ANT vyvolané kardiotoxicity (Mody et al., 2023).

Na základě našich poznatků jsme stanovili pracovní hypotézu, že daunorubicin a jeho metabolit daunorubicinol (sekundární alkohol) budou působit poškození DNA neonatálních potkaních kardiomyocytů a látky působící jako katalytické inhibitory TOP II budou (stejně jako dexrazoxan) toto poškození snižovat. Jako zástupci katalytických inhibitorů byly použity přírodní látky – kyselina gambogová a resveratrol, které byly ve studiích prezentovány jako nové inhibitory TOP II (Lee et al., 2017; Wang & Chen, 2012).

Tato práce je součástí projektů Grantové agentury Univerzity Karlovy (GA UK 1674119, SVV 260 664) a Grantové agentury České republiky (21-16195S).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 DNA topoizomerasy

Velikost molekuly DNA a její uspořádání do dvoušroubovice vytváří během replikace, transkripce a dalších biologických pochodů topologické změny. Mezi ně patří nadšroubovicové vinutí/relaxace, katenace/dekatenace a uzlování/rozvazování DNA (Bush et al., 2015). Nadšroubovicové vinutí může být pozitivní (ve směru dvoušroubovice), či negativní (ve směru opačném) a často zásadně ovlivňuje buněčné procesy. Například navázání proteinů na DNA je závislé na negativním vinutí (Bush et al., 2015). Při replikaci DNA dochází před replikační vidličkou k pozitivnímu vinutí a tvorbě prekatenanů za replikační vidličkou. Tyto topologické problémy jsou řešeny enzymy ze skupiny DNA topoizomerasy, které mají schopnost tvořit přechodné zlomy DNA. V místě dočasného zlomu vzniká kovalentní vazba mezi fosfátovou skupinou DNA a tyrozinovým zbytkem enzymu (Champoux, 2004).

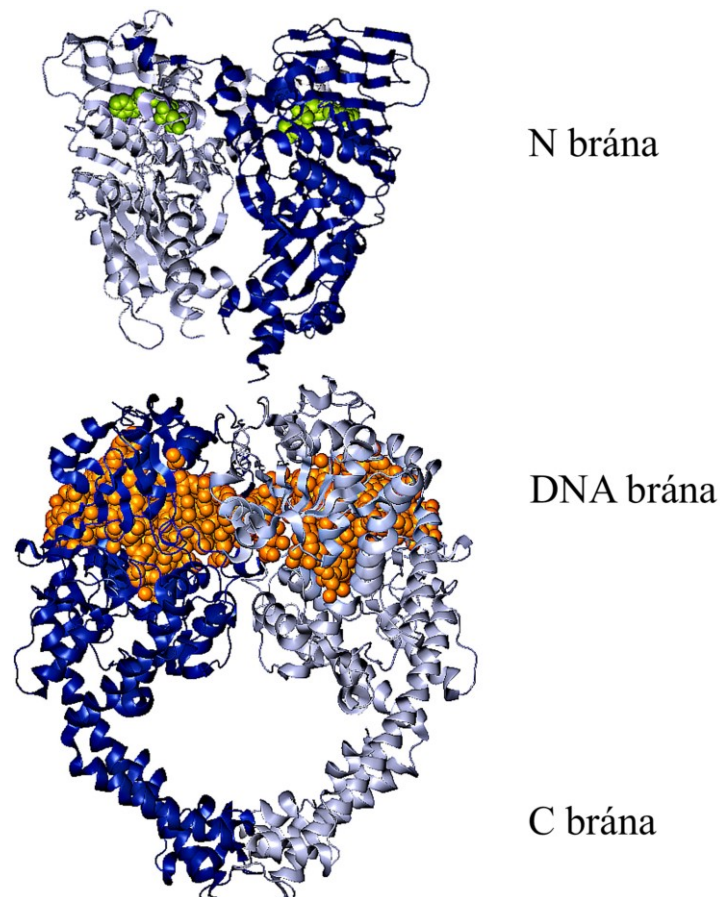
Existují dva typy topoizomerasy, typ I a typ II, které jsou definovány jejich reakčními mechanismy. Topoizomerasy I (TOP I) mění topologii DNA tvorbou přechodných jednořetězcových zlomů a usnadňují tak otáčení dvoušroubovice okolo zlomu nebo průchod vlákna zlomem (Vélez-Cruz & Osheroff, 2004). TOP I jsou dále klasifikovány dle toho, zda se enzym kovalentně váže fosfodiesterovou vazbou přes tyrozin na 5' konec DNA (typ IA), či na 3' konec (typ IB) (Champoux, 2004). Eukaryotní TOP II, patřící do podrodiny IIA, mají schopnost rozplétat uzly a spletnice v genetickém materiálu za pomoci dvouřetězcových zlomů (DSB), kterými může projít jiné neporušené vlákno DNA. TOP II jsou zodpovědné za správnou kondenzaci, kohezi a segregaci dceřiných chromozomů po replikaci DNA (DiNardo et al., 1984).

Oproti TOP I potřebuje TOP II k dokončení svého katalytického cyklu dva kofaktory – dvojmocný kationt (*in vivo* Mg^{2+}) a ATP. Navázání ATP není nezbytné pro vazbu ani štěpení DNA, ale pohání průchod řetězce zlomem a v dalším kroku je jeho hydrolýza na ADP a inorganický fosfát (P_i) nezbytná pro recyklaci enzymu (Vélez-Cruz & Osheroff, 2004).

U obratlovců se vyskytují dvě izoformy TOP II – II α a II β , které se liší kromě jiného také rozdílnou mírou exprese podle fází buněčného cyklu (Gonzalez et al., 2011). Exprese TOP II α je nejvyšší v G₂ a M fázi buněčného cyklu, nachází se tedy především v proliferujících buňkách. TOP II β se oproti tomu vyskytuje ve všech buňkách a její

exprese je zpravidla konstantní během celého buněčného cyklu (Vélez-Cruz & Osheroff, 2004). Savčí TOP II α a II β jsou homodimerní enzymy s vysokou podobností v pořadí aminokyselin (~70 % aminokyselin je identických) s podobnými molekulovými hmotnostmi (170, respektive 180 kDa) (Drake et al., 1989a). U člověka jsou kódovány geny, které se nachází na odlišných chromozomech (17, respektive 3) (Tan et al., 1992).

Struktura TOP II (Obr. 1) může být rozdělena do několika proteinových domén. Na N-konci se nachází místo pro navázání a hydrolýzu ATP. Centrální část nese doménu TOPRIM (topoizomerasa/primasa) a doménu pro vazbu DNA, které jsou důležité pro štěpení a spojení DNA. V tomto procesu hraje důležitou roli tyrozin v aktivním místě, nacházející se na pozici 805 u TOP II α a 821 u TOP II β . C-koncová část obsahuje místa, která jsou nezbytná pro jadernou lokalizaci, regulaci enzymové aktivity posttranslačními úpravami a regulaci enzymové funkce interakcemi mezi proteiny (Nitiss, 2009a)



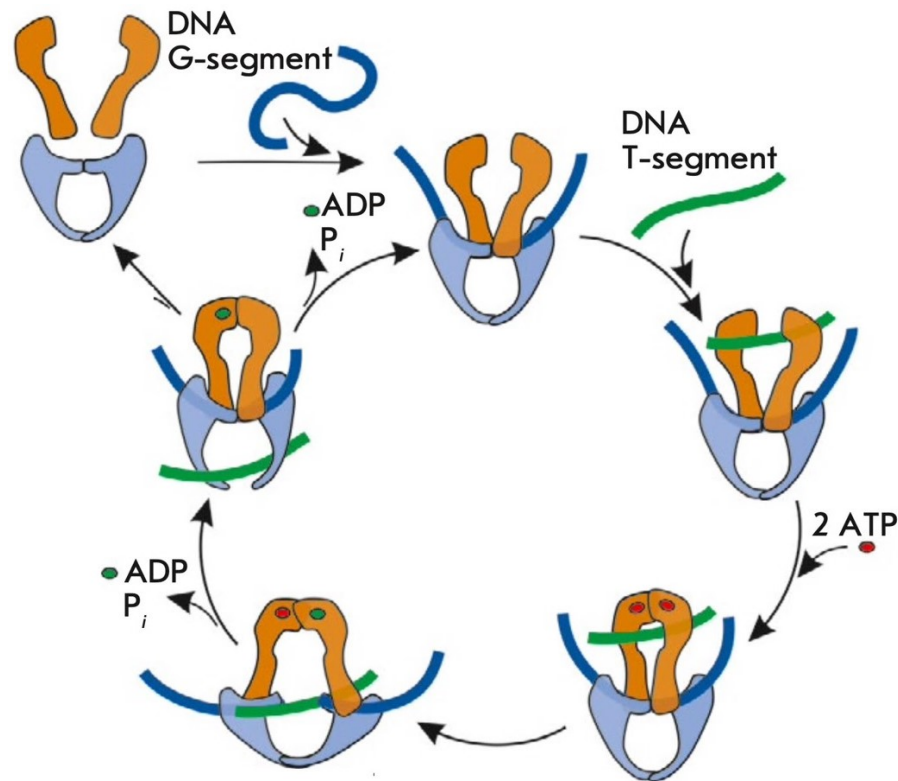
Obr. 1: Struktura TOP II.

Struktura TOP II s navázanou DNA. Zelené kuličky znázorňují analog ATP, oranžové kuličky znázorňují navázanou DNA. Převzato a upraveno: Vávrová and Šimůnek (2012)

2.2 Katalytický cyklus TOP II

TOP II mění topologii DNA za pomoci štěpení fosfodiesterových vazeb molekul DNA (Champoux, 2004). V jedné části řetězce DNA, který nazýváme G-segment (z angl. gate) je vytvořen DSB, kterým je transportováno druhé vlákno neporušené DNA označované jako T-segment (z angl. transported) (Sutormin et al., 2021).

Katalytický cyklus (Obr. 2) začíná navázáním enzymu na dvouvláknovou DNA (na G-segment) pomocí části zvané DNA brána. Navázání TOP II způsobí ohnutí DNA, přičemž TOP II se preferenčně váže na místa, která jsou již ohnuta, nebo se dají snadno ohnout díky přítomnosti nadšroubovicového vinutí. Do části enzymu zvané N brána vstupuje druhé vlákno DNA (T-segment). Ve druhém kroku jsou navázány dvě molekuly ATP na N bránu (N-koncový fragment) a dochází k dimerizaci ATPasové domény a uzavření N brány okolo T-segmentu. (Sutormin et al., 2021). V přítomnosti Mg^{2+} dojde k rozštěpení G-segmentu (Sehested & Jensen, 1996) za vzniku dvou 5'-fosfotyrosinových meziproduktů, což umožní transport T-segmentu skrz dočasný zlom (Sutormin et al., 2021). Hydrolyza první molekuly ATP v tomto procesu urychlí přenos vlákna skrz zlom (Baird et al., 1999). Po přenosu je dočasný zlom znovu spojen, C brána enzymu otevřena a T-segment uvolněn. Druhá molekula ATP hraje roli v navrácení enzymu do počátečního stavu, aby mohl začít nový cyklus (Osheroff et al., 1983).



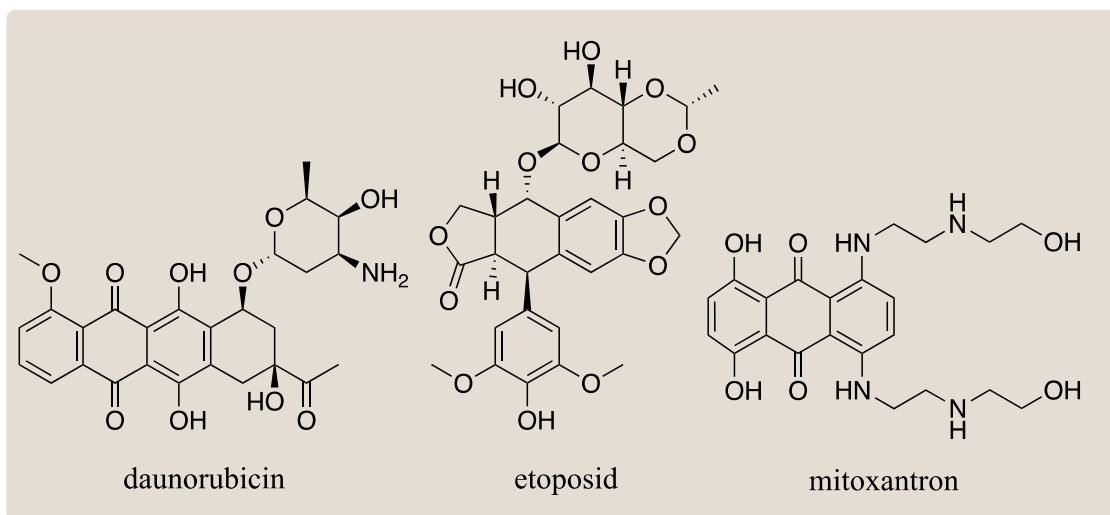
Obr. 2: Schéma katalytického cyklu TOP II. Schéma ukazuje následující kroky: navázání TOP II na G-segment (modrý), vstup T-segmentu (zelený), navázání a hydrolyza molekul ATP (červené kuličky), rozštěpení/spojení G-segmentu a průchod T-segmentu, uvolnění T-segmentu. (N brána – oranžová, C brána – modrá)
Převzato a upraveno: Sutormin et al. (2021)

2.3 Látky ovlivňující funkci TOP II

Z podstaty reakčního mechanismu TOP II je zřejmé, že nejdůležitějším krokem katalytického cyklu je vytvoření DSB v DNA. Tyto zlomy jsou u zdravých buněk přítomné jen krátkou dobu a v nízkém počtu, díky čemuž nepředstavují za normálních podmínek žádné nebezpečí. Pravdou však je, že každý proces, který generuje DSB může být hrozbou pro stabilitu genomu. Pokud dojde k výraznému navýšení fyziologické koncentrace komplexů TOP II-DNA v buňce, může to vést k mutagenезi, zvýšené rekombinaci, či k translokacím nebo rozpadu chromozomů. Při přítomnosti velkého množství DSB způsobených TOP II může také buňka iniciovat apoptózu (Fortune & Osheroff, 2000). Právě na tyto jevy cílí mnoho protinádorových léčiv.

2.3.1 TOP II jedy

Topoizomerasové jedy, jinak nazývané také jako "klasické inhibitory" způsobují stabilizaci kovalentně vázaných komplexů TOP II-DNA, čímž prakticky mění enzym TOP II v buněčný toxin, který po sobě v DNA zanechává DSB. Látky z této skupiny tvoří jeden z hlavních pilířů protinádorové chemoterapie (Cortés et al., 2007) a jsou používány pro léčbu mnoha malignit, jako jsou leukémie, lymfomy, rakoviny prsu či plic (Nitiss, 2009b). Mezi klinicky významná protinádorová léčiva z této skupiny (Obr. 3) patří ANT (daunorubicin, doxorubicin), deriváty podofylotoxinu (etoposid, teniposid) a antracendion (mitoxantron) (Cortés et al., 2007). Mnohá z těchto léčiv jsou v klinickém použití limitována jejich nežádoucími účinky, jako je kardiotoxicita, či vznik sekundárních malignit (Nitiss, 2009b). Proto je vyvíjena snaha o nalezení specifitějších a méně toxických TOP II jedů, či alternativních inhibitorů TOP II, které přímo nevyvolávají poškození DNA (Pommier et al., 2010).



Obr. 3: Struktury klinicky významných TOP II jedů

2.3.1.1 Etoposid

Již okolo roku 900 byly kořeny rostlin s obsahem podofylotoxinů používány k léčbě rakoviny. O tisíc let později byl podofylotoxin izolován z kořenů rostliny *Podophyllum peltatum* (Noholist štítnatý) a následně zkoumán na zvířecích modelech, kdy se ukázalo, že je velmi toxický. Následně byly objeveny semisyntetické deriváty teniposid a etoposid (ETO) (Kim et al., 2016). ETO měl oproti teniposidu výhodu v tom, že byla možná jeho perorální aplikace (Keller-Juslen et al., 1971).

Později bylo zjištěno, že cytotoxicita ETO je dána jeho schopností působit na TOP II (Ross et al., 1984). ETO je klasickým TOP II jedem, který stabilizuje TOP II-DNA kovalentní komplex, konkrétně zabraňuje opětovnému spojení DNA (Montecuccio et al., 2015). V novějších studiích bylo také zjištěno, že dalším možným cílem ETO by mohl být chromatin a konkrétně histon H1, ke kterému má ETO vysokou afinitu (Chamani et al., 2014).

ETO byl na konci 20. století schválen americkou Food and Drug Administration (FDA) pro terapii rakoviny varlat a nemalobuněčné rakoviny plic (Kim et al., 2016). Ačkoliv je léčba TOP II jedy, jako je ETO, vysoce účinná, vyskytují se u ní nežádoucí účinky, např. vznik sekundárních leukémií, které jsou často charakteristické přítomností specifických chromosomálních translokací. Také molekulární mechanismy vzniku těchto nežádoucích účinků nejsou zcela objasněny (Fortune & Osheroff, 2000), nicméně jedním z důležitých faktorů se zdá být právě tvorba DSB v prostorově blízkých genech s následnou translokací (Cowell & Austin, 2012).

2.3.1.2 Antracyklinová antibiotika

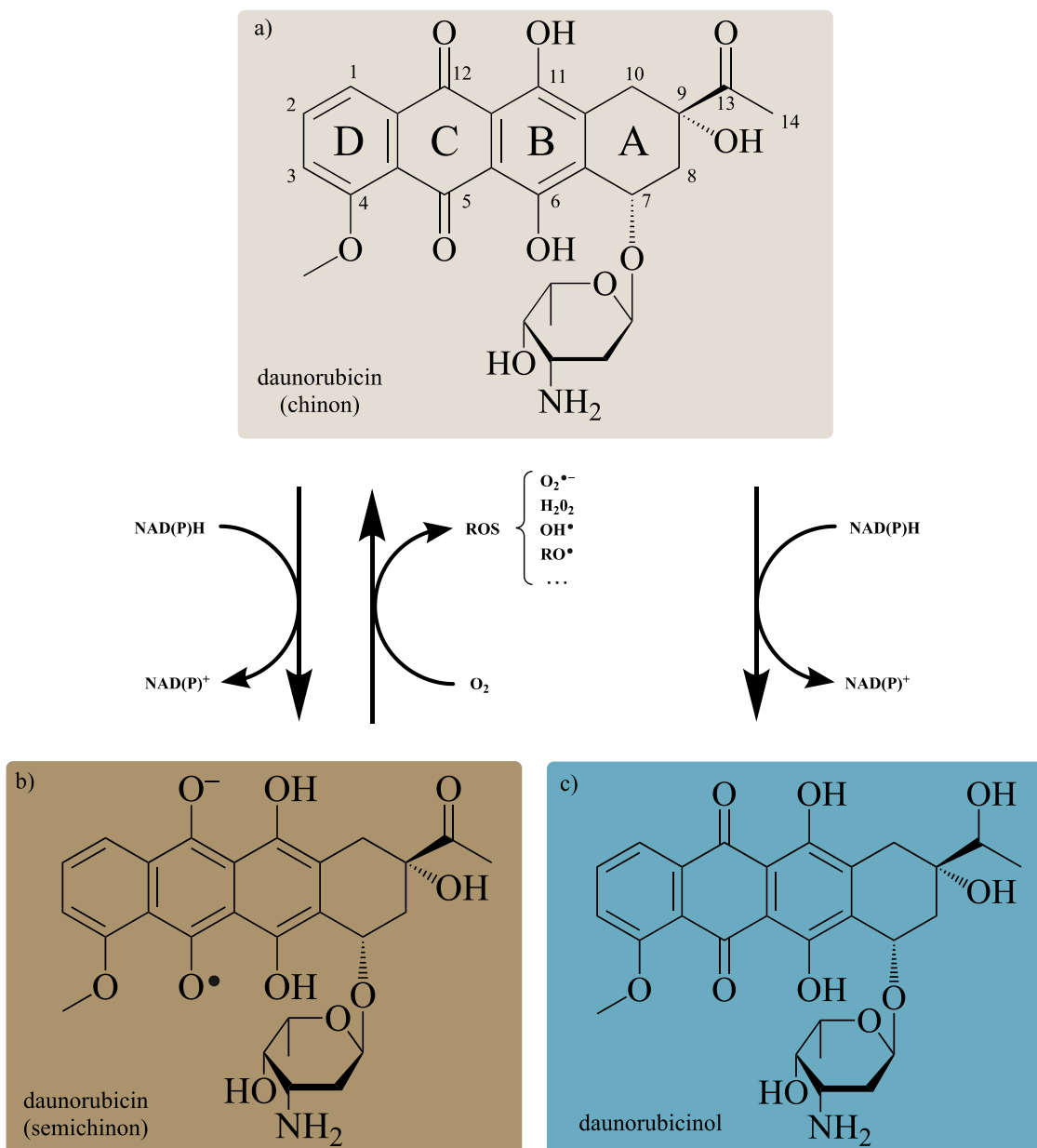
Antracyklinová antibiotika se řadí mezi nejefektivnější protinádorová léčiva vůbec (Weiss, 1992). První ANT byly izolovány z bakterií *Streptomyces peucetius* na začátku 60. let 20. století a byly pojmenovány daunorubicin (DAU) a doxorubicin (DOX) (Minotti et al., 2004). Od roku 1979, kdy byl DAU schválen FDA, je využíván jako lék na akutní myeloidní a akutní lymfoblastickou leukémii. DOX je kromě hematologických malignit účinný také při léčbě rakoviny prsu, žaludku, vaječníku, štítné žlázy, či Hodgkinova lymfomu (Kim et al., 2016).

Struktura ANT (Obr. 4a) má dvě části – aglykon a cukerný zbytek. Aglykon se skládá z tetracyklického kruhu se sousedními chinon-hydrochinonovými skupinami v kruzích C-B, s krátkým postranním řetězcem na C-9, s karbonylem na C-13, a methoxy substituentem na C-4 v kruhu D. Cukerný zbytek navázaný glykosidickou vazbou k C-7 v kruhu A se nazývá daunosamin a skládá se z 3-amino-2,3,6-trideoxy-L-fukosylového zbytku (Minotti et al., 2004).

Mechanismus účinku ANT byl po mnoho let velmi kontroverzním tématem. ANT patří mezi tzv. interkalační topoizomerasové jedy. Vmezeřují se do DNA svou antrachinonovou částí, což má za následek inhibici syntézy DNA a RNA. Během toho se cukerná část molekuly dostává do malého žlábků DNA a soutěží o místo s histony.

V důsledku toho dochází k vypuzení histonů z nukleosomů a poškození chromatinu. ANT také stabilizují kovalentní komplex TOP II-DNA, čímž zabraňují opětovnému spojení vláken rozštěpeného řetězce DNA, což ústí v DSB a aktivaci komplexních mechanismů reakce na poškození DNA (DNA damage response) (van der Zanden et al., 2021). Účinek ANT na nádorové buňky je přisuzován především inhibici TOP II α (Zhang et al., 2012), která je nejvíce exprimována v rychle se dělících buňkách (Vélez-Cruz & Osheroff, 2004). V neposlední řadě produkují ANT reaktivní formy kyslíku (ROS), které mohou způsobit oxidativní poškození různých buněčných struktur jako jsou lipidy, proteiny a DNA (van der Zanden et al., 2021). Chinonová část v kruhu C se po dodání elektronu oxidoreduktázou (cytochrom P450 reduktasa, xantin oxidasa a mitochondriální NADH dehydrogenasa) mění na semichinon (Obr. 4b) (Vásquez-Vivar et al., 1997), který je rychle regenerován na chinon redukcí kyslíku na ROS, jako je například superoxidový či hydroxylový radikál. Během této reakce může oxidací semichinonu vazbou mezi kruhem A a daunosaminem také dojít k reduktivní deglykosidaci (Minotti et al., 2004). Kromě toho mohou ANT produkovat ROS také přímým zásahem do metabolismu železa (van der Zanden et al., 2021).

DAU a ostatní ANT podléhají v organismu dvouelektronové redukci karbonylové části postranního řetězce C-13 za vzniku sekundárních alkoholových metabolitů – daunorubicinolu (DAUnol), doxorubicinolu (DOXol), aj. (Obr. 4c) (Minotti et al., 2004). Tato metabolická reakce je zprostředkována NADPH dependentními cytoplasmatickými aldo-/keto- a karbonyl-reduktasami (Mordente et al., 2003). Metabolit DAUnol má také cytotoxický účinek, který je však oproti parentnímu DAU nižší (Bains et al., 2013) a je výrazně polárnější, což ovlivňuje jeho extracelulární i intracelulární distribuci (Minotti et al., 2004).



Obr. 4: Metabolismus DAU a tvorba ROS

a) DAU ve formě chinonu b) DAU redukovaný na semichinon c) metabolit DAUnol

Úskalí užití DAU spočívá v jeho nežádoucích účincích, jako je poškození tkání při eventuální extravazaci, leukopenie, alopecie, nauzea či toxické působení na myokard. To patří k nejzávažnějším nežádoucím účinkům ANT a může se projevovat formou akutní, subakutní, nebo chronickou. Bezprostředně po zahájení léčby se u pacientů projevují arytmie a hypotenze. Tyto nežádoucí účinky jsou vysvětlovány především formací ROS, popsanou výše. Po dokončení dlouhodobé léčby se rozvíjí chronická kardiomyopatie, která přechází v městnavé srdeční selhání. Tato toxicita je závislá na dávce, přičemž prudce stoupá při kumulativních dávkách $\geq 550 \text{ mg/m}^2$ (Mordente et

al., 2003). Dle dřívějších předpokladů byla chronická toxicita ANT způsobena formací ROS (Singal & Iliskovic, 1998). Tato hypotéza však byla vyvrácena řadou studií, kdy léčba zhášeci ROS nebo chelátory železa nevedla k ochraně vůči kardiotoxickým účinkům ANT (Jirkovský et al., 2021; Martin et al., 2009). Dnes je tato toxicita přisuzována především interakcím ANT s TOP II β , která je hlavní izoformou TOP II v kardiomyocytech (Capranico et al., 1992) a jiných nedělicích se buňkách (Vélez-Cruz & Osheroff, 2004). To potvrzuje i studie, ve které specifická delece genu kódujícího TOP II β v kardiomyocytech ochránila myši před vznikem progresivního srdečního selhání (Zhang et al., 2012).

2.3.1.3 Mitoxantron

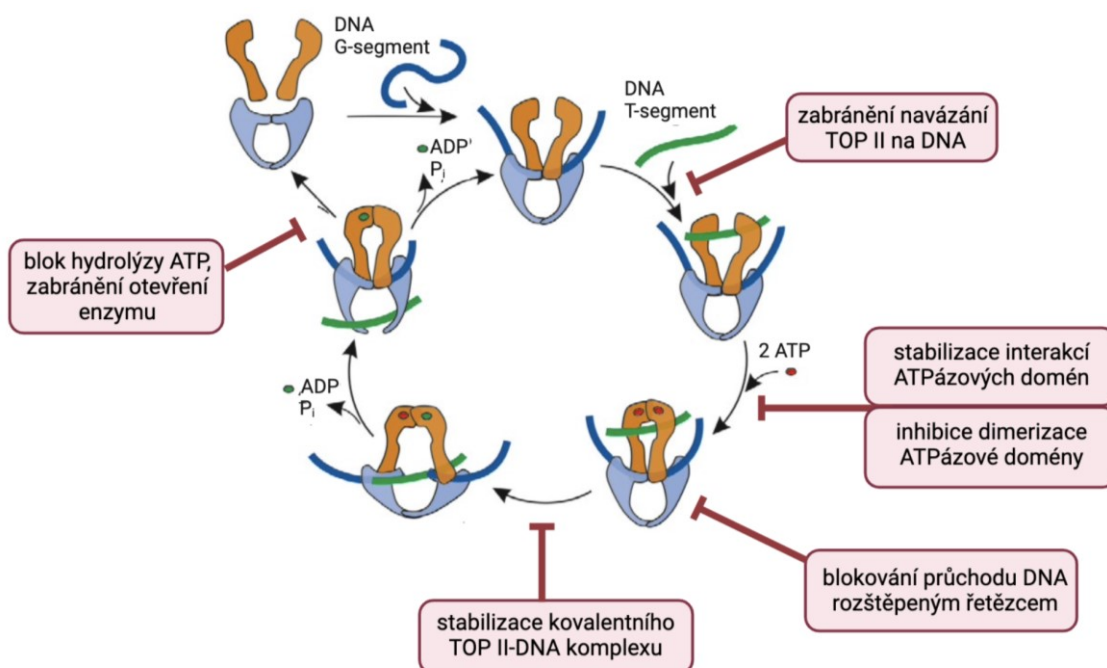
Mitoxantron (MTX) je syntetický derivát antracendionu, který byl objeven v návaznosti na výzkum toxicity a chemické syntézy ANT (Ehninger et al., 1990). Vyznačuje se dobrou protinádorovou aktivitou proti mnoha typům leukémií, lymfomů, či rakovině prsu (Durr, 1984, 1988; Johnson et al., 1979). Zároveň je pro svůj immunomodulační účinek používán pro léčbu roztroušené sklerózy (Scott & Figgitt, 2004).

MTX inhibuje obě izoformy TOP II a je také tzv. interkalačním inhibitorem (Errington et al., 2004). Mezi jeho další mechanismy účinku patří inhibice proliferace a indukce apoptózy u B a T lymfocytů (Fidler et al., 1986), inhibice proliferace makrofágů a snížení sekrece IFN- γ , TNF- α a IL-2 (Maghzi et al., 2011). Jeho klinické využití je podobně jako u ANT limitováno kardiotoxicitou. Při stejné klinicky ekvivalentní dávce je však kardiotoxicita oproti ANT o něco nižší (Damiani et al., 2016).

2.3.2 Katalytické inhibitory TOP II

Katalytické inhibitory jsou skupinou strukturně rozdílných látek, které zasahují do různých stádií katalytického cyklu TOP II (Larsen et al., 2003). Oproti TOP II jedům neprodukují DSB stabilizací TOP II-DNA kovalentních komplexů. Mechanismus účinku těchto látek zahrnuje například inhibici navázání enzymu na DNA; vazbu na místo pro ATP; inhibici štěpení vláken DNA, či blokaci hydrolýzy ATP a zabránění otevření enzymu na konci katalytického cyklu (Obr. 5) (Pogorelnik et al., 2013). V novějších studiích bylo zjištěno, že i některé TOP II jedy (ANT, MTX) ve vyšších koncentracích působí jako inhibitory a mění aktivitu TOP II, což ve výsledku může snižovat účinek jiných současně podávaných TOP II jedů (Atwal et al., 2019).

Mezi nejstudovanější a zároveň jediné klinicky užívané látky patří analoga bisdioxopiperazinu (dexrazoxan) (Pogorelcnik et al., 2013). Jako katalytické inhibitory TOP II působí také řada přírodních produktů, jako jsou deriváty xantonu (kyselina gambogová), či polyfenol resveratrol.



Obr. 5: Mechanismy působení katalytických inhibitorů TOP II a topoizomerázových jedů
Převzato a upraveno: Sutormin et al. (2021)

2.3.2.1 Dexrazoxan

Dexrazoxan (DEX, označován také jako ICRF-187) je cyklickým analogem chelátátoru železa kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) a v organismu se hydrolyzuje na molekulu ADR-925, která je EDTA strukturně podobná. Molekula ADR-925 má schopnost chelátovat železo (Dong & Berger, 2007) a tradiční hypotéza předpokládala, že může zabraňovat oxidačnímu působení vyvolanému DOX (Hasinoff et al., 1995). DEX je také schopen katalyticky inhibovat lidskou TOP II, nespecificky ovlivňuje obě izofomy (Pogorelcnik et al., 2013). V katalytickém cyklu zasahuje DEX do hydrolyzy ATP, kdy přemostňuje a stabilizuje dimer tvořený ze dvou ATPasových jednotek. Tím je zabráněno otevření enzymu s navázaným ATP (Classen et al., 2003; Morris et al., 2000).

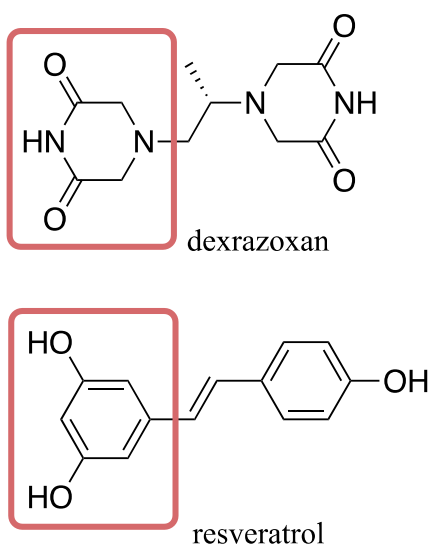
Z popsaných mechanismů plyne i terapeutické použití DEX. Dlouhodobě je jedinou klinicky používanou látkou pro prevenci a terapii ANT-navozené kardiotoxicity

(Mody et al., 2023), přičemž bylo v posledních letech zjištěno, že za kardioprotektivní účinek DEX není odpovědná chelatační schopnost jeho metabolitů, ale právě jeho schopnost inhibovat TOP II β (Jirkovský et al., 2021). DEX je možné využít i pro terapii akutní extravazace způsobené ANT (Mouridsen et al., 2007).

2.3.2.2 Resveratrol

Resveratrol (RES) je přírodní polyfenol, který se vyskytuje v hroznech, červeném víně, arašidech, či sušených kořenech rostliny *Polygonum cuspidatum*, která se odedávna používá v tradiční orientální medicíně (Sergides et al., 2016). U zvířat vykazuje RES antioxidační, protizánětlivé, kardioprotektivní, anti-diabetické, protistárnoucí a antikancerogéní účinky (Bertelli & Das, 2009; Meng et al., 2021). U člověka byly protirakovinné účinky RES prokázány na buněčné linii rakoviny děložního čípku HeLa, kdy RES inhiboval proliferaci a indukoval apoptózu skrze aktivaci mitochondriální signální dráhy, zvýšením hladin kaspasy-3/-9 a zvýšením (či snížením) exprese několika buněčných proteinů (např. p53) (Li et al., 2018).

Chemická struktura RES do jisté míry objasňuje i některé z jeho mechanismů působení. Antioxidační efekt je dán tím, že RES ve své struktuře obsahuje tři hydroxy-skupiny a je proto schopen vychytávat ROS a chelatovat ionty železa (Salehi et al., 2018). Z jeho chemické podobnosti s DEX (Obr. 6) poté vznikla a byla potvrzena hypotéza, že by RES mohl inhibovat TOP II podobným způsobem jako DEX. Později bylo zjištěno, že RES inhibuje TOP II zabráněním dimerizace ATPasové domény (Lee et al., 2017).



Obr. 6: Strukturální podobnost DEX a RES
Shora: chemický vzorec DEX, RES; červeně vyznačena podobnost ve strukturách

Při studiu mechanismu účinku bylo zjištěno, že merbaron nemá vliv na vazbu TOP II na DNA, ani na hydrolyzu ATP, ale že inhibuje enzymem zprostředkované štěpení DNA (Fortune & Osheroff, 1998). Bylo dokázáno, že merbaron je selektivní inhibitor lidské TOP II α (Drake et al., 1989a) a zároveň 10 \times potentnější inhibitor TOP II α oproti TOP I (Drake et al., 1989b).

2.3.2.5 Aklarubicin

Aklarubicin patří do skupiny ANT, avšak oproti ostatním zástupcům působí jako katalytický inhibitor, který interkalací DNA brání vazbě TOP II na DNA (Sørensen et al., 1992). Stejným mechanismem působí i na TOP I (Sørensen et al., 1994).

Užívá se při léčbě akutní myeloblastické leukémie (Case Jr et al., 1987a) a lymfomů (Case Jr et al., 1987b). Podobně jako u jiných zástupců ze skupiny ANT je aklarubicin limitován toxicitou na srdce. Během II. fáze klinického testování vyvolal u dospělých pacientů léčených s refrakterní akutní myelogenní či lymfoblastickou leukémií pozdní srdeční příhody (Dabich et al., 1986).

2.3.2.6 Suramin

Suramin je polyanionická látka původně vyvinutá pro léčbu onchocerkózy (onemocnění vyvolané *Onchocerca volvulus*) a africké trypanozomiázy (onemocnění způsobené bičíkovci rodu *Trypanosoma*) (Eisenberger & Reyno, 1994). Suramin byl nejdříve zkoumán jako léčivo pro terapii HIV, avšak během studií se ukázal jeho pozitivní vliv na Kaposiho sarkom, non-hodgkinův lymfom (Cheson et al., 1987) a později i na další typy nádorových onemocnění (Stein et al., 1989). Jeho působení na tato nádorová onemocnění bylo pravděpodobně způsobeno především jeho antagonistickým účinkem na růstové faktory (Pollak & Richard, 1990), avšak u pacientů nedocházelo ke kompletní remisi a postupně bylo od dalšího testování suraminu jako protinádorové terapie upouštěno (Wiedemar et al., 2020).

Suramin působí nejen inhibicí katalytické aktivity TOP II a zabráněním vazby enzymu na DNA (Bojanowski et al., 1992), ale díky své chemické struktuře také inhibicí mnoha dalších proteinů (glykolytické enzymy, enzymy Krebsova cyklu, DNA i RNA polymerasy, reverzní transkriptasy atd.) (Wiedemar et al., 2020).

2.3.2.7 Analoga purinu

Objemnou skupinou látek cílících na TOP II jsou sloučeniny založené na struktuře purinu. Americký NCI zkoumal bezmála 2 000 struktur, mezi kterými byla purinová analoga substituovaná na O⁶, či thiopurinová analoga s volnými nebo S⁶ substituovanými SH skupinami a další jinak substituované puriny (Jensen et al., 2005). Sloučeniny založené na struktuře purinu byly navrženy tak, aby mohly snadno interagovat s místem na TOP II pro vazbu ATP a tím inhibovat katalytický cyklus (Furet et al., 2009).

Jednou z nalezených látek byl NSC35866, S⁶-substituovaný analog thioguaninu, který působil *in vitro* a na nádorové buňky jako TOP II katalytický inhibitor. Zároveň se ukázalo, že je NSC35866 schopný i chránit buňky před ETO indukovanou cytotoxicitou (Jensen et al., 2005).

Furet a kol. (2009) navrhli a syntetizovali další purinový základ 9H-purin-2,6-diamin, jehož analoga se *in silico* jevila jako vhodný prototyp pro nové katalytické inhibitory TOP II. Sloučeniny na bázi 9H-purin-2,6-diaminu jako inhibitory TOP II se vyskytly i v patentové přihlášce firmy Novartis (Baenteli et al., 2007).

Jiná výzkumná skupina zkoumala cyklický 8-chloro-adenosin-3',5'-monofosfát, který je konvertován na 8-chloro-adenosin a dále v buňkách fosforylován na 8-chloro-ATP. Tato sloučenina vykazovala *in vitro* inhibici TOP II α a to kompetitivní inhibicí s ATP (Yang et al., 2009).

2.4 Metody stanovení poškození DNA

Některé z látek, které jsou zmíněny v předešlé části textu jsou účinné genotoxické látky, které způsobují poškození DNA a podporují apoptotickou smrt nádorových buněk. Pro studium těchto látek, zejména detekci, analýzu a kvantifikaci poškození DNA, ale i pro následné rozpoznání a analýzu reparačních mechanismů je klíčové mít k dispozici především efektivní metody.

Škála metod pro stanovení poškození DNA je opravdu široká, můžeme zde zahrnout různé modifikace polymerázové řetězové reakce; stanovení exprese reparačních proteinů – např. XRCC1, γ -H2AX, Ku 80; kometový test; fluorescenční *in situ* hybridizaci; radioimmunoassay; ELISA (z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay), či některé analytické metody jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie/plynová chromatografie s hmotnostní detekcí nebo elektrochemické metody (Figuroa-González

& Pérez-Plasencia, 2017). V této práci je uveden detailnější popis k metodám, které byly použity v praktické části.

2.4.1 Metody detekující a kvantifikující fosforylovaný histon H2AX

DNA v jádře eukaryot je kondenzováno do vysoce organizovaného vlákna – chromatinu, jehož základní strukturální jednotkou je kulovitá částice, která se nazývá nukleosom. Okolo jádra nukleosomu, které má strukturu oktameru složeného z histonů, je ovinutá DNA. Oktamer obsahuje vždy dvě molekuly histonu H2A, H2B, H3 a H4. Jednou z variant rodiny H2A je i histon H2AX, který se od ostatních odlišuje tím, že má na 4. pozici od C-konce aminokyseliny serin (Řezáčová et al., 2011).

Lidský histon H2AX je v reakci na vznik DSB fosforylován na serinu v pozici 139, přítomnost fosforylace se někdy označuje řeckým písmenem gamma - γ -H2AX (Rogakou et al., 1998) Tato fosforylace je signálem k aktivaci reparačních proteinů v reakci na poškození DNA (Cruet-Hennequart et al., 2012). Fosforylace probíhá třemi kinasami (ataxia telangiectasia mutovaná (ATM), ataxia teleangiectasia a Rad related (ATR) a DNA-dependentní proteinkinasa (DNA-PK)) a její míra odpovídá množství DSB (Řezáčová et al., 2011).

Pro detekci a kvantifikaci γ -H2AX je následně využívána imunodetekce primární protilátkou, která může být provedena buď imunocytochemicky s vizualizací mikroskopem, průtokovou cytometrií a nebo SDS-PAGE s western blotem a imunodetekcí (Řezáčová et al., 2011).

2.4.2 Kometový test

Kometový test (Comet assay) je jednoduchou, citlivou a poměrně univerzální metodou, kterou lze použít pro měření poškození DNA v eukaryontních buňkách (Azqueta & Collins, 2013). Svě jméno si získal díky obrazům DNA jednotlivých buněk, které pod mikroskopem připomínají kometu. Nazývá se také jako gelová elektroforéza jednotlivých buněk (single-cell gel electrophoresis) (Azqueta & Collins, 2013).

Vlákna DNA uložená v jádře buňky jsou během kometového testu imobilizována na agarózovém gelu. Každá molekula DNA je v jádře nadšoubovicově svinuta a pokud v ní byl vytvořen zlom (jednořetězcový, či dvouřetězcový), tak je po lýze buněk detergentem s vysokým obsahem soli umožněno unášení takto rozvolněné DNA elektrickým proudem směrem k anodě. Čím více zlomů je v DNA, tím více smyček je

uvolněno a o to větší je pak obraz (konkrétně chvost), tvořící tzv. kometu, která je po obarvení pozorovatelná pod fluorescenčním mikroskopem (Azqueta & Collins, 2013).

Kometový test je možné využít pro studium poškození a reparace DNA. Běžná varianta tohoto testu reaguje na množství zlomů vytvořených v DNA. Test je však možné upravit přidáním enzymů specifických pro poškození, které vytváří zlom DNA v místě poškození, díky čemuž lze studovat např. i oxidované a alkylované báze (Azqueta & Collins, 2013).

3 Cíle práce

- Stanovení vlivu DAU (1,2 μM) a jeho metabolitu DAUnol (1,2 μM) na poškození DNA u NRCM pomocí imunodetekce $\gamma\text{-H2AX}$ a kometového testu při různých délkách expozice
- Stanovení poškození DNA vyvolané RES (1; 10; 100 μM) a jeho potenciál snížit poškození DNA vyvolané DAU (1,2 μM) u NRCM pomocí imunodetekce $\gamma\text{-H2AX}$ a kometového testu
- Stanovení poškození DNA vyvolané GA (0,1; 1 μM) a její potenciál snížit poškození DNA vyvolané DAU (1,2 μM) u NRCM pomocí imunodetekce $\gamma\text{-H2AX}$ a kometového testu

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Neonatální potkaní kardiomyocyty

Neonatální potkaní kardiomyocyty (NRCM) jsou primární kulturou nenádorových, terminálně diferencovaných buněk, které jsou izolované ze dva dny starých potkanů. Charakteristické jsou pro ně rytmické kontrakce. NRCM představují model srdeční tkáně a v *in vitro* experimentech dovolují zkoumat biochemické, morfologické a elektrofyziologické vlastnosti srdce. Výhodou izolované kultury je vyšší množství vzorků z jedné izolace, lze tedy provést hned několik *in vitro* studií za použití menšího množství zvířat (Chlopčíková et al., 2001).

4.1.2 Přístrojové vybavení

- Box s laminárním prouděním vzduchu TopSafe 1.2 (BioAir, Itálie)
- CO₂ inkubátor MCO-19AIC (SANYO Electric, Japonsko)
- Stolní třepací inkubátor NB-205 (N-Biotek, Korea)
- Vodní lázeň Memmert WB 14 LV (Memmert, Německo)
- Inverzní fluorescenční mikroskop Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- Hlubokomrazicí box ULUF 750-2M (Arctiko, Dánsko)
- Bürkerova komůrka (Neubauer Improved, Německo)
- Laboratorní třepačka Vortex V-1 Plus (BioSan, Litva)
- Minicentrifuga Z 100 M (Hermle LaborTechnik GmbH, Německo)
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Spektrofotometr Tecan Infinite 200M Pro (Tecan, Švýcarsko)
- Vertikální elektroforetický systém Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Zobrazovací systém ChemiDoc MP + ImageLab software (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Transferový systém Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Základní zdroj PowerPac (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Japonsko) s kamerou Zyla sCMOS (Andor, Irsko)

4.1.3 Chemikálie

- Daunorubicin (Pfizer, Švýcarsko)
- Daunorubicinol (Katedra organické a bioorganické chemie, FAF)
- Kyselina gambogová (Milipore, USA)
- Resveratrol (Merck, Německo)
- DMEM/F12 médium (Merck, Německo)
- FBS, fetální bovinní sérum (Merck, Německo)
- 1% Pen/Strep, roztok penicilinu a streptomycinu (Lonza, Švýcarsko)
- HS, koňské sérum (Merck, Německo)
- PBS tablety, fosfátem pufovaný solný roztok připraven dle návodu výrobce použitím redestilované vody, sterilizováno autoklávem (Merck, Německo)
- ADS pufr, sterilní, (1,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 116 mM NaCl; 5,3 mM KCl; 1,13 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 20 mM HEPES; 1 g/l glukóza; rozpuštěné v redestilované vodě, pH upravené na 7,4)
- DIG, Digesční roztok, sterilní, (80 U/ml kolagenáza typu II (Invitrogen, USA); 0,4 mg/ml pankreatin (Merck, Německo); 1 mg/ml glukóza (Merck, Německo); rozpuštěné v ADS pufru)
- S-médium, sedací médium, (médium DMEM/F12; 4 mM pyruvát sodný (Merck, Německo); 10 % HS; 5 % FBS; 1 % Pen/Strep)
- V-médium, vyměňovací médium, (médium DMEM/F12; 4 mM pyruvát sodný; 5 % FBS; 1 % Pen/Strep)
- E-médium, expoziční, (médium DMEM/F12; 1 % Pen/Strep)
- Želatina z vepřové kůže, 1% roztok v redestilované vodě (Merck, Německo)
- Accutasa (Life Technologies, USA)
- BSA, hovězí sérový albumin, 10 mg/ml roztok v SDS-Tris (MP Biomedicals, Francie)
- Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethan, ultra čistý (MP Biochemicals, USA)
- SDS, dodecylsírán sodný (Carl Roth, Německo)
- 2% SDS-Tris, (0,1 M Tris, pH 7,5)
- QPRO-BCA kit Standard – 1% BCA (Cyanagen, Itálie)
- QPRO-BCA kit Standard – 4% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Cyanagen, Itálie)
- TGX Stain-Free FastCast 12% akrylamidový kit (Bio-Rad Laboratories, USA)

- APS, peroxodisíran amonný, 10% roztok (Bio-Rad Laboratories, USA)
- TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (Bio-Rad Laboratories, USA)
- TGS, elektroforézový pufr (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) (Bio-Rad Laboratories, USA)
- 5× koncentrovaný nanášecí pufr LSB bez SDS (300 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 25 % β-merkptoethanol, 0,1 % bromfenolová modř, 50 % glycerol)
- Kaleidoscope™, proteinový standard (Bio-rad Laboratories, USA)
- Transferový pufr, Trans-Blot Turbo, 5× koncentrovaný (Bio-Rad Laboratories, USA)
- TBS, fyziologický roztok pufrovaný Tris-pufrem (10× koncentrovaný roztok: 4 g Tris base; 5,6 g Tris-HCl; 88 g NaCl; 1000 ml redestilované vody, pH 7,6)
- TBS-T 0,05% (1×, 500 ml TBS, 250 μl Tween-20)
- PBS-T 0,05% (1×, 500 ml PBS, 250 μl Tween-20)
- Sušené odstředěné mléko (Serva, Německo), blokovací roztok (roztok 5% sušeného odtučněného mléka v TBS-T)
- Primární protilátka – Anti-gamma H2A.X (ab11174) (Abcam, UK)
- Sekundární protilátka – Anti-Mouse IgG (A9044) (Merck, Německo)
- Clarity ECL (Enhanced chemiluminescence) substrát pro western blot (Merck, Německo)
- Agaróza, nízkotuhnoucí, 1% roztok (Serva, Německo)
- Ethidium bromid, 0,1 μg/ml? (Merck, Německo)
- Lyzační pufr pro comet assay (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris a pH upravené na 10 pomocí NaOH)
- Triton X-100 (Merck, Německo)
- Elektroforetický pufr pro comet assay (300 mM NaOH; 1 mM EDTA)
- Neutralizační pufr (0,4 M Tris; 0,5 M EDTA a pH upravené na 7,5 pomocí HCl)

4.2 Metodika

4.2.1 Izolace neonatálních potkaních kardiomyocytů

Izolace byla provedena dle standardních metodik popsanych v mnoha publikacích naší výzkumné skupiny (Jirkovská-Vávrová et al., 2015; Šimůnek et al., 2008). Použití zvířat schválila Odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Praze a izolace byla provedena pracovníky z Katedry biochemických věd. Buněčná kultura pocházela ze 2 dny starých mláďat potkanů kmene Wistar, dodaných firmou VELAZ, s.r.o.

Po dekapitaci 10-20 novorozených potkanů a otevření hrudníků byla extrahovaná srdce opláchnuta ledovým ADS puřem s přídavkem 5,5mM glukózy a rozmělněna pomocí skalpelu v Petriho misce. Homogenát byl šestkrát sériově vystaven působení kolagenasy a pankreatinu (12 ml digesčního roztoku; DIG) při 37 °C za konstantního míchání (200 ot/min) v třepacím inkubátoru po dobu 20 min. Po každé sérii se nejdříve suspenze nechala 2 min dekantovat a poté byl supernatant přenesen do 10ml sterilní zkumavky s 1 ml koňského séra (HS), které inaktivovalo výše uvedené trávicí enzymy. Následně byla suspenze centrifugována (5 min, 350 × g, laboratorní teplota) a resuspendována v 1 ml HS. Jednotlivé myocytové frakce byly spojeny a centrifugovány (8 min, 350 × g) a peleta resuspendována v sedacím médiu (S-médiu), složeného z DMEM/F12 média s 2 mM glutaminem, 1% směsi penicilinu a streptomycinu, 4mM pyruvátu, 5% fetálního bovinního séra a 10% koňského séra. Vzniklá suspenze byla nanesena na Petriho misku a inkubována 2 hod při 37 °C, díky čemuž fibroblasty obsažené v suspenzi adherovaly na dno a kardiomyocyty mohly být společně s médiem odsáty. Ke vzorku 50 μl výsledné suspenze bylo přidáno 50 μl 4% roztoku trypanové modři v PBS pro stanovení viability a počtu buněk v Bürkerově komůrce. Pomocí mikroskopu byly spočítány živé buňky vyskytující se v celkem 10 čtvercích (v 5 čtvercích nahoře a 5 čtvercích dole) a zjištěna koncentrace buněk v 1 ml. Koncentrace byla upravena na 800 tisíc buněk v 1 ml a suspenze byla nanesena na 24jamkovou destičku potaženou 1% roztokem želatiny.

Buňky ponechané v inkubátoru při 37 °C adherovaly ke dnu, uspořádaly se do syncytia a synchronně se kontrahovaly. Po 40 hod bylo S-médiu nahrazeno vyměňovacím médiem (V-médiem, bez HS) a za dalších 24 hod bylo V-médiu ještě jednou nahrazeno za nové. Čtvrtý den po izolaci bylo médiu vyměněno za expoziční

médium (E-médium, bez HS, FCS a pyruvátu) a buňky tak byly připraveny k experimentu.

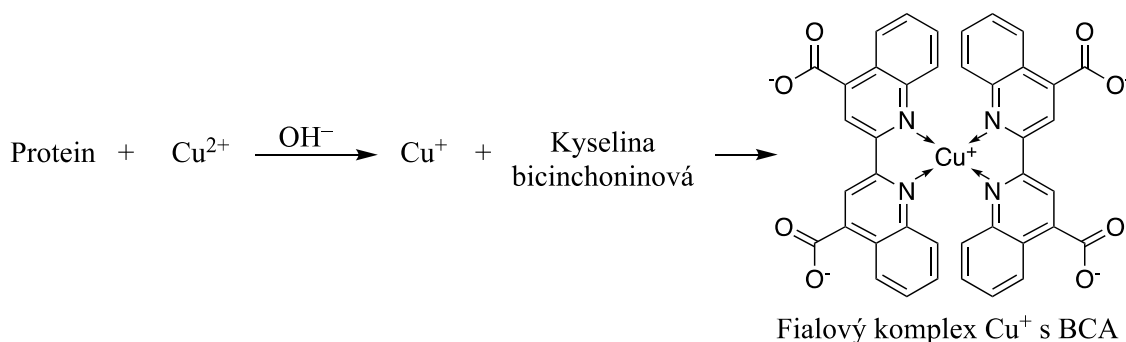
4.2.2 Příprava vzorků

Izolované kardiomyocyty jsme inkubovali s 1, 10 a 100 μM RES nebo 0,1 a 1 μM GA po dobu 30 min. Po přidání 1,2 μM DAU jsme buňky inkubovali ještě 1,5 hod. Inkubace se samotným DAU trvala 1,5 hod, se samotnou GA/RES 2 hod (30 + 90 min). Následně byly provedeny inkubace s 1,2 μM DAU a 1,2 μM DAUnol po dobu 0; 1,5; 3 a 6 hod. Všechny inkubace probíhaly při teplotě 37 °C.

U vzorků pro imunoblot bylo po dokončení inkubace odstraněno médium a buňky byly následně lyzovány ve 2% roztoku SDS-Tris. Viskózní lyzát byl přenesen do mikrozkušavky a inkubován 5 min při teplotě 95 °C. Touto inkubací a opakovaným pipetováním se viskozita lyzátu (způsobená přítomností vysokomolekulární DNA) snížila, aby bylo možné vzorek spolehlivě pipetovat při dalších analýzách.

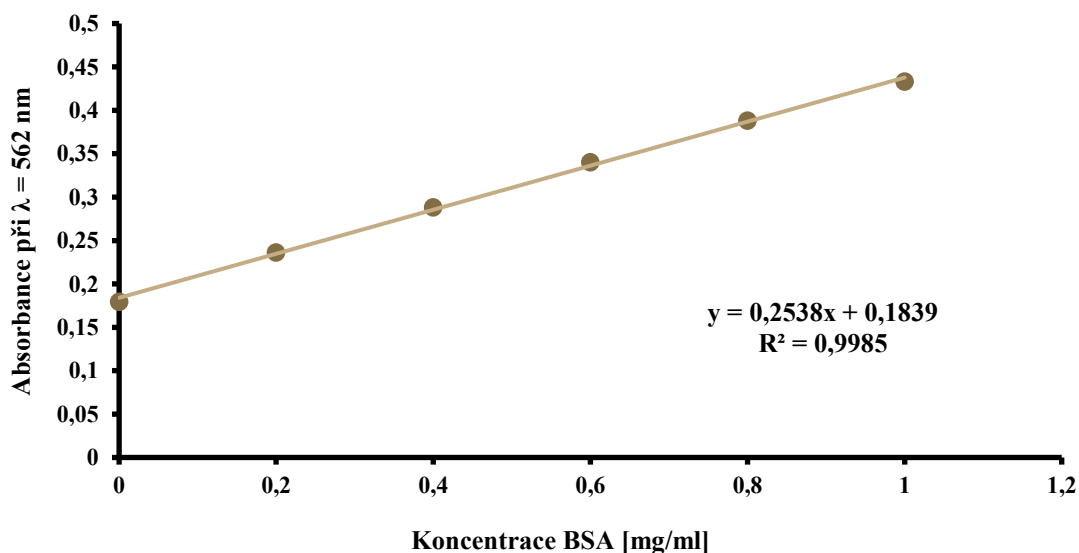
4.2.3 Stanovení množství proteinu metodou BCA

Stanovení koncentrace proteinu ve vzorku je důležitou metodou užívanou v biochemických laboratořích a má širokou škálu využití (Noble & Bailey, 2009). Metoda s kyselinou bicinchoninovou (BCA) byla prvně popsána v roce 1985 a je podobná dříve užívané Lowryho metodě (Smith et al., 1985). Obě metody fungují na principu tvorby komplexu Cu^{2+} s proteinem v zásaditém prostředí a následné redukci Cu^{2+} na Cu^{1+} . Množství redukovaného Cu^{2+} je ekvivalentní množství proteinu přítomném ve vzorku a reakce je závislá na délce inkubace a teplotě, kdy nejlépe probíhá ve 37 °C. V druhém kroku reagují dvě molekuly BCA s měďným kationtem za vzniku fialově zbarveného komplexu (Obr. 8), který absorbuje světlo o vlnové délce 562 nm (*QPRO Product manual – Protein quantitation Bicinchoninic Acid (BCA) kit*). Koncentraci bílkovin v neznámém vzorku lze poté stanovit spektrofotometricky porovnáním absorpčního spektra vzniklého komplexu se spektrem roztoků standardu (Walker, 1994).



Obr. 8: Reakce při stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Pro stanovení koncentrace proteinu ve vzorcích byly nejdříve připraveny jednotlivé roztoky standardu, a to ze zásobního 10 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA) v 2% SDS-Tris. Roztoky standardu, ze kterých byla sestavena kalibrační přímka měly koncentrace 2; 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0 mg/ml. Na 96jamkovou destičku s kulatým dnem byly roztoky standardu i vzorků nanášeny po 10 μl v triplikátu. Do všech jamek bylo následně přidáno multikanálovou pipetou 200 μl reakčního činidla připraveného z roztoku A (QPRO-BCA kit Standard – 1% BCA) a B (QPRO-BCA kit Standard – 4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) v poměru 50:1. Destička byla inkubována 30 min při 37 $^\circ\text{C}$ a bylo provedeno spektrofotometrické měření absorpance ($\lambda_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$) v přístroji Tecan Infinite 200M Pro. Z roztoků standardu byla v programu Excel sestavena kalibrační křivka (Obr. 9) a z její rovnice vypočteny koncentrace proteinů ve vzorcích.



Obr. 9: Kalibrační křivka (representativní měření jedné série vzorků)

4.2.4 Separace proteinů pomocí SDS-PAGE

Jednotlivé proteiny v připravených vzorcích měly odlišné molekulové hmotnosti a tím pádem se lišila i rychlost, jakou byly schopny procházet ve stejnosměrném elektrickém poli skrze polyakrylamidový gel (Al-Tubuly, 2000). Separací metoda SDS-PAGE konkrétně pomocí dodecylsírany sodného (SDS) denaturuje proteiny a následně je skrze polyakrylamidový gel elektroforeticky (PAGE) unáší různou rychlostí směrem k anodě.

Polyakrylamidový gel je tvořen z monomerů akrylamidu zesíťovaných N,N'-methylenbisakrylamidem, jejichž polymerace je iniciována katalyticky působícím peroxodisíranem amonným (APS), který dodává volné radikály, a urychlena N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminem (TEMED). Koncentrace akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu určuje délku a zesíťování polymeru ve výsledném gelu a udává tak jeho fyzikální vlastnosti – především velikost pórů, ale také hustotu, elasticitu a křehkost (Al-Tubuly, 2000). Z tohoto důvodu byl pro naše potřeby zvolen 12% akrylamidový gel, který je vhodný pro separaci proteinů o molekulové hmotnosti mezi 10-100 kDa (γ -H2AX ~ 17 kDa).

Příprava gelů pro SDS-PAGE byla provedena smísením reagensů uvedených výše v daném poměru (Tab. 1) a nanášením Pasteurovou pipetou mezi krátkou a distanční destičku ve stojanu pro odlévání gelu. Nejdříve se nanášel resolver gel (rozlišovací) – má vyšší pH (8,8) a je určen k vlastní separaci proteinů a poté stacker (zaostřovací) – s nižším obsahem polyakrylamidu a nižším pH (6,8). Posledním krokem bylo vložení hřebenu do kazety tak, aby se pod něj nezachytil vzduch. Gely se nechaly polymerizovat 30–45 min a případně byly do použití uchovávány v lednici (*Návod k použití akrylamidové sady a startovací sady TGX™ and TGX Stain Free™ FastCast™*).

Tab. 1: Reagencie pro přípravu čtyř 12% polyakrylamidových gelů
Převzato a upraveno: *Návod k použití akrylamidové sady a startovací sady TGX™ and TGX Stain Free™ FastCast™*

	Resolver	Stacker
A*	12 ml	4 ml
B*	12 ml	4 ml
10% APS	120 ul	40 ul
TEMED	12 ul	8 ul

* roztoky monomeru a síťovacího činidla dle označení výrobce

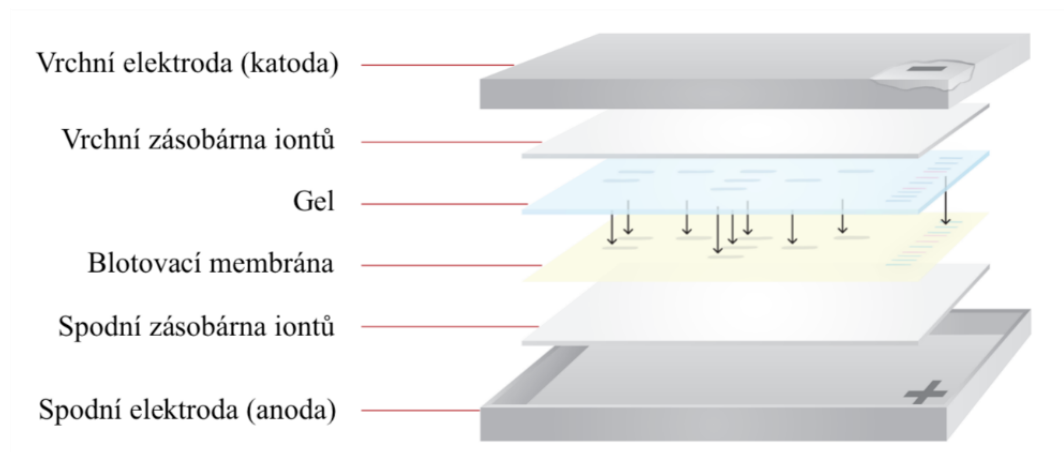
Separace proteinů byla provedena ve vertikálním elektroforetickém systému Mini-PROTEAN Tetra Cell v prostředí TGX pufru. Do první jamky byl napipetován proteinový standard Kaleidoscope – vícebarevný žebříček a do ostatních jamek vzorky. Elektroforéza trvala cca 1 hod při 100–120 V a ihned po jejím dokončení byly proteiny z gelu přeblovány na nitrocelulosovou membránu.

4.2.5 Přenos proteinů na membránu – western blotting

Western blotting je metoda široce užívaná nejen v oblasti molekulární biologie, sloužící k detekci, identifikaci, kvantifikaci a určení velikosti proteinů, nebo posttranslačních úprav proteinů v jednoduchých či komplexních chemických vzorcích (Jensen, 2012).

Zatímco v některých zdrojích je jako western blot nepřesně označován celý proces od SDS-PAGE až do imunodetekce (Begum et al., 2022), správně se jedná jen o část, kdy jsou proteiny z polyakrylamidového gelu přeneseny na nitrocelulosovou či polyvinylidendifluoridovou membránu (Kurien & Scofield, 2006). Nejčastěji se pro tento přenos používá tzv. elektroblotting, kdy je přenos zprostředkován pomocí elektrického proudu a transferového pufru (Kurien & Scofield, 2006).

Pro přenos proteinů na membránu byl použit transferový systém Trans-Blot Turbo. Na podložku byla postupně položena vrstva filtračních papírů smočených v transferovém pufru (stacks, sloužící jako zásobárna iontů), nitrocelulosová membrána, gel s rozdělenými proteiny a další vrstva filtračních papírů. Takto zformovaný tzv. sendvič (Obr. 10) byl přesunut do transferové kazety a byly z něj pomocí válečku vytlačeny vzduchové bubliny a nadbytek pufru. Kazeta byla uzavřena víkem a vložena do přístroje. Transfer probíhal na program 1 Mini TGX po dobu 3 min při konstantním proudu 2,5 A až do napětí 25 V.



Obr. 10: Mini Trans-Blot sendvič
Převzato a upraveno: *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System – Stručný návod k použití.*

4.2.6 Imunodetekce

Ještě před inkubací membrány s primární protilátkou bylo nutné zablokovat volná místa na membráně, která nebyla obsazena proteiny z gelu. Blokace těchto volných míst nespecifickými proteiny z mléka potlačila možnou vazbu primární protilátky na membránu, díky čemuž byl snížen šum na pozadí a bylo zamezeno falešně pozitivnímu výsledku (Jensen, 2012). Membrána byla blokována po dobu 1 hod při laboratorní teplotě 5% odtučněným sušeným mlékem v TBS-T za stálého míchání. Nezachycené proteiny byly odstraněny promytím membrány 10 min v PBS-T.

Primární protilátka anti- γ H2AX byla naředěna v poměru 1:5 000 v 1% BSA v PBS a inkubována s membránou 1 hod za stálého míchání. Po šesti promytích (5 min) v PBS-T následovala druhá hodinová inkubace, a to se sekundární protilátkou anti-mouse (s konjugovanou křenovou peroxidasou, HRP) v ředění 1:40 000 v 1% BSA v PBS. Membrána byla opláchnuta 6 \times v PBS-T po 5 min a do vyfocení uchovávána v PBS.

Membrána byla postupně snímána v režimu colorimetric (faint bands), stain-free (expozice 2 vteřiny) a chemi (5 min inkubace, accumulation mode 30/300/10 a následně výběr optimálního času expozice). Před spuštěním snímání v režimu chemi byla membrána pokryta připraveným roztokem Clarity – substrátem pro chemiluminescenční detekci HRP a překryta fólií.

4.2.7 Zpracování experimentálních dat z imunodetekce

Snímky membrán po přeblokování a imunodetekci pořízené zobrazovacím systémem ChemiDoc MP byly zpracovány pomocí software Image Lab 6.1.

Na chemiluminescenčních snímcích byly nejdříve pomocí analytických nástrojů označeny sloupce (lanes) a poté tmavé pásy (bands). Tato data byla normalizována na stain-free snímky (zobrazující celkové množství proteinu) a výsledné normalizované objemy byly zpracovány v programu Excel 16.

Statistická analýza a grafické zpracování dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9. Pro statistickou analýzu byla zvolena One-Way ANOVA (jednofaktorová analýza rozptylu). Pro následné porovnání středních hodnot skupin s kontrolou (či DAU) byl zvolen test dle Holm-Šidáka, který je vhodný pro vícenásobná srovnání pomocí testování statistických hypotéz.

4.2.8 Kometový test

Prvním krokem v kometovém testu bylo potažení bezprašných mikroskopických sklíček s matným koncem 1% roztokem agarózy. Tu bylo třeba povařit až do vzniku homogenního roztoku. Roztok agarózy byl nalit do 50ml kádinky umístěné na horké vodní lázni. Jednotlivá podložní sklíčka byla ponořena do agarózy za pomoci pinzety, přičemž neponořený okraj následně sloužil k popisu. Jedna strana sklíčka byla otřena tak, aby jej bylo možné nechat sušit na podnosu. Při práci bylo nutné postupovat co nejrychleji, aby byl na sklíčku utvořen pouze tenký film. Po vysušení a zatuhnutí při laboratorní teplotě byla sklíčka dále sušena v sušárně po dobu 1 hod při 60 °C.

Před další částí experimentu bylo třeba připravit 3 pufrů – lyzační, elektroforézový a neutralizační. Lyzační pufr byl připraven z 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris a pH bylo upraveno koncentrovaným roztokem NaOH na 10. Byl uchováván v lednici a těsně před pokusem byl přidán Triton X-100 za vzniku 1% roztoku. Pufr pro elektroforézu obsahoval 300 mM NaOH a 1 mM EDTA. Neutralizační pufr se skládal z 0,4 M Tris a 0,5 M EDTA a k úpravě pH na 7,5 byla použita koncentrovaná HCl.

Následně bylo možné na připravená sklíčka nanést vrstvu agarózy s buňkami. 1% roztok nízkotuhnoucí agarózy byl umístěn do vodní lázně tak, aby měl výsledný roztok agarózy teplotu 37 °C. Ovlivněné buňky byly opláchnuty PBS a inkubovány 30 min se 150 µl accutasy, která způsobila puštění buněk z plastové destičky. Následně byly buňky přeneseny do zkumavky s 250 µl PBS a vzniklá suspenze byla uchována na ledu. Z každého vzorku bylo připraveno $10^4 - 2 \times 10^4$ buněk. Čím více buněk vzorek obsahoval, tím blíže u sebe byly komety na gelu a o to větší bylo riziko, že se komety

budou překrývat. 20 μ l resuspendovaných buněk v PBS (pro minimalizaci agregace buněk) bylo smícháno s 60 μ l 1% roztoku nízkotuhnoucí agarózy a pipetováno na sklíčko. Ihned byly překryty krycím sklíčkem a ponechány ke ztuhnutí v lednici. Po 15 min bylo krycí sklíčko opatrně sejmuto, jednotlivé vzorky přesunuty do kyvety Hellendahlova typu a po přidání lyzačního roztoku byly vzorky přes noc lyzovány v lednici.

Před samotnou elektroforézou byla sklíčka přesunuta do elektroforetického tanku s elektroforetickým pufrem a prázdná místa byla vyplněna novými sklíčky. Nádoba byla ještě 40 min ponechána v lednici, kdy došlo k alkalickému rozplétání DNA. Po uplynutí této doby byla provedena elektroforéza při 25 V a cca 300 mA. Po skončení elektroforézy byla sklíčka přenesena zpět do kyvety a třikrát 5 min opláchnuta neutralizačním pufrem.

Sklíčka byla později barvena ethidium bromidem (0,1 μ g/ml) a focena pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse Ti-E s $\times 10$ Nikon air objektivem s kamerou Zyla sCMOS za použití optického filtru Cy3 a software NIS-Elements AR 2.20. Z každého vzorku bylo pořízeno minimálně 20 snímků. Pro následnou kvantifikaci poškození DNA bylo nezbytné, aby snímky nebyly přexponované, to znamená, aby intenzita fluorescence v žádné části digitalizovaného obrazu komety nepřekročila maximum digitálního rozsahu (Olive & Banáth, 2006).

4.2.9 Zpracování experimentálních dat z kometového testu

Pro analýzu snímků z kometového testu bylo možno zvolit jeden z mnoha volně dostupných softwarů jako je OpenComet, CaspLab, či CometScore. Analýza byla provedena v softwaru CometScore 2.0 dle několika stanovených kritérií – byly hodnoceny pouze správně exponované snímky a jen celistvé komety, které ve svém okolí neměly žádnou další kometu, artefakt, nebo se s ničím přímo nepřekrývaly. U každého snímku byla nejprve nastavena hodnota cutoff tak, aby bylo pozadí snímku zřetelně odděleno od chvostu komety. Jednotlivé komety byly ohraničeny rámečkem a kliknutím byla označena hlava komety. V dalším kroku byly odstraněny překrývající se komety, či komety s artefakty. Pro rychlejší a reprodukovatelnější analýzu byla použita funkce auto-score, Tato funkce vychází z histogramu komety – odečítá intenzitu komety, kdy se v nejvyšším bodě histogramu nachází hlava komety. Software tak přesně našel hlavu komety a následně dopočítal i ostatní parametry – např. délku a výšku komety, délku chvostu a moment chvostu. U jednoho vzorku bylo vždy analyzováno nejméně 100 komet. Z procentuálního obsahu DNA ve chvostu komety (Tail % DNA) byl vypočten aritmetický průměr a data byla dále zpracována v softwaru Excel 16.

Statistická analýza a grafické zpracování dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9. Pro statistickou analýzu byla použita One-Way ANOVA (jednofaktorová analýza rozptylu). Pro následné porovnání středních hodnot skupin s kontrolou (či DAU) byl zvolen test dle Holm-Šidáka.

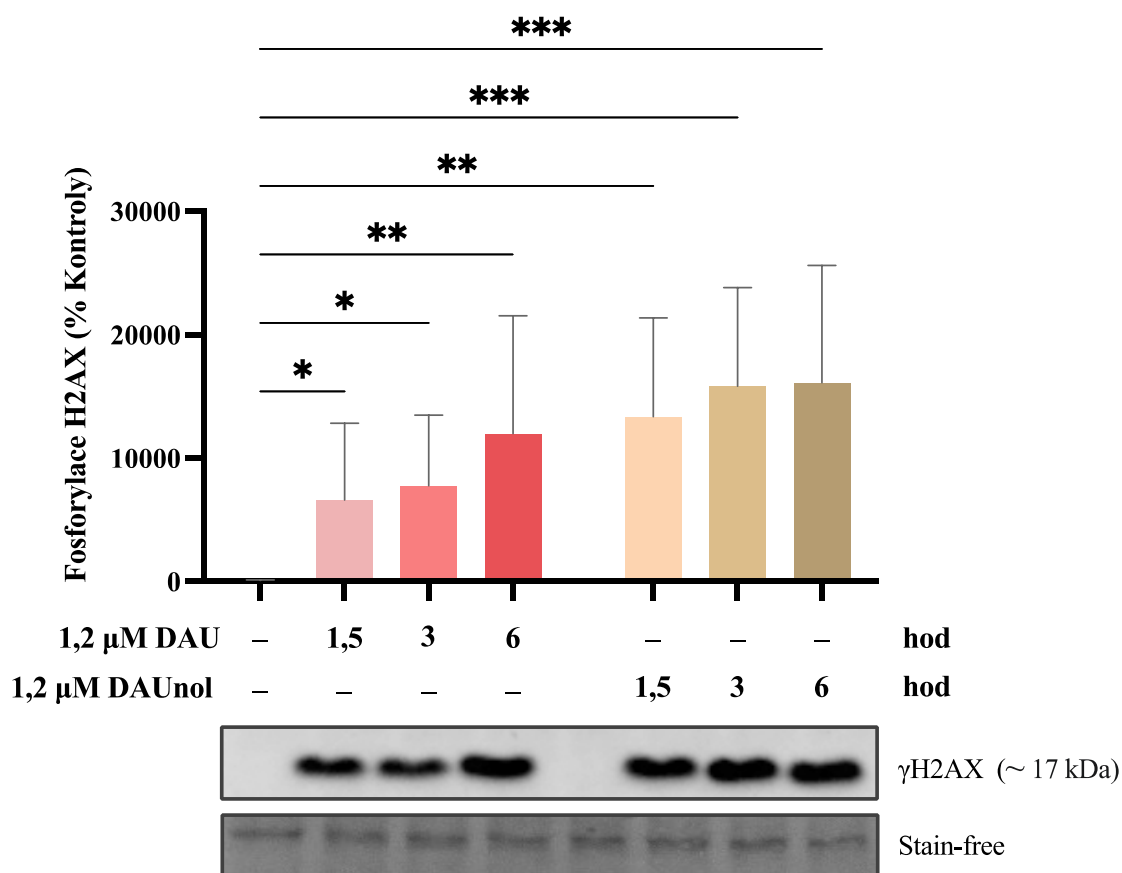
5 Výsledky

5.1 Imunodetekce fosforylovaného histonu H2AX

Neonatální kardiomyocyty byly inkubovány s 1,2 μM DAU a 1,2 μM DAUnol a dalšími dvěma látkami interagujícími s TOP II a zkoumány imunodetekcí $\gamma\text{-H2AX}$. Míra fosforylace H2AX je vyjádřena graficky jako průměr z kvadruplikátu \pm směrodatná odchylka (znázorněná chybovými úsečkami), jako % kontroly, nebo % 1,2 μM DAU. Statisticky signifikantní rozdíly jsou vyznačeny hvězdičkami (oproti kontrole), či křížkem (oproti DAU).

5.1.1 Stanovení fosforylace H2AX po inkubaci s 1,2 μM DAU a DAUnol

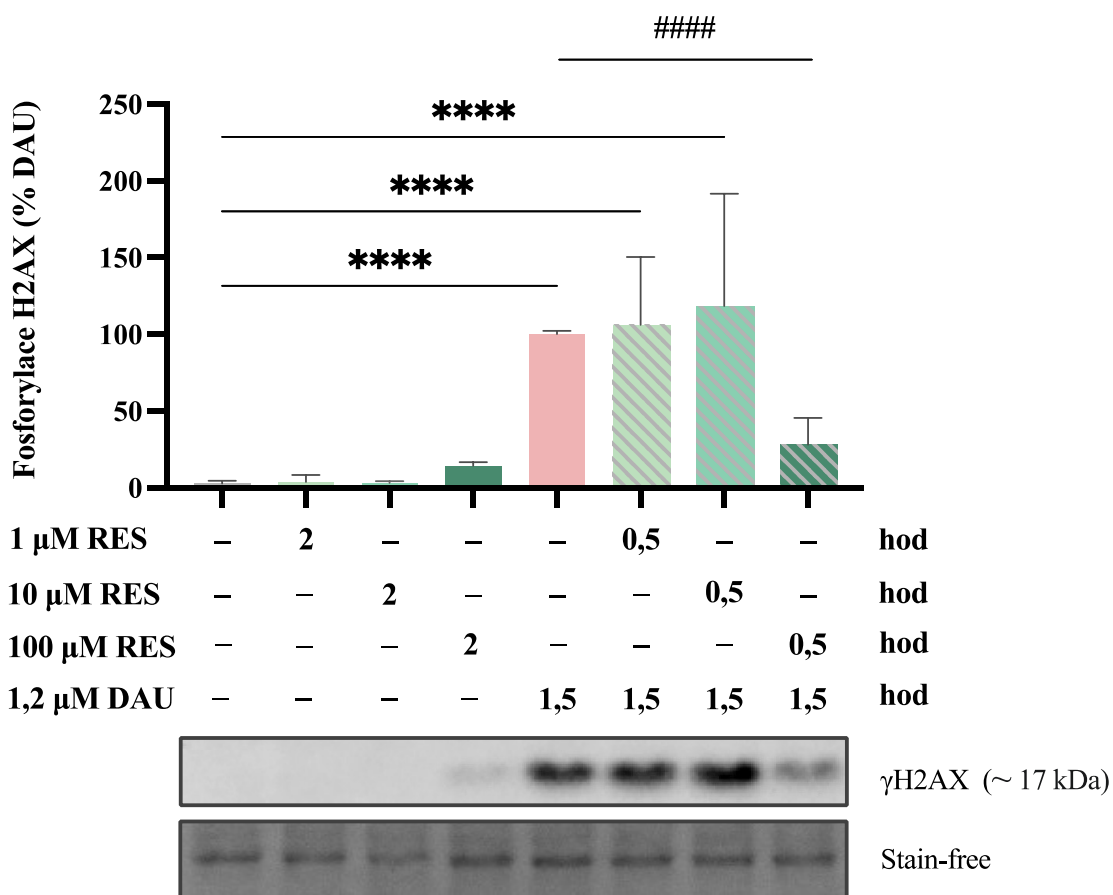
Izolované neonatální kardiomyocyty byly inkubovány s 1,2 μM DAU nebo 1,2 μM DAUnol po dobu 1,5; 3 a 6 hod. U všech vzorků byla pozorována statisticky signifikantní míra fosforylace H2AX oproti kontrole. Míra fosforylace H2AX u DAU i DAUnol rostla s časem expozice (Obr. 11).



Obr. 11: Fosforylace histonu H2AX vlivem 1,2 μM DAU a DAUnol u NRCM. Signifikantní rozdíly označeny hvězdičkou (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$)

5.1.2 Stanovení poškození DNA po preinkubaci s 1, 10 a 100 μM RES a následné expozici 1,2 μM DAU

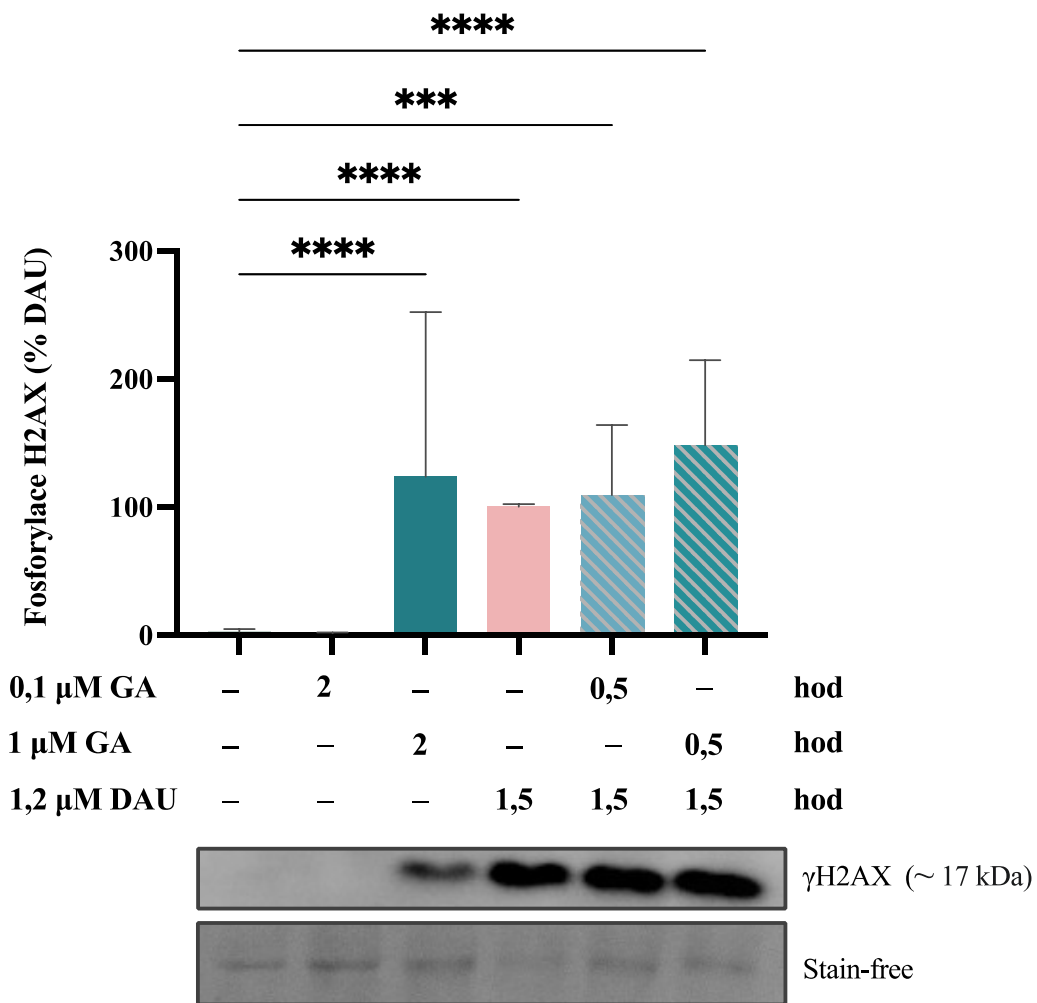
Izolované neonatální kardiomyocyty byly inkubovány s 1, 10 a 100 μM RES po dobu 30 min. K části vzorků byl bez výměny média přidán 1,2 μM DAU a druhá část byla ponechána beze změny. Obě sady byly dále inkubovány po dobu 1,5 hod. Vzorky se samotným DAU byly inkubovány 1,5 hod. Fosforylace H2AX způsobená DAU, či kombinací DAU s 1 a 10 μM RES byla signifikantně zvýšená oproti kontrole. Z Obr. 12 je také patrné, že RES v koncentraci 100 μM signifikantně snížil míru fosforylace H2AX způsobené DAU.



Obr. 12: Fosforylace histonu H2AX vlivem působení 1, 10 a 100 μM RES a jeho kombinace s 1,2 μM DAU u NRCM. Signifikantní rozdíly označeny hvězdičkou (****/##### $P \leq 0,0001$)

5.1.3 Stanovení poškození DNA po preinkubaci s 0,1 a 1 μM GA a následné expozici 1,2 μM DAU

Izolované neonatální kardiomyocyty byly inkubovány s 0,1 a 1 μM GA po dobu 30 min. K části vzorků byl bez výměny média přidán 1,2 μM DAU a druhá část byla ponechána beze změny. Obě sady byly dále inkubovány po dobu 1,5 hod. Vzorky se samotným DAU byly inkubovány 1,5 hod. Fosforylace H2AX byla u všech vzorků kromě 0,1 μM GA signifikantně zvýšená oproti kontrole (Obr. 13). U kombinace GA s DAU jsme pozorovali rostoucí tendenci poškození DNA, která však nedosáhla statistické signifikance.



Obr. 13: Fosforylace histonu H2AX vlivem působení 0,1 a 1 μM GA a její kombinace s 1,2 μM DAU u NRCM.

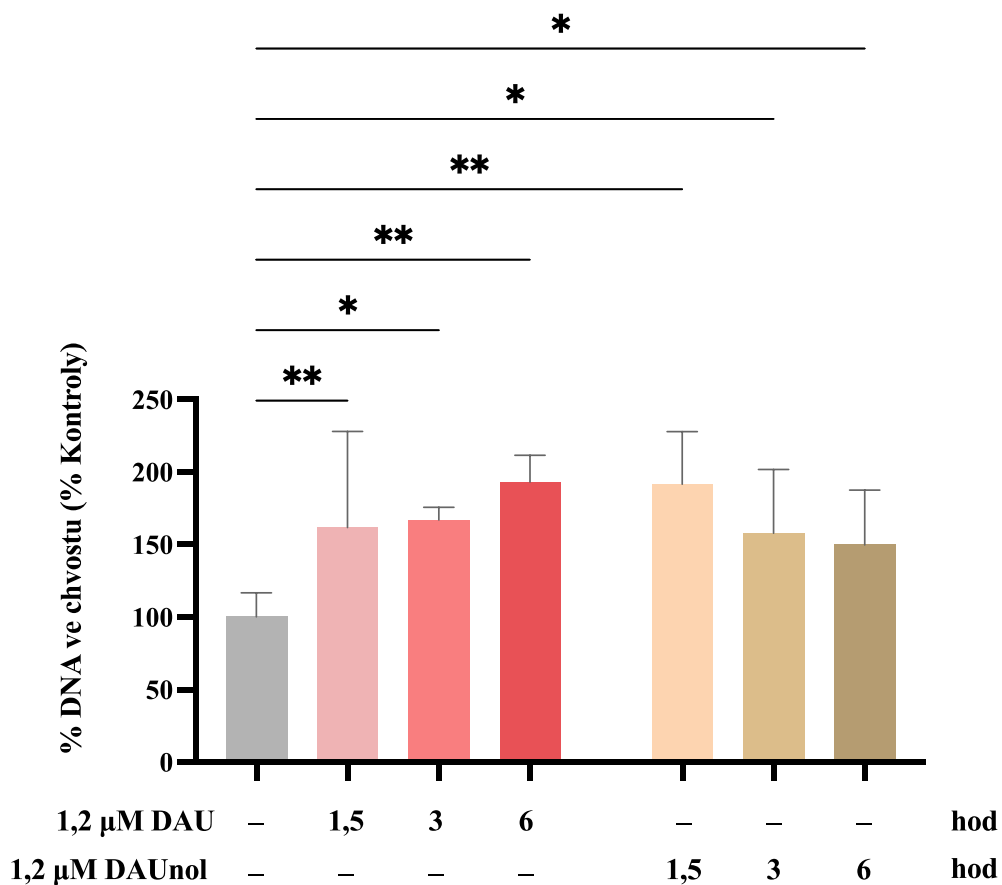
Signifikantní rozdíly označeny hvězdičkou (***) $P \leq 0,001$; ****) $P \leq 0,0001$)

5.2 Kometový test

Neonatální kardiomyocyty byly inkubovány analogicky jako u imunoblotu γ -H2AX a zkoumány pomocí kometového testu. Data byla získána jako průměr ze tří až čtyř měření \pm směrodatná odchylka (znázorněná chybovými úsečkami). Původně byly všechny vzorky zkoumány ve kvadruplikátu, avšak později muselo být několik vzorků kvůli přexponovaným snímkům vyřazeno a u těchto vzorků nebylo dostatečné množství (min. 100) komet k analýze. Poškození DNA je vyjádřeno graficky jako procentuální zastoupení DNA v chvostu komety, jako % kontroly. Statisticky signifikantní rozdíly jsou vyznačeny hvězdičkami (oproti kontrole), či křížkem (oproti DAU). Ilustrační snímky z fluorescenční mikroskopie jsou na Obr. 17.

5.2.1 Stanovení poškození DNA po inkubaci s 1,2 μ M DAU a DAUnol

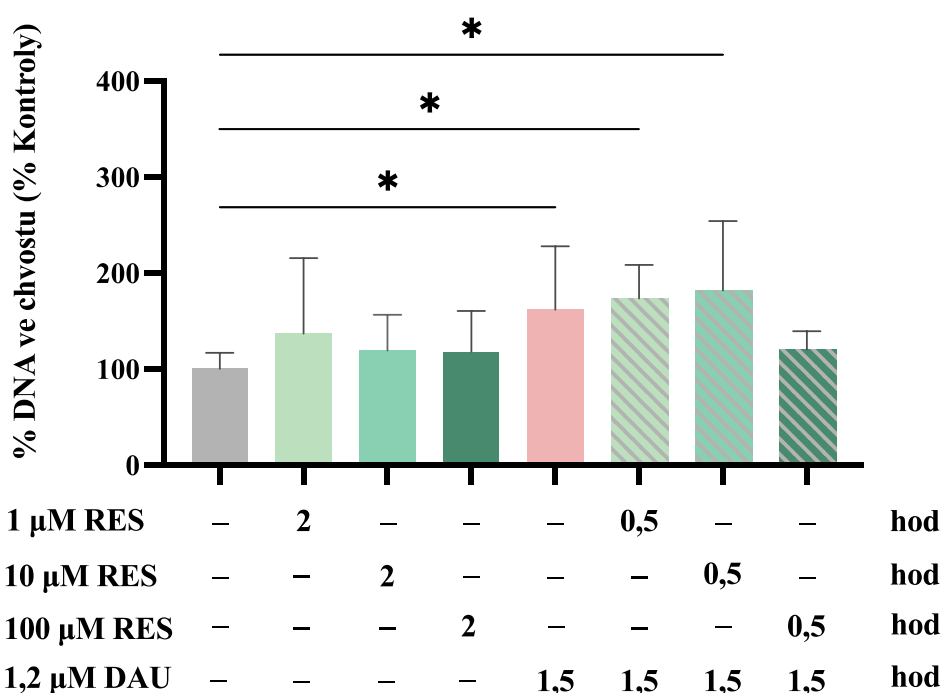
Izolované neonatální kardiomyocyty byly inkubovány s 1,2 μ M DAU nebo 1,2 μ M DAUnol po dobu 1,5; 3 a 6 hod. U všech vzorků byl pozorován statisticky signifikantní nárůst % DNA ve chvostu oproti kontrole. U DAU rostlo množství DNA ve chvostu s časem expozice, u DAUnol byla tendence opačná (Obr. 14).



Obr. 14: % DNA ve chvostu komety způsobené vlivem působení 1,2 μ M DAU a DAUnol u NRCM. Signifikantní rozdíly označeny hvězdičkou (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$)

5.2.2 Stanovení poškození DNA po preinkubaci s 1, 10 a 100 μM RES a následné expozici 1,2 μM DAU

Izolované neonatální kardiomyocyty byly inkubovány s 1, 10 a 100 μM RES po dobu 30 min. K části vzorků byl bez výměny média přidán 1,2 μM DAU a druhá část byla ponechána beze změny. Obě sady byly dále inkubovány po dobu 1,5 hod. Vzorek s DAU byl inkubován 1,5 hod. Obdobně jako u imunoblotu $\gamma\text{-H2AX}$ bylo % zastoupení DNA ve chvostu způsobené DAU, či kombinací DAU s 1 a 10 μM RES signifikantní oproti kontrole. Při kombinaci 100 μM RES s DAU mělo % zastoupení DNA ve chvostu klesající tendenci, které ale nedosáhlo oproti DAU signifikance (Obr. 15).

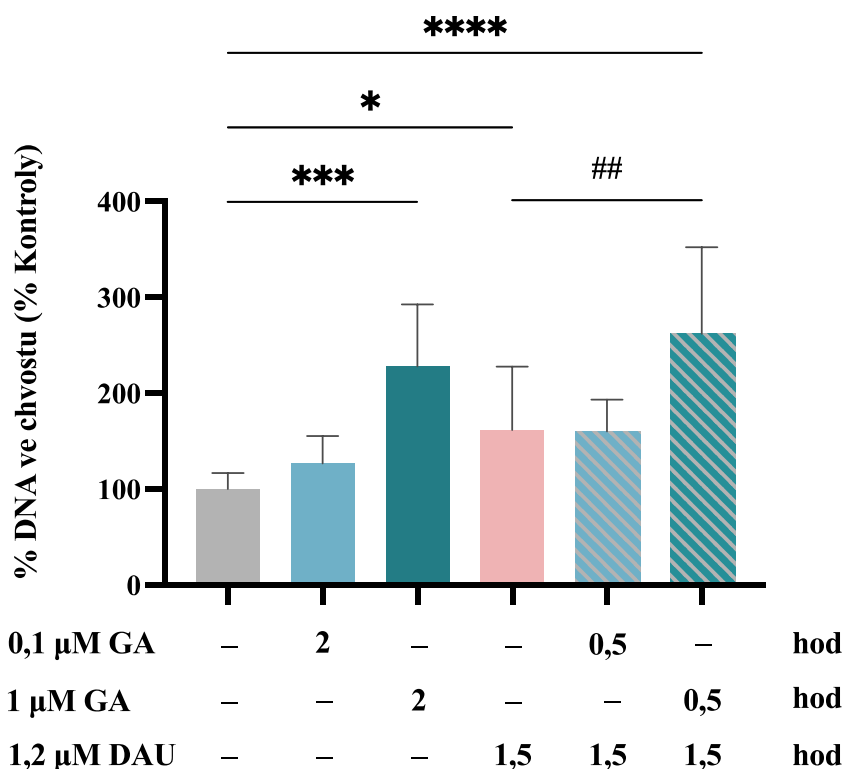


Obr. 15: % DNA ve chvostu komety způsobené vlivem 1, 10 a 100 μM RES a jeho kombinace s 1,2 μM DAU u NRCM.

Signifikantní rozdíly označeny hvězdičkou (* $P \leq 0,05$)

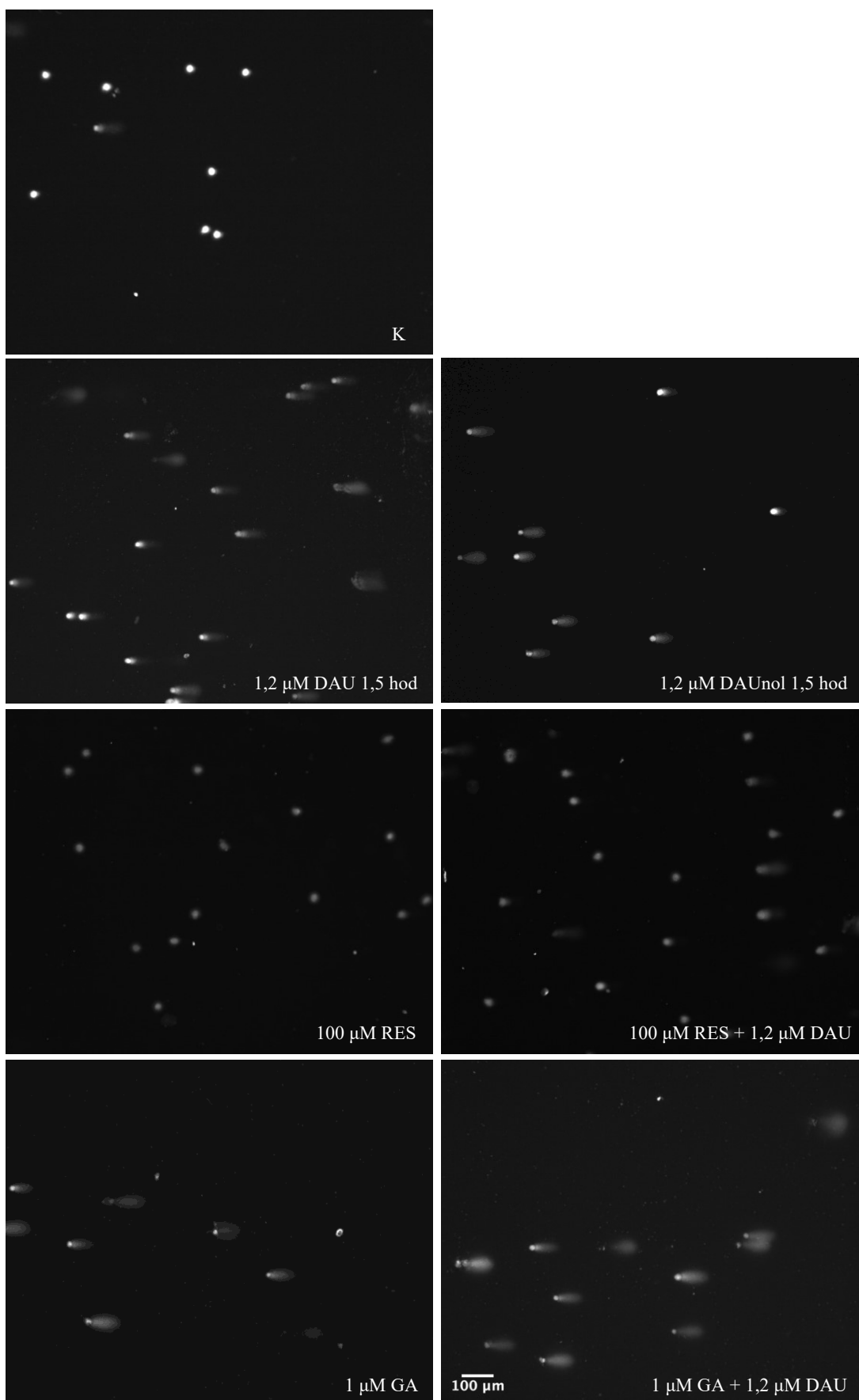
5.2.3 Stanovení poškození DNA po preinkubaci s 0,1 a 1 μM GA a následné expozici 1,2 μM DAU

Izolované neonatální kardiomyocyty byly inkubovány s 0,1 a 1 μM RES po dobu 30 min. K části vzorků byl bez výměny média přidán 1,2 μM DAU a druhá část byla ponechána beze změny. Obě sady byly dále inkubovány po dobu 1,5 hod. Vzorek s DAU byl inkubován 1,5 hod. Množství DNA ve chvostu bylo u vzorků 1 μM GA, DAU a jejich kombinace signifikantní oproti kontrole. 1 μM GA také v kombinaci s DAU způsobila signifikantní nárůst % DNA ve chvostu oproti samotnému DAU (Obr. 16).



Obr. 16: % DNA ve chvostu komety způsobené vlivem 0,1 a 1 μM GA a její kombinace s 1,2 μM DAU u NRCM.

Signifikantní rozdíly označeny hvězdičkou (* $P \leq 0,05$; ## $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$)



Obr. 17: Snímky komet pod fluorescenčním mikroskopem

6 Diskuze

Látky ze skupiny ANT jsou již od 80. let 20. století pro svůj protinádorový účinek široce užívány pro léčbu mnoha typů leukémií a jiných nádorových onemocnění. Na nádorové buňky působí komplexním mechanismem – produkují ROS, vmezeřují se do DNA a inhibují TOP II, což vede k produkci DSB a může vyústit až v buněčnou smrt (van der Zanden et al., 2021). Kromě inhibice TOP II α u nádorových buněk ovlivňují ANT i TOP II β , jejíž inhibice je pravděpodobně příčinou nežádoucí toxicity ANT na srdeční myocyty (Zhang et al., 2012).

Právě na dávce závislá kardiotoxicita ANT je omezujícím faktorem pro jejich klinické použití. Ihned po začátku léčby se u malého procenta pacientů může projevit akutní toxicita ve formě hypotenze a arytmií. Chronická toxicita se často projeví až po dokončení léčebného režimu a může v nejhorších případech vést až k městnavému srdečnímu selhání (Mordente et al., 2003). V patofyziologii ANT kardiotoxicity se značná pozornost věnuje vlivu jejich přeměny na alkoholické metabolity, které by mohly mít větší potenciál k akumulaci např. v srdečním svaly a tento metabolismus by tedy mohl významně přispívat ke kardiotoxicitě (Minotti et al., 2004). Tradičně se v literatuře spekuluje hlavně o zvýšené tvorbě aktivních kyslíkových radikálů alkoholickými metabolity, avšak o jejich roli v poškození DNA kardiomyocytů je velmi málo informací.

Jediným v praxi používaným léčivem pro prevenci a léčbu ANT navozené kardiotoxicity je DEX (Mody et al., 2023). Dle tradiční teorie účinkuje DEX prostřednictvím vyvázání volných iontů železa a zároveň odnětím těchto iontů z komplexu s ANT (Hasinoff, 1998). Dnes je však kardioprotektivní mechanismus připisován spíše inhibici TOP II β v kardiomyocytech (Jirkovský et al., 2021). DEX je zástupcem strukturně velmi různorodé skupiny tzv. katalytických inhibitorů TOP II. Do této skupiny patří také některé přírodní látky, jako například GA a RES. Zatímco RES je strukturně velmi podobný DEX a váže se na stejné vazebné místo v TOP II (Lee et al., 2017), struktura GA je od DEX velmi vzdálená a mechanismus jejího ovlivnění TOP II není plně popsán.

V této práci jsme se tedy detailně věnovali srovnání poškození DNA vyvolaného DAU a jeho hlavním alkoholickým metabolitem DAUnol a také hodnocení vlivu dvou přírodních katalytických inhibitorů TOP II – GA a RES na poškození DNA vyvolané DAU. Dále jsme studovali, jaký vliv má délka expozice DAU na míru poškození DNA.

Tyto pokusy jsme provedli na izolovaných neonatálních potkaních kardiomyocytech (NRCM), které jsou vhodným modelem pro *in vitro* studium toxicity léčiv (Chlopčíková et al., 2001).

Pro stanovení poškození DNA byly zvoleny dvě principiálně odlišné metody – stanovení fosforylovaného histonu H2AX a kometový test. Kometový test je relativně jednoduchá a senzitivní metoda pro měření poškození či/a reparace DNA v jednotlivých eukaryotních buňkách. Varianta kometového testu použitá v této práci detekuje jedno nebo dvouřetězcové zlomy a další léze v DNA, které jsou citlivé na alkalickou hydrolýzu a zlomy produkují až druhotně (např. apurinická místa) (Olive & Banáth, 2006). Limitující pro tuto metodu je to, že ve výsledcích nezahrnuje pouze poškození způsobené zkoumanými látkami, ale i veškeré další poškození DNA, které bylo ve vzorku přítomné (např. počínající apoptóza buňky), nebo na něj působilo (UV/ γ záření) (Olive & Banáth, 2006). U kometového testu se potýkáme s poměrně složitou interpretací výsledků, jelikož vztah mezi mírou poškození DNA určitou látkou a biologickým dopadem tohoto poškození se nedá jednoduše určit (Olive & Johnston, 1997). Pro správnou interpretaci biologického významu poškození DNA tak bylo nutné výsledky kometového testu porovnat s další metodou stanovující poškození DNA.

Druhou metodou jsme stanovovali množství histonu γ -H2AX. Jednou z prvních buněčných odpovědí na vznik DSB je fosforylace tohoto histonu na serinu v pozici 139 některými kinasami, například ATM kinasou (Rogakou et al., 1998; Řezáčová et al., 2011). Množství γ -H2AX a vzniklých ložisek přitom odpovídá počtu DSB. K fosforylaci H2AX dochází v buňce vlivem oxidačního stresu, UV či ionizujícího záření, kovů nebo chemikálií. γ -H2AX však může vznikat i endogenně jako reakce na DSB během apoptózy (Řezáčová et al., 2011). Stanovení fosforylovaného histonu H2AX je rutinně užíváno ke stanovení poškození DNA, například jako důsledku působení ANT (Cruet-Hennequart et al., 2012).

Ve všech lidských tkáních je DAU biotransformován na DAUnol (Bachur & Huffman, 1971), jehož koncentrace rychle převyšují koncentrace DAU v plasmě s poměrem AUC (plocha pod křivkou) 1:3–5 (Robert & Gianni, 1993). U tohoto metabolitu byla v *in vivo* testech prokázána nižší cytotoxicita na nádorové buňky než u DAU (Schott & Robert, 1989), jeho možný toxický účinek na srdeční buňky byl dlouho diskutován a zatím zůstal neobjasněn. My jsme sledovali míru poškození DNA způsobenou DAU nebo metabolitem DAUnolem na NRCM ve třech různých časech

expozice – 1,5; 3 a 6 hod. Obě látky byly použity v koncentraci 1,2 μM , což je koncentrace, která vychází z běžných plasmatických koncentrací DAU (1–2 μM) (Gewirtz, 1999) a dle předchozích experimentů naší výzkumné skupiny se jeví jako optimální pro náš *in vitro* model. Dle našich očekávání došlo u obou látek k signifikantnímu nárůstu sledovaného parametru oproti kontrole, což bylo potvrzeno oběma metodami. Množství $\gamma\text{-H2AX}$ se u DAUnol zdálo vyšší než u DAU, avšak tento jev nedosáhl u žádného času expozice signifikance. Ani u kometového testu se neprojevila žádná signifikance ve snížení/zvýšení % DNA ve chvostu DAU oproti DAUnol.

DAUnol, podobně jako DAU, způsobil v našich experimentech poškození DNA u NRCM, což potvrzují i výsledky toxicitní studie na izolovaných kardiomyocytech, prokazující schopnost parentní látky i jejího metabolitu tyto buňky poškozovat, a to jak se zvyšující se koncentrací, tak i délkou expozice (nepublikovaná data, Dr. Applová). Naše závěry jsou v souladu s výsledky skupiny, která nejdříve hodnotila toxicitu DOXol a později i toxicitu DAUnol na králičím papilárním svalu (sval uvnitř srdeční komory) (Olson et al., 1988). Redukovaný metabolit DOXol způsobil ve vyšší míře inhibici různých iontových pump srdečního sarkoplazmatického retikula a zároveň i větší narušení systolické a diastolické srdeční funkce než DOX (Olson et al., 1988). V pozdější studii autoři prokázali *in vitro* schopnost DAUnol inhibovat vychytávání Ca^{2+} v sarkoplazmatickém retikulu, avšak výsledný efekt na srdeční sval již nebyl ve studii hodnocen. U DAU se tato schopnost nevyskytla a autoři tak usuzovali, že toxické účinky ANT na srdce mohou být zprostředkovány narušením homeostázy Ca^{2+} DAUnol (Cusack et al., 1993). Pouze důkaz pomocí Ca^{2+} ale nemusí být pro přisouzení toxického působení DAUnol dostačující. Efekt DAU a DAUnol na srdeční funkce byl později studován na vyvinutém modelu izolovaného perfundovaného potkaního srdce (Pouna et al., 1996). DAU v kumulativní dávce 18 mg/kg vyvolal výrazné změny ve funkci levé komory potkaního srdce a DAUnol ve stejné dávce neměl žádný účinek. Při podávání obou léčiv se ukázalo, že byla koncentrace DAUnol v levé komoře podobná, z čehož lze usuzovat, že toxické působení bylo způsobené především parentním DAU. Tyto výsledky jsou odlišné od těch našich, nicméně ve studii byla také provedena přímá perfuze potkaních srdcí velmi vysokými dávkami DAU/DAUnol (10 mM), která měla u obou látek podobný efekt. Koncentrace DAUnol během pokusu v levé komoře dosáhla více než 20násobku běžné intraperitoneální koncentrace u těchto zvířat (Platel et al., 2001). Jiný přístup pro

porovnání toxicity sekundárních alkoholických metabolitů vůči parentním ANT vytvořil (Forrest et al., 2000) úpravou genomu myši, které exprimovaly v srdcích ve zvýšené míře karbonylreduktasy, zodpovědné za redukci ANT na sekundární alkoholy. Výsledky ukázaly, že podávání DOX těmto myším vedlo k výraznější kardiotoxicitě než u normálních myši (Forrest et al., 2000). Podávání DAU oproti tomu vedlo k nižší srdeční toxicitě než u běžných myši. Biotransformace DAU tedy ochránila myši před toxicitou ANT (Platel et al., 2001). Pro objasnění molekulárních mechanismů toxického působení DAUnolu na NRCM a zároveň jeho komplexních efektů na srdce by bylo třeba provést rozsáhlejší a podrobnější studie.

Dříve panoval konsenzus, že přírodní polyfenol RES působí na nádorové buňky jako TOP II jed, protože v několika studiích zpozdil progresi buněčného cyklu a/nebo zvýšil markery poškození DNA (Demoulin et al., 2015; Leone et al., 2012; Leone et al., 2010). Nejnovější studie zjistila, že RES působí spíše jako katalytický inhibitor TOP II, který zabráňuje dimerizaci ATPasové domény, a to konkrétně interakcí s jednou ze dvou ATPasových domén enzymu. Tento mechanismus je velmi podobný mechanismu DEX (Lee et al., 2017).

Proto jsme usuzovali, že RES samostatně nebude poškozovat DNA potkaních kardiomyocytů a že je bude chránit před působení toxického DAU. RES byl použit v koncentracích 1, 10 a 100 μM a v žádném z experimentů nezpůsobil signifikantní poškození DNA oproti kontrole. Obě metody poté ukázaly, že nejvyšší koncentrace RES (100 μM) má potenciál snížit poškození DNA způsobené DAU (pouze u $\gamma\text{-H2AX}$ bylo toto snížení statisticky signifikantní). Kvůli širšímu klinickému použití DOX oproti DAU se v literatuře vyskytuje převážně řada studií s kombinací RES a DOX. Ve studii podobné té naší bylo na kardiomyoblastech (H9c2) prokázáno, že preinkubace s 25 μM RES po dobu 24 hod a následná inkubace s DOX vedla k signifikantnímu zvýšení viability těchto buněk i oproti preinkubaci s 70 μM DEX (Monahan et al., 2021). Vzhledem k použitému buněčnému modelu se ale nabízí otázka, zda-li je za tento efekt odpovědná interakce s TOP II (H9c2 buňky obsahují oproti NRCM obě izoformy TOP II), či jiný mechanismus RES – vychytávání ROS, inhibice NADPH, prevence peroxidace lipidů, snížení acetylace p53, aj. (Monahan et al., 2021; Park et al., 2009; Xu & Si, 2012; Zhang et al., 2011). V jedné ze studií zkoumajících srdeční funkce u potkanů byl podán RES ve formě pevných lipidových nanočástic, což vedlo k ochraně kardiomyocytů před toxickým působením DOX a zlepšení hodnot srdeční frekvence, ejekční frakce levé

komory a frakčnímu zkrácení levé komory (Zhang et al., 2019). V jiné studii bylo při použití RES s DOX pozorováno výrazné snížení kardiotoxicity DOX se zvýšenou expresí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru B a i inhibice apoptózy kardiomyocytů. Potkanům, kterým byl podáván pouze DOX se výrazně zhoršily srdeční funkce, zvýšily hladiny laktátdehydrogenasy (LDH) a myokardiální izoformy kreatinkinasy v séru a výrazně se snížila exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru B (Tian et al., 2020). Hladiny LDH byly zkoumány i v dalších experimentech naší výzkumné skupiny, kdy RES v koncentracích nad 30 μM signifikantně snížil hladiny LDH oproti DAU u NRCM (nepublikovaná data, Mgr. Kubeš).

Z naší práce tedy vyplývá, že RES může ovlivnit nežádoucí účinky ANT na srdeční myocyty. Podobnost jeho mechanismu účinku s mechanismem DEX (Lee et al., 2017) a naše výsledky naznačují, že by RES mohl být stejně jako DEX katalytickým inhibitorem TOP II v kardiomyocytech. Prevence ANT kardiotoxicity skrze TOP II β byla naznačena již dřívější studií, která ale tento mechanismus studovala na nepřilíš vhodném modelu H9c2, který exprimuje obě izoformy TOP II (Lyu et al., 2007). Výhodou RES je, že může zároveň cílením na různé signální a molekulární dráhy ovlivňovat léčbu rakoviny a smrt nádorových buněk. Pozitivní je i to, že v nízkých či středních dávkách RES nevykazuje mnoho nežádoucích účinků a je rychle biotransformován na bezpečné metabolity (Yang et al., 2022). RES je již mnoho let dostupný jako doplněk stravy, pro jeho široké klinické uplatnění jako léčiva pro prevenci a terapii srdeční toxicity je však třeba provést ještě řadu dalších studií zaměřujících se např. na jeho terapeutické cíle, biodostupnost, toxicitu, dávky a interakce (Novelle et al., 2015), nebo za pomoci modifikace jeho struktury získat účinnější látky s lepšími vlastnostmi.

GA je přírodní látka, která má mj. protinádorový a antiproliferativní účinek na řadu nádorových buněk (Novelle et al., 2015; Thida et al., 2016). Spektrum protinádorových účinků GA je velmi rozmanité a je naznačeno v teoretické části práce. Do naší práce byla GA zařazena kvůli její schopnosti inhibovat katalytický cyklus TOP II v místě štěpení a opětovného spojení DNA (Minniti et al., 2017). Byly provedeny experimenty s GA v koncentraci 0,1 a 1 μM na izolovaných NRCM. Zpočátku byla používána i 10 μM GA, ta však byla později vyřazena kvůli velkému poškození DNA, které mělo negativní vliv na hodnocení výsledků imunoblotu $\gamma\text{-H2AX}$. Při exponování chemiluminescenčních snímků byl totiž signál 10 μM GA natolik vysoký, že musel být čas expozice oproti ostatním výrazně snížen a bylo zvýšeno riziko, že výsledná intenzita

chemiluminescence ostatních vzorků na membráně nemusí být úměrná velikosti signálu. GA způsobovala již v koncentraci 1 μM v obou metodách signifikantní poškození DNA oproti kontrole. U kometového testu dokonce v této koncentraci s přidáním DAU způsobila signifikantní nárůst poškození DNA oproti samotnému DAU. Stejnou tendenci měla tato kombinace i u druhé metody. Autoři studie s DOX ale došli k opačnému závěru a dokonce navrhovali, že by GA mohla být možnou součástí účinné protektivní terapie proti kardiotoxickým účinkům DOX (Wang et al., 2014). V této studii byl zkoumán vliv GA na DOX-navozenou kardiotoxicitu na myším modelu detekcí hladiny LDH a myokardiální izoformy kreatinkinasy. Samotný DOX signifikantně zvyšoval hladiny obou enzymů a GA hladiny enzymů nezvyšovala. Preinkubace GA zamezila zvýšení hladiny LDH způsobené DOX ($P < 0,05$), ale na kreatinkinase tato preinkubace neměla efekt (Wang et al., 2014). Experimenty zkoumající hladinu LDH provedené v rámci naší výzkumné skupiny ukázaly, že GA samostatně od 30 μM signifikantně zvyšuje hladinu LDH a že do 10 μM v kombinaci s 1,2 μM DAU nezvyšuje, ale ani nesnižuje hladinu LDH (nepublikovaná data, Mgr. Kubeš). Vědci zkoumající efekty GA na srdce ukázali, že GA nemá negativní efekt na krevní tlak, srdeční tep aj. (Qi et al., 2008; Zhao et al., 2010). Během 3měsíčního intragastrického podávání GA se ale projevilo signifikantní zvýšení indexu hmotnosti orgán-tělo u srdce potkanů. Tento index byl stejně zvýšen i u jater a ledvin (Qi et al., 2008), které byly již dříve označeny za hlavní cíle toxického působení GA (Wu et al., 2004). V práci byl také poznamenán malý blíže nespecifikovaný vliv GA na histologické změny srdeční tkáně (Qi et al., 2008). Mimo ovlivnění srdce bylo také zjištěno, že GA působí *in vitro* i *in vivo* synergicky s DOX na xenograftovém modelu nemalobuněčného karcinomu plic v myších a to skrze inhibici nukleárního faktoru kappa B a P-glykoproteinu (Wang et al., 2014).

V našich experimentech nesnižovala GA dle zamýšlené hypotézy poškození DNA neonatálních potkaních kardiomyocitů způsobené DAU, což by se dalo zčásti objasnit její selektivitou vůči TOP II α (Qin et al., 2007). Izoforma α je totiž v srdci exprimována jen minimálně, či vůbec (Capranico et al., 1992) a hlavním mediátorem ANT způsobené kardiotoxicity je izoforma β (Zhang et al., 2012). Naopak GA způsobovala i samostatně signifikantní poškození DNA, a také zvyšovala poškození DNA vyvolané DAU. Toto bylo již dříve pozorováno v nádorových buňkách (Rong et al., 2010), kde GA vyvolávala poškození DNA s následnou stabilizací p53 a další aktivací buněčných odpovědí na poškození DNA. Tyto výsledky naznačují, že se GA nechová jako typický představitel

tzv. katalytických inhibitorů a bylo by tedy vhodné ověřit mechanismus jejího působení na TOP II. Mohl by se totiž ukázat jiný mechanismus podobně jako tomu bylo v případě nedávných výsledků naší skupiny s látkou XK469, která byla původně publikovaným TOP II β selektivním jedem a naše výsledky toto tvrzení následně opravily. Je také možné, že GA působí poškození DNA neenzymatickou cestou, například oxidačním poškozením. Tyto výsledky jsou v souladu s experimenty na hladiny LDH, které taktéž ukázaly vlastní toxicitu GA (nepublikovaná data, Mgr. Kubeš), avšak nesouhlasí se závěry studií (Qi et al., 2008; Wang et al., 2014; Zhao et al., 2010), které nejenže nepopisují, ale ani neuvažují, že by GA mohla toxicky působit na myokard. Zhao et al. (2010) přitom závěr staví pouze na měření systolického a diastolického krevního tlaku a elektrokardiogramu. Qi et al. (2008) ve výsledcích poukazuje na malé změny na histologickém preparátu srdce a na změnu indexu hmotnosti orgán-tělo u srdce, avšak v závěru těmito poznatkům nevěnuje pozornost. Zhao et al. (2014) prokazuje účinek GA proti toxickému působení DOX na srdce pouze důkazem jednoho ze dvou sledovaných enzymů.

O toxickém působení DAUnol a GA na srdeční buňky se v literatuře nevyskytuje dostatečné množství dat, ze kterých by šlo učinit jasný závěr. Údaje v literatuře jsou nejednotné, mají poměrně odlišný rozsah, nebo v závěru nemají dostatečně kritický pohled na zhodnocení výsledků. Pro dostatečné pochopení působení DAUnol, GA a případného širšího uplatnění RES (či jeho derivátů) bude proto zapotřebí provést další výzkum.

7 Závěr

- Metodou imunodetekce γ -H2AX i kometovým testem bylo u DAU i DAUnol sledováno statisticky významné poškození DNA u NRCM oproti kontrolní skupině. Poškození DAU mělo se zvyšujícím se časem expozice rostoucí tendenci u obou metod.
- RES nepůsobil signifikantní poškození DNA a v nejvyšší koncentraci (100 μ M) snižoval poškození DNA způsobené DAU u NRCM, kdy u imunodetekce γ -H2AX bylo toto snížení statisticky signifikantní. U kometového testu byla sledována stejná tendence.
- GA (1 μ M) vykazovala v obou metodách signifikantní poškození DNA u NRCM oproti kontrolní skupině. U kometového testu způsobila preinkubace GA před inkubací s DAU signifikantní nárůst poškození DNA oproti samotnému DAU. U imunodetekce γ -H2AX byla sledována stejná tendence.

8 Seznam zkratek

ANOVA	Analýza rozptylu
ANT	Antracyklinová antibiotika
APS	Peroxodisíran amonný
ATM	Ataxia telangiectasia proteinkinasa
ATP	Adenosintrifosfát
ATR	Ataxia teleangiectasia a Rad related proteinkinasa
BCA	Bicinchoninová kyselina
BSA	Hovězí sérový albumin
DAU	Daunorubicin
DAUnol	Daunorubicinol
DEX	Dexrazoxan
DIG	Digesční roztok
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA-dependentní proteinkinasa
DOX	Doxorubicin
DOXol	Doxorubicinol
DSB	Dvouřetězcový zlom DNA
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ETO	Etoposid
FBS	Fetální bovinní sérum

FDA	Food and Drugs Administration
GA	Kyselina gambogová
HRP	Křenová peroxidasa
HS	Koňské sérum
LDH	Laktátdehydrogenasa
MTX	Mitoxantron
NCI	National Cancer Institute
NRCM	Neonatální potkaní kardiomyocyty
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	Fosfátem pufovaný solný roztok
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RES	Resveratrol
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SDS	Dodecylsírán sodný
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOP I/II	Topoizomerasa I/II
UV	Ultrafialové záření
γ -H2AX	γ -fosforylovaný histon H2AX

9 Literatura

Al-Tubuly, A. A. (2000). SDS-PAGE and western blotting. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*, 391-405.

Atwal, M., Swan, R. L., Rowe, C., Lee, K. C., Lee, D. C., Armstrong, L., Cowell, I. G., & Austin, C. A. (2019). Intercalating TOP2 poisons attenuate topoisomerase action at higher concentrations. *Molecular Pharmacology*, 96(4), 475-484.

Azqueta, A., & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949-968.

Baenteli, R., Chene, P., Collingwood, S., Furet, P., Meier, P., & Schoepfer, J. (2007). Use of 9h-purine-2, 6-diamine Derivatives in the Treatment of Proliferative Diseases and Novel 9h-purine-2, 6-diamine Derivatives, U.S. Patent Application No. 10/594,412. (10/594,412.).

Bachur, N., & Huffman, D. (1971). Daunorubicin metabolism: estimation of daunorubicin reductase. *British journal of pharmacology*, 43(4), 828.

Bains, O. S., Szeitz, A., Lubieniecka, J. M., Cragg, G. E., Grigliatti, T. A., Riggs, K. W., & Reid, R. E. (2013). A correlation between cytotoxicity and reductase-mediated metabolism in cell lines treated with doxorubicin and daunorubicin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 347(2), 375-387.

Baird, C. L., Harkins, T. T., Morris, S. K., & Lindsley, J. E. (1999). Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proceedings of the national academy of sciences*, 96(24), 13685-13690.

Begum, H., Murugesan, P., & Tangutur, A. D. (2022). Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *BioTechniques*, 73(1), 58-69.

Bertelli, A. A., & Das, D. K. (2009). Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 54(6), 468-476.

Bojanowski, K., Lelievre, S., Markovits, J., Couprie, J., Jacquemin-Sablon, A., & Larsen, A. K. (1992). Suramin is an inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells. *Proceedings of the national academy of sciences*, 89(7), 3025-3029.

Bush, N. G., Evans-Roberts, K., & Maxwell, A. (2015). DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus*, 6(2).

Capranico, G., Tinelli, S., Austin, C. A., Fisher, M. L., & Zunino, F. (1992). Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1132(1), 43-48.

Case Jr, D. C., Ervin, T. J., Boyd, M. A., Bove, L. G., Sonneborn, H. L., & Paul, S. D. (1987a). Phase II study of aclarubicin in acute myeloblastic leukemia. *American journal of clinical oncology*, 10(6), 523-526.

Case Jr, D. C., Gams, R., Ervin, T. J., Boyd, M. A., & Oldham, F. B. (1987b). Phase I-II trial of high-dose Epirubicin in patients with lymphoma. *Cancer research*, 47(23), 6393-6396.

Classen, S., Olland, S., & Berger, J. M. (2003). Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(19), 10629-10634.

Cortés, F., Pastor, N., Mateos, S., & Domínguez, I. (2007). Topoisomerase inhibitors as therapeutic weapons. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 17(5), 521-532.

Cowell, I. G., & Austin, C. A. (2012). Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents. *International journal of environmental research and public health*, 9(6), 2075-2091.

Cruet-Hennequart, S., Prendergast, Á. M., Shaw, G., Barry, F. P., & Carty, M. P. (2012). Doxorubicin induces the DNA damage response in cultured human mesenchymal stem cells. *International journal of hematology*, 96, 649-656.

Cusack, B., Mushlin, P., Voulelis, L., Li, X., Boucek, R., & Olson, R. (1993). Daunorubicin-induced cardiac injury in the rabbit: a role for daunorubicinol? *Toxicology and applied pharmacology*, 118(2), 177-185.

Dabich, L., Bull, F. E., Beltran, G., Athens, J. W., Coltman Jr, C. A., Weick, J. K., Van Slyck, E. J., & Amare, M. (1986). Phase II evaluation of aclarubicin in refractory adult acute leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Cancer Treatment Reports*, 70(8), 967-969.

Damiani, R. M., Moura, D. J., Viau, C. M., Caceres, R. A., Henriques, J. A. P., & Saffi, J. (2016). Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Archives of Toxicology*, *90*, 2063-2076.

Demoulin, B., Hermant, M., Castrogiovanni, C., Staudt, C., & Dumont, P. (2015). Resveratrol induces DNA damage in colon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53-dependent apoptosis. *Toxicology in Vitro*, *29*(5), 1156-1165.

DiNardo, S., Voelkel, K., & Sternglanz, R. (1984). DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proceedings of the national academy of sciences*, *81*(9), 2616-2620.

Dong, K. C., & Berger, J. M. (2007). Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. *Nature*, *450*(7173), 1201-1205.

Drake, F. H., Hofmann, G. A., Bartus, H. F., Mattern, M. R., Crooke, S. T., & Mirabelli, C. K. (1989a). Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry*, *28*(20), 8154-8160.

Drake, F. H., Hofmann, G. A., Mong, S.-M., Bartu, J. O. L., Hertzberg, R. P., Johnson, R. K., Mattern, M. R., & Mirabelli, C. K. (1989b). In vitro and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor agent merbarone. *Cancer research*, *49*(10), 2578-2583.

Durr, F. (1984). Biologic and biochemical effects of mitoxantrone. *Seminars in oncology*, Vol. 11, No. 3 Suppl 1, str. 3-10

Durr, F. (1988). Biochemical pharmacology and tumor biology of mitoxantrone and ametantrone. *Anthracycline and anthracenedione-based anticancer agents*, 401-445.

Ehninger, G., Schuler, U., Proksch, B., Zeller, K.-P., & Blanz, J. (1990). Pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone A Review. *Clinical pharmacokinetics*, *18*, 365-380.

Eisenberger, M. A., & Reyno, L. M. (1994). Suramin. *Cancer treatment reviews*, *20*(3), 259-273.

Errington, F., Willmore, E., Leontiou, C., Tilby, M. J., & Austin, C. A. (2004). Differences in the longevity of topo II α and topo II β drug-stabilized cleavable complexes and the relationship to drug sensitivity. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *53*, 155-162.

Fidler, J., DeJoy, S. Q., & Gibbons Jr, J. (1986). Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *137*(2), 727-732.

Figuroa-González, G., & Pérez-Plasencia, C. (2017). Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer. *Oncology letters*, *13*(6), 3982-3988.

Forrest, G. L., Gonzalez, B., Tseng, W., Li, X., & Mann, J. (2000). Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cancer research*, *60*(18), 5158-5164.

Fortune, J. M., & Osheroff, N. (1998). Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II α by blocking DNA cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(28), 17643-17650.

Fortune, J. M., & Osheroff, N. (2000). Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *64*, 221-253.

Furet, P., Schoepfer, J., Radimerski, T., & Chène, P. (2009). Discovery of a new class of catalytic topoisomerase II inhibitors targeting the ATP-binding site by structure based design. Part I. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *19*(15), 4014-4017.

Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology*, *57*(7), 727-741.

Glover, A., Chun, H. G., Kleinman, L. M., Cooney, D. A., Plowman, J., Grieshaber, C. K., Malspeis, L., & Leyland-Jones, B. (1987). Merbarone: an antitumor agent entering clinical trials. *Investigational new drugs*, *5*, 137-143.

Gonzalez, R. E., Lim, C.-U., Cole, K., Bianchini, C. H., Schools, G. P., Davis, B. E., Wada, I., Roninson, I. B., & Broude, E. V. (2011). Effects of conditional depletion of topoisomerase II on cell cycle progression in mammalian cells. *Cell Cycle*, *10*(20), 3505-3514.

Guo, Q.-L., You, Q.-D., Wu, Z.-Q., Yuan, S.-T., & Zhao, L. (2004). General gambogic acids inhibited growth of human hepatoma SMMC-7721 cells in vitro and in nude mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, *25*, 769-774.

Hasinoff, B. B. (1998). Chemistry of dexrazoxane and analogues. *Seminars in oncology*, Vol. 25, No. 4 Suppl 10, str. 3-9

Hasinoff, B. B., Kuschak, T. I., Yalowich, J. C., & Creighton, A. M. (1995). A QSAR study comparing the cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory effects of bisdioxopiperazine analogs of ICRF-187 (dexrazoxane). *Biochemical pharmacology*, *50*(7), 953-958.

Chamani, E., Rabbani-Chadegani, A., & Zahraei, Z. (2014). Spectroscopic detection of etoposide binding to chromatin components: the role of histone proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *133*, 292-299.

Champoux, J. J. (2004) DNA topoisomerases: type I. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, str. 798–805.

Cheson, B. D., Levine, A. M., Mildvan, D., Kaplan, L. D., Wolfe, P., Rios, A., Groopman, J. E., Gill, P., Volberding, P. A., & Poiesz, B. J. (1987). Suramin therapy in AIDS and related disorders: report of the US Suramin Working Group. *Jama*, *258*(10), 1347-1351.

Chlopčíková, Š., Pšotová, J., & Míketová, P. (2001). Neonatal rat cardiomyocytes-a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomedical Papers-Palacky University in Olomouc*, *145*(2), 49-55.

Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, *295*(3), 369-371.

Jensen, L. H., Thougard, A. V., Grauslund, M., Søkilde, B., Carstensen, E. V., Dvinge, H. K., Scudiero, D. A., Jensen, P. B., Shoemaker, R. H., & Sehested, M. (2005). Substituted purine analogues define a novel structural class of catalytic topoisomerase II inhibitors. *Cancer research*, 65(16), 7470-7477.

Jirkovská-Vávrová, A., Roh, J., Lenčová-Popelová, O., Jirkovský, E., Hrušková, K., Potůčková-Macková, E., Jansová, H., Hašková, P., Martinková, P., & Eisner, T. (2015). Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Toxicology Research*, 4(4), 1098-1114.

Jirkovský, E., Jirkovská, A., Bavlovič-Piskáčková, H., Skalická, V., Pokorná, Z., Karabanovich, G., Kollárová-Brázdová, P., Kubeš, J., Lenčová-Popelová, O., Mazurová, Y., Adamcová, M., Lyon, A. R., Roh, J., Šimůnek, T., Štěrbová-Kovaříková, P., & Štěřba, M. (2021). Clinically Translatable Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity by Dexrazoxane Is Mediated by Topoisomerase II Beta and Not Metal Chelation. *Circ Heart Fail*, 14(11), e008209.

Johnson, R., Zee-Cheng, R., Lee, W., Acton, E., Henry, D., & Cheng, C. (1979). Experimental antitumor activity of aminoanthraquinones. *Cancer Treatment Reports*, 63(3), 425-439.

Kasibhatla, S., Jessen, K. A., Maliartchouk, S., Wang, J. Y., English, N. M., Drewe, J., Qiu, L., Archer, S. P., Ponce, A. E., & Sirisoma, N. (2005). A role for transferrin receptor in triggering apoptosis when targeted with gambogic acid. *Proceedings of the national academy of sciences*, 102(34), 12095-12100.

Keller-Juslen, C., Kuhn, M., Von Wartburg, A., & Stähelin, H. (1971). Mitosis-inhibiting natural products. 24. Synthesis and antimitotic activity of glycosidic lignan derivatives related to podophyllotoxin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 14(10), 936-940.

Kim, K.-W., Roh, J. K., Wee, H.-J., & Kim, C. (2016) Natural Product Anticancer Drugs. In: *Cancer Drug Discovery*. Springer, str. 113-134.

Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293.

Larsen, A. K., Escargueil, A. E., & Skladanowski, A. (2003). Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 99(2), 167-181.

Lee, J. H., Wendorff, T. J., & Berger, J. M. (2017). Resveratrol: A novel type of topoisomerase II inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 292(51), 21011-21022.

Leone, S., Basso, E., Polticelli, F., & Cozzi, R. (2012). Resveratrol acts as a topoisomerase II poison in human glioma cells. *International journal of cancer*, 131(3), E173-E178.

Leone, S., Cornetta, T., Basso, E., & Cozzi, R. (2010). Resveratrol induces DNA double-strand breaks through human topoisomerase II interaction. *Cancer letters*, 295(2), 167-172.

Li, L., Qiu, R. L., Lin, Y., Cai, Y., Bian, Y., Fan, Y., & Gao, X. J. (2018). Resveratrol suppresses human cervical carcinoma cell proliferation and elevates apoptosis via the mitochondrial and p53 signaling pathways. *Oncology letters*, 15(6), 9845-9851.

Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C.-P., Azarova, A. M., Tsai, Y.-C., Ban, Y., & Liu, L. F. (2007). Topoisomerase II β -mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer research*, 67(18), 8839-8846.

Maghzi, A.-H., Borazanci, A., McGee, J., Alexander, J. S., Gonzalez-Toledo, E., & Minagar, A. (2011) Multiple sclerosis: pathophysiology, clinical features, diagnosis, and management. In: *Neuroinflammation*. Elsevier, str. 1-23.

Martin, E., Thougard, A. V., Grauslund, M., Jensen, P. B., Bjorkling, F., Hasinoff, B. B., Tjørnelund, J., Sehested, M., & Jensen, L. H. (2009). Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology*, 255(1-2), 72-79.

Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L., & He, J. (2021). Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. *Molecules*, 26(1), 229.

Minniti, E., Byl, J. A. W., Riccardi, L., Sissi, C., Rosini, M., De Vivo, M., Minarini, A., & Osheroff, N. (2017). Novel xanthone-polyamine conjugates as catalytic inhibitors of human topoisomerase II α . *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(20), 4687-4693.

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, 56(2), 185-229.

Mody, H., Vaidya, T. R., & Ait-Oudhia, S. (2023). In vitro to clinical translational pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of doxorubicin (DOX) and dexrazoxane (DEX) interactions: Safety assessment and optimization. *Scientific Reports*, 13(1), 3100.

Monahan, D. S., Flaherty, E., Hameed, A., & Duffy, G. P. (2021). Resveratrol significantly improves cell survival in comparison to dexrazoxane and carvedilol in a h9c2 model of doxorubicin induced cardiotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 140, 111702.

Montecucco, A., Zanetta, F., & Biamonti, G. (2015). Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI journal*, 14, 95.

Mordente, A., Minotti, G., Martorana, G. E., Silvestrini, A., Giardina, B., & Meucci, E. (2003). Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochemical pharmacology*, 66(6), 989-998.

Morris, S. K., Baird, C. L., & Lindsley, J. E. (2000). Steady-state and rapid kinetic analysis of topoisomerase II trapped as the closed-clamp intermediate by ICRF-193. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2613-2618.

Mouridsen, H. T., Langer, S. W., Buter, J., Eidtmann, H., Rosti, G., De Wit, M., Knoblauch, P., Rasmussen, A., Dahlstrøm, K., & Jensen, P. (2007). Treatment of anthracycline extravasation with Savene (dexrazoxane): results from two prospective clinical multicentre studies. *Annals of Oncology*, 18(3), 546-550.

Návod k použití akrylamidové sady a startovací sady TGX™ and TGX Stain Free™ FastCast™. Bio-Rad Laboratories, Inc [online]. Poslední revize 10.9.2013 [cit. 2023-01-08]. Dostupné z: <<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10033918.pdf>>

Nitiss, J. L. (2009a). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 327-337.

Nitiss, J. L. (2009b). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 338-350.

Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, 463, 73-95.

Novelle, M. G., Wahl, D., Diéguez, C., Bernier, M., & De Cabo, R. (2015). Resveratrol supplementation: where are we now and where should we go? *Ageing research reviews*, 21, 1-15.

Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, 1(1), 23-29.

Olive, P. L., & Johnston, P. J. (1997). DNA damage from oxidants: influence of lesion complexity and chromatin organization. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 9(6-7), 287-294.

Olson, R. D., Mushlin, P. S., Brenner, D. E., Fleischer, S., Cusack, B. J., Chang, B. K., & Boucek Jr, R. (1988). Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proceedings of the national academy of sciences*, 85(10), 3585-3589.

Osheroff, N., Shelton, E., & Brutlag, D. (1983). DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 258(15), 9536-9543.

Park, D.-W., Baek, K., Kim, J.-R., Lee, J.-J., Ryu, S.-H., Chin, B.-R., & Baek, S.-H. (2009). Resveratrol inhibits foam cell formation via NADPH oxidase 1-mediated reactive oxygen species and monocyte chemoattractant protein-1. *Experimental & molecular medicine*, 41(3), 171-179.

Platel, D., Bonoron-Adèle, S., & Robert, J. (2001). Role of Daunorubicinol in Daunorubicin-Induced Cardiotoxicity as Evaluated with the Model of Isolated Perfused Rat Heart. *Pharmacology & Toxicology*, 88(5), 250-254.

Pogorelcnik, B., Perdih, A., & Solmajer, T. (2013). Recent advances in the development of catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase II α as novel anticancer agents. *Current medicinal chemistry*, 20(5), 694-709.

Pollak, M., & Richard, M. (1990). Suramin blockade of insulinlike growth factor I-stimulated proliferation of human osteosarcoma cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82(16), 1349-1352.

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology*, 17(5), 421-433.

Pouna, P., Bonoron - Adèle, S., Gouverneur, G., Tariosse, L., Besse, P., & Robert, J. (1996). Development of the model of rat isolated perfused heart for the evaluation of anthracycline cardiotoxicity and its circumvention. *British journal of pharmacology*, 117(7), 1593-1599.

Qi, Q., You, Q., Gu, H., Zhao, L., Liu, W., Lu, N., & Guo, Q. (2008). Studies on the toxicity of gambogic acid in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 117(3), 433-438.

Qin, Y., Meng, L., Hu, C., Duan, W., Zuo, Z., Lin, L., Zhang, X., & Ding, J. (2007). Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II α by binding to its ATPase domain. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(9), 2429-2440.

QPRO Product manual – Protein quantitation Bicinchoninic Acid (BCA) kit. Cyanagen s.r.l. [online]. Poslední revize 1.3.2022 [cit. 2023–01-08]. . Dostupné z: <<https://www.cyanagen.com/cyanacontent/uploads/Products/QPRO-BCA-kit-Standard/Product-Manual/QPRO-Product-manual-Rev-01-11-2020.pdf>>

Robert, J., & Gianni, L. (1993). Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer surveys*, 17, 219-252.

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858-5868.

Rong, J.-J., Hu, R., Song, X.-M., Ha, J., Lu, N., Qi, Q., Tao, L., You, Q.-D., & Guo, Q.-L. (2010). Gambogic acid triggers DNA damage signaling that induces p53/p21Waf1/CIP1 activation through the ATR-Chk1 pathway. *Cancer letters*, 296(1), 55-64.

Ross, W., Rowe, T., Glisson, B., Yalowich, J., & Liu, L. (1984). Role of topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage. *Cancer research*, 44(12_Part_1), 5857-5860.

Řezáčová, M., Havelek, R., Lukášová, E., & Vávrová, J. (2011). Phosphorylation of Histone H2AX-A Novel Indicator of DNA Damage. *Chemické listy*, 105(2).

Salehi, B., Mishra, A. P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P. V. T., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. *Biomedicines*, 6(3), 91.

Scott, L. J., & Figgitt, D. P. (2004). Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS drugs*, 18, 379-396.

Sehested, M., & Jensen, P. B. (1996). Mapping of DNA topoisomerase II poisons (etoposide, clerocidin) and catalytic inhibitors (aclerubicin, ICRF-187) to four distinct steps in the topoisomerase II catalytic cycle. *Biochemical pharmacology*, 51(7), 879-886.

Sergides, C., Chirilă, M., Silvestro, L., Pitta, D., & Pittas, A. (2016). Bioavailability and safety study of resveratrol 500 mg tablets in healthy male and female volunteers. *Experimental and therapeutic medicine*, 11(1), 164-170.

Schott, B., & Robert, J. (1989). Comparative activity of anthracycline 13-dihydrometabolites against rat glioblastoma cells in culture. *Biochemical pharmacology*, 38(22), 4069-4074.

Singal, P. K., & Iliskovic, N. (1998). Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 339(13), 900-905.

Smith, P. e., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., & Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.

Sørensen, B. S., Jensen, P. B., Sehested, M., Jensen, P. S., Kjeldsen, E., Nielsen, O. F., & Alsner, J. (1994). Antagonistic effect of aclerubicin on camptothecin induced cytotoxicity: role of topoisomerase I. *Biochemical pharmacology*, 47(11), 2105-2110.

Sørensen, B. S., Sinding, J., Andersen, A. H., Alsner, J., Jensen, P. B., & Westergaard, O. (1992). Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence: uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. *Journal of molecular biology*, 228(3), 778-786.

Stein, C., LaRocca, R., Thomas, R., McAtee, N., & Myers, C. E. (1989). Suramin: an anticancer drug with a unique mechanism of action. *Journal of Clinical Oncology*, 7(4), 499-508.

Sutormin, D., Galivondzhyan, A., Polkhovskiy, A., Kamalyan, S., Severinov, K., & Dubiley, S. (2021). Diversity and Functions of Type II Topoisomerases. *Acta Naturae*, 13(1), 59.

Šimůnek, T., Štěřba, M., Popelová, O., Kaiserová, H., Adamcová, M., Hroch, M., Hašková, P., Poňka, P., & Geršl, V. (2008). Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *British journal of pharmacology*, 155(1), 138-148.

Tan, K., Dorman, T. E., Falls, K. M., Chung, T. D., Mirabelli, C. K., Crooke, S. T., & Mao, J.-i. (1992). Topoisomerase II α and topoisomerase II β genes: characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively. *Cancer research*, 52(1), 231-234.

Thida, M., Kim, D. W., Tran, T. T. T., Pham, M. Q., Lee, H., Kim, I., & Lee, J. W. (2016). Gambogic acid induces apoptotic cell death in T98G glioma cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(3), 1097-1101.

Tian, W., Yang, L., Liu, Y., He, J., Yang, L., Zhang, Q., Liu, F., Li, J., Liu, J., & Sumi, S. (2020). Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by up-regulation of vascular endothelial growth factor B. *The Journal of nutritional biochemistry*, 79, 108132.

Trans-Blot® Turbo™ Transfer System – Stručný návod k použití. Bio-Rad Laboratories, Inc [online]. Poslední revize 28.10.2011 [cit. 2023-02-08]. Dostupné z: <<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10016505D.pdf>>

van der Zanden, S. Y., Qiao, X., & Neefjes, J. (2021). New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *The FEBS journal*, 288(21), 6095-6111.

Vásquez-Vivar, J., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S. S., Pritchard, K. A., & Kalyanaraman, B. (1997). Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry*, 36(38), 11293-11297.

Vávrová, A., & Šimůnek, T. (2012). DNA topoisomerase II β : a player in regulation of gene expression and cell differentiation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(6), 834-837.

Vélez-Cruz, R., & Osheroff, N. (2004) DNA topoisomerases: type II. In: Encyclopedia of Biological Chemistry. Elsevier, str. 806-811.

Walker, J. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 32, 5-8.

Wang, L.-H., Yang, J.-Y., Yang, S.-N., Li, Y., Ping, G.-F., Hou, Y., Cui, W., Wang, Z.-Z., Xiao, W., & Wu, C.-F. (2014). Suppression of NF- κ B signaling and P-glycoprotein function by gambogic acid synergistically potentiates adriamycin-induced apoptosis in lung cancer. *Current cancer drug targets*, 14(1), 91-103.

Wang, X., & Chen, W. (2012). Gambogic acid is a novel anti-cancer agent that inhibits cell proliferation, angiogenesis and metastasis. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(8), 994-1000.

Weiss, R. B. (1992). The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in oncology*, Vol. 19, No. 6, str. 670-686

Wiedemar, N., Hauser, D. A., & Mäser, P. (2020). 100 years of suramin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(3), e01168-01119.

Wu, Z.-Q., Guo, Q.-L., You, Q.-D., Zhao, L., & Gu, H.-Y. (2004). Gambogic acid inhibits proliferation of human lung carcinoma SPC-A1 cells in vivo and in vitro and represses telomerase activity and telomerase reverse transcriptase mRNA expression in the cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(11), 1769-1774.

Xu, Q., & Si, L.-Y. (2012). Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action. *Nutrition Research*, 32(9), 648-658.

Yang, R., Dong, H., Jia, S., & Yang, Z. (2022). Resveratrol as a modulatory of apoptosis and autophagy in cancer therapy. *Clinical and Translational Oncology*, 24(7), 1219-1230.

Yang, S.-Y., Jia, X.-Z., Feng, L.-Y., Li, S.-Y., An, G.-S., Ni, J.-H., & Jia, H.-T. (2009). Inhibition of topoisomerase II by 8-chloro-adenosine triphosphate induces DNA double-stranded breaks in 8-chloro-adenosine-exposed human myelocytic leukemia K562 cells. *Biochemical pharmacology*, 77(3), 433-443.

Youns, M., ElKhoely, A., & Kamel, R. (2018). The growth inhibitory effect of gambogic acid on pancreatic cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 391(5), 551-560.

Yu, J., Guo, Q.-L., You, Q.-D., Zhao, L., Gu, H.-Y., Yang, Y., Zhang, H.-w., Tan, Z., & Wang, X. (2007). Gambogic acid-induced G 2/M phase cell-cycle arrest via disturbing CDK7-mediated phosphorylation of CDC2/p34 in human gastric carcinoma BGC-823 cells. *Carcinogenesis*, 28(3), 632-638.

Zhang, C., Feng, Y., Qu, S., Wei, X., Zhu, H., Luo, Q., Liu, M., Chen, G., & Xiao, X. (2011). Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of p53. *Cardiovascular research*, 90(3), 538-545.

Zhang, L., Zhu, K., Zeng, H., Zhang, J., Pu, Y., Wang, Z., Zhang, T., & Wang, B. (2019). Resveratrol solid lipid nanoparticles to trigger credible inhibition of doxorubicin cardiotoxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 6061-6071.

Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L.-S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., & Yeh, E. T. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine*, 18(11), 1639-1642.

Zhao, L., Zhen, C., Wu, Z., Hu, R., Zhou, C., & Guo, Q. (2010). General pharmacological properties, developmental toxicity, and analgesic activity of gambogic acid, a novel natural anticancer agent. *Drug and chemical toxicology*, 33(1), 88-96.