

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Antiprolifernační aktivita nových analogů dexrazoxanu a jejich vliv na protinádorový účinek antracyklinů

Diplomová práce

Studijní program: Zdravotnická bioanalýtika
Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách
Vedoucí diplomové práce: Pharm.Dr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Pavla Martinková

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

Dne

v Hradci Králové

Podpis

Ráda bych poděkovala svým školitelkám Pharm.Dr. Lucii Vostatkové, Ph.D. a Pharm.Dr. Anně Jirkovské, Ph.D. a jejich mentorovi Doc. Pharm.Dr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D. za jejich cenné rady, informace, trpělivost a připomínky, které mi poskytli v průběhu psaní této práce. Také bych ráda poděkovala zaměstnancům a studentům katedry biochemických věd za příjemné pracovní prostředí a praktické rady, které byly přínosem pro vypracování této práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Pavla Martinková

Školitel: Pharm.Dr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Název diplomové práce: Antiproliferační aktivita nových analogů dexrazoxanu a jejich vliv na protinádorový účinek antracyklinů

Antracyklinová antibiotika (daunorubicin, doxorubicin, epirubicin a další) jsou v současné době jedny z nejpoužívanějších léčiv solidních tumorů i hematologických malignit. Jejich užívání je však omezeno závažným nežádoucím účinkem – kardiotoxicitou, který může být eliminován jediným dosud registrovaným kardioprotektivem – dexrazoxanem. Přestože je dexrazoxan jediné registrované kardioprotektivum, jeho užívání v klinické praxi je velmi omezené. Proto existují snahy o syntézu jeho analogů, které by mohly pomoci pochopit vztah struktury a účinku dexrazoxanu a případně vést k objevení struktury s výhodnějšími vlastnostmi.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit antiproliferační aktivitu nových analogů dexrazoxanu (MK-15 a ES-5) a jeho metabolitu ADR-925 (JR-159 a KH-TA4) a vliv těchto nových analogů na antiproliferační účinek antracyklinů a také studovat jejich chelatační vlastnosti a interakci těchto látek s topoisomerasou II.

Nové analogy jsme testovali na buňkách promyelocytární leukemické linie HL-60. Viabilitu buněk jsme (po 72 hodinách inkubace buněk s testovanými látkami na mikrotitračních 96-jamkových destičkách) hodnotili pomocí MTT testu. Chelatační aktivitu látek jsme zjišťovali pomocí změření časového průběhu změny absorbance komplexu antracyklinu s železem a schopnost nových analogů inhibovat topoisomerasu II jsme hodnotili enzymaticky pomocí kinetoplastové DNA jako substrátu pro topoisomerasu II.

Z naměřených výsledků jsme došli k závěru, že pouze dexrazoxan a KH-TA4 dokázaly statisticky snížit buněčnou viabilitu. Protinádorový účinek antracyklinů byl ve všech případech testovanými látkami zvýšen. Chelatační aktivitu vykazovalo ADR-925 a JR-159. Schopnost katalyticky inhibovat topoisomerasu II prokázal pouze dexrazoxan.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Pavla Martinková

Supervisor: PharmDr. Anna Jirkovská, PhD.

Title of diploma thesis: Antiproliferative activity of novel dexrazoxane analogues and their effect on antitumor effectiveness of anthracyclines

Anthracycline antibiotics (such as daunorubicin, doxorubicin or epirubicin) belong to the most common therapeutics of both solid tumors and hematological malignities. Unfortunately the serious and life-threatening adverse effect cardiotoxicity compromises their clinical usefulness. The only approved protection against anthracycline cardiotoxicity so far is dexrazoxane. Despite the outstanding cardioprotective ability, dexrazoxane use is very limited mainly due to its possible side effects. So we were directed towards synthesis of dexrazoxane analogues with better pharmacological properties.

The aim of this diploma thesis was to assess the antiproliferative activity of novel analogues of both dexrazoxane (MK-15 and ES-5) and ADR-925 (JR-159 and KH-TA4) and their influence on the antiproliferative effectiveness of anthracyclines. Moreover, we aimed to study their chelating properties and their inhibition of the topoisomerase II in solution.

We tested the antiproliferative activity of the novel analogues using the promyelotic leukemia HL-60 cell line. Cellular viability was assessed with MTT test after 72 hours of incubation of cells with novel analogues alone or in combination with daunorubicin on 96-well plates at a density of 10,000 cells per well. Iron displacement from its complex with anthracyclines was measured spectrophotometrically by the changes of the daunorubicin-Fe complex specific absorbation at 600 nm over time. The results show statistically significant drop in the HL-60 proliferation caused by dexrazoxane and KH-TA4. The novel agents (10 and 100 μ M) did not compromise the antiproliferative action of 15 nM daunorubicin (IC_{50} value). From the novel analogues, only JR-159 was able to at least partially displace iron from its daunorubicin complex. The relaxation activity of topoisomerase II was inhibited by 100 μ M dexrazoxane.

1. ÚVOD	7
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1. Antracyklinová antibiotika	9
2.1.1. Historie a struktura	9
2.1.2. Daunorubicin	10
2.1.3. Protinádorový účinek antracyklinů	10
2.1.4. Kardiotoxicita	14
2.2. Dexrazoxan	18
2.2.1. Historie a struktura	18
2.2.2. Dexrazoxan jako kardioprotektivum	19
2.3. Analogy dexrazoxanu	21
2.3.1. MK-15 a ES-5	24
2.3.2. JR-159 a KH-TA4	24
3. CÍLE PRÁCE	26
4. MATERIÁL A METODIKA	27
4.1. Materiál	27
4.1.1. Buněčná linie	27
4.1.2. Přístroje a vybavení	27
4.1.3. Chemikálie	28
4.2. Pracovní postupy	30
4.2.1. Kultivace	30
4.2.2. Pasážování buněk	30
4.2.3. Inkubace buněk s testovanými látkami	31
4.2.4. Vyhodnocení viability buněk	31
4.2.5. Chelatační testy	32
4.2.6. Testování inhibice topoisomerasy II novými analogy	32
4.2.7. Zpracování naměřených dat	33

5. VÝSLEDKY	34
5.1. Antiproliferační účinky sledovaných látek	34
5.1.1. Antiproliferační účinek DAU	34
5.1.2. Antiproliferační účinek DEX	35
5.1.3. Antiproliferační účinek ADR-925	36
5.1.4. Antiproliferační účinek JR-159	37
5.1.5. Antiproliferační účinek ES-5	38
5.1.6. Antiproliferační účinek KH-TA4	39
5.1.7. Antiproliferační účinek MK-15	40
5.2. Kombinační testy	41
5.2.1. Kombinace DAU a DEX	41
5.2.2. Kombinace DAU a ADR-925	42
5.2.3. Kombinace DAU a JR-159	43
5.2.4. Kombinace DAU a ES-5	44
5.2.5. Kombinace DAU a KH-TA4	45
5.2.6. Kombinace DAU a MK-15	46
5.3. Chelatační testy	47
5.3.1. Změny absorpance v čase	47
5.3.2. Absorpční spektra	48
5.4. Stanovení inhibice topoisomerasy II	49
6. DISKUZE	50
7. ZÁVĚRY	58
8. SEZNAM ZKRATEK	59
9. LITERATURA	60

1. Úvod

Zhoubné novotvary jsou v současné době jednou z nejčastějších příčin úmrtí na celém světě. Např. v roce 2012 8,2 milionů pacientů zemřelo na následky nádoru nebo jiného novotvaru a 14 milionů obyvatel touto chorobou onemocnělo. Počet nových onemocnění se každý rok zvyšuje a proto mezi hlavní cíle lékařů a vědců patří prodloužení života pacientů a nalézení účinné léčby. Kromě chirurgických zákroků, chemoterapie a radioterapie patří mezi zavedené terapeutické postupy léčba antracyklinovými antibiotiky.

Antracykliny byly izolovány na počátku 60. let 20. století, tento objev znamenal výrazný přínos v léčbě rakoviny a i dnes patří nepostradatelně k léčivům solidních tumorů (rakovina prsu, vaječníků) a hematologických onemocnění (lymfomy, akutní a chronické leukemie). Přestože se antracykliny prokázaly jako velmi účinné léčivo, s postupem času vyšly najevo i jejich nežádoucí účinky, jako např. trombocytopenie, granulocytopenie, anémie, krvácivé stavy, nekróza tkáně při subkutánním nebo intramuskulárním podání a nejzávažnější z nich – kardiotoxicita. Právě rozvoj pozdních forem kardiotoxicity je nejvíce limitujícím a dávku omezujícím faktorem antracyklinové léčby.

V průběhu let se řada vědeckých týmů pokoušela objasnit mechanismy vzniku kardiotoxicity, což by mohlo napomoci při syntéze léčiva, které by kardiotoxicitu eliminovalo. Nakonec se nezávisle na těchto pokusech na trhu objevilo léčivo dexrazoxan, které bylo původně syntetizováno jako cytotoxická látka, ale v průběhu klinických testů se projevila jeho schopnost kardioprotekce. I přesto, že až do současnosti byla připravena řada látek, která se svou strukturou a mechanismem účinku dexrazoxanu podobá, je dexrazoxan zatím jediné registrované kardioprotektivum.

Avšak ani užívání dexrazoxanu spolu s antracykliny není v praxi příliš běžné a obě látky se současně podávají přibližně pouze 7 % pacientů se zhoubným novotvarem. Užívání dexrazoxanu je omezeno spekulacemi o ovlivnění antiproliferačního účinku antracyklinů, možné indukci sekundárních malignit a také jeho poměrně vysokou cenou ve srovnání s antracykliny.

Proto je i dnes cílem vědců pochopit mechanismus kardiotoxicity antracyklinů a kardioprotekce dexrazoxanu. Studium této problematiky by mohlo pomoci při

přípravě látek, které by byla schopná ochránit srdeční sval před kardiotoxicitou a která by zároveň neměla závažné nežádoucí účinky.

V rámci projektu Centra pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém (Univerzitní výzkumné centrum UNCE 204019/304019/2012) byly připraveny dva nové analogy dexrazoxanu (ES-5, MK-15) a dva nové analogy jeho hydrolyzovaného metabolitu ADR-925 (JR-159, KH-TA4), které byly hodnoceny z hlediska jejich antiproliferačních i kardioprotektivních účinků.

Cílem této práce, která vznikla za podpory projektů SVV 267 004, UNCE 204019/304019/2012, GAČR (13-15008S) a projektu „Podpora vytváření, rozvoje a mobility kvalitních výzkumně-vývojových týmů na Univerzitě Karlově“ (reg. číslo CZ.1.07/2.3.00/30.0022), je zjistit *in vitro* podmínkách antiproliferační aktivitu nových analogů, vliv nových analogů na protinádorový účinek antracyklinů a studovat prostřednictvím testování nových analogů mechanismus kardioprotekce dexrazoxanu.

2. Současný stav řešené problematiky

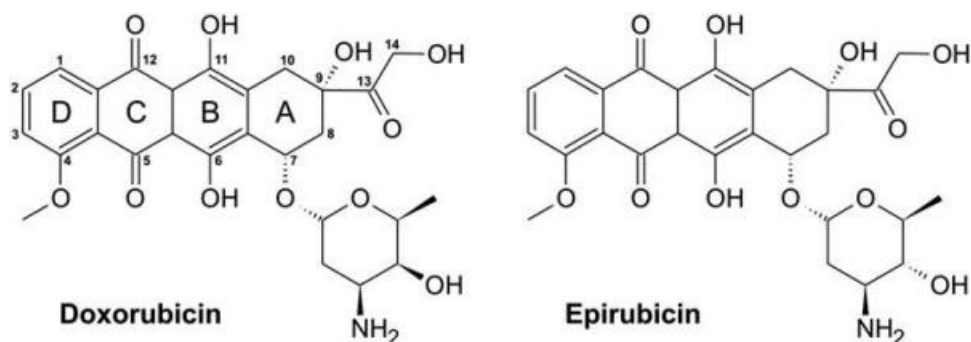
2.1. Antracyklinová antibiotika

2.1.1. Historie a struktura

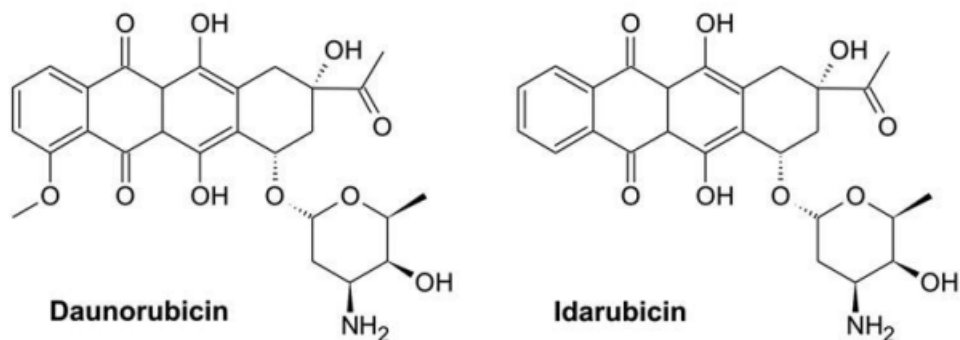
Antracyklinová antibiotika (ANT, antracykliny) jsou látky tetracyklické struktury, které se poprvé podařilo izolovat na počátku 60. let 20. století. Jejich zavedení do klinické praxe znamenalo jeden z největších pokroků v léčbě rakoviny a nezastupitelné jsou dodnes v řadě terapeutických protokolů, a to i přes široké spektrum nežádoucích účinků, které terapii pomocí ANT doprovázejí (Siegel a kol., 2012).

V roce 1963 byl z modifikovaného kmene bakterie *Streptomyces peucetius* izolován první ANT daunorubicin (DAU, daunomycin, rubidomycin) (Grein a kol., 1964), který se začal úspěšně využívat převážně pro terapii akutní myeloidní leukemie u dětí (Tan a kol., 1967). Následně byl ještě v 60. letech izolován z bakterie *Streptomyces peucetius* var. *caesius* doxorubicin (adriamycin). U doxorubicinu byla prokázána účinnost proti širokému spektru onkologických onemocnění, jak hematologických malignit (včetně Hodgkinova a ne Hodgkinových lymfomů), tak solidních tumorů (např. rakoviny prsu, vaječníků, kolorektálního karcinomu a osteosarkomu). V dalších letech byly připraveny i semisyntetické analogy epirubicin, idarubicin, valrubicin a další (Štěrbá a kol., 2013).

ANT jsou tetracyklické aglykony se sousedícími chinonovými a hydrochinonovými strukturami, na nichž je v poloze 4 na kruhu D vázána methoxyskupina a v poloze 9 je vázán tříuhlíkatý řetězec s karbonylem a hydroxyskupinou. V poloze 7 je pak glykosidickou vazbou vázán sacharid daunosamin (Minotti a kol., 2004).



Obr. 1 Chemické struktury doxorubicinu a epirubicinu (převzato z Štěrbá a kol., 2013)



Obr. 2 Chemické struktury daunorubicinu a idarubicinu (převzato z Štěrba a kol., 2013)

2.1.2. Daunorubicin

DAU je antracyklinové chemoterapeutikum se sumárním vzorcem $C_{27}H_{29}NO_{10}$, molekulovou hmotností 527,519897 g/mol a systematickým názvem (1S,3S)-3-Acetyl-3,5,12-trihydroxy-10-metoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydro-1-tetracenyloxy-3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosid (PubChem Compounds). Strukturně se DAU skládá z pigmentovaného aglykonu daunomycinonu, na který se v poloze 7 váže sacharid daunosamin (Tan a kol., 1967).

V preklinickém hodnocení DAU na myších a potkaních xenograftových modelech byla pozorována inhibice růstu nádorů a prodloužení přežití zvířat. V *in vitro* testech na normálních a neoplastických buňkách působil DAU toxicky při koncentraci 0,1 – 1,0 μ g/ml. Při prvotním klinickém hodnocení u pacientů způsoboval vážnou lokální reakci (nekrózu tkáně při extravazaci DAU), myelosupresi s konečnou leukopenií, anémií, trombocytopenií a krvácivé stavy. Vzhledem ke schopnosti DAU nekrotizovat okolní tkáň se může podávat pouze intravenózně, nikdy subkutánně nebo intramuskulárně (Tan a kol., 1967).

2.1.3. Protinádorový účinek antracyklinů

I přesto, že byla antracyklinová léčiva izolována před více než padesáti lety a jsou stále hojně využívána v klinické praxi, jejich přesný mechanismus účinku nebyl ještě zcela objasněn a je stále otázkou řady diskuzí (Gewirtz, 1999; Minotti a kol., 2004).

Prvotní studie poukazovaly na interkalaci ANT do DNA jako hlavní mechanismus protinádorového účinku ANT. Během interkalace se planární aromatický aglykon ANT může vmezeřit mezi páry bází DNA, daunosamin pak v malém žlábků DNA reaguje

s dalšími postranými páry bazí (Pigram a kol., 1972). Interkalace ANT brání replikaci DNA, čímž dochází i k blokadě buněčného cyklu a zastavení replikace rychle rostoucích rakovinných buněk (Sinha a kol., 1984; Gewirtz, 1999).

Dále se předpokládalo, že ANT jsou cytotoxické kvůli svým schopnostem produkovat volné radikály a reaktivní formy kyslíku (ROS) a tím způsobovat oxidační poškození (Muindi a kol., 1984). Chinonová struktura umožňuje ANT působit v oxidoredukčních reakcích jako akceptory volného elektronu. Působením enzymů, jako je např. cytochrom P450, NADH dehydrogenáza a xantinoxidáza, se chinon přeměňuje na semichinon a vede ke vzniku volných radikálů, které mohou poškodit DNA, vést k peroxidaci lipidů nebo proteinů (Halliwell a Gutteridge, 1999).

Byl zaznamenán také vznik DNA aduktů s ANT v roztoku, a to cestou enzymatickou i chemickou. Komplex DNA-chinon vznikl jak s jednořetězcem, tak s dvouřetězcem DNA (Phillips, 1989; Cullinane a Phillips, 1990). To potvrzovalo dřívější studie ze Sinhovy laboratoře a studie Wallace a Johnsona, které prokázaly vazbu ANT na DNA zprostředkovanou enzymem, nebo chemicky (Sinha a Chignell, 1979; Sinha a kol., 1984; Wallace a Johnson, 1986). Pozdější *in vitro* studie prokázaly i vznik DNA cross-linků (Gewirtz, 1999).

Některé z původních tezí byly založeny na myšlence, že ANT jsou schopné se navazovat na buněčné membrány a tím působit cytotoxicky, což se později ukázalo jako nepravděpodobné za standardních klinických podmínek. Navíc bylo prokázáno, že pro své cytotoxické působení musí být ANT přítomny uvnitř buňky (Gewirtz, 1999).

Další studie prokázaly schopnost ANT ovlivňovat rozdělení dvouřetězce DNA. To bylo zapříčiněno buď vznikajícími DNA cross-linky, nebo změněnou koncentrací helikázy v důsledku působení ANT (Gewirtz, 1999).

Předpokládá se, že ANT jsou schopné navodit transkripční aktivitu proteinu p53 ve prospěch exprese genu *p21* za vzniku proteinu WAF1/CIP1. Tím dochází k zastavení buněčného cyklu při přechodu z fáze G1 do S fáze. Tento názor navíc koreluje s konceptem, že vyšší hladiny proteinu WAF1/CIP1 byly pozorovány při chemorezistentní akutní myeloidní leukemii (Zhang a kol., 1995).

Dnes převažuje teorie, že hlavním cílem ANT je enzym topoisomerasa II (TOP2) (Binaschi a kol., 2001). Topoisomerasy obecně jsou isomerasové enzymy, které se účastní replikace DNA tím, že uvolňují nadšroubovicové vinutí, čímž umožňují přístup helikas k jednotlivým vláknům a nasednutí replikačního aparátu. Dochází

k dočasnému přerušení jednoho (topoisomerasy I), nebo obou (topoisomerasy II) vláken dvouřetězce, čímž se zabrání „překroucení“ a zvýšené tenzi v jedné části DNA (před replikačním aparátem) vzniklé při rozvolnění vláken DNA helikasou (Champoux, 2001).

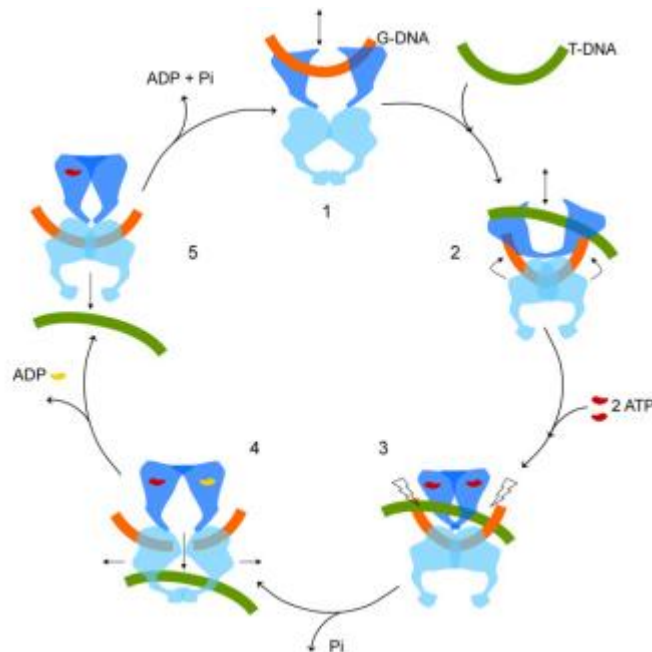
DNA topoisomeráza byla objevena v roce 1971 Jamesem Wangem v bakterii *Escherichia coli*. Protein byl izolován jako monomer o velikosti přibližně 100 kDa a byla u něj zjištěna schopnost rozplétat dvouřetězec DNA v průběhu replikace. Polypeptid vykazoval nukleasovou a ligasovou aktivitu a byl nazván ω protein, později byl zařazen mezi topoisomerasy I (Wang, 1971). V roce 1976 byla z prokaryotických buněk (*Escherichia coli*) izolována DNA gyrasa a o několik let později byla z eukaryotických buněk (*Xaenopus levis*) izolována TOP2. TOP2 spolu s DNA gyrasou jsou enzymy, které jsou schopny přerušit obě vlákna DNA za využití energie v podobě adenosintrifosfátu (ATP). Tyto enzymy řadíme je mezi topoisomerasy IIA (Pommier, 2012).

Zatímco u nižších eukaryot se vyskytuje pouze jedna izoforma TOP2, v buňkách obratlovců se vyskytují dvě izoformy – TOP2 α a TOP2 β . Jejich struktura je podobná (z 68 % shodná sekvence), liší se od sebe svou funkcí a regulací. TOP2 α je protein o molekulové hmotosti 170 kDa, její gen je lokalizován na chromozomu 17q21-22 (Christensen, 2002). Její exprese je značně zvýšena hlavně u dělicích se a nádorových buněk (Lyu a kol., 2007). Aktivita této izoformy je modulována v závislosti na buněčném cyklu a transkripční aktivitě, je přísně regulována v průběhu celého buněčného cyklu a vrcholí při přechodu buněčného cyklu z fáze G2 do fáze M, kdy je nutné oddělit dceřinný dvouřetězec DNA od dvouřetězce původního (Binaschi a kol., 2001; Deweese a Osheroff, 2010).

TOP2 β má velikost 180 kDa, je kódována na chromozomu 3p24 (Christensen, 2002), vyskytuje se u všech buněk včetně postmitotických a její aktivita je přibližně stejná v průběhu celého buněčného cyklu (Nitiss, 2009). Na gen TOP2 β můžeme do jisté míry nahlížet jako na „housekeepingový“, protože koncentrace přepsané mRNA nezávisí na stupni buněčné proliferace a jsou stejné ve všech tkáních (Christensen, 2002). Úloha TOP2 β v působení ANT je zatím prozkoumána pouze velmi málo (Zhang a kol., 2012).

Eukaryotická TOP2 je homodimerní enzym, který je schopný měnit topologii DNA bez změny struktury nebo sekvence deoxynukleotidu, způsobuje dvouřetězcové zlomy

v molekule DNA, které mění otáčky nadšroubovicového vinutí, a to za využití energie v podobě ATP (Obr. 2.3) (Pommier a kol., 2012).



Obr. 3 Katalytický cyklus TOP2. 1. Před reakcí s DNA má enzym tvar otevřené svorky. 2. Dochází k navázání a stočení molekuly DNA (červená G-DNA, která je přerušena) kolem tyrosinů aktivního centra enzymu a koordinačně vázaného Mg^{2+} a vzniká tzv. štěpný komplex. Je zachycena druhá molekula DNA (zelená T-DNA, která je transportována). 3. Navazují se dvě molekuly ATP, což způsobí uzavření N-terminální domény. Uzavřením vzniká napětí uvnitř struktury. 4. Po hydrolýze první molekuly ATP dochází k uvolnění vnitřního napětí a změně struktury enzymu, což umožňuje oddálení obou řetězců G-DNA a prostup T-DNA vzniklou mezerou. 5. Po uvolnění první molekuly ADP se od sebe oddělí C-terminální domény a je uvolněna T-DNA. Hydrolýzou druhé molekuly ATP po transportu T-DNA se enzym vrací do původní struktury otevřené svorky po tom, co opět spojil rozdělené řetězce, G-DNA (Vávrová a Šimůnek, 2012).

ANT patří mezi tzv. topoisomerasové jedy. Stabilizují tzv. štěpný komplex, který vzniká v průběhu reakčního cyklu TOP2 (Obr. 3) a brání zpětnému spojení konců DNA kovalentně vázaných na tyrozinových zbytcích v aktivním místě TOP2 (Šterba a kol., 2013).

Vzniká terciární komplex ANT-TOP2-DNA, v důsledku čehož dochází k nevratnému poškození DNA, zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 nebo G2 a nastává programovaná buněčná smrt (Perego a kol., 2001; Zunino a kol., 2001).

2.1.4. Kardiotoxicita

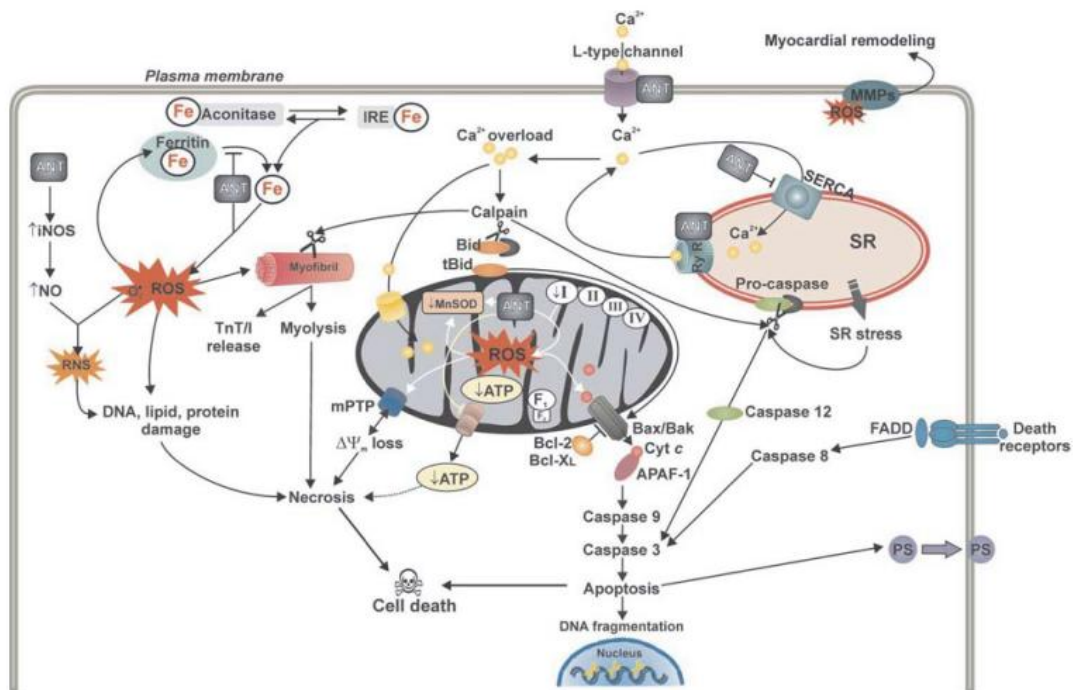
ANT patří i dnes mezi jedny z nejpoužívanějších a nejúčinnějších protinádorových léčiv, a to i přes jejich nežádoucí účinky, z nichž nejzávažnější je kardiotoxicita (Gianni a kol., 2008).

Už během léčby nebo bezprostředně po ní se toxické účinky ANT na myokard mohou projevit jako tzv. „akutní kardiotoxicita“ s vazodilatací vedoucí k hypotenzi a vzniku arytmií. Jeden až tři dny po podání vysoké dávky ANT byla pozorována tzv. „subakutní kardiotoxicita“, která se projevuje jako perikarditida a myokarditida. Tyto časné formy ANT kardiotoxicity jsou spojené s dnes už neužívaným bolusovým podáním velmi vysokých dávek ANT, jsou přechodné se spontánní úpravou symptomů, nejsou závislé na dávce a nemají souvislost s pozdními formami kardiotoxicity.

Chronické formy kardiotoxicity se objevují několik týdnů až měsíců (u tzv. „časné chronické kardiotoxicity“) nebo dokonce až několik desítek let (u tzv. „pozdní chronické kardiotoxicity“) po ukončení chemoterapie. U těchto forem dochází k nevratnému poškození myokardu vedoucí k dilatační kardiomyopatii s dysfunkcí levé komory s progresí do kongestivního srdečního selhání (Štěrba a kol., 2013).

Mechanismus poškození kardiomyocytů ANT není dodnes zcela objasněn a diskutuje se o celé řadě hypotéz, které byly studovány v průběhu půlstoletí výzkumu tohoto fenoménu (Šimůnek a kol., 2009). Na podzim roku 2006 se v italském městě Como konal The First International Workshop on Anthracycline Cardiotoxicity, na kterém byla předními světovými vědci diskutována problematika kardiotoxicity ANT, molekulární mechanismy vzniku kardiotoxicity, možnosti zmenšení jejího vlivu na kvalitu života pacientů a také kontroverzní otázky a existující hypotézy týkající se tohoto fenoménu (Gianni a kol., 2008). Mezi tyto hypotézy patří např. kumulace alkoholických metabolitů ANT v srdečním svalu, snížení syntézy nebo zvýšení degradace důležitých srdečních proteinů, převážně myofilament a buněčných skeletárních proteinů, ovlivnění buněčných a mitochondriálních koncentrací vápníku a řada dalších mechanismů (viz. Obr. 4). Tradičně je však za hlavní příčinu poškození

myokardu ANT považován železem katalyzovaný vznik volných kyslíkových radikálů (ROS) (Šimůnek a kol., 2009).

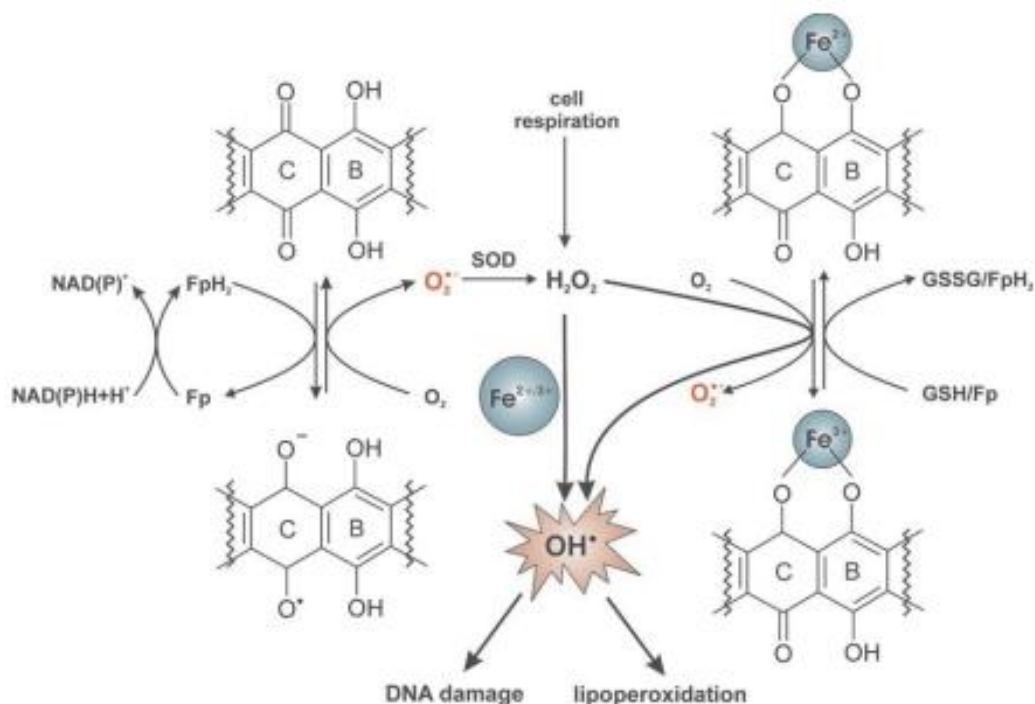


Obr. 4 Schématické znázornění mechanismu pravděpodobného vzniku chronické kardiotoxicity. ANT – antracykliny, FADD – FAS-associated death domain protein, iNOS – indukovaná syntéza oxidu dusnatého, MMP – matrixová metaloproteinasa, MnSOD – mitochondriální superoxidodismutasa, mPTP – mitochondriální propustný přechodový pór, PS – fosfatidylserin, ROS – reaktivní formy kyslíku, RNS – reaktivní formy dusíku, NO – oxid dusnatý, SR – sarkoplazmatické retikulum, TnT/I – troponin T/I (převzato z Šimůnek a kol., 2009).

ANT jsou schopné způsobovat oxidační stres několika mechanismy (Obr. 5). Předpokládá se, že ke vzniku ROS dochází při redukcí kruhu C na tetracyklické strukturu ANT, což vede ke vzniku semichinonového volného radikálu. Tato reakce může probíhat buď spontánně, nebo může být katalyzovaná flavoproteiny za účasti redukčních ekvivalentů (NADH nebo NADPH). Tato semichinonová struktura je velmi nestabilní a svůj volný elektron předává vhodnému akceptoru, nejčastěji kyslíku za vzniku superoxidu ($\cdot\text{O}_2^-$) (Šimůnek a kol., 2009).

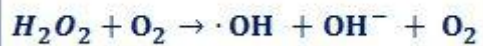
ANT mohou vytvářet ROS i prostřednictvím vzniku komplexu ANT se železem (ANT-Fe). Komplex ANT-Fe³⁺ se redukuje na ANT'-Fe²⁺, který může odebírat elektron molekule kyslíku za vzniku $\cdot\text{O}_2^-$. Komplex ANT'-Fe²⁺ může vznikat spontánně nebo v přítomnosti oxidačně-redukčního systému (nejčastěji cytochrom P450) (Šimůnek a kol., 2009).

Vznikající $\cdot\text{O}_2^-$ působí na různé buněčné struktury, např. membrány, kde způsobuje peroxidaci lipidů a vznik toxických aldehydů (např. malondialdehyd). Může však také oxidačně poškozovat DNA, proteiny a ostatní složky buněk (Šimůnek a kol., 2009). Superoxid je v buňce degradován dismutací na peroxid vodíku buď spontánně, nebo pomocí superoxidodismutasy na relativně méně reaktivní peroxid vodíku, který je dále odbouráván katalasou a glutathionperoxidasou. Avšak za přítomnosti dalších molekul superoxidu může vznikat vysoce reaktivní hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) při tzv. Haber-Weissově reakci (Obr. 6). Ta probíhá obecně velmi pomalu, ale při katalýze ionty přechodných kovů (zvláště pak železa) se rychlost rapidně zvýší (Šimůnek a kol., 2009).



Obr. 5 Předpokládaný mechanismus vzniku ROS prostřednictvím komplexu ANT-Fe. Fe – železo, $\cdot\text{O}_2^-$ – superoxid radikál, SOD – superoxidodismutasa, H₂O₂ – peroxid vodíku, $\cdot\text{OH}$ – hydroxylový radikál, NAD(P) – nikotinamidadeninukleotid (fosfát),

Fp – flavoprotein, GSH/GSSG – redukovaný/oxidovaný glutathion (převzato z Šimůnek a kol., 2009).



Obr. 6 *Haber-Weissova reakce.* $\cdot O_2^-$ – superoxid radikál, H_2O_2 – peroxid vodíku, $\cdot OH$ – hydroxylový radikál, OH^- – hydroxylový aniont, O_2 – molekulární kyslík.

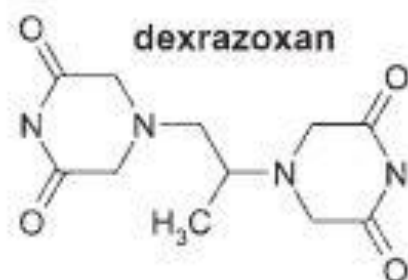
Vzniklý $\cdot OH$ je extrémně reaktivní a nemůže být eliminován enzymaticky jako je tomu u peroxidu vodíku a $\cdot O_2^-$, ale stejně jako superoxid má $\cdot OH$ schopnost peroxidovat lipidy, způsobovat mutace nukleových kyselin a může nevratně poškozovat všechny proteiny (Halliwell a Gutteridge, 2007).

2.2. Dexrazoxan

V současné době je kardiotoxicita jedním ze dvou nežádoucích účinků, které omezují celkovou dávku ANT, která může být pacientům podána. Jelikož však použití ANT stále představuje jeden z neúčinnějších léčebných postupů při léčbě onkologických onemocnění a omezení celkové dávky představuje vážné omezení jejich potenciálu a může vést k relapsu onemocnění, je snaha spíše o snížení jejich toxicity při zachování dávkování. Studium možností omezení ANT kardiotoxicity se soustředilo jak na syntézu méně kardiotoxických analogů ANT tak na vyhledávání a syntézu látek, které budou nežádoucí účinek ANT blokovat, nebo mu budou předcházet. Přestože preklinickým hodnocením prošla řada antioxidantů, látek ze skupiny flavonoidů a také chelátorů železa, jediným dosud registrovaným kardioprotektivem s účinkem prokázaným v mnoha klinických hodnoceních je dexrazoxan (Sawyer a kol., 2010).

2.2.1. Historie a struktura

Dexrazoxan (DEX), který je také označován kódem ICRF-187, je pravotočivý enantiomer razoxanu (ICRF-159). Obě tyto látky patří do skupiny bis-dioxopiperazinů, mají cytotoxický účinek na nádorové buňky a antimetastatickou aktivitu. Tyto látky řadíme spolu s merbanonem, suraminem, aclarubicinem a dalšími látkami mezi tzv. katalytické inhibitory TOP2 (Hellmann a Rhomberg, 2011).



Obr. 7 *Struktura DEX* (převzato z Šimůnek a kol., 2009)

V roce 1964 byly poprvé bis-dioxopiperaziny popsány v laboratořích společnosti Geigy a o rok později v laboratořích Eastman Kodak (Geigy, 1964; Eastman Kodak, 1965). Tyto látky byly nejprve určeny k využívání ve farmaceutickém, textilním a ropném průmyslu, ale později se u nich projeví hlavně protinádorové

a antimetastatické účinky. Razoxan byl zkoumán již v 60. letech, DEX o dekádu později a byly u něj zjištěny jiné chemické vlastnosti a odlišné spektrum účinků.

Původně byl DEX, stejně jako razoxan, studován pro své antiproliferační účinky, ale na konci 70. let byla zjištěna jeho schopnost chránit srdeční sval před toxicitou ANT. (Hellmann a Rhomberg, 2011).

Nejprve byla u DEX pozorována spíše jeho antiproliferační aktivita, která vychází ze schopnosti zastavit buněčný cyklus při přechodu z fáze G2 do fáze M (Sharpe a kol., 1970). Přitom nemá žádný vliv na jiné fáze buněčného cyklu. Neselektivně ovlivňuje i buňky nemaligní, které se normálně dělí (Tanabe a kol. 1991).

Blokáda buněčného cyklu a dělení buněk je pravděpodobně způsobena interakcí DEX s TOP2. DEX se váže na N-terminální doménu TOP2 mezi dvě vazebná místa pro ATP, znemožňuje jeho hydrolýzu a zablokuje tak katalytický cyklus TOP2 (obr. 3). Následně nedochází k oddělení dceřiného dvouřetězce během mitózy a buněčného dělení (Hellmann a Rhombergh, 2011).

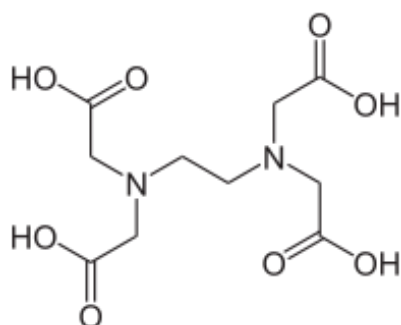
V důsledku zástavy buněčného cyklu právě mezi fázemi G2 a M dochází ke zvětšení buňky. Veškerý buněčný materiál je zdvojnásoben kvůli připravovanému rozdělení buňky, ale k tomu nedochází, a proto může být velikost buňky až dvojnásobná (Hallowes a kol., 1974). Tento jev může vést k domněnce, že nádor na léčbu neodpovídá, přestože počet buněk klesá (Swain a kol., 1997a).

Kromě schopnosti zastavit buněčný cyklus byla u DEX zjištěna i antimetastatická aktivita (Hellmann a Burrage, 1969). Jeho schopnost zabránit diseminaci nádoru do okolních tkání byla pozorována až při klinických testech, kdy se u pacientů v pokročilém stádiu rakoviny s metastázami jejich růst zpomalil (Hellmann a kol., 1987). V některých případech došlo i k redukci velikosti metastáz (Gilbert a kol., 1986).

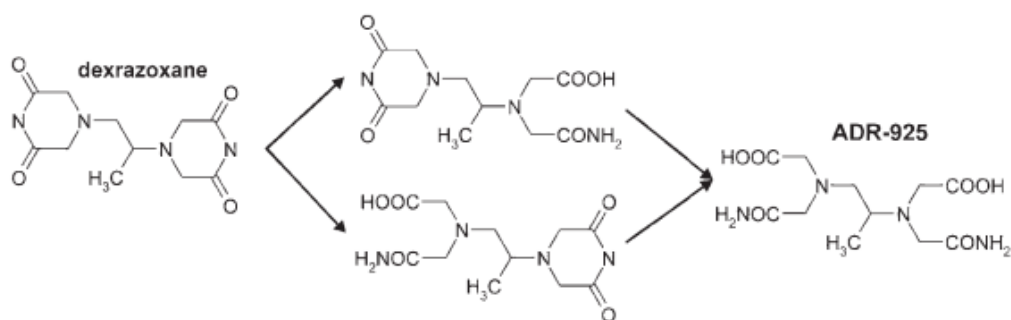
2.2.2. Dexrazoxan jako kardioprotektivum

Dle tradiční hypotézy je antracyklinová kardiotoxicita podmíněna železem katalyzovaným vznikem ROS s následným poškozením základních buněčných struktur. Tato hypotéza byla z velké míry podpořena objevem účinné kardioprotekce pomocí DEX. Jeho účinek byl vysvětlen nitrobuněčnou hydrolýzou DEX na ADR-925 (Obr. 9), což je molekula strukturně podobná ethylendiamintetraoctové kyselině (EDTA, Obr. 8) (Štěrba a kol., 2013). ADR-925 je stejně jako EDTA látka schopná chelatovat ionty přechodných kovů. Kromě ochrany myokardu je DEX schopen účinně chránit před

toxickým poškozením ANT i jiné tkáně a také je schopen omezovat toxicitu jiných léčiv, jako je cis-platina, mitoxantron, neomycin a VP-16 (Hellmann a Rhomberg, 2011).



Obr. 8 Chemická struktura etylendiaminotetraoctová kyselina (převzato z Wikipedia The Free Encyklopedia)



Obr. 9 Hydrolýza DEX na ADR-925 (převzato z Šimůnek a kol., 2009)

Schopnost chelatace umožňuje ADR-925 vyvazovat Fe^{2+} nebo Fe^{3+} z komplexu s ANT, a také chelatovat volné nitrobuněčné železo, čímž zabraňuje katalýze Haber-Weissovy reakce a snižuje tak rychlost vzniku ROS na minimum (Hasinoff, 2002).

2.3. Analogy dexrazoxanu

Ačkoli byl DEX syntetizován před téměř půl stoletím, je to zatím jediné kardioprotektivum, jehož účinnost byla prokázána jak v preklinickém hodnocení na různých modelech ANT kardiotoxicity, tak při klinických zkouškách a nakonec i v klinické praxi, kde jeho účinnost byla prokázána jak dvojitě zaslepenými studiemi, tak i několika metaanalýzami (Swain a Vici, 2004). Přesto jsou však možnosti jeho užívání v klinické praxi velmi omezené. Například v doporučeních vydaných americkou FDA (U.S. Food and Drug Administration) není doporučeno podávat dexrazoxan dětským pacientům a u dospělých je jeho použití omezeno až na dobu, kdy dosáhnou hraniční dávky ANT (300 mg/m^2) a je zapotřebí, aby terapie ANT dále pokračovala. Tato omezení vyplývají především z obav z možného snížení účinku ANT, z možnosti potenciace myelotoxického účinku ANT, nebo z obav ze vzniku sekundárních malignit (U.S. FDA; Swain a Vici, 2004). Zjevnou nevýhodou DEX je také jeho relativně vysoká cena ve srovnání s náklady na terapii samotnými ANT, přestože farmakoekonomické studie jednoznačně prokázaly účelnost použití DEX pro omezení pozdních komplikací léčby ANT (Cvetkovic a Scott, 2005).

V průběhu let vznikla celá řada derivátů ze skupiny bis-dioxopiperazinů, mezi něž patří např. ICRF-154, ICRF-159 (razoxan), ICRF-161, ICRF-186, ICRF-187 (dexrazoxan), ICRF-192, ICRF-193, ICRF-197, ICRF-201, ICRF-202, ICRF-215, ICRF-220, ICRF-239 (Hasinoff a kol., 1995) a byly vyvíjeny také deriváty DEX, jako např. *cis*-PtCl₂(dexrazoxan) (Hasinoff a kol., 2004).

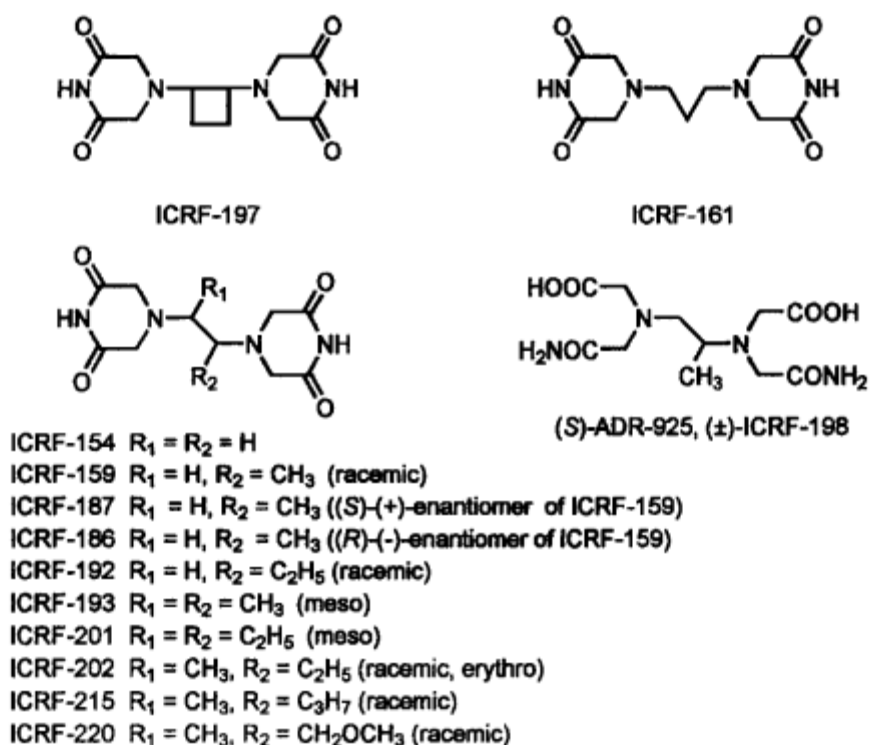
V posledních dvou desetiletích 20. století se objevila teorie, že toxicita klasických protinádorových léčiv, mezi které patří např. doxorubicin, VP-16, VM-26 a m-AMSA, působí cytotoxicky prostřednictvím inhibice aktivity TOP2. To vedlo k obnovení zájmu vědců o bis-dioxopiperaziny jako o protinádorová léčiva, protože razoxan, ICRF-154 a ICRF-193 jsou katalytické inhibitory TOP2, jsou tedy schopné podobně jako fostriecin, suramin, merbarone a aclarubicin inhibovat aktivitu TOP2 bez stabilizace tzv. štěpného komplexu, jako tomu je u ANT a dalších tzv. topoisomerasových jedů (Hasinoff a kol., 1995).

Hasinoff a jeho kolegové proto u výše zmíněných bis-dioxopiperazinů hodnotili jejich schopnost zastavit buněčný růst na buněčné linii CHO (odvozená z buněk křeččích vaječníků), jejich inhibiční aktivitu savčí TOP2 a byla zjišťována korelace

mezi těmito schopnostmi. Buňky CHO byly s testovanými látkami ovlivňovány po dobu 48 hodin a následně bylo pomocí MTT testu a spektrofotometrického měření absorbance (při vlnové délce 490 nm) hodnoceno snížení buněčné proliferace. Deset z dvanácti testovaných látek snižovalo buněčnou proliferaci pod 50 % a byla u nich spočítána hodnota IC_{50} . Nejnižší hodnotu IC_{50} měla látka ICRF-193 ($IC_{50}=0,017 \mu M$) a nejvyšší látka ICRF-161 ($IC_{50}=500 \mu M$). ADR-925 nesnižovalo buněčnou proliferaci pod 50 %, a proto u něj hodnota IC_{50} nemohla být spočítána (Hasinoff a kol., 1995).

Schopnost inhibice katalytické aktivity TOP2 byla u látek (v koncentraci od 0 μM do 100 μM) testována pomocí kinetoplastové DNA a TOP2 izolované z jader buněk leukemie K562 podobným způsobem, jakým byla hodnocena inhibice v této práci. Nejnižší hodnota IC_{50} byla naměřena u ICRF-159 ($IC_{50}=0,6 \mu M$) a nejvyšší u ICRF-159 ($IC_{50}=91 \mu M$). Látka ADR-925 nevykazovala inhibiční aktivitu ani při 100 μM koncentraci (Hasinoff a kol., 1995).

Z výsledků vyplynulo, že testované látky působí cytotoxicky prostřednictvím inhibice katalytické aktivity TOP2. Navíc byla prokázána jak podobná cytotoxická, tak inhibiční aktivita DEX a razoxanu, z čehož můžeme usuzovat, že vazebné místo pro bis-dioxopiperaziny na TOP2 je buď dostatečně velké, nebo dostatečně flexibilní, aby bylo schopno vázat metylovou skupinu obou enantiomerů (Hasinoff a kol., 1995).



Obr. 10 *Struktura ADR-925 a bis-dioxopiperazinů* (převzato z Hasinoff a kol., 1995)

Kvůli nedostatku relevantních informací pro jednoznačné určení mechanismu účinku DEX je potřeba nadále zkoumat strukturní obměny DEX, které by nás přivedly na určení vztahu struktury a účinku DEX, jež by v důsledku mohl mechanismus kardioprotekce objasnit. S tímto cílem se naše výzkumná skupina věnuje systematické syntéze nových analogů DEX a ADR-925.

Na Katedře anorganické a organické chemie naší fakulty byly pod vedením Pharm.Dr. Jaroslava Roha, Ph.D. nasyntetizovány dva nové analogy DEX (MK-15, ES-5) a dva analogy ADR-925 (JR-159, KH-TA4). U těchto látek byly následně hodnoceny jejich antiproliferativní a kardioprotektivní vlastnosti. Cílem této diplomové práce bylo získat informace o antiproliferační aktivitě těchto látek a ovlivnění antiproliferační aktivity ANT kombinací s těmito novými analogy. Dále jsme sledovali jejich železo-chelatační vlastnosti a také jejich vliv na aktivitu TOP2.

2.3.1. MK-15 a ES-5

MK-15 je analog DEX, který má stejnou velikost i uspořádání molekuly. Rozdíl mezi těmito strukturami spočívá v nepřítomnosti jedné karbonylové skupiny na obou piperazinových kruzích.

MK-15 je nažloutlá pevná látka s teplotou tání 110°C, molární hmotností 279,41 g/mol a systematickým názvem 4,4'-(Propan-1,2-diyl)bis(piperazin-2-on).



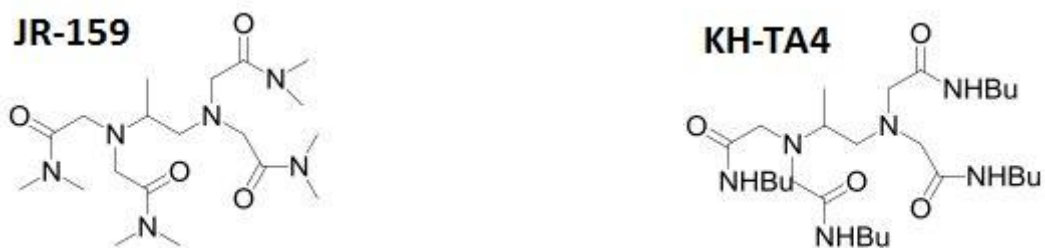
Obr. 11 *Strukturní vzorec MK-15 a ES-5*

Druhý analog DEX, ES-5, je nažloutlá pevná krystalická látka s teplotou tání mezi 155–156°C, molární hmotností 383,40 g/mol a její systematický název je 4,4'-(Propan-1,2-diyl)bis(piperazin-2-on). Látka je dobře rozpustná ve vodě a omezeně rozpustná v DMSO.

Na rozdíl od DEX má ES-5 modifikovaný spojovací můstek mezi koncovými piperazinovými kruhy. Předpokládá se, že metabolit s otevřeným kruhem bude mít schopnost chelátovat železo podobně jako ADR-925. Strukturně ES-5 odpovídá uzavřenému derivátu chelátoru dietylenetriaminepentanové kyseliny.

2.3.2. JR-159 a KH-TA4

JR-159 se systematicky nazývá N,N,N',N'-tetrakis(N,N-dimethylkarbamoylmethyl)-1,2-diaminopropan. Jedná se o nažloutlou viskózní kapalinu s molární hmotností 414,54 g/mol, která je výborně rozpustná ve vodě.



Obr. 12 *Strukturní vzorec JR-159 a KH-TA4*

KH-TA4, systematicky N,N,N',N'-tetrakis(N-butylkarbamoylmethyl)-1,2-diaminopropan 12, je pevná bílá látka s teplotou tání 160–162°C, molární hmotností 569,88 g/mol a je obtížně rozpustná v DMSO a nerozpustná ve vodě.

Obě látky jsou lipofilnější alkylamidy ADR-925. V případě JR-159 se jedná o derivatizaci koncových aminoskupin metyly, u KH-TA4 pak byly pro derivatizaci zvoleny delší čtyřuhlíkaté řetězce. Zvýšená lipofilita u obou analogů byla navržena kvůli usnadnění přestupu látek přes buněčnou membránu.

3. Cíle práce

- Stanovení antiproliferačních účinků analogů dexrazoxanu (MK-15, ES-5) a ADR-925 (JR-159, KH-TA4) a daunorubicinu na buněčné linii HL-60.
- Stanovení antiproliferačních účinků kombinace nových analogů dexrazoxanu a ADR-925 s daunorubicinem.
- Stanovení schopnosti nových analogů dexrazoxanu a ADR-925 vyvazovat železo z komplexu s daunorubicinem.
- Stanovení schopnosti nových analogů dexrazoxanu a ADR-925 inhibovat topoisomerasu II v roztoku.
- Na základě naměřených výsledků přispět k diskuzi o vztahu struktury a účinku dexrazoxanu.

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál

4.1.1. *Buněčná linie*

Pro hodnocení antiproliferační aktivity sledovaných látek byla použita buněčná linie HL-60, která byla poprvé získána v roce 1977 od pacienta s akutní myeloidní leukémií typu M3. Tyto promyelocytární leukocyty jsou ze své podstaty nediferencované, ale při *in vitro* pokusech může být vyvolána jejich terminální diferenciací (Birnie, 1988). Buňky linie HL-60 postrádají povrchové antigeny lymfoidních buněk, ale exprimují povrchové receptory pro Fc fragment a komplement, což je vlastnost charakteristická pro diferencované granulocyty, a tím získávají fagocytární aktivitu a odpovídají na chemotaktické působky (Gallagher a kol., 1979). Buněčná linie používaná během našich pokusů pocházela z americké banky buněčných linií (Americane Type Culture Collection; ATCC) a pro hodnocení antiproliferační aktivity byla používána mezi 12.–45. pasáží.

4.1.2. *Přístroje a vybavení*

- Box s laminárním prouděním Aura 2000 M.A.C. s třídou biohazardu A (BioAir, Itálie)
- Biohazard ochranný box BioAir TopSafe 1.2 třídy II (EuroClone, Italy)
- Vodní lázeň Memmert WB 14 LV (Memmert, Německo)
- Invertovaný epifluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Japonsko)
- Spektrofotometr Tecan Infinite M 200 s optickým hranolem (Tecan, Rakousko)
- Spektrofotometr Helios β (Spectrons Unicam, UK)
- Laboratorní třepačky vortex (BioTech, Česká republika)
- Desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph, Německo)
- Analytické váhy ScalTec SBC 22 (Scaltec, Německo)
- Automatické pipety Eppendorf research různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- Pipety elektronické 8-kanálové e-PET BioHit 5-100 μ l a 50-1200 μ l (BioHit, Finsko)
- Sterilní špičky různého rozsahu (P-lab, Česká Republika a BioHit, Finsko)

- BioHit midi plus (BioHit, Finsko)
- Sérologické sterilní pipety 2, 5, 10 a 25 ml (TPP, Švýcarsko)
- Mikrotitrační destičky TPP, 96-jamkové (TPP, Švýcarsko)
- Plastové sterilní kultivační nádoby T75 (TPP, Švýcarsko)
- Laboratorní sklo a plasty sterilní (Thermo Fischer Scientific, Česká republika)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- Plastové sterilní zkumavky různého objemu (TPP, Švýcarsko)
- Elektroforéza Hoefer HE 33 (Hoefer Inc., U.S.A)
- UV transiluminátor GelDoc (BioRad)

4.1.3. *Chemikálie*

- Daunorubicin (Daunoblastina 20 mg – Pfizer, Švýcarsko)
- Dexrazoxan (Cardioxane 500 mg – Chiron, Nizozemí)
- KH-TA4 (Katedra anorganické a organické chemie, FaF UK HK)
- JR-159 (Katedra anorganické a organické chemie, FaF UK HK)
- ES-5 (Katedra anorganické a organické chemie, FaF UK HK)
- MK-15 (Katedra anorganické a organické chemie, FaF UK HK)
- RPMI-1640 (Rosewell Park Memorial Institute) kultivační medium (Sigma, Německo)
- Teplem deaktivované fetální bovinní sérum (Lonza, Česká republika)
- Směs penicilinu a streptomycinu 5000 U/ml (Lonza, Česká republika)
- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) (Sigma, Německo)
- Trypanová modř (Sigma, Německo)
- Etanol absolutní p.a. $\geq 99,9\%$ (Penta, Česká republika)
- DMSO $\geq 99,9\%$ (Sigma, Německo)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma, Německo)
- Isopropanol (Sigma, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Česká republika)
- Triton X 100 (Sigma, Německo)
- Ultradestilovaná voda (MQ, přístroj Milli-Q RG, Millipore, Česká republika)
- TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Penta, Česká republika)

- Chlorid železitý (Sigma, Německo)
- Kyselina boritá (Penta, Česká republika)
- Agaróza (Serva, Německo)
- Etidium bromid 10 mg/ml (Molecular Probes, U.S.A)
- Topoisomerase II Drug Screening Kit (Topogen, Inc., U.S.A.)
- Lidská rekombinantní puřifikovaná topoisomerasa II alfa/beta, aktivní (LaeBio, U.S.A.)

4.2. Pracovní postupy

4.2.1. *Kultivace*

Buňky HL-60 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s 10 % fetálního bovinního séra a s 1 % směsí penicilinu a streptomycinu. Buněčná kultura byla uchovávána v kultivačních nádobách o objemu 75 cm³ v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % oxidu uhlíčitého. Tyto podmínky měly co nejpřesněji napodobit prostředí lidského těla. Práce s buňkami probíhala v laminárním boxu za sterilních podmínek tak, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci buněk. Všechny roztoky, které jsme k buňkám přidávali, byly předhřátý na teplotu 37 °C ve vodní lázni, aby nedošlo k tepelnému šoku.

4.2.2. *Pasážování buněk*

Buňky byly pasážovány každý 3.–4. den tak, aby jejich koncentrace nepřekročila 1 000 000 buněk/ml a nedošlo k vyčerpání živin v kultivačním médiu. Buněčná kultura HL-60 je suspenzního typu, proto pasáž spočívala v naředění kultury na koncentraci 100 000 buněk na ml.

Po důkladné homogenizaci bylo z kultury odebráno 100 µl buněčné suspenze do mikrozkuřavky. K tomuto vzorku bylo přidáno 100 µl 0,4% roztoku trypanové modři. Po promíchání byly buňky barveny jednu až dvě minuty.

Obarvené buňky byly důkladně promíchány a do každé části Bürkerovy komůrky bylo napipetováno 10 µl buněčné suspenze. Na každé straně Bürkerovy komůrky byl spočítán počet živých buněk v pěti z devíti čtverců. Živé buňky se na rozdíl od buněk mrtvých trypanovou modří neobarvily, a proto se jeví jako bílé na modrém pozadí.

Počet buněk v deseti čtvercích byl vynásoben dvěma tisíci, čímž byl zjištěn počet buněk v 1 ml suspenze. Následně byl vypočítán objem buněčné suspenze, který byl pipetován do nových kultivačních nádob tak, aby výsledný objem byl 25 ml suspenze o koncentraci 100 000 buněk na ml.

Suspenze byla opatrně promíchána a lahev byla označena názvem buněk, datem a číslem pasáže a iniciály pracovníka, který pasáž prováděl. Takto připravená nádoba se suspenzí byla umístěna do inkubátoru. Zbylá suspenze, která nebyla potřebná k pasážím, byla použita k antiproliferačním experimentům s testovanými látkami.

4.2.3. Inkubace buněk s testovanými látkami

Buněčná suspenze byla naředěna na koncentraci 200 000 buněk na ml a řádně promíchána. Do sloupců 2 až 12 na 96-jamkové destičce bylo pipetováno 50 μ l suspenze na jamku (10 000 buněk v jedné jamce) multikanálovou pipetou. Do sloupce 1 bylo pipetováno 100 μ l média. Tento sloupec sloužil jako negativní kontrola s nulovou viabilitou buněk.

Do sloupců 2, 10, 11 a 12 bylo k buněčné suspenzi pipetováno 50 μ l média s DMSO, ve kterém byly nejčastěji testované látky rozpuštěny. Sloupce 2, 10, 11 a 12 sloužily jako pozitivní kontroly se 100% viabilitou.

Do sloupců 3 až 9 bylo pipetováno 50 μ l média s testovanými látkami v koncentračních řadách, přičemž bylo použito vždy stejné množství zásobního roztoku látky, aby koncentrace DMSO byla vždy stejná. Poté byly kultury inkubovány po dobu 72 hodin a následně byla vyhodnocena jejich viabilita pomocí MTT testu.

U nově syntetizovaných analogů DEX a ADR-925 byl hodocen také jejich vliv na antiproliferační účinek DAU. Během kombinačních testů byly buňky HL-60 72 hodin inkubovány s DAU o koncentraci 15 nM (viabilita buněk se při této koncentraci pohybovala mezi 40 až 60 %, bylo tedy možné sledovat jak snížení, tak zvýšení antiproliferačního účinku DAU). DEX, ADR-925 a nově syntetizované látky byly použity v koncentraci 10 a 100 μ M (dvě nejvyšší testované koncentrace u koncentračních řad).

4.2.4. Vyhodnocení viability buněk

MTT test je založen na principu metabolizace žlutého 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) aktivně respirujícími mitochondriemi na modrofialový krystalický formazan. MTT bylo pro účely stanovení buněčné viability rozpuštěno v PBS v koncentraci 3 mg/ml a před použitím byl tento roztok předeřán na 37 °C. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo po uplynutí doby inkubace se sledovanými látkami přidáno 25 μ l roztoku MTT multikanálovou pipetou. Následovala dvouhodinová inkubace, po níž byly buňky lyzovány 100 μ l lyzačního roztoku složeného z isopropanolu, 0,1 M HCl a 5% Tritonu X 100. Destičky byly umístěny na třepačku, kde byly při přibližně 600 až 700 rpm třepány půl hodiny. Po půl hodině byly v každé jamce resuspendovány krystalky, které se usadily na dně, a destičky byly třepány na třepačce dalších 45 minut.

Po rozpuštění krystalků byla měřena absorbance na spektrofotometru TECAN při vlnových délkách 570 nm (absorpční maximum pro fialový formazan) a 690 nm (absorpční maximum žlutého MTT). Absorbance při 690 nm byla odečtena od absorbance odečtené při 570 nm, poté byla odečtena také hodnota negativní kontroly (nulové viability). Průměrné hodnoty ze sloupců s testovanými látkami byly vyjádřeny jako procenta viability v kontrolních sloupcích.

4.2.5. Chelatační testy

Chelatační vlastnosti testovaných látek byly hodnoceny jako jejich schopnost vyvazovat železo z komplexu s ANT. Komplex ANT se železem vykazuje specifické absorpční spektrum, které na rozdíl od volného ANT vykazuje specifické zvýšení absorbance při 600 nm. Změna absorbance v této vlnové délce v závislosti na čase nás informuje o tom, zda je komplex (DAU-Fe) v roztoku stále přítomen, nebo zda testované látky železo z tohoto komplexu vyvazují.

Vyvazování železa z komplexu s ANT bylo hodnoceno spektrofotometricky podle dříve publikované metody (Hasinoff a kol., 2003b). Komplex DAU se železem byl připraven přidáním 100 μ l 1,5 mM FeCl_3 ke 450 μ l 1mM DAU, 10 μ l 5% HCl a 440 μ l ultradestilované vody. Zásobní roztok volného DAU byl připraven stejným způsobem, ale místo 100 μ l FeCl_3 bylo použito 100 μ l 15 mM HCl.

Do kyvety bylo pipetováno vždy 70 μ l roztoku volného DAU nebo DAU-Fe komplexu, 630 μ l reakčního pufru (50 mM TRIS/150 mM KCl, pH=7.4) a 0,7 μ l testované látky. Kyveta byla vložena do spektrofotometru Helios beta a 4 minuty byla měřena změna absorbance v čase při vlnové délce 600 nm, a poté bylo proměřeno absorpční spektrum v rozmezí vlnových délek 400 nm až 650 nm.

4.2.6. Testování inhibice topoisomerasy II novými analogy

U nových analogů byla testována jejich schopnost inhibovat TOP2, a tím zabránit enzymu v rozštěpení dvouřetězce DNA za použití komerčně dostupné sestavy Topoisomerase II Drug Screening Kit, který je založen na sledování rozplétání kinetoplastové DNA topoisomerasou II. Reakční produkty (DNA izomery s různým stupněm nadšroubovicového vinutí a lineární DNA) byly sledovány za použití agarózové elektroforézy.

Byly připraveny následující vzorky:

1. Lineární DNA makrer – pro kontrolu tvorby štěpných komplexů topoisomerasovými jedy (2 μ l lineární DNA, 4 μ l pufru C, 14 μ l ultradestilované vody).

2. DNA – vzorek s neovlivněným substrátem (1 μ l DNA, 4 μ l pufru C, 13 μ l ultradestilované vody) – negativní kontrola.

3. DNA + TOP2 – vzorek se substrátovou DNA ovlivněnou enzymem při neinhibované reakci (1 μ l DNA, 4 μ l pufru C, 15 μ l ultradestilované vody a 2 μ l TOP2) – pozitivní kontrola.

4. DNA + TOP2 + DMSO – kontrola vlivu rozpouštědla na reakci (1 μ l DNA, 4 μ l pufru C, 12 μ l ultradestilované vody, 2 μ l TOP2, 1 μ l DMSO).

6.–12. DNA + TOP2 + zkoumané látky – reakce ovlivněná testovanými látkami (1 μ l DNA, 4 μ l pufru C, 12 μ l ultradestilované vody, 2 μ l TOP2, 1 μ l 10 mM roztoku testované látky v DMSO).

Takto připravené vzorky byly inkubovány ve vyhřívané třepačce (teplota 37 °C) po dobu 30 minut. Poté byla reakce ve zkumavkách zastavena přidáním 2 μ l 10% dodecylsulfátu sodného (předehřátého na 37 °C) a TOP2 byla rozložena přidáním 2,6 μ l proteinasy K. Následovala patnáctiminutová inkubace na třepačce při 37 °C. K připraveným vzorkům byl přidán 2 μ l nanášecího pufru a 10 μ l vzorku bylo nanášeno na 1% agarózový gel ve 40 mM TBE pufru. Elektroforéza probíhala při cca 50 V dokud modré barvivo nanášecího pufru dosáhlo přibližně 80 % celkové délky gelu. Po ukončení elektroforézy byl gel barven po dobu 1 hodiny v TBE pufru s etidium bromidem (0,5 μ g/ml). DNA v gelu byla vizualizována pomocí UV transiluminátoru.

4.2.7. Zpracování naměřených dat

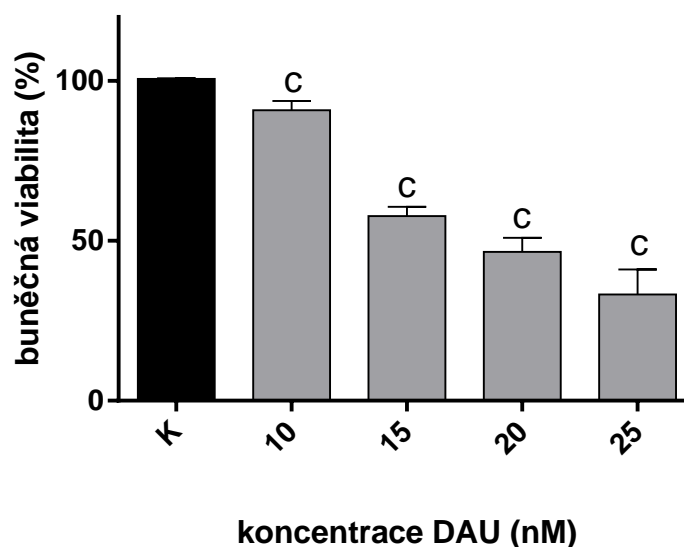
Naměřená data byla graficky a statisticky zpracovávána v programech MS Office Excel a GrafPad Prism for Windows 6.1 (GraphPad Software, Inc., U.S.A.). Každé měření bylo provedeno čtyřikrát a průměrná hodnota spolu s odpovídající odchylkou byla zaznamenána do sloupcového (koncentrační řady a kombinační testy) nebo spojnicového (chelatace) grafu. Metodou One-Way ANOVA s Tukey's post-hoc testem (kombinační testy) nebo Dunnett's multiple comparison testem (koncentrační řady) byla hodnocena statistická významnost. Hodnoty IC₅₀ (koncentrace látky, která způsobí snížení buněčné proliferace o 50 %) byly vyhodnoceny pomocí programu CalcuSyn for Windows 2.0 (Biosoft, U.K.).

5. Výsledky

5.1. Antiproliferační účinky sledovaných látek

5.1.1. Antiproliferační účinek DAU

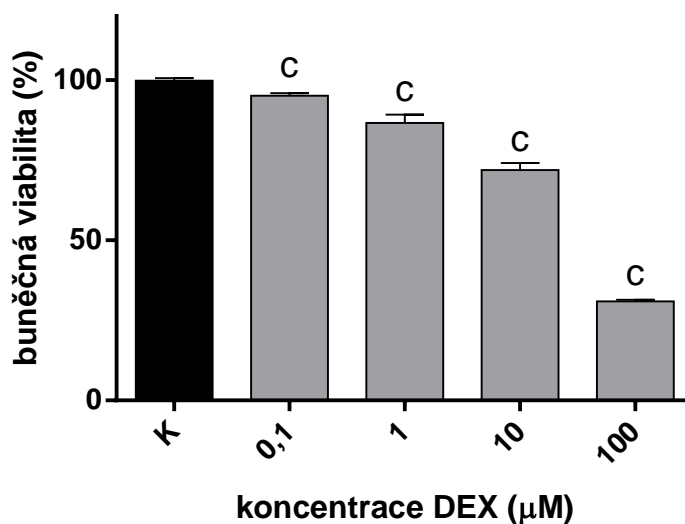
Po 72-hodinové inkubaci buněk HL-60 s DAU bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk s hodnotou IC_{50} 19,9 nM.



Obr. 13 Graf znázorňující proliferaci HL-60 buněčné linie po 72-hodinové inkubaci s různými koncentracemi daunorubicinu (DAU). Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině (K) je v grafu označena písmenem „c“ (OneWay ANOVA, Dunnett's multiple comparison test, $p < 0,05$).

5.1.2. Antiproliferační účinek DEX

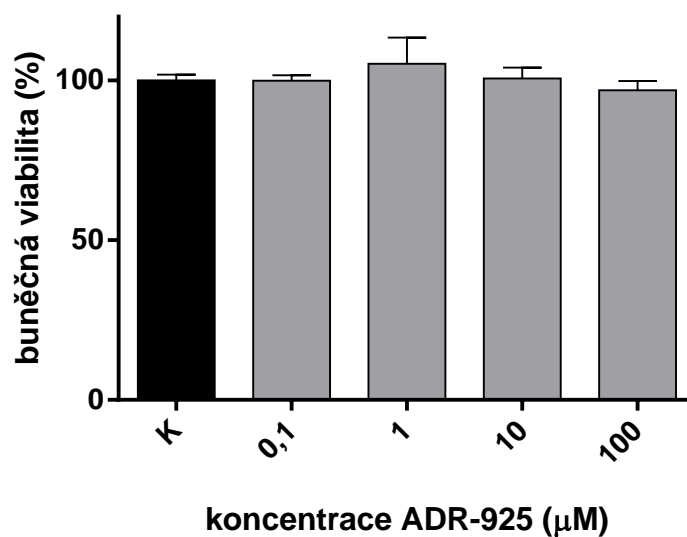
Po 72-hodinové inkubaci buněk HL-60 s DEX bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk od koncentrace 0,1 μM . Hodnota IC_{50} byla vypočítána na 33,1 μM .



Obr. 14 Graf znázorňující proliferaci HL-60 buněčné linie po 72-hodinové inkubaci s různými koncentracemi dexrazoxanu (DEX). Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině (K) je v grafu označena písmenem „c“ (OneWay ANOVA, Dunnett's multiple comparison test, $p < 0,05$).

5.1.3. Antiproliferační účinek ADR-925

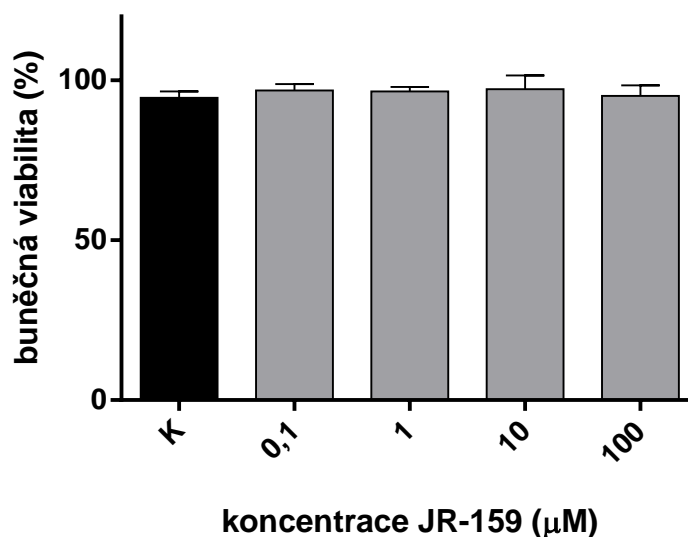
Po 72-hodinové inkubaci buněk HL-60 s ADR-925 nebylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk.



Obr. 15 Graf znázorňující proliferaci HL-60 buněčné linie po 72-hodinové inkubaci s různými koncentracemi ADR-925. Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině (K) je v grafu označena písmenem „c“ (OneWay ANOVA, Dunnett's multiple comparison test, $p < 0,05$).

5.1.4. Antiproliferační účinek JR-159

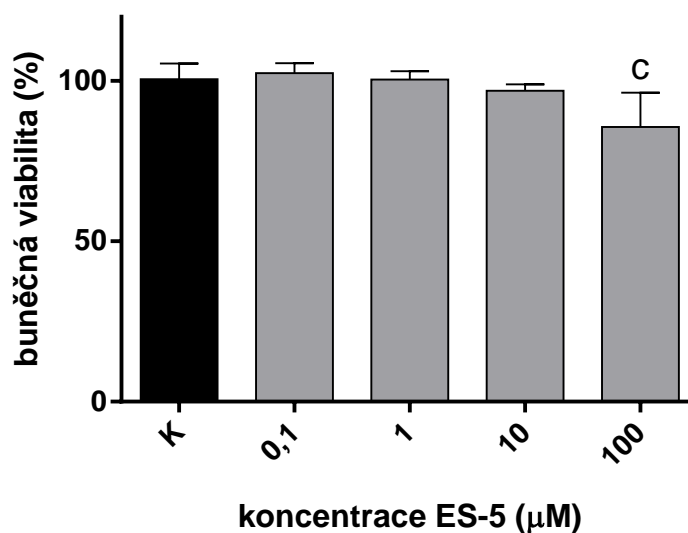
Po 72-hodinové inkubaci buněk HL-60 s JR-159 nebylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk.



Obr. 16 Graf znázorňující proliferaci HL-60 buněčné linie po 72-hodinové inkubaci s různými koncentracemi JR-159. Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině (K) je v grafu označena písmenem „c“ (OneWay ANOVA, Dunnett's multiple comparison test, $p < 0,05$).

5.1.5. Antiproliferační účinek ES-5

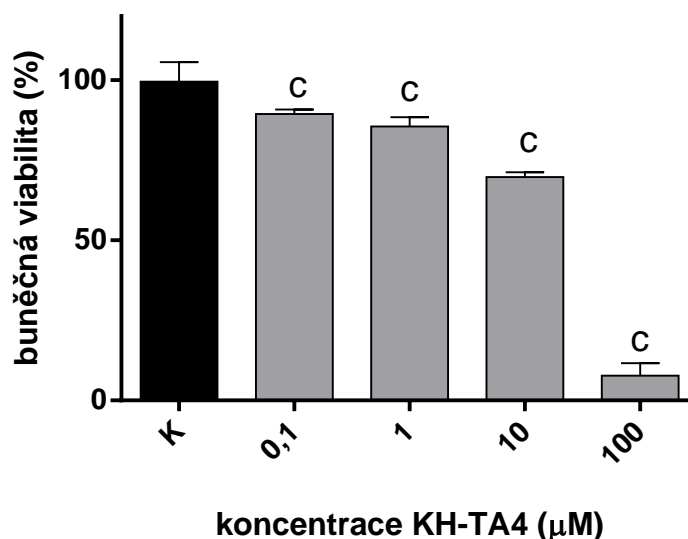
Po 72-hodinové inkubaci buněk HL-60 s ES-5 bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk od koncentrace 100 μM .



Obr. 17 Graf znázorňující proliferaci HL-60 buněčné linie po 72-hodinové inkubaci s různými koncentracemi ES-5. Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině (K) je v grafu označena písmenem „c“ (OneWay ANOVA, Dunnett's multiple comparison test, $p < 0,05$).

5.1.6. Antiproliferační účinek KH-TA4

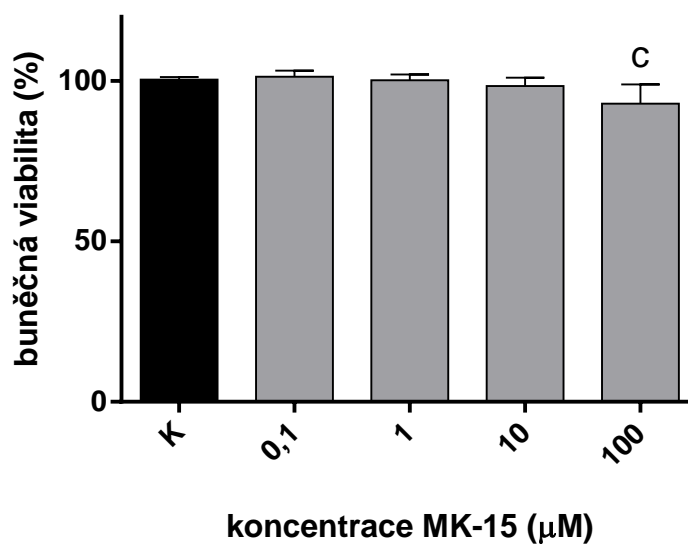
Po 72-hodinové inkubaci buněk HL-60 s KH-TA4 bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk od koncentrace 0,1 μM . Hodnota IC_{50} byla vypočítána na 64,9 μM .



Obr. 18 Graf znázorňující proliferaci HL-60 buněčné linie po 72-hodinové inkubaci s různými koncentracemi KH-TA4. Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině (K) je v grafu označena písmenem „c“ (OneWay ANOVA, Dunnett's multiple comparison test, $p < 0,05$).

5.1.7. Antiproliferační účinek MK-15

Po 72-hodinové inkubaci buněk HL-60 s MK-15 bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk od koncentrace 100 μM .

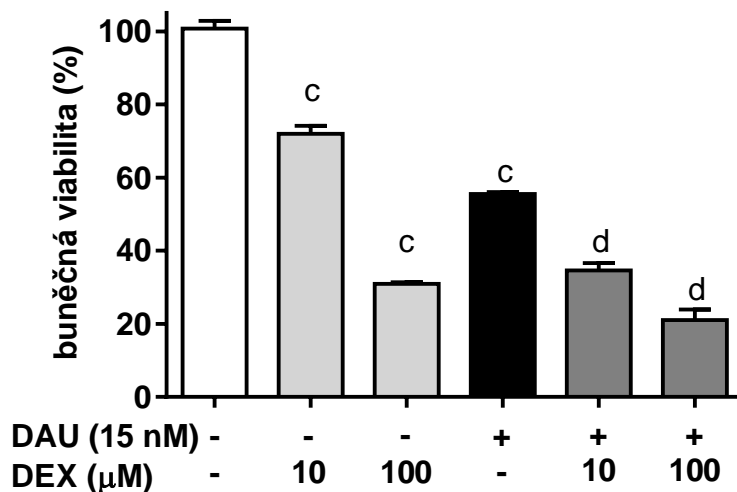


Obr. 19 Graf znázorňující proliferaci HL-60 buněčné linie po 72-hodinové inkubaci s různými koncentracemi MK-15. Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině (K) je v grafu označena písmenem „c“ (OneWay ANOVA, Dunnett's multiple comparison test, $p < 0,05$).

5.2. Kombinační testy

5.2.1. Kombinace DAU a DEX

Po inkubaci buněčné kultury s kombinací DEX s DAU bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk v porovnání s účinkem samotného DAU.

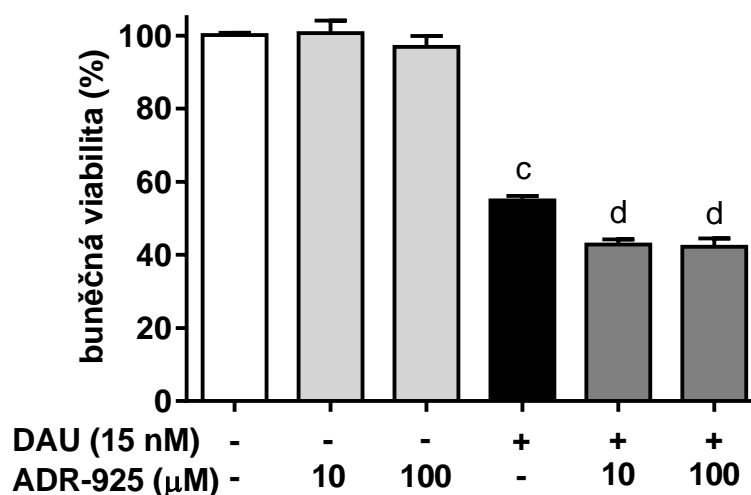


Obr. 20 Graf antiproliferačních účinků DAU, DEX a kombinací obou látek. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena písmenem „c“. Statisticky významná změna DAU+DEX vůči samotnému DAU je označena písmeny „d“ (OneWay ANOVA, Tukey's post-hoc test, $p < 0,05$).

5.2.2. Kombinace DAU a ADR-925

Po inkubaci buněčné kultury s kombinací ADR-925 s DAU bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk v porovnání s účinkem samotného DAU.

Přestože ADR-925 v obou sledovaných koncentracích významný antiproliferační účinek nemělo, bylo schopno zvýšit antiproliferační účinek DAU v obou sledovaných koncentracích statisticky významně oproti samotnému DAU.

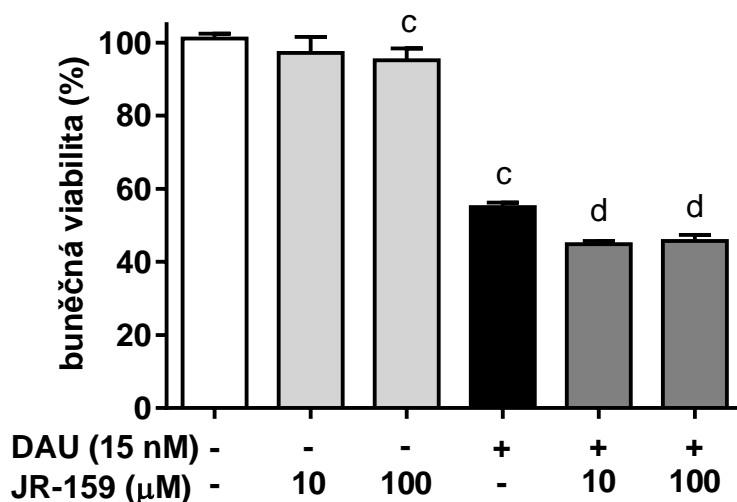


Obr. 21 Graf antiproliferačních účinků DAU, ADR-925 a kombinací obou látek. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena písmenem „c“. Statisticky významná změna DAU+ADR-925 vůči samotnému DAU je označena písmeny „d“ (OneWay ANOVA, Tukey's post-hoc test, $p < 0,05$).

5.2.3. Kombinace DAU a JR-159

Po inkubaci buněčné kultury s kombinací JR-159 s DAU bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk v porovnání s účinkem samotného DAU.

Přestože JR-159 v obou sledovaných koncentracích významný antiproliferační účinek nemělo, bylo schopno zvýšit antiproliferační účinek DAU v obou sledovaných koncentracích statisticky významně oproti samotnému DAU.

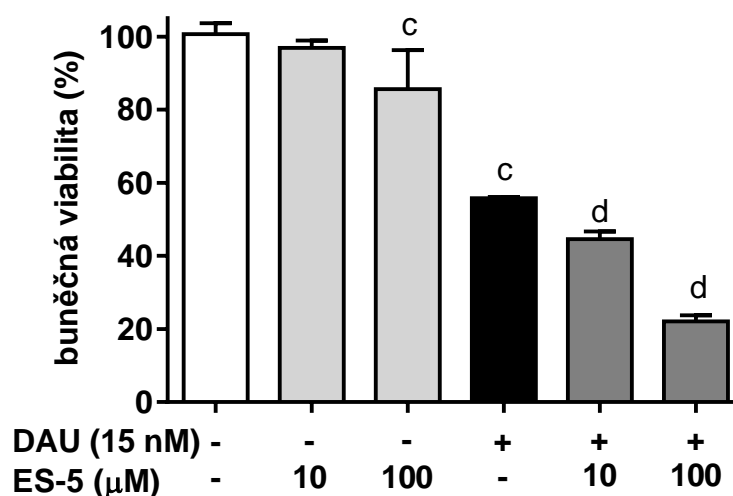


Obr. 22 Graf antiproliferačních účinků DAU, JR-159 a kombinací obou látek. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena písmenem „c“. Statisticky významná změna DAU+JR-159 vůči samotnému DAU je označena písmeny „d“ (OneWay ANOVA, Tukey's post-hoc test, $p < 0,05$).

5.2.4. Kombinace DAU a ES-5

Po inkubaci buněčné kultury s kombinací ES-5 s DAU bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk v porovnání s účinkem samotného DAU.

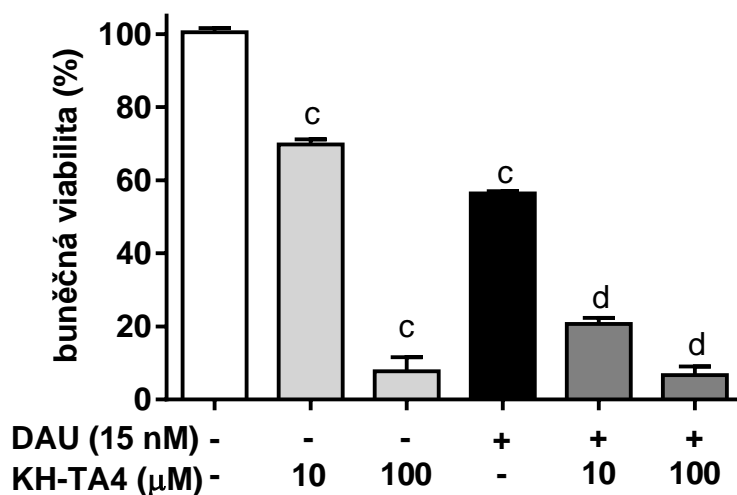
Přestože ES-5 v obou sledovaných koncentracích významný antiproliferační účinek nemělo, bylo schopno zvýšit antiproliferační účinek DAU v obou sledovaných koncentracích statisticky významně oproti samotnému DAU.



Obr. 23 Graf antiproliferačních účinků DAU, ES-5 a kombinací obou látek. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena písmenem „c“. Statisticky významná změna DAU+MK-15 vůči samotnému DAU je označena písmeny „d“ (OneWay ANOVA, Tukey's post-hoc test, $p < 0,05$).

5.2.5. Kombinace DAU a KH-TA4

Po inkubaci buněčné kultury s kombinací KH-TA4 s DAU bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk v porovnání s účinkem samotného DAU.

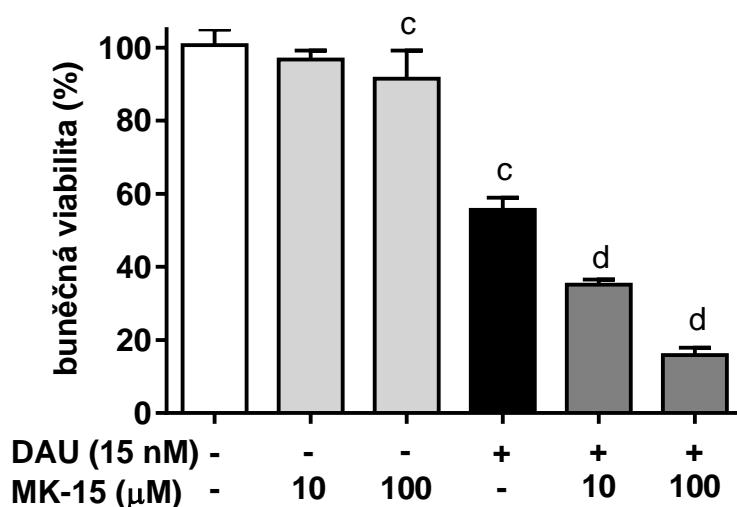


Obr. 24 Graf antiproliferačních účinků DAU, KH-TA4 a kombinací obou látek. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena písmenem „c“. Statisticky významná změna DAU+MK-15 vůči samotnému DAU je označena písmeny „d“ (OneWay ANOVA, Tukey's post-hoc test, $p < 0,05$).

5.2.6. Kombinace DAU a MK-15

Po inkubaci buněčné kultury s kombinací MK-15 s DAU bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk v porovnání s účinkem samotného DAU.

Přestože MK-15 v obou sledovaných koncentracích významný antiproliferační účinek nemělo, bylo schopno zvýšit antiproliferační účinek DAU v obou sledovaných koncentracích statisticky významně oproti samotnému DAU.



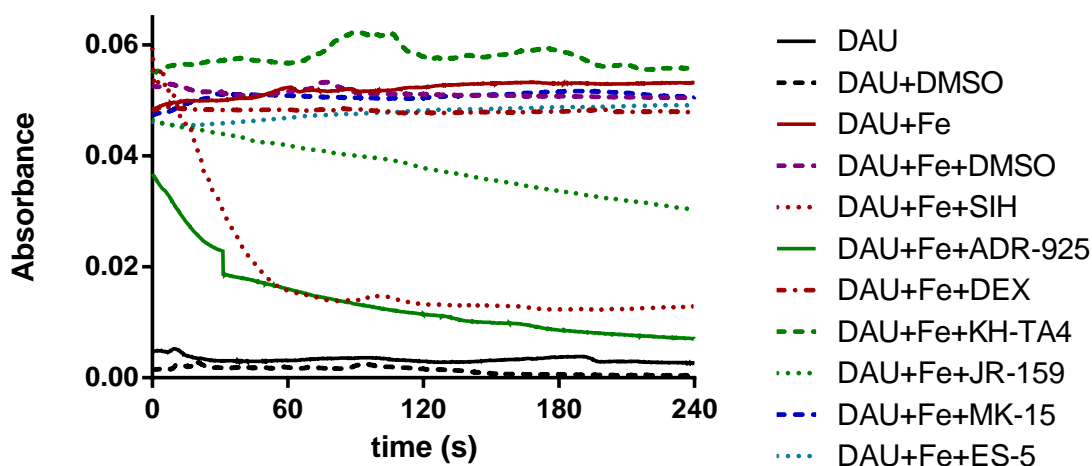
Obr. 25 Graf antiproliferačních účinků DAU, MK-15 a kombinací obou látek. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena písmenem „c“. Statisticky významná změna DAU+MK-15 vůči samotnému DAU je označena písmeny „d“ (OneWay ANOVA, Tukey's post-hoc test, $p < 0,05$).

5.3. Chelatační testy

5.3.1. Změny absorbance v čase

Měření změny absorbance roztoku v čase (240 s) umožnilo zjistit, zda mají nové analogy schopnost vyvazovat železo z komplexu s ANT. Zatímco komplex DAU+Fe je schopný absorbovat světlo o vlnové délce 600 nm, absorbance volného DAU při této vlnové délce je blízka nule. V případě, že testovaná látka vyvazovala Fe z komplexu, docházelo v průběhu času ke snížení absorbance až na hodnoty absorbance samotného DAU, protože se v roztoku zvyšovala koncentrace volného DAU a snižovala koncentrace komplexu DAU+Fe.

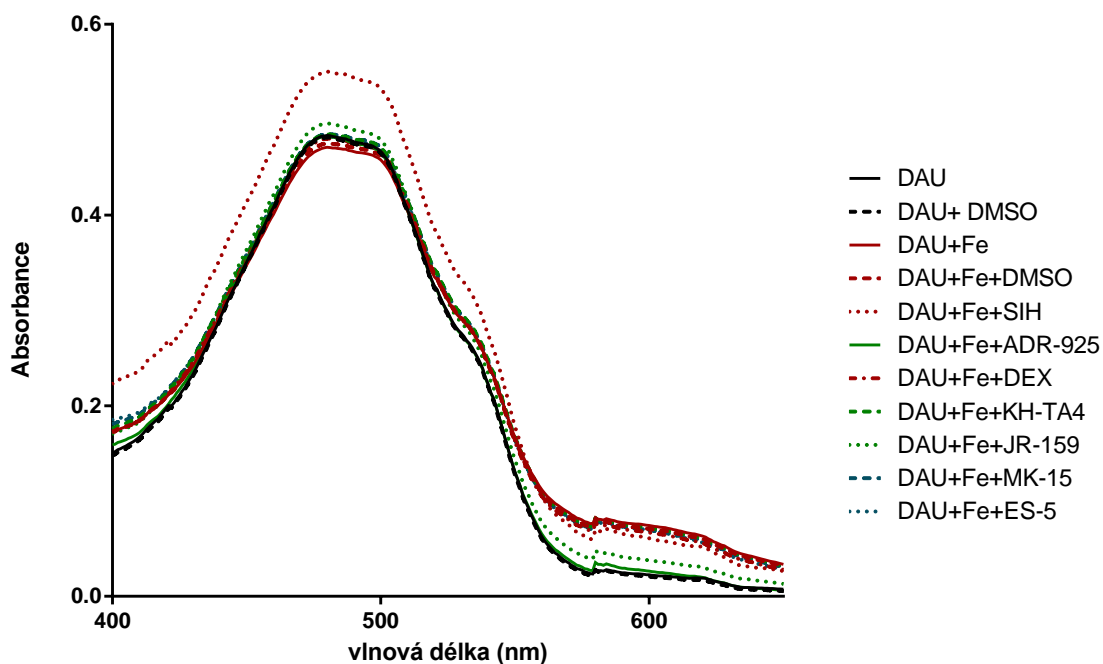
Jako modelovou látku, u které byly už dříve prokázány chelatační vlastnosti, jsme použili salicylaldehydisonikotinoylhydrazon – SIH (Šimůnek a kol., 2008). Ze všech sledovaných látek jsme schopnost vyvazovat železo z komplexu s ANT pozorovali pouze u ADR-925 a v mnohem menší míře také u JR-159.



Obr. 26 Graf časového průběhu změny absorbance roztoku DAU, DAU+Fe a DAU+Fe+testovaná látka. Všechna měření probíhala čtyřikrát a do grafu byly zaznamenány křivky průměrných hodnot ze všech měření.

5.3.2. Absorpční spektra

Po měření změny absorbance v čase bylo změřeno také absorpční spektrum hodnocených vzorků. Byla měřena absorbance samotného DAU, komplexu DAU+Fe a komplexu DAU+Fe s testovanými látkami při plynulé změně vlnové délky (400 až 650 nm). Stejně jako při předchozím měření bylo zjištěno, že vyvazovat železo z komplexu s DAU jsou schopné pouze látky SIH, ADR-925 a částečně i JR-159.

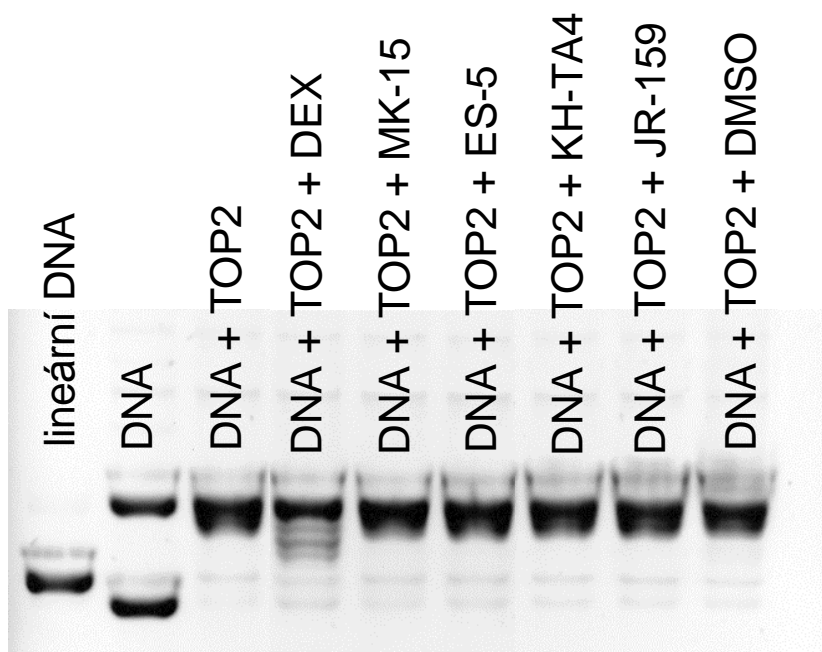


Obr. 27 Graf změny absorbance DAU, DAU+Fe a DAU+Fe+testovaná látka při změně vlnové délky primárního záření. Všechna měření probíhala čtyřikrát a do grafu byly zaznamenány křivky průměrných hodnot ze všech měření.

5.4. Stanovení inhibice topoisomerasy II

Na Obr. 28 je zobrazena zleva kontrola lineární DNA a kontrola plazmidové DNA (negativní kontrola – bez TOP2), pozitivní kontrola (neinhibovaná enzymatická reakce), reakce ovlivňované zkoumanými látkami a kontrola ovlivnění enzymatické reakce použitým rozpouštědlem (DMSO).

Zjistili jsme, že enzymatickou aktivitu TOP2 inhibuje pouze DEX v koncentraci 100 μ M, jak je patrné na Obr. 28 ve čtvrtém sloupci. Inhibice enzymové reakce se projevila objevením tzv. “žebříčku“ topoizomerů DNA s částečně rozvolněným nadšroubovicovým vinutím. Žádná z nově syntetizovaných látek nevykazovala ve stejné koncentraci inhibiční vliv na aktivitu TOP2.



Obr. 28 Vizualizace elektroforetického gelu po testování inhibičních účinků nových analogů DEX a ADR-925 na TOP2.

6. Diskuze

Antracyklinová antibiotika (ANT) patří již od svého zavedení do klinické praxe na přelomu 60. a 70. let minulého století k nepostradatelné součásti protinádorové léčby pro svou výbornou účinnost proti řadě solidních nádorů a hematologických malignit. I v současné době moderní onkologické léčby s použitím cílené biologické léčby jsou ANT stále používány převážně v kombinaci s jinými léčivy. Kromě klasických nežádoucích účinků společných ostatním klasickým protinádorovým léčivům představuje riziko rozvoje ANT kardiotoxicity největší limitaci použití v klinické praxi. Nejzávažnější jsou pozdní formy ANT kardiotoxicity, které se mohou projevit i řadu let po ukončené ANT léčbě (Klener a Klener, 2010; Suter a Ewer, 2013).

Zpětně se prokázalo, že se zvyšující se kumulativní dávkou ANT riziko rozvoje závažných kardiovaskulárních komplikací roste (Sawyer, 2013). U 3 % pacientů se vyskytlo srdeční selhání při kumulativní dávce 400 mg/m² a u 18 % pacientů při kumulativní dávce 600 mg/m² (Swain a kol., 1997b). Kromě řady nefarmakologických možností, jak je možné omezit rozvoj ANT kardiotoxicity (např. redukce celkové kumulativní dávky ANT či prevence rizikových faktorů), představuje dexrazoxan (DEX) zatím jedinou látku s prokázaným kardioprotektivním působením jak v experimentálních podmínkách, tak i v klinické praxi (Hellmann a Rhomberg, 2011).

Ačkoli byla kardioprotekce DEX ověřena řadou klinických studií (Swain a kol., 1997b; Herman a Ferrans, 1998; Hasinoff a kol., 1998), jeho praktické užívání je dnes omezeno z důvodů jeho relativně vysoké ceny, možných interferencí s účinkem ANT, možné potence myelotoxicity ANT a také možného vzniku sekundárních malignit. Jak např. uvádí ve své studii Tebbi a kol. (2007), z dvě stě třiceti devíti pacientů s Hodgkinovým lymfomem, kterým byl při antracyklinové léčbě současně podáván i DEX, byl u osmi zaznamenán vznik sekundárních malignit (akutní myeloidní leukemie, myelodysplastický syndrom). Sekundární malignity se vyskytly i u dvou pacientek (z celkového počtu dvě stě třiceti devíti pacientů), které nebyly léčeny DEX. Nebyla prokázána korelace mezi vznikem sekundárních malignit a pohlavím, nebo stádiem onemocnění (Tebbi a kol., 2007).

Svoboda (2010) ve své studii uvádí jako nežádoucí účinek DEX prohloubení granulocytopenie a trombocytopenie při současném užívání ANT a DEX a s odkazem na studie Swain (1997a) a Von Hoff (1998) dále upozorňuje i na možnost snížení

protinádorového účinku cytostatické léčby DEX. Naopak Swain a kol. (1997b) uvádí, že DEX nemá inhibující vliv na účinky ANT v *in vitro* testech na buněčné linii karcinomu prsu MX-1. Významný vliv DEX na přežití pacientů nebyl dosud zcela prokázán a o doporučení, či nedoporučení jeho užívání jako adjuvantní léčby se zatím vedou diskuze (Svoboda, 2010, U.S. FDA).

Už řadu let se vědci snaží najít látku, která bude mít podobně jako DEX kardioprotektivní účinky, zároveň však nebude mít závažné nežádoucí účinky a nebude nijak interferovat s účinky onkologické léčby (Hasinoff a kol., 1995; Hasinoff a kol., 2004). Hledání „lepšího dexrazoxanu“ je také jedním z cílů Centra pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém (Univerzitní výzkumné centrum UNCE 204019/304019/2012), v rámci kterého byla vypracována také tato diplomová práce. Jejím cílem bylo otestovat dva nově syntetizované analogy DEX se strukturními obměnami jak na koncových piperazinových cyklech (MK-15), tak i ve spojovacím řetězci (ES-5) a dva nové analogy ADR-925 se zvýšenou lipofilitou, s koncovými aminoskupinami modifikovanými vždy dvěma ethylovými (KH-TA4), nebo terc-butylovými řetězci (JR-159).

Tyto analogy byly připraveny na Katedře anorganické a organické chemie (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze). Naším úkolem bylo zjistit v *in vitro* podmínkách na modelu HL-60 buněčné linie jejich antiproliferační aktivitu, jejich vliv na antiproliferační účinek ANT a blíže určit možné mechanismy jejich působení se zaměřením zvláště na jejich schopnost vyvazovat železo z komplexu s antracykliny a jejich schopnost katalyticky inhibovat TOP2. Studium účinku nových analogů nám zároveň mělo sloužit k bližšímu objasnění mechanismu kardioprotektivního účinku DEX.

Antiproliferační aktivita látek byla hodnocena jako pokles proliferace buněk HL-60 po 72 hodinách inkubace s různými koncentracemi testovaných látek ve srovnání s proliferací kontrolních buněk, u kterých byl zaznamenán charakteristický 6-8násobný vzestup jejich koncentrace v kultivačním médiu. K vyhodnocení buněčné viability byl použit MTT test, který je založen na redukci žlutého 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu v aktivně respirujících mitochondriích na modrofialový ve vodě nerozpustný formazan, jehož koncentrace byla zjištěna po rozpuštění v izopropanolu pomocí spektrofotometrického stanovení.

Každé stanovení bylo provedeno čtyřikrát a pomocí programu CalcuSyn byly zjištěny hodnoty IC_{50} pro jednotlivé sledované látky. U látek JR-159, ES-5 a MK-15 nebylo možné hodnotu IC_{50} zjistit, protože nesnižovaly buněčnou proliferaci pod 50 % a statisticky významný pokles buněčné viability byl pozorován až u nejvyšší použité koncentrace látek (100 μ M). Tuto koncentraci jsme jako nejvyšší zvolili z důvodu nízké rozpustnosti látek v DMSO. Experimenty byly také navrženy tak, abychom mohli přímo porovnávat účinek nových látek s DEX, u nějž jsme jak v předchozích experimentech, tak i v této studii pozorovali antiproliferační účinek s hodnotou IC_{50} rovnou přibližně 30 μ M. Při koncentraci 100 μ M jsme tedy zaznamenali prakticky absolutní zástavu buněčné proliferace. U obou látek, u nichž bylo možné určit hodnotu IC_{50} (DEX, KH-TA4), byla tato koncentrace v μ M. Tyto látky tedy potřebovaly ke snížení buněčné proliferace na polovinu přibližně 1000x vyšší koncentrace, než tomu bylo u DAU (IC_{50} =19,9 nM). Z hodnoty IC_{50} látky KH-TA4 (IC_{50} =64,9 μ M) je také zřejmé, že její antiproliferační účinek je asi o polovinu slabší než u DEX (IC_{50} =33,1 μ M).

Jelikož nebylo možné zjistit hodnotu IC_{50} u všech testovaných látek, nemohla být ke kombinačním experimentům využita metoda podle Chou a Talalay, která pro hodnocení vzájemného ovlivnění účinku dvou látek využívá stanovení jejich tzv. kombinačního indexu. Pro tato stanovení jsou využívány stejné cytotoxicitní testy jako pro určení hodnoty IC_{50} , ale dvě látky jsou kombinovány v koncentracích, které odpovídají podílům a násobkům hodnot IC_{50} jednotlivých látek (Chou a Talalay, 1984). Jelikož nebylo možné použít tuto jinak optimální metodu, využili jsme v této studii sledování změny antiproliferačního účinku DAU při koncentraci blízké jeho IC_{50} v kombinaci s testovanou látkou o dvou různých koncentracích (10 μ M a 100 μ M). Takto bylo možné zaznamenat jak zvýšení, tak i snížení účinku DAU.

Samotný DAU (15 nM) použitý při kombinačních testech snížil buněčnou proliferaci na přibližně 55 %. Všechny testované látky snížily buněčnou proliferaci v kombinaci s DAU oproti samotnému DAU signifikantně v obou koncentracích a to i přesto, že samotné analogy v nižší koncentraci proliferaci statisticky významně nesnižovaly. Z těchto dat proto můžeme soudit, že nové analogy ve všech případech antiproliferační účinek DAU nesnížily, naopak, ve všech případech jsme pozorovali jistý synergismus účinků.

Z naměřených výsledků vyplývá, že nové analogy, zejména KH-TA4, by z hlediska jejich antiproliferační aktivity a z hlediska jejich ovlivnění účinků ANT bylo nejspíš

možné použít v praxi, avšak ani účinek této látky se nevyrovná synergismu pozorovanému při kombinaci s DEX.

Aby byly poznatky o nových analozích z hlediska jejich podobnosti s DEX a ADR-925 kompletní, zjišťovali jsme jejich schopnost vyvazovat Fe z komplexu s ANT a jejich schopnost katalyticky inhibovat aktivitu TOP2.

Chelatační aktivita nových analogů byla hodnocena jako jejich schopnost vyvazovat ionty železa z jejich komplexu s ANT, v našem případě s DAU, podle již dříve publikované metody (Hasinoff a kol., 2003b; Šimůnek a kol., 2009). Tato metoda je založena na sledování změn absorbance komplexu ANT-Fe. Tento komplex vykazuje specifické absorpční spektrum se zvýšenou absorpcí při 600 nm ve srovnání s volným ANT. Nejprve bylo provedeno měření změny absorbance vzorků v čase při 600 nm a následně bylo změřeno také jejich absorpční spektrum v rozmezí 400–650 nm.

Zjistili jsme, že při 600 nm je absorbance jak samotného DAU, tak i DAU s DMSO téměř nulová, proto jsme mohli pokračovat v měření absorbance komplexu DAU+Fe, případně komplexu s potencionálními chelátory. Měřením absorbance samotného komplexu bylo prokázáno, že tento komplex absorbuje světlo o vlnové délce 600 nm, a proto mohl být dále testován spolu s potencionálními chelátory. Nejprve byl ke komplexu přidán chelátor SIH (Šimůnek a kol., 2008), na kterém byl demonstrován pokles absorbance po vyvázání Fe z komplexu s DAU. Podobný pokles absorbance byl zaznamenán i po přidání ADR-925 a JR-159, i když u JR-159 byla vyvazovací rychlost nižší než u obou výše zmíněných látek. Ostatní nově syntetizované analogy, stejně jako DEX, schopost vyvazovat železo z komplexu s DAU nevykazovaly.

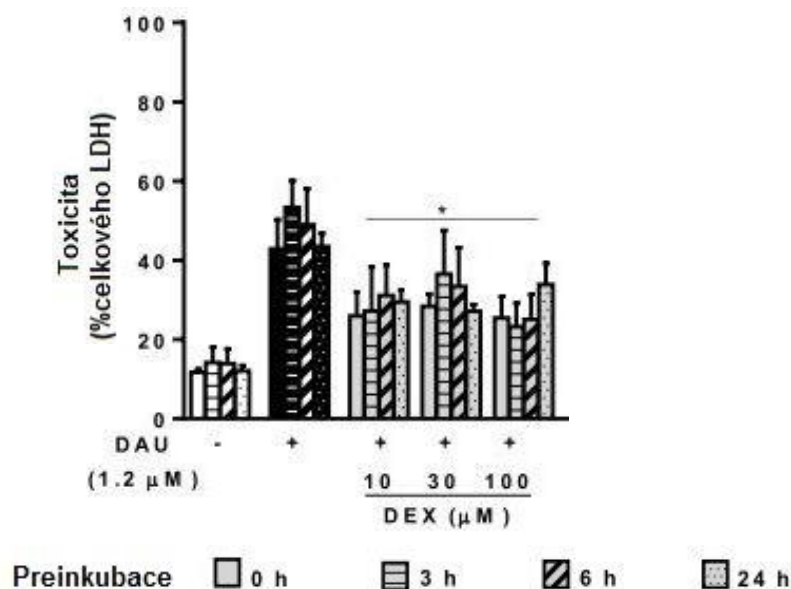
Schopnost analogů inhibovat aktivitu TOP2 byla testována za použití komerčně dostupné sestavy využívající kinetoplastovou DNA jako substrátu pro rekombinantní lidskou alfa izoformu TOP2. Vyhodnocení tohoto experimentu jsme prováděli pomocí agarózové gelové elektroforézy, kde měla substrátová DNA s různým stupněm nadšroubovicového vnutí různou pohyblivost. To nám umožnilo rozeznat neinhibovanou reakci od inhibované, která se vyznačovala přítomností specifického „žebříčku“ jednotlivých topoizomerů. Přestože řada bis-dioxopiperazinů má antiproliferační aktivitu, aniž by inhibovala aktivitu topoisomerasy, u DEX byl prokázán pravý opak (Larsen a kol., 2003), a proto byl použit DEX jako potvrzený inhibitor TOP2.

U použité kinetoplastové DNA bylo po působení samotné TOP2 zřejmé, že z původně dvou nativních forem DNA (jedna s nadšroubovicovými závitů a druhá bez) vznikla převážně jedna nativní forma – bez závitů. Po přidání DEX ke kinetoplastové DNA s TOP2 k tomuto sjednocení nedocházelo a na gelu byl viditelný specifický „žebříček“ s částečně rozvinutým nadšroubovicovým vinutím. Žádný z analogů na elektroforetickém gelu tuto schopnost neprokázal.

Již v 90. letech minulého století byla u DEX, razoxanu a dalších deseti bis-dioxopiperazinů studována jejich cytotoxická aktivita (na proliferující, i když nenádorové buněčné lini křeččích ovariálních buněk – CHO) a jejich schopnost inhibovat TOP2 (Hasinoff a kol., 1995). Dále pak bylo zjišťováno, zda se schopnost inhibovat TOP2 projevuje v jejich antiproliferační aktivitě.

Z výsledků vyplynulo, že ADR-925 nemá cytotoxickou aktivitu a není schopný inhibovat aktivitu topoisomerasy (Hasinoff a kol., 1995), podobně jako prokázala i naše měření. Hodnota IC_{50} DEX (3 μ M) byla u této buněčné linie nižší než ta, kterou jsme pozorovali v našich experimentech ($IC_{50}=33,1$ μ M), což lze pravděpodobně vysvětlit použitím jiného typu buněčné linie (CHO). Ačkoli z naměřených dat vyplývá, že i dalších devět látek kromě DEX prokazovalo cytotoxickou aktivitu, pouze DEX je zatím jediný bis-dioxopiperazin, který je v praxi využíván jako kardioprotektivum (Hasinoff a kol., 1995).

Nové analogy byly ve studii zároveň hodnoceny z hlediska jejich možného kardioprotektivního účinku v *in vitro* testech na izolovaných neonatálních potkaních ventrikulárních kardiomyocytech a v *in vitro* testech na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka. V *in vitro* testech na neonatálních kardiomyocytech bylo zjištěno, že žádný z nových analogů nemá signifikantní schopnost kardioprotekce. Jedinou látkou, která byla schopná ochránit kardiomyocyty proti toxicitě vyvolané 3-hodinovou expozicí 1,2 μ M DAU byl DEX, jehož protektivní účinky byly nezávislé jak na dávce (účinně chránil v koncentracích 10, 30 a 100 μ M), tak i na čase preinkubace (0, 3, 6 a 24 hodin) (Obr. 29). Jeden z nových analogů ADR-925 (KH-TA4) dokonce v koncentraci 100 μ M zvyšoval toxicitu DAU.



Obr. 29 Graf protektivních účinků DEX vůči kardiotoxicitě DAU

Jelikož tradičně je ANT kardiotoxicita vnímána primárně jako důsledek oxidačního poškození kardiomyocytů, byly u nových analogů DEX a ADR-925 rovněž sledovány jejich protektivní schopnosti proti modelovému oxidačnímu poškození peroxidem vodíku (300 μM), aby bylo možné porovnat protekci proti tomuto modelovému poškození a inzultem vyvolaným DAU. Bylo zjištěno, že KH-TA4, který zvyšoval toxicitu DAU, vykazoval významné protektivní vlastnosti proti tomuto oxidačnímu inzultu.

V souvislosti s výsledky dalších experimentů hodnotících chelatační schopnosti nových analogů, které byly provedeny RNDr. Pavlínou Haškovou, Ph.D a Mgr. Hanou Jansovou, ve kterých bylo pozorováno, že KH-TA4 je schopen chelatovat železo a vyvazovat jej z komplexu s kalceinem, by bylo možno spekulovat o schopnosti KH-TA4 vázat volné intracelulární Fe, a znemožnit tak jeho katalýzu Fentonovy reakce (Obr. 5). Jelikož u žádného z nových analogů nebyla prokázána schopnost inhibice TOP2, je možné, že mechanismus kardioprotekce může být spojen právě s inhibicí TOP2.

I když tato teorie nebyla doposud zcela spolehlivě prokázána, stále panuje názor, že DEX působí kardioprotektivně prostřednictvím svého hydrolyzovaného metabolitu ADR-925, který chelatací kationtů Fe zabraňuje vzniku oxidačního stresu (Hasinoff, 2002; Hasinoff a kol., 2003a). Např. u látky deferasirox, která je používána v klinické praxi (přípravek Desferal) u chorob spojených s chronickým přetížením Fe, tedy s prokázanou chelatační schopností, nebyla zjištěna žádná protekce myocytů proti

kardiotoxicitě ANT (Hasinoff a kol, 2003b). Stejně tak další látky a mechanismy, které jsou schopné odstraňovat z organismu volné radikály, nebyly schopné snížit antracyklinovou kardiotoxicitu. Protože bis-dioxopiperaziny, mezi které patří i DEX, jsou schopné inhibovat aktivitu TOP2, vyskytly se domněnky, že kardioprotekce probíhá právě přes tento mechanismus (Hasinoff a kol., 1995; Lyu a kol., 2007).

Antiproliferativní působení jak ANT tak i DEX je pravděpodobně zprostředkováno přes alfa izoformu TOP2. Tato izoforma je převažující izoformou v dělících se a nádorových buňkách, avšak kvůli nízké specifitě těchto látek je pravděpodobné, že mohou ovlivnit také aktivitu beta izoformy TOP2, přestože jejich účinek na tento enzym nebyl ještě dostatečně prozkoumán, pravděpodobně proto, že beta izoforma TOP2 byla objevena relativně nedávno a její funkce a role v biochemických nebo regulačních pochodech organismu není ještě zcela objasněna.

Beta izoforma TOP2 je na rozdíl od alfa izoformy převažující v terminálně diferencovaných a nedělících se buňkách, jako jsou např. kardiomyocyty. Tyto buňky jsou zároveň velmi náročné z hlediska exprese specifických proteinů (Vávrová a Šimůnek, 2012). V souvislosti s velkou náročností kardiomyocytů na expresi specifických proteinů, ať už se jedná o kontraktilní proteiny nebo i o mitochondriální enzymy účastnící se oxidativní fosforylace, je další možný mechanismus ANT kardiotoxicity, stejně jako kardioprotekce pomocí DEX, přisuzován jejich interakci s beta izoformou TOP2.

Katalytická aktivita izoenzymů je podobná, jednotlivé izoformy se od sebe liší hlavně regulací. TOP2 α hraje důležitou roli v buněčném cyklu, protože se podílí na replikaci DNA, kondenzaci a dekonduzaci chromozomů a segregaci sesterských chromatid, a proto se vyskytuje hlavně u dělících se a nádorových buněk. TOP2 β se naopak nachází u všech buněk, včetně postmitotických, a jeho aktivita není tak přísně regulovaná v průběhu celého buněčného cyklu (Vávrová a Šimůnek, 2012).

Lyu a kol. (2007) ve své studii zkoumali, zda by mohl DEX předcházet antracyklinovému poškození DNA právě prostřednictvím TOP2 β . Ve studii bylo nejprve prokázáno, že zatímco katalytické inhibitory TOP2 dokážou snížit poškození DNA způsobené antioxidanty, jako např. vitamín C a N-acetylcystein, tuto toxicitu neinhibují. Na základě těchto výsledků autoři usuzují, že oxidační stres nemusí být příčinou kardiotoxicity ANT. V této studii bylo také zjištěno, že poškození DNA ANT je blokováno inhibitory proteasomu (např. bortezomib a MG132) a že k poškození DNA

dochází pouze v buňkách, ve kterých nedošlo k depleci TOP2 β . Z naměřených výsledků pak autoři usuzují, že ANT poškozují DNA právě prostřednictvím enzymu TOP2 β (Lyu a kol., 2007).

7. Závěry

Výsledky antiproliferačních experimentů, hodnocení nových analogů DEX a ADR-925 z hlediska jejich chelatační aktivity a jejich schopností inhibovat TOP2 ve srovnání s DEX a ADR-925 získané v rámci této diplomové práce spolu s dalšími daty o těchto nových látkách, získané mými kolegy z Farmaceutické a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, nám umožnily získat nový náhled na působení DEX jako kardioprotektiva. Tyto výsledky přispěly také k diskusi o jeho možném ovlivnění antiproliferačního účinku ANT a významnou měrou přispěly také ke směru, jakým by se mohla ubírat další syntéza nových analogů DEX s lepšími farmakologickými vlastnostmi.

8. Seznam zkratek

$\cdot\text{O}_2^-$ – superoxid radikál

$\cdot\text{OH}$ – hydroxylový radikál

ANT – antracykliny

ATP – adenosintrifosfát

DAU – daunorubicin

DEX – dexrazoxan

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleotidová kyselina

Fe – železo

ROS – reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)

TOP2 – topoisomeráza II

9. Literatura

- BINASCHI M., BIGIONI M., CIPOLLONE A. (2001): **Anthracyclines: selected new developments.** *Curr Med Chem* 1, str. 113–130
- BIRNIE G.D. (1988): **The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation.** *Br J Cancer Suppl* 9 str. 41–45
- BUHLER C., LEBBINK J.H., BOCS C., LADENSTEIN R. A FORTERRE P. (2001): **DNA topoisomerase VI generates ATP-dependent double-strand breaks with two-nucleotide overhangs.** *J Biol Chem* 276, str. 37215–37222
- CULLINANE C., PHILLIPS D.R. (1990): **Induction of stable transcriptional blockage sites by adriamycin: GpC specificity of apparent adriamycin-DNA adducts and dependence on iron(III) ions.** *Biochemistry* 29, str. 5638–5646
- CVETKOVIĆ R.S. A SCOTT L.J. (2005): **Dexrazoxane: A review of its use for cardioprotection during athracycline chemotherapy.** *Drugs* 65, str. 1005–1024
- DEWEESE J.E., OSHEROFF N. (2010): **The Use of Divalent Metal Ions by Type II Topoisomerases.** *Metallomics* 2, 450–459
- EASTMAN KODAK Co (1965): **UK Patent 1,1001,157.**
- GALLAGHER R., COLLINS S., J TRUJILLO A DALŠÍ. (1979): **Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.** *Blood* 54, str. 713–733
- GEIGY J.R. (1964): **UK Patent 978,724.**
- GEWIRTZ D.A. (1999): **A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin.** *Biochem Pharmacol* 57, str. 727–741
- GIANNI L., HERMAN E. H., LIPSHULTZ S. E. A DALŠÍ (2008): **Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, str. 3777–84
- GILBERT J.M., HELLMANN K., EVANS M. A DALŠÍ (1986): **Randomised trial of oral adjuvant razoxane (ICRF-159) in resectable colorectal cancer.** *Br J surf* 73, str. 446–50

- GREIN A., SOLDATI M., FIORETTI A. A DASDIA T. (1964): **Activity of daunomycin, a new antitumor antibiotic, on normal and neoplastic cells grown in vitro.** Cancer Chemother. Rep. 38, str. 39–47
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. (1999): **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford; New York: Oxford University Press, 3. vydání, ISBN 978-0-1985-0044-5
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. (2007): **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford; New York: Oxford University Press, 4. vydání, ISBN 978-0-1985-6869-8
- HALLOWES R.C., WEST D.G., HELLMANN K. (1974): **Cumulative cytostatic effect of ICRF-159.** Nature 247, str. 487–490
- 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).** Biochem Pharmacol, str. 953–958
- HASINOFF B.B., HELLMANN K., HERMAN E.H., FERRANS V.J. (1998): **Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines.** Curr Med Chem 5, str. 1–28
- HASINOFF B.B. (2002): **Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against hypoxia-reoxygenation damage.** Cardiovasc Toxicol 2, str. 111–118
- HASINOFF B.B., SCHROEDER P.E., PATEL D. (2003A): **The metabolites of the cardioprotective drug dexrazoxane do not protect myocytes from doxorubicin-induced cytotoxicity.** Mol Pharmacol 64, 670–678
- HASINOFF B.B., PATEL D., WU X. (2003B): **The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin.** Free Radic Biol Med 35, str.1469–79
- HASINOFF B.B., WU X., YANG Y.W. (2004): **Synthesis and characterization of the biological activity of the cisplatin analogs, *cis*-PtCl₂(dexrazoxane) and *cis*-PtCl₂(levrazoxane), of the topoisomerase II inhibitors dexrazoxane (ICRF-187) and levrazoxane (ICRF-186).** Journal of Inorganic Biochemistry , str. 616–624
- HELLMANN K., BURRAGE K. (1969): **Control of malignant metastases by ICRF 159.** Nature 224, str. 273–275

- HELLMANN K., GILBERT J., EVANS M. A DALŠÍ (1987): **Effect of razoxane on metastases from colorectal cancer.** Clin Exp Metastasis 5, str. 3–5
- HELLMANN K. A RHOMBERG W. (2011): **Razoxane and Dexrazoxane - Two Multifunctional Agents.** 1. vydání, Dordrecht: Springer Netherlands, str. 1,2,158–180, ISBN 978-90-481-9168-0
- HERMAN E.H. FERRANS V.J. (1998): **Animal model sof anthracycline cardiotoxicity: Basic mechanisms and cardioprotective aktivty.** Prog Pediatr Cardiol 8, 49–58
- CHAMPOUX J. J. (2001): **DNA topoisomerases: structure, function, and echanism.** Annual review of biochemistry 70, str. 369–413.
- CHOU T.C., TALALAY P. (1984): **Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors.** Adv Enzyme Regul 22, str. 27–55
- CHRISTENSEN MORTEN OVERBY (2002): **Dynamics of Human DNA Topoisomerases I and II.** Disertační práce. Bayerischen-Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, str. 11–13
- KLENER P. A KLENER P. JR. (2010): **ABL1, SRC and other non-receptor protein tyrosine kinases as new targets for specific anticancer therapy.** Klin Onkol. 23, str. 203–239
- LARSEN A. K., ESCARGUEIL A. E. A SKLADANOWSKI A. (2003): **Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy.** Pharmacology & therapeutics 99, str. 167–181
- LYU Y. L., KERRIGAN J. E., LIN C.P. A DALŠÍ. (2007): **Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane.** Cancer research 67, str. 8839–8846
- MINOTTI G., MENNA P., SALVATORELLI E., CAIRO,G., GIANNI, L. (2004): **Anthracyclines : Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity.** Pharmacol Rev 56, str. 185–229.
- MUINDI J.R., SINHA B.K., GIANNI L., MYERS C.E. (1984): **Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex.** FEBS Lett 172, str. 226–230

- NITISS J.L. (2009): **Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy.** *Nat Rev Cancer* 9, str. 338–350
- PEREGO P., CORNA E., DE CESARE M. A DALŠÍ (2001): **Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines.** *Curr Med Chem* 8, str. 31–37
- PHILLIPS D.R., WHITE R.J., CULLINANE C. (1989): **DNA sequence-specific adducts of adriamycin and mitomycin C.** *FEBS Lett* 246, str. 233–240
- PIGRAM W.J., FULLER W., HAMILTON L.D. (1972): **Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA.** *Nat New Biol* 235, str. 17–19
- POMMIER, Y. (2012): **DNA Topoisomerases and Cancer.** New York: Humana Press, 1. vydání, ISBN 978-1-4614-0322-7
- *PubChem Compound* [online]. **Daunorubicin.** Poslední revize 2012-1 [cit. 2014-01-30]. Dostupné z:
<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=30323>>
- SAWYER D.B., PENG X., CHEN B., PENTASSUGLIA L. A LIM C.C. (2010): **Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection?** *Prog. Cardiovasc. Dis.* 53, str. 105–113
- SAWYER D.B. (2013): **Anthracyclines and heart failure.** *N Engl J Med* 368, str. 1154–1156
- SHARPE H.B.A., FIELD E.O., HELLMANN K. (1970): **The mode of action of the cytostatic agent ICRF-159.** *Nature* 226, str. 524–526
- SIEGEL R., NAISHADHAM D., JEMAL A. (2012): **Cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 62, str. 10–29
- SINHA B.K., CHIGNELL C.F. (1979): **Binding modes of chemically activated semiquinone free radicals from quinone anticancer agents to DNA.** *Chem Biol Interact* 28, str. 301–308
- SINHA B.K., TRUSH M.A., KENNEDY K.A., MIMNAUGH E.G. (1984): **Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA.** *Cancer Res* 44, str. 2892–2896
- SUTER T. M., EWER M.S. (2013): **Cancer drugs and the heart: importance and management.** *European Heart Journal* 34, str. 1102-1111

- SVOBODA T. (2010): **Antracykliny v léčbě karcinomu prsu : pro a proti.**
Onkologie 4, str. 110–114.
- SWAIN S.M., WHALEY F.S., GERBER M.C A DALŠÍ (1997A): **Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer with doxorubicin-containing therapy.** J Clin Oncol 15, str. 1333–1340
- SWAIN S. M., WHALEY F. S., GERBER M. C. A DALŠÍ (1997B): **Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer.** J Clin Oncol 15, str. 1318–32
- SWAIN S. M. A VICI P. (2004): **The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review.** J. Cancer Res. Clin. Oncol. 130, str. 1–7
- ŠIMŮNEK T., ŠTĚRBA M., POPELOVÁ O. A KOL. (2008): **Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone.** Br J Pharmacol 155, str. 138–148
- ŠIMŮNEK T., ŠTĚRBA M., POPELOVÁ O. A DALŠÍ (2009): **Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron.** Pharmacological reports 61, str.154–171
- ŠTĚRBA M., POPELOVÁ O., VÁVROVÁ A. A DALŠÍ (2013): **Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection.** Antioxidants & redox signaling 18, str. 899–929
- TAN C., TASAKA H., YU K.P., MURPHY M.L., KARNOFSKY D.A. (1967): **Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease: Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia.** Cancer 20, str. 333–353
- TANABE K., IKEGAMI Y., ISHIDA R., ANDOH T. (1991): **Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis (2,6-dioxopiperazine) derivatives.** Cancer Res 51, str. 4903–4908
- TEBBI C. K., LONDON W. B., FRIEDMAN D. A DALŠÍ (2007): **Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease.** Journal of

clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 25, str. 493–500

- *U.S. Food and Drug Administration* [online]: **FDA Statement on Dexrazoxane** (2011), In Secondary. Poslední revize 2001-7-20 [cit. 2014-05-02]. Dostupné z: <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm263729.htm>>
- 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, str. 834–837
- VON HOFF (1998): **Phase I trials of dexrazoxane and other potential applications for the agent**. Semin Oncol 25, str. 31–36
- WALLACE K.B., JOHNSON J.A. (1986): **Oxygen-dependent effect of microsomes on the binding of doxorubicin to rat hepatic nuclear DNA**. Mol Pharmacol 31, str. 307–311
- WANG J.C. (1971): **Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega**. J Mol Biol 55, str. 523–533
- *Wikipedia The Free Encyklopedia* [online]. **Ethylenediaminetetraacetic acid**. Poslední revize 2014-4-22 [cit. 2014-03-21]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/EDTA>
- ZHANG W., KORNBLAU S.M., KOBAYASHI T. A DALŠÍ (1995): **High levels of constitutive WAF1/Cip1 protein are associated with chemoresistance in acute myelogenous leukemia**. Clin Cancer Res 1, str. 1051–1057
- ZHANG S., LIU X., BAWA-KHALFE T. A DALŠÍ (2012): **Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity**. Nature medicine 18, str. 1639–1642
- ZUNINO F, PRATESI G, AND PEREGO P (2001): **Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs**. Biochem Pharmacol 61, str. 933–938