

Studium vlivu neplatínových cytostatik na polymerázovou řetězovou reakci

Simona Dostálová^{a,b}, Martin Vetter^a, Branislav Ruttkay-Nedecký^b, Pavel Kopel^b,
Libuše Trnková^b, Ondřej Zítka^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Influence study of non-platinum cytotoxic drugs on polymerase chain reaction

The tumor is a cellular process, whose essence is the change of the genetic information and regulatory processes in the cell. Consequently, occurs to the uncontrolled multiplication of cells. Cytostatics, especially anthracycline antibiotics are currently widely used for example in the treatment of breast cancer or prostate cancer, which are nowadays the most frequent cancers. The influence of non-platinum cytotoxic drug doxorubicin on polymerase chain reaction can be studied using fluorescent labelling of amplicons. Due to numerous side-effects of doxorubicin, it is important to know its mechanism of influence on living cells. Polymerase chain reaction can serve as a suitable model of replication in living cells.

Přijato k publikování: 20. 6. 2014

Klíčová slova: antracykliny, cytostatika, doxorubicin, nádorové bujení, polymerázová řetězová reakce

Úvod

Polymerázová řetězová reakce (PCR), objevená v roce 1983, slouží k amplifikaci specifických částí nukleových kyselin. K jejímu provedení postačuje velmi malé množství vzorku, díky čemuž se používá zejména v lékařské diagnostice nebo kriminalistice¹. Probíhá v opakovaných cyklech, složených z několika částí^{2,3}. První z nich je denaturace, kdy se DNA po dobu 30 sekund zahřívá na teplotu 94-98 °C. Při této teplotě dochází k rozvolnění DNA dvoušroubovice vlivem porušení vodíkových můstků¹. Vzniknou tak dvě samostatná vlákna DNA, zvaná templátová, na která mohou v dalším kroku (annealing) nasednout primery, tj. krátké úseky druhého vlákna. Při annealingu se teplota sníží na 50-65 °C, přesná hodnota určená dle teploty tání konkrétních primerů². Pro každou konkrétní aplikaci PCR je třeba navrhnout dvojici specifických primerů, protože je nutno zajistit, aby oba primery nasedly při stejné teplotě jen na komplementární sekvenci v templátové DNA. Samotnému prodlužování úseku se říká elongace. Protože však podle jednoho templátového vlákna vznikne jen jedna kopie,

je nutno zajistit řetězové hromadění produktu. To se provádí opakovanými cykly denaturace, nasedání primeru a extenze primeru. Vzniklé produkty slouží zároveň jako templáty pro další reakční cyklus³.

K obdobnému ději, zvanému replikace, dochází v živých buňkách při jejich množení⁴. PCR tak může sloužit jako modelová reakce pro studium vlivu různých látek na replikaci DNA v buňkách. To může být důležité zejména při osvětlení mechanismu účinku protinádorových léčiv.

Nádorové bujení je buněčný proces, jehož podstatou je změna genetické informace a regulačních procesů v buňce, v důsledku čehož dochází k nekontrolovanému zmnožení buněk. Nádor může vzniknout z jakékoliv živé buňky, vyjma těch buněk, které nevratně ztratily schopnost dělit se⁵. Nádorové bujení může postihnout kohokoliv, některé faktory však jeho vznik usnadňují. Říkáme jim faktory rizikové¹¹. Největší podíl na samotném vzniku bujení mají pak faktory vnější, jako například výživový faktor, kouření, alkohol a nízká pohybová aktivita. Pouze 10 % tvoří faktor dědičné

predispozice. Rakovinné buňky oproti normálním mají zvýšenou schopnost proliferace, odolnost a invazivnost⁹. Klasifikace typu rakoviny se za posledních 30 let velmi zlepšila. Nyní se nově objevené druhy klasifikují do nových, či do již existujících tříd¹³.

Rozdíly ve způsobech transkripce tvoří většinu biologické diverzity lidských buněk a nádorů. V každé buňce transdukcí signály a regulační systémy přenášejí informace o identitě jednotlivých buněk v rámci jejich životního poslání. Tím jsou kontrolovány hladiny exprese všech genů v genomu¹². Například postup klasifikace typu leukemie se tvoří na základě sledování genové exprese pomocí DNA mikročipů, které jsou popsány jako vzorový případ při aplikování lidem s akutní leukemií. Touto procedurou se automaticky určí rozdíl mezi akutní myeloidní a akutní lymfoblastickou leukemií, bez předchozích vyšetření. Výsledky podobných výzkumů ukazují možnost použití genové exprese nejen ke klasifikaci leukemie, ale i různých dalších typů rakoviny, nezávisle na předchozích biologických znalostech¹³. Jednou z cest léčby nádorového bujení je léčba pomocí cytostatik.

Protinádorová léčiva neboli cytostatika, jsou látky, které poškozují, zpomalují nebo zastavují růst buněk. Mohou poškozovat DNA, inhibovat syntézu DNA nebo znemožňovat replikaci buněk⁶. Nejvíce působí na rychle se dělící buňky, jako jsou právě nádorové buňky, vlasové folikuly nebo buňky sliznic. Kvůli působení na zdravé buňky má mnoho cytostatik řadu vedlejších účinků⁷. Mezi nejznámější patří poruchy trávicí soustavy, způsobené zastavením růstu buněk sliznice, padání vlasů, poruchy krvetvorby nebo nervové soustavy⁸. Cytostatika lze zařadit do několika skupin, dle složení a mechanismu jejich účinku a řadí se mezi ně například inhibitory topoizomerázy, hormony, radioizotopy nebo interkalační cytostatika.

K nejčastěji používaným cytostatikům patří antracyklinová antibiotika. Využívají se například při léčbě zhoubných nádorů prsu nebo prostaty, které patří mezi nejčastější nádorová onemocnění⁹. Vykazují častou kardiotoxicitu, způsobenou kumulací látky v těle při opakovaném podání. Kardiotoxicita pak

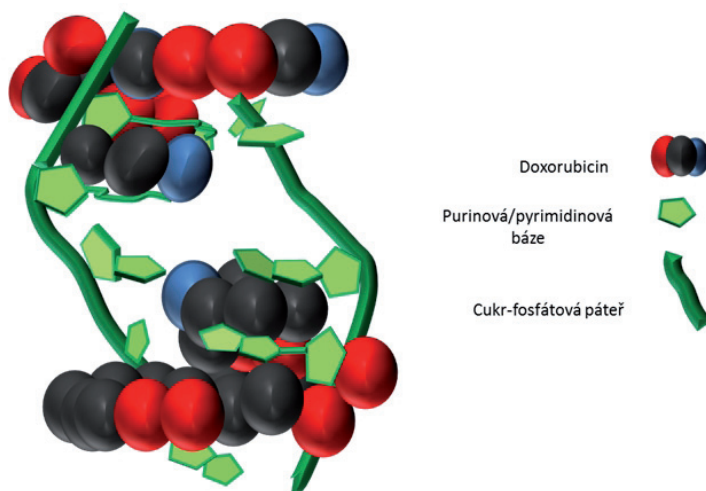
snadno přechází v srdeční selhání s nutností transplantace srdce¹⁰. Stále častější se proto stává využívání liposomálních cytostatik, která díky obalení léčiva liposomální vrstvou disponují sníženou kardiotoxicitou samotného léku a zároveň zvýšením celkového kumulativního množství látky, které je tělo ještě schopno přijmout. Účinek liposomálních a neliposomálních forem je stejný²⁰.

Přestože prvním izolovaným antracyklinovým antibiotikem byl idarubicin, pravděpodobně nejznámějším antracyklinovým antibiotikem z hlediska léčby nádorových onemocnění je doxorubicin (14-hydroxyl-daunorubicin). Doxorubicin vzniká hydroxylací přírodního produktu daunorubicinu izolovaného z bakterie *Streptomyces peucetius*¹¹. Používá se v léčbě karcinomu prsu¹², neuroblastomu¹³, akutní myeloidní leukémie, akutní lymfoidní leukémie¹⁴, Hodgkingského a non-Hodgkingského lymfomu¹⁵, nádorů močového měchýře¹⁶, kůže¹⁷ nebo vaječnicků¹⁸.

Mechanismus účinku doxorubicin je založen na interkalaci mezi páry bází DNA, která tak nemůže být rozpletena a nedochází k replikaci buňky. Struktura DNA je nekovalentně poškozena, interkalované molekuly doxorubicinu odvíjejí dvoušroubovici a prodlužují tak obrysovou délku DNA (**Obr. 1**). Změněná struktura často nemůže být rozpoznána proteiny, které mají s DNA reagovat¹⁹. Může tak docházet také k mutacím, posouvajícím čtecí rámec genetického kódu²⁰. Mezi další mechanismy účinku patří inhibice topoizomerázy²¹, produkce volných radikálů, které poškozují DNA a způsobují lipoperoxidaci membrán²², alkylace²³ a crosslinking DNA²⁴.

Závěr

Nádorové bujení je buněčný proces, jehož podstatou je změna genetické informace a regulačních procesů v buňce, v důsledku čehož dochází k nekontrolovanému zmnožení buněk. Cytostatika, zejména pak antracyklinová antibiotika jsou v současné době široce využívána například při léčbě zhoubných nádorů prsu nebo prostaty, řadících se mezi nejčastější nádorová onemocnění.



Obrázek 1: Interkalace doxorubicinu do dvoušroubovice DNA

Tato práce byla financována ze zdrojů SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

- Kennedy S., Oswald N., PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide, Caister Academic Press, 2011.
- Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H.: *Biotechniques*, 23, 504 (1997).
- Raclavsky V.: (2003).
- Sherstyuk V. V., Shevchenko A. I., Zakian S. M.: *Chromosoma*, 123, 183 (2014).
- Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslén L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O., Botstein D.: *Nature*, 406, 747 (2000).
- Kovalova L., McArdell C. S., Hollender J.: *Journal of Chromatography A*, 1216, 1100 (2009).
- Negreira N., Lopez de Alda M., Barcelo D.: *The Science of the total environment*, 482-483, 389 (2014).
- Jehn U., Heinemann V.: *Anticancer Research*, 11, 705 (1991).
- Basar E. Z., Corapcioglu F., Babaoglu K., Anik Y., Daglioz G. G., Dedeoglu R.: *Pediatric Hematology and Oncology*, 31, 237 (2014).
- Raj S., Franco V. I., Lipshultz S. E.: *Current treatment options in cardiovascular medicine*, 16, 315 (2014).
- Bains O. S., Szeitz A., Lubieniecka J. M., Cragg G. E., Grigliatti T. A., Riggs K. W., Reid R. E.: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 347, 375 (2013).
- Tang S., Yin Q., Zhang Z., Gu W., Chen L., Yu H., Huang Y., Chen X., Xu M., Li Y.: *Biomaterials*, 35, 6047 (2014).
- Wang G., Edwards H., Caldwell J. T., Buck S. A., Qing W. Y., Taub J. W., Ge Y. B., Wang Z. H.: *Plos One*, 8, (2013).
- Varshosaz J., Hassanzadeh F., Aliabadi H. S., Nayeb Sadrian M., Banitalebi M., Rostami M.: *Biomed Research International*, (2014).
- Burley K., Allford S.: *British Journal of Haematology*, 165, 70 (2014).
- Fairey A. S., Daneshmand S., Quinn D., Dorff T., Dorin R., Lieskovsky G., Schuckman A., Cai J., Miranda G., Skinner E. C.: *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, 31, 1737 (2013).
- Silverman H. I.: *New England Journal of Medicine*, 333, 257 (1995).
- Shoji T., Takatori E., Kaido Y., Omi H., Yokoyama Y., Mizunuma H., Kaiho M., Otsuki T., Takano T., Yaegashi N., Nishiyama H., Fujimori K., Sugiyama T.: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 73, 895 (2014).
- Box V. G. S.: *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 26, 14 (2007).
- Agudelo D., Bourassa P., Berube G., Tajmir-Riahi H. A.: *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 144 (2014).
- Kato M., Nakayama M., Agata M., Yoshida K.: *Tumor Biology*, 34, 723 (2013).
- Elford H. L., Cardounel A. J., Zweier J., Henry J., Sumpter R., Oakley O., Gallicchio V.: *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting*, 47, 502 (2006).
- Taatjes D. J., Fenick D. J., Gaudiano G., Koch T. H.: *Current Pharmaceutical Design*, 4, 203 (1998).
- Post G. C., Barthel B. L., Burkhart D. J., Hagadorn J. R., Koch T. H.: *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 7648 (2005).
- Popenoe E. A., Schmaeler M. A.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 196, 109 (1979).
- Sartiano G. P., Lynch W. E., Bullington W. D.: *Journal of Antibiotics*, 32, 1038 (1979).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.