

24 Miniaturizované elektrochemické systémy v detekci interakce protinádorových léčiv s DNA.

Hůska D.¹, Šílený J.², Hodek P.³, Adam V.¹, Trnková L.⁴, Eckschlager T.⁵, Stiborová M.³, Hraběta J.⁵, Poljaková J.³, Hubálek J.², Kizek R.¹

1) Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

2) Ústav mikroelektroniky, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně

3) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2

4) Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

5) Klinika dětské hematologie a onkologie, II. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha 5

* Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz

Klíčová slova

DNA; DNA senzory; senzorové pole, modifikace DNA; interkalace; ellipticin, protinádorová terapie

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v rozvinutých zemích, a proto je hledání vhodných léčebných strategií je jedním z významných cílů moderní medicíny. Chemoterapeutika jsou často jedinou možností léčby u pokročilých forem nádorového onemocnění. Mechanismy účinku léčiv jsou různé, ale velmi často zasahují do buněčného dělení. Je známo, že malé molekuly (léčiva) mohou s DNA interagovat několika různými mechanismy, a to vazbou do malého či velkého žládku, přímou vazbou s jednotlivými bazemi či interkalací do primární struktury polynukleotidového řetězce. Zjistilo se, že planární aromatické molekuly se především interkalují mezi dvě po sobě jdoucí báze DNA. Tento interkalační efekt je významný v oblasti hledání léčiv aktivních v protinádorové chemoterapii, kam je možno zařadit deriváty ellipticinu. Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyridol(4,3-b)carbazole) je alkaloid izolovaný z čeledi rostlin *Apocynaceae* (jako jsou *Ochrosia borbonica*, *Excavativa coccinea*). Prvně byl izolován v roce 1959 z listů stále zeleného stromu *Ochrosia elliptica* roustoucím v Oceánii. Mezi nejznámější a nejpožívanější deriváty ellipticinu patří 9-hydroxyellipticin, jehož protinádorový efekt byl studován již před třiceti lety.

Během intenzivního studia ellipticinu bylo zjištěno, že tato látka je schopna aktivovat mutanční p53, což by mohlo mít význam u zhoubných nádorů s mutací proteinu p53. Navíc řada jeho derivátů vykazuje nejen protinádorové, ale i anti-HIV vlastnosti (*Stiborova and Frei, 2001*). Ellipticin je navržen jako potencionální protinádorové léčivo, ale jeho použití je limitováno výraznou toxicitou. Jeho protinádorový efekt je dán interakcí s DNA nebo inhibicí enzymu topoisomerasy II. Po enzymatické aktivaci cytochromy P450 je schopen kovalentní vazby na molekulu DNA (*Stiborova, et al., 2007*, *Stiborova, et al., 2004*). Z provedených experimentálních studií vyplynulo, že místem kam se aktivovaný ellipticin váže je deoxyguanosin (*Poljakova, et al., 2006*, *Stiborova, et al., 2003*, *Stiborova, et al., 2007*, *Stiborova, et al., 2003*). Bylo zjištěno, že kovalentní DNA adukty byly pozorovány u celé řady buněčných linií (*Poljakova, et al., 2007*).

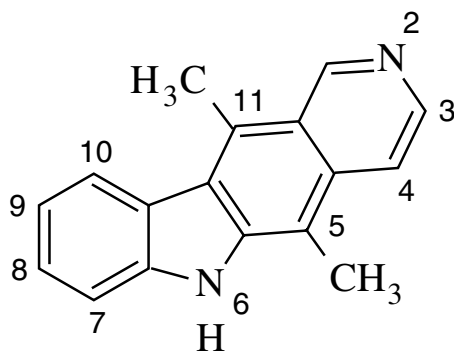
Cílem této práce bylo studovat chování ellipticinu a jeho interakci s DNA za použití nových materiálů pro přípravu mikroelektrod a následnou elektrochemickou detekci.

2. Materiál a metody

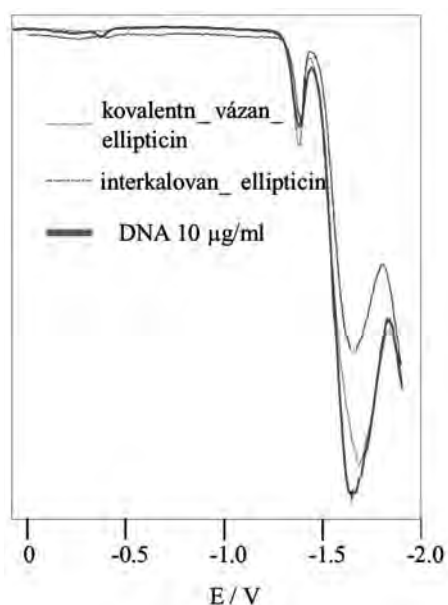
Chemikálie: DNA byla izolována běžným postupem (fenol/chloroformovou extrakcí) z buněčných linií odvozených od neuroblastomů běžným postupem. Ellipticin a ostatní použité chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich. Použité materiály: podkladová destička byla vyrobena z korundové keramiky (alumina-96% Al₂O₃), a pro výrobu elektrody byly použity pasty 5545, 9635-HG, 4460 (ESL) a 5874, 7105, BQ221 (DuPont).

Při výrobě tištěných elektrod byly využity následující přístroje a zařízení: poloautomatický sítotiskový přístroj UL-1505A Tesla, laser AUREL AUTOMATION ALS 300L, horkovzdušná pec HS 62A a inline pec BTU. Parametry při výrobě uhlíkových nanotrubek byly následující: niklový katalyzátor, depoziční doba 70 s, podklad pro růst nanotrubic platina. Materiály použité na jednotlivé vrstvy byly pro pracovní elektrodu – uhlík, referenční elektrodu – Ag/AgCl, pomocnou elektrodu – Pt, izolaci – sklo a přírodní kontakty – AgPd. Plocha pracovní elektrody byla 0.5 mm². Pro amperometrické měření byl použit potenciostat Bio-

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE



Obr. 1
Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyridol
(4,3-b)karbazol)



Obr. 2
Elektrochemický záznam interakce
1 μM ellipticinu s 10 μg/ml DNA

Stat a AUTOLAB ve spojení s konektory TX721 1115 a Molex 0039532035, které jsou určeny pro připojení tištěných elektrod. K vyhodnocování měření byl použit program BioStat a GEPES 4.9. Nastavení parametrů elektrochemické analýzy: počet kanálů 1, vzorkovací frekvence 20 sps (vzorků/s), řád filtru 5. Základním elektrolytem byl acetátový pufr o pH 5.

3. Výsledky a diskuse

V experimentech zaměřených na sledování interakce ellipticinu a DNA bylo využito tištěných pastových na nanotrubkových uhlíkových elektrod. Nejdříve jsme se zaměřili na sledování elektrochemického chování samotného protinádorového léčiva ellipticinu a DNA. DNA byla analyzována pomocí rtuťové (HMDE) a uhlíkových elektrod. Na HMDE byla pozorována výrazná elektrochemická odezva v případě použití acetátového pufru o nižším pH. Pozorovaný elektrochemický signál odpovídající redukci adeninu a cytosinu (CA) byl kolem potenciálu -1.5 V. Pomocí HMDE jsme dále sledovali změny signálu DNA v přítomnosti ellipticinu. Zaznamenávaný signál DNA se s dobou interakce a koncentrací ellipticinu snižoval. Za pozorované snížení signálu DNA odpovídá interkalace ellipticinu do DNA. Další experiment byl proveden s kovalentně vázaným ellipticinem do struktury DNA. Pozorovaná změna CA signálu byla podle našeho očekávání výrazně menší, ale bylo ji možné ještě zaznamenat. Další experimenty byly provedeny na různých typech námi navržených uhlíkových elektrodách. Nejdříve jsme na uhlíkové elektrody postupně nanášeli různé koncentrace ellipticinu a ethidium bromidu. Na získaných voltamogramech byly pozorovány oxidační signály kolem potenciálu 600 mV. V dalších experimentech byla sledována interakce DNA s ellipticinem a ethidium bromidem. Podobně jako interkalačního činidla bylo sledováno chování samotné DNA na uhlíkových elektrodách.

Získali jsme velmi dobře reprodukovatelné oxidační signályází v DNA. Pomocí navrženého postupu bylo možné detekovat koncentrace DNA pod $1 \mu\text{g/ml}$. V následných experimentech jsme se zaměřili na detailní sledování interakce DNA s ellipticinem a nebo s ethidium bromidem (známé interkalační činidlo). Byl připraven inkubační roztok (50 mM fosfátový pufr, pH 7.4) ke kterému byl přidán ellipticin nebo ethidium bromid v koncentraci $10 \mu\text{M}$. K takto připravené reakční směsi byla postupně přidávána DNA s vzrůstající koncentrací (od 0.5 do $10 \mu\text{g/ml}$). Na získaných elektrochemických záznamech byly pozorovatelné změny související s interakcí zkoumaných látek s DNA. Signály DNA s rostoucí koncentrací ellipticinu i ethidium bromidu klesaly. Pokles oxidačních signálůází DNA jednoznačně souvisí se změnou struktury DNA způsobené interakcemi.

4. Závěr

Elektrochemická detekce, představující jednoduchý a rychlý nástroj pro studium redoxních reakcí byla aplikována na studium interkalačních činidel do DNA (Adam, et al., 2007, Hubalek, et al., 2007, Vitecek, et al., 2006). Zjistili jsme, že proces interkalace lze velmi dobře monitorovat. Experimenty také ukázaly, že na uvedených elektrodách je možné analyzovat odděleně jak DNA, tak i interkalační sloučeniny.

Literatura

- ADAM, V.; MIKLOVA, R.; HUBALEK, J.; HANUSTIAK, P.; BEKLOVA, M.; HODEK, P.; HORNA, A.; TRNKOVA, L.; STIBOROVA, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R. Utilizing of square wave voltammetry to detect flavonoids in the presence of human urine. *Sensors*, 2007, roč. 7. č. 10, s. 2402-2418.
- HUBALEK, J.; HRADECKY, J.; ADAM, V.; KRSTOFOVA, O.; HUSKA, D.; MASARIK, M.; TRNKOVA, L.; HORNA, A.; KLOSOVA, K.; ADAMEK, M.; ZEHNAL, J.; KIZEK, R. Spectrometric and voltammetric analysis of urease – nickel nanoelectrode as an electrochemical sensor. *Sensors*, 2007, roč. 7. č. 7, s. 1238-1255.
- POLJAKOVA, J.; DRACINSKY, M.; FREI, E.; HUDECEK, J.; STIBOROVA, M. The effect of pH on peroxidase-mediated oxidation of and DNA adduct formation by ellipticine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 2006, roč. 71. č. 8, s. 1169-1185.
- POLJAKOVA, J.; FREI, E.; GOMEZ, J. E.; AIMOVA, D.; ECKSCHLAGER, T.; HRABETA, J.; STIBOROVA, M. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human leukemia HL-60 and CCRF-CEM cells. *Cancer Letters*, 2007, roč. 252. č. 2, s. 270-279.

5. STIBOROVA, M.; BREUER, A.; AIMOVA, D.; STIBOROVA-RUPERTOVA, M.; WIESSLER, M.; FREI, E. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by P-32 postlabeling. *International Journal of Cancer*, 2003, roč. 107. č. 6, s. 885-890.
6. STIBOROVA, M.; DRACINSKA, H.; AIMOVA, D.; HODEK, P.; HUDECEK, J.; RYSLAVA, H.; SCHMEISER, H. H.; FREI, E. The anticancer drug ellipticine is an inducer of RAT NAD(P)H : Quinone oxidoreductase. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 2007, roč. 72. č. 10, s. 1350-1364.
7. STIBOROVA, M.; FREI, E. Targeting of ellipticine drugs on tumor cells. *Chemicke Listy*, 2001, roč. 95. č. 9, s. 549-555.
8. STIBOROVA, M.; POLJAKOVA, J.; RYSLAVA, H.; DRACINSKY, M.; ECKSCHLAGER, T.; FREI, E. Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *International Journal of Cancer*, 2007, roč. 120. č. 2, s. 243-251.
9. STIBOROVA, M.; SEJBAL, J.; BOREK-DOHALSKA, L.; AIMOVA, D.; POLJAKOVA, J.; FORSTEROVA, K.; RUPERTOVA, M.; WIESNER, J.; HUDECEK, J.; WIESSLER, M.; FREI, E. The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N-2-oxide. *Cancer Research*, 2004, roč. 64. č. 22, s. 8374-8380.
10. STIBOROVA, M.; STIBOROVA-RUPERTOVA, M.; BOREK-DOHALSKA, L.; WIESSLER, M.; FREI, E. Rat microsomes activating the anticancer drug ellipticine to species covalently binding to deoxyguanosine in DNA are a suitable model mimicking ellipticine bioactivation in humans. *Chemical Research in Toxicology*, 2003, roč. 16. č. 1, s. 38-47.
11. VITECEK, J.; PETRLOVA, J.; PETREK, J.; ADAM, V.; POTESIL, D.; HAVEL, L.; MIKELOVA, R.; TRNKOVA, L.; KIZEK, R. Electrochemical study of S-nitrosoglutathione and nitric oxide by carbon fibre NO sensor and cyclic voltammetry – possible way of monitoring of nitric oxide. *Electrochimica Acta*, 2006, roč. 51. č. 24, s. 5087-5094.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem KAN 208130801.