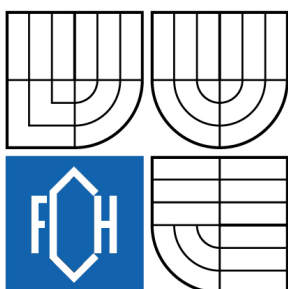




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# RAMANOVA SPEKTROSKOPIE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK A PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV

RAMAN SPECTROSCOPY OF BIOLOGICALLY ACTIVE SPECIES AND ANTITUMOR DRUGS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

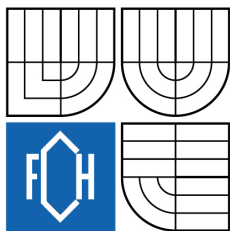
Bc. LIBĚNA TŘEŠTÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. OLDŘICH VRÁNA, CSc.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0261/2008** Akademický rok: **2008/2009**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Bc. Liběna Třeštíková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)  
Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Oldřich Vrána, CSc.**  
Konzultanti diplomové práce: Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

### Název diplomové práce:

Ramanova spektroskopie biologicky aktivních látek a protinádorových léčiv

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Ramanova spektroskopie - praktické aplikace ( příprava vzorku, příprava Ag koloidů, měření spekter, jejich zpracování a vyhodnocení)
3. Zpracování výsledků, diskuse

### Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Liběna Třeštíková  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Oldřich Vrána, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Text abstraktu v češtině

SERRS spektra biologických materiálů jsou velmi komplexní, neboť zahrnují dohromady signály všech přítomných molekul. Svoji pozornost jsem zaměřila zejména na SERRS spektra protinádorových látek a jejich komplexů s dvoušroubovicí DNA. Bylo studováno léčivo doxorubicin a jeho deriváty, jenž by mohly být využity při léčbě nádorových onemocnění. Doxorubicin, který patří do skupiny antracyklinových antibiotik, se již používá při potlačování bujení rakovinových buněk, ale hledají se nové možnosti léčby s vyšší efektivitou a s nižší úrovní nežádoucích účinků. SERRS představuje jednu z možností studia těchto látek a jejich interakcí s DNA.

## **ABSTRACT**

Text abstraktu v angličtině

SERRS spectra of biological materials are very complex, because they consist of signals from all molecules present in cells. In this text are presented SERRS spectra of antitumor drugs and its complex with DNA. Experimental are rated on doxorubicin and another antitumor druha and on study of theirs potential by treatment for tumors. Doxorubicin belong to clase antracycline antibiotics and is used for stop of tumor cells reproduction. Scientists found still new ways, new drugs. SERRS is one of possibilities for study of this drugs and theirs interaction with DNA.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Ramanova spektroskopie, vibrační spektroskopie SERRS, DNA, protinádorová léčiva, doxorubicin

## **KEYWORDS**

Raman spectroscopy, vibrating spectroscopy, SERRS, DNA, antitumor drugs, doxorubicin

TŘEŠTÍKOVÁ, L. Ramanova spektroskopie biologicky aktivních látek a protinádorových léčiv. Brno, 2009. 68 s. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Oldřich Vrána CSc.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Oldřichu Vránovi CSc. za spoustu podnětných připomínek a věnovaný čas.

## OBSAH

PROHLÁŠENÍ.....	2
OBSAH .....	3
I. Úvod.....	4
II. Teoretická část.....	5
2.1 Ramanova spektroskopie.....	5
2.2 Vibrační spektroskopie.....	6
2.2.1 Molekulární vibrace .....	7
2.2.2 Interpretace vibračních spekter .....	8
2.3 Resonanční Ramanova spektroskopie.....	9
2.3.1 Povrchem zcitlivěná (rezonanční) Ramanova spektroskopie SE(R)RS.....	9
2.3.2 Experimentální aspekty SER(R)S .....	9
2.3.3 SER(R)S DNA .....	10
2.4 DNA .....	11
2.4.1 Úroveň struktury DNA.....	12
2.5.1 Mechanismus účinku.....	15
2.5.2 Možné nežádoucí účinky.....	16
2.6 Ramanovo spektrum DNA .....	18
2.7 Srovnání technik vhodných pro studium interakcí doxorubicinu s DNA .....	19
2.7.1 Srovnání studií doxorubicinu a jeho interakcí s DNA použitím FT SERS, rezonančního Ramana a SERRS .....	20
2.7.2 Srovnávací studie aclacinomycinu versus doxorubicinu použitím rezonanční Ramanovy spektroskopie .....	24
2.7.3 Srovnání spekter získaných pomocí SERRS: doxorubicinu, aclacinomycinu, 11-deoxycarminomycinu a jejich komplexů s DNA.....	31
III. Praktická část.....	33
3.1. Cíl práce .....	33
3.2 Materiál .....	34
3.3 Příprava Ag koloidů .....	35
3.4 Příprava vzorku .....	39
3.4.1 Příprava Ramanova spektrofotometru T64000NSPL .....	39
3.5 Měření spekter, jejich zpracování a vyhodnocení.....	40
3.5.1 Časová závislost roztoku Ag koloid - doxorubicin .....	40
3.5.2 Komplex doxorubicin-DNA.....	43
3.5.3 Pyrazol-doxorubicin časová závislost .....	47
3.5.4 Komplex (pyrazol-doxorubicin)-DNA.....	48
3.5.5 Časová závislost vzorku N2-DOX .....	53
3.5.6 Aplikace nosiče a jeho vliv .....	55
3.5.7 Komplexy DOX, PYR, N2-DOX s DNA .....	57
3.5.8 Komplex doxorubicin-oligonukleotid A <sub>12</sub> .....	59
3.5.9 Srovnání A-DOX, DOX-A, KOMP a samotného A <sub>12</sub> se síranem .....	63
III. Závěr.....	64
IV. Seznam použitých zdrojů .....	66
V. Seznam použitých zkratk .....	68

## I. Úvod

Tato diplomová práce navazuje na práci bakalářskou (Metody stanovení změn struktury proteinů metodami vibrační spektroskopie). Zajímavé se ukázaly hlavně možnosti Ramanovy spektroskopie a to převážně povrchově zcitlivěné (rezonanční) Ramanovy spektroskopie, SE(R)RS. Tuto metodu lze využít jak při analýze potravin, jejich složek tak při studiu léčiv pro účely medicíny. Název práce je Ramanova spektroskopie biologicky aktivních látek a protinádorových léčiv, ale je zaměřená převážně na studium protinádorových léčiv pomocí SERRS. Týká se to hlavně doxorubicinu a léčiv od něj odvozených. Ty se interkalují do dvoušroubovice DNA a tím ovlivňují další průběh nemoci, zabraňují intenzivnímu bujení.

Pro pochopení mechanismu na molekulární úrovni je ale nutná detailní znalost mezimolekulárních interakcí např. systému vodíkových vazeb, nábojového rozložení atp., kterou v řadě případů nelze jednoznačně odvodit ze známé třídímní struktury biomolekuly. Proto pro řešení mnoha problému vztahu struktury je nutná další experimentální metoda poskytující jedinečnou a komplementární informaci o zkoumaném systému. Tou může být právě SERRS. Vibrační spektroskopie, do níž SERRS patří, se zabývá studiem molekulárních vibrací, a to prostřednictvím interakce molekuly se zářením, která vede k vibračním přechodům molekuly.

SERRS (obecně všechny metody vibrační spektroskopie) umožňuje studovat biologické látky v jejich přirozeném prostředí, tedy ve vodných roztocích. Sledovat můžeme nejen změny struktury vyvolané změnou fyzikálně-chemických parametrů například změnou pH, iontové síly, teploty, vlhkosti..., ale i dynamiku strukturních přechodu.

Doxorubicin, antracyklinové antibiotikum, je už delší dobu používán při léčení nádorových onemocnění. Cytostatický efekt antracyklinů se zaměřuje na DNA v jádře buňky. Antracykliny mají schopnost interkalace mezi páry bází DNA a inhibice funkce topoizomerázy II. Důsledkem je inhibice replikace a transkripce DNA a RNA.

Vývoj jde stále kupředu, hledají se nové varianty tohoto antibiotika, které nebudou mít, níže v textu zmíněné, nežádoucí účinky doxorubicinu. Studium možných náhrad doxorubicinu s vyšší účinností a s méně vedlejšími účinky byl jeden z cílů práce.

## II. Teoretická část

### 2.1 Ramanova spektroskopie

Je moderní analytická metoda založená na tzv. Ramanově jevu (Ramanově rozptylu). Prochází-li světelný paprsek nějakým prostředím, je určitá jeho část absorbována, část projde beze změny a část je rozptýlena. Světelný paprsek dopadá na molekuly látky a je-li srážka dokonale pružná, světlo se rozptýlí beze změny vlnové délky. Je-li srážka nepružná, dojde k rozptylu (změně směru šíření světla) a současně se změní vlnová délka světla. Pokud je dopadající světlo monochromatické, bude ve spektru rozptýleného záření jistý počet čar, jejichž vlnová délka bude ve srovnání s původní vlnovou délkou posunuta. Zdrojem monochromatického záření (obvykle ve viditelné oblasti spektra) je laser. [1]

Ramanova spektroskopie je založena na neelastickém rozptylu ultrafialového (o vlnové délce přibližně 250 – 400 nm, tj. 25 000 - 40 000  $\text{cm}^{-1}$ ), viditelného (o vlnové délce přibližně 400 – 700 nm, tj. 14 300 - 5 000  $\text{cm}^{-1}$ ) nebo též blízkého IČ záření molekulou, přičemž rozdíl mezi energií dopadajícího a rozptýleného fotonu odpovídá vždy některému z vibračních energetických přechodů v molekule. Intenzita rozptylu je úměrná změně polarizovatelnosti molekuly při přechodu. [2]

Metodu lze použít na vzorky plynné, kapalné i pevné. Mohou to být roztoky, suspenze, gely, tenké vrstvy, vlákna nebo monokrystalické, práškové či amorfni vzorky. Data získaná na vzorku v daném morfologickém stavu jsou přenosná na stejný vzorek v jiném morfologickém stavu. Lze studovat organické i anorganické látky. Měření lze provádět i na krystalograficky přesně orientovaném monokrystalu. Další výhodou metody je malé množství vzorku potřebné k analýze. V současnosti jsou nejužívanější přístroje umožňující analýzu jednotlivých objektů o velikosti 5 – 10  $\mu\text{m}$ , tzv. mikrospektrometry. [1]

Každé Ramanovsky aktivní normální vibraci molekuly přísluší pás ve spektru Ramanova rozptylu (přesněji řečeno dva pásy, jeden ve Stokesově a druhý v anti-Stokesově oblasti, běžně se měří Ramanova spektra pouze ve Stokesově oblasti). Ramanovo spektrum představuje závislost intenzity Ramanova rozptylu (osa y) na vlnočtu Ramanova posunu (osa x). Mezi vibrační spektroskopie náleží také infračervená spektroskopie.[2]

Principem metody IČ je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorpance (A) na vlnové délce dopadajícího záření.

Vibrace indukující změnu dipólového momentu molekuly se tedy projeví v IČ spektrech, zatímco vibrace indukující změnu polarizovatelnosti molekuly se projeví v Ramanových spektrech.[3]

Díky rozdílným výběrovým pravidlům jsou Ramanova a IČ spektroskopie do jisté míry komplementární – některé vibrace mohou být aktivní v obou těchto metodách, některé však jen v jedné z nich a jiné mohou být v obou neaktivní.

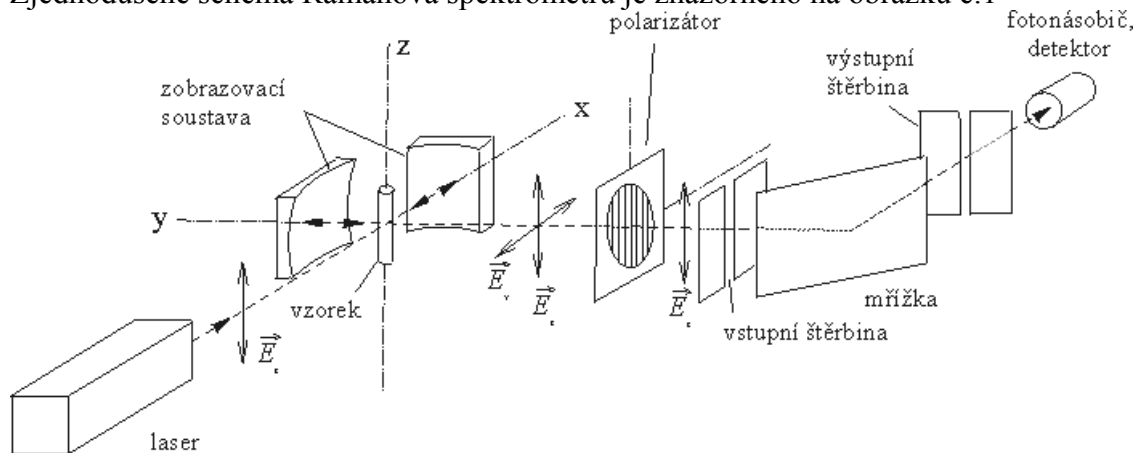
Plná komplementarita nastává u středově symetrických molekul, kdy vibrace symetrické vůči středu inverze jsou aktivní v Ramanových spektrech a vibrace antisymetrické vůči středu inverze jsou aktivní v IČ spektrech. [2]

Obě metody lze použít k identifikaci látek a ke kvalitativní i kvantitativní a strukturní analýze. Ramanova spektrometrie poskytuje spektrum částečně odlišné od infračerveného

spektra (některé pásy se objevují v obou, některé jen v jednom nebo druhém spektru), proto může být velmi užitečná kombinace obou metod.

Ramanova spektrometrie je zvláště významná při studiu organických a anorganických látek (v geologii např. bitumeny, uhlí atd.). Výhodou je možnost detailního studia složitých heterogenních směsí látek.

Zjednodušené schéma Ramanova spektrometru je znázorněno na obrázku č.1



**Obrázek č. 1 – Schéma Ramanova spektrometru [4]**

## 2.2 Vibrační spektroskopie

Objasnění struktury biologických makromolekul a vztahu mezi jejich strukturou a funkcí patří mezi jeden z hlavních úkolů molekulární biologie a biofyziky. Pro řešení mnoha problému vztahu struktury a funkce nutně potřebujeme experimentální metody poskytující jedinečnou a komplementární informaci o zkoumaném systému. V této oblasti nacházejí široké uplatnění metody vibrační spektroskopie. Vibrační spektroskopie se zabývá studiem molekulárních vibrací, a to prostřednictvím interakce molekuly se zářením, která vede k vibračním přechodům molekuly.

RS i IČ jsou nedestruktivní a hlavním jejich přínosem je možnost získání poměrně detailní strukturní informace, která je jinými metodami obtížně zjistitelná či dokonce nezjistitelná. Vibrační spektroskopii lze studovat biologické látky v jejich přirozeném prostředí, tedy ve vodných roztocích. Sledovat můžeme nejen změny struktury vyvolané změnou fyzikálně-chemických parametru například změnou pH, iontové síly, teploty, vlhkosti atd. ale i dynamiku strukturních přechodu. Ve srovnání s fluorescencí a nukleární magnetickou rezonancí probíhají Ramanův rozptyl i IČ absorpce ve velmi krátkém čase. Vibrační spektroskopie je tedy vhodnou metodou studia dynamiky biologických procesů. [5]



## 2.2.1 Molekulární vibrace

- Biatomická molekula

Vibrační biatomické molekuly chápeme periodickou změnu mezijaderné vzdálenosti. Při klasickém popisu jde o oscilátor tvořený dvěma hmotnými body na pružině viz obrázek č. 2.

Pro jeho frekvenci platí:

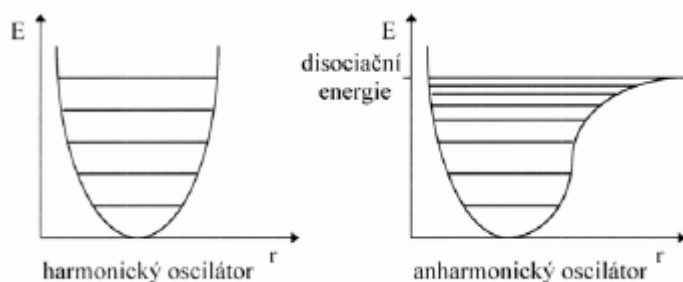
$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \text{ kde : } \mu \text{ je redukovaná hmotnost} \quad \mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

k je silová konstanta.



Obrázek č. 2 – Oscilátor tvořený dvěma hmotnými body na pružině

Frekvence vibrace biatomické molekuly tedy závisí na síle poutající atomy, to znamená na typu chemické vazby, a na hmotnosti vibrujících atomů. Při vibraci dochází k vychýlení atomů z rovnovážné polohy. Potenciální energie v případě harmonického oscilátoru je kvadratickou funkcí této výchylky. Grafickým znázorněním vzdálenosti je parabola s minimem v rovnovážném stavu systému. (obrázek č.3)

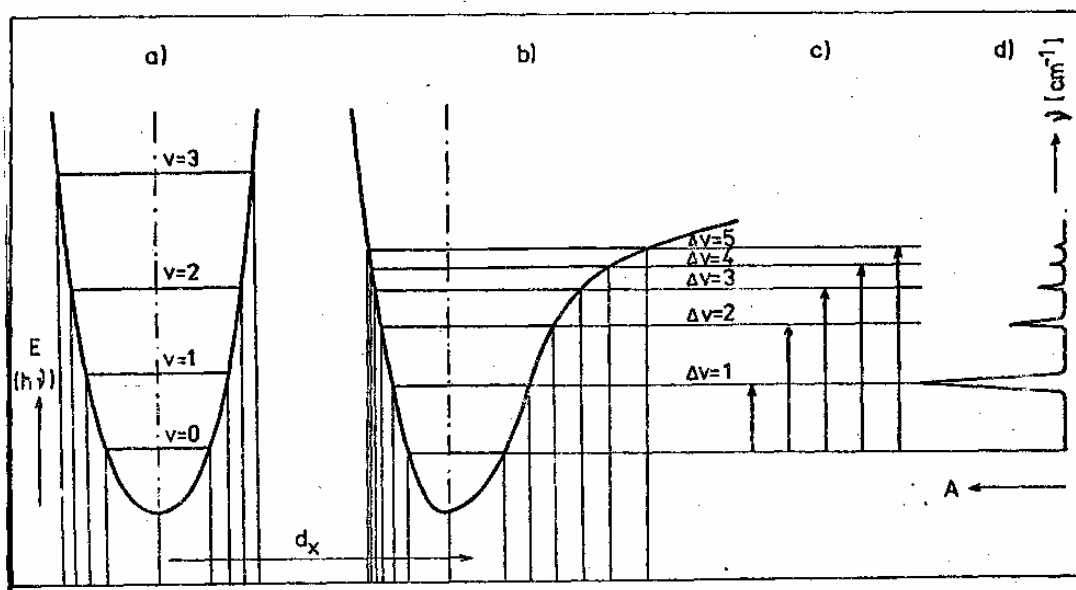


Obrázek č. 3 - Křivky disociační energie

- Víceatomová molekula

Pomocí mechanického modelu molekuly lze víceatomovou molekulu popsat jako soustavu hmotných bodů (atomů), vázaných silami chemických vazeb. Vibrace víceatomové molekuly je složitá forma kmitavého pohybu, kterou můžeme popsat jako součet jednoduchých harmonických pohybů, tzv. normálních vibrací.

Při normální vibraci všechny atomy v molekule vibrují se stejnou frekvencí a ve stejné fázi (současně procházejí rovnovážnými polohami a současně dosahují maximálních výchylek), ale s různými amplitudami. Každá normální vibrace molekuly je charakterizována určitou frekvencí a dále směrem a velikostí výchylky jednotlivých atomů, přičemž těžiště soustavy atomů nevibruje.



**Obrázek č. 4 – Potenciální energie, vibrační stavy, vibrační spektra harmonického a anharmonického oscilátoru**

$v$ ...vibrační kvantové číslo

$d_x$ ...souřadnice meziatomových vzdáleností

$A$ ...absorbance

Potenciální energie:

a) harmonický oscilátor

b) anharmonický oscilátor

c) znázornění vibračních stavů odpovídající vibrační spektrum

Obrázek č. 4 znázorňuje potenciální energie jak harmonického tak anharmonického oscilátoru, vibrační stavy a jim odpovídající vibrační spektra.

Každou normální vibrační souřadnici lze vyjádřit jako lineární kombinaci vnitřních souřadnic. Je-li více koeficientů transformace nenulových, jde o spřažené normální vibrace. Podmínkou spřažení je blízkost hmotností atomů a blízkost hodnot silových konstant vazeb.

Spřahovat se mohou pouze pohyby atomů stejných symetrických vlastností. [1]

### 2.2.2 Interpretace vibračních spekter

Interpretace vibračních spekter řeší dva neoddelitelné problémy:

- Přiřazení absorpčních a rozptylových pásů jednotlivým normálním vibračním molekuly.
- Charakterizace normálních vibrací určením symetrie a spřažených vnitřních souřadnic.

Při rozboru vibračních spekter se musí analyzovat všechny normální vibrační mody.

Užívá se tzv. koncepce charakteristických vlnočtů funkčních skupin, která umožňuje přiřadit některé význačné pásy ve spektru. Tato metoda si ovšem žádá velkou zkušenost experimentátora. Spektrální pásy, které se nacházejí v oblasti  $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ , jsou vhodné pro identifikaci funkčních skupin (např.  $-\text{OH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{N}-\text{H}$ ,  $\text{CH}$  aj.). Pásy nacházející se v oblasti  $1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$  se nazývají oblastmi „otisku palce“ (fingerprint region). Pomocí „vyhledávacích programů“ a digitalizovaných knihoven infračervených spekter je možno identifikovat neznámou analyzovanou látku. [6]

## 2.3 Resonanční Ramanova spektroskopie

Resonanční Ramanova spektroskopie se používá ke studiu složitějších látek. K rezonančního efektu dochází jestliže se vlnová délka záření blíží maximu absorpčního pásu vzorku. V důsledku toho narůstá intenzita Ramanových spekter, v některých případech až o tři řády.

### 2.3.1 Povrchem zesílená (rezonanční) Ramanova spektroskopie SE(R)RS

Zkratka SE(R)S je odvozena z anglického výrazu Surface-enhance (resonance) Raman scattering.

Princip SE(R)RS

V roce 1974 bylo poprvé pozorováno Ramanovo spektrum pyridinu adsorbovaného na stříbrné elektrodě [7]

Původní interpretace Ramanových signálů zesílených až o několik řádů nebyla správná. K poznání jevu došlo až o tři roky později a efekt byl nazván povrchem zesílený Ramanův rozptyl.

Přestože se SERS používá už řadu let, přesný mechanismus této metody není ještě zcela znám. [8]

Existují dvě hypotézy:

- Elektromagnetická
- Chemická.

#### Elektromagnetická

Elektromagnetická se zabývá indukovaným dipólem  $p$ , který při Ramanově rozptylu vzniká působením elektromagnetického světelného pole  $E$  na molekulu s polarizovatelností  $\alpha$  ( $p = E \cdot \alpha$ ). Tento jev je popsán jako zvýšení intenzity elektromagnetického pole adsorbátu na kovovém povrchu.

#### Chemická

Chemická hypotéza předpokládá, že v důsledku chemisorpce studované molekuly na povrchu kovu dochází k velkému zvýšení molekulové polarizace adsorbátu. [9]

### 2.3.2 Experimentální aspekty SER(R)S

U metody SER(R)S lze užít elektrody, koloidy nebo nanočástice, jejichž povrch je pokryt vrstvou příslušného kovu.

Elektrody jsou zhotoveny z ušlechtilých kovů: nejpoužívanějšího stříbra, dále pak zlata, mědi. Před použitím musí být povrch elektrod zdrsňen aluminou a následně podroben jednomu nebo několika oxidačně-redukčním cyklům.

Koloidy jsou připravovány chemickou redukcí solí příslušných kovů ve vodném nebo v některých bezvodých prostředích - např.:

- Ag koloid připravený použitím  $\text{NaBH}_4$
- Ag koloid v prostředí glycerolu
- Ag koloid v prostředí ethanolu
- Ag koloid stabilizovaný polyvinylalkoholem
- Ag koloid připravený pomocí EDTA.

Nevýhody koloidů oproti elektrodám jsou v nemožnosti přímé regulace potenciálu a v tendenci koloidu k agregaci. [10]

Metodou SER(R)S lze studovat jak malé molekuly (metabolity, nukleové báze, aminokyseliny atd, tak poměrně složité systémy (proteiny, oligo- a polynukleotidy, DNA atd.). Tato metoda se s úspěchem využívá při analýze velmi malých koncentrací studovaných látek. [11]

### **2.3.3 SER(R)S DNA**

Neboť je dvoušroubovice DNA nositelem genetické informace u všech živých organismů, věnuje je jejímu studiu značná pozornost. Řada autorů se snažila a stále snaží získat SERS spektra DNA jak na Ag elektrodách [12], tak na koloidech. [13]

Spektra nativní DNA nelze prakticky získat, protože v případě ds DNA se kontakt s povrchem např. koloidu uskutečňuje přes cukr-fosfátové skupiny a báze, jenž dávají intenzivní spektra jsou uvnitř dvoušroubovice. U denaturované DNA mohou báze díky rozpojení dvoušroubovice interagovat s povrchem kovu. Tím lze získat velmi intenzivní a bohaté spektrum.

Pro adsorpci ds DNA na povrch jsou dvě možnosti, buď se zachová nativní struktura a není získáno žádné spektrum nebo dojde k distorzi a je získáno spektrum, které odpovídá spektru ss DNA.

## 2.4 DNA

Deoxyribonukleová kyselina je nositelkou genetické informace všech organismů s výjimkou těch nebuněčných organismů, u nichž hraje tuto úlohu RNA (RNA-viry, virusoidy a viroidy). DNA je pro život nezbytnou látkou, která ve své struktuře obsahuje kódovanou genetickou informaci a tím předurčuje vývoj a vlastnosti celého organismu.

Objev její dvoušroubovité struktury se datuje do roku 1952, o rok později je veřejně publikována svými objeviteli, jimiž byli James Watson a Francis Crick, kteří za tento objev dostali v roce 1962 Nobelovu cenu.

U eukarotických organismů (rostlin a živočichů) je DNA uložena vždy uvnitř buněčného jádra zatímco u prokaryot (např. bakterie) se DNA nachází volně v cytoplazmě. Genová výbava člověka obsahuje přibližně  $3,2 \cdot 10^9$  vazebných párů bází.

DNA je biologická makromolekula — polymer, dvoušroubovice tvořená dvěma řetězci nukleotidů v obou vláknech. Jednotlivé nukleotidy se skládají ze tří složek:

1. fosfátu (vazebný zbytek kyseliny fosforečné)
2. deoxyribózy (pětiuhlíkový cukr - pentóza)
3. nukleové báze (dusíkaté heterocyklické sloučeniny).

V DNA se v různých kombinacích vyskytují čtyři nukleové báze:

- puriové báze: adenin (A) a guanin (G)
- pyrimidinové báze: thymin (T) a cytosin (C).

Spojení dusíkaté báze a deoxyribózy se nazývá nukleosid

Nukleotidy jsou uspořádány do řady za sebou, jejich spojení v řadě zajišťují fosfátové zbytky, které spojují uhlík 3' jedné deoxyribózy s uhlíkem 5' druhé deoxyribózy. Směr vláken se označuje podle orientace deoxyribózy v něm, tedy: směr  $3' \rightarrow 5'$  a opačný směr  $5' \rightarrow 3'$ .

Na uhlík 1' deoxyribózy se váží dusíkaté báze (A,G,C,T). Ty se spojují navzájem s odpovídající bází z protějšího řetězce, podle jednoduchého klíče:

- $A \leftrightarrow T$  (vzájemně jsou spojeny dvěma vodíkovými vazbami)
- $C \leftrightarrow G$  (vzájemně jsou spojeny třemi vodíkovými vazbami)

Jde o tzv. komplementaritu bází, z ní vychází vzájemná komplementarita obou vláken DNA. Vždy je na určité pozici v molekule jeden nukleotid z dvojice a v protějším vlákně druhý z nich.

Takto se uchovává v každém z vláken tatáž informace. Vzájemné spojení nukleotidů není uskutečněno regulární chemickou vazbou, ale vodíkovými můstky.

DNA se v organismu uchovává ve formě pravotočivé dvoušroubovice, ve které se nacházejí dva antiparalelní řetězce  $5' - 3'$  a  $3' - 5'$ , (vlákna jdou tedy proti sobě, na jednom konci molekuly se setkává zároveň 3' konec jednoho řetězce a 5' konec druhého a na druhém konci molekuly naopak). Při sobě je drží vodíkové můstky mezi komplementárními dusíkatými bázemi. Tato struktura je rozrušena, jen pokud je nutné DNA zreplikovat či použít genetickou informaci v ní ukrytou. [14]

Genetická informace se v DNA kóduje pomocí genetického kódu, který přiřazuje k jednotlivým tripletům (trojicím nukleotidů) aminokyseliny. Genetický kód je shodný prakticky u všech organismů (drobné odchylky byly nalezeny u mitochondrií). [15]

## 2.4.1 Úroveň struktury DNA

### Primární struktura

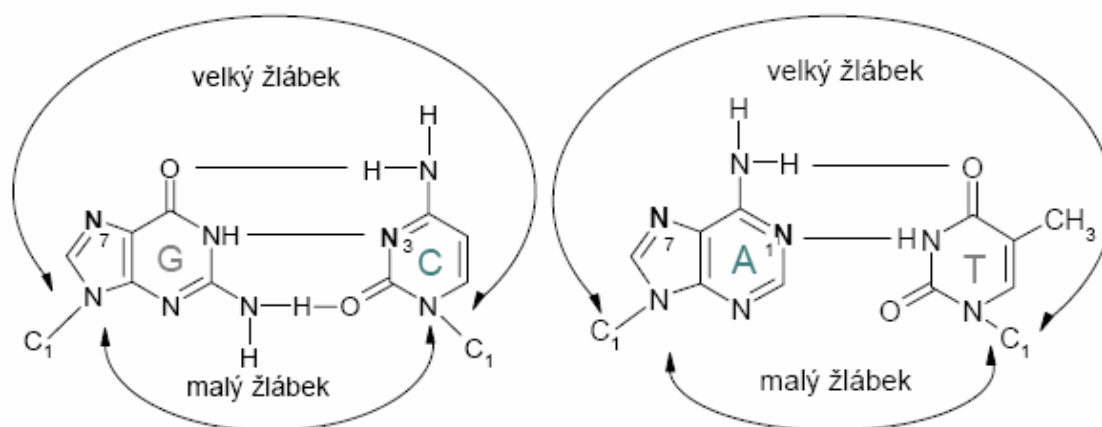
Primární struktura je dána pořadím nukleotidů, jejich sekvencí. Tato struktura sama přímo určuje genetickou informaci. Dá se znázornit lineárně jako řada nukleotidů nebo abstrahovat do řady písmen, které těmto dusíkatým bázím odpovídají. Podle konvence se pořadí nukleotidů zapisuje směrem 5' → 3'.

### Sekundární struktura

Forma stočení dvoušroubovice. Vlákna DNA se přirozeně stáčí do dvoušroubovice, avšak forma stočení není vždy, za všech podmínek stejná. *In vitro* je většina DNA v B formě, *in vivo* však za určitých podmínek přirozeně přechází v jinou.

Forma stočení má vliv na funkci – schopnosti molekuly reagovat s jinými látkami

Jedno z těchto uspořádání zaujímá DNA dle toho, které je v daném okamžiku energeticky nejvýhodnější a to s ohledem na nukleotidovou sekvenci, obsah vody a iontovou sílu. [14]



**Obrázek č. 5 – Schéma párování bází**

Na obrázku č. 5 je schématické znázornění párování bází.

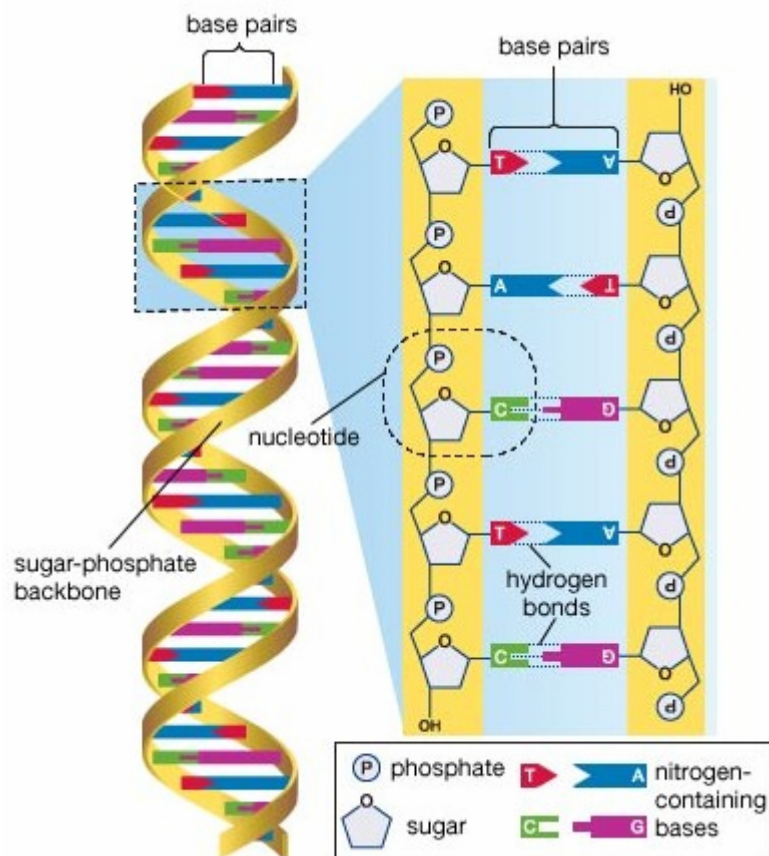
V tabulce č. 1 jsou uvedeny průměrné parametry dvoušroubovic konformací A, B a Z.

**Tabulka č. 1 – Parametry dvoušroubovic DNA konformací A, B a Z [16]**

	charakteristika dvoušroubovice		
	konformace A	konformace B	konformace Z
vinutí	pravotočivá	pravotočivá	levotočivá
celkový tvar	krátká, široká	dlouhá, tenká	podlouhlá, tenká
umístění osy dvoušroubovice	před větší žlábek	před páry bází	před menší žlábek
větší žlábek šířka/hloubka (nm)	velmi úzký hluboký 0,27/1,35	široký a hluboký 1,17/0,88	zploštělý na povrchu 0,88/0,37
menší žlábek šířka/hloubka (nm)	velmi široký a mělký 1,1/0,28	úzký a hluboký 0,57/0,75	velmi úzký a hluboký 0,2/1,38
zvýšení na pár bází (nm)	0,23	0,34	0,38
zvýšení na jeden závit (otáčku)(nm)	2,5	3,4	4,6
počet párů bází na jeden závit	11	10,5	12
konformace glykosidové vazby	anti	anti	anti u C, syn u G
konformace deoxyribózy	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo u dC/-exo u dG

#### **Vyšší úrovně struktury (supercoiling)**

Molekula DNA není jen neuspořádaným klubkem náhodně zavinutého vlákna. Celá molekula se velmi pečlivě několikanásobně navíjí a skládá. Do tzv. nadšroubovicového vinutí  
 pozitivní – struktura DNA je pevnější, kompaktnější  
 negativní – struktura je uvolňována, to může vést až k porušení párování bází. [17]



**Obrázek č. 6 – Struktura DNA [18]**

Obrázek č. 6 znázorňuje strukturu DNA, vazby mezi jednotlivými složkami

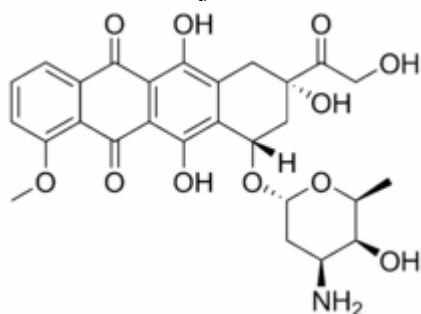


## 2.5 Doxorubicin

Je 14-hydroxyderivátem daunorubicinu, který byl izolován ze *Streptomyces peucetius* (var. *caesius*). Patří do skupiny antracyklinů. Původně antibiotikum (proti gram-negativním bakteriím) se nyní používá jako cytostatikum.

Historii doxorubicinu lze dohledat zpět až k 1950 k italské společnosti Farmitalia. Tato výzkumná společnost začala hledat protinádorové sloučeniny v mikroorganismech žijících v půdě. Po dlouhých výzkumech bylo zjištěno, že nejvhodnějším producentem je kmen *Streptomyces* zmutovaný pomocí N-nitroso-N-methyl uretanových sloučenin. Produktem bylo červené antibiotikum se souhrnným vzorcem  $C_{27}H_{29}NO_{11}$  a molekulovou hmotností 543,52 g / mol. [19]

Na obrázku č.7 je vzorec doxorubicinu.



Obrázek č. 7 – Vzorec doxorubicinu [20]

### 2.5.1 Mechanismus účinku

Hlavní cílovou strukturou pro cytostatický efekt antracyklinů je DNA v jádře buňky. Antracykliny mají schopnost interkalace, tj. vmezeřování se mezi páry bazí DNA a inhibice funkce topoizomerázy II. Důsledkem je inhibice replikace a transkripce DNA a RNA.

Přestože je známo, že antracykliny mají schopnost zasahovat do řady biochemických a biologických funkcí eukaryotických buněk, přesný mechanismus cytotoxických a antiproliferativních účinků doxorubicinu nebyl dosud plně vysvětlen. Po průniku do buňky, se doxorubicin váže převážně na chromatin. Experimentální důkazy svědčí pro to, že doxorubicin tvoří komplex s DNA interkalací svých planárních systémů mezi páry nukleotidových bazí. Důsledkem tohoto vmezeření je výrazné narušení syntézy DNA, DNA-dependentní syntézy RNA a syntézy proteinů.

Koncentrace doxorubicinu nutná k uplatnění antiproliferativních účinků prostřednictvím těchto mechanismů se zdají být poněkud vyšší než jsou koncentrace dosažitelné v místě tumoru za klinických podmínek. Nejnovější experimentální důkazy naznačují, že interkalace DOX do DNA zabraňuje štěpení DNA pomocí topoizomerázy II, což vede k závažnému narušení funkce, replikace DNA. Tento účinek byl pozorován při takové koncentraci léčiva, která je v rozmezí klinické léčebné dávky. O doxorubicinu je rovněž známo, že se podílí na oxidačních a redukčních reakcích. Řada NADPH-dependentních buněčných reductáz je schopna redukovat doxorubicin na volné radikály semichinonu, které reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku vysoce reaktivních cytotoxických sloučenin, jako jsou např. superoxid, hydroxylové radikály a peroxid vodíku. Tvorba volných radikálů vede také ke kardiotoxicitě doxorubicinu.

Další místo působení doxorubicinu může být na úrovni buněčné membrány. Léčivo se může vázat na lipidy buněčné membrány a může ovlivnit řadu funkcí. Cytotoxicita a antiproliferativní účinnost doxorubicinu mohou vycházet z některých shora uvedených

mechanismů; mohou se však uplatňovat i další procesy. Studie buněčné kinetiky ukázaly, že doxorubicin je účinný během celého buněčného cyklu včetně mezifáze. Rychle proliferující tkáně, např. nádorová tkáň (ale i kostní dřev, gastrointestinální sliznice a sliznice dutiny ústní, vlasové folikuly), jsou proto nejcitlivější na antiproliferativní účinky doxorubicinu. [21]

Léčiva obsahující látku doxorubicin se používají k léčbě některých onemocnění ze skupiny leukemií, gynekologických nádorů, sarkomů měkkých tkání, karcinomů močového měchýře, močových cest, trávicí trubice a prsu. Dále pro potlačování maligních lymfomů a nádorů plic. [22]

### 2.5.2 Možné nežádoucí účinky

Stejně jako u jiných antibiotik může být léčba doprovázena celou řadou nežádoucích účinků, jako např.:

- Vypadávání vlasů začíná obvykle 3 - 4 týdny po první dávce doxorubicin
- Pocit nevolnosti a zvracení
- Snížena odolnost vůči infekci-doxorubicin může snížit produkci bílých krvinek v kostní dřev, organismus je pak náchylnější k infekcím.
- Modřiny nebo krvácení doxorubicin může snížit produkci destiček (které pomáhají srážet krev)
- Anémie (nízký počet červených krvinek)-chudokrevnost
- Vředy v ústech
- Únava a pocit slabosti
- Změny chuti
- Změny barvy moči – moč může být zbarvená do růžovo-červené barvy
- Změny barvy kůže – díky nadměrné tvorbě pigmentu může kůže ztmavnout
- Citlivost na slunce – možné brzké spálení [23]

Kardiotoxicita způsobená dlouhodobějším podáváním doxorubicinu, označovaná jako chronická, se projevuje kardiomyopatií, která může mít za následek srdeční selhání.

U zvířat byl prokázán mutagenní a teratogenní efekt doxorubicinu. Doxorubicin prochází placentou a ohrožuje plod a u kojící matky se dostává i do mléka, kde se koncentruje. [24]

Vzhledem k výše uvedeným toxickým aspektům doxorubicinu se hledají možné náhrady, které by měly stejné účinky na nádory, ale nižší nežádoucí účinky na zbytek organismu.

Donedávna byla Ramanova spektroskopie považována za metodu vhodnou pouze pro určení strukturního složení malých molekul. Nyní má také velký význam při řešení problémů nižší citlivosti a při problémech vyvolaných fluorescencí. Ramanova spektroskopie se také stala unikátním nástrojem, který dovoluje selektivní analýzy přímo ve skleněných nádobách v nichž jsou látky skladovány.

Ramanova spektroskopie může být aplikována v mnoha oblastech potravinářské chemie, při studiu stopového množství nukleových kyselin a dalších komponentů buněk, tkání a mikroorganismů a jejich změn během uchování. V dříve provedených studiích byla demonstrována také aplikace metody při zjišťování přeměn cukrů během fermentace. Zjišťovala se také koncentrace organických i syntetických látek (např. koloidního fosfátu draselného nacházejícího se v mléčném kaseinu). RS může být také použita pro detailní analýzu polyolefinových materiálů, jako jsou vysoce polymerní polyethyleny, polypropyleny nebo polyvinylchloridy, včetně studií chování polymerních vláken a kompozitů za různých fyzikálních podmínek.

RS reprezentuje nástroj, který může být použit pro přímou kvalitativní kontrolu stejně dobře jako pro získání detailních údajů o struktuře potravních systémů.

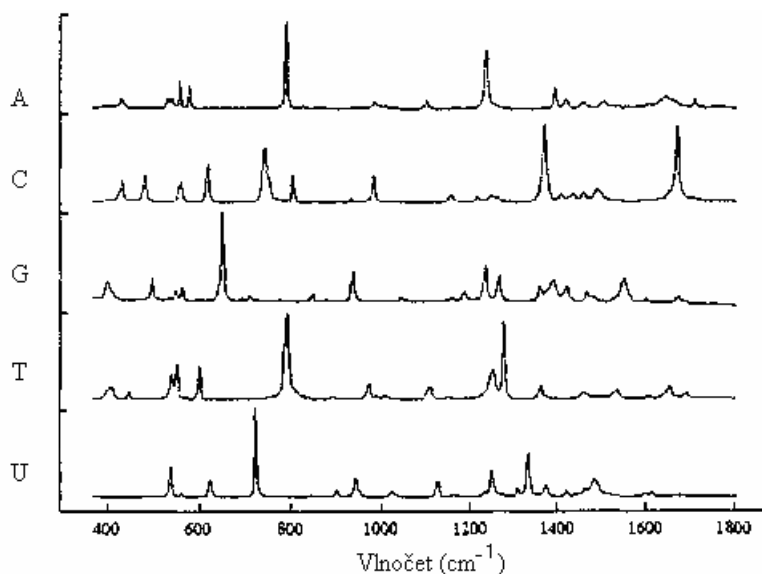
Je vhodná k analýze různých látek v potravinách, jako jsou makrokomponenty (proteiny, tuky, cukry nebo i vody) i komponentů s nízkým zastoupením (karotenové pigmenty, syntetická barviva v mikroorganismech i obalových materiálech, které jsou v kontaktu s potravinami).

Interakce elektromagnetického záření s elektrony nebo jádry molekul je základem mnoho spektroskopických technik, které jsou založeny na absorpci, emisi nebo rozptylu. Ramanova spektroskopie je založena na rozptylu. Intenzita i vlnočet indukovaných molekulárních vibrací jsou velmi citlivé na chemické reakce i na okolní prostředí, Ramanovo spektrum může být použito k popisu těchto interakcí na molekulární úrovni [25].

## 2.6 Ramanovo spektrum DNA

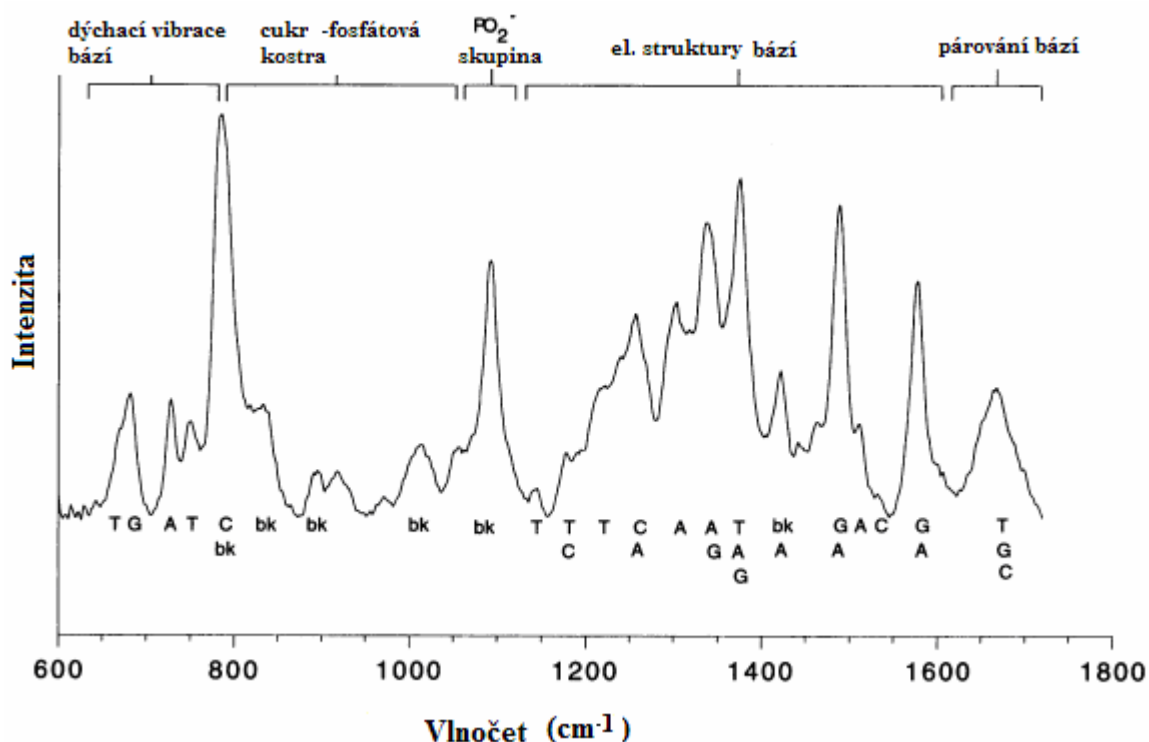
Srovnávací studie, které jsou dále uvedeny, jsou zaměřeny na výzkum interakcí léčiv a dvoušroubovice DNA. Spektrům DNA a RNA bází dominují vibrace dýchacího kruhu v oblasti  $600-800\text{ cm}^{-1}$ . Ve spektru nejsou pouze vibrační pásy bází, ale i symetrické valenční vibrace  $\nu(\text{PO}_2^-)$  DNA a RNA cukr-fosfátové kostry, které mohou být v oblasti okolo  $1100\text{ cm}^{-1}$ . Ramanova spektra pěti bází přítomných v DNA a RNA jsou znázorněny na obrázku č. 8 a na obrázku č. 9 je uvedeno typické spektrum DNA v B - konformaci. Všechna spektra bází obsahují intenzivní pás v oblasti  $600 - 800\text{ cm}^{-1}$ , který může být přiřazen vibracím dýchacího kruhu.

Z uvedených spekter je jasné, že pomocí Ramanova spektroskopu lze snadno odlišit jednotlivé báze. To je možné nejlépe demonstrovat na spektru thyminu a uracilu. Tyto dvě báze se od sebe liší pouze methylací v poloze  $\text{C}_5$ . Přesto jsou jejich spektra značně odlišná. Ve spektru DNA (obr. č. 9) jsou některé pásy připisovány charakteristickým vibracím bází, ale jejich součet je jiný než by odpovídal součtu jednotlivých spekter adeninu, guaninu, thyminu a cytosinu (obr. č. 8). To je proto, že jsou vázány se zbytkem struktury DNA.



Obrázek č. 8 – Spektra bází [26]

- A – adenin
- C – cytosin
- G – guanin
- T – thymin
- U – uracil



**Obrázek č. 9 – Spektrum DNA v B – konformaci [27]**

- A – adenin, C – cytosin, G – guanin, T – thymin, bk – vibrace cukr-fosfátové skupiny
- 600 – 800  $\text{cm}^{-1}$  – dýchací vibrace ar. kruhů jednotlivých bází
- 800 – 1050  $\text{cm}^{-1}$  – cukr-fosfátová kostra
- 1050 – 1100  $\text{cm}^{-1}$  – fosfátová skupina
- 1100 – 1650  $\text{cm}^{-1}$  – elektronová struktura bází
- 1650 – 1800  $\text{cm}^{-1}$  – párování bází

Interakce léčiv s DNA byly studovány mnoha metodami. Byla publikována studie uvádějící srovnání metod FT SERS, RR a SERS.

## 2.7 Srovnání technik vhodných pro studium interakcí doxorubicinu s DNA [28, 29, 30]

FT SERS spojený s mikroskopem byl použit jako sonda k získání informací o interakci léčiv s DNA. Micro-FT SERS spektra doxorubicinu o koncentraci  $10^{-5}$  M a jeho komplex s DNA byly zaznamenány po absorpci na povrchu stříbrného koloidu a srovnány s korespondujícími spektry rezonančního Ramana a SERS (koncentrace DOX  $5 \cdot 10^{-4}$  a  $5 \cdot 10^{-8}$  M). Komplexy mezi DOX a DNA izolovaným z telecího brzlíku byly připraveny stejným způsobem pro analýzu v RR a viditelném SERS spektru. Data ukazují, že absorpce léčivo - DNA komplexu po absorpci na koloid Ag, nezpůsobily zjizvitelné odchylky molekulárních interakcí uvnitř komplexu. Analýza spekter micro FT-SERS ukázala drobné odchylky od získaných spekter viditelného SERS. Tyto odlišnosti se týkají relativního zvýšení některých vibračních módů, které nemohou být pozorovány, když je použita rezonanční excitace. Metoda FT-SERS umožňuje získat další informace a odhalit dodatečné detaily o geometrii interakcí léčivo-DNA. Analýza spekter doxorubicinu a jeho komplexu s DNA metodou FT-SERS nepotvrdila pouze model interakcí navržených pokud byly použity metody

RR a SERS, ale přinesla i nové informace, speciálně o vibracích A kruhu molekuly, které jsou obvykle ve viditelném SERS spektru maskovány vibracemi dominantních B a C kruhů.

Mnoho léčiv vykazuje protitumorovou aktivitu. Tato jejich biologická vlastnost byla vysvětlována vlivem interkalace komplexů (chromofor) mezi páry bazí DNA. Změny v celkové struktuře komplexu léčivo-DNA poskytovaly vysvětlení změn v klinické aktivitě léků. Bylo provedeno mnoho studií k objasnění interkalačního mechanismu DOX-DNA. V následujícím textu byly uvedeny výsledky a diskutovány techniky umožňující selektivní studium molekulárních interakcí bez komplikovaných supramolekulárních komplexů. RS umožňuje selektivně popsat změny probíhající v biomolekulách, které jsou pro ně charakteristické („otisk prstu“). Zvláště RR spektroskopie může být použita, protože její selektivita dovoluje pozorování pásů korespondujících pouze s vibracemi chromoforu a její citlivost dovoluje monitorování struktury komplexu léčivo-DNA.

Zaznamenat kvalitní Ramanova spektra je obvykle poměrně náročné, protože mnohé komplexy silně fluoreskují. SERS bývá použita jako efektivní metoda k získání informací z fluoreskujících chromoforů. V důsledku adsorpce molekuly na povrch Ag koloidu dochází v mnoha případech ke zhášení fluorescence a je tedy možné zaznamenat Ramanova spektra. Byla publikována data, která demonstrují, že interakce s kovovým povrchem v hydrosolu jsou velmi jemné a adsorpce na jeho povrch neruší nativní strukturu molekul, respektive jejich komplexů se studovanými léčivy.

### **2.7.1 Srovnání studií doxorubicinu a jeho interakcí s DNA použitím FT SERS, rezonančního Ramana a SERRS [28]**

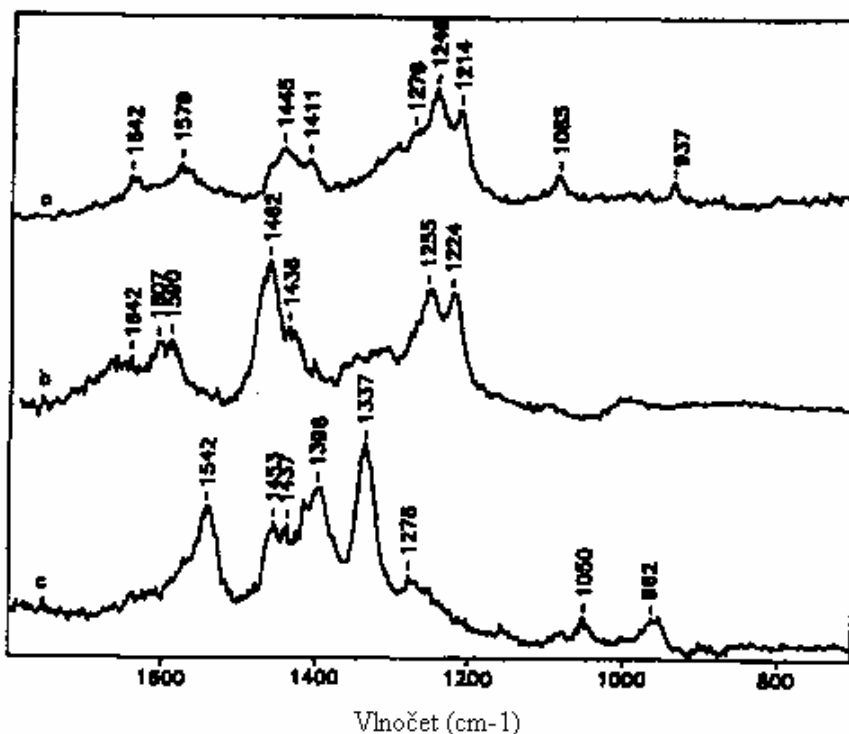
SERS spektra doxorubicinu byla zaznamenána při koncentraci  $5 \cdot 10^{-8}$  M. Srovnání tohoto spektra s RR spektrem ukazuje vysoké přispění fluorescenčního pozadí pro RR spektrum a silné zhášení fluorescence v SERS spektru. Adsorpce léčiv na povrchu Ag koloidu nenavodila pozorovatelné změny ve struktuře molekul. Proto změny pozorované v SERS spektrech DOX-DNA komplexů odpovídají interakcím léčiva s dvoušroubovicí DNA.

Spektra v této studii byla měřena v Ag koloidu, ve vodě a v  $D_2O$ . Pokud zkoumaná látka obsahuje disociovatelné skupiny (např.  $H^+$ ) dochází k jejich záměně za  $D^+$ . Tato skutečnost se projeví výrazným posunem příslušného pásu ve spektru.

Protože vibrace kruhového skeletu doxorubicinu a  $-OH$  a  $C=O$  skupin významně přispívají k SERS spektru DOX, analýza efektu deuterace může pomoci k zhodnocení míry spojení mezi valenčními vibracemi kruhu chromoforu a deformačními vibracemi  $C=O$ ,  $C-O$  a  $-OH$ . Na obrázku č. 10 je uvedeno viditelné SERS (b,c) a mikro FT-SERS(a) spektra volného DOX ve vodném roztoku (a,b) a v roztoku  $D_2O$ (c). Na základě analýzy těchto dat, pás  $1642\text{ cm}^{-1}$  může být přiřazen deformačním vibracím skupin  $C=O$  (kruhu B), která je vodíkovou vazbou spojena s hydroxylovou skupinou. Ve viditelné oblasti, je tento pás velmi slabý a  $D_2O$  není vůbec pozorován. Navíc je celkem intenzivní v NIR. Pozice pásu  $C-OH$ , který tvoří chelát s  $C=O$  ve spojení s valenční vibrací  $C=C$  kruhu je  $1590\text{ cm}^{-1}$  a  $1579\text{ cm}^{-1}$  pro viditelnou a NIR excitaci. V  $D_2O$  je tento pás v oblasti nižší než  $1542\text{ cm}^{-1}$ .

Ramanovy pásy v oblastech  $1462 - 1436\text{ cm}^{-1}$  jsou odrazem valenčních vibrací  $C=C$  a  $C-C$  aromatického kruhu. Tyto pásy jsou mírně posunuty po deuteraci fenolických hydroxylových skupiny, což indikuje vzájemné ovlivňování deformačních vibrací  $C=O \cdots H$  skupin. V NIR je tato oblast posunuta do oblasti  $1445 - 1411\text{ cm}^{-1}$ . Skupina pásů v oblasti  $1200-1300\text{ cm}^{-1}$  je připisována vibracím zahrnujícím módy deformačních vibrací v rovině  $C-O$ ,  $C-O-H$  a  $C-H$ . Tyto pásy úplně zmizely v  $D_2O$ . Při nižších vlnočtech, ve viditelném SERS pás  $477\text{ cm}^{-1}$  není

rušen v D<sub>2</sub>O. Interpretace NIR pásu v oblasti pod 600 cm<sup>-1</sup> není známa. Srovnání mezi spektrem molekuly volného doxorubicinu ve viditelné a NIR excitaci ukazuje rozdílné intenzity v oblasti 1610-1400 cm<sup>-1</sup> (vibrace odpovídající fenolovému kruhu B a C chromoforu). Pás 1462 cm<sup>-1</sup> je velmi intenzivní při nerezonančních podmínkách. Tyto podmínky znamenají, že vlnová délka použitého laseru je výrazně vzdálená absorpčnímu maximu doxorubicinu.



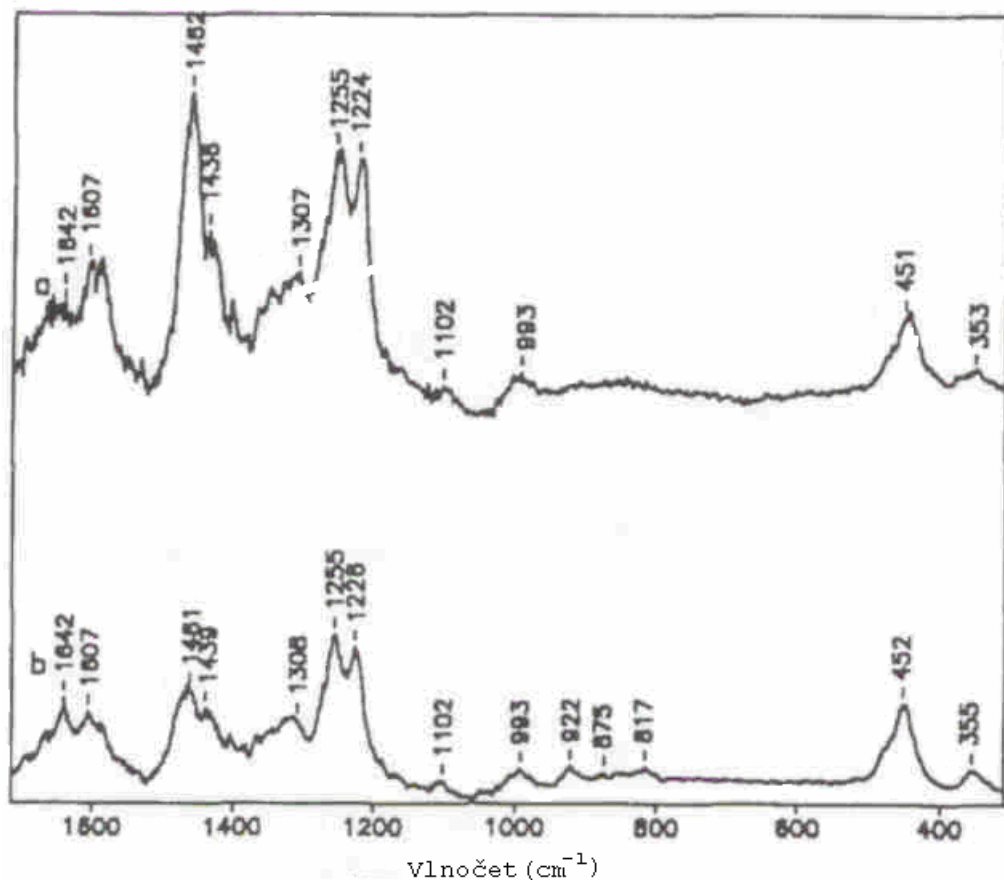
**Obrázek č. 50 – Spektra SERS (b,c); mikro FT SERS (a) doxorubicínu v H<sub>2</sub>O – a,b; v D<sub>2</sub>O – c**

spektrum (a): excitace 1064 nm, koncentrace DOX 10<sup>-5</sup> M

spektra (b) a (c): excitace 514,5 nm, koncentrace DOX 5 · 10<sup>-6</sup> a 5 · 10<sup>-8</sup> M

Biologická aktivita molekuly DOX je přisuzována vzniku komplexu mezi chromoforem a páry bázi DNA. Srovnání mezi SERS spektrem volného DOXu a jeho komplexu s DNA ve viditelné oblasti ukazuje ztrátu intenzity spolu se snížením některých pásů ve spektru komplexu. Na obrázku č. 11 ve spektru - b intenzity pásů 1226 cm<sup>-1</sup> a 1255 cm<sup>-1</sup> (oblast odpovídající deformačním vibracím  $\nu$  (C-O) +  $\delta$  (C-O-H) +  $\delta$  (C-H)) a pás 1461 cm<sup>-1</sup> (valenční vibrace skeletálního kruhu spojené s vibrací C-O-H) jsou velmi sníženy. Protože vibrace jsou charakteristické pro kruhy B a C chromoforu, je průkazné, že zde nastává interkalace mezi báze dvojité šroubovice DNA, tím je částečně zabráněno jejich další absorpci na povrch Ag koloidu, vzniku intenzivních pásů ve spektru. Další důležité pozorování je, že pás 1642 cm<sup>-1</sup> (C=O··H vodíková vazba) má asi o 25 % větší intenzitu než ve spektru samotného DOX (spektrum a). Z výše uvedeného je zřejmé, že 1/2 molekuly je interkalována a druhá 1/2 je stále vně helixu. Další pásy ve spektru nejsou výrazně změněny. SERS data korespondují dobře s výsledky X-ray a demonstrují interkalaci postranních C-OH skupin a kruhů B a C chromoforu uvnitř dvojitého helixu DNA, kruh A zůstává přístupný pro absorpci

na povrch koloidu. Tato geometrie může vést k snížení intenzity pásů C-O-H dohromady s pásy, které náleží vibracím silných vazeb kruhu s vibracemi exogenních skupin.



**Obrázek č. 11 – SERS spektra doxorubicinu (a); komplexu DOX-DNA (b)**

Poměr 1 molekuly léku ku 750 párům bází DNA

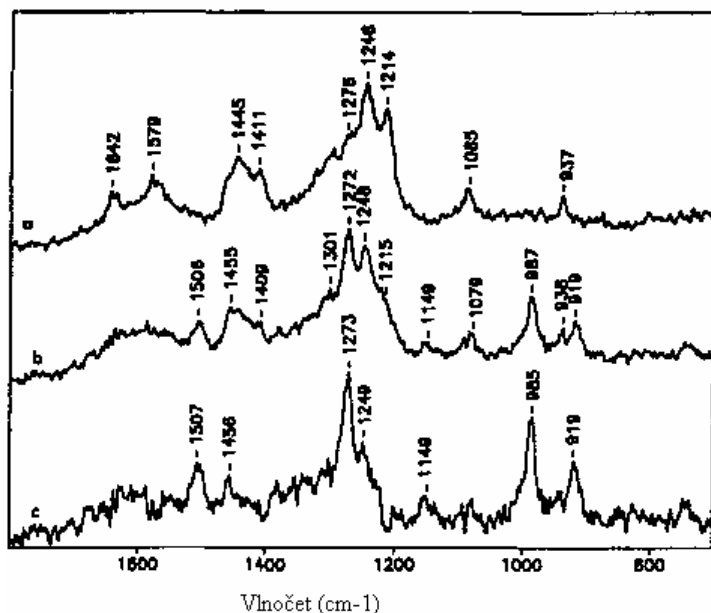
Koncentrace doxorubicinu je  $5 \cdot 10^{-8}$  M (a) a  $8 \cdot 10^{-8}$  M (b)

V NIR, FT SERS spektrech látek, při použití laseru s vlnovou délkou výrazně vzdálenou od absorpčního maxima doxorubicinu (1064 nm) dochází k relativnímu zvýšení některých vibrací (pocházejících z kruhu A). Micro-FT SERS spektra volného DOX o koncentraci  $10^{-5}$  M a jeho komplexu s DNA izolované z telecího brzlíku (při poměru 1 molekula léčiva:1 páru bází DNA) byly zaznamenány a jsou uvedeny v obr.č. 12 (a,b). Díky vysokému poměru je příspěvek volného DOXu ve spektru komplexu velmi intenzivní. Proto je odečteno spektrum DOX-DNA komplexu od spektra volného DOX, aby bylo získáno spektrum pouze komplexu. Srovnáním spektra volného DOX s diferenčním spektrem (odpovídajícím pouze komplexu DOX-DNA) jsou odhaleny posuny vlnočtů a změny intenzit některých pásů (obr.č. 12 c). Tyto rozdíly jsou popsány níže.

- Interakce DOX s DNA se projevuje vznikem nového pásu v oblasti  $1273 \text{ cm}^{-1}$ . Ten odpovídá valenční vibrace kruhu s  $\nu(\text{C-O})$  kruhu A, který není interkalován do DNA. Tento pás není výrazný ve spektru komplexu DOX-DNA ve viditelné oblasti, protože další pásy chromoforu jsou intenzivnější v podmínkách nerezonančního SERS. V roztoku  $\text{D}_2\text{O}$  se jeví pás málo intenzivní, protože pásy chromoforu jsou také méně intenzivní.



- Dodatečný pás se objevuje v oblasti okolo  $1507\text{ cm}^{-1}$ , to odpovídá vibraci C=C kruhu A
- Další pás vzniká v oblasti okolo  $985\text{ cm}^{-1}$ , to odpovídá vibraci C-C kruhu A
- Pás  $1642\text{ cm}^{-1}$  (náležící vodíkové vazbě C=O) je velmi slabý při komplexaci
- Je pozorována ztráta intenzit pásů  $1214$  a  $1246\text{ cm}^{-1}$ , náleží vibracím zahrnujícím deformační vibrace C-O, C-O-H a C-H v rovině. To potvrzuje interkalaci kruhů B a C do helixu



**Obrázek č. 12– Spektra mikro FT SERS doxorubicinu (a); komplexu DOX-DNA (b); jejich rozdílu (c = a – b)**

Koncentrace doxorubicinu  $10^{-5}\text{ M}$

Poměr 1 molekuly DOX ku 1 párů bází DNA

Mikro-FT SERS s NIR excitací se ukázal jako vhodné pro výzkum molekulárních interakcí volných léčiv i jejich komplexů s DNA. Analýza FT SERS spektra doxorubicinu a komplexu DOX-DNA potvrdila model interakce navržený na základě RR a SERS ve viditelné oblasti a doplnila jej o další informace, hlavně o vibracích kruhu A molekuly doxorubicinu, které jsou maskovány ve spektru SERS silnějšími vibracemi kruhu B a C při excitaci  $514,5\text{ nm}$ . SERS spektra DOX zaznamenané po absorpci na Ag koloid jsou identické s odpovídajícími RR spektry.

FT SERS data doplňují informace získané pomocí viditelné RR a SERS techniky a umožňují kompletní vysvětlení interakcí léčivo-DNA. FT SERS spektra léčiv při použití laseru s vlnovou délkou vzdálenou absorpčnímu maximu při excitaci  $1064\text{ nm}$  vykazují relativní zvýšení intenzit některých vibrací, které nemohou být zaznamenávány, když je použita rezonanční excitace. Navíc použitím NIR excitace je skoro odstraněn problém s fluorescencí a fotochemickým rozkladem přidruženým k biologickým vzorkům.

Díky absenci zjistitelných odchylek molekulárních interakcí nízkomolekulárních komponentů a jejich cílů, když jsou adsorbovány na povrch Ag koloidu, je tato technika využívána při studiu léčiv uvnitř žijících buněk [28].

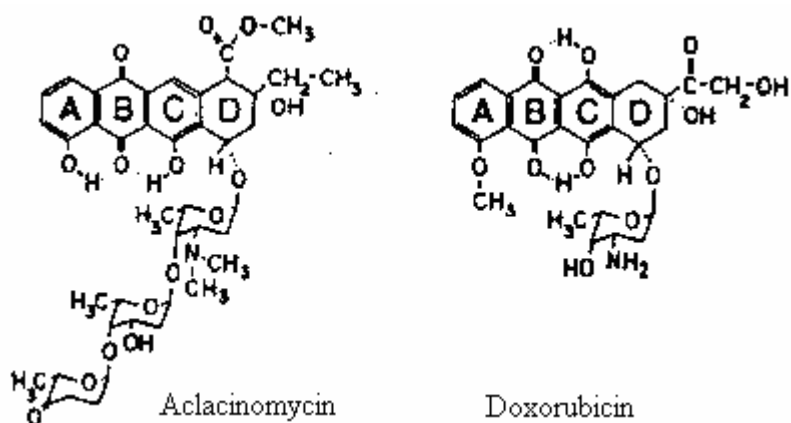
## 2.7.2 Srovnávací studie aclacinomycinu versus doxorubicinu použitím rezonanční Ramanovy spektroskopie [29]

V další studii bylo provedeno srovnání aclacinomycinu a doxorubicinu a jejich komplexů s DNA. Oba komplexy byly studovány použitím rezonanční Ramanovy spektroskopie.

Aclacinomycin a doxorubicin patří do stejné skupiny antracyklinových antibiotik. První obsahuje 1,8-dihydroxyantrachinon a druhý 1,4-dihydroxyantrachinon (obr.č. 13). Jejich studie rozličnými technikami (např. RR, SERRS, FTIR, NMR..) potvrdily interkalaci chromoforového kruhu mezi C-G nebo G-C sekvence (u doxorubicinu) a do sekvence A-T (u aclacinomycinu)

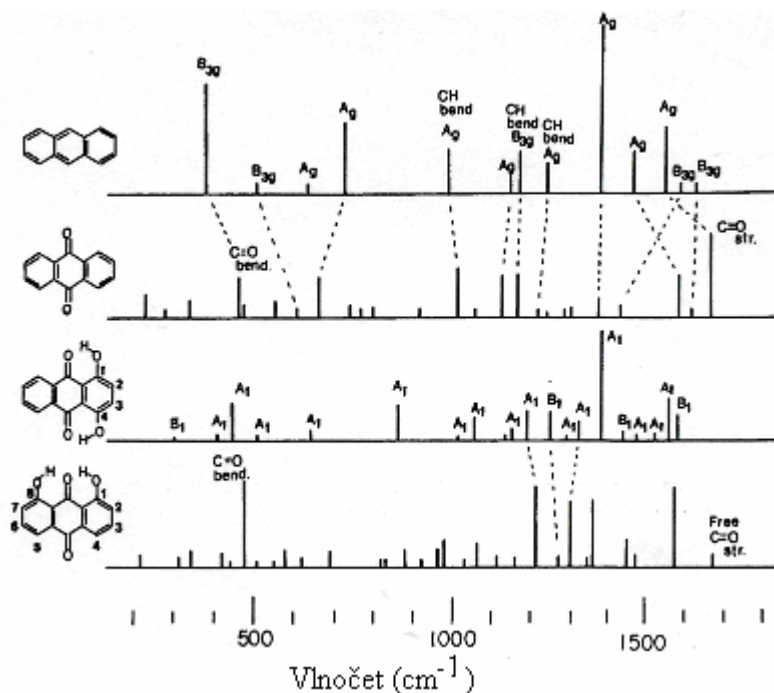
Rezonanční Ramanova spektroskopie doxorubicinu a aclaciomycinu v této studii byla provedena ve vodném roztoku a v roztoku D<sub>2</sub>O.

Všechny odlišnosti ve spektru a sekvenčních specifikacích jsou vysvětleny na základě molekulární struktury chromoforů. 2 OH skupiny u doxorubicinu jsou vázány vodíkovou vazbou k odlišným C=O skupinám, zatímco u aclacinomycinu jsou 2 OH skupiny vázány vodíkovou vazbou s tou samou C=O skupinou. Další C=O skupin a zůstává volná pro další intramolekulární vodíkovou vazbu.



Obrázek č. 13 – Vzorce aclacinomycinu a doxorubicinu

Byly také studovány roztoky 1,4-dihydroxyantrachinonu 1,4-(OH)<sub>2</sub>AQ a 1,8-dihydroxyantrachinonu 1,8-(OH)<sub>2</sub>AQ Tyto látky představují zjednodušené modely doxorubicinu a aclacinomycinu. Na obrázku č. 14 jsou uvedeny vlnočty a intenzity Ramanových pásů anthracenu, antrachinonu a dihydroxyantrachinonu.[29]



**Obrázek č. 16 – Vlnočty, relativní intenzity pásů antracenu, antrachinonu a 1,4-dihydroxyantrachinonu, 1,8-dihydroxiantrachinonu**

Antracenu a antrachinonu excitace při 632,8 nm

1,4-dihydroxiantrachinonu a 1,8-dihydroxiantrachinonu excitace při 457,9 nm

Módy vibrací antracenu ( $D_{2h}$ ) jsou velmi známé a mnoho Ramanových pásů antrachinonu (také mají  $D_{2h}$  symetrii) koreluje s některými z nich. Silný pás  $1675\text{ cm}^{-1}$  antrachinonu je přiřaditelný valenčním vibracím karbonylu v rovině a pás  $785\text{ cm}^{-1}$  deformačním vibracím, ve kterém jsou 2 karbonyly centrosymetrické. Korespondující Ramanovy pásy benzochinonu byly nalezeny v  $1686$  a  $476\text{ cm}^{-1}$ . Dýchací vibrace kruhu jsou lokalizované v oblasti  $754\text{ cm}^{-1}$  (pro antracenu) a v oblasti  $683\text{ cm}^{-1}$  (pro antrachinonu).

Oba 1,4-(OH)<sub>2</sub>AQ a 1,8-(OH)<sub>2</sub>AQ patří k symetrii  $C_{2v}$ . Jejich osy  $C_2$  jsou však odlišné, podél dlouhé osy molekuly pro 1,4-(OH)<sub>2</sub>AQ, kdežto kolmo k dlouhé ose v 1,8-(OH)<sub>2</sub>AQ. Proto vibrace  $A_1$  druhu dávají růst většině silných Ramanových pásů prvního, druhý může mít velmi odlišné módy. Rozdělení intenzivních Ramanových pásů ve spektru bylo odlišné pro 1,4-(OH)<sub>2</sub>AQ a 1,8-(OH)<sub>2</sub>AQ. 1,4-(OH)<sub>2</sub>AQ dává silný pás v oblasti  $1445\text{ cm}^{-1}$ , který patří okrajovým valenčním vibracím, a další silný pás v oblasti  $876\text{ cm}^{-1}$ , který pravděpodobně náleží vibracím dýchacího kruhu. V 1,8-(OH)<sub>2</sub>AQ je dolní pás prominentní a Ramanovy intenzity jsou distribuovány mezi několika pásů lokalizovaných okolo 2 zmíněných vlnočtů. 1,8-(OH)<sub>2</sub>AQ má karbonylovou skupinu, která je volná z intramolekulárních vodíkových vazeb a tím dává valenční vibrace karbonylu v oblasti  $1674\text{ cm}^{-1}$ . Stejně tak chybí pás v 1,4-(OH)<sub>2</sub>AQ, jako chybí volná karboxylová skupina. 1,8-(OH)<sub>2</sub>AQ dává intenzivní pás okolo  $484\text{ cm}^{-1}$  odpovídající deformačním vibracím karbonylu v rovině, tento vlnočet je ve vyšších hodnotách kmitočtů než u prvního ( $459\text{ cm}^{-1}$ ) 1,4-(OH)<sub>2</sub>AQ. Popsané silné Ramanovy pásy antracenu a antrachinonu v oblasti  $1000 - 2000\text{ cm}^{-1}$  (přiřazené několika vazebným módům valenčním vibracím kruhu a CH deformačním vibracím v rovině) jsou posunuty do vyšších vlnočtů, do oblasti  $1200 - 1300\text{ cm}^{-1}$  pro 1,4-(OH)<sub>2</sub>AQ a 1,8-(OH)<sub>2</sub>AQ pravděpodobně následkem vazeb s OH v rovině a C-O valenčním vibracím.

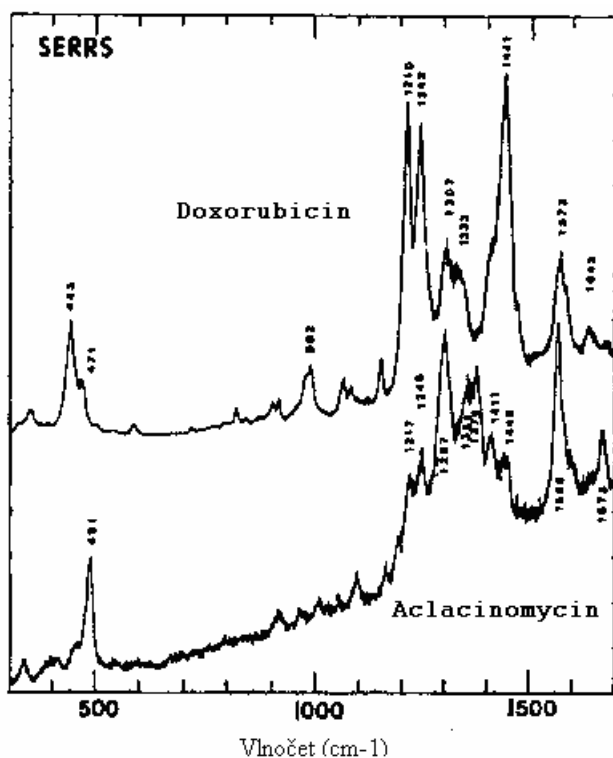
Mnoho pásů Ramanova spektra nalezených v 1,4-(OH)<sub>2</sub>AQ a 1,8-(OH)<sub>2</sub>AQ je možno nalézt také ve spektrech doxorubicinu a aclacinomycinu:

1. Ve spektru doxorubicinu se vyskytují intenzivní pásy v oblastech okolo 1442 a 996 cm<sup>-1</sup>, které ve spektru aclacinomycinu nejsou
  2. Ve spektru aclacinomycinu je pás valenčních vibrací C-O v oblasti 1674 cm<sup>-1</sup>, zatímco spektrum doxorubicinu ho nemá
  3. Pás deformačních vibrací karbonylu v rovině je lokalizován při značně vyšším vlnočtu (492 cm<sup>-1</sup>) u aclacinomycinu než u doxorubicinu (440-465 cm<sup>-1</sup>)
  4. V obou spektrech doxorubicinu i aclacinomycinu jsou 3 Ramanovy pásy v oblasti 1200-1300 cm<sup>-1</sup>, které náleží deformačním vibracím COH v rovině aromatického kruhu
- Vlnočty prominentních Ramanových pásů jsou uvedeny v tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2 – Vlnočty spekter doxorubicinu a aclacinomycinu**

Vibrační vlnočty hlavních pásů doxorubicinu a aclacinomycinu						
doxorubicin			aclacinomycin			přiřazení
v H <sub>2</sub> O	SERRS	v D <sub>2</sub> O	v H <sub>2</sub> O	SERRS	v D <sub>2</sub> O	
436	443	428	492	491	485	C=O deformační vibrace v rovině dýchací kruh
444		444				
465	471	460				
996	992	960				O-H deformační vibrace v rovině spojené s C-O valenčními vibracemi
1213	1210		1217	1217		
1244	1242		1249	1246		
1303	1307		1303	1297		
1341	1333	1336	1351	1351		valenční vibrace skeletárního kruhu s C-O-H deformačními vibracemi
			1372	1374	1365	
1442	1441	1416	1413	1411	1409	
		1462	1454	1449	1446	
1580	1573	1542	1568	1565	1537	
1645	1642	1592	1610		1592	
			1674	1673	1671	C=O valenční vibrace

Obrázek č. 15 ukazuje SERRS spektra doxorubicinu a aclacinomycinu excitované při 488 nm a 457,9 nm. Obě spektra nejsou komplikována fluorescencí a byly pozorovány ostré a dobře vysvětlitelné Ramanovy pásy v celé oblasti mezi 300 až 1700 cm<sup>-1</sup>. Tato spektra byla získána proměřením roztoku který byl 100x zředěnější než při měření „roztokových“ R spekter obr.č. 16. SERRS spektrum aclacinomycinu je také podobné 11-deoxycarminomycinu, který má ten samý chromofor jako aclinomycin.



**Obrázek č. 17 – SERRS spektra doxorubicinu a aclacinomycinu**

Koncentrace doxorubicinu a aclacinomycinu byla  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M

Z výše uvedené tabulky je vidět, že hlavní rysy spektra zůstávají převážně nezměněny při přechodu z vodného roztoku na povrch Ag koloidu, pro doxorubicin i aclacinomycin. Jak je vidět všechny vlnočty valenčních vibrací aromatického kruhu (včetně vlnočtu dýchacího kruhu doxorubicinu) vykazují posun k nižším hodnotám vlnočtů při adsorpci na povrch Ag koloidu. Vlnočet valenčních vibrací volného karbonylu se posunul níž pouze nepatrně. Ramanovy pásy souvisejících s intermolekulárními vodíkovými vazbami obou léčiv ukazují významné změny. Ve spektru doxorubicinu se pás  $1303 \text{ cm}^{-1}$  posunul do pozice  $1307 \text{ cm}^{-1}$  (to je nárůst o  $4 \text{ cm}^{-1}$ ), kdežto odpovídající pás  $1303 \text{ cm}^{-1}$  ve spektru aclacinomycinu se posunul k nižším hodnotám vlnočtů o  $6 \text{ cm}^{-1}$  (do  $1297 \text{ cm}^{-1}$ ) při přechodu z vodného roztoku na povrch Ag koloidu. U doxorubicinu se pás  $465 \text{ cm}^{-1}$  posunul do  $471 \text{ cm}^{-1}$ , zatímco u aclacinomycinu  $492 \text{ cm}^{-1}$  pás se posunul jen nepatrně do  $491 \text{ cm}^{-1}$ . Tento fakt naznačuje, že v doxorubicinu jsou některé valenční vibrace intramolekulárních vodíkových vazeb způsobeny interakcí s povrchem Ag koloidu, ale u aclacinomycinu žádné takové vibrace nebyly pozorovány, protože intramolekulární vodíkové vazby jsou lokalizovány pouze v některých místech systému antrachinového kruhu. Tato místa jsou pravděpodobně daleko od povrchu Ag koloidu.

### **Efekty interkalace do DNA**

RR spektra doxorubicinu a jeho komplexu s DNA byly studovány v mnoha laboratořích. Byla provedena kompletní studie zahrnující selektivní zvýšení DNA vibrací při použití excitace  $363,8 \text{ nm}$ . Bylo zjištěno, že interkalace do DNA vyvolává hypochromí efekt, jak u vibrací chromoforu ( $1444, 1306, 1246, 1214, 996$  a  $466 \text{ cm}^{-1}$ ), tak u vibrací DNA ( $1018, 835, 786$  a  $682 \text{ cm}^{-1}$ ). Protože poslední dva pásy přísluší C a G bázím jejich hypochromicita byla

interpretována jako indikátor interkalace do polohy C-G. Na druhou stranu hypochromicita dvou pásů ( $1018$  a  $835\text{ cm}^{-1}$ ) způsobená vibracemi cukr-fosfátové kostry byla přisuzována lokální interakci mezi doxorubicinem a páteří DNA. Přídavek velkého přebytku dvoušroubovice DNA (20-ti násobek v koncentraci bp), se projevuje ve spektru DOX následujícím způsobem:

1. Dochází k zhášení fluorescence, strmý nárůst v oblasti  $<1700\text{ cm}^{-1}$  zmizel přidáním DNA
2. Intenzivní pás v oblasti okolo  $1442\text{ cm}^{-1}$  se rozštěpil na 2 -  $1432\text{ cm}^{-1}$  a  $1450\text{ cm}^{-1}$
3. Pík s maximem při  $440\text{ cm}^{-1}$  se posunul k  $450\text{ cm}^{-1}$

Body (2) a (3) byly popsány již dříve, nebylo však řečeno nic o původu těchto nových pásů. Spektrální změny uvedené v bodě (2), posun dvou pásů  $1416$  a  $1442\text{ cm}^{-1}$  k vyšším vlnočtům k  $1432$  a  $1450\text{ cm}^{-1}$ , byly interpretovány jako výsledek interkalace, lokalizované interakce mezi DNA páry bází a jedním z aromatických kruhů doxorubicinu. Není ale jasné, zda je tato specifická interakce odpovědná také za velký posun k vyšším vlnočtům (až o  $17\text{ cm}^{-1}$ ) a zvýšení intenzity pásu při  $1416\text{ cm}^{-1}$ . Analýza krystalové struktury komplexu daunomycinu - d(CGTACG) neposkytuje údaje pro takovouto lokalizovanou interakci. Je také možné, že změny uvedené v bodech (2) a (3) jsou nezávislé. Kombinace pásů  $450 + 996 = 1442\text{ cm}^{-1}$  může být důsledkem Fermiho rezonance. V žádném případě rozštěpení pásu  $1442\text{ cm}^{-1}$  pásu nemůže být využito k diagnose interkalace doxorubicinu do DNA. U dalších prominentních Ramanových pásů doxorubicinu nedochází při interakci s DNA k značným posunům ( $<2\text{ cm}^{-1}$ ) viz. tab.č. 3. Tři pásy spojené deformačními vibracemi COH v rovině jsou posunuty velmi málo ( $1303 \rightarrow 1304$ ,  $1244 \rightarrow 1244$  a  $1213 \rightarrow 1215\text{ cm}^{-1}$ ).

V kontrastu k doxorubicinu se mnoho Ramanových pásů ve spektru aclacinomycinu v oblasti okolo  $1200 - 1700\text{ cm}^{-1}$  se významně posunulo po navázání k DNA. Za prvé volný C=O pás valenčních vibrací  $1664$  byl ve vodě posunut do  $1667\text{ cm}^{-1}$  a  $1671$  k  $1666\text{ cm}^{-1}$  v  $\text{D}_2\text{O}$ . To znamená, že volná C=O skupina je zdatelně rušena interakcí s funkčními skupinami DNA. Byly pozorovány následující posuny:

$1568 \rightarrow 1565$ ,  $1454 \rightarrow 1451$ ,  $1413 \rightarrow 1415$ ,  $1372 \rightarrow 1374$  a  $1351 \rightarrow 1349\text{ cm}^{-1}$  v  $\text{H}_2\text{O}$   
 $1592 \rightarrow 1590$ ,  $1537 \rightarrow 1532$ ,  $1446 \rightarrow 1444$ ,  $1409 \rightarrow 1408$  a  $1365 \rightarrow 1368\text{ cm}^{-1}$  v  $\text{D}_2\text{O}$

Tyto výsledky naznačují, že pásy valenčních vibrací silových konstant jsou obvykle posunuty směrem k nižším vlnočtům jako následek nepatrného množství elektron transferu z DNA bází  $\pi$ -orbitalu do antivazebného  $\pi^*$  orbitalu aclacinomycinového chromoforu. Další významné posuny jsou pozorovány pro vlnočty deformačních vibrací C-O-H v rovině pro aclacinomycin ( $1303 \rightarrow 1295\text{ cm}^{-1}$ ). Ve spektru aclacinomycinu slabení je způsobeno pravděpodobně interkalací volné intermolekulární vodíkové vazby, která se u doxorubicinu nevyskytuje. 2 OH skupiny v aclacinomycinu tvoří vodíkové vazby s tou samou C=O skupinou, kdežto v doxorubicinu 2 OH skupiny jsou vázány vodíkovou vazbou s odlišnými C=O skupinami. Systém intramolekulárních vodíkových vazeb je slabší v aclycinomycinu než v doxorubicinu.

**Tabulka č. 3 – Vlnočty spekter doxorubicinu a aclacinomycinu v komplexu s DNA**

Efekt navázání DNA na doxorubicin a aclacinomycin							
doxorubicin				aclacinomycin			
v H <sub>2</sub> O		v D <sub>2</sub> O		v H <sub>2</sub> O		v D <sub>2</sub> O	
bez DNA	s DNA	bez DNA	s DNA	bez DNA	s DNA	bez DNA	s DNA
436	436	428	428				
444	450	444	443	492	491	485	484
465	464	460	459				
996	994	960	959				
1213	1215			1217	1215		
1244	1244			1249	1249		
1303	1304			1303	1295		
1341	1341	1336	1337	1351	1349		
				1372	1374	1365	1368
1442	1432	1416	1416	1413	1415	1409	1408
	1450						
		1462	1462	1454	1451	1446	1444
1580	1579	1542	1543	1568	1565	1537	1532
1645	1639	1592	1581	1610	1607	1592	1590
				1674	1667	1671	1666

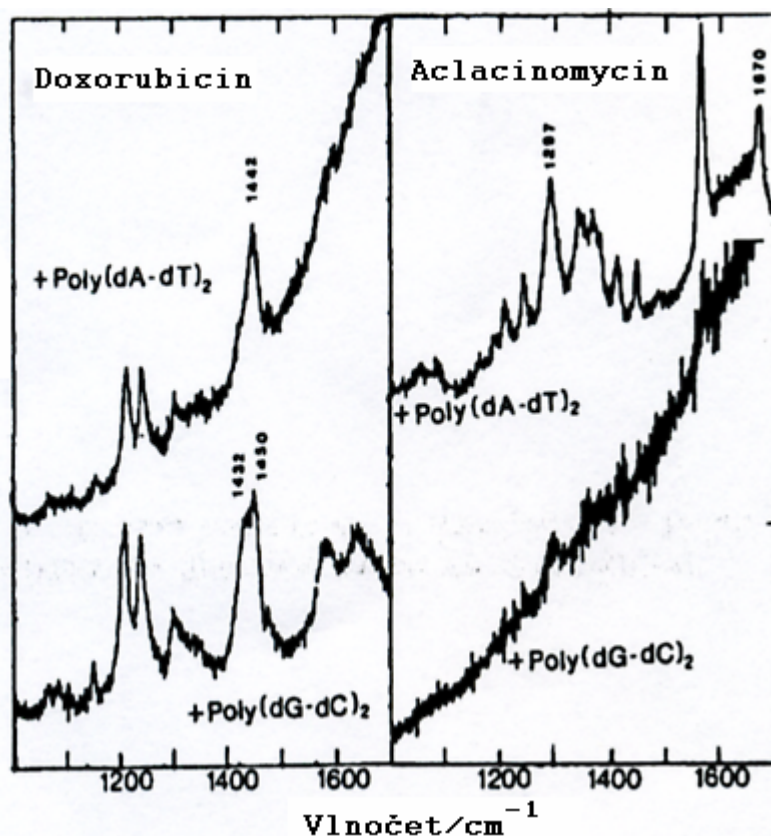
Nízký vlnočt Ramanova pásu 492 cm<sup>-1</sup> aclacinomycinu je posunut nepatrně k nižším vlnočtům (491 cm<sup>-1</sup>) v kontrastu k pásu 440 cm<sup>-1</sup> doxorubicinu, který je posunut k vyšším vlnočtům (450 cm<sup>-1</sup>). To naznačuje, že se v doxorubicinu jedna hydrogenová intramolekulární vazba stává silnější, kdežto u aclacinomycinu se stává slabší při přenesení do DNA bází.

U obou aclacinomycinu i doxorubicinu zmizelo fluorescenční pozadí ve vysokých vlnočtech konce spektra zmizelo po navázání DNA.

Byl také provedeno sledování komplexu léčivo-DNA pomocí SERRS. Kde roztok doxorubicin-DNA v molárním poměru 1:20 byl přidán do Ag koloidu. SERRS bylo zřetelně pozorováno. Jeho intenzity jsou však mnohem nižší než byly nalezeny bez DNA a všechny Ramanovy vlnočty byly identifikovány jak s tak i bez DNA. Navíc nárůstem koncentrace DNA intenzita pásů v SERRS slábnou, a když se molární poměr změní na 1:100 SERRS spektra zcela zmizí.

### **Vliv sekvence DNA na interakci s DOX a aclacinomycinem**

Na obrázku č. 16 jsou Ramanova spektra komplexu: doxorubicin + poly d(A-T) · poly d(A-T) a doxorubicinu + poly d(G-C) · poly d(G-C), aclacinomycin + poly d(A-T) · poly d(A-T) a aclacinomycin + poly d(G-C).poly d(G-C). Fluorescenční pozadí doxorubicinu (pozadí spektra roste v oblasti vyšších vlnočtů), je významné pro poly d(A-T) spektrum a je zhaseno pro poly d(G-C) spektrum, zatímco u aclacinomycinu je to přesně naopak. Tyto výsledky naznačují, že doxorubicin se váže převážně do oblasti G-C sekvencí a aclacinomycin naopak do oblasti A-T sekvencí.



**Obrázek č. 16 – Ramanova spektra komplexů doxorubicinu a aclacinomycinu s poly(dA-dT)<sub>2</sub> a s poly(dG-dC)<sub>2</sub>**

Doxorubicin: excitace 457,9 nm, koncentrace  $10^{-4}$  M

Aclacinomycin: excitace 406,7 nm, koncentrace  $5 \cdot 10^{-4}$  M.

Ve spektru doxorubicinu se intenzivní pás v oblasti  $1442 \text{ cm}^{-1}$  rozštěpí na 2 při interakci s poly d(G-C)<sub>2</sub>, zůstane 1 při interakci s poly d(A-T)<sub>2</sub>. V nižších vlnocetech jsou pozorovány reprodukovatelnosti mezi doxorubicinem + poly d(A-T)<sub>2</sub> a doxorubicinem + poly d(G-C)<sub>2</sub>. Ve spektrech komplexů léčiv na obrázku č. 16 je pás okolo  $440 \text{ cm}^{-1}$  méně ostrý pro poly d(G-C)<sub>2</sub> než pro poly d(A-T)<sub>2</sub>. To může indikovat že pás okolo  $440 \text{ cm}^{-1}$  je více posunut k vyšším vlnocetům s poly d(G-C)<sub>2</sub> než s poly d(A-T)<sub>2</sub>. Ve spektru aclacinomycinu je pás valenčních vibrací C=O v oblasti okolo  $1670 \text{ cm}^{-1}$  (namísto  $1674 \text{ cm}^{-1}$ ) a 1 z C-O-H deformačních vibrací v rovině je v oblasti okolo  $1297 \text{ cm}^{-1}$  (namísto  $1303 \text{ cm}^{-1}$ ) pro poly d(A-T)<sub>2</sub>. Pro poly d(G-C)<sub>2</sub> je intenzita fluorescence tak vysoká, že vlnocety těchto vibrací nemohou být přesně určeny. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že doxorubicin je interkalován do CpG sekvence a/nebo do GpC sekvence ale ne do TpA nebo ApT sekvence. Aclacinomycin má obrácenou selektivitu.

Na základě známé struktury a vazebných momentech je jasné, že chromofor doxorubicinu má síť dipolových momentů podél dlouhé osy, zatímco aclacinomycinový chromofor musí mít své dipolové momenty podél kolmice k dlouhé ose.

Jak bylo zmíněno na začátku aclacinomycinový chromofor má karbonylovou skupinu, která je volná z intramolekulárních vodíkových vazeb. Tato volná C=O skupina musí silně interagovat s funkčními skupinami DNA při chromoforové interkalaci do TpA polohy. Existuje podezření, že tato funkční skupina je amino-skupinou adeninu, a že tato interakce není možná v případě CpG sekvence. To také napovídá, že 1 deformační vibrace C-O-H



v rovině aclacinomycinu je rušena funkční skupinou DNA. To může být C=O skupina thiminu, která není zahrnuta do inter-base vodíkových vazeb C.G párů bází tak, že by nebyla přitahována žádnou skupinou OH léčiv. Tedy doxorubicin a aclacinomycin jsou velmi rozdílné ve způsobu navázání na DNA. Doxorubicinový chromofor je interkalován do polohy CpG a fixován pravděpodobně elektrostatickými a van der Waalsovými silami. To může způsobit jen malé změny v konstantách sil valenčních vibrací kruhu, ale značné změny v konstantách sil deformačních vibrací C=O. Na druhou stranu aclacinomycin je interkalován do polohy TpA a fixován pravděpodobně skrz slabé vodíkové vazby –like forces a změny transferních sil jsou způsobeny jeho volnými karbonyly a 1 hydroxylovou skupinou, jež značně ovlivňuje efekty silových konstant valenčních vibrací kruhu chromoforu. [29]

### 2.7.3 Srovnání spekter získaných pomocí SERRS: doxorubicinu, aclacinomycinu, 11-deoxycarminomycinu a jejich komplexů s DNA [29, 30]

Tabulka č. 4 – Vlnočty spekter doxorubicinu, 11-deoxycarminomycinu a aclacinomycinu [29, 30]

DOX [30]	DOX [29]	DCM [30]	Aclacinomycin [29]	přirazení
vlnočty (cm <sup>-1</sup> )				
824				skeletární deformace
879				skeletární deformace
918		923		skeletární deformace
960				deformační vibrace (C-H)
990	992	1013		dýchací kruh
		1028		deformační vibrace (C-H)
1066				deformační vibrace (C-H)
1082		1094		skeletární deformace
1118				valenční vibrace (C-OCH <sub>3</sub> )
		1159		deformační vibrace (C-H)
1152				deformační vibrace (C-H)
		1193		valenční vibrace (C-C)
1207	1210	1246	1217	deformační vibrace (C-O)
		1216		valenční vibrace kruhu
1241	1242	1289	1246	deformační vibrace (C-O)
1265		1260		valenční vibrace kruhu
1303	1307		1297	valenční vibrace (C-O)
1331	1333			valenční vibrace kruhu
1348		1344	1351	valenční vibrace kruhu
		1364	1374	valenční vibrace (C-O)
1409		1400		valenční vibrace kruhu
1442	1441	1455	1411	valenční vibrace kruhu
		1436	1449	valenční vibrace kruhu
1472				valenční vibrace kruhu
1572	1573	1560	1565	valenční vibrace kruhu
1586		1586		valenční vibrace kruhu
1638	1642	1633		valenční vibrace (C=O)
1676		1666	1673	valenční vibrace (C=O)

**Tabulka č. 5 – Vlnočty spekter komplexů DNA s doxorubicinem, 11-deoxycarminomycinem a aclacinomycinem [29, 30]**

DOX-DNA [30]	DOX-DNA [29]	DCM-DNA [30]	aclacinomycin-DNA[29]
918 w			
962 sh			
986 w	994 w		
		1028 w	
1089 w			
1151 w		1155 w	
		1203 w	
1210 s	1215 s	1245 m	1215 w
1238 s	1244 s	1284 s	1249 w
1263 sh		1260 s	
1305 w	1304 w		1295 s
1330 w	1338 w		1349 w
		1364 w	1374 w
1411 s		1399 sh	1415 m
	1432 s	1437 w	
1441 m	1450 s		1451 s
1468 sh			
1570 w	1579 m	1564 m	1565 w
1591 sh			1607 s
1636 w	1639 m	1636 m/w	
		1666 w	1667 m

s – velká intenzita píku  
m– střední intenzita píku  
w – slabá intenzita píku  
sh – shoulder(hřbet)

V tabulkách číslo 4 a 5 jsou srovnány výsledky více studií. Je zřejmé, že doxorubicin dává ve dvou odlišných studiích spektra s nepatrně odlišnými hodnotami vlnočtů. To může být způsobena odlišným spektrometrem a nastavením laseru.

Také je zřejmé, že aclacinomycin je svou strukturou i orientací na povrch Ag koloidu více podobný než DCM. Hodnoty vlnočtů jeho spektra jsou blízké hodnotám ze spekter doxorubicinu. Naopak DCM má vlnočty posunuty až o  $10 < \text{cm}^{-1}$ .

### **III. Praktická část**

#### **3.1. Cíl práce**

Cílem práce je získat SERRS spektra doxorubicinu, dalších léčiv a jejich komplexů s DNA. Mechanismus interkalace doxorubicinu do DNA se již delší dobu studuje, hledají se však nové účinnější léčiva.

V této studii jsou měřeny spektra celkem 4 látek a to doxorubicinu, jeho derivátu pyrazol-doxorubicinu, který je cca 100 x toxičtější. Další dvě studované látky označované jako N1-DOX a N2-DOX jsou komplexy v nichž je molekula doxorubicinu navázána na nosič.

### 3.2 Materiál

Všechny chemikálie byly p.a. čistoty. Při všech experimentech byla použita ultračistá deionizovaná voda.

Hydroxylamin hydrochlorid – firma Chemapol  
Hydroxid sodný – firma Chemapol  
Dusičnan stříbrný – firma Chemapol  
Síran hořečnatý – firma Chemapol  
Spermin – firma Sigma  
Doxorubicin – Sigma  
Pyrazol-doxorubicin – Makromolekulární chemie AVČR v.v.i  
N2-DOX – Makromolekulární chemie AVČR v.v.i  
N1-DOX – Makromolekulární chemie AVČR v.v.i  
Nosič – Makromolekulární chemie AVČR v.v.i

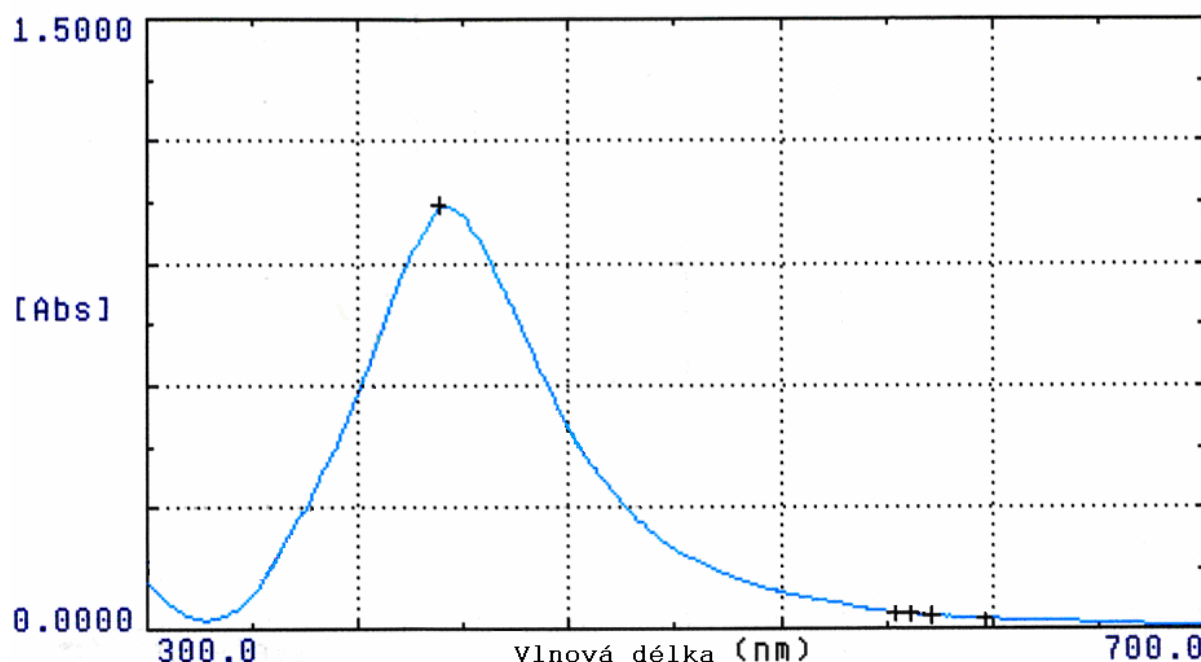
Roztoky DOX, PYR-DOX, N2-DOX, N1-DOX, nosič byly skladovány při teplotě 4 °C. Telecí thymová DNA (42 % G + C, střední molekulová hmotnost 20.000 kD) byla izolována a charakterizována dle postupu z článku - *Brabec, V., Paleček, E.* 1970: The influence of salts and pH on polarographic currents produced by denatured DNA, *Biophysik* 6, 290-300.

### 3.3 Příprava Ag koloidů

Ag koloid byl připraven podle navrženého postupu v práci Leopold, Lendl .

Bylo smícháno 5 ml (navážka 5,15 mg) hydroxylamin hydrochloridu a 5 ml (navážka 6 mg) hydroxidu sodného. K vzniklému roztoku bylo naráz přidáno 45 ml (navážka 8,48 mg) dusičnanu stříbrného. Koncentrace  $\text{Ag}^+$  v koloidu byla  $1,1 \cdot 10^{-2}$  M.

Takto připravený koloid je možné charakterizovat absorpčním spektrem v UV-VIS oblasti. Maximum absorpčního pásu koloidu je v 411 nm. Spektrum bylo zaznamenáno ihned po smíchání (viz. obrázek č. 17)



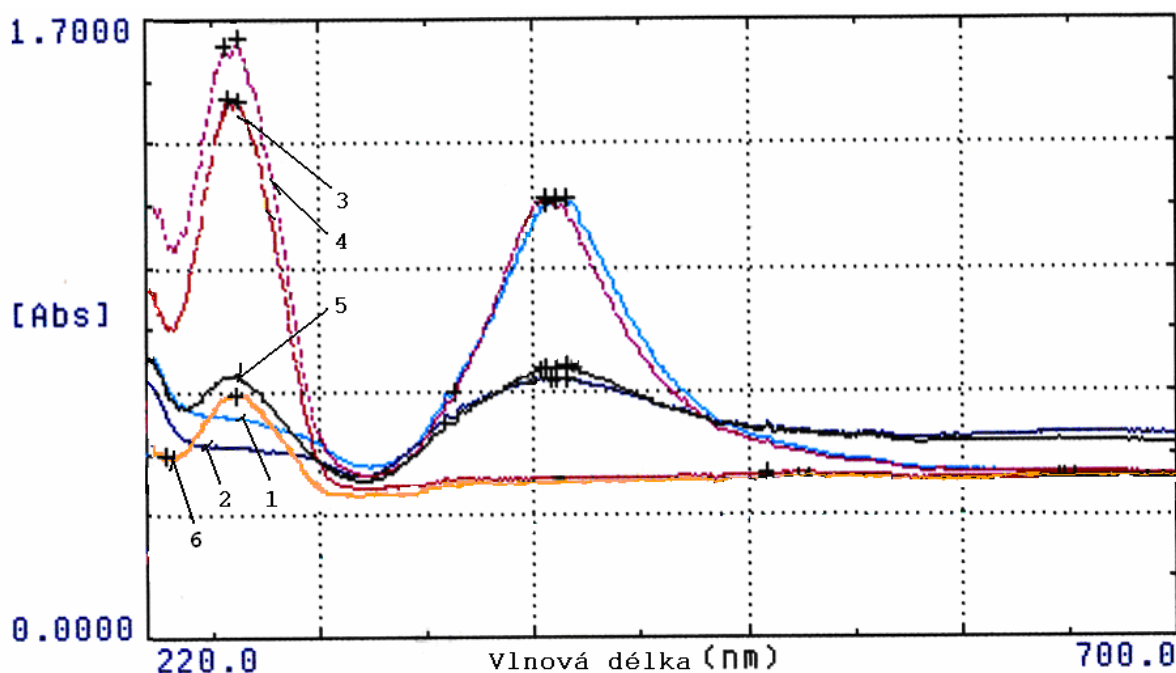
Obrázek č. 17 – Absorpční spektrum Ag koloidu

Zásobní roztok koloidu byl 100x zředěn vodou

Pro potvrzení stálosti roztoku bylo provedeno měření v čase  $t = 0 \sim 50$  minut. V získaných spektrech byla pozorována jen minimální odchylka ( $< 5\%$ ) v intenzitě v absorpčním maximu. Po dvou měsících byl opět stejný roztok Ag koloidu změřen v UV-VIS oblasti a nebyly zaznamenány žádné výrazné změny v intenzitě spektra, pouze absorpční maximum se posunulo z 411 nm do oblasti okolo 408 nm. To mohlo být způsobeno agregací disperzních částic stříbra. Když jsou agregáty dostatečně velké vypadávají z roztoku ve formě šedého prášku.

V UV-VIS oblasti byly změřeny také roztoky dsDNA/ssDNA s Ag koloidem, spolu s  $\text{MgSO}_4$  nebo se sperminem. Tyto látky vyvolávají agregaci koloidu. Když je shluků monodisperzních částic dostatečné množství – po dostatečné agregaci teprve poté nastává SERRS efekt.

Na obrázcích č. 18 - 20 jsou výsledná UV-VIS spektra, v nichž při agregaci intenzita klesá (pokud pouze spermin, síran + Ag koloid, pokud je přítomna i DNA je to složitější v závislosti na její koncentraci)



**Obrázek č. 18 – Spektra Ag koloidu a DNA, bez síranu/se síranem**

Na obrázku č. 18 jsou znázorněny spektra s  $\text{MgSO}_4$ :

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. Ag koloid   | - světle modré spektrum |
| 2. Ag + $\text{MgSO}_4$ ( $c_{\text{MgSO}_4} = 10^{-4} \text{ M}$ )  | - tmavě modré spektrum  |
| 3. dsDNA ( $c_{\text{dsDNA}} = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ )  | - červené spektrum      |
| 4. Ag + dsDNA ( $c_{\text{dsDNA}} = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ )   | - růžové spektrum       |
| 5. Ag + dsDNA ( $c_{\text{dsDNA}} = 3,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) + $\text{MgSO}_4$ ( $c_{\text{MgSO}_4} = 10^{-4} \text{ M}$ ) | - fialové spektrum      |
| 6. dsDNA ( $c_{\text{dsDNA}} = 3,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ )  | - oranžové spektrum     |

**Tabulka č. 5 – Přítomnost daných složek v roztoku měřeného spektra**

č.spekter	1 ≈	4 »	5 ≈	2
DNA	-	+	+	-
$\text{SO}_4^{-2}$	-	-	+	+

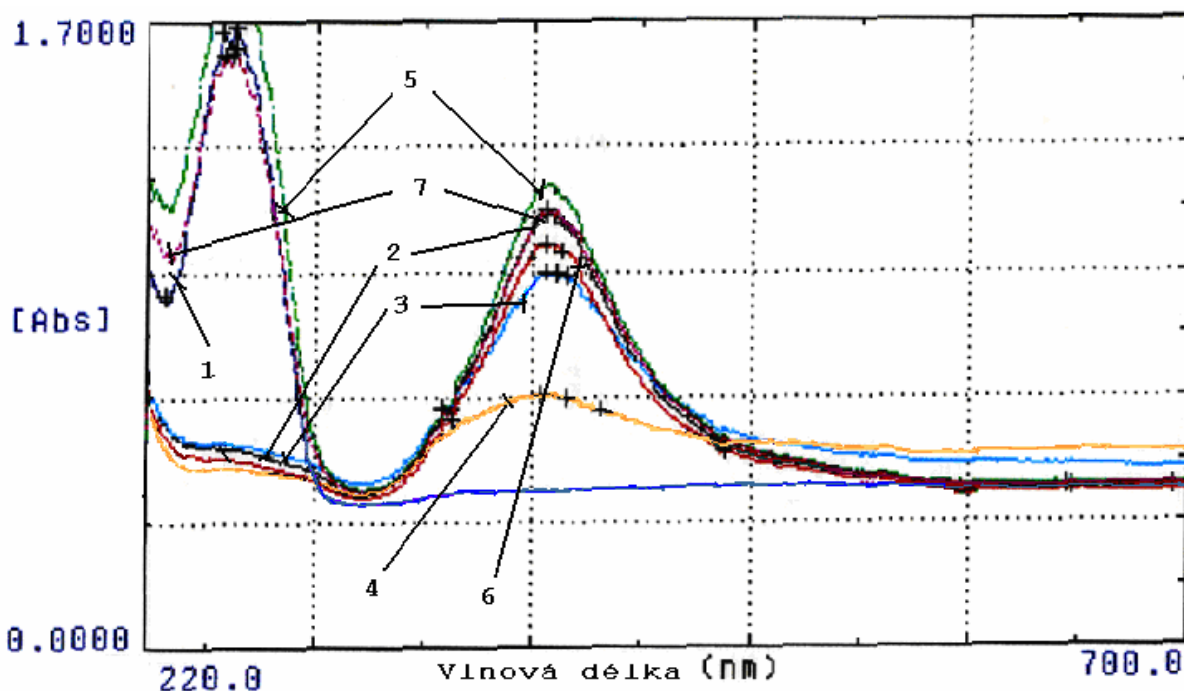
- + látka přítomna
- látka nepřítomna
- ≈ spektrum s podobnou intenzitou
- » spektrum s ostře větší intenzitou

Z obrázku je jasně zřetelné, že po přidání  $\text{SO}_4^{-2}$  (spektrum č. 2 a 5) dochází k snížení absorpčního pásu okolo 411 nm. Při nižší koncentraci dsDNA se celé spektrum posunulo dolů k nižším hodnotám intenzity.

Po přidání DNA k roztoku Ag koloidu nedochází prakticky k žádným změnám v intenzitě pásu s maximem 411 nm, tj. nedochází k agregaci koloidu

Pokud si vezmeme průběh spekter, které obsahují Ag koloid bez přídavku  $\text{MgSO}_4$  (tedy 1 a 4) a ty s přídavkem síranu (2 a 5) je zřetelné, že se zvýšila absorbance v absorpčním maximu.

Na dalším obrázku č. 19 jsou znázorněny obdobné roztoky jako ve spektrech výše. Jako agregační činidlo byl použit spermin, což je polyamid nesoucí náboj 4+.



**Obrázek č. 19 – Spektra koloidů, DNA, se sperminem/bez sperminu**

Složení roztoků:

- |   |                        |
|---|------------------------|
| 1. dsDNA ( $c_{\text{dsDNA}} = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ )   | -tmavě modré spektrum  |
| 2. Ag + Sp ( $c_{\text{Sp}} = 10^{-5} \text{ M}$ )  | -černé spektrum        |
| 3. Ag + Sp ( $c_{\text{Sp}} = 10^{-4} \text{ M}$ )  | -světle modré spektrum |
| 4. Ag + Sp ( $c_{\text{Sp}} = 10^{-3} \text{ M}$ )  | -oranžové spektrum     |
| 5. Ag + Sp ( $c_{\text{Sp}} = 10^{-5} \text{ M}$ ) + dsDNA ( $c_{\text{dsDNA}} = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) | -zelené spektrum       |
| 6. Ag koloid  | -červené spektrum      |
| 7. Ag + Sp ( $c_{\text{Sp}} = 10^{-4} \text{ M}$ ) + dsDNA ( $c_{\text{dsDNA}} = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) | -růžové spektrum       |

**Tabulka č. 6 – Přítomnost daných složek v roztoku měřeného spektra**

č. spektra	5 »	7 ≈	2 >	6 >	3 >	4
<b>DNA</b>	+	+	-	-	-	-
<b>spermin</b>	+( $10^{-5}$ )	+( $10^{-4}$ )	+( $10^{-5}$ )	-	+( $10^{-4}$ )	+( $10^{-3}$ )

+ látka přítomna

- látka nepřítomna

≈ spektrum s podobnou intenzitou

» spektrum s ostře větší intenzitou

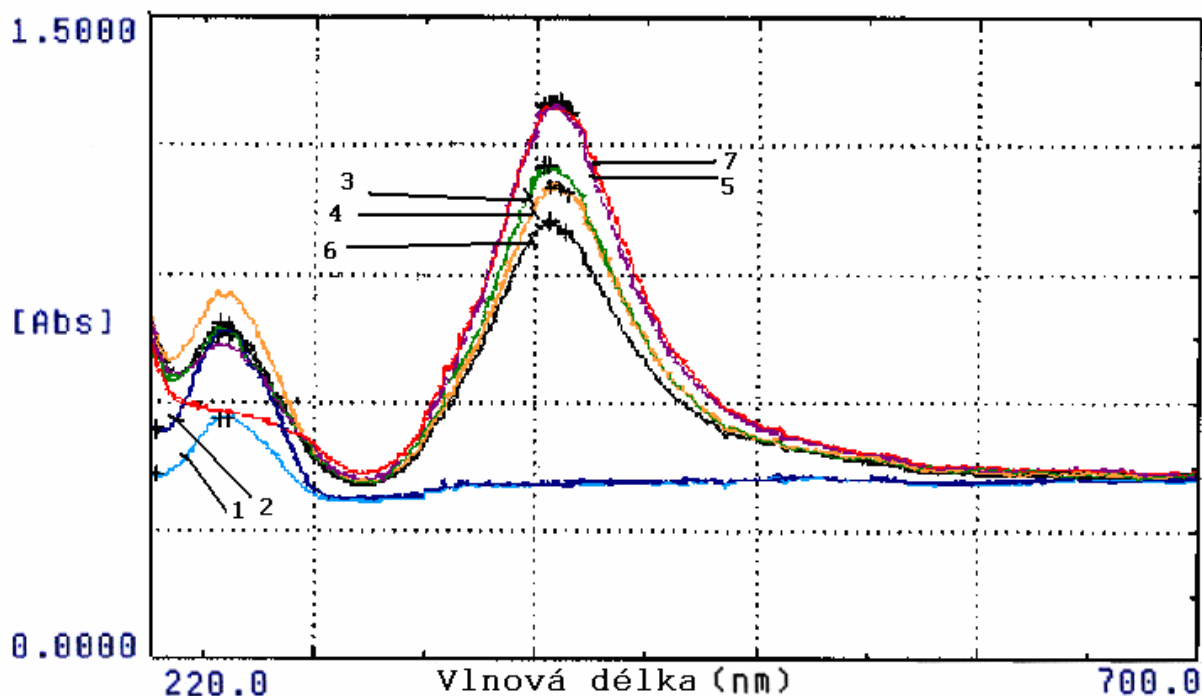
> spektrum s větší

Ze spekter 2, 3, 4 je patrné, že při zvyšování koncentrace sperminu v roztoku se snižuje intenzita pásu okolo absorpčního maxima.

Ve spektru 1 je absorbance v 411 nm nulová, neboť roztok neobsahuje žádný koloid.

Samotný spermin o koncentraci  $10^{-4} \text{ M}$  (spektrum 3) snižuje intenzitu pásu 411 nm, ale v kombinaci s DNA (spektrum 7) intenzitu zvyšuje na úroveň spektra sperminu o koncentraci  $10^{-5} \text{ M}$  (spektrum 2).

Byly změřeny i spektra s ssDNA. Výsledné naměřené spektra spolu se srovnáním s dsDNA jsou uvedeny na obrázku č. 20.



Obrázek č. 20 – Spektra ds/ss DNA

Složení roztoků:

- |   |                        |
|---|------------------------|
| 1. dsDNA ( $3,6 \cdot 10^{-5}$ M)                                   | -světle modré spektrum |
| 2. ssDNA ( $3,6 \cdot 10^{-5}$ M)                                   | -tmavě modré spektrum  |
| 3. dsDNA ( $3,6 \cdot 10^{-5}$ M) + Ag                              | -zelené spektrum       |
| 4. ssDNA ( $3,6 \cdot 10^{-5}$ M) + Ag                              | -světle hnědé spektrum |
| 5. dsDNA ( $3,6 \cdot 10^{-5}$ M) + Ag + Sp ( $c_{Sp} = 10^{-4}$ M) | -fialové spektrum      |
| 6. ssDNA ( $3,6 \cdot 10^{-5}$ M) + Ag + Sp ( $c_{Sp} = 10^{-4}$ M) | -černé spektrum        |
| 7. Ag koloid  | -červené spektrum      |

Tabulka č. 7 - Přítomnost daných složek v roztoku měřeného spektra

č.spektra	7 ≈	5 »	3 >	4 >	6
dsDNA	-	+	+	-	-
ssDNA	-	-	-	+	+
spermin	-	+	-	-	+

- + látka přítomna
- látka nepřítomna
- ≈ spektrum s podobnou intenzitou
- » spektrum s ostře větší intenzitou
- > spektrum s větší

Z obrázku výše je zřejmé, že je pouze nepatrná změna mezi spektry samotného Ag koloidu a Ag koloidu + dsDNA + sperminu. Naopak ve spektru samotné dsDNA s Ag koloidem nastává významný pokles, stejně tak ve spektru ssDNA s koloidem. Nejnižší intenzitu spektra absorbance roztoků obsahujících DNA má spektrum roztoku ssDNA v Ag koloidu se sperminem.

- ssDNA versus ssDNA + spermin nastává pokles intenzity
- dsDNA versus dsDNA + spermin nastává nárůst intenzity



### 3.4 Příprava vzorku

Vzorky byly připraveny smícháním studovaného roztoku o příslušné koncentraci s roztokem Ag koloidu.

V případě, že se studovaný systém skládal z více komponent (např. DNA, spermin, síran hořečnatý) bylo bráno také v úvahu pořadí v němž byly jednotlivé komponenty přidávány k roztoku koloidu.

#### 3.4.1 Příprava Ramanova spektrofotometru T64000NSPL

Měření probíhalo v klimatizované místnosti při stálé teplotě  $T = 22\text{ °C}$ . Před zapnutím přístroje musel být zapnut detektor, jehož pracovní teplota je  $-144\text{ °C}$ . Této teploty bylo dosaženo kapalným dusíkem (pracovní teplota  $T$  detektoru je vyšší než teplota kapalného dusíku, takže se přehřívá termostatem). Dále se zapnul spektrální a do nádržky nalil tekutý dusík. Potom bylo nutno počkat cca 1 hodinu na zchladnutí detektoru na provozní teplotu.

Po vychladnutí detektoru byl zapnut laser (potřebný výkon 100 W).

Dále bylo nutno seřídit spektrometr pro samotné měření a to kalibrací pomocí referenčního roztoku (acetonitril toluen 1:1).

Excitační vlnová délka byla 488 nm a relativní poloha hlavního píku (s teoretickým maximem) vůči 488 nm byla  $1003,61\text{ cm}^{-1}$ . Přístroj bylo před začátkem měření vždy třeba nafitovat do správné polohy.

Na začátku každého měření se měřil samotný koloid, tím se podruhé ověřoval jak spektrometr tak případná stabilita koloidu. Spektrum koloidu se při vyhodnocování spekter odečítalo od naměřených křivek. Díky tomu některé píky, které byly spektrem koloidu částečně maskovány, zřetelně vystoupily. Od spekter se také odečítala tzv. base line, hlavní linie. Tím bylo docíleno odečtu pozadí.

### 3.5 Měření spekter, jejich zpracování a vyhodnocení

Měření spekter bylo prováděno pomocí Ramanova spektrofotometru T64000, který byl zapnut a nastaven dle dříve zmíněných pravidel.

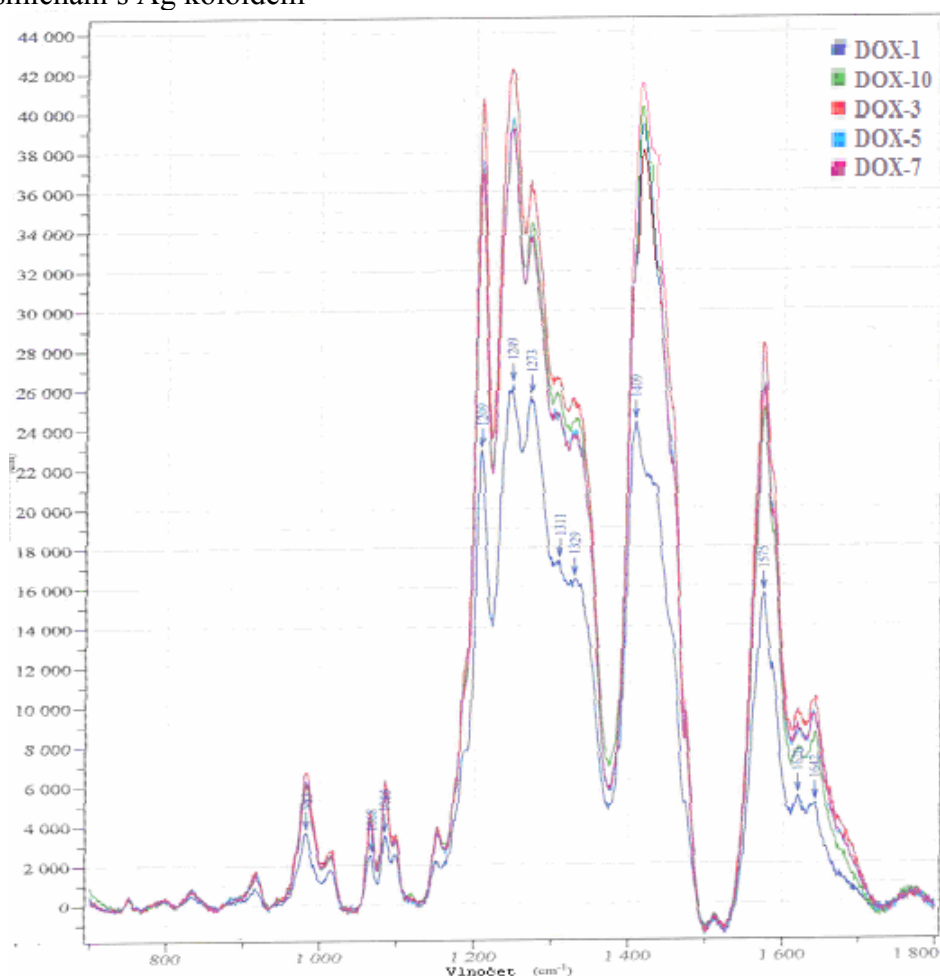
Jako první krok bylo třeba zjistit, v jakých koncentracích látek (doxorubicinu) se bude měření provádět. Nejvyšší přípustná koncentrace je dána citlivostí detektoru, jenž je schopen měřit intenzity do 60000 countů (cnt). Bylo nutné najít optimální rozsah koncentrací poskytující měřitelné spektra s vhodným poměrem signál/šum

Bylo vyzkoušeno mnoho koncentrací doxorubicinu. Jako optimální se ukázala  $c = 8,7 \cdot 10^{-8}$  M. To potvrzuje dříve v textu zmíněnou vysokou citlivost Ramanova spektrometru. Protože koncentrace zásobního roztoku byla  $8,7 \cdot 10^{-4}$  M, probíhalo ředění 100 x pomocí H<sub>2</sub>O a poté byl 1  $\mu$ l tohoto roztoku přidán k 99  $\mu$ l Ag koloidu

Dále bylo nutné zvolit počet akumulací a dobu trvání měření. Díky vysoké citlivosti metody bylo možné zaznamenat spektrum v čase 20 s (1 akumulace). Další měření ukázalo, že zvýšení času a počtu akumulací vedlo k snižování intenzit spekter doxorubicinu. Ag koloid se přehříval. Dále bylo třeba zjistit, zda měření může probíhat ihned po smíchání nebo je nutná inkubace DOX s Ag koloidem.

#### 3.5.1 Časová závislost roztoku Ag koloid - doxorubicin

Na obrázku č. 21 jsou uvedena spektra doxorubicinu měřená v čase  $t = 1 \sim 10$  minut po smíchání s Ag koloidem



Obrázek č. 21 – Časová závislost spekter doxorubicinu

Koncentrace doxorubicinu je  $8,7 \cdot 10^{-8}$  M

DOX-1 spektrum roztoku změřeného po inkubaci 1 min. po smíchání DOX s Ag koloidem  
DOX-3, 5, 7, 10 spektrum roztoku změřeného po inkubaci 3, 5, 7, 10 min. po smíchání DOX s Ag koloidem

V tabulce č. 8 jsou procentuálně uvedeny změny intenzit některých výrazných píků ve spektrech. Za stoprocentní jsou brány hodnoty spektra po 5 minutách.

**Tabulka č. 8 – Změny intenzit SERRS spekter doxorubicinu po smíchání s Ag koloidem v čase t**

Doxorubicin-časové změny					
%					
vlnočty ( $\text{cm}^{-1}$ )	t = 1 (min)	t = 3 (min)	t = 5 (min)	t = 7 (min)	t = 10 (min)
983	58,7	108	100	100	100
1068	62,5	107,9	100	100	100
1085	55,6	108,6	100	100	100
1209	61	110,8	100	98	98
1249	66,2	107,2	100	98,7	98,7
1273	76	108,6	100	100	101,8
1329	63,3	106,2	100	99	102
1409	61	108,1	100	100	101,3
1575	60	108,2	100	100	95,4
1620	60,1	108	100	100	86,7
1642	51,5	106,1	100	100	88,6

Z tabulky číslo 8 je vidět, že největší nárůst směrem k vyšším intenzitám proběhl mezi 1 a 3 minutou. To naznačuje, že kinetika adsorpce je velmi rychlá. V čase 1 minuty nebyla adsorpce molekuly doxorubicinu na Ag koloid ještě zcela úplná, ale ve třetí minutě už byl povrch koloidu zcela obsazen. Mezi 5 a 10 minutou se pouze ustaluje rovnováha. Také je vidět, že i když se mění intenzita píků, jejich vlnočty zůstávají stejné ve všech časech.

Srovnáním s tabulkou č. 5 ve které jsou uvedeny vlnočty změřené v jiných studiích, je vidět že pásy mají nepatrně jiné hodnoty. Většinou je o posun k vyšším vlnočtům o 2 – 3  $\text{cm}^{-1}$ . To může být způsobeno odlišným nastavením spektrometru.

Z obrázku číslo 21 je dále zřejmé, že relativní intenzity jednotlivých píků se v čase mění, to lze připisovat reorientaci molekuly na povrch Ag koloidu.

**Tabulka č. 9 – Vlnočty spektrálních pásů doxorubicinu a jejich přiřazení [31]**

<b>Doxorubicin</b>	
<b>vlnčet (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>přiřazení</b>
824	skeletární deformace
879	skeletární deformace
918	skeletární deformace
960	deformační vibrace (C-H)
990	dýchací kruh
1066	deformační vibrace (C-H)
1082	skeletární deformace
1118	valenční vibrace (C-OCH <sub>3</sub> )
1152	deformační vibrace (C-H)
1207	deformační vibrace (C-O)
1241	deformační vibrace (C-O)
1265	valenční vibrace kruhu
1303	valenční vibrace (C-O)
1331	valenční vibrace kruhu
1348	valenční vibrace kruhu
1409	valenční vibrace kruhu
1442	valenční vibrace kruhu
1472	valenční vibrace kruhu
1572	valenční vibrace kruhu
1586	valenční vibrace kruhu
1638	valenční vibrace (C=O)
1676	valenční vibrace (C=O)

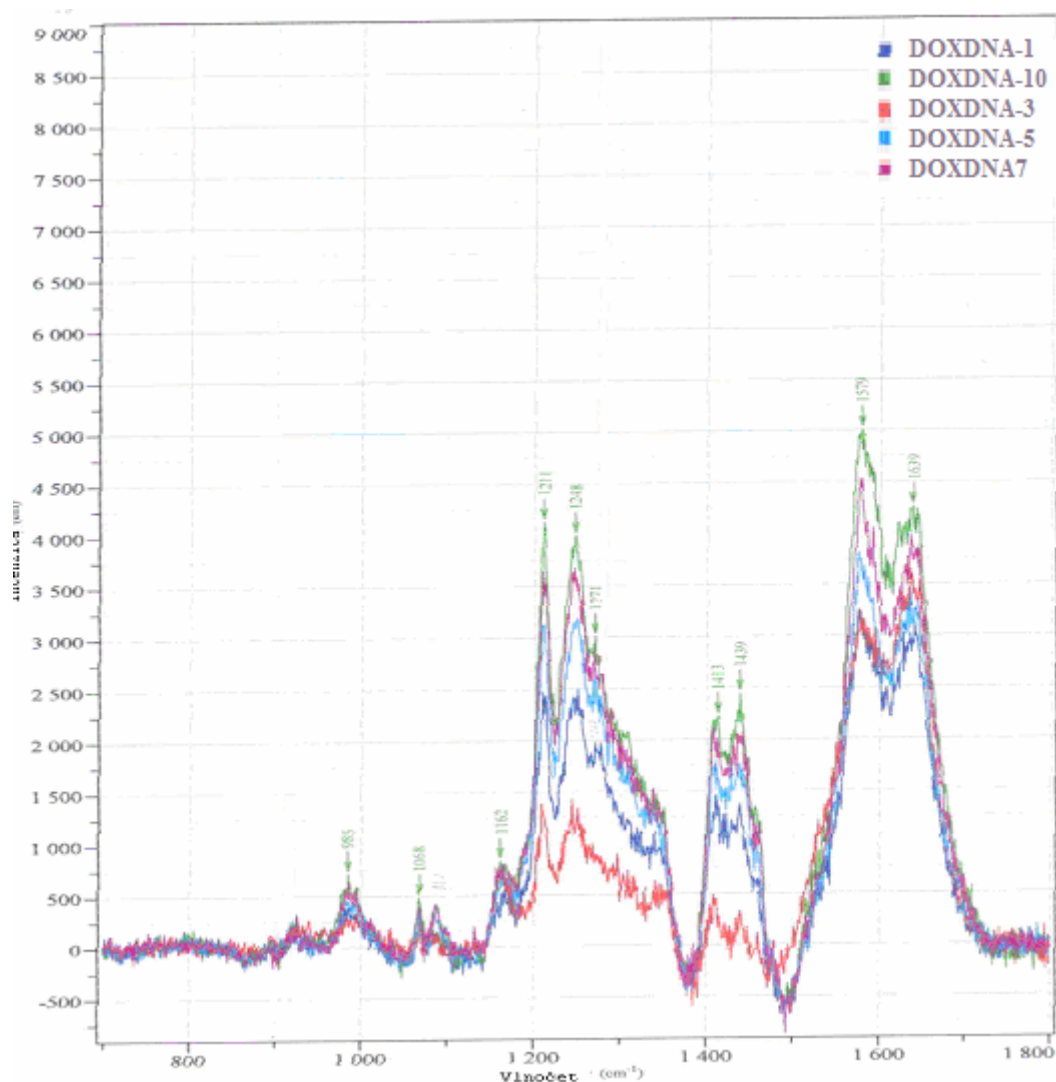
Relativní intenzity sousedních píků ve spektru doxorubicinu zůstávají ve všech časech stejné. Pouze intenzita píků v oblastech 1249 a 1273 cm<sup>-1</sup> se změnila. Z jejich poměru 1 : 0,98 se stal poměr 1 : 0,85.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem byly další vzorky měřeny až po inkubaci 5 minut v Ag koloidu.

### 3.5.2 Komplex doxorubicin-DNA

Vzorek pro měření interkalace doxorubicinu do DNA byl připraven následovně:

- DOX + DNA ..vzorek stál 1 minutu a po ní je smíchán s Ag koloidem, v něm následně měřen po čase  $t$ ,  $t = 1 \sim 10$  minut (obrázek č. 22)
- DOX + DNA..vzorek stál 10 minut a pak byl smíchán s Ag koloidem v němž byl následně měřen v časech  $t$ ,  $t = 1 \sim 10$  minut (obrázek č. 23)
- DOX + DNA..vzorek stál 20 minut a pak byl smíchán s Ag koloidem v němž byl následně měřen v časech  $t$ ,  $t = 1 \sim 10$  minut (obrázek č. 24)



Obrázek č. 22 – Časová závislost spekter komplexu DOX-DNA

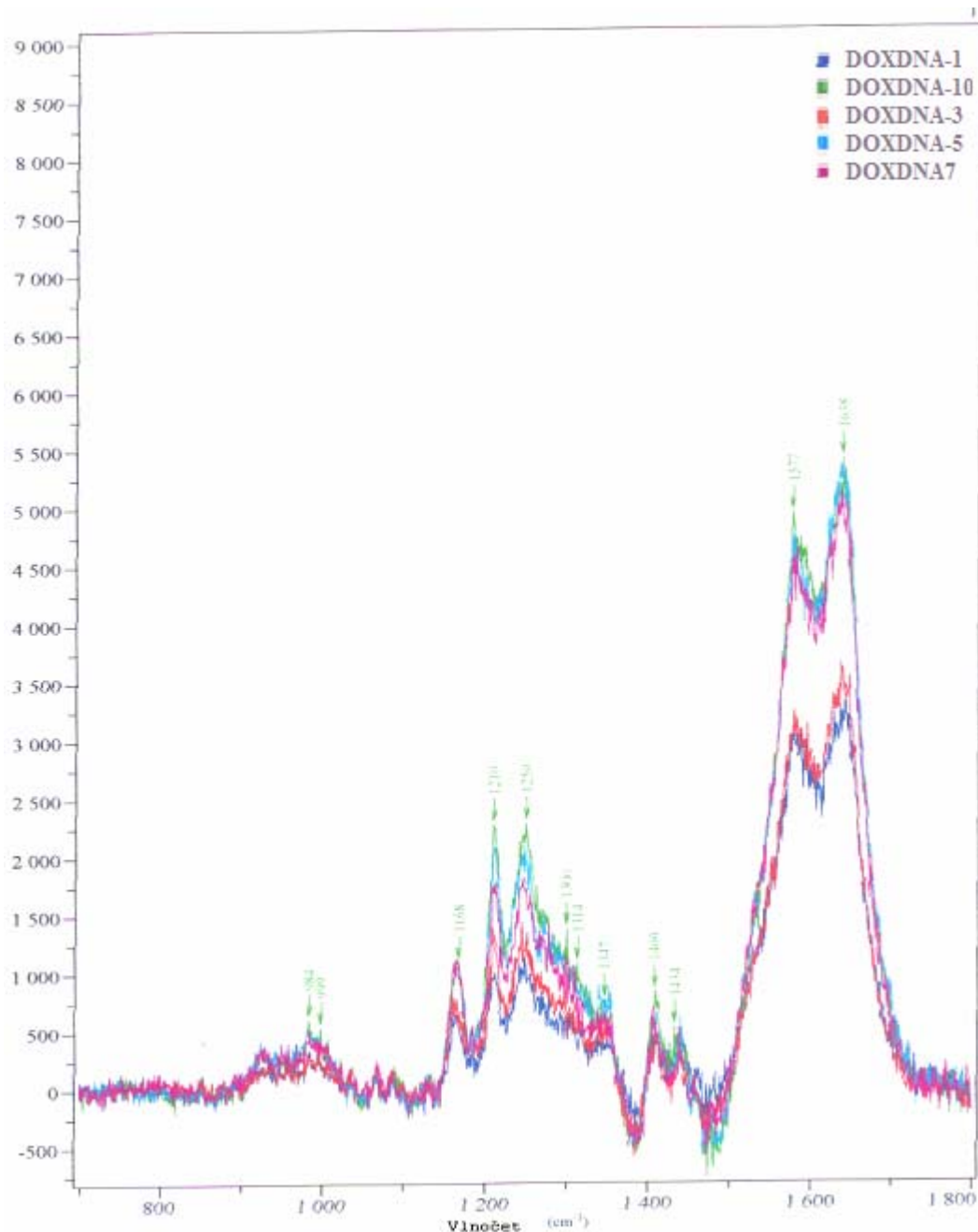
$$c_{\text{DNA}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_{\text{DOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

DOXDNA spektra komplexů DOX s DNA, inkubovaných 1 minutu po smíchání DOX + DNA a dále převedeného do roztoku Ag koloidu.

Vzorky byly odebrány a měřeny po 1, 3, 5, 7 a 10 minutách inkubace v Ag koloidu (DOXDNA-1, DOXDNA-3, DOXDNA-5, DOXDNA-7, DOXDNA-10)

Je zřejmé z obr.č. 22, že časová závislost spekter je jiná než v případě samotného DOX. Zatímco u DOX byl největší nárůst intenzit mezi spektry v čase 1 a 3 minuty. U jeho komplexu s DNA se to nedá říct jednoznačně. V oblasti mezi 1200 – 1500  $\text{cm}^{-1}$  mezi první a třetí minutou intenzita klesá, mezi 3 – 5 minutou intenzivně roste a dál roste mezi 5 - 10 minutou. Zatímco v oblasti 1500 – 1800  $\text{cm}^{-1}$  od první minuty probíhá pozvolný plynulý nárůst intenzit. Změny pozorované mezi spektry samotného DOX a jeho komplexu s DNA jsou způsobeny také změnou přístupu k povrchu Ag koloidu.



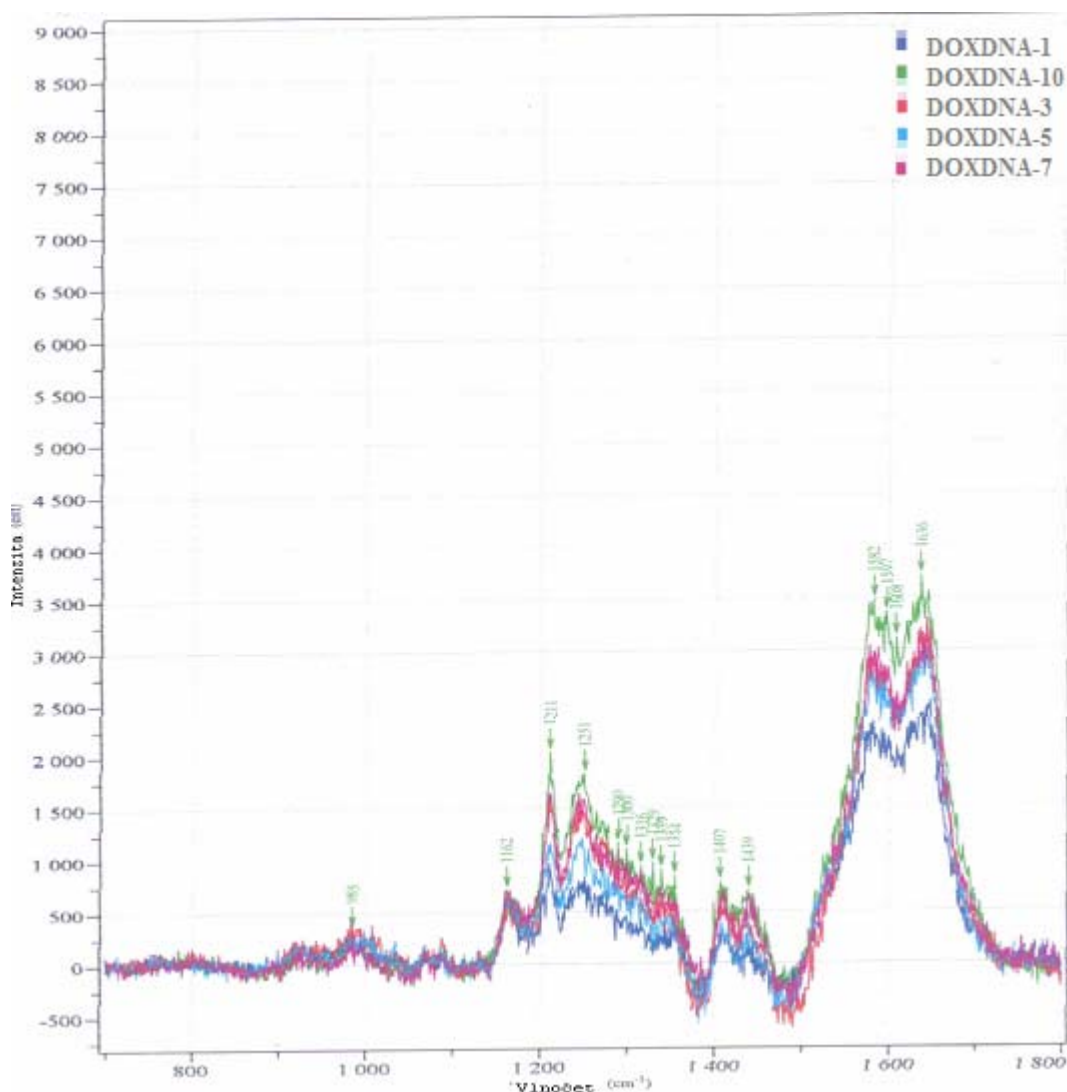
**Obrázek č. 23 – Časová závislost komplexu DOX-DNA 10 min po smíchání**

$$c_{\text{DNA}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_{\text{DOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

DOXDNA spektra komplexů DOX s DNA, inkubovaných 10 minut po smíchání DOX + DNA a dále převedeného do roztoku Ag koloidu. Vzorky byly odebrány a měřeny po 1, 3, 5, 7 a 10 minutách inkubace v Ag koloidu (DOXDNA-1, DOXDNA-3, DOXDNA-5, DOXDNA-7, DOXDNA-10)

Spektra DOX-DNA získaná po inkubaci deset minut (obr.č.23) po jejich samotném smíchání a následném přidání do koloidu jsou značně odlišná od spekter v obrázku č. 22. Poměr relativních intenzit píků 1579 (1577) : 1639 (1638) byl 1 : 0,85 a změnil se na 1 : 1,1 a po dvaceti minutách (obr.č. 24) je to skoro 1 : 1. V průměru klesla intenzita všech spekter po 20 minutách o 40 %.



**Obrázek č. 24 – Časová závislost spekter komplexu DOX-DNA po 20 minutách**

$$c_{\text{DNA}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_{\text{DOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

DOXDNA spektra komplexů DOX s DNA, inkubovaných 20 minut po smíchání DOX + DNA a dále převedeného do roztoku Ag koloidu.

Vzorky byly odebrány a měřeny po 1, 3, 5, 7 a 10 minutách inkubace v Ag koloidu (DOXDNA-1, DOXDNA-3, DOXDNA-5, DOXDNA-7, DOXDNA-10)

**Tabulka č. 10 – Srovnání vlnočtů DOX, DOX-DNA, v čase t**

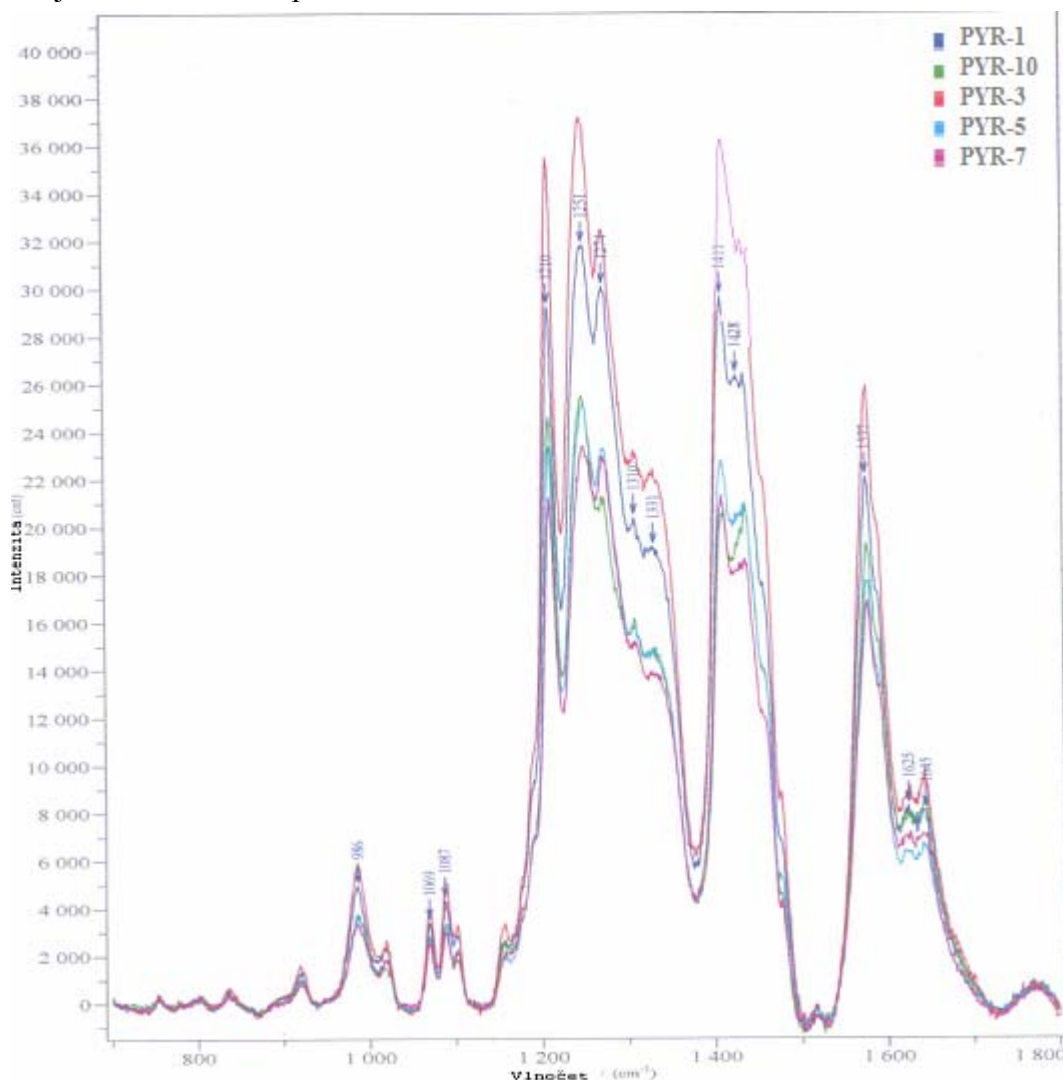
vlnočet ( $\text{cm}^{-1}$ )			
DOX	DOX-DNA		
	t = 0 (min)	t = 10 (min)	t = 20 (min)
983	985	984	985
1068			
1185			
1167	1162	1168	1162
1209	1211	1210	1211
1249	1248	1250	1251
1273	1271		
1329			
1409	1413	1409	1407
1437	1439	1434	1439
1575	1579	1577	1582
1620			
1642	1639	1638	1636

Tabulka č. 10 srovnává údaje o vlnočtech samotného doxorubicinu a jeho komplexu s DNA. Některé výrazné píky zmizely a většina se posunula o 2 – 3  $\text{cm}^{-1}$ . U samotného DOX se intenzity maximálních píků pohybovaly okolo 42000 cnt, zatímco u jeho komplexů se jedná pouze o hodnoty okolo 5000 cnt. To znamená, že většina doxorubicinu se interkaluje do dvoušroubovice DNA. Nepatrně se projevují pouze deformační vibrace (O-H), valenční vibrace kruhu a C=O. Dle snižování intenzit píků v čase po smíchání komplexu se dá říct, že interkalace ještě dál pokračuje.



### 3.5.3 Pyrazol-doxorubicin časová závislost

Srovnáním obrázku číslo 25 a 21 lze říct, že pyrazolový kruh navázaný na doxorubicin nedává žádný výrazný pík navíc, spektra jsou totožná. Přítomnost pyrazolového kruhu se v SERRS spektrech neprojevuje. To je pravděpodobně proto, že pyrazolový kruh není v kontaktu s povrchem Ag koloidu Polohy i poměry píků jsou v podstatě shodné. Jen intenzita u PYR je ve srovnání se spektrem DOX o 15 % nižší.



**Obrázek č. 25 – Časová závislost spekter komplexu PYR-DOX**

$$c_{\text{PYR-DOX}} = 8,7 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

DOX-1 spektrum roztoku změřeného po inkubaci 1 min. po smíchání DOX s Ag koloidem  
DOX-3, 5, 7, 10 spektrum roztoku změřeného po inkubaci 3, 5, 7, 10 min. po smíchání DOX s Ag koloidem.

Časový průběh spekter PYR-DOX je poněkud odlišný od DOX. Značný nárůst intenzity směrem k vyšším hodnotám nastává mezi 1 a 3 minutou a značný pokles mezi 3 a 5 minutou. To naznačuje, že mezi 1 – 3 dochází ještě k adsorpci na povrch Ag koloidu. Tabulka číslo 11 porovnává hodnoty vlnočtů pro DOX a PYR.

**Tabulka č. 11 – Srovnání hodnot vlnočtů spekter samotného DOX a PYR**

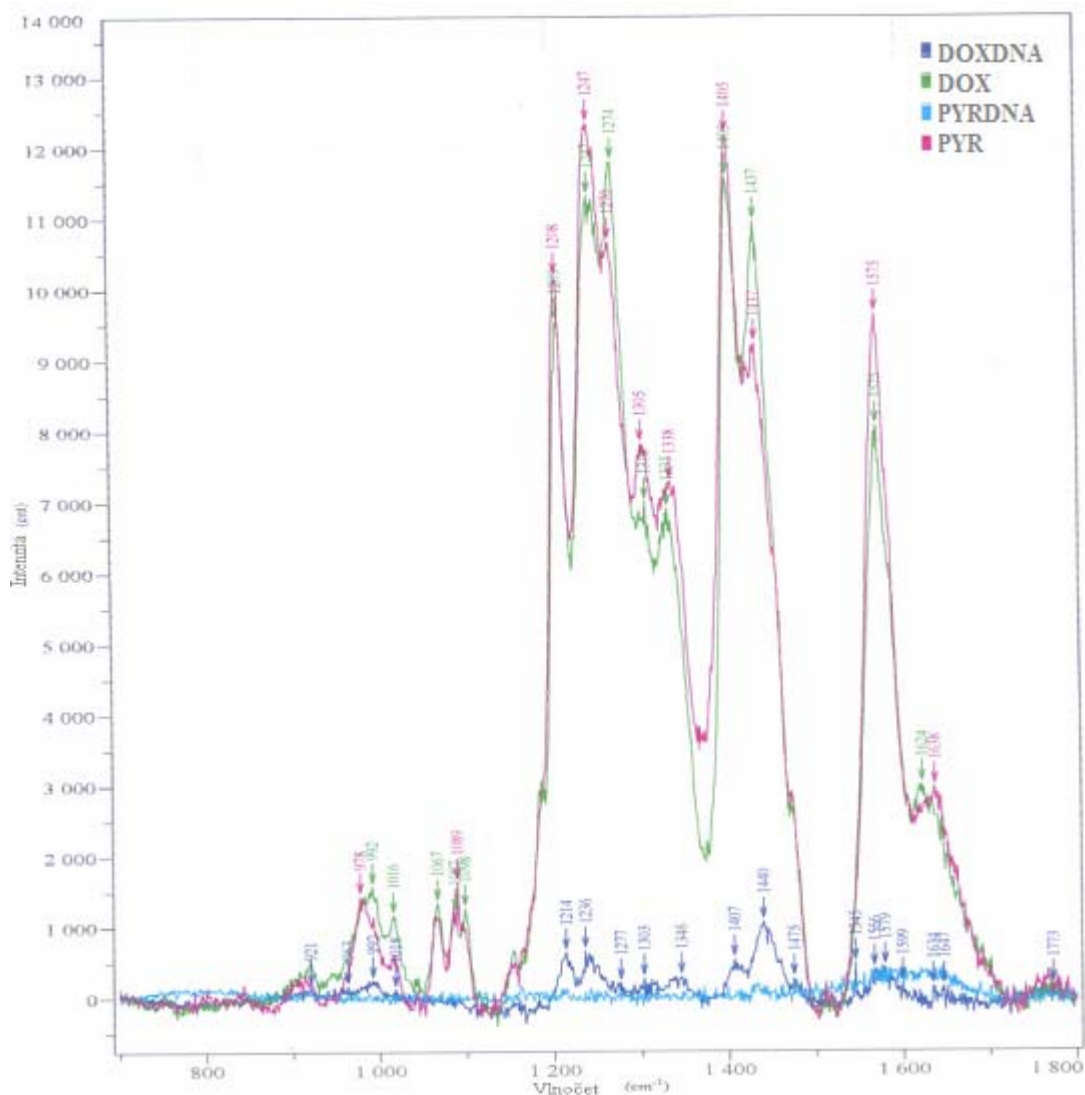
vlnočty (cm <sup>-1</sup> )	
DOX	PYR
983	986
1068	1069
1085	1087
1209	1210
1249	1251
1273	1274
1311	1310
1329	1331
1409	1411
1437	1440
1575	1577
1620	1625
1642	1645

### 3.5.4 Komplex (pyrazol-doxorubicin)-DNA

Byly použity stejné koncentrace jako u komplexu DOX-DNA, tj.  $c_{\text{DNA}} = 8,7 \cdot 10^{-6}$  M  
 $c_{\text{PYR-DOX}} = 1,07 \cdot 10^{-7}$  M.

Při sledování změn ve spektrech komplexu PYR-DNA s ohledem na čas nemohly být sledovány žádné změny, protože bylo pozorováno spektrum bez jakýchkoliv výrazných píků. Lze tedy říct, že naproti komplexu DOX-DNA, kde celé molekuly nebyly interkalovány u komplexu PYR-DNA je tomu naopak. Interkalací do dvoušroubovice a orientací molekuly (např. díky náboji) pyrazol-doxorubicin bylo zabráněno jakékoliv adsorpci na povrch Ag koloidu. Vazba PYR-DNA je pravděpodobně těsnější než obdobná vazba mezi DOX a DNA.

Na obrázku č. 26 jsou uvedeny spektra samotného doxorubicinu, pyrazol-doxorubicinu a jejich komplexů s DNA. Měření bylo provedeno při jiném nastavení spektrofotometru než dříve uvedená spektra. Proto je zde jiná intenzita spekter. Relativní intenzity píků samotných léčiv versus jejich komplexů jsou však stejné jako u dříve uvedených spekter. Rozdíly mohou být také způsobeny jinou polohou kapiláry vůči paprsku laseru.



**Obrázek č. 26 – Spektra DOX, PYR a jejich komplexů s DNA**

$$c_{\text{DNA}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_{\text{PYR-DOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$c_{\text{DOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

DOX (PYR) spektrum roztoku DOX (PYR) změřeno po inkubaci 5 min. po smíchání DOX (PYR) s Ag koloidem.

DOXDNA (PYRDNA) spektra komplexu DOX (PYR) s DNA, inkubovaných 1 minut po smíchání DOX (PYR) + DNA a dále převedeného do roztoku Ag koloidu.

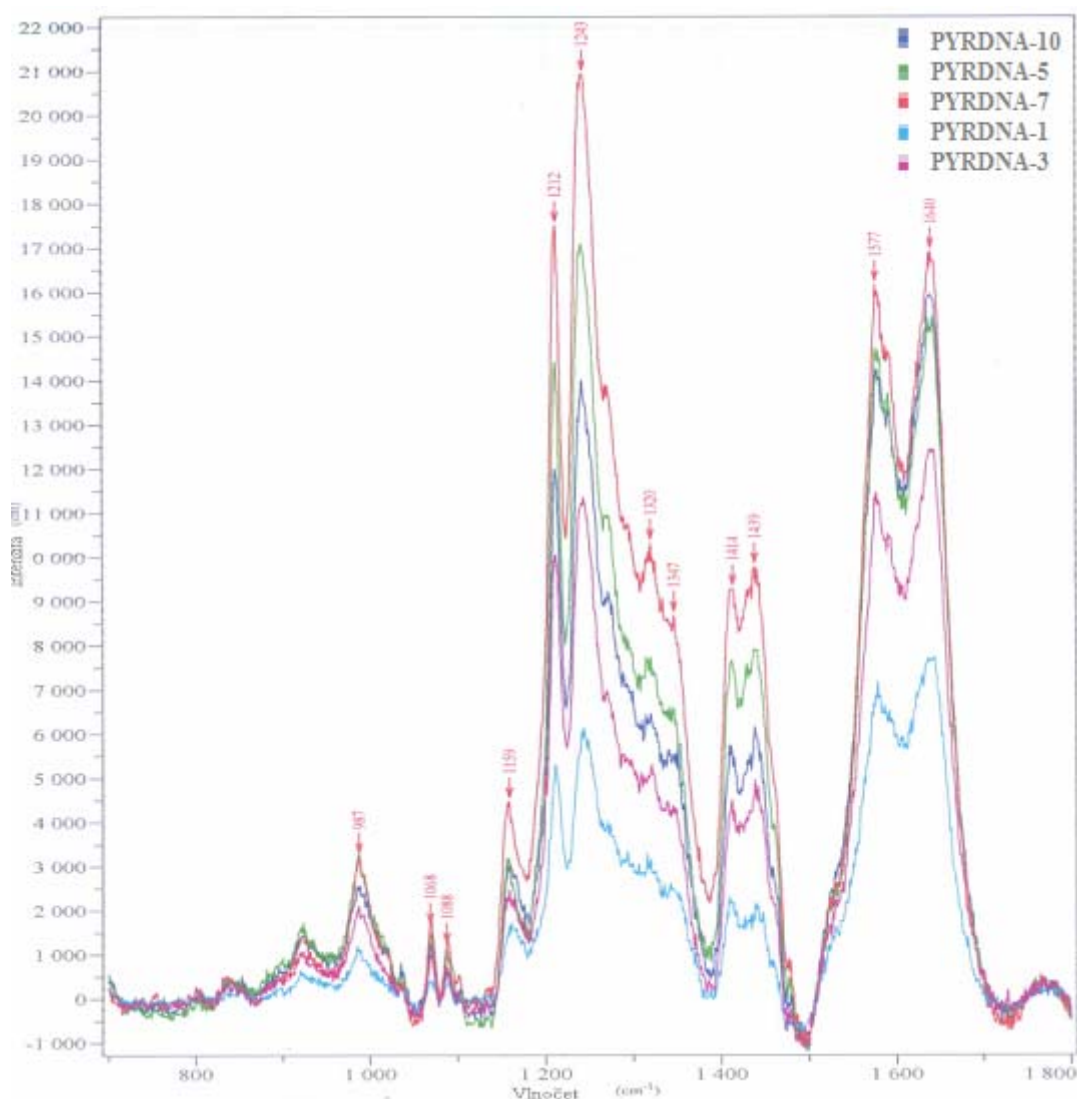
Vzorky byly odebírány a měřeny po 5 minutách inkubace v Ag koloidu

Hodnoty vlnočtů DOX a PYR jsou obdobné, jen nepatrně posunuté v rámci několika  $\text{cm}^{-1}$ . Na obrázku je vidět částečné a úplné vymizení spektra u komplexů.

Protože samotný PYR s DNA nedává žádné spektrum, byl do roztoku koloidu před přidáním komplexu PYR-DNA přidán síran o koncentraci  $c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . Síran se přidává proto, že v důsledku jeho interakce s Ag koloidem se mění stupeň agregace. Tím dochází k tzv. aktivaci koloidu. Síran v Ag koloidu bez dalších složek nedává žádné spektrum.

Na obrázcích č. 27, 28, 29 jsou znázorněny spektra PYR-DNA se síranem různou dobu po smíchání a to takto:

- PYR + DNA..1 minutu roztok stál, následně byl přidán do roztoku 2 : Ag kol. + MgSO<sub>4</sub>, měření probíhalo v čase t od aplikace do roztoku 2; t = 1 ~ 10 minut (obr. č. 27)
- PYR + DNA..10 minut roztok stál, následně byl přidán do roztoku 2 : Ag kol. + MgSO<sub>4</sub>, měření probíhalo v čase t od aplikace do roztoku 2; t = 1 ~ 10 minut (obr. č. 28)
- PYR + DNA..20 minut roztok stál, následně byl přidán do roztoku 2 : Ag kol. + MgSO<sub>4</sub>, měření probíhalo v čase t od aplikace do roztoku 2; t = 1 ~ 10 minut (obr. č. 29)



**Obrázek č. 27 – Komplex PYR-DNA po přidavku síranu**

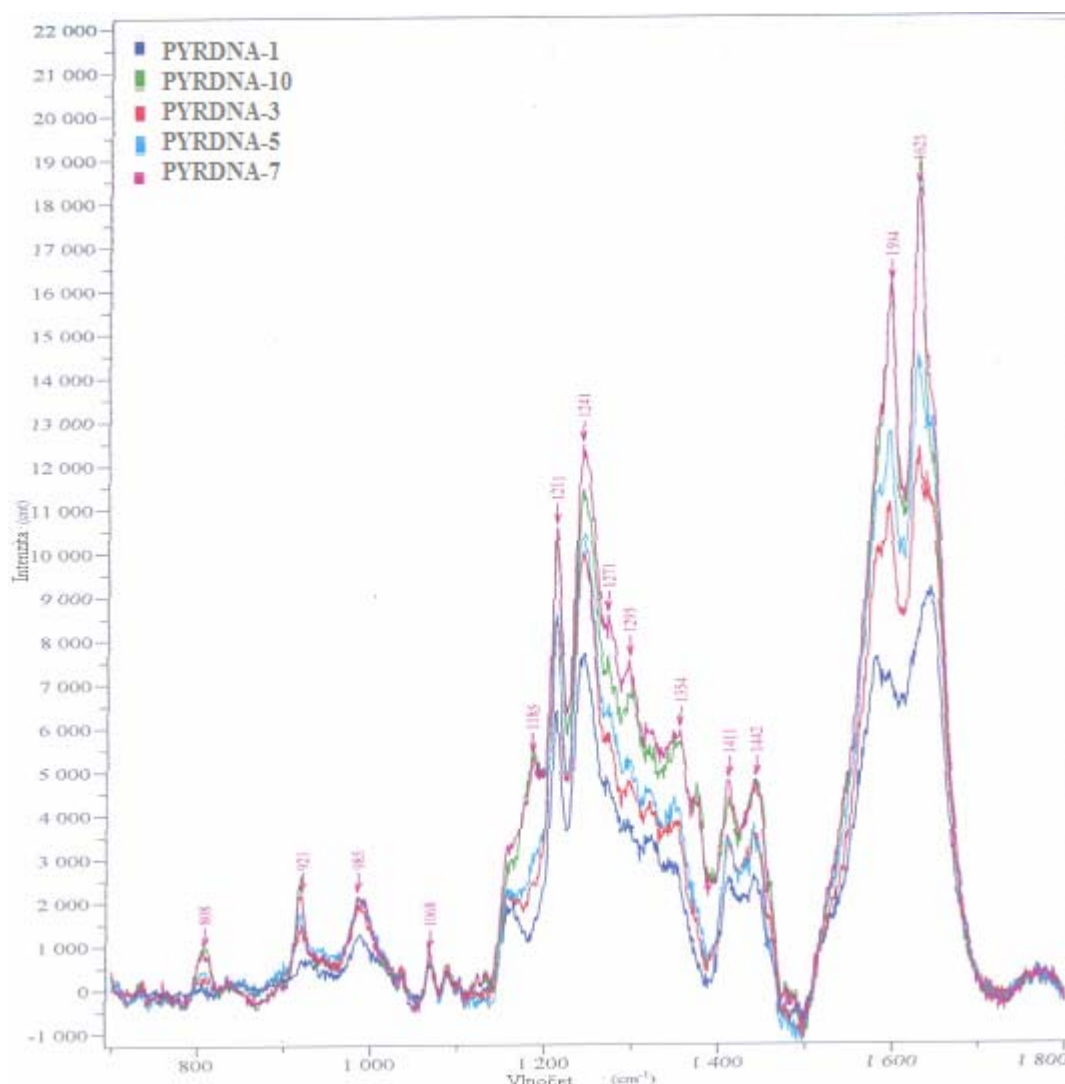
$$c_{\text{DNA}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_{\text{PYRDOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

PYRDNA spektra komplexů PYR s DNA, inkubovaných 1 minutu po smíchání PYR + DNA a dále převedeného do roztoku Ag koloidu se síranem.

Vzorky byly odebírány a měřeny po 1, 3, 5, 7 a 10 minutách inkubace v Ag koloidu se síranem (PYRDNA-1, PYRDNA-3, PYRDNA-5, PYRDNA-7, PYRDNA-10)

Z obrázku č. 27 je patrné, že po přidání síranu ke komplexu PYR-DNA bylo získáno spektrum velmi podobné spektru DOX-DNA bez síranu. Pouze relativní intenzity píků v oblasti okolo 1577 : 1640 se změnilly. Z 1 : 0,85 (DOX-DNA) na 1 : 1,06 (PYR-DNA se síranem). Oba pásy náležejí valenčním vibračním kruhu.



Obrázek č. 28 – Komplex PYR-DOX po přidání síranu, 10 minut po smíchání

$$c_{\text{DNA}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

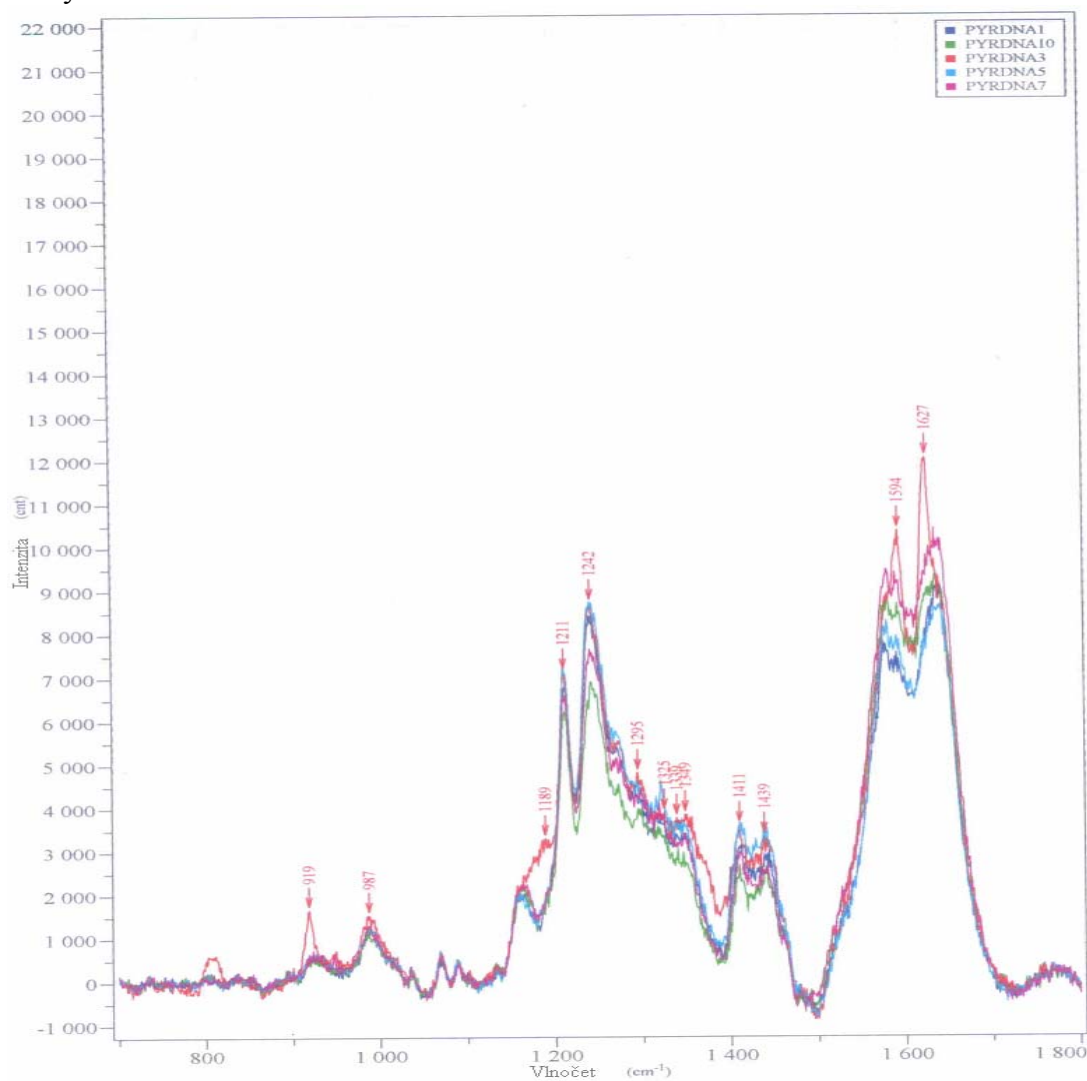
$$c_{\text{PYRDOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

PYRDNA spektra komplexů PYR s DNA, inkubovaných 10 minut po smíchání PYR + DNA a dále převedeného do roztoku Ag koloidu se síranem.

Vzorky byly odebírány a měřeny po 1, 3, 5, 7 a 10 minutách inkubace v Ag koloidu se síranem (PYRDNA-1, PYRDNA-3, PYRDNA-5, PYRDNA-7, PYRDNA-10)

Ze srovnání obrázků č. 27, 28 a 29 je vidět rapidní pokles píků v oblasti mezi 1150 - 1500  $\text{cm}^{-1}$  (po uplynutí 10 minut od smíchání PYR s DNA. Zatímco v čase 0 minut byl poměr mezi vybranými píky v oblasti mezi 1150 – 1500 : 1500 – 1700  $\text{cm}^{-1}$  1 : 0,85, v čase 10 minut od smíchání komplexu byl poměr 1 : 1,52. To znamená pokles vibrací způsobených el. strukturami bází ku vibračním způsobeným párováním bází. Celkově se dá říct, že pokud je dán dostatečný čas na komplexaci PYR s DNA má síran menší účinnost na zvýšení intenzit píků než pokud je aplikován hned po smíchání těchto dvou komponent.

Nemůže zvyšovat agregaci částic Ag koloidu na kterých jsou již adsorbovány molekuly jiné látky.



**Obrázek č. 29 – Komplex PYR-DOX po přidání síranu, 20 minut po smíchání**

$$c_{\text{DNA}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_{\text{PYRDOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

PYRDNA spektra komplexů PYR s DNA, inkubovaných 20 minut po smíchání PYR + DNA a dále převedeného do roztoku Ag koloidu se síranem.

Vzorky byly odebírány a měřeny po 1, 3, 5, 7 a 10 minutách inkubace v Ag koloidu se síranem (PYRDNA-1, PYRDNA-3, PYRDNA-5, PYRDNA-7, PYRDNA-10)

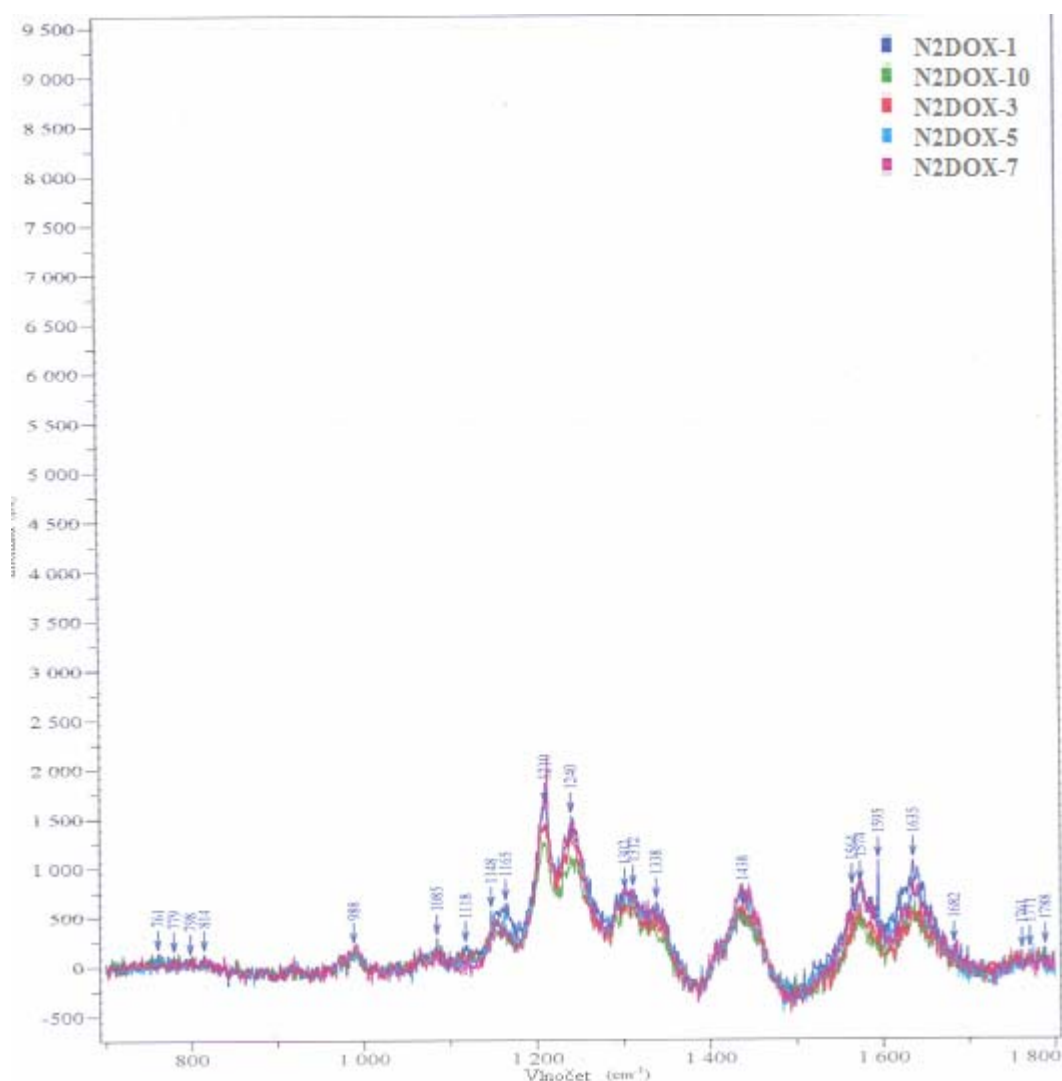
### 3.5.5 Časová závislost vzorku N2-DOX

N2-DOX = konjugát poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX).

Obsah doxorubicinu je 7,9 hm% a z toho 0,02 hm% volného doxorubicinu. Jednalo se o ve vodě rozpustný práškový polymer s enzymaticky řízeným uvolňováním léčiva. Kromě vody byl rozpustný také ve vodných pufrech, alkoholech, DMF, DMSO. Pro měření bylo použito vzorku rozpuštěného ve vodě, neboť je poměrně stabilní. V jiných rozpouštědlech uvolňuje malé množství silně fluoreskujícího derivátu.

Bylo provedeno také měření vzorku N1-DOX. Ten obsahuje 9,8 hm% DOX, z toho 0,1 hm% volného doxorubicinu.

N1-DOX = konjugát poly(HPMA-co-MA-Akap-NHN=DOX). Vzorek N1 je také ve vodě rozpustný práškový polymer avšak s hydrolyticky řízeným uvolňováním doxorubicinu. Připravený roztok však byl ve velmi krátkém čase nestabilní. Dával v podstatě totožná spektra se spektry samotného doxorubicinu a to jak samotného tak v komplexu s DNA. Spektra vzorku N2 v závislosti na čase  $t$ , kdy  $t = 1 \sim 10$  minut, jsou uvedeny na obr.č. 30.



**Obrázek č. 30 – Časová závislost spekter N2-DOX**

$c_{N2-DOX} = 8,7 \cdot 10^{-7}$  M, N2DOX-1 (3, 5, 7, 10) spektrum roztoku N2-DOX v Ag koloidu po inkubaci 1 (3, 5, 7, 10) min.



Z obrázku je jasné, že dává spektrum s odlišnými intenzitami i polohami vlnočtů než spektrum samotného doxorubicinu (viz obrázek č. 21). Tabulka číslo 12 srovnává nejintenzivnější vlnočty spektra doxorubicinu a N2-DOX. Některé píky vymizely úplně, některé se posunuly do jiných hodnot vlnočtů a objevily se i nějaké nové píky. Pokud jde o intenzitu spektra tak ta se u N2-DOX pohybuje 2 500, zatímco u doxorubicinu se pohybuje v řádu desítek tisíc.

Dále lze říct, že se v čase vzorek v Ag koloidu vzorek nemění. Spektrum N2DOX-DNA nevykazuje žádné značné změny oproti spektru samotného N2, jen mírný pokles intenzity. Dá se tedy říct, že s DNA neinteraguje ani se neinterkaluje do DNA. Snad pouze jeho doxorubinová část ano, ale protože nedávala skoro žádné spektrum ani pokud byl vzorek pouze v koloidu, nelze říct jak se interkalovala. Samotný nosič dává spektrum bez jakýchkoliv intenzivních pásů (podobné spektru samotného DNA)

**Tabulka č. 12 – Srovnání vlnočtů spektra doxorubicinu a N2-DOX**

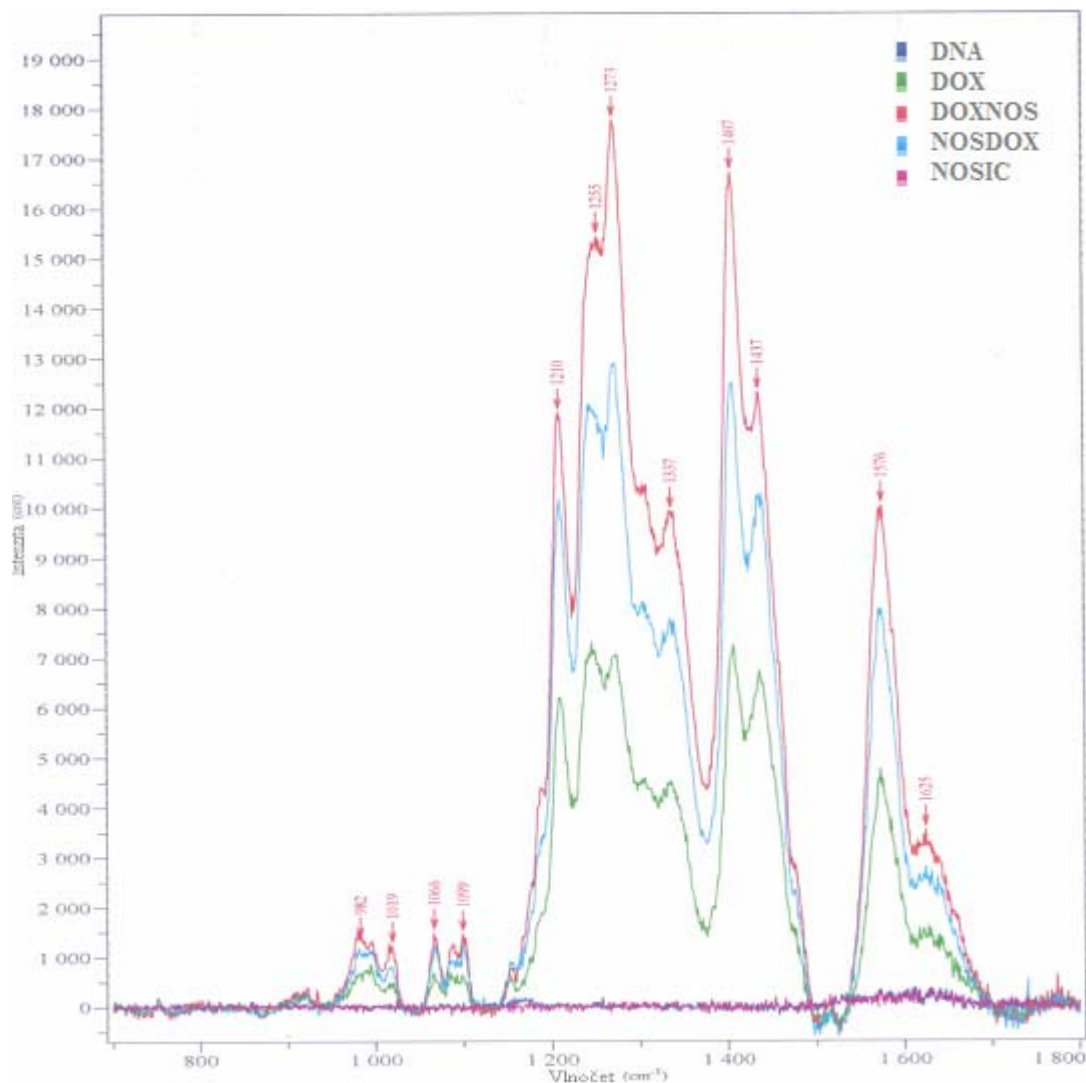
Vlnočet (cm <sup>-1</sup> )	
DOX	N2
983	988
1068	
1085	1085
1209	1210
1249	1240
1273	
	1302
1329	1338
1409	
	1438
1575	1574
1620	
1642	1635

Nový pík v oblasti okolo 1302 cm<sup>-1</sup> lze přiřadit valenčním vibracím C-O, 1438 cm<sup>-1</sup> náleží valenčním vibracím kruhu.



### 3.5.6 Aplikace nosiče a jeho vliv

Na obrázku číslo 31 jsou porovnány spektra samotného nosiče, DNA, doxorubicinu a komplexů DOX-nosič s rozdílným pořadím přidávání látek do roztoku Ag koloidu.



**Obrázek č. 31 – Spektra DOX, DNA, nosiče a komplexů DOX-DNA, pořadí 1.DOX-2.nosič, 1.nosič-2.DOX**

$$c_{N2-DOX} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$c_{DOX} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$c_{DNA} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_{NOSIC} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

DOXNOS spektrum roztoku DOX s nosičem, do roztoku Ag koloidu přidáváno v pořadí 1. DOX, 2.nosič inkubace 5 min v Ag koloidu před měřením.

NOSDOX spektrum roztoku DOX s nosičem, do roztoku Ag koloidu přidáváno v pořadí 1. nosič, 2. DOX inkubace 5 min v Ag koloidu před měřením.

DOX spektrum roztoku DOX v roztoku Ag koloidu ,inkubace 5 min v Ag koloidu před měřením.

NOSIC (DNA) spektrum roztoku nosiče (DNA) v roztoku Ag koloidu ,inkubace 5 minut v Ag koloidu před měřením.

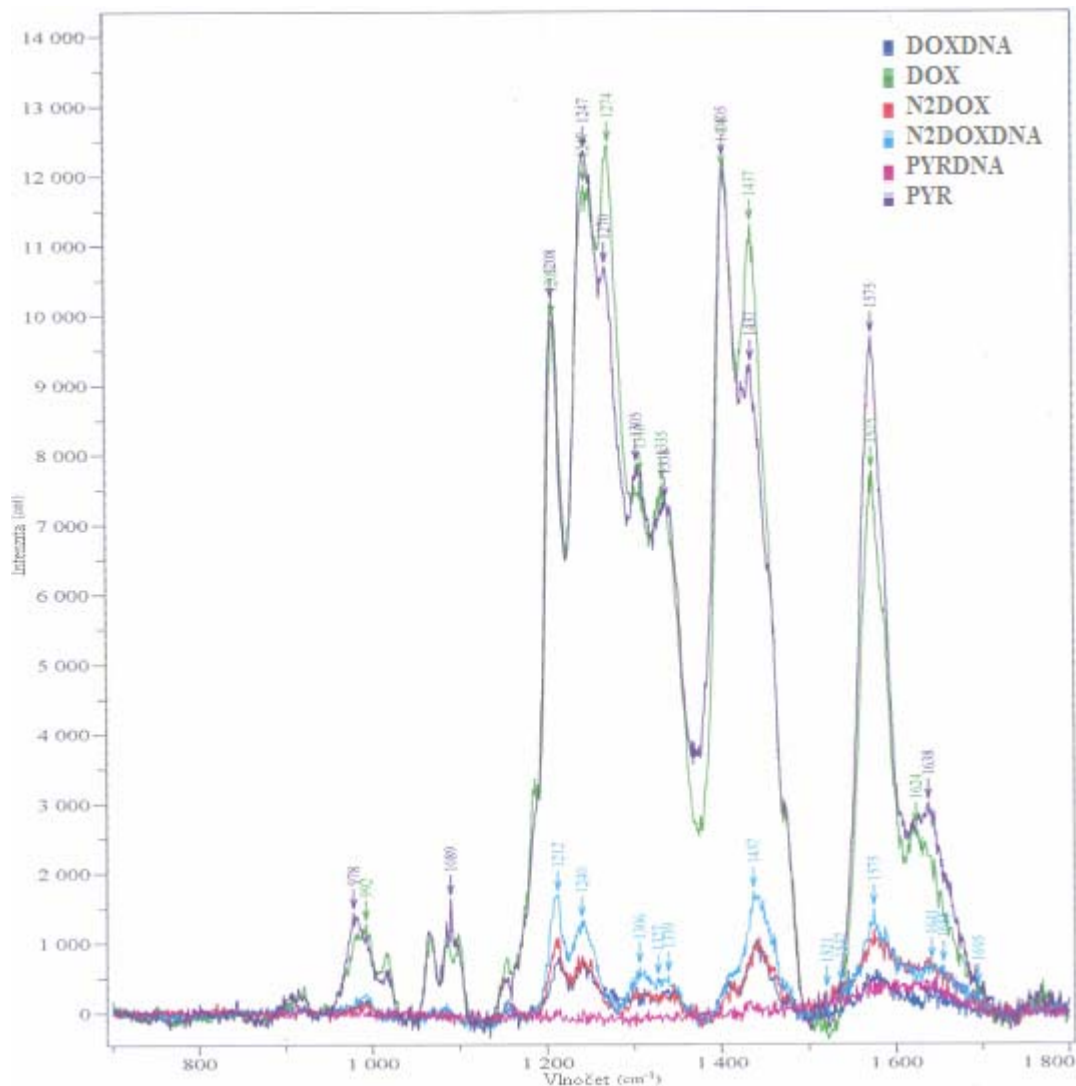
Fialové a modré spektrum náleží vzorkům samotného nosiče a samotné DNA. Ani jeden vzorek nedává žádné intenzivní píky v celém rozsahu měřených hodnot. Pokud byl přidán nosič do koloidu před doxorubicinem byl pozorován skoro dvojnásobný (1,8 x) nárůst intenzit u všech významných píků oproti samotnému doxorubicinu. Když byl přidán do roztoku až po doxorubicinu intenzity vzrostly dokonce 2,5 x. Také se měnil poměr intenzit některých píků (viz. tabulka č. 13). Vliv nosiče se patrně odvíjí od jeho schopnosti měnit stupeň agregace koloidu (náboj, polymerní strukturu). Je-li navázán DOX na nosič, tak se v případě interakce s Ag koloidem mění prostorová orientace DOX na povrch Ag koloidu. Změny ve spektrech na obr. č. 30 a 31.

**Tabulka č. 13 – Srovnání relativních intenzit vlnočtů spekter dvojic píků**

	vlnočť (cm <sup>-1</sup> ) poměry			
	1150:1273		1407:1437	
<b>DOX</b>	1	0,97	1	0,9
<b>DOX-nosič</b>	1	1,07	1	0,82
<b>nosič-DOX</b>	1	1,15	1	0,74

Je tedy zřejmé, že přidání nosiče zapříčiňuje nárůst intenzit píků, působí tedy obdobně jako síran či chlorid. Může to být způsobeno těsnější a intenzivnější adsorpcí doxorubicinu na povrch Ag koloidu díky nosiči. Ten může měnit polohovou orientaci molekuly k povrchu nebo může způsobovat změnu náboje. Větší změna nastává pokud je dán nosič až k doxorubicinu částečně adsorbovanému na povrch, protože pokud je dán do koloidu jako první může se sám vázat na povrch a částečně tím i bránit adsorpci DOXu.

### 3.5.7 Komplexy DOX, PYR, N2-DOX s DNA



**Obrázek č. 32 – Spektra DOX, PYR, N2-DOX a jejich komplexů s DNA**

$$c_{N2-DOX} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$c_{DOX} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$c_{PYROX} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$c_{DNA} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

DOXDNA (PYRDNA, N2DOXDNA) spektrum komplexu DOX (PYR, N2-DOX) s DNA, po minutové inkubaci přidáván do roztoku Ag koloidu, před měřením 5 minutová inkubace v Ag koloidu

DOX (PYR, N2DOX) spektrum DOX (PYR, N2DOX) v roztoku Ag koloidu, inkubace 5 min v Ag koloidu před měřením.

Na výše uvedeném obrázku jsou srovnány spektra DOX, PYR, N2 a jejich komplexů s DNA. Je patrný obrovský pokles v hodnotách intenzit píků mezi DOX, PYR a N2. Také je jasně vidět, že spektra komplexů doxorubicinu a N2 jsou si velmi podobná. Místo dvou pásů oblasti okolo 1405 a 1437  $\text{cm}^{-1}$  (pro samotný DOX) je pouze jeden pás okolo 1437  $\text{cm}^{-1}$  (a to

jak pro komplex DOX-DNA, tak pro samotný N2 i jeho komplex s DNA). Celá tato oblast náleží valenčním vibračním kruhu.

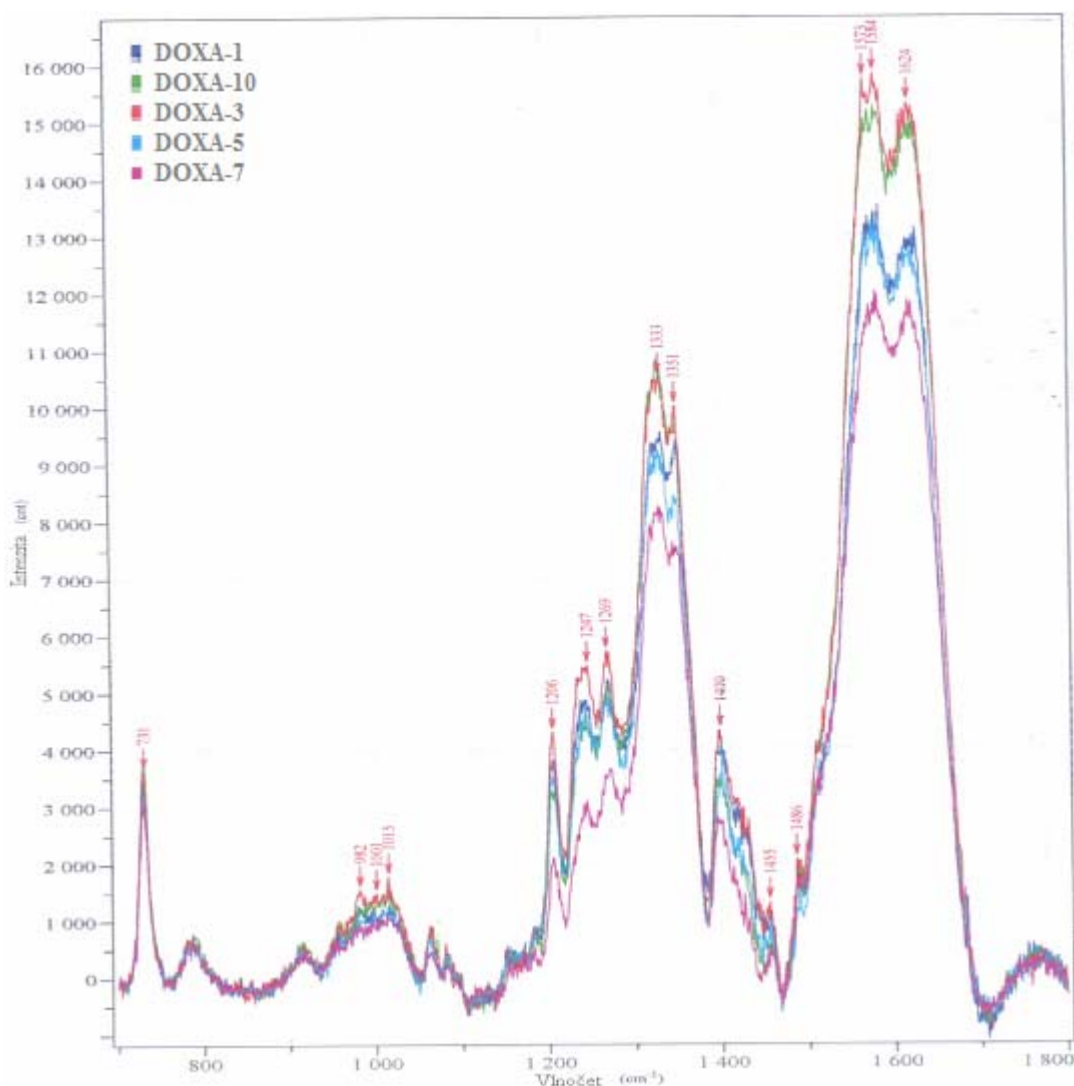
Jak bylo již dříve uvedeno pásy v oblasti mezi  $700 - 1100 \text{ cm}^{-1}$  u DOX a PYR zcela zmizí ve spektrech jejich komplexů s DNA. Zmizí tak veškeré deformační vibrace skeletu, C-H a vibrace dýchacího kruhu. To naznačuje interkalaci těchto částí do dvoušroubovice DNA. U PYR-DNA nastává interkalace nebo jiná interakce celé molekuly, neboť píky v celém měřeném rozsahu vlnočtů zmizí.

Při srovnání spekter samotného N2 a jeho komplexu s DNA je vidět, že interakce s DNA nastává pouze minimálně.

### 3.5.8 Komplex doxorubicin-oligonukleotid A<sub>12</sub>

Spektra tohoto komplexu lze získat pouze pokud je do roztoku přidán i síran. Bez tohoto přídavku nejsou ve spektru žádné intenzivní píky. Byly zkoumány změny, které nastanou, když se mění pořadí zkoumaných látek do Ag koloidu. Koncentrace síranu ve výsledném roztoku byla  $4 \cdot 10^{-4}$  M.

- Do Ag koloidu se síranem nejprve doxorubicin, následně oligonukleotid A<sub>12</sub> (obr.č. 33)
- Do Ag koloidu se síranem nejprve A<sub>12</sub>, následně doxorubicin (obr.č. 34)
- Nejprve byl smíchán doxorubicin s A<sub>12</sub>, tento roztok byl pak přidán do koloidu Ag + síran (obr.č. 35)



**Obrázek č. 33 – Komplex DOX-A<sub>12</sub>, pořadí: 1.DOX**

$$c_{\text{DOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$c_{\text{A}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

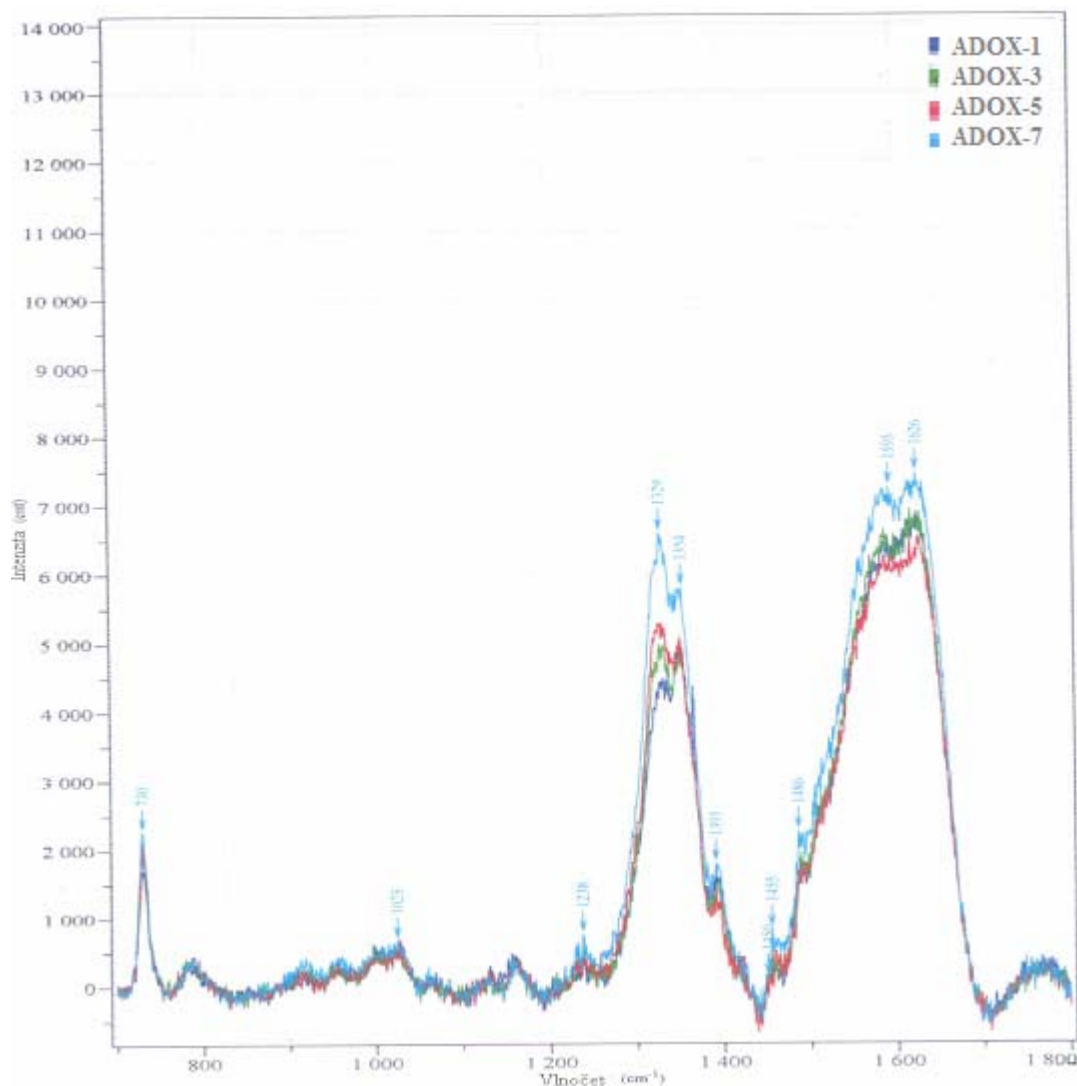
DOXA-1, 3, 5, 7, 10 spektra roztoku DOX s A<sub>12</sub>, přidáváno do Ag koloidu v pořadí 1. DOX, 2. A<sub>12</sub>, inkubace 1, 3, 5, 7, 10 min v Ag koloidu před měřením.

Oproti spektrům DOX-DNA byla pozorována 3 x vyšší intenzita píků. To bylo způsobeno přidáním síranu, který funguje jako agregační činidlo. Během sledování v čase intenzity spekter oscilovaly. Ze srovnání hodnot vlnočtů intenzivních píků je jasné, že interkalace nastává poněkud odlišně od interkalace do DNA (viz. tabulka č. 14)

**Tabulka č. 14 – Vlnočty spekter komplexů DOX-DNA a DOX-A, jejich přiřazení**

vlnočty ( $\text{cm}^{-1}$ )				přiřazení
DOX-DNA	DOX-A <sub>12</sub>	A <sub>12</sub> -DOX	komplex	
	731	730	730	dýchací vibrace ar.kruhu adeninu
	781	780	780	
985	982		984	dýchací kruh
	1015	1025		vibrace cukerného zbytku
1068	1065			deformační vibrace (C-H)
1087	1085			skeletární deformace
			1151	deformační vibrace (C-H)
1162				vibrace imidazolového kruhu guaninu
1211	1206		1206	deformační vibrace (O-H)
		1238	1232	deformační vibrace (O-H)
1248	1247			deformační vibrace (O-H)
1271	1269		1263	valenční vibrace kruhu
	1333	1329	1327	valenční vibrace ar. kruhu adeninu
	1351	1354		valenční vibrace kruhu
	1400	1391		valenční vibrace kruhu
1413			1409	valenční vibrace kruhu
1439				deformační vibrace (CH <sub>2</sub> )
	1455	1455	1455	valenční vibrace kruhu
1579	1573	1575	1573	valenční vibrace kruhu
1639	1624	1626	1628	valenční vibrace (C=O)

Z tabulky je zřejmé, že přibýly vibrace způsobené adeninem (731, 1333, 1351, 1400 a 1455  $\text{cm}^{-1}$  pro DOX-A<sub>12</sub>). Charakteristický pík pro A je v oblasti okolo 731  $\text{cm}^{-1}$ . Ze srovnání obrázků číslo 37 a 38 je zřejmé, že pokud byl první dán do roztoku oligonukleotid A<sub>12</sub>, vymizely skoro pásy v oblasti mezi 1200 – 1300  $\text{cm}^{-1}$ . Ty náležejí deformačním vibracím O-H a valenčním vibracím kruhu (u doxorubicinu). Dále byl pozorován také pokles intenzit píků okolo 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Ty jsou přiřazovány valenčním vibracím kruhu. To naznačuje, že pokud je oligonukleotid A<sub>12</sub> v roztoku první obsadí povrch Ag koloidu tak, že doxorubicin nemá na povrch dostatečný přístup. Také intenzity zbylých píků ve spektru A<sub>12</sub>-DOX jsou oproti spektrům DOX-A<sub>12</sub> skoro poloviční. (viz níže obrázek číslo 34)



**Obrázek č. 34 – Komplex DOX-A, pořadí: 1.A<sub>12</sub>**

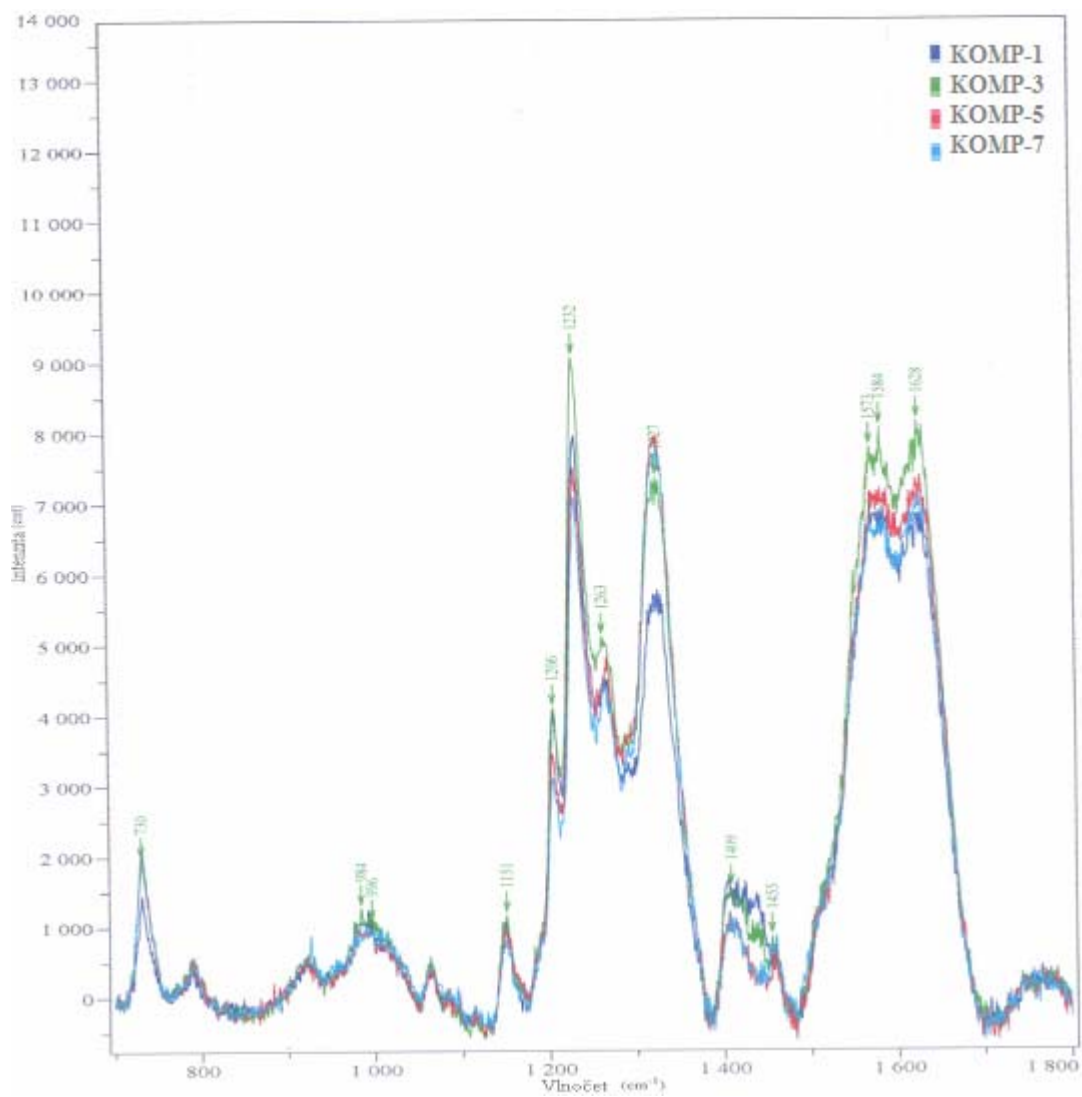
$$c_{\text{DOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$c_{\text{A}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

ADOX-1, 3, 5, 7 spektra roztoku DOX s A<sub>12</sub>, přidáváno do Ag koloidu v pořadí 1. A<sub>12</sub>, 2. DOX, inkubace 1, 3, 5, 7 min. v Ag koloidu před měřením

Byly srovnávány všechny tři možnosti (obr.č. 33, 34 a 35) tedy spektra vzniklá změnami pořadí a spektra 3. možnosti – nejprve vznik komplexu A<sub>12</sub>-DOX (dále značeno KOMP) pak teprve aplikace do koloidu. Na obrázku číslo 35 je zřetelný nárůst intenzit píků mezi 1200 - 1400 cm<sup>-1</sup>. To naznačuje, že není bráněno částem doxorubicinové molekuly způsobujícím tyto vibrace adsorpci na povrch koloidu. Jedná se převážně o deformační vibrace O-H a valenční vibrace kruhu.

V oblasti mezi 1400 – 1500 cm<sup>-1</sup> jsou intenzivní píky stejně jako ve spektrech, kdy byl do Ag koloidu nejprve dáván doxorubicin. Když byl nejprve dáván oligonukleotid píky vymizely. Ve spektrech KOMP (obr.č. 35) jsou nejintenzivnější píky ty s hodnotami vlnočtů okolo 1232 a 1327 cm<sup>-1</sup>. Oba bývají přisuzovány valenčním vibracím kruhu. Pokud tedy probíhá interakce mezi doxorubicinem a oligonukleotidem A<sub>12</sub> mimo koloid, nejsou tyto vibrace nijak ovlivňovány.



**Obrázek č. 35 – Komplexy DOX-A**

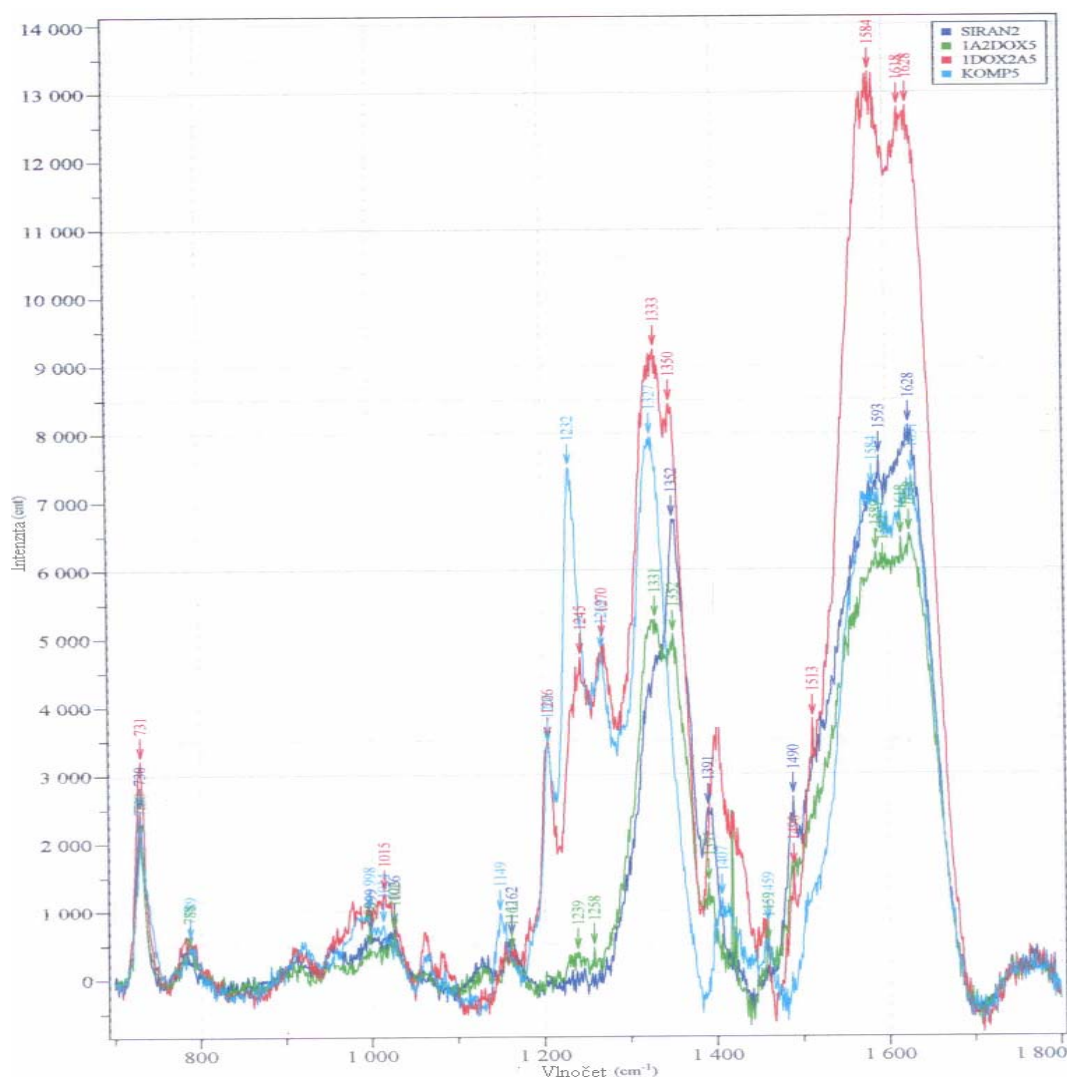
$c_{\text{DOX}} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

$c_{\text{A}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

KOMP-1, 3, 5, 7 spektra roztoku DOX s  $\text{A}_{12}$ , přidáváno do Ag koloidu po předcházejícím smíchání, inkubace 1, 3, 5, 7 min. v Ag koloidu před měřením



### 3.5.9 Srovnání A-DOX, DOX-A, KOMP a samotného A<sub>12</sub> se síranem



Obrázek č. 36 – Spektra komplexů DOX-A<sub>12</sub>, 1.DOX-2.A<sub>12</sub>, 1.A<sub>12</sub>-2.DOX a samotný A<sub>12</sub>

Na obrázku číslo 36 je možné přímé srovnání vybraných spekter. Lze říct, že do 1200 cm<sup>-1</sup> nejsou mezi spektry komplexů s různým pořadím a samotným adeninem se síranem žádné velké rozdíly. V oblasti mezi 1200 – 1300 cm<sup>-1</sup> nejsou výraznější píky u spekter samotného A a komplexu A-DOX, naopak ve spektrech KOMP a komplexu DOX-A jsou intenzivní píky. Pro KOMP jde o píky v oblasti okolo 1206 a 1232 cm<sup>-1</sup>, pro DOX-A o píky v oblasti okolo 1206, 1245 a 1270 cm<sup>-1</sup>. Mezi hodnotami vlnočů 1300 a 1400 cm<sup>-1</sup> mají všechna spektra intenzivní píky okolo 1330 cm<sup>-1</sup> a všechna mimo KOMP v oblasti okolo 1350 cm<sup>-1</sup>. Mezi 1500 – 1800 cm<sup>-1</sup> mají všechna spektra intenzivní pásy okolo 1584 a 1628 cm<sup>-1</sup>. Největší intenzitu má spektrum DOX-A. Ve spektru KOMP jsou nejintenzivnější píky okolo 1232 a 1327 cm<sup>-1</sup>, pík 1232 cm<sup>-1</sup> není v žádném jiném spektru.

### III. Závěr

V textu byly shrnuty známé informace o vibrační spektroskopii a zejména o SERRS. Metoda se ukazuje jako vhodnou pro studium biologických látek v jejich přirozeném prostředí, ve vodném roztoku. Díky SERRS lze sledovat změny struktury vyvolané změnami fyzikálně-chemických parametrů, ale i dynamiku strukturních přechodu. Metodou SERRS byla měřena antracyklinová antibiotika, převážně doxorubicin.

Hlavní cílovou strukturou pro cytostatický efekt antracyklinů je DNA v jádře buňky. Antracykliny mají schopnost interkalace, tj. vmezeřování se mezi páry bazí DNA a inhibice funkce topoizomerázy II. Důsledkem je inhibice replikace a transkripce DNA a RNA. Přestože je známo, že anthracykliny mají schopnost zasahovat do řady biochemických a biologických funkcí eukaryotických buněk, přesný mechanismus cytotoxických a antiproliferativních účinků doxorubicinu nebyl dosud plně vysvětlen. Kvůli možnosti jasnějšího vysvětlení mechanismu účinku, byl studován vznik komplexu léčiv s DNA.

Již dříve byly provedeny studie možné interkalace doxorubicinu do DNA. Výsledky, které byly získány během této práce, odpovídají výsledkům získaným jinými laboratořemi. Pokud se hodnoty vlnočtů odlišovaly, jednalo se pouze o 2 – 3  $\text{cm}^{-1}$ . To mohlo být způsobeno odlišným nastavením laseru.

Byla provedena měření nových léčiv odvozených od doxorubicinu. Pyrazol-doxorubicin, je derivát doxorubicinu, jenž obsahuje v molekule cukru namísto  $-\text{NH}_2$  pyrazolový kruh. Dával prakticky totožná spektra se spektry doxorubicinu, ale v komplexu s DNA všechny výrazné píky zmizely. To naznačuje úplnou interkalaci nebo jinou interakci mezi PYR a DNA. To by mohlo znamenat, že by se pyrazol-doxorubicin mohl stát vhodnějším lékem na léčbu rakovinotvorných buněk. To by však musely potvrdit i studie provedené jinými metodami, případně přímo pokusy s živými buňkami.

Byla provedena také měření látky N2-DOX, N1-DOX. Jednalo se o ve vodě rozpustné práškové polymery s enzymaticky (pro N2-DOX) a hydrolyticky (pro N1-DOX) řízeným uvolňováním léčiva. U vzorku N1-DOX byla zjištěna značná nestabilita, látka se velmi rychle rozpadala, změřená spektra byla tedy velmi podobná spektrům samotného doxorubicinu. V případě N2-DOX byly zjištěny značné odlišnosti. Proto byla provedena také měření samotného nosiče (látka N2-DOX bez doxorubicinu). Ten sám o sobě nedává žádné intenzivní spektrum. Jeho kombinacemi s doxorubicinem byly získány spektra, která naznačují, že nosič zvýrazňuje intenzity píků samotného doxorubicinu a nepatrně mění jejich polohu. Vliv na to, v jak velké míře byla intenzita zvýšena, mělo pořadí, jestli byl první přidán doxorubicin, nebo byl první nosič. To naznačuje možnou změnu orientace doxorubicinu díky nosiči, nebo případnou změnu náboje a tím i změnu adsorpce na povrch Ag koloidu. Pokud byl nosič přidán jako první nebyl nárůst intenzity tak značný, to naznačuje, že proběhla částečná adsorpce nosiče na povrch koloidu a tím bylo částečně bráněno doxorubicinu v adsorpci.

Byly získány také spektra komplexu doxorubicinu s jednořetězovým oligonukleotidem  $A_{12}$  (model ssDNA). Opět byla provedena srovnání spekter s ohledem na jejich pořadí přidávání do koloidu. Ukázaly se značné rozdíly v polohách pásů vzhledem k pořadí. Když byl nejprve dáván adenin, bylo spektrum velmi podobné spektru samotného oligo  $A_{12}$ , neboť ten byl adsorbován na povrch Ag koloidu a doxorubicin jej nemohl již vytěsnit z povrch. Naopak když byl nejprve aplikován do Ag koloidu doxorubicin a pak až oligo  $A_{12}$ , doxorubicin se adsorboval na povrch a také již nemohl být ve značné míře vytlačen oligonukleotidem. Samotný  $A_{12}$  poskytuje po adsorpci na povrch Ag koloidu, který byl aktivován přídatkem

síranu intenzivní SERRS spektra. Ve spektru roztoku, který byl připraven tak, že byl doxorubicin nejprve smíchán s oligonukleotidem a pak až aplikován do roztoku Ag koloidu se síranem, byly pozorovány nové píky v oblasti mezi  $1200 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ . Ty náleží valenčním vibračním kruhu. Vibrace této části molekuly doxorubicinu nejsou ovlivňovány vazbou s DNA, naopak se díky této vazbě dostanou do kontaktu s povrchem Ag koloidu.

Tato práce sice nepostačí k rozhodnutí, zda je některé léčivo vhodnější pro použití než doxorubicin, ale naznačuje možné interakce mezi DNA a jinými léčivy. To by mohlo pomoci k objasnění prostorového uspořádání komplexu DNA-léčivo po interkalaci.

#### IV. Seznam použitých zdrojů

- [1] Churáček J., Kotrlý S.: *Analytická chemie II.* vyd. Pardubice, VŠCHT Pardubice, 1983, 189.
- [2] Trchová M.: *Jak vibrují atomy.* 2002. poslední revize stránek 12.10.2003, [cit. 2007-20-03]. <trchova@imc.cas.cz>
- [3] Horák M., Papoušek D.: *Infračervená spektra a struktura molekul.* vyd. Praha: Academia, 1976, 214.
- [4] Obrázek URL: <[http://skripta.dictor.net/obecna\\_min/o\\_65.php#](http://skripta.dictor.net/obecna_min/o_65.php#)> [cit. 2007-15-06].
- [5] Baumruk V.: *Infračervená a Ramanova spektroskopie-Co nám mohou vibrace říct o (bio) molekulách,* Praha: Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Fyzikální ústav UK., 1997, 129.
- [6] Otyepková E., Kvítek L., Otyepka M., Panáček A.: *Infračervená spektroskopie,* 2004, poslední revize stránek 1.2. 2005, [cit. 2007-12-02] <[http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/ir/ir\\_teorie.htm](http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/ir/ir_teorie.htm)>
- [7] Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J.: *Raman spektra of pyridine adsorbed at silver electrode,* Chemical Physics Letters 26, 1973, 163 – 166.
- [8] Kiefel W.: *Infrared and Raman Spectroscopy Methods and Applications Weiehm,* Surface enhanced Raman scattering (SERS) in Schrader, B. (ed.), 1995, 489 – 498.
- [9] Otto A.: *The chemical (electronic) contribution to surface enhanced Raman scattering,* Journal of Raman Spectroscopy 36, 2005, 497 – 509.
- [10] Li X., Wang Y., Jia H., Song W., Zhao B.: *Koloids in the SERRS,* Journal of Raman Spectroscopy 36, 2005, 635 – 639.
- [11] Drachev V.P., Thoreson M.D., Nashine V., Khaliullin N., Ben-Amotz D., Davisson V.J., Shalaev V.M.: *SERRS of DNA,* Journal of Raman Spectroscopy 36, 2005, 648 – 656.
- [12] Brabec V., Niki K.: *DNA SERRS in koloids,* Biophysical Chemistry 23, 1983, 63 - 68 .
- [13] Nabiev I.R., Sokolov K.V., Voloqin O.N.: *DNA SERRS on elektrods,* Journal of Raman Spectroscopy 21, 1990, 333 – 335.
- [14] Rosypal S.: *Molekulární biologie,* Brno, 1998, 220 – 230.
- [15] *Molekulární základy dědičnosti,* [citace dne 22.3. 2009] <[http://www.eamos.cz/amos/koz/externi/koz\\_2627/molekularni\\_zaklad\\_dedicnosti.pdf](http://www.eamos.cz/amos/koz/externi/koz_2627/molekularni_zaklad_dedicnosti.pdf)>
- [16] Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie díl 1,* Brno 2003, 150
- [17] Meyer P.: *Chromatin remodelling,* Current Opinion in Plant Biology 4, 2001, 457 - 462.
- [18] Původ života, [citace dne 15.2.2009], poslední revize 28.6. 2008, <<http://sagan.blog.cz/0807/puvod-zivota-2-3>>
- [19] Tan C., Tasana H., Kou-Ping Y. et al.: *Daunomycin, An Antitumor Antibiotic,* In the Treatment of Neoplastic Disease, Clinical Evaluation with Special Reference to Childhood Leukemia 20, 1967, 333 – 353.
- [20] Pigram W.J., Fuller W., *Nature,* Hamilton L.D. 17, 1972, 235.
- [21] Remers W.A.: *The Chemistry of Antitumor Antibiotics,* Wiley: New York 1, 1979
- [22] Rizzo V., Pence S., Menozzi M.: *Anti-Cancer Drug* 3, 1998, 103.
- [23] Arcamode F.: *Antitumor drugs,* Medical Res. Reviue 4, 153 – 188.
- [24] Česká onkologická společnost: [citace dne 10.2.2009] <<http://www.linkos.cz/pacienti/lecba/leciva.php?latka=doxorubicin>>
- [25] Li-Chan E.C.Y.: *The applications of Raman spectroscopy in food science,* Trends in Food Science and Technology 7, 1996, 361 – 370.
- [26] Gelder J.D., Gussem K.D., Vandenabeele P., Moens L.: *Reference databaze of Raman spektra of biological molecules,* Journal of Raman Spectroscopy 15, 2007, 210 – 225.

- [27] Duguid J., Bloomfield V. A., Benevides A. J., Thomas G. J.: *Raman Spectroscopy of DNA-Metal Complexes*, Biophysical Journal 65, 1993, 1916 – 1928.
- [28] Beljebbar A., Sockalingum G.D., Angiboust J.F., Manfait M.: *Comparative FT SERS, resonance Raman and SERRS studie sof doxorubicin and its komplex with DNA*, Spectrochimica Acta Part A 51, 1995, 2083 – 2090.
- [29] Nonaka Y., Tsuboi M., Nakamoto K.: *Comparative Study of Aclacinomycin versus Adriamycin by means of Resonance Raman Spectroscopy*, Journal of Raman spectroscopy 21, 1990, 133 – 141.
- [30] Smulevich G., Marzocchi P.: *Chem. Phys.* 105, 1986., 159
- [31] Smulevich G., Angeloni L., Giovannardi S., Marzocchi M. P.: *Chem. Phys.* 65, 1982, 313 – 322.

## V. Seznam použitých zkratk

SERRS – Povrchem zcitlivělá rezonanční Ramanova spektroskopie

SERS – Povrchem zcitlivělá Ramanova spektroskopie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

IČ (IR) – infračervená spektroskopie

RS – Ramanova spektroskopie

T – transmitance (propustnost)

A – absorbance

$\mu$  – redukovaná hmotnost

$m_{A,B}$  – hmotnost atomu A, B

E – potenciální energie

$\nu$  – frekvence oscilátoru

k – silová konstanta

n – vibrační kvantové číslo

$d_x$  – souřadnice meziatomových vzdáleností

A – adenin

G – guanin

T – thymin

C – cytosin

DOX – doxorubicin

FT-SERS – Fourierova transformace SERS

NIR – blízká infračervená spektroskopie

$\nu$  – valenční vibrace

$\delta$  – deformační vibrace

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

CD – cirkulární dichroismus

RR – rezonanční Raman

dsDNA – dvouvláknová (nativní) DNA

ssDNA – jednovláknová (denaturovaná) DNA

PYR – pyrazol-doxorubicin

N1-DOX – konjugát poly(HPMA-co-MA-Akap-NHN=DOX)

N2-DOX – konjugát poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)

KOMP – komplex A<sub>12</sub>-DOX