

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Nikola Königová

Interakce alkaloidů s DNA in vitro

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Olomouc, 2011

Prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jana Vacka, Ph.D., s použitím uvedené literatury a experimentálních výsledků získaných na Ústavu lékařské chemie a biochemie v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Nikola Königová

Mé dík patří Janu Vackovi, vedoucímu mé bakalářské práce, za ochotu, odborné vedení a trpělivost při zpracování bakalářské práce. Dále děkuji Martině Zatloukalové za pomoc při práci v laboratoři a celému ULCHB za příjemné pracovní podmínky a cenné rady při řešení experimentů.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Nikola Königová

Název práce: Interakce alkaloidů s DNA *in vitro*

Typ práce: Bakalářská

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc

Školitel: Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt:

Práce popisuje oxidaci sanguinarinu (SG) a jeho metabolitu dihydrosanguinarinu (DHSG) na povrchu pyrolytické grafitové elektrody (PGE). Oba alkaloidy se silně adsorbují na povrch PGE. Pro měření byly použity *ex situ* voltametrické metody, adsorpční přenosová (AdT) cyklická voltametrie (CV) a voltametrie s pravoúhlým vkládaným napětím (square-wave voltammetry - SWV). Oxidace SG a DHSG byla pozorována při hodnotě potenciálu kolem +0,7 V (vs. Ag|AgCl|3M KCl). Elektrochemické výsledky byly následně aplikovány pro studium interakce SG a DHSG s DNA *in vitro* dle již dříve zavedené metody. Analýza interakce alkaloidu s DNA byla založena na pozorování výšky oxidačních píků SG a DHSG po inkubaci alkaloidů s nadšroubovicovou DNA (scDNA) [pBSK₍₋₎]. Výsledky ukázaly, že SG se interkaluje do dvoušroubovicové struktury scDNA. DHSG, který nemá striktně planární strukturu, nevykazuje interkalaci.

Klíčová slova: isochinolinové alkaloidy, sanguinarin, dihydrosanguinarin, voltametrie, adsorpce a oxidace, nadšroubovicová DNA (scDNA)

Počet stran: 41

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Nikola Königová

Type of thesis: Bachelor

Department: Bioorganic chemistry B1407

Advisor: Ing. Jan Vacek, Ph.D.

The year of presentation: 2011

Abstract:

This study describes oxidation of sanguinarine (SG) and its metabolite dihydrosanguinarine (DHSG) on the surface of a basal-plane pyrolytic graphite electrode (PGE). Since both alkaloids strongly adsorb onto the surface of pyrolytic graphite, measurements were performed using *ex situ* voltammetric methods, adsorptive transfer (AdT) cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetry (SWV). Oxidation of SG and DHSG were observed around the potential of +0.7 V (vs. Ag/AgCl/3M KCl). The electrochemical results and optimized AdT SWV were subsequently applied for study of the interactions of SG and DHSG with DNA *in vitro*. Analysis of the alkaloid/DNA interactions was based on observing heights of oxidation peaks SG and DHSG after incubation with supercoiled (sc) DNA [pBSK₍₋₎]. The results suggest that SG intercalates into the double-stranded structure of scDNA. DHSG did not show intercalative DNA binding.

Keywords: isoquinoline alkaloids, dihydrosanguinarine, voltammetry, adsorption and oxidation, supercoiled DNA

Number of pages: 41

Language: czech

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 KVARTÉRNÍ BENZO[c]FENANTHRIDINOVÉ ALKALOIDY	9
2.1.1 Struktura KBA	9
2.1.2 Chemické vlastnosti KBA	10
2.1.3 Biologické účinky KBA	11
2.2 NUKLEOVÉ KYSELINY A JEJICH INTERAKCE	14
2.2.1 Interakce nukleových kyselin	17
2.3 ELEKTROCHEMICKÉ METODY A JEJICH VYUŽITÍ PŘI STUDIU DNA A JEJICH INTERAKCÍ	18
2.3.1 Elektrochemické metody	18
2.3.2 Elektrody používané pro analýzu DNA	20
2.4 INTERAKCE KBA S DNA	22
2.4.1 Interakce vybraných alkaloidů s ctDNA	22
2.4.2 Interakce SG s DNA	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1 CHEMIKÁLIE	26
3.2 ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA	26
3.3 ESI/MS a HPLC alkaloidů	27
3.4 VÝSLEDKY A DISKUZE	29
4. ZÁVĚR	36
5. LITERATURA	38

1. ÚVOD

Alkaloidy jsou rostlinné organické dusíkaté látky¹. Biogenese většiny alkaloidů se odvíjí od několika aminokyselin (fenylalanin, tryptofan, ornithin, lysin, histidin a kyselina anthranilová)². Poskytují rostlině ochranu před škůdci³.

Společnou vlastností alkaloidů je bazicita vyvolaná přítomností atomu dusíku v molekule, a to nejčastěji dusíku umístěného v heterocyklu. Alkaloidy jsou často ve vodě málo rozpustné. Jsou obsaženy především ve vyšších rostlinách, i když byly prokázány i v některých plavuních, přesličkách a houbách. Odhaduje se, že 10–20 % všech rostlin obsahuje alkaloidy².

Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA) jsou nízkomolekulární sekundární rostlinné metabolity spadající do rozsáhlé skupiny isochinolinových alkaloidů. V rostlinách se vyskytují v minoritním podílu, a to v čeledi Pryskyřníkovité (Ranunculaceae), Zemědýmovité (Fumariaceae), Rutovité (Rutaceae) a Mákovité (Papaveraceae)⁴. Do poslední čeledi patří i u nás hojně se vyskytující vlaštovičník větší (*Chelidonium majus*). Tyto alkaloidy mají významné biologické aktivity, za zmínku stojí zejména jejich antimikrobiální⁵, protizánětlivé⁶, antiproliferační⁷ a antiapoptotické⁸ účinky.

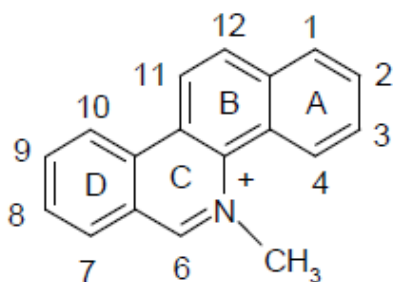
Cílem předkládané bakalářské práce je podat přehled dostupných informací o problematice interakcí alkaloidů s DNA. V experimentální části pak analýza interakcí sanguinarinu a jeho dihydrometabolitu s DNA. Ke studiu alkaloidů budou použity elektrochemické metody.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 KVARTÉRNÍ BENZO[c]FENANTHRIDINOVÉ ALKALOIDY

2.1.1 Struktura KBA

Základem struktury KBA je *N*-methylbenzo[*c*]fenanthridinový kation (Obr. 1). Na něm jsou navázané hydroxylové, methoxylové a methylendioxylové skupiny. Čtyři spojené aromatické kruhy jsou označeny písmeny A, B, C, D. Dusíkový atom se nachází v pozici 5 a nese methylovou skupinu a kladný náboj. Vazba mezi dusíkem N5 a uhlíkem C6 se nazývá iminová ($C=N^+$) a je pravděpodobně nejreaktivnějším místem v molekule^{8,9}.

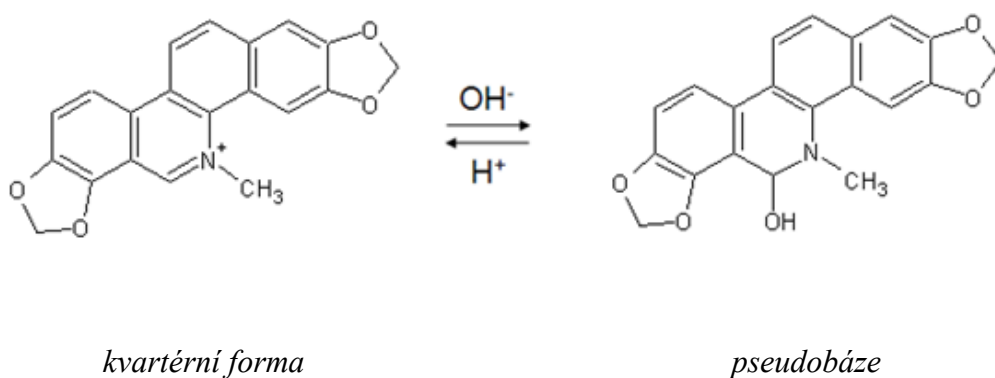


Obr. 1: *N*-methylbenzo[*c*]fenanthridinový kation.

2.1.2 Chemické vlastnosti KBA

KBA jsou náchylné k nukleofilnímu ataku na iminiovou vazbu. Iminiová vazba snadno podléhá redukci za vzniku dihydroderivátů. Kvartérní kation alkaloidu je barevný a ve vodě rozpustný, vzniklý adukt s trojvazným atomem dusíku je bezbarvý a ve vodě nerozpustný⁸.

Jedním z nejvíce studovaných KBA je sanguinarin (SG). V alkalickém prostředí se SG vyskytuje ve formě pseudobáze (alkanolaminu) a v acidickém prostředí přechází na formu kvartérní¹⁰ (Obr. 2).



Obr. 2: Strukturní formy SG.

2.1.3 Biologické účinky a metabolismus KBA

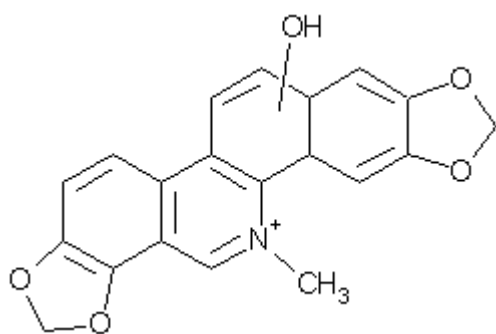
KBA vykazují řadu biologických aktivit. V případě SG byly potvrzeny anti-mikrobiální, protizánětlivé, anti-fugální a anti-parasitické¹¹ účinky a používá se (a) jako komponenta přípravků zabraňujících tvorbě zubního plaku¹², (b) v živočišné výrobě jako aditivum do krmiv, na trhu nabízené pod obchodním názvem jako Sangrovit¹³, (c) při ochraně rostlin jako součást fungicidních a baktericidních preparátů¹⁴. Nicméně jsou diskutovány možné nepříznivé účinky SG, jakožto složky oleje semen rostlin rodu *Argemone*, který může být kontaminantem potravy v rozvojových zemích a způsobuje tzv. „Epidemic dropsy“ syndrom - syndrom otoku kloubů¹⁰.

Biologická aktivita KBA je ovlivněna především planaritou aromatického skeletu, reaktivitou kvartérního kationu, pozicí a charakterem substituentů na kruhu D⁷. Biologicky účinnou strukturou KBA může být jak forma kvartérní¹⁵, tak i forma terciární¹⁶ (viz Obr. 2). Pozorované biologické účinky KBA jsou výrazně ovlivněny schopností SG pronikat přes rozhraní membrán, rychlosti a typu biotransformace. Za fyziologického pH (7,2–7,4) buněčnou membránou prochází jak forma terciární, tak i kvartérní¹⁷. Rychlost průniku obou forem alkaloidů do buňky se liší v závislosti na velikosti rovnovážné konstanty tvorby pseudobáze¹⁸. V organismu (gastrointestinálním traktu) SG konvertuje na DHSG¹⁹.

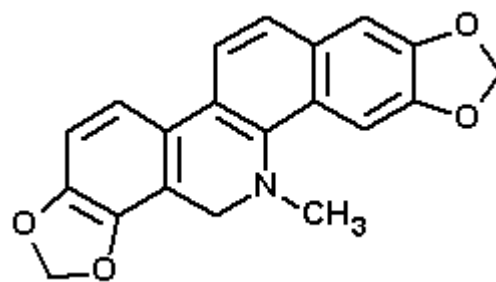
DHSG je metabolit, který může v organismu vznikat účinkem NAD(P)H jako redukčního kofaktoru. K redukci může docházet i působením reduktáz. Významně vyšší úroveň DHSG byla v porovnání se SG pozorována v plasmě a játrech, kde dochází k jeho dalším přeměnám^{20,21}. Ve studii Kosiny et al²² byly identifikovány metabolity KBA (SG, CHE) na lidských hepatocytech pomocí HPLC/ESI. Popsána byla I. a II. fáze biotransformace v organismu. Uvádí se, že alkaloid (SG) je redukován NAD(P)H nebo reduktázami na dihydrometabolit (DHSG), který může být oxido-reduktázou převeden zpět na SG. V I. fázi biotransformace je dihydrometabolit nebo SG samotný oxidován cytochromem P450 na formy O-demethylenovaného/O-demethylovaného či hydroxy metabolitů SG/DHSG. Ve II. fázi biotransformace jsou metabolity s hydroxy skupinou pomocí sulfotransferáz a glukoronosyltransferáz konjugovány a dochází k jejich eliminaci²². Struktury metabolitů sanguinarinu jsou uvedeny na Obr. 3.

Účinek KBA je pleiotropní. KBA v organismu ovlivňují funkci řady enzymů, příkladem může být Na⁺/K⁺-ATPáza, která je pravděpodobně jedním z cílů SG v buňce.

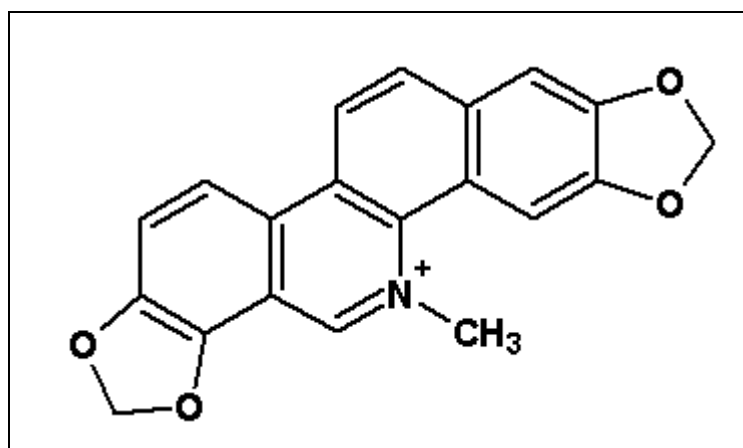
Fluorimetrické experimenty prokázaly, že SG inhibuje Na^+/K^+ -ATPázu, což nebylo potvrzeno pro jeho metabolit DHSG²³.



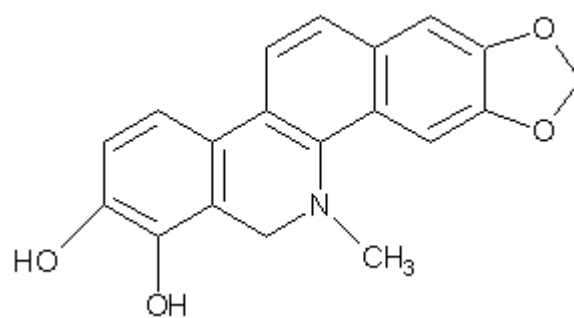
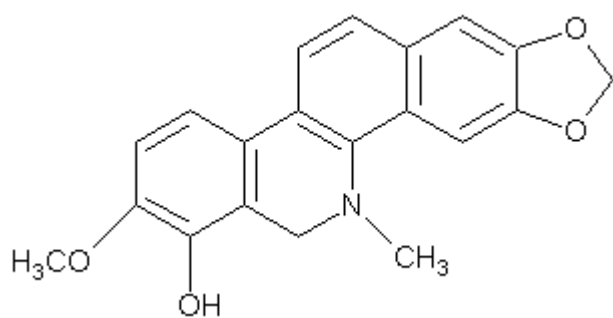
Hydroxysanguinarin



DHSG



SG



O-demethylované metabolity DHSG

Obr. 3: Struktury metabolitů SG/DHSG.

2.2 NUKLEOVÉ KYSELINY A JEJICH INTERAKCE

Nukleové kyseliny slouží v živých organismech k uchovávání a expresi genetické informace vyjádřené sekvencí bází²⁴. DNA je biologická makromolekula - polymer, dvoušroubovice tvořená dvěma řetězci nukleotidů. Nukleotidy jsou složeny z cukru deoxyribózy, fosfátové skupiny a jedné ze čtyř nukleových bází, jimiž může být adenin (A), guanin (G), cytosin (C) nebo thymin (T) (Obr. 4 a 5A). A a G patří mezi puriny, C a T mezi pyrimidiny²⁵. Mezi protilehlými bázemi se vytváří vodíkové můstky, a to vždy mezi G a C nebo mezi A a T^{25,26}.

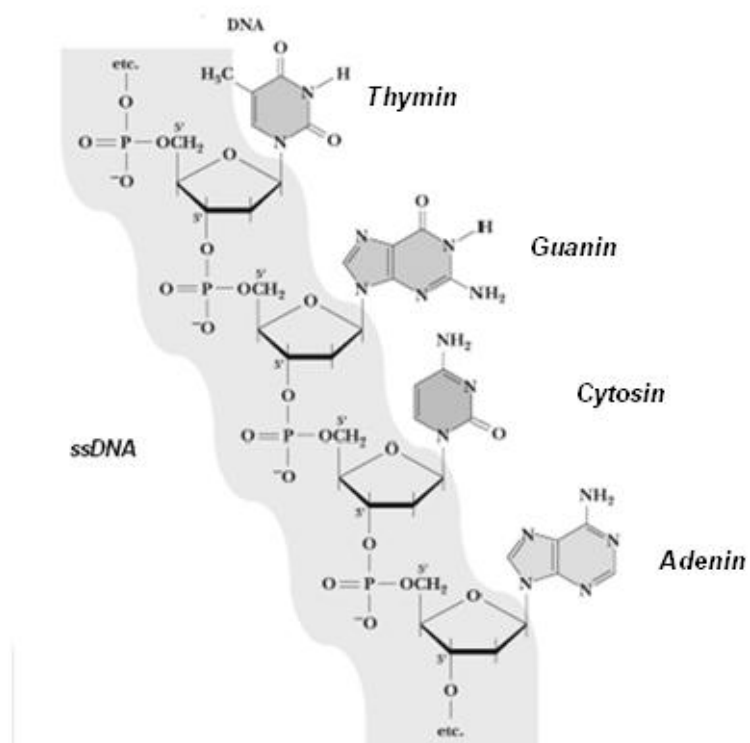
DNA byla poprvé izolována z bílých krvinek v roce 1869 F. Miescherem²⁷. V průběhu druhé poloviny 19. a první poloviny 20. století bylo ve výzkumu DNA učiněno velké množství objevů. Patří sem významný objev F. Griffitha, který uvedl souvislosti DNA s přenosem dědičné informace. Ve výzkumu nukleových kyselin byl důležitým mezníkem (v roce 1953) objev chemické struktury DNA J. Watsonem a F. Crickem^{28,29,30}. Další vývoj v oblasti výzkumu DNA v druhé polovině 20. století byl zaměřený na popis strukturních forem (A, B, Z-DNA), lokálních struktur DNA a popis replikačního a transkripčního procesu^{29,31}.

Proces tvorby dvoušroubovice DNA ze dvou komplementárních vláken ssDNA je označován jako renaturace³². Dusíkaté báze mohou v deoxyribonukleotidovém řetězci vytvářet i jiné typy párování, než jak je tomu v případě Watson-Crickovy dvoušroubovice, proto je možné za určitých podmínek pozorovat tvorbu „alternativních“ DNA struktur. Na základě tzv. Hoogsteenova párování bází tak mohou vznikat DNA struktury, jako jsou intramolekulární triplexy³³. Také může dojít ke tvorbě guaninových tetrad stabilizovaných jednomocnými kationty. Sekvence převrácených repetací mohou vytvářet křížové formy DNA tvořené dvěma protilehlými vlásenkami. Vznik těchto strukturních stavů a forem DNA je řízen především pořadím jednotlivých nukleotidů v řetězci (polymorfismus DNA) a řada z nich je vytvářena a stabilizována negativním nadšroubovicovým vinutím^{31,34}.

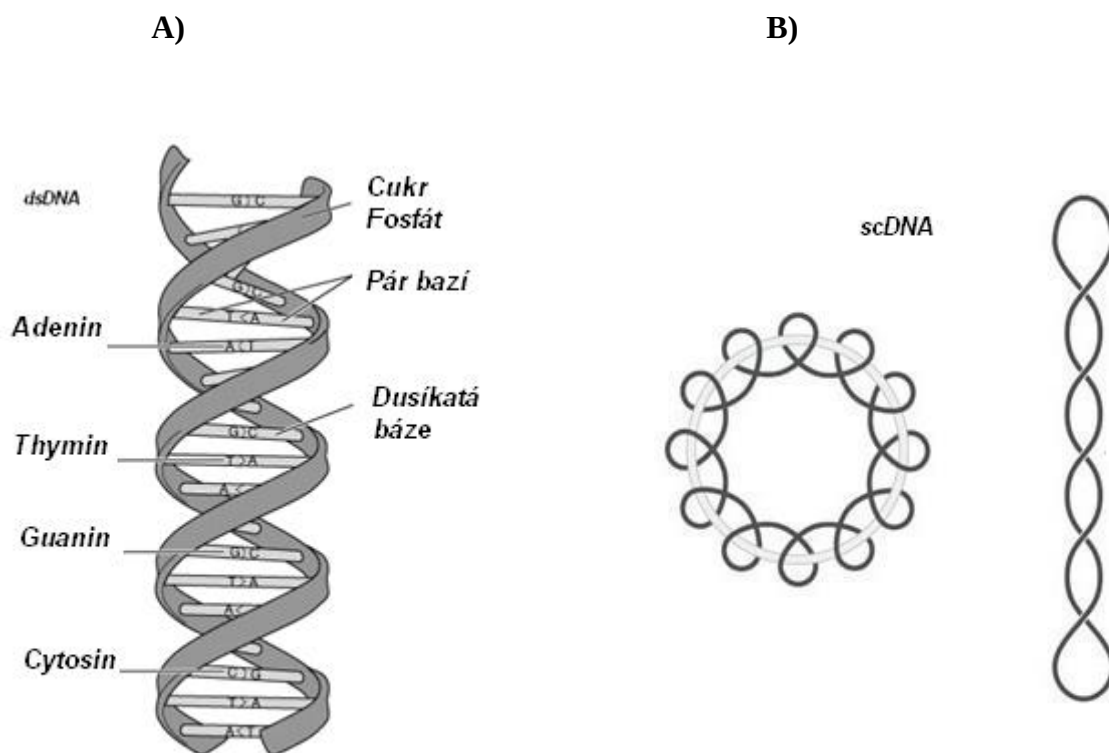
Znalosti struktury DNA jsou důležité při studiu její reaktivity a jejího poškození. Struktura dsDNA sehrává důležitou roli v případě interkalací planárních organických sloučenin mezi páry bází, při vazbě jiných typů sloučenin do žlábků dvoušroubovice a zejména také při interakcích DNA s proteiny^{31,35,36}.

Mnohokrát prokázanou skutečností je, že relaxované cirkulární DNA prokaryotních buněk jsou biologicky neaktivní³⁷. Všechny důležité funkce těchto DNA jsou závislé na

nadšroubovicovém vinutí (supercoiling) (Obr. 5B), které může být kladné nebo záporné^{29,38,39}.



Obr. 4: Struktura jednořetězcové DNA (ssDNA), upraveno viz citace⁴⁰.



Obr. 5:

A) Struktura dvouřetězcové DNA (dsDNA), upraveno viz citace⁴¹.

B) Struktura nadšroubovicové DNA (scDNA), upraveno viz citace⁴².

2.2.1 Interakce nukleových kyselin

Interakce můžeme rozdělit na kovalentní a nekovalentní. Oba typy interakcí hrají důležitou úlohu v biologických systémech. Kovalentní vazby jsou zpravidla kratší než 2 Å, zatímco nekovalentní interakce fungují v rozsahu několika Å. Vznik kovalentních vazeb vyžaduje překrytí částečně obsazených orbitalů atomy, které poskytují elektronový pár⁴³.

DNA je schopna reagovat nebo nekovalentně interagovat s širokým spektrem látek. V případě kovalentních vazeb vznikají adukty, které obvykle nemohou za fyziologických podmínek disociovat. Jinak je tomu v případě nekovalentních interakcí, kde je vazebná energie výrazně nižší než u kovalentní vazby. Energie vazby (disociační energie) je jednou z charakteristik pevnosti vazby mezi dvěma atomy. Udává se zpravidla v $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Součet energií jednotlivých vazeb je přibližně totožný s atomizační energií dané molekuly⁴⁴. Právě díky své reverzibilitě hrají nekovalentní interakce klíčovou úlohu při regulaci replikace a transkripce DNA^{29,45}.

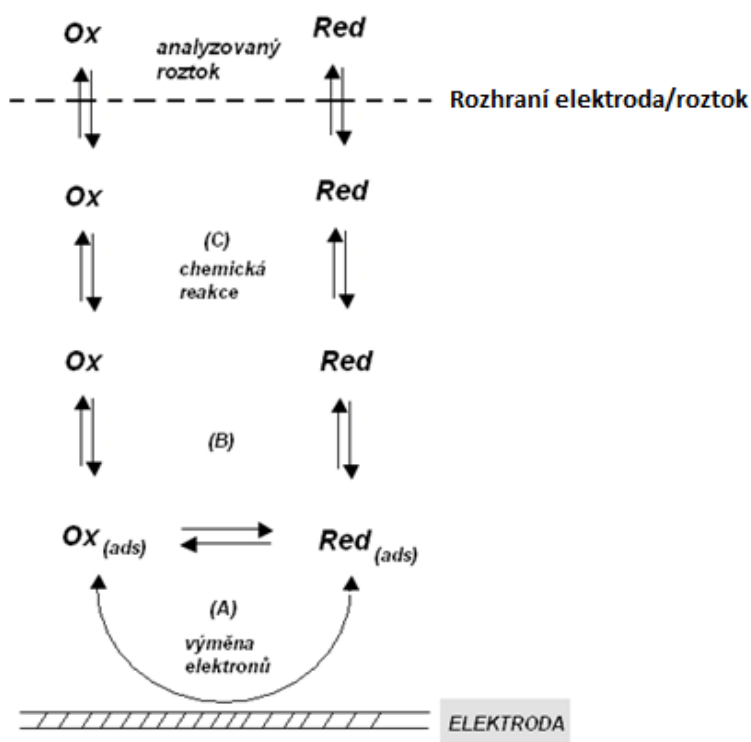
Interkalace je jeden z možných způsobů interakce nízkomolekulární sloučeniny s nukleovou kyselinou. Poprvé se s tímto termínem setkáváme v roce 1961, kdy byl použit pro vysvětlení silné a specifické vazby některých heteroaromatických barviv s nukleovými kyselinami, zvláště DNA³⁷. Azobarviva patří do velké skupiny karcinogenů, které pro svůj karcinogenní efekt vyžadují metabolickou aktivaci (produkci reaktivních metabolitů iniciujících poškození DNA tvorbou aduktů s DNA)⁴⁶. Podrobným studiem se prokázalo, že planární (hetero)-aromatická struktura interkaluje mezi páry basí dvojité šroubovice DNA, přičemž obvykle dochází k její distorzi a denaturaci^{37,47}. Tyto změny mohou ovlivnit vazbu řady enzymů na strukturu DNA, např. při transkripci i replikaci. Interkalace sama o sobě nezahrnuje vytvoření kovalentní vazby, ale podílí se na ní obvykle několik nekovalentních interakcí, především stohové („stacking“) interakce mezi sousedními páry bází, van der Waalsovy interakce, vodíkové vazby a elektrostatické interakce zprostředkované mezi funkčními skupinami interkalátoru a DNA. Formu a rozsah interakce ovlivňuje jak charakter ligandu, vlastnosti prostředí tak i sekvence cílové molekuly nukleové kyseliny³⁸.

2.3 ELEKTROCHEMICKÉ METODY A JEJICH VYUŽITÍ PŘI STUDIU DNA A JEJICH INTERAKCÍ

2.3.1 Elektrochemické metody

Podstatou elektrochemických metod jako je voltametrie (amperometrie) je měření složky proudu v závislosti na potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu, která je ponořena do zkoumaného roztoku. Měřit lze i další elektrické veličiny článku: potenciál E , proud I , elektrický náboj Q , odpor R , vodivost G , kapacita C , relativní permitivita ϵ . Další sledovanou veličinou je čas t ⁴⁸.

Pokud je analyt k dispozici povrchu pracovní elektrody, na kterou je vložen vhodný potenciál, můžeme pozorovat výměnu elektronů mezi elektrodou a studovanou látkou (faradický děj)^{49,50}. Kromě proudových změn vyvolaných touto výměnou elektronů mohou být sledovány kinetické proudy spojené s druhotnou chemickou reakcí, která probíhá na povrchu elektrody nebo je proudová složka ovlivněna adsorpcí látky na povrch elektrody (adsorpčně-desorpční děje)²⁹ (Obr. 6).

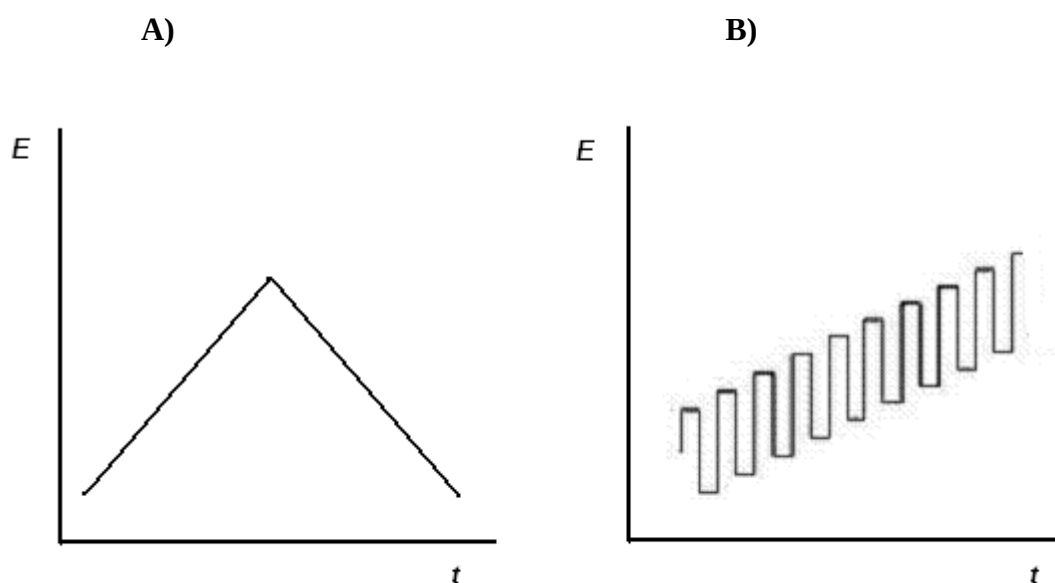


Obr. 6.: Schematické znázornění faradických (A), adsorpčně/desorpčních (B) a kinetických (C) dějů probíhajících na povrchu elektrody. Ox/Red: oxidovaná nebo redukovaná forma analytu; ads: adsorbovaný stav, upraveno viz citace²⁹.

V předkládané práci byly použity dvě metody, cyklická voltametrie (CV) a voltametrie s pravoúhlým vkládaným napětím (square wave voltammetry - SWV).

CV je elektrochemická metoda, při níž se cyklicky mění polarizační napětí elektrody a výsledný proud se měří v závislosti na tomto napětí (Obr. 7). Z toho lze odvodit, že základními nastavitelnými parametry experimentu jsou meze a rychlost posuvu potenciálu^{51,52}.

Při SWV je na elektrodu taktéž vnášen lineárně se měnící potenciál modulovaný napěťovými pulzy, které však jsou pozitivní a negativní vůči potenciálové rampě (Obr. 7). Proud je měřen vždy těsně před změnou potenciálu, tj. ke konci každého vloženého pulzu. Odečítají se od sebe hodnoty proudu na pozitivním pulzu a předchozím negativním pulzu^{52,53}.



Obr. 7: Schéma závislosti polarizačních napětí při CV (A) a SWV (B); schematický tvar E-t závislosti.

2.3.2 Elektrody používané pro analýzu DNA

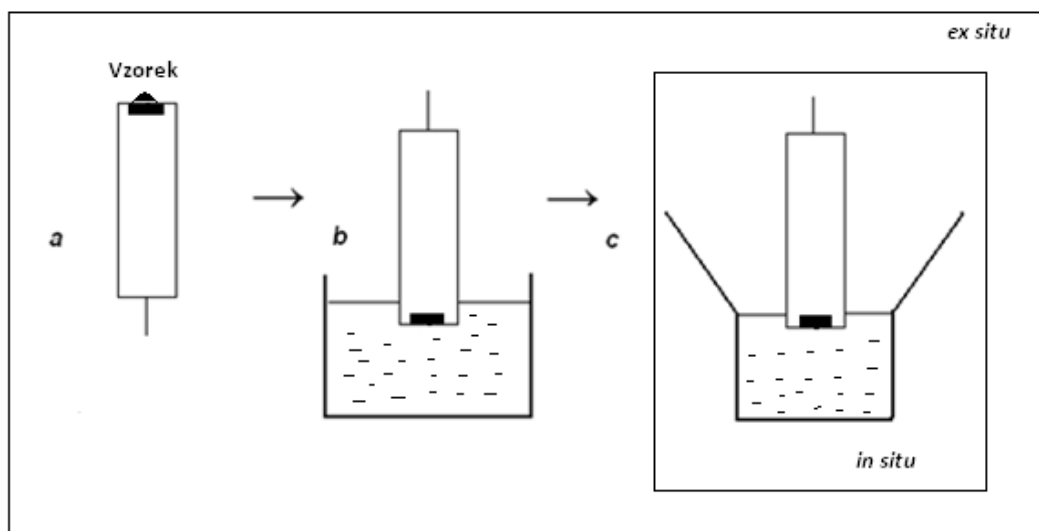
Pracovní polarizovatelné elektrody ve voltametrické analýze bývají z tuhých materiálů (Pt, Au, různé formy uhlíku) nebo rtuťové. Elektrody mohou mít různý tvar. Pracovní elektroda může být ponořena do studovaného roztoku, v takovém případě jsou analyty dopravovány k jejímu povrchu prostou difuzí. Při práci byly použity 2 techniky. Voltametrická analýza *in situ* (Obr. 8c), kdy je vzorek adsorbován na povrch elektrody při akumulacím potenciálu a následně je zaznamenán voltamogram. Při adsorpci *ex situ*, neboli adsorpční přenosové technice, (Obr. 8) je možné adsorbovat vzorek z podstatně menšího množství objemu⁵². *Pomocné elektrody* mají podstatně větší povrch než elektrody pracovní, takže jsou prakticky nepolarizovatelné; obvykle jsou tvořeny platinovým nebo uhlíkovým drátkem či tyčinkou. *Referenční elektrody* jsou obvykle elektrodami II. druhu (kalomelová, argentchloridová)^{52,54}. Mezi nepoužívanější pracovní elektrody v elektrochemii DNA patří rtuťové a uhlíkové elektrody.

Rtuť je ideální elektrodový materiál, který má díky vysokému přepětí vodíku značně široký potenciálový interval v katodickém směru⁵⁵. Na povrchu rtuti dochází (v závislosti na pH elektrolytu) k ireverzibilní redukci cytosinu a adeninu při potenciálech kolem $-1,45$ V, naproti tomu elektrochemicky ireverzibilní redukce guaninu probíhá až ve značně negativních potenciálech $E < -1,6$ V. Experimenty s rtuťovými elektrodami poskytují velmi reprodukovatelné výsledky a byly aplikovány pro stanovení DNA různými elektrochemickými metodami^{5,52,56}. Mezi nejčastěji používané typy rtuťových elektrod patří kapková rtuťová elektroda, visící (stacionární) rtuťová kapková elektroda⁵⁷, rtuťová filmová elektroda a amalgámové elektrody⁵⁸.

Uhlíkové elektrody se poměrně jednoduše čistí, používají se různé modifikace uhlíku, jejichž povrch se dá obrousit, např. jemným brusným papírem. Komplikace však způsobuje jejich pórovitost, která má za následek zadržování roztoku. To vede k vysokým nadbytečným proudům a ke špatné reprodukovatelnosti měřeného signálu⁵⁹. Pórovitost se snižuje impregnací elektrody nebo použitím pyrolytického grafitu, či skelného uhlíku. Na rozdíl od rtuťových elektrod, umožňují pozorovat oxidační děje, které probíhají při pozitivních potenciálech^{56,60}.

Z kovových materiálů se pro pevné elektrody používají platina, zlato, někdy měď. Méně ušlechtilé materiály nejsou vhodné, podléhají totiž vedlejším reakcím se složkami roztoku. Povrch elektrod musí být většinou modifikován⁵⁶.

Ex situ voltametrie (Adsorpční přenosová technika)



Obr. 8: Schéma *ex situ* techniky. Vzorek (a) je adsorbován na povrch pracovní elektrody, (b) odmytí interferujících látek, (c) elektrochemické měření, upraveno viz citace⁵⁶.

2.4 INTERAKCE ALKALOIDŮ S DNA

2.4.1 Interakce vybraných alkaloidů s ctDNA

Byly studovány interakce alkaloidů s DNA, nejčastěji s DNA izolované z telecího brzlíku a synteticky připravenými oligonukleotidy. Zkoumána byla afinita KBA, morfinových, β -karbolinových, protoberberinových, oxoisoaporphinových a indolových alkaloidů, viz. Tabulka 1.

Skupina alkaloidů	Alkaloid	Metoda stanovení interakce	Podmínky inkubace	Reference
KBA	SG, CHE, chelirubin, sanguilutin, chelilutin, makarpin	Fluorescenční spektroskopie	teplota - 20°C fosfátový pufr; pH 5,3	Urbanová, J. a kol. ⁶¹
Morfinové alkaloidy	morfin	Fluorescenční spektroskopie	teplota - 20°C; 45°C Britton-Robinsonův pufr Tris-HCl; pH 7,4	Li, JF., Dong, C. a kol. ⁶²
β – karbolinové alkaloidy	harmin, harman, harmalin, harmalol, tryptolin	FTIR UV-spektroskopie	teplota – n.u.* fosfátový pufr; pH 7,0	Nafisi, S. a kol. ⁶³
Oxoisoaporphinové alkaloidy	deriváty 9-aminoalkanamido-1-azabenzanthronu	Fluorescenční spektroskopie	teplota - 20°C fosfátový pufr; pH 7,0	Tang, H. a kol. ⁶⁴

Skupina alkaloidů	Alkaloid	Metoda stanovení interakce	Podmínky inkubace	Reference
KBA	SG, CHE, nitidin	Fluorescenční spektroskopie UV-VIS spektroskopie	teplota - $18 \pm 1^\circ \text{C}$ fosfátový pufr; pH 5,3	Bai, L. a kol. ⁶⁵
Protoberberinové alkaloidy	berberin, palmatin, jatrorrhizin, berberrubin, coptisin	ESI-MS spektroskopie Fluorescenční spektroskopie Absorpční spektroskopie	teplota – 20°C Tris-HCl; pH 6,35 kakodylát sodný; pH 7,0	Kluza, J. a kol. ⁶⁶ Chen, W. a kol. ⁶⁷
Indolové alkaloidy	4-(1H-indol-3-yl)butanová kyselina; 3-(1H-indol-3-yl)propanová kyselina; 1H-indol-3-ylethanová kyselina	Fluorescenční spektroskopie Volumetrie	teplota - $26,85^\circ \text{C}$ fosfátový pufr; pH 7,5	Pandya, P. a kol. ⁶⁸

*n.u. – není uvedeno

Tabulka 1: Interakce vybraných alkaloidů s ctDNA

2.4.2 Interakce SG s DNA

Bylo potvrzeno, že SG může interagovat s jadernou a mitochondriální DNA. *In vitro* se SG interkaluje do dsDNA. Analýza $^1\text{H-NMR}$ potvrdila, že SG se interkaluje do DNA izolované z telecího brzlíku. Interakce SG s DNA vyhodnocená kombinací dat z absorpčních a fluorescenčních spekter ukázala, že vazba SG s DNA je závislá na iontové síle, složení roztoku a primární sekvenci DNA. Vazebná afinita SG na DNA byla stanovena v řádu 10^5 mol.l^{-1} ⁶⁹. Pseudobáze neváže DNA, ale přítomnost většího množství DNA, může vést k přeměně na iminiovou formu⁷⁰. Das a spol. studovali interakci SG s B-, Z-, a H^{L} -formami DNA pomocí cirkulárního dichroismu a spektrofotometricky⁶¹. Dřívější studie uvádějí, že SG ve formě kvartérního kationtu se váže na B-formu DNA interkalací, přednostně na sekvence bohaté na GC. SG neinteraguje s formami Z- a H^{L} -DNA, ale mění je na B-formu. Studie potvrdily, že v molekule DNA při interakci SG s GC sekvencemi dochází ke konformačním změnám^{61,71}.

Metodou kapilární elektroforézy bylo prokázáno, že za fyziologického pH nedochází ke kovalentní vazbě SG s DNA. Jejich vzájemná interakce je založena na vzniku nevazebných komplexů pomocí slabé intermolekulární síly^{10,15}. Ke tvorbě kovalentní vazby SG/DNA může docházet pouze po metabolické aktivaci.

Dále literatura uvádí⁶⁹, že SG^+ má vyšší vazebnou afinitu k dvoušroubovicové DNA než pseudobáze SG. SG^+ se tedy interkaluje do struktury DNA, kdežto pseudobáze a DHSG se neinterkalují z důvodu ztráty planarity, snížené rozpustnosti ve vodě a nepřítomnosti kladného náboje, který hraje důležitou roli při interkalaci do DNA, která má náboj záporný¹⁶.

Pro studium interakcí SG byly v práci Vespálce et al¹⁶ vybrány molekuly cysteinu a merkptoethanolu obsahující v molekule skupinu -SH. Bylo doloženo, že SG chemicky nereaguje s touto -SH skupinou při pH 7,4 a že se při této reakci tvoří nekovalentní interakce¹⁶.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 CHEMIKÁLIE

SG byl izolován z rostliny *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. o čistotě 95%. Dihydroderivát alkaloidu (DHSG) byl připraven v čistotě 99% redukcí SG s NaBH_4 v metanolu, ověřeno MS (viz. Odstavec 3.3 a Obr. 9). Pro více informací o izolaci alkaloidu, viz. literatura^{72,73}. Methanol byl získán od firmy Merck (Darmstadt, Německo), pufrý a další chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Všechny roztoky byly připraveny pomocí deionizované vody (Ultrapur, Watrex, Praha, Česká republika). Dusík a helium (99,999% pro oba) byly získané od Linde Gas (Praha, Česká republika). Byla použita plasmidová [pBSK⁽⁻⁾] DNA, která byla připravena dle metodiky⁷⁴.

3.2 ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA

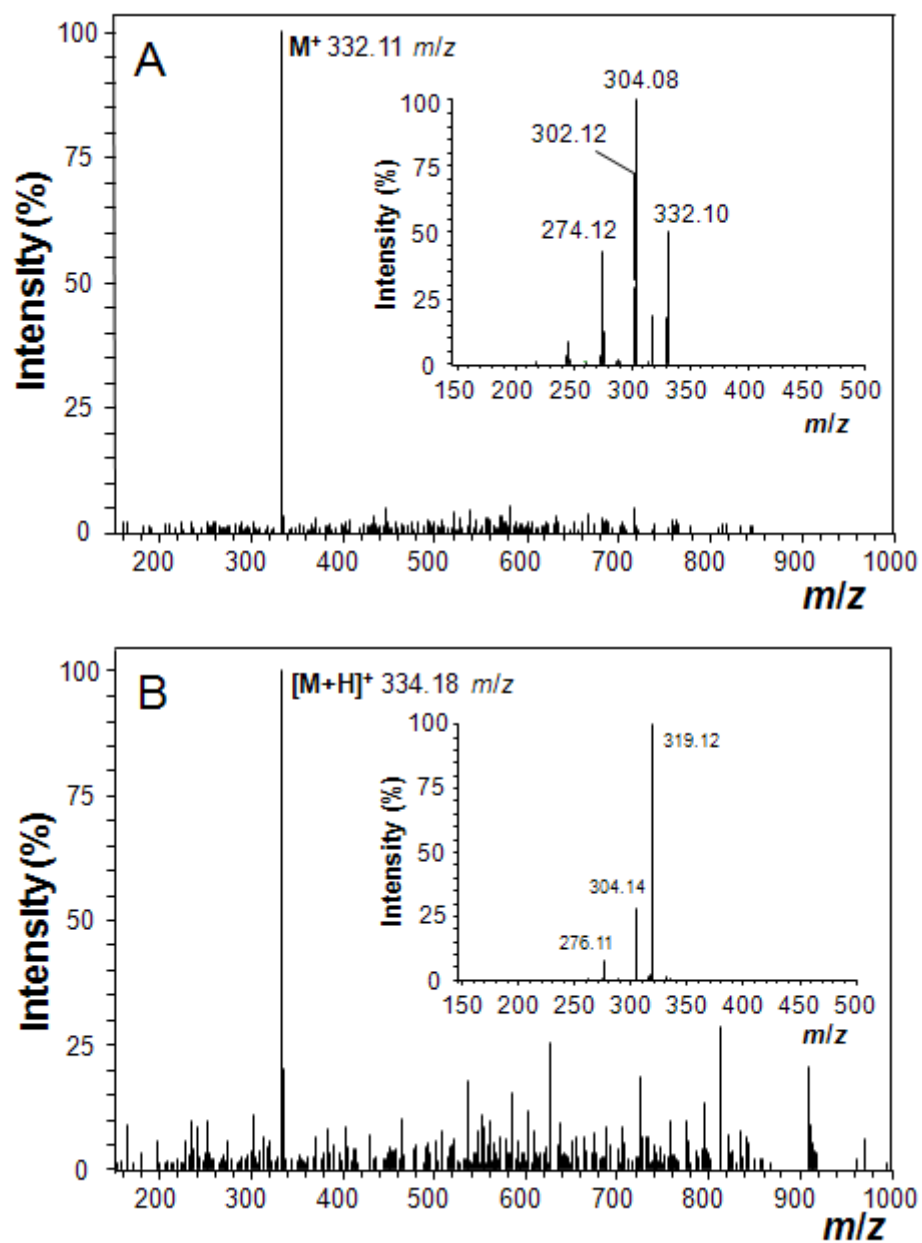
SG byl analyzován pomocí *in situ* voltametrie (s pracovní elektrodou ponořenou v základním elektrolytu obsahujícím SG) a/nebo *ex situ* voltametrie (adsorpční přenosové techniky), kde byla PGE ponořena do 5- μl vzorku. Po uplynutí doby akumulace, byla elektroda následně omyta deionizovanou vodou a umístěna v elektrochemické cele obsahující základní elektrolyt. SG byl rozpuštěn v roztoku methanolu o koncentraci $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ a ředěn základním elektrolytem a/nebo $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ acetátovým pufrém (pH 5) pro *in situ* a/nebo *ex situ* voltametrii. Všechna elektrochemická (CV a SWV) měření byla provedena při laboratorní teplotě (pokud není uvedeno jinak) pomocí analyzátoru $\mu\text{Autolab III}$ (Eco-Chemie, Utrecht, Nizozemí) v tříelektrodovém provedení (Ag|AgCl|3M KCl elektroda jako referenční a platinový drát jako pomocná elektroda). Nastavení pro CV a SWV, jakož i koncentrace alkaloidu a akumulační doba (t_A) jsou uvedeny v legendě obrázků. Argon byl použit k odstranění kyslíku ze základního elektrolytu.

3.3 ESI/MS a HPLC alkaloidů

Byl použit HPLC chromatografický systém Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan) vybaven SCL-10Avp kontrolorem, vakuovým odplyňovačem, binární pumpou (LC-10ADvp), autoinjektorem (SIL-10ADvp), kolonou (CTO-10ACvp) a UV-detektorem (SPD10Avp, 280 nm). Systém byl propojen on-line s ESI/MS.

Byla použita chromatografická kolona ($150 \times 2,1$ mm, $5\mu\text{m}$) Eclipse XDB-CN (Santa Clara, USA). Objem nástřiku byl 10 μl . Mobilní fáze složena z methanolu (solvent B)/1 % octové kyseliny v 10 % vodném roztoku methanolu, lineární gradient eluce (% v): 0-9 min (10-55 % B), 9-12 min (55-60 % B), 12-12.1 min (60-10 % B), 12.1-16 min (10 % B). Průtok mobilní fáze byl $0.4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota automatického dávkovače byla 10°C a kolony 30°C .

Pro analýzu byl použit přístroj MS LCQ Fleet - s kvadrupólovou iontovou pastí (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), s ionizací elektrosprejem vzorku v pozitivním módu. ESI/MS parametry byly: napětí (4.75 kV), teplota kapiláry (37°C) a napětí na kapiláře (30 V). Dusík byl použit jako sušící plyn a helium jako kolizní plyn. Sušícího plynu bylo 50, 5 a 1 (jako arbitrární jednotky). Četnost MS^2 fragmentů (SG $332.17 \rightarrow 304.17$, DMSG $334.17 \rightarrow 319.17 m/z$) byla monitorována při ověření čistoty alkaloidů.



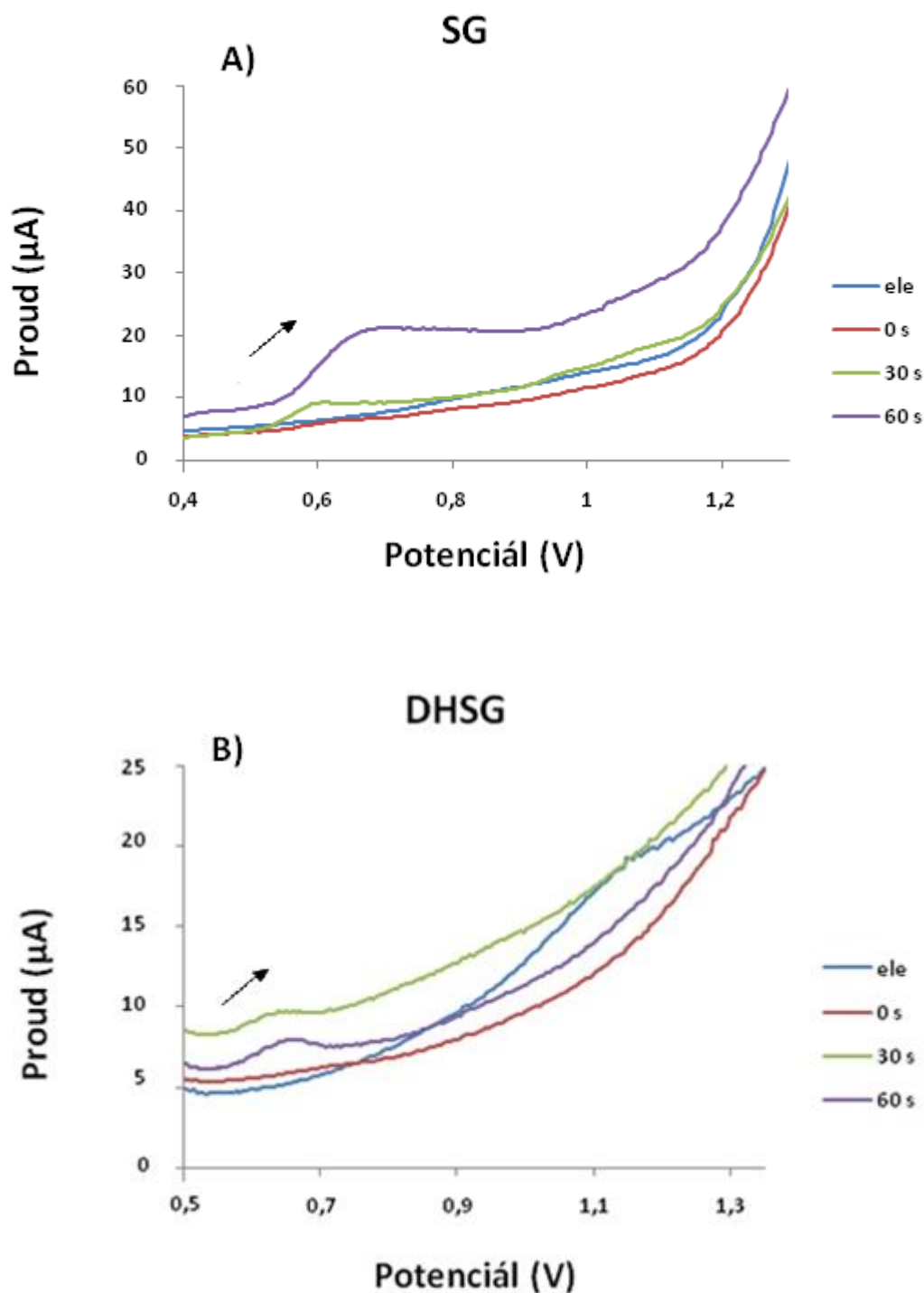
Obr. 9: MS spektra SG (A) a DHSG (B).

3.4 VÝSLEDKY A DISKUZE

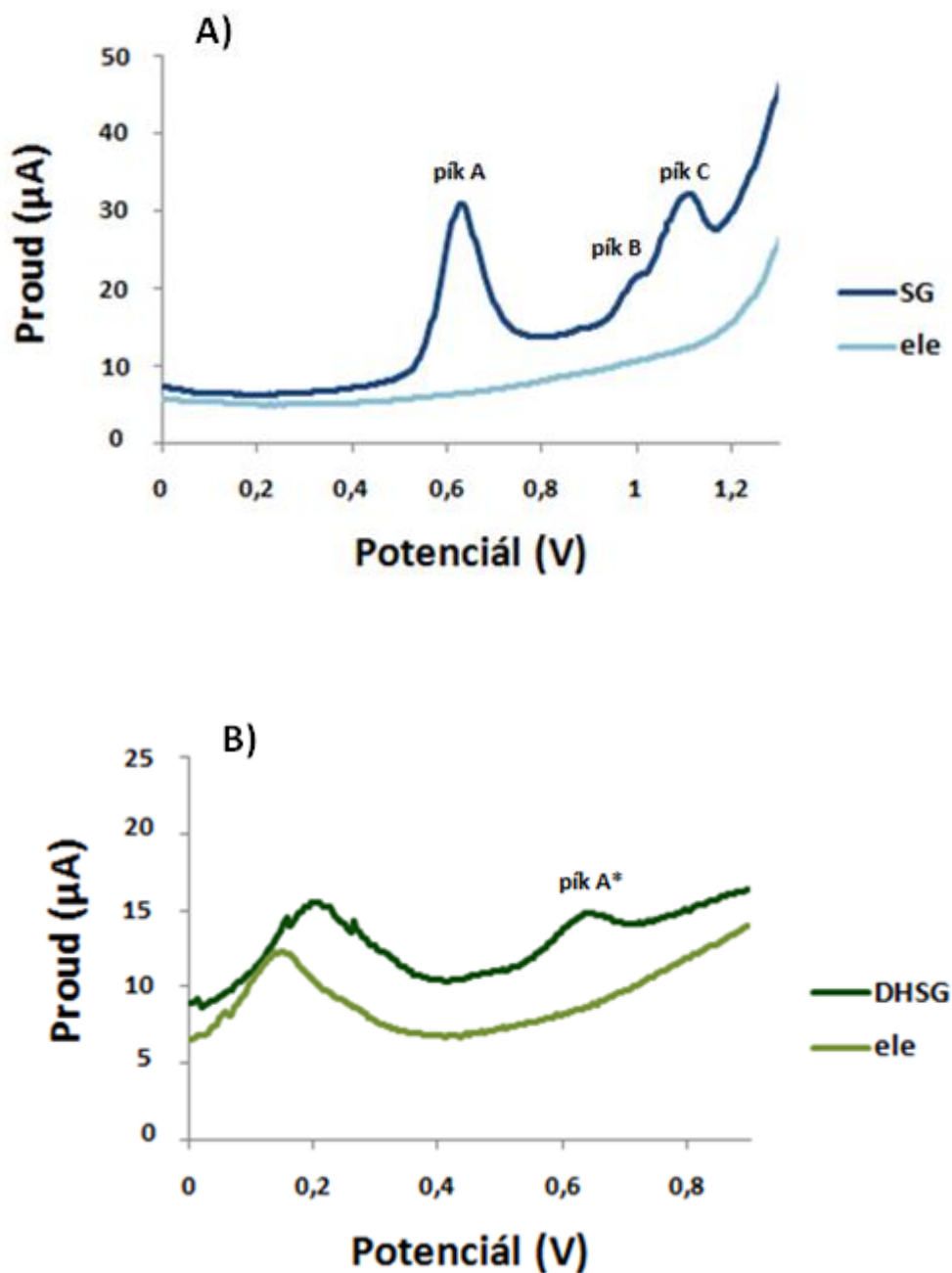
CV a SWV alkaloidů

Pro studium oxidace SG a DHSG na PGE byla použita *ex situ* CV. Alkaloidy (koncentrace $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$) byly adsorbovány na povrch elektrody po dobu 60 s. Alkaloidem modifikovaná PGE byla po promytí interferentů přenesena do základního elektrolytu, Britton-Robinsonova (B-R) pufru. Cyklické voltamogramy obou alkaloidů jsou uvedeny na Obr. 10, kde je v alkalickém B-R pufru možné pozorovat pík oxidace SG (Obr. 10A) při potenciálu kolem +0,7 V. Oxidační pík DHSG (Obr. 10B) byl pozorován při potenciálu ~50 mV nižším než pro SG, a to pouze v kyselém médiu. Jestliže byla elektroda polarizovaná od 0 do +1,5 V, nebyla pozorována proudová odpověď v katodické větvi cyklického voltamogramu. Vrstva tvořená oxidačními produkty pravděpodobně brání transportu elektronů mezi adsorbovanou vrstvou alkaloidu a elektrodovým povrchem. V případě, že není elektroda polarizovaná potenciálem přesahujícím +1,0 V byly pozorovány píky také v katodické větvi cyklického voltamogramu. Výsledky naznačují, že oxidační produkty SG a DHSG na PGE mohou být částečně redukovatelné.

SWV byla použita podobně jako CV pro měření alkaloidů *ex situ*. SWV voltamogramy SG a DHSG jsou ukázány na Obr. 11A pro SG (pík A) a Obr. 11B pro DHSG (pík A*). Pro experimenty SWV a CV prezentované v této práci nebyl kyslík odstraněn ze základního elektrolytu, neboť jeho přítomnost nijak významně neovlivňovala proudovou odpověď alkaloidů. To bylo ověřeno na základě porovnání voltamogramů alkaloidů před a po probublání základního elektrolytu argonem.



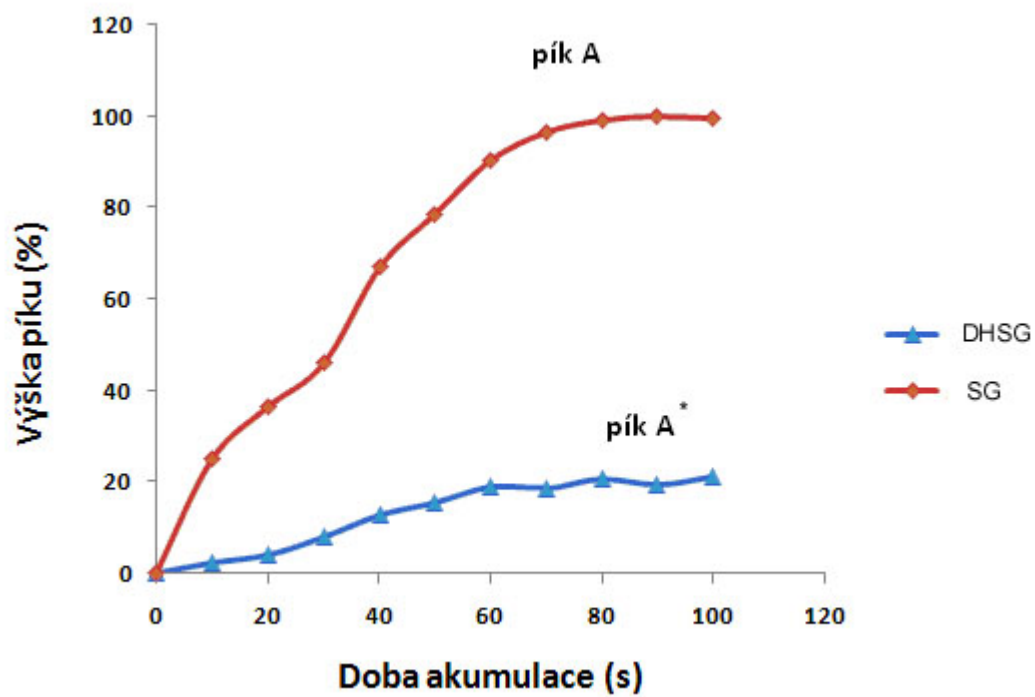
Obr. 10: Anodická větev cyklických voltamogramů SG (A) a DHSG (B). Experimentální podmínky (*ex situ* CV), různé doby akumulace: 30 s, 60 s, koncentrace alkaloidů: $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (rozpuštěné v $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ acetátovém pufru pH 5,0), základní elektrolyt: Britton-Robinsonův pufr (pH 9,7 pro SG a pH 3,2 pro DHSG), CV parametry: počáteční potenciál (0 V), rychlost polarizace elektrody 1 V.s^{-1} .



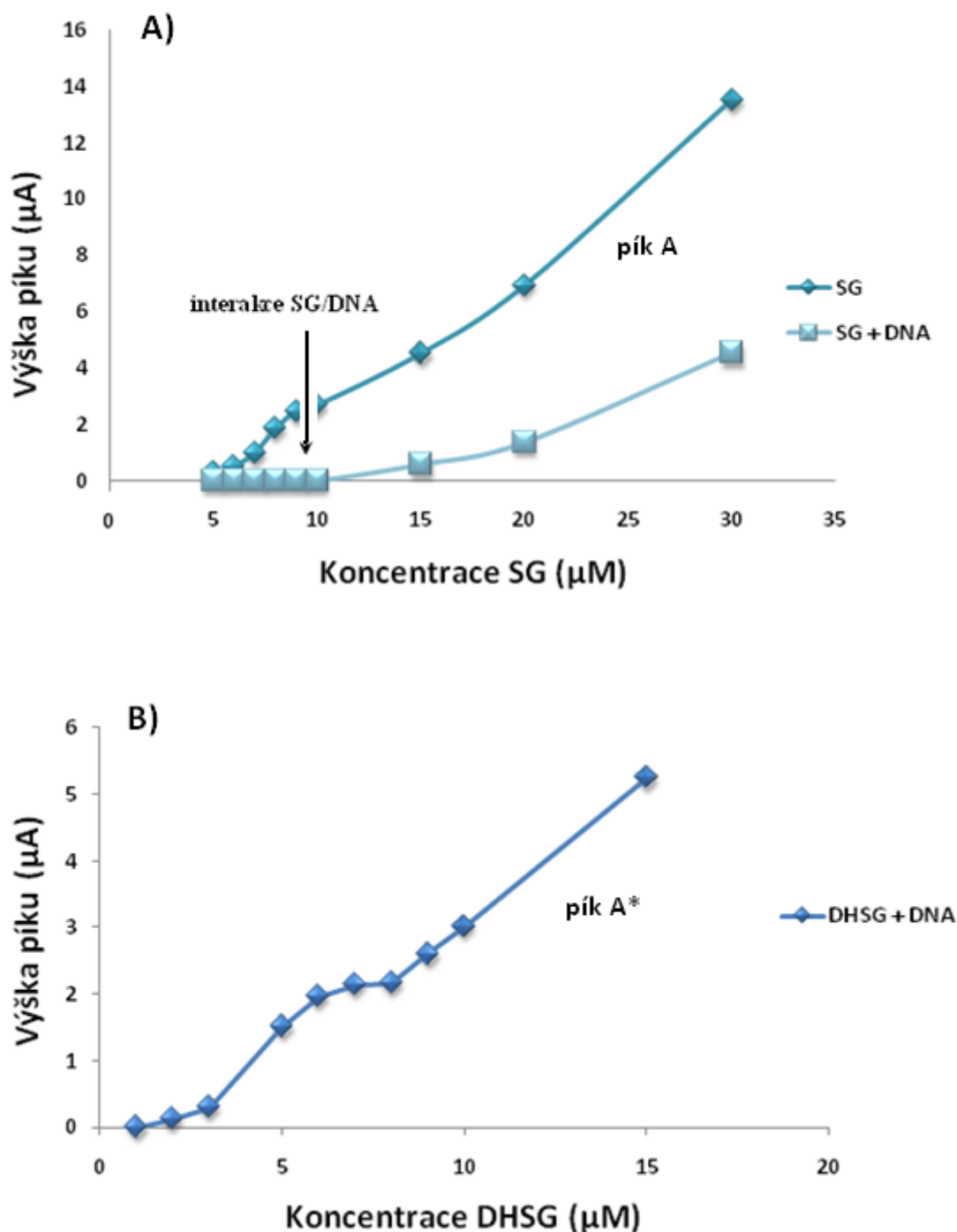
Obr. 11: SWV voltamogramy SG (A) a DHSG (B). Experimentální podmínky (*ex situ* SWV), doba akumulace: 60 s, koncentrace alkaloidů: $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (rozpuštěné v $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ acetátovém pufru pH 5,0), základní elektrolyt: Britton-Robinsonův pufr (pH 9,75 pro SG a pH 4,5 pro DHSG), SWV parametry: počáteční potenciál (0 V), frekvence 200 Hz, amplituda 25 mV.

Adsorpce alkaloidů na povrch PGE a interakce alkaloidů s DNA

Dále byla studována adsorpce SG a DHSG na povrch PGE. Bylo prokázáno, že povrch elektrody je nasycen $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ SG či DHSG po uplynutí doby adsorpce (t_A) 80 s (Obr. 12). Na povrch PGE se také může adsorbovat DNA, čehož bylo využito pro studium interakcí DNA s alkaloidy dle zavedené metody. Alkaloidy byly inkubovány (20 min) při 37°C v B-R pufru (pH 7,4) za přítomnosti nebo nepřítomnosti scDNA ($25 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Po inkubaci byly vzorky analyzovány užitím AdT SWV, kde byl v případě samotného SG postupný nárůst výšky píku A pozorován v závislosti na jeho koncentraci (Obr. 13). Pro směs SG a scDNA nebyl pozorován pík A do koncentraci SG $\leq 10 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Nepřítomnost píku za těchto podmínek byla příčinou interkalace SG do struktury dvoušroubovicové DNA. Shoduje se s rozdíly výšek píku A pro samotný SG (s elektrochemickou odezvou) a pro směs s scDNA (bez elektrochemické odezvy). Pro koncentraci vyšší než $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pík SG narůstá s jeho zvyšující se koncentrací za přítomnosti scDNA, ale výška píku SG je významně nižší než píky pozorované v nepřítomnosti scDNA. Toto je způsobeno koadsorpce obou složek (SG a scDNA) a jejich kompeticí o povrch elektrody. Po úplné saturaci scDNA, je volný SG v roztoku k dispozici pro adsorpci a oxidaci na povrchu PGE. Saturace scDNA byla pozorována při $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentraci alkaloidu, která odpovídá poměru SG/pár báze 1:4. Interakce DHSG s scDNA byly také studovány stejným experimentálním provedením jako pro SG. V protikladu s výsledky obdrženými se SG, závislost výšky píku DHSG na jeho koncentraci je provázána proporcionálním nárůstem píku A^* bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost scDNA. Jelikož molekula DHSG není planárním aromatickým systémem jako SG^+ , interkalace do struktury dvoušroubovice DNA není pozorována.



Obr. 12: Závislost výšky píku SG a DHSG na době akumulace.



Obr. 13: SWV výšky píků A SG (A) a píku A* DHSG (B) v přítomnosti scDNA. Efekt odlišných koncentrací SG a DHSG na pík A a A* v přítomnosti scDNA v kultivační směsi (doba inkubace 20 min, při 37 °C, v Britton-Robinsonově pufru pH 7,4). Experimentální podmínky (*ex situ* SWV), doba akumulace: 60 s, koncentrace alkaloidů: 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, rozpuštěné v 0,2 mol.l^{-1} acetátovém pufru pH 5,0, základní elektrolyt: Britton-Robinsonův pufr (pH 8,5 pro SG a pH 3,5 pro DHSG), SWV parametry: počáteční potenciál (0 V), frekvence 200 Hz, amplituda 25 mV.

Pozorování, že SG^+ má vyšší vazebnou afinitu k dvoušroubovicové DNA než pseudobáze SG je ve shodě s literaturou, která se touto problematikou již zabývala. Bylo potvrzeno, že vazebná afinita pseudobáze SG k DNA je omezena vzhledem k jeho neutralitě a struktuře, která není planární⁶⁹. Vazba DHSG k DNA je omezená, podobně jako u pseudobáze, což bylo potvrzeno AdT SWV.

In situ a *ex situ* voltametrií alkaloidů na PGE, konkrétně doxorubicinu, se již zabýval Vacek et al⁷⁵. CV a SWV voltametrii použili ke sledování reversibilní redukce DOX a specifické interakce DOX s scDNA. Jako v případě SG se potvrdila interkalace do dvoušroubovicové struktury dsDNA i u DOX.

4. ZÁVĚR

Práce popisuje oxidaci SG a DHSG na povrchu PGE. Oba alkaloidy se silně adsorbují na povrch PGE. Na měření byla použita *ex situ* voltametrie (AdT CV a SWV). Oxidace obou alkaloidů byla silně ovlivněna pH základního elektrolytu s nejlépe vyvinutou voltametrickou odpovědí pozorovatelnou v alkalickém prostředí pro SG a acidickém prostředí pro DHSG. Oxidační píky SG a DHSG byly pozorovány při potenciálu kolem +0,7 V v závislosti na experimentálních podmínkách. Získané elektrochemické výsledky byly následně použity pro studii interakcí SG a DHSG s DNA *in vitro* pomocí optimalizované metody AdT SWV. Analýza interakcí alkaloid/DNA byla založena na pozorování výšky oxidačních píků SG a DHSG po jejich inkubaci s scDNA [pBSK₍₋₎]. Výsledky naznačují, že se SG interkaluje do dvoušroubovicové struktury scDNA. Poněvadž DHSG nemá striktně planární molekulární strukturu jako SG⁺ jeho interkalace do struktury scDNA nebyla potvrzena. Výsledky poskytují solidní základ pro studium oxidace isochinolinových alkaloidů voltametrickými metodami a doplňují poznatky o interakcích SG a DHSG s DNA.

Seznam zkratek

Å	angstrem
AdT	adsorpční přenos
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
B-R	Britton-Robinsonův pufr
ctDNA	DNA izolovaná z telecího brzlíku
CV	cyklická voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
dsDNA	dvourěťzcová DNA
ESI	elektrosprej
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kaplinová chromatografie
CHE	chelerytrin
KBA	kvarterní benzo[c]fenantridinové alkaloidy
MALDI	technika laserové desorpce/ionizace za účasti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PGE	pyrolytická grafitová elektroda
RNA	ribonukleová kyselina
scDNA	nadšroubovicová DNA
SG	sanguinarin
ssDNA	jednorěťzcová DNA
SWV	voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (Square Wave)
t_A	akumulační čas
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TOF	průletový analyzátor (Time of Flight)

5. LITERATURA

- 1) Klouda, P.: *Základy biochemie*, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, **2005**.
- 2) Moravcová, J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*, VŠCHT, Praha, **2006**.
- 3) Minařík, J.: *Farmakognosie*, 1. vyd., Praha: Avicenum, 384, **1979**.
- 4) Slaninova, I., Slanina J., Taborska E.: *Chem. Listy* **2008**, 102, 427.
- 5) Adámková, H., Šimánek, V. et al: *Biomed. Papers* **2004**, 148(1), 103–105.
- 6) Lenfeld, J., Kroutil, M., Marsálek, E., Slavík, J., Preininger, V., Šimánek, V.:
Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from
Chelidonium majus, *Planta Med.* **1981**, 43(2), 161-5.
- 7) Hammerová, J., Slaninová, I., Slunská, Z., Táborský, P., Táborská, E.: Quaternary
benzo[c]phenanthridine alkaloids - antiproliferative and colour properties, In *XIII.*
Setkání biochemiků a molekulárních biologů,. Vyd. 1. Brno : Masarykova univerzita,
ISBN 978-80-210-4830-0, **2009**.
- 8) Dostál, J., Slavík, J.: *Chem. Listy* **2000**, 94, 15-20.
- 9) Dostál, J., Potáček, M.: Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids; *Collect. Czech.*
Chem. Commun. **1990**, 55 (12), 2840-2873.
- 10) Zdařilová, A., Malíková, J. et al: *Chem. Listy* **2006**, 100, 30–41.
- 11) Dvořák, Z., Šimánek, V.: *Current Drug Metabolism* **2007**, 8, 173-176.
- 12) Food and Drug Administration, **2003**, 21 CFR Part 356 - *Oral Health Care Drug*
Products for Over-the-Counter Human Use; Antigingivitis/Antiplaque Drug Products;
Establishment of a Monograph.
- 13) Kosina P., Walterova D., Ulrichova J., Lichnovsky V., Stiborova M. et al.: Sanguinarine
and chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment, *Food*
and Chemical Toxicology **2004**, 42, 85-91.
- 14) Franz, C.: *Assessment of Plants/Herbs, Plant/Herb extracts and their naturally or*
syntetically produced components as "additives" for use in animal production, **2005**.
- 15) Bhadra, K., Kumar, GS.: *Therapeutic potencial of nucleic acid-binding isoquinoline*
alkaloids: Binding Aspects and Implications for drug design, Medicinal Research
Reviews, **2010**.
- 16) Vespalec, R. et al: *J. Phys. Org. Chem.* **2003**, 16, 803-810.
- 17) Lenfeld, J., Kroutil, M., Maršálek, E., Slavík, J., Preininger, V., Šimánek, V.: *Planta*
Med. **1981**, 43, 161.

- 18) Slaninová, I., Táborská, E., Bochořáková, H., Slanina, J.: *Cell Biol. Toxicol.* **2001**, 17, 51.
- 19) Janovská, M., Kubala, M. et al: *Anal Bioanal Chem* **2009**, 395, 235-240.
- 20) Psotová, J., Šimánek, V. et al: *Journal of Chromatography B* **2006**, 830, 165-172.
- 21) Ulrichová, J.: *Biomed. Pap. Med.* **2005**, Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub (Supplement) 149, 9.
- 22) Kosina, P. et al: *J. Chromatogr. B* **2011**, 879, 1077–1085.
- 23) Janovská, M., Kubala, M. et al: *Toxicology Letters* **2010**, 196, 56-59.
- 24) Internetový zdroj: <http://www.gvi.cz/files/chemie/nk.pdf>.
- 25) Rosypal, S.: *Molekulární biologie*, Brno, **1998**, 220 – 230.
- 26) Watson, J., Crick, F.: *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, *Nature* **1953**, 171, 4356, 737–738.
- 27) Dahm, R., Friedrich Miescher and discovery of DNA, *Dev. Biol.* **2005**, 278, 274-288.
- 28) Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature* **1953**, 171, 964-967.
- 29) Vacek, J.: Disertační práce - *Nové přístupy v elektrochemické analýze poškození, hybridizace a dalších interakcí DNA*, Brno, **2009**.
- 30) Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- 31) Arnott, S.: Historical article: DNA polymorphism and the early history of the double helix, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, 31, 349-354.
- 32) Wittung, P., Nielsen, P. E., Buchardt, O., Egholm, M., Norden, B.: DNA-like double helix formed by peptide nucleic-acid, *Nature* **1994**, 368, 561-563.
- 33) Pennisi, E.: DNA's molecular gymnastics, *Science* **2006**, 312, 1467-1468.
- 34) Mirkin, S. M.: DNA topology: Fundamentals, Encyclopedia of life sciences, *Nature publishing group* **2001**, 1-11.
- 35) Mirkin, S. M.: DNA topology: Fundamentals, Encyclopedia of life sciences, *Nature publishing group* **2001**, 1-11.
- 36) Pennisi, E.: DNA's molecular gymnastics, *Science* **2006**, 312, 1467-1468.
- 37) Stibor, I.: Interakce planárních molekul s nukleovými kyselinami - interkalace, Ústav organické chemie, VŠCHT, Praha, internetový zdroj: http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/7_Stibor.pdf, přečteno dne 12.1.2011

- 38) Micco, S. D., Bassarello, C., Bifulco, G., Riccio, R., Gomez-Paloma, L.: Differential-Frequency Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy Allows the Detection of Different Ligand–DNA Binding Modes, *Angew. Chem. Int.* **2006**, 45, 224 –228.
- 39) Martínez, R., Chacón-García, L., The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what is worked and what did not work, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 127-151.
- 40) Frébort, I.,: Struktura a funkce biomakromolekul KBC/BPOL **2008** (prezentace pro výuku)
- 41) Fojta, M., Paleček, E.: *Anal. Chim. Acta* **1997**, 342, 1.
- 42) Travers, A., Muskhelishvili, G.: *EMBO reports* 8, 2, 147–151, **2007**.
- 43) Internetový zdroj: <http://herkules.oulu.fi/isbn9514259971/html/x156.html>, přečteno dne 29.11.2010
- 44) Internetový zdroj:
http://www.sci.muni.cz/mineralogie/kap_3_5_vazby/kap_3_5_vazby.htm, přečteno dne 21.1.2011
- 45) Anastassopoulou, J.: Metal–DNA interactions, *J. Mol. Struct.* **2003**, 651–653, 19–26.
- 46) Stiborová, M.: *Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace*.
Internetový zdroj: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, přečteno dne 5.2.2011
- 47) Hendry, L. B., Mahesh, V. B., Bransome, E. D. Jr., Swing, D. E.: Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals, *Mutat. Res.* **2007**, 623, 53–71.
- 48) Klouda, P.: *Moderní analytické metody*, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, **2003**.
- 49) Bard, A. J., Faulkner, L. R.: *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, John Willey & Sons, USA, 2nd edition, **2001**.
- 50) Bard, A. J., Faulkner, L. R.: *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, John Willey & Sons, USA, 2nd edition, **2001**.
- 51) Bard, A. J., Faulkner, L. R.: *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, **1980**
- 52) Wang, J.: *Analytical electrochemistry*, 3rd Edition, **2006**, ISBN: 978-0-471-67879-3
- 53) Fojta, M., Jelen, F., Havran, L., Paleček, E.: Electrochemical stripping techniques in analysis of nucleic acids and their constituents, *Current Anal. Chem.* **2008**, 250-262.
- 54) Zanello, P.: *Inorganic Electrochemistry*, **2003**, ISBN 0-85404-661-5.

- 55) Heyrovský, J., Kůta, J.: *Základy polarografie*, **1962**, 38-39.
- 56) Vacek, J., Havran, L., Fojta, M.: *Chem. Listy* **2011**, 105, 15-26.
- 57) Vacek, J., Kizek, R. et al: *Chem. Listy* **2004**, 98, 166 – 173 .
- 58) Heyrovský M., Vavříčka S.: *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 423, 125.
- 59) Safavi, A., Malcki, N., Shams, E., Shahbaazi, H.R.: *Electroanalysis* **2002**, 14, 13.
- 60) Havran, L., Vacek, J., Cahová, K., Fojta, M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391(5), 1751-8.
- 61) Urbanová, J., Lubal, P., Táborská, E., Táborský, P.: *Interakce kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů s DNA*, internetový zdroj:
<http://kalch.upce.cz/merck09/pdf/Urbanova.pdf>
- 62) Li, JF., Dong, C.: Study on the interaction of morphine chloride with deoxyribonucleic acid by fluorescence method, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **2009**, 71(5), 1938-43.
- 63) Nafisi, S., Bonsaii, M., Maali, P., Khalilzadeh, MA., Manouchehri, F.: *J. Photochem. Photobiol. B.* **2010**, 100, 84-91.
- 64) Tang, H. et al: *European Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 43, 973-980.
- 65) Bai, L. et al: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 5439–5445.
- 66) Kluza, J. et al: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, 20, 383–391.
- 67) Chen, W. et al: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13, 1859–1866.
- 68) Pandya, P. et al: *J. Chem. Sci.* **2010**, 122, 2, 247–257.
- 69) Sen, A., Maiti, M.: Interaction of sanguinarine iminium and alkamoamine form with calf thymus DNA, *Biochem Pharmacol* **1994**, 48, 2097-2102.
- 70) Das, S., Kumar, GS., Maiti, M.: Conversions of the left-handed form and the protonated form of DNA back to the bound right-handed form by sanguinarine and ethidium: A comperative study, *Biophys Chem* **1999**, 76, 199-218.
- 71) Sen, A., Ray, A., Maiti, M.: Thermodynamics of the interactions of sanguinarine with DNA; Influence of ionic strenght ans base composition, *Biophys Chem* **1996**, 59, 155-170.
- 72) Brossi, A., Borer, R.: *Analysis and purification of a commercial sample of sanguarine nitrate*, Lloydia, **1965**, 28, 199-&.
- 73) Vicar, J., Soural, M., Hlavac, J.: Separation of quaternary benzo[c]phenantridine alkaloids from *Macleaya cordata*, *Chem. Listy* **2010**, 101, 51-53.
- 74) Fojta, M., Paleček, E.: *Anal.Chim.Acta* **1997**, 342, 1.
- 75) Vacek, J., Havran, L., Fojta, M.: *Electroanalysis* **2009**, 19, 2139-2144.