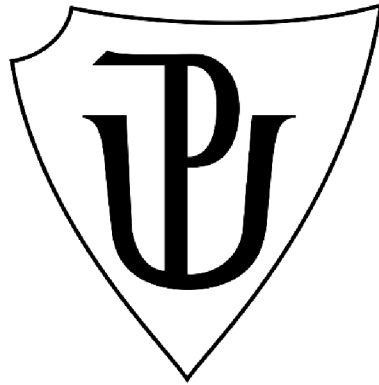


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium interakce nového protinádorově působícího  
komplexu platiny s DNA**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Petra Andršová</b>
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.</b>
Konzultant:	<b>Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.</b>
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....  
Podpis studenta

Chtěla bych velmi poděkovat vedoucí své diplomové práce paní profesorce Kašpárkové za odborné vedení, přívětivý přístup, ochotu, trpělivost a pomoc při práci v laboratoři. Dále bych velmi chtěla poděkovat paní doktorce Prachařové za vstřícnost, pomoc v laboratoři, ochotu a trpělivost. Zároveň také děkuji všem členům Laboratoře molekulární biofyziky a farmakologie za vytvoření příjemného prostředí.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Andršová
Název práce	Studium interakce nového protinádorově působícího komplexu platiny s DNA
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biofyziky
Vedoucí práce	prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

### Abstrakt

V této diplomové práci je studována biologická aktivita Pt(II) komplexní sloučeniny (dále označované jako komplex **9b**), která již dříve (Rehm et al., 2018) byla testována pro své protinádorové účinky. Pt(II) komplexní sloučeniny hrají významnou roli při léčbě nádorových onemocnění již mnoho desítek let. Teoretická část této práce je především zaměřena na vybrané komplexy obsahující platinu a jejich mechanismus účinku. Experimentální část je zaměřena na komplex **9b**, který byl syntetizován jako analog cisplatin. Obsahuje ve své struktuře místo  $\text{NH}_3$  ligandů *N,N*-diethylbenzimidazol-2-ylidenovou a trifenylofosfinovou skupinu. Studovaný komplex vykazoval v MTT testu větší antiproliferativní aktivitu než cisplatin a zároveň bylo prokázáno, že dochází k platinaci DNA daným komplexem v nádorových buňkách MDA-MB-231. Slibné výsledky aktivity komplexu **9b** v nádorových buňkách podnítily zájem o studium mechanismu biologické aktivity dané komplexní sloučeniny v bezbuněčném prostředí. Hlavním cílem této práce je provedení experimentů zaměřených na studium vazby komplexu **9b** na DNA. Měření teploty tání, fluorescence  $\text{Tb}^{3+}$  iontů a CD spekter byly použity k charakterizaci stability a míry poškození DNA. Komplex **9b** stabilizoval molekulu DNA při nižších stupních modifikace DNA a vykazoval také menší poškození DNA než cisplatin. Pomocí agarosové elektroforézy byly dále charakterizovány strukturální změny DNA. Komplex **9b** oproti cisplatině rozvinul plasmid pUC19 o menší úhel, naopak vytvořil větší množství meziřetězcových můstků. Při studiu vlivu komplexu **9b** na enzymy procesující DNA bylo zjištěno, že oproti cisplatině komplex **9b** způsobuje větší inhibici DNA topoisomerasy I a RNA polymerasy, a to pravděpodobně díky objemnějším neodstupujícím ligandům, které studovaný komplex obsahuje. Větší vliv na enzymy procesující DNA zřejmě souvisí i s větší antiproliferativní aktivitou komplexu **9b**. Výsledky diplomové práce tedy poodhalily mechanismus účinku komplexu **9b**, jež se chová jiným způsobem než cisplatin, přestože se jedná o analog tohoto klinicky využívaného léčiva.

Klíčová slova	Komplex <b>9b</b> , cisplatin, DNA, protinádorová aktivita
Počet stran	72
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Petra Andršová
Title	Study of interactions of novel anticancer platinum-based complex with DNA
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biophysics
Supervisor	prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.
Adviser	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
The year of presentation	2024

### Abstract

This Master's thesis studies the biological activity of a Pt(II) complex compound (hereafter referred to as complex **9b**), which has been previously (Rehm et al., 2018) tested for its anti-cancer activity. Pt(II) complex compounds have played an important role in the treatment of cancer for many decades. The theoretical part of this thesis is mainly focused on selected platinum-containing complexes and their mechanism of action. The experimental part focuses on complex **9b**, which was synthesized as an analogue of cisplatin. Its structure contains *N,N*-diethylbenzimidazol-2-ylidene and triphenylphosphine groups instead of NH<sub>3</sub> ligands. The studied complex exhibited greater antiproliferative activity than cisplatin in the MTT assay, and it was also demonstrated that the platination of DNA by the complex occurs in MDA-MB-231 tumor cells. The promising results of the activity of complex **9b** in tumor cells prompted interest in studying the mechanism of biological activity of this complex compound in a cell-free environment. The main aim of this thesis is to perform experiments focused on studying the binding of complex **9b** to DNA. DNA melting, Tb<sup>3+</sup> ion fluorescence and CD spectra measurements were used to characterize the stability and the damage of DNA. Complex **9b** stabilized the DNA molecule at lower levels of DNA modification and also showed less DNA damage than cisplatin. The structural changes of DNA were further characterized using agarose gel electrophoresis. Compared to cisplatin, complex **9b** unfolded the pUC19 plasmid by a smaller angle, but formed a larger number of interstrand crosslinks. When studying the effect of complex **9b** on DNA-processing enzymes, it was demonstrated that complex **9b** caused greater inhibition of DNA topoisomerase I and RNA polymerase than cisplatin probably due to the bulkier non-leaving ligands the investigated complex contains. The greater effect on DNA-processing enzymes is likely related to the greater antiproliferative activity of complex **9b**. The results of this thesis have therefore revealed a mechanism of action for complex **9b** that behaves in a different way compared to cisplatin, although it is an analogue of this clinically used drug.

Keywords	Complex <b>9b</b> , cisplatin, DNA, anticancer activity
Number of pages	72
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>3</b>
2.1	Léčba nádorových onemocnění .....	3
2.1.1	Chemoterapie .....	3
2.1.2	Cílená (biologická) léčba nádorů .....	5
2.1.2.1	Použití monoklonálních protilátek .....	6
2.1.2.2	Použití nízkomolekulárních inhibitorů a konjugátů protilátka-léčivo .....	7
2.1.3	Další přístupy pro léčbu nádorových onemocnění .....	7
2.2	Cytostatika obsahující platinu .....	8
2.2.1	Pt(II) cytostatika používaná v klinické praxi .....	9
2.2.1.1	Cisplatina .....	9
2.2.1.2	Karboplatina.....	12
2.2.1.3	Oxaliplatina .....	12
2.2.1.4	Nedaplatina .....	13
2.2.1.5	Lobaplatina.....	13
2.2.1.6	Heptaplatina .....	13
2.2.2	Pt cytostatika v klinickém testování.....	14
2.2.2.1	Lipoplatina .....	14
2.2.2.2	Satraplatina.....	14
2.2.2.3	Picoplatina.....	16
2.2.2.4	BBR3464.....	17
2.3	Cytotoxický účinek cisplatiny v buňce .....	18
2.3.1	Vstup do buňky a tvorba aduktů cisplatina-DNA .....	18
2.3.2	Rozpoznání aduktů cisplatina-DNA proteiny .....	20
2.3.2.1	Proteiny obsahující HMG doménu.....	20
2.3.3	Mechanismy zajišťující protinádorovou aktivitu cisplatiny .....	21
2.4	Nové experimentální sloučeniny těžkých kovů s cytostatickým účinkem. <b>22</b>	
2.4.1	Transplatina a její analoga .....	23
2.4.2	Pt(IV) cytostatika .....	23
2.4.2.1	Mitaplatina .....	24
2.4.2.2	Etakraplatina .....	25
2.4.3	Vybraní zástupci potencionálních protinádorových komplexních sloučenin na bázi ruthenia a iridia.....	26
2.4.3.1	Ru(II) komplex – TLD1433 .....	26
2.4.3.2	Ir(III) komplexy .....	27
2.4.4	Komplex obsahující platinu použitý v experimentální části diplomové práce.....	28
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>30</b>
3.1	Biologický materiál .....	30
3.2	Chemikálie .....	30
3.3	Přístroje, software a další pomůcky .....	31
3.4	Použité komplexní sloučeniny .....	32
3.5	Příprava roztoků a kultivačního média .....	33
3.6	Metody .....	34
3.6.1	Kultivace nádorových buněk.....	34
3.6.2	Test antiproliferativní aktivity.....	34
3.6.3	Platinace DNA v buňkách.....	35

3.6.4	Rychlost vazby komplexu na DNA z telecího thymu v bezbuněčném prostředí.....	36
3.6.5	Příprava vzorků pro experimenty s DNA z telecího thymu.....	36
3.6.6	Měření teploty tání DNA .....	37
3.6.7	Měření fluorescence $Tb^{3+}$ iontů .....	37
3.6.8	Měření spekter cirkulárního dichroismu .....	37
3.6.9	Rozvíjení plasmidové DNA .....	37
3.6.10	Stanovení množství meziřetězcových můstků .....	38
3.6.11	Vliv komplexu na enzym DNA topoisomerasa I .....	39
3.6.12	Vliv komplexu na enzym RNA polymerasa .....	40
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
4.1	Test antiproliferativní aktivity.....	41
4.2	Platinace DNA v buňkách.....	42
4.3	Rychlost vazby komplexu na DNA z telecího thymu v bezbuněčném prostředí.....	43
4.4	Měření teploty tání DNA .....	44
4.5	Měření fluorescence $Tb^{3+}$ iontů .....	47
4.6	Měření spekter cirkulárního dichroismu .....	48
4.7	Rozvíjení plasmidové DNA .....	51
4.8	Stanovení množství meziřetězcových můstků .....	52
4.9	Vliv komplexu na enzym DNA topoisomerasa I .....	53
4.10	Vliv komplexu na enzym RNA polymerasa .....	56
4.11	Shrnutí výsledků .....	57
<b>5</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>71</b>

## **CÍLE PRÁCE**

Cílem teoretické části diplomové práce bude popsat způsoby léčby nádorových onemocnění, charakterizovat vybrané protinádorové komplexy obsahující platinu, popsat jejich mechanismus účinku a zpracovat krátký přehled nových protinádorových sloučenin obsahujících těžký kov.

Cílem experimentální části bude studovat interakce nového protinádorového Pt komplexu s molekulou DNA. Nejprve bude provedeno testování antiproliferativní aktivity komplexu na buněčné nádorové linii a bude také zjištěna platinace DNA v buňkách. Následně bude stanoveno, jak vazba komplexu ovlivní strukturu (mj. bude pomocí agarosové elektroforézy popsáno rozvíjení dvoušroubovice DNA a tvorba meziřetězcových můstků) a teplotní stabilitu DNA. Bude také charakterizováno, jak komplex ovlivní procesování DNA vybranými modifikujícími enzymy.



# 1 ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou závažným problémem moderní medicíny. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny zveřejnila nejnovější data z roku 2022, kdy ve sledované populaci v tomto roce přibylo 20 mil. nových případů nádorového onemocnění a 9,7 mil. lidí díky tomuto onemocnění zemřelo. I když se zlepšuje včasná diagnostika, léčba a péče o pacienty s rakovinou, počet lidí, u kterých je diagnostikováno toto onemocnění však každoročně roste a podle Světové zdravotnické organizace v roce 2050 bude nových případů 35 mil.

Existuje mnoho přístupů k léčbě nádorových onemocnění, avšak chemoterapie je stále jednou z velmi používaných metod. Cisplatina (*cis*-diamminodichloroplatinatý komplex) byla prvním léčivem na bázi platiny schváleným pro léčbu nádorových onemocnění v roce 1979 (Dilruba & Kalayda, 2016). Přestože cisplatina měla a má velký úspěch, neustále se pracuje na vývoji nových sloučenin na bázi platiny. Cílem je, aby chemoterapie byla co nejmenší zátěží pro pacienty – snaha o minimalizování vedlejších účinků, relapsu (návratu nádorového onemocnění) a rezistence organismu vůči léčivu (Brown et al., 2019). Pro vývoj nových chemoterapeutik obsahujících platinu je také důležité porozumění mechanismu účinku již používaných léčiv (Schoch et al., 2020).

Často dochází k vývoji a studiu biologické aktivity komplexů, které jsou strukturními analogy již zmíněné cisplatiny. Nejinak tomu bylo i v této práci, která se zabývá studiem protinádorové aktivity nové Pt(II) komplexní sloučeniny (označované jako komplex **9b**), která byla poprvé představena v práci Rehm et al., 2018. Tato sloučenina obsahuje stejně jako cisplatina dva chloridové ligandy, NH<sub>3</sub> skupiny však byly nahrazeny objemnějšími ligandy. Předpokládá se, že velkou roli v mechanismu účinku bude hrát vazba na DNA, stejně jako je tomu u cisplatiny. Proto jsou v experimentální části této práce studovány interakce komplexu s DNA.

Vazba komplexu **9b** na DNA byla studována v bezbuněčném prostředí za pomoci mnoha metod, které měly za cíl zjistit stabilitu DNA modifikované komplexem **9b** (měření teploty tání), míru poškození molekuly DNA (stanovení fluorescence Tb<sup>3+</sup> iontů, měření CD spekter a úhel rozvinutí) a množství meziřetězcových můstků. Byla studována také antiproliferativní aktivita komplexu **9b** a platinace DNA v nádorových buňkách MDA-MB-231 (triple negativní karcinom prsu). V závěru experimentální části této diplomové práce bylo stanoveno, jak vazba komplexu **9b** na molekulu DNA

ovlivní modelové bakteriální enzymy procesující DNA, které hrají důležitou roli při replikaci a transkripci DNA. Pokud dojde k ovlivnění procesování DNA tak, že buňka nebude schopna molekulu DNA opravit, dojde k její apoptóze, což je u nádorových buněk žádoucí.

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Léčba nádorových onemocnění**

Při nádorových onemocněních dochází v organismu k nekontrolovatelnému dělení buněk. Charakteristickou vlastností nádorových buněk je jejich rezistence k buněčné smrti (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015). Nádorové buňky jsou také schopné pronikat do okolních tkání a vytvářet tak metastáze. Čím jsou nádorové buňky více rozšířeny po organismu, tím je těžší nádorové onemocnění vyléčit. Předpokládá se, že nádorová onemocnění vznikají z jedné buňky, u které došlo k mutaci. Potomci této buňky však musí projít dalšími mutacemi a epigenetickými změnami, aby se stali buňkami nádorovými (Alberts et al., 2015).

Léčba se odvíjí od stádia nádorového onemocnění a u některých pacientů zahrnuje i paliativní péči. Do léčby tohoto typu onemocnění lze zařadit chirurgické odstranění nádoru, chemoterapii, ozařování, hormonální terapii, imunoterapii či transplantaci buněk kostní dřeně (<https://www.cdc.gov/cancer/survivors/patients/treatments.htm>). Chirurgické odstranění nádoru a terapie ozařováním jsou hlavními způsoby léčby pro lokální a nemetastazující nádory. Chemoterapie, hormonální a biologická terapie, při kterých se podávají protinádorová léčiva, jsou způsoby léčby, které se v současnosti používají při terapii u metastazujících nádorů (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015).

Tato kapitola se zabývá vybranými způsoby léčby nádorových onemocnění, a to především léčbou nádorů pomocí chemoterapie a cílené (biologické) terapie, které jsou běžně v praxi používané. V dnešní době se zkoumají také nové přístupy při terapii nádorových onemocnění, což bude v krátkosti zmíněno v subkapitole 2.1.3.

#### **2.1.1 Chemoterapie**

Klinicky efektivní chemoterapie byla ustavena jako klíčový způsob léčby v moderní onkologii přibližně před sto lety. Úplně prvními látkami, které nebyly přírodního původu, a u nichž se zjistilo, že mají protinádorové vlastnosti, byly sloučeniny s arsenem. První zmínka o použití sloučenin arsenu jako látek protinádorových pochází z 11. století a je spojena s lékařem Avicennou. Moderní chemoterapie započala s využitím hořčičných plynů, antifolátů (antagonistů kyseliny listové) a analogů nukleosidů ve 20. století (Gilad et al., 2021).

Při chemoterapii dochází k inhibici dělení rychle se dělících buněk. Dochází však také k ničení normálních buněk organismu, které stejně jako nádorové buňky rychle proliferují (např. vlasové folikuly, buňky kostní dřeně, buňky gastrointestinálního traktu), což způsobuje charakteristické nežádoucí vedlejší znaky chemoterapie (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015).

Mezi vedlejší účinky chemoterapie patří např. nevolnost, únava, zvracení, dále myelosuprese, neplodnost, sekundární nádorové onemocnění, dysfunkce ledvin, jater či srdce. Na chemoterapeutikum může mít pacient také rezistenci. Primární rezistence se vyskytne, pokud nádor neodpovídá od začátku léčby na chemoterapii (může být způsobená např. genetickými změnami uvnitř nádoru či neadekvátním dávkováním). Sekundární rezistenci získají některé nádorové buňky v průběhu chemoterapie – tyto klony získají tak výhodu v přežití oproti jiným buňkám v nádoru. Sekundární rezistence může být způsobená např. zvýšením inaktivace léčiva organismem či změnou opravných mechanismů DNA (Bhosle & Hall, 2009).

Mnoho chemoterapeutik jsou látky extrahované z rostlin či bakterií (např. vinca alkaloidy z rostlin čeledi toješťovitých či paclitaxel z tisu), jiné jsou specificky vytvářeny v chemických laboratořích. Přehled chemoterapeutik podle jejich mechanismu účinku je znázorněn v Tab. 1 (Bhosle & Hall, 2009).

Tab. 1: Přehled klasických chemoterapeutik. Zpracováno podle Bhosle & Hall, 2009.

Skupina chemoterapeutik	Příklady
Alkylační činidla	Komplexy na bázi platiny (např. cisplatina) Deriváty hořčičného plynu (např. chlorambucil)
Antimetabolity	Analoga pyrimidinu (např. 5-fluorouracil) Antifoláty (methotrexát)
Inhibitory mitózy	Vinca alkaloidy (např. vinkristin) Taxany (např. paclitaxel)
Inhibitory topoisomerasy I a II	Např. irinotekan, etopsid
Protinádorová antibiotika	Např. doxorubicin, bleomycin

Z Tab. 1 je patrné, že mezi alkylační činidla je zařazována např. i cisplatina, přestože neobsahuje alkylovou skupinu. Z chemického hlediska se však nejedná o alkylační činidlo, i když je do této skupiny nesprávně zahrnováno. Stejně jako ostatní protinádorová alkylační činidla však cisplatina inhibuje především transkripci DNA a tím pádem syntézu proteinů ve všech rychle se dělících buňkách vytvářením různých aduktů s molekulou DNA (alkylační činidla působí na všechny buňky, primárně však na buňky nádorové, které díky rychlé proliferaci nemají čas na opravu) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547849/>).

V následujících subkapitolách budou popsány nové způsoby léčby nádorových onemocnění, avšak klasická chemoterapie je stále v klinické praxi hojně využívána (Tilsed et al., 2022). Chemoterapeutika se kombinují s jinými léčivy s cílem usmrtit co nejvíce nádorových buněk a zároveň minimalizovat vývoj rezistence organismu vůči léčivu (Bhosle & Hall, 2009). Léčba pomocí chemoterapie však není efektivní u všech osob s nádorovým onemocněním. Odpověď na chemoterapii se liší nejen u pacientů s různými typy tumorů, ale i v rámci skupiny pacientů se stejným typem nádoru. Proto je snaha nalézt prediktivní biomarker, který by předpověděl odpověď konkrétního pacienta na konkrétní chemoterapeutikum (Tilsed et al., 2022).

### **2.1.2 Cílená (biologická) léčba nádorů**

Cílená (biologická) léčba zahrnuje použití substancí, které jsou specifické pro nádorové buňky. Jejím cílem je blokovat specifické dráhy nebo nádorové proteiny, které jsou zahrnuty v růstu a progresi nádoru (receptory, růstové faktory, kinasové kaskády nebo molekuly spojené s apoptózou a angiogenezí). Tyto molekuly se nachází i v normálních tkáních, u nádorových buněk jsou však nadexprimované nebo zmutované (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015).

U chemoterapie i cílené (biologické) léčby se nejčastěji orálně nebo intravenózně podává pacientovi léčivo, jehož cílem je eliminovat nebo úplně zničit nádorové buňky v nemocném organismu. Chemoterapie cílí na rychle se dělící buňky (nádorové i normální), zatímco u cílené terapie dochází k vysoce specifickému doručení léčiva do místa s nádorovým bujením. Cílená terapie je také méně toxická v porovnání s klasickou chemoterapií (Lee et al., 2018).

Cílenou léčbu lze rozdělit na čtyři obecné kategorie – použití monoklonálních protilátek, využití nízkomolekulárních inhibitorů, použití konjugátů protilátka-léčivo a využití imunoterapie (Powers Smith & Prasad, 2021). Posledním zmíněným termínem je imunoterapie, což je široký pojem zahrnující mnoho léčebných technik. Do této skupiny protinádorové léčby patří např. imunostimulační cytokiny, PRR agonisté (PRR jsou receptory rozeznávající molekulové vzory, z angl. pattern recognition receptor – tyto receptory hrají významnou roli v imunitní obraně), protinádorové vakcíny, ale také monoklonální protilátky, které se mohou podle jiného dělení řadit zvlášť (Galluzzi et al., 2014).

### **2.1.2.1 Použití monoklonálních protilátek**

Při cílené léčbě lze využít specifické monoklonální protilátky, které se vážou na antigeny na nádorových buňkách. Imunitní systém pak tyto buňky rozezná a odstraní je (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015). V roce 1997 byla FDA schválena první terapeutická monoklonální protilátka pro léčbu non-Hodgkinova lymfomu z B lymfocytů – rituximab (Wu et al., 2006).

Bevacizumab je další monoklonální protilátkou běžně používanou v klinické praxi. Jedná se o první schválený inhibitor angiogeneze (proces tvorby nových cév, které se následně oddělí z cév již existujících). Nové cévy jsou potřeba kvůli vysokým metabolickým nárokům nádorů na živiny a kyslík. Toto léčivo konkrétně cílí na vaskulární endoteliální růstový faktor A (VEGF-A). VEGF hraje klíčovou roli v indukci angiogeneze u nádoru a je schopen stimulovat proliferaci a přežití endoteliálních buněk a zvyšovat permeabilitu cév, což podporuje růst nádoru (Garcia et al., 2020).

Dalším lékem je trastuzumab (pro léčbu metastazujícího nádoru prsu). Jedná se o anti-HER2 monoklonální protilátku, která inhibuje proliferaci *in vitro* nádorových buněk, které nadexprimují HER2 protein (lidský epidermální receptor 2) (Wu et al., 2006). HER2-pozitivní nádor se vyskytuje u 15-25 % žen, kterým byla diagnostikována rakovina prsu. Mezi léčiva na bázi monoklonálních protilátek patří dále např. cetuximab a panitumumab (pro léčbu metastatického kolorektálního karcinomu) (Powers Smith & Prasad, 2021).

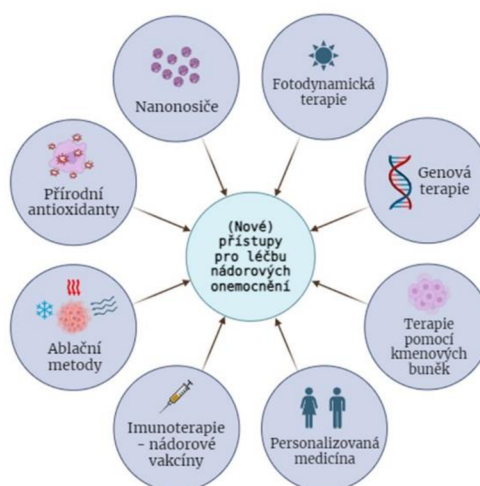
### **2.1.2.2 Použití nízkomolekulárních inhibitorů a konjugátů protilátka-léčivo**

Dalším typem cílené terapie je léčba pomocí nízkomolekulárních inhibitorů (z angl. small molecule inhibitors), které inhibují signální dráhy nádorových buněk zahrnuté v abnormální proliferaci, anti-apoptotických a angiogenních mechanismech. Mnoho těchto molekul je navrženo tak, aby narušily kinasovou doménu ATP: [protein]-L-tyrosin-O-fosfotransferas (tyrosinkinasa, EC 2.7.10.1) (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015). Imatinib (Glivec) je prvním selektivním tyrosinkinásovým inhibitorem, který byl v roce 2001 schválen pro léčbu nádorových onemocnění. Mezi další léčiva tohoto typu patří gefitinib, který inhibuje kinasovou aktivitu receptoru epidermálního růstového faktoru. FDA ho schválila roku 2003 pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic (Wu et al., 2006).

Konjugát protilátka-léčivo (ADC) obsahuje monoklonální protilátku a malé množství vysoce účinného cytotoxického léčiva, které je na protilátku připojeno. ADC se váže na receptor na povrchu cílové nádorové buňky, následně se propojení přeruší a dojde k uvolnění cytotoxické látky do nádorové buňky. Mezi konjugáty protilátka-léčivo, které se používají v klinické praxi, patří např. brentuximab vedotin, jež se využívá pro léčbu Hodgkinova lymfomu (Ornes, 2013).

### **2.1.3 Další přístupy pro léčbu nádorových onemocnění**

Na Obr. 1 je vyobrazen přehled moderních přístupů k léčbě nádorů. Dalším způsobem protinádorové léčby je např. terapie pomocí kmenových buněk, což jsou nediferencované buňky v kostní dřeni (Debela et al., 2021). Podle Národního institutu pro rakovinu v USA transplantace kmenových buněk nefunguje proti nádorovému onemocnění přímo, ale slouží ke zlepšení schopnosti organismu tyto buňky produkovat po vystavení velkému množství radiace či chemoterapie (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/stem-cell-transplant>). Dalším přístupem léčby nádorových onemocnění je např. kryoablace (využití extrémní teploty ke „zmražení“ nádoru a tkáně okolo něj) (Debela et al., 2021).



Obr. 1: Přehled moderních přístupů k léčbě nádorových onemocnění (o některých z nich je pojednáno v textu). Informace použity z Debela et al., 2021. Obrázek vytvořen pomocí webového softwaru BioRender.

Mezi nové přístupy patří využití nanonosičů, které jsou schopny transportovat protinádorová léčiva přímo do nádoru a omezit tak toxicitu pro zbytek organismu (izolují léčivo před prostředím organismu). Nanonosiče chrání léčivo před degradací, redukují odstranění léčiva ledvinami, zvyšují jeho poločas rozpadu v krevním řečišti či zlepšují rozpustnost léčiva. Mezi nanonosiče patří např. liposomy, které jsou využívány např. v lipoplatině, o níž bude pojednáno v následující kapitole (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015). Dalším přístupem k léčbě nádorových onemocnění je např. genová terapie, při které dochází k nahrazení defektivního genu genem „normálním“ (Debela et al., 2021).

## 2.2 Cytostatika obsahující platinu

Objev cisplatiny podnítil zájem vědců nejen o platnaté komplexní sloučeniny, ale také o jiné koordinační sloučeniny, které by se mohly stát potencionálními protinádorovými léčivy. Kromě cisplatiny se v současné době v rámci chemoterapie v klinické praxi celosvětově používají také karboplatina a oxaliplatin (Florea & Büsselberg, 2011). Nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina se využívají v klinické praxi pouze v určitých zemích. Mezi chemoterapeutika na bázi platiny, jež se nacházejí ve fázi klinického testování, patří např. satraplatina či lipoplatina (Johnstone et al., 2016).

Obecně se komplexy s platinou jako centrálním atomem používají pro široké spektrum nádorových onemocnění, které zahrnují karcinomy varlat, vaječníků,



močového měchýře, hlavy a krku, jícnu, prsu, žaludku, prostaty, dále se také používají pro léčbu Hodgkinových a non-Hodgkinových lymfomů, neuroblastomu, sarkomů, malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic či melanomů (Florea & Büsselberg, 2011).

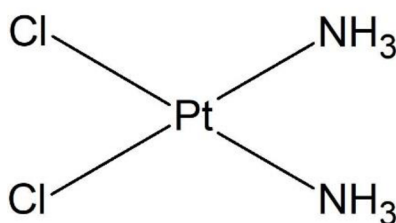
V současné době se protinádorová léčiva na bázi platiny většinou nevyužívají v klinické praxi samostatně, ale dochází ke kombinaci klasických a cílených chemoterapeutik k dosažení co nejlepších výsledků u pacientů s rakovinou (Gilad et al., 2021).

Tato kapitola se zabývá nejvýznamnějšími zástupci cytostatických látek, které obsahují jako centrální atom platinu, jež se již používají v klinické praxi, nebo se nachází ve stádiu klinického testování. Je důležité také zmínit, že Pt(II) komplexní sloučeniny používané v klinické praxi vykazují kromě řady výhod, také určité nevýhody (rezistence, vedlejší účinky). Proto se stále syntetizují a hledají nové protinádorově účinné látky, které by tyto nedostatky překonaly. Nové komplexní sloučeniny budou popsány v kapitole 2.4, kdy subkapitola 2.4.2 bude zaměřena na další komplexy obsahující platinu, konkrétně na Pt(IV) koordinační sloučeniny.

## 2.2.1 Pt(II) cytostatika používaná v klinické praxi

### 2.2.1.1 Cisplatina

Cisplatina je komplexní sloučenina s čtvercovou planární geometrií (Tchounwou et al., 2021). Její strukturní vzorec je znázorněn na Obr. 2. Za pokojové teploty se jedná o žluto-oranžový prášek (Tchounwou et al., 2021). V polovině 19. století byla cisplatina poprvé syntetizována a v roce 1893 Alfred Werner odvodil strukturu této látky (Florea & Büsselberg, 2011). Werner správně navrhl čtvercově planární konfiguraci a také rozlišil *cis* a *trans* izomery (cisplatinu a transplatinu). V roce 1913 získal za svou vědeckou práci Nobelovu cenu za chemii (Alderden et al., 2006).



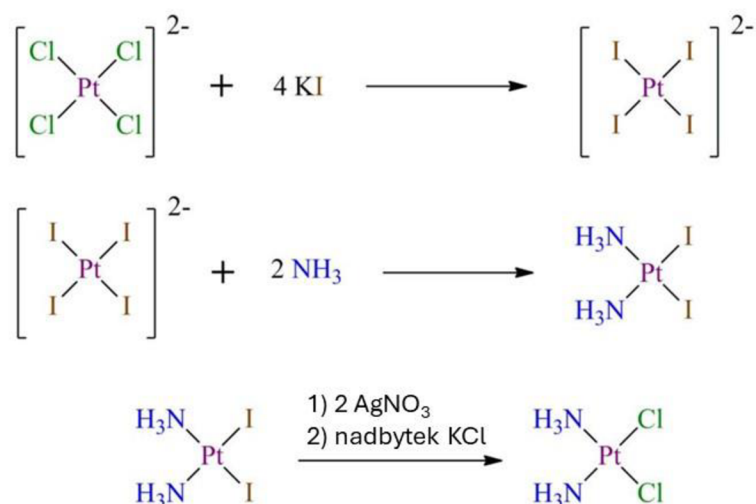
Obr. 2: Strukturní vzorec cisplatiny.

Antiproliferativní účinky koordinačních komplexů s platinou byly poprvé pozorovány v roce 1965 biofyzikem Barnettem Rosenbergem (Rosenberg et al., 1965). Rosenberg chtěl zjistit, jestli při dělení buněk hraje roli elektrický proud. Provedl to tak, že na buněčnou kulturu bakterie *Escherichia coli* v pufru chloridu amonného aplikoval elektrický proud skrz „inertní“ platinové elektrody, které byly ponořené v pufru. Po určité době se jednotlivé bakterie *E. coli* proměnily v dlouhá filamenta, protože se u nich zastavilo buněčné dělení. To se nestalo díky působení elektrického proudu, ale díky vytvoření komplexní sloučeniny s platinou, které se formovala z „inertních“ platinových elektrod (Alderden et al., 2006). Po Rosenbergově pozorování byla cisplatina jedním ze čtyř komplexů obsahujících platinu, které byly pilotně testovány u myšího sarkomu. Cisplatina byla při testování aktivní (Lebwohl & Canetta, 1998).

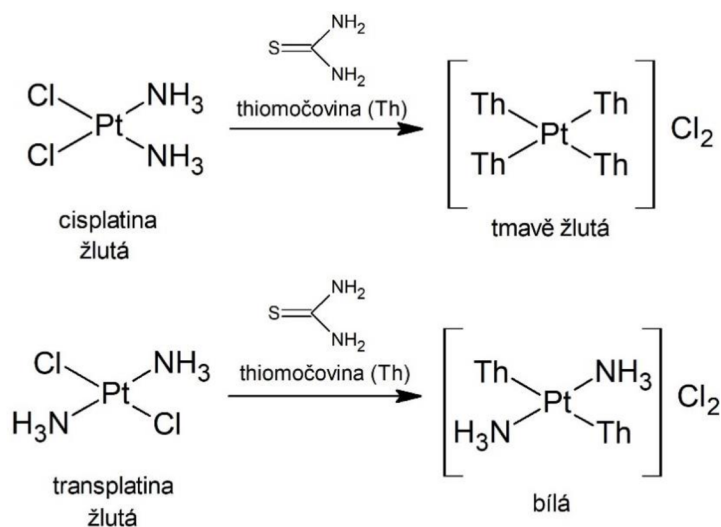
Protinádorová aktivita cisplatin byla nezávisle potvrzena jinými laboratořemi a na jiných nádorech. Představitelé Národního institutu pro rakovinu v USA projevíli o cisplatinu zájem a ta v červnu 1971 vstoupila do fáze I klinického testování v nemocnicích v Detroitu a Houstonu (Lebwohl & Canetta, 1998).

Nejpoužívanější metoda pro přípravu cisplatin pochází z roku 1970 (Dhara, 1970). Nejprve je vodný roztok  $[\text{PtCl}_4]^{2-}$  převeden na  $[\text{PtI}_4]^{2-}$  přidáním KI. Dále je přidán hydroxid amonný, který přemění tmavě hnědý roztok  $[\text{PtI}_4]^{2-}$  na žlutý precipitát *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{I}_2]$ . Přidáním  $\text{AgNO}_3$  rozpuštěného ve vodě dojde k odstranění jodidových ligandů z komplexu a vznikne *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ . Z posledního zmíněného komplexu lze již izolovat čistou cisplatinu jako žlutý prášek tak, že se k tomuto roztoku přidá nadbytek KCl (Wilson & Lippard, 2014). Schematicky je celý proces znázorněn na Obr. 3.

V roce 1894 byl Kurnakow schopen rozlišit mezi cisplatinou a transplatinou pomocí reakce s thiomocovinou. Tato metoda byla vyvinuta k separaci směsi těchto dvou izomerů a zároveň k detekci kontaminace transplatinou ve vzorcích klinické cisplatin. Při reakci s thiomocovinou cisplatina vytváří silně žlutý roztok  $[\text{Pt}(\text{Th})_4]^{2+}$ , zatímco transplatina tvoří bílý nerozpustný komplex *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Th})_2]\text{Cl}_2$  (viz Obr. 4) (Alderden et al., 2006).



Obr. 3: Syntéza cisplatiny podle Dhara et al., 1970. Obrázek upraven podle Wilson & Lippard, 2014.



Obr. 4: Rozlišení mezi cisplatinou a transplatinou pomocí thiomočoviny. Obrázek upraven podle Alderden et al., 2006.

Cisplatina je známá svým účinkem na různé typy nádorových onemocnění, organismus pacienta si však dokáže vytvořit rezistenci na toto léčivo. Nádorové buňky nejsou tak schopny podstoupit apoptózu při správných klinických koncentracích léčiva. Rezistence může být způsobena sníženou intracelulární koncentrací (zodpovědná za 70-90 % případů rezistence), zvýšenou opravou poškozené DNA či cytosolickou inaktivací cisplatiny (Aldossary, 2019).

Omezení pro použití cisplatiny je spatřováno také v jejích nežádoucích účincích, které se nejčastěji projevují jako nevolnost a zvracení. Pokud nejsou podávána antiemetika, může docházet k emetickým záchvatům (zvracení) až 11x za den.

Nefrotoxicita je jedním z dalších hlavních vedlejších účinků použití cisplatiny, jelikož ledviny hrají důležitou roli při vylučování tohoto léčiva. Ledviny jsou schopny akumulovat vyšší koncentraci cisplatiny než kterýkoliv jiný orgán v těle (včetně jater). Cisplatina se v ledvinách biotransformuje na cysteinyl glycinové konjugáty a jiné thiole, u kterých se předpokládá, že způsobují toxicitu. Mezi další nežádoucí účinky patří např. hepatotoxicita, neurotoxicita a kardiotoxicita (Aldossary, 2019).

Cytostatický účinek cisplatiny, který je založen na vazbě na molekulu DNA, je v odborné literatuře nejlépe popsán, proto se mu bude věnovat samostatná kapitola 2.3. U ostatních cytostatik uvedených v následujících subkapitolách je mechanismus účinku v krátkosti popsán přímo u dané sloučeniny.

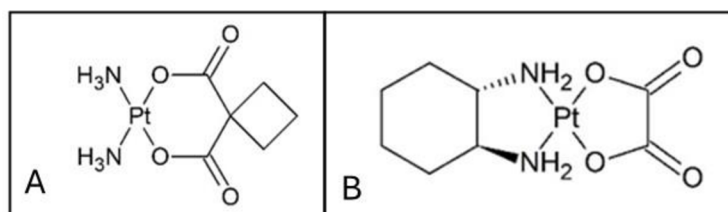
### **2.2.1.2 Karboplatina**

Předpokladem pro navržení karboplatiny (*cis*-diammin-[1,1-cyklobutan dikarboxyláto]platnatého komplexu) (viz Obr. 5 – část A) bylo, že stabilnější odstupující skupina než chlorid může snížit toxicitu, aniž by ovlivnila protinádorovou aktivitu léčiva (Brabec et al., 2017). Jelikož je karboplatina méně reaktivní, může být podávána ve větších dávkách (Wheate et al., 2010). Nevýhodou použití tohoto léčiva je zkřížená rezistence s cisplatinou (Lebwohl & Canetta, 1998).

Cyklobutandikarboxylátový ligand, který se nachází ve struktuře karboplatiny, je horší odstupující skupinou než chloridy u cisplatiny. Karboplatina však dokáže efektivně platinovat molekulu DNA díky tomu, že je aktivována nukleofily a nižším pH v nádorových buňkách. Dojde tak k odstranění cyklobutandikarboxylátové skupiny a vytvoření hydratované cisplatiny. DNA adukty vytvořené karboplatinou jsou stejné jako ty vytvořené cisplatinou. Bylo také zjištěno, že karboplatina a její deriváty jsou potenciálními kandidáty pro použití v nádorové terapii, která využívá aktivaci světlem (Brabec et al., 2017).

### **2.2.1.3 Oxaliplatina**

Oxaliplatina ([*trans*-1R,2R-diamincyklohexan]oxalátolatnatý komplex) byla poprvé schválena ve Francii v roce 1996 a následně v USA roku 2002 (viz Obr. 5 – část B). Jedná se o první léčivo, které bylo v organismu schopné překonat rezistenci na cisplatinu díky tomu, že tvoří rozdílné adukty s DNA (Wheate et al., 2010).



Obr. 5: Strukturní vzorec karboplatiny (A) a oxaliplatiny (B).

Rozdíly jsou spatřovány v tom, že adukty oxaliplatiny s DNA jsou objemnější a hydrofobnější. Adukty oxaliplatina-DNA jsou efektivnější při inhibici DNA syntézy a jsou cytotoxičtější než adukty s cisplatinou. Dále lze zmínit, že oxaliplatina může zabránit vazbě proteinů mechanismu opravy chybného párování bází (z angl. mismatch repair) na konformační změny na molekule DNA (Raymond et al., 1998).

#### 2.2.1.4 Nedaplatina

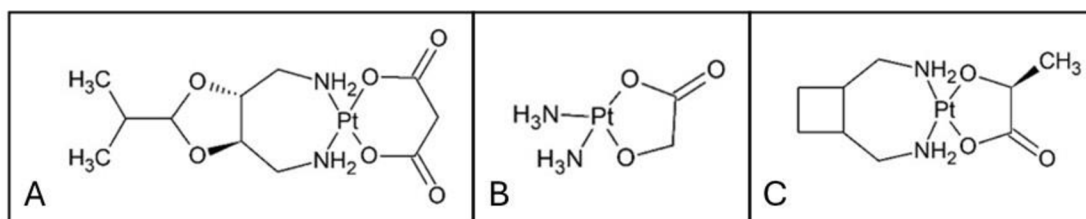
Nedaplatina (diammin(hydroxyacetáto)platnatý komplex) je analogem cisplatin. Tato sloučenina byla vyvinuta farmaceutickou společností v Japonsku, kde je také schválena pro použití v klinické praxi. Na rozdíl od cisplatin má nedaplatina nízkou afinitu k vazbě na proteiny (Shimada et al., 2013). Jedná se o léčivo, které je desetkrát více rozpustné ve vodě než cisplatin a je méně nefrotoxické než cisplatin a karboplatina (Wheate et al., 2010).

#### 2.2.1.5 Lobaplatina

Lobaplatina (2-cyklobutandimethanamin(2-hydroxypropanáto)platnatý komplex) je schválena pro použití v Číně (Galanski et al., 2005). Wu et al., 2010 ve své studii zjistili, že lobaplatina vykazovala i aktivitu vůči buněčné nádorové linii hepatocelulárního karcinomu.

#### 2.2.1.6 Heptaplatina

V Jižní Koreji je heptaplatina (2-isopropyl-1,3-dioxolanáto-4,5-dimethanamin(propandioáto)platnatý komplex) schválena pro použití v klinické praxi (Galanski et al., 2005). Tato látka je schopna efektivně kondenzovat nukleovou kyselinu (Brabec et al., 2017). Na Obr. 6 jsou znázorněny strukturní vzorce heptaplatiny, nedaplatiny a lobaplatiny.



Obr. 6: Strukturní vzorce heptaplatiny (A), nedaplatiny (B) a lobaplatiny (C).

## 2.2.2 Pt cytostatika v klinickém testování

V této subkapitole budou popsány vybrané protinádorové komplexní sloučeniny, které se nachází v klinické fázi testování – konkrétně se jedná o lipoplatinu (liposomální cisplatinu), Pt(IV) komplex satraplatinu, Pt(II) koordinační sloučeninu picoplatinu a trinukleární komplexní sloučeninu BBR3464. Důležitou součástí mechanismu účinku těchto sloučenin, stejně jako ostatních komplexních sloučenin obsahujících platinu, je vazba na molekulu DNA (viz dále).

### 2.2.2.1 Lipoplatina

Lipoplatina (liposomální cisplatinu) je enkapsulovaná forma cisplatinu, která byla vytvořena s cílem snížit toxicitu cisplatinu a umožnit administraci větších dávek léčiva cíleně do primárních tumorů a metastáz. Nanočásticové liposomy, do nichž je cisplatinu zabalená, jsou reverzní micely, které jsou složeny z 1,2-dipalmitoyl-3-fosfatidylglycerolu, sójového fosfatidylcholinu, cholesterolu a methoxy-polyethylenglykol-distearoyalfosfatidylethanolaminu. Lipoplatina je schopna projít buněčnou membránou snadněji než cisplatinu. Přítomnost polyethylenglykolu zabraňuje detekci lipoplatiny složkami imunitního systému (Wheate et al., 2010).

Lipoplatina úspěšně překonala fázi III klinického testování, kde vykazovala protinádorové vlastnosti vůči metastazujícím nádorům prostaty, tlustého střeva, žaludku a plic. Vykazovala také potenciál při použití v kombinaci s 5-fluorouracilem u nádorů plic a krku (Xian et al., 2021).

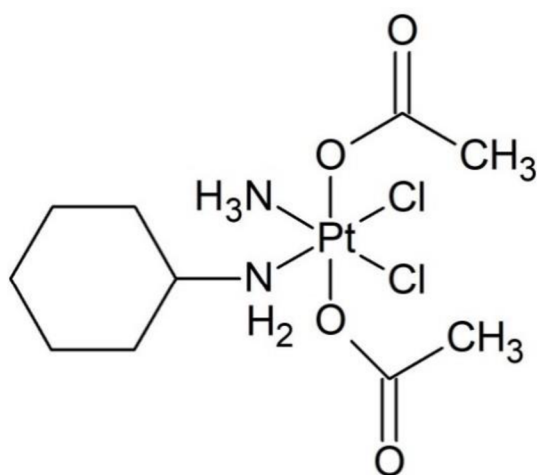
### 2.2.2.2 Satraplatina

Satraplatina (*bis*-(acetát)-ammin-dichloro-(cyklohexylamin) platičitý komplex) je Pt(IV) komplexní sloučeninou (viz Obr. 7), jež je aktivní vůči karcinomům rezistentním na cisplatinu a vykazuje podobnou cytotoxicitu jako karboplatina. Toto

léčivo je podáváno orálně, takže je zvýšen komfort pacientů při chemoterapeutické léčbě (Bhargava & Vaishampayan, 2009).

Mechanismus účinku satraplatiny je, podobně jako u cisplatinu a dalších platnatých cytostatik, založen na tvorbě aduktů s DNA – meziřetězcových a vnitřetězcových můstků. Satraplatina inhibuje replikaci a transkripci DNA a indukuje signální dráhy vedoucí k zástavě buněčného cyklu a apoptóze. Asymetrické stabilní ligandy mj. snižují pravděpodobnost rozpoznání DNA opravnými mechanismy a HMG (z angl. high mobility group) proteiny, což má za výsledek, že satraplatina je schopna překonat rezistenci organismu na cisplatinu (Bhargava & Vaishampayan, 2009).

Momentálně se satraplatina nachází ve fázi III klinického testování označovaném jako SPARC (Satraplatin and Prednisone Against Refractory Cancer, testování využívalo satraplatinu a prednison proti refrakterní rakovině prostaty – tento typ nádoru je těžce léčitelný). V tomto testování vykazovaly uvedené látky aktivitu vůči pokročilému karcinomu prostaty (konkrétně typ nádoru mCRPC – z angl. metastatic castration-resistant prostate cancer) (Liaw et al., 2023). Satraplatina byla aktivní i u karcinomů plic a vaječnicků (Galanski et al., 2005).



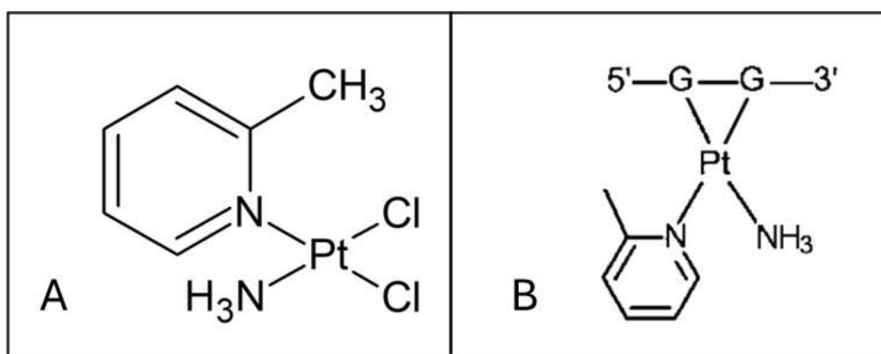
Obr. 7: Strukturální vzorec satraplatiny.

### 2.2.2.3 Picoplatina

Picoplatina (*cis*-diammindichloro(2-methylpyridin) platnatý komplex) je koordinační sloučenina, která ve své struktuře obsahuje 2-methylpyridin, jež se označuje také jako 2-pikolin (viz Obr. 8 – část A). *N*-heterocykly jsou slibnými ligandy pro potenciálně protinádorové komplexní sloučeniny – mezi další komplexy obsahující *N*-heterocyklus patří např. monofunkční Pt(II) komplex fenantriplatina (Facchetti & Rimoldi, 2019).

Vazba picoplatiny na DNA je ovlivněna sterickými faktory (Chen et al., 1999). U pikolinového komplexu dochází také k pomalejší hydrolyze, kdy chloridový ligand, který se nachází vůči NH<sub>3</sub> ligandu v *trans* poloze, hydrolyzuje čtyřikrát pomaleji než ten u cisplatinu. To může vést k menší intracelulární aktivitě v porovnání s cisplatinou. Může to také přispívat k vyšší aktivitě v nádorových buněčných liniích, které jsou na cisplatinu rezistentní (Chen et al., 1998).

Jelikož se jedná o analog cisplatinu, tak není překvapivé, že mechanismem způsobujícím cytotoxicitu tohoto komplexu je vazba na DNA. Picoplatina se váže na DNA se značnou stereoselektivitou. Interakce picoplatiny s DNA zřejmě probíhá tak, jak je znázorněno na Obr. 8 (část B). K této vazbě přispívají také vodíkové vazby mezi NH<sub>3</sub> ligandem a O6 atomem na guaninu. Mohou také přispívat van der Waalsovy interakce mezi CH<sub>3</sub> skupinou 2-picolinu a CH<sub>3</sub> skupinou thyminu, pokud se nachází v blízkosti. Poškození DNA způsobená picoplatinou mohou být rozeznávána opravnými systémy jiným způsobem než adukty cisplatinu-DNA (Chen et al., 1999).



Obr. 8: Strukturální vzorec picoplatiny (A), schematické znázornění vazby picoplatiny na DNA (B). Obrázek B převzat z Chen et al., 1999.



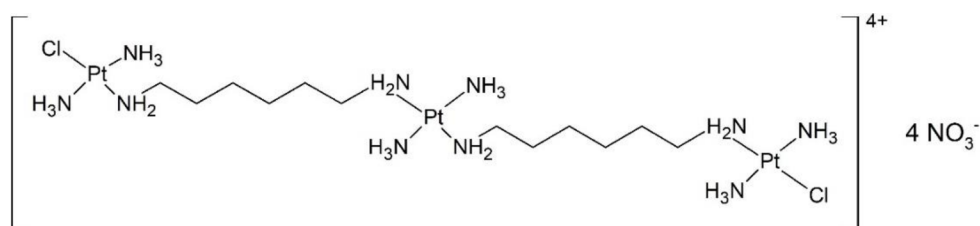
Picoplatina vykazovala výrazný účinek při léčbě karcinomu vaječníků a plic, které jsou rezistentní na cisplatinu a karboplatinu. Tato komplexní sloučenina byla předmětem fáze II a III klinického testování, ve které byla zkoumána protinádorová aktivita vůči nemalobuněčnému karcinomu plic. Klinická testování se zaměřovala také např. na kombinaci picoplatiny a docetaxelu při léčbě karcinomu prostaty (Kopacz-Bednarska & Król, 2022).

#### 2.2.2.4 BBR3464

BBR3464 je označení pro trinukleární komplexní sloučeninu (obsahuje tři atomy platiny). Její strukturní vzorec je znázorněn na Obr. 9 – BBR3464 obsahuje ve své struktuře dvě *trans*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] jednotky, které jsou spojené tetra-aminovou jednotkou [*trans*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, jež přispívá k vazbě na DNA pouze pomocí elektrostatických a vodíkových interakcí. Celkový náboj této sloučeniny je 4+ a je neutralizován čtyřmi dusičnanovými anionty (Manzotti et al., 2000).

BBR3464 byl účinnější než cisplatinu u buněčné linie neuroblastomu a na cisplatinu rezistentní linie astrocytomu (Servidei et al., 2001). Komplex vykazoval také vysokou míru účinku u nádorové linie karcinomu vaječniku se získanou rezistencí k cisplatině (Manzotti et al., 2000). I u tohoto Pt(II) komplexu experimenty naznačují, že vazba na DNA je velmi důležitým faktorem cytostatického účinku této sloučeniny. BBR3464 pravděpodobně vytváří bifunkční adukty s DNA. Bylo zjištěno, že tvoří větší množství meziřetězcových můstků a způsobuje větší úhel rozvíjení DNA než cisplatinu. Díky této koordinační sloučenině dochází ke vzniku takových vnitřetězcových a meziřetězcových můstků, které pokrývají velký úsek molekuly DNA a způsobují tak efektivní poškození této molekuly (Brabec et al., 1999).

Doposud komplexní sloučenina BBR3464 prodělala fázi II klinického testování pro léčbu metastazujícího malobuněčného karcinomu plic, pokročilého a metastazujícího karcinomu slinivky břišní (<https://clinicaltrials.gov/>).



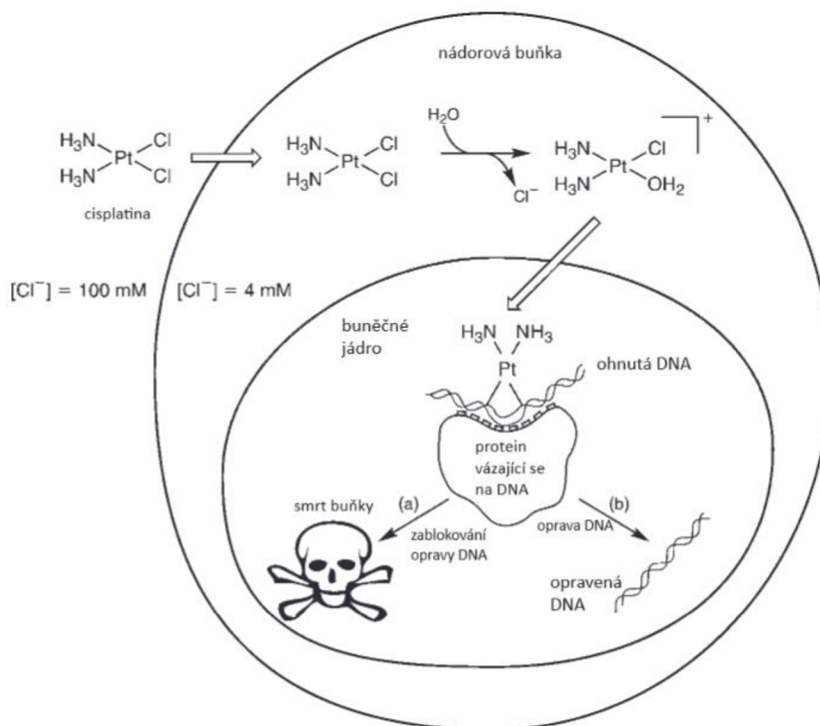
Obr. 9: Strukturní vzorec komplexu BBR3464.

## 2.3 Cytotoxický účinek cisplatiny v buňce

Hlavní cytotoxický účinek cisplatiny je založen na tvorbě aduktů s DNA (Brabec, 2002). Na Obr. 10 je znázorněno zjednodušené schéma mechanismu účinku cisplatiny. Působení cisplatiny v organismu bude popsáno v následujících subkapitolách. Cisplatina je podávána pacientům intravenózně (Kartalou & Essigmann, 2001).

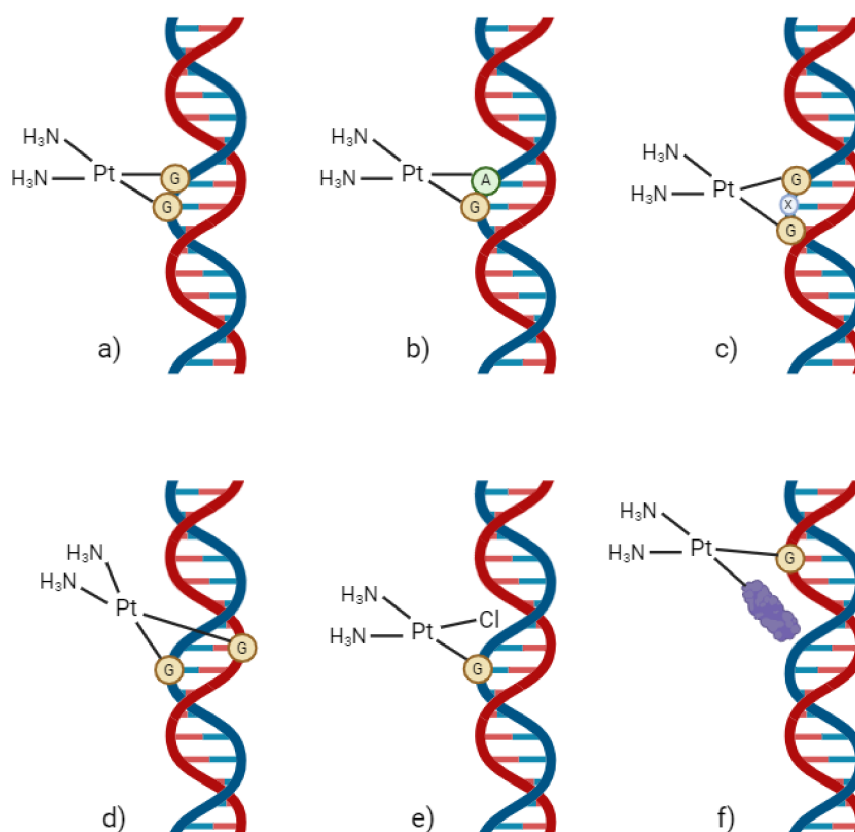
### 2.3.1 Vstup do buňky a tvorba aduktů cisplatina-DNA

Po vstupu do cytoplazmy buňky je cisplatina aktivována nahrazením chloridových atomů molekulami vody. Díky tomu dojde k vytvoření elektrofilu, který je afinitní vůči sulfhydrylovým skupinám na proteinech a dusíkovým atomům na nukleových kyselinách (Tchounwou et al., 2021). Cisplatina může vstoupit do buňky pasivní difuzí přes plasmatickou membránu nebo aktivním transportem zprostředkovaným membránovými proteiny. Aktivní transport je pravděpodobně hlavním mechanismem vstupu cisplatiny do buňky (Johnstone et al., 2016).



Obr. 10: Zjednodušené schéma cytotoxického účinku cisplatiny v buňce. Obrázek upraven podle Alderden et al., 2006.

Nejnukleofilnějším místem na DNA jsou *N7* atomy guaninu a adeninu, u kterých dochází k platinaci přednostně. Nejprve cisplatina vytváří monofunkční adukty s DNA, následně dochází k tvorbě vnitřetězcových a mezietězcových můstků (Johnstone et al., 2016). Nejrozšířenějším aduktem s DNA, který cisplatina vytváří, je vnitřetězcový adukt, a to konkrétně vazba na dva sousední guaniny (1,2-GG adukt; 65 % všech aduktů) (Eastman, 1986). V tomto případě se cisplatina váže na *N7* atomy imidazolového kruhu dvou sousedních guaninů (Brabec et al., 2017). Druhými v pořadí jsou adukty, u kterých se cisplatina váže na sousední adenin a guanin (1,2-AG adukt; 25 % všech aduktů). Dalšími adukty, které cisplatina může vytvářet, je vazba na dva guaniny, mezi kterými je jiná báze (1,3-GG adukt), vazba na jeden guanin, vazba na jeden guanin a protein a tvorba mezietězcového můstku (Eastman, 1986). Mezietězcové můstky způsobují velké poškození DNA a preferenčně se tvoří mezi *N7* atomy dvou guaninových bází (Lemaire et al., 1991) Na Obr. 11 jsou znázorněny všechny zmíněné adukty cisplatina-DNA.



Obr. 11: Adukty cisplatina-DNA. a) vazba na dva sousední guaniny, b) vazba na sousední adenin a guanin, c) vazba na dva nesousední guaniny, d) tvorba mezietězcového můstku, e) vazba na jeden guanin (monofunkční adukt), f) vazba na guanin a protein. Obrázek byl vytvořen za pomoci webového softwaru BioRender.

Bylo zjištěno, že adukty, které cisplatina vytváří, narušují konformaci DNA (způsobují ohnutí a rozvinutí helixu). Hlavní vnitřetězcové adukty (1,2-GG adukty) způsobují ohnutí DNA helixu o 40° vůči velkému žlábků. Tento adukt také rozvíjí DNA helix o 13°. Dále např. adukt cisplatiny, který se váže na dva nesousední guaniny (1,3-GG adukt), ohýbá DNA o 25-35° a rozvíjí DNA helix o 23°. Jednotlivé adukty jsou schopny narušit strukturu DNA unikátním způsobem, z čehož vyplývá, že každý adukt bude rozpoznán a procesován jinými buněčnými proteiny (Kartalou & Essigmann, 2001).

### **2.3.2 Rozpoznání aduktů cisplatina-DNA proteiny**

Hlavní vnitřetězcové adukty cisplatiny jsou odstraňovány z DNA především nukleotidou excisní opravou, dále také opravným mechanismem MMR. Tyto opravné mechanismy mohou být příčinou rezistence buněk k cisplatině (Brabec, 2002; Brabec et al., 2017). Adukty cisplatina-DNA jsou však také rozpoznány řadou proteinů, které jsou velmi důležité pro protinádorovou aktivitu cisplatiny. Jedná se např. o opravné enzymy, transkripční faktory, histony a proteiny obsahující HMG doménu (z angl. high mobility group) (Brabec et al., 2017).

Mezi transkripční faktory patří např. TATA-vazebný protein, který je nezbytný pro iniciaci transkripce v eukaryotních buňkách. Tento protein se váže na 1,2-GG adukty (Brabec, 2002). Dalším transkripčním faktorem, který se váže na DNA modifikovanou cisplatinou je Y-box vázající protein, který se váže na 1,2-GG, 1,2-AG a 1,3-GG vnitřetězcové adukty (Todd & Lippard, 2009).

#### **2.3.2.1 Proteiny obsahující HMG doménu**

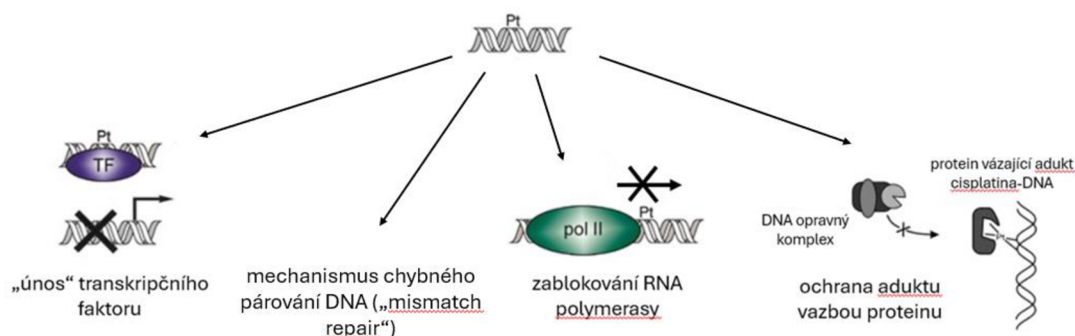
HMG doména je společný strukturní element dvou rodin proteinů vázajících se na DNA (Kartalou & Essigmann, 2001). První rodina se skládá z proteinů, které obsahují dvě nebo více HMG domén – patří sem HMGB1 a HMGB2 proteiny či jaderný transkripční faktor RNA polymerasy I (UBF) (Woźniak & Błasiak, 2002). Zajímavé je, že UBF se váže na 1,2-GG adukty cisplatina-DNA s největší známou afinitou jakéhokoliv proteinu vůči distorzím na DNA způsobených platinou (Todd & Lippard, 2009). Do druhé rodiny patří proteiny, které obsahují jednu HMG doménu (např. tkáňově specifické transkripční faktory) (Woźniak & Błasiak, 2002).

HMGB1 protein obsahuje dvě HMG domény A a B (HMGB1a a HMGB1b), které jsou spojeny krátkou sekvencí, která je bohatá na lysiny (HMGB1 protein ještě obsahuje „kyselý ocas“ – z angl. acidic tail). Každá doména specificky rozpoznává 1,2-GG vnitrořetězcový adukt (nebo 1,2-AG adukt), avšak nedochází k vazbě na 1,3-GG vnitrořetězcové adukty, monofunkční adukty ani na adukty vytvořené transplatinou. Vyšší afinitu k 1,2-GG aduktu má HMGB1a doména, která je také hlavní doménou, jež se váže na místo na DNA, kde se nachází daný vnitrořetězcový adukt, zatímco HMGB1b zprostředkovává dodatečné interakce DNA s proteinem. HMG doména se váže do malého žlábků DNA dvoušroubovice na opačné místo, než na kterém se nachází 1,2-GG adukt (Brabec, 2002).

### **2.3.3 Mechanismy zajišťující protinádorovou aktivitu cisplatin**

Vazba cisplatin na DNA vyvolává poškození této molekuly, které vede v buňce k narušení několika buněčných procesů včetně replikace a transkripce. DNA poškozená cisplatinou je buď odstraněna buněčnými opravnými mechanismy, nebo dochází k apoptóze (Todd & Lippard, 2009). Sorenson a Eastman, 1988 zjistili, že u leukemických myších buněk došlo při vazbě cisplatin na DNA k zastavení buněčného cyklu v G2 fázi díky tomu, že buňky nebyly schopny přepisovat geny nutné pro přechod do mitózy (nedocházelo k dělení buňky, ale syntéza DNA probíhala). Toto naznačuje, že inhibice transkripce DNA adukty vytvořeny cisplatinou je důležitější složkou cytotoxického účinku cisplatin než inhibice syntézy DNA (Sorenson & Eastman, 1988).

Mechanismy protinádorové aktivity cisplatin vedoucí nejen k inhibici transkripce, jež jsou zmíněné v této subkapitole, jsou znázorněny na Obr. 12. Mezi složky protinádorového působení cisplatin patří např. „únos“ proteinů vázajících se na poškozenou DNA, jako jsou např. transkripční faktory, pryč z jejich normální vazebných míst, což vede k narušení základních buněčných procesů, kterých se tyto faktory účastní (např. transkripce). Může dále docházet např. k inhibici enzymů zajišťujících RNA syntézu při transkripci, kdy DNA adukty vytvořené cisplatinou mohou sloužit jako „překážka“ zabraňující prodlužování mRNA řetězce (Todd & Lippard, 2009; Brabec et al., 2017).



Obr. 12: Možnosti, kterými cisplatina v nádorových buňkách působí cytotoxickým účinkem. Tyto mechanismy mohou vést k apoptóze nádorové buňky. Obrázek upraven podle Kartalou & Essigmann, 2001; Todd & Lippard, 2009.

Dalším způsobem zajišťujícím protinádorový účinek cisplatiny je ochrana aduktů cisplatina-DNA před opravou buněčnými opravnými mechanismy. Dochází k vazbě proteinů (např. HMGB1) na DNA poškozenou cisplatinou. Adukty cisplatina-DNA tak přetrvávají v buňce, což přispívá k protinádorovému účinku cisplatiny (Brabec et al., 2017).

I opravný mechanismus DNA, a to konkrétně MMR, může hrát roli v cytotoxicitě cisplatiny. Proteiny tohoto mechanismu rozpoznávají adukty cisplatinu na vlákne DNA a pokouší se opravit dané poškození. Jelikož neexistuje správná báze, která může být zainkorporována na opačném vlákně od vlákna, kde se nachází cisplatina, dochází k cyklu oprav, který je však bezvýsledný, což může vést k zastavení buněčného cyklu a/nebo k apoptóze (Kartalou & Essigmann, 2001).

## 2.4 Nové experimentální sloučeniny těžkých kovů s cytostatickým účinkem

V mnoha laboratořích po celém světě dochází k vývoji nových sloučenin obsahujících těžké kovy, které by mohly projevat protinádorový účinek a překonat tak omezení již používaných chemoterapeutik (cisplatinu a jejich derivátů). Při navrhování nových sloučenin s cytostatickým účinkem může dojít ke změně ligandů navázaných na platinu, jak bylo patrné např. u satraplatiny (viz Obr. 7). Lze změnit izomerii sloučeniny (*cis* na *trans*) (analoga transplatinu popsána v práci Ramos-Lima et al., 2006). Dále může dojít ke změně oxidačního stavu sloučeniny (vytvoření platičitých komplexů – viz dále). Pro tvorbu protinádorových komplexních sloučenin nemusí být použita pouze platina, ale také jiný těžký kov (ruthenium, paladium, osmium, iridium

či zlato). V této kapitole je konkrétně věnována pozornost transplatini a jejím analogům, Pt(IV) cytostatikům a vybraným komplexním sloučeninám, jež obsahují jiný centrální atom než platinu.

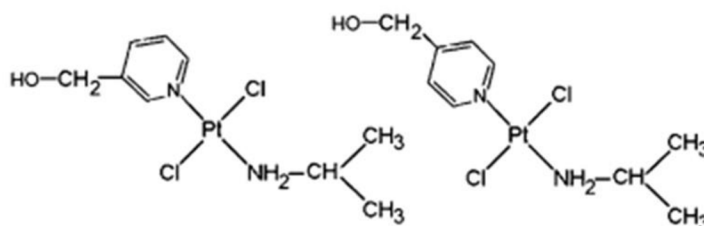
### 2.4.1 Transplatina a její analoga

Izomerem cisplatiny je transplatina, která není za normálních podmínek protinádorově aktivní. Transplatina však může být stejně cytotoxická jako cisplatina při působení UVA záření. Bylo zjištěno, že monofunkční adukty transplatiny se tvoří rychle, ale jejich přechod na adukty bifunkční je pomalejší a méně častý než u cisplatiny. Při působení UVA záření dochází ke ztrátě druhého chloridu transplatiny a tvorbě především meziřetězcových můstků (Heringova et al., 2006).

Ramos-Lima et al., 2006 ve své studii popsali cytotoxické účinky analogů transplatiny, u kterých byla jedna amminová skupina nahrazena alifatickým aminem a druhá planárním heterocyklickým ligandem (viz Obr. 13). Na heterocyklickém ligandu se nacházela OH skupina, od které si autoři slibovali, že zvýší rozpustnost komplexů a bude lépe interagovat s cílovou biologickou skupinou. Tyto sloučeniny vykazovaly podobný způsob vazby na DNA jako cisplatina – došlo k tvorbě vnitřetězcových můstků (Ramos-Lima et al., 2006).

### 2.4.2 Pt(IV) cytostatika

Již od minulého století je známo, že platičité komplexy mají protinádorové vlastnosti. Některá Pt(IV) cytostatika byla navrhuta jako proléčiva, která obsahují bioaktivní ligand, a která jsou také schopna uvolnit Pt(II) skupinu (dojde k redukci v prostředí nádorových buněk). Připojený ligand a aktivní Pt(II) skupina zajistí duální letální působení na nádor. Pt(IV) cytostatika, která fungují na tomto principu a kterým se bude věnovat tato subkapitola, jsou mitaplatina a etakraplatina (Johnstone et al., 2013).



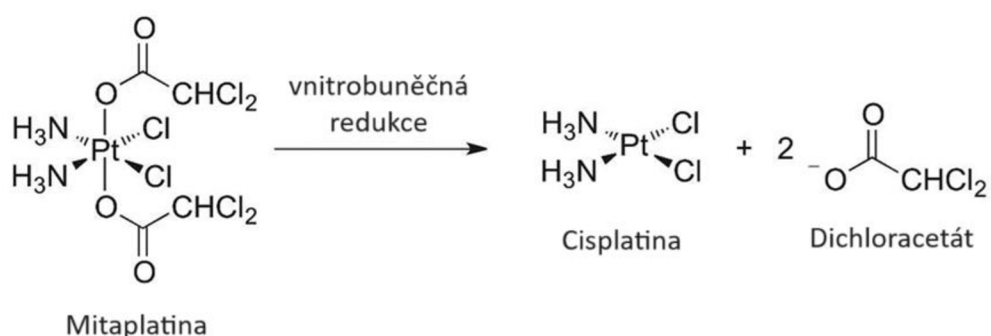
Obr. 13: Analoga transplatiny použita v práci Ramos-Lima et al., 2006.

Další významnou Pt(IV) koordinační sloučeninou s protinádorovým účinkem, jež se nachází v klinickém testování, je satraplatina, o které bylo pojednáno v kapitole 2.2. Mezi další Pt(IV) komplexy nezahrnuté do této subkapitoly, které se zkoumají pro svůj potenciál léčit nádorová onemocnění, patří např. oxoplatina a adamplatina (Kopacz-Bednarska & Król, 2022).

### 2.4.2.1 Mitaplatina

Mitaplatina (*cis,cis,trans*-diammindichloridobis(dichloroacetáto)platičitý komplex) je komplexní sloučenina, která je schopna se uvnitř buňky redukovat na cisplatinu a dvě dichloroacetátové molekuly (DCA), jak je patrné na Obr. 14. Tento komplex může tedy cílit jednak na jadernou DNA (cisplatinu) a jednak na mitochondrie (DCA) (Xue et al., 2012; Gabano et al., 2014).

Bylo pozorováno, že u nádorových buněk probíhá v intenzivní míře glykolýza, která dokonce převažuje nad oxidativní fosforylací. Uvolněný dichloroacetát je inhibítorem glykolýzy. Podporuje oxidativní fosforylací nad glykolýzou tím, že tlumí pyruvátdehydrogenasakinasu, a tak zvyšuje tok pyruvátu do mitochondrií. DCA tak způsobí regresi nádorového onemocnění zvýšením senzitivity buněk k chemoterapii díky tomu, že dojde k obnovení funkce mitochondrií (a tím i mitochondriální apoptotické dráhy). Tento mechanismus má zanedbatelný vliv na normální buňky. Cytotoxicita mitaplatiny na různé nádorové buněčné linie je srovnatelná nebo dokonce lepší než u cisplatinu, zejména u nádorových buněk s vytvořenou rezistencí (Gabano et al., 2014).



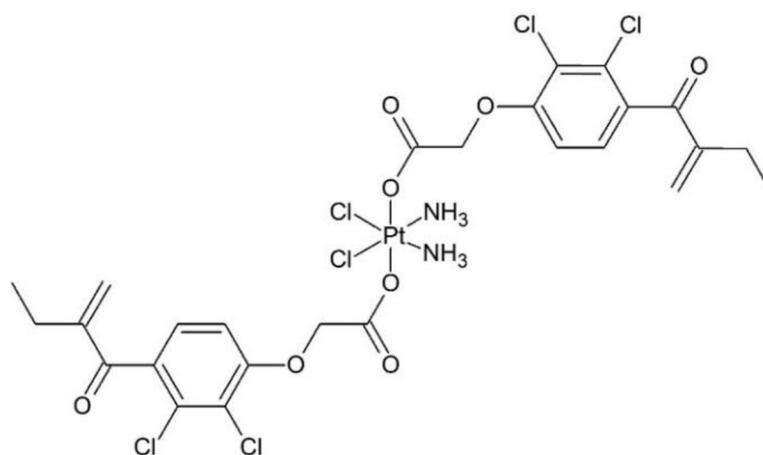
Obr. 14: Znárodnění rozpadu mitaplatiny na cisplatinu a dva dichloroacetátové ligandy. K tomuto jevu dochází při intracelulární redukci v prostředí nádorových buněk. Obrázek upraven podle Johnstone et al., 2013.



### 2.4.2.2 Etakraplatina

RX: glutathion-R-transferasy (glutathiontransferasy, GSTs, EC 2.5.1.18) jsou enzymy, které v organismu mohou plnit různé biologické role – ochrana buněk před oxidačním stresem či toxickými molekulami. Tyto enzymy jsou schopny konjugovat glutathion s velkým množstvím molekul (např. karcinogenů, terapeutických léčiv či produktů oxidativního metabolismu). Konjugace vede k přeměně na méně toxické látky. GSTs jsou často u nádorových buněk nadexprimovány, což vede ke zvýšení detoxifikace protinádorových léčiv a tím pádem k rezistenci organismu k léčivu. Za jedním z mnoha mechanismů rezistence organismu k cisplatině jsou zodpovědné i GSTs, které mohou katalyzovat reakci glutathionu s cisplatinou (tato reakce však může probíhat i neenzymaticky) (Allocati et al., 2018).

Mezi inhibitory GSTs patří např. etakrynová kyselina (EA, [2,3-dichloro-4-(2-methylenbutanoyl)fenoxy]octová kyselina), která se v klinické praxi používá jako diuretikum. Etakraplatina byla vyvinuta jako inhibitor GST P1-1, což je konkrétní třída enzymů GSTs, která je zodpovědná za detoxifikaci xenobiotik. Nadexprese GST P1-1 je asociována s mnoha nádorovými onemocněními, proto tento protein slouží jako biomarker. Tato sloučenina obsahuje ve své struktuře dvě EA na *cis,cis,trans*-diammindichloridobiskarboxylatoplatinicičné kostře (viz Obr. 15). Po vstupu do buňky může být tato sloučenina redukována a dojde k uvolnění cisplatinu a dvou molekul EA schopných inhibovat GSTs. Bylo zjištěno, že etakraplatina je účinnějším inhibitorem než samotná EA (Parker et al., 2011).



Obr. 15: Strukturální vzorec etakraplatiny.

Byly také úspěšně vytvořeny micely obsahující etakraplatinu. Tyto micely byly schopny zvýšit množství léčiva v místě nádoru díky zvýšené propustnosti, zlepšit cytostatický účinek látky a zajistit nízkou toxicitu pro organismus (byly schopny obejít nefrotoxický účinek cisplatinu) (Li et al., 2017). Do micely byla také enkapsulována mitaplatina, což vedlo ke zlepšení dlouhodobějšího účinku tohoto léčiva na inhibici růstu nádoru (Johnstone et al., 2013).

### **2.4.3 Vybraní zástupci potencionálních protinádorových komplexních sloučenin na bázi ruthenia a iridia**

Bylo syntetizováno mnoho potencionálních protinádorových sloučenin, které ve své struktuře obsahují např. osmium, ruthenium, iridium, paladium, rhodium, měď či zlato, tedy jiný kov než platinu. První část této subkapitoly je věnována jednomu z mnoha zástupců Ru komplexů – fotoaktivnímu TLD1433. Mezi další významnou skupinu sloučenin obsahujících Ru, o kterých však v této subkapitole nebude pojednáno, patří např. polosendvičové komplexy, které vykazují slibné protinádorové účinky (Bashir et al., 2023). Ve druhé části je pojednáno o Ir(III) komplexech, které tvoří velkou skupinu rozmanitých látek s potencionálním využitím pro léčbu nádorů. Na Obr. 16 jsou znázorněny všechny komplexní sloučeniny, o kterých je zmínka v této subkapitole.

#### **2.4.3.1 Ru(II) komplex – TLD1433**

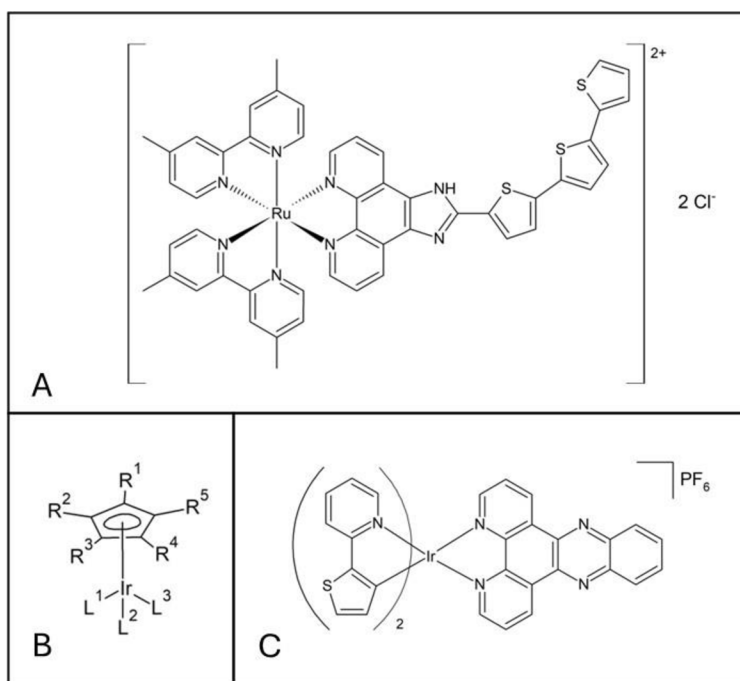
TLD1433 je Ru(II) polypyridylový komplex, který se využívá v rámci fotodynamické terapie jako fotosensitizer (PS) (Monro et al., 2019). Momentálně se tato látka nachází ve fázi II klinického testování pro léčbu karcinomu močového měchýře (<https://clinicaltrials.gov/>).

Fotodynamická terapie neboli terapie světlem specifický způsob léčby nádorových onemocnění, který je založen na reakci mezi PS (světlem aktivovanou molekulou), světlem a molekulárním kyslíkem. Dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku, které mohou způsobit poškození buněk. Má dvě fáze – vpravení PS (nebo prekurzoru PS) do organismu a expozice konkrétní části organismu světlem, což vede k lokálnímu poškození tkáně. Dochází k významné redukci vedlejších účinků, neboť PS, pokud není vystaven přímému světlu, je neškodný (van Straten et al., 2017).

### 2.4.3.2 Ir(III) komplexy

Polosendvičové Ir(III) komplexní sloučeniny obsahují většinou ve své struktuře cyklopentadienylovou (Cp) skupinu nebo její derivát. Cp skupina je silným donor elektronů a způsobuje rychlejší výměnu ligandů a rychlejší hydrolýzu po vstupu do buňky, což vede ke zvýšení protinádorové aktivity (Ajay et al., 2020).

Dále byly syntetizovány cyklometalované Ir(III) komplexy obsahující např. dipyridofenazinové ligandy, u kterých bylo zjištěno, že se přednostně akumulují v mitochondriích. Tyto komplexy jsou schopny poškozovat mitochondriální DNA, což vede k poškození funkce mitochondrií a vyvolání apoptotické buněčné smrti. Cílení na mitochondriální DNA je efektivní protinádorovou strategií, která může pomoci překonat rezistenci organismu k cisplatině, neboť tato rezistence je často vyvolána jadernými opravnými mechanismy DNA, kterými však mitochondrie nedisponují (Cao et al., 2019).



Obr. 16: Strukturální vzorec komplexu TLD1433 (A), obecná struktura polosendvičové Ir(III) komplexní sloučeniny obsahující cyklopentadienylovou skupinu (B) a příklad strukturálního vzorce cyklometalované Ir(III) komplexní sloučeniny obsahující dipyridofenazinový ligand (C).

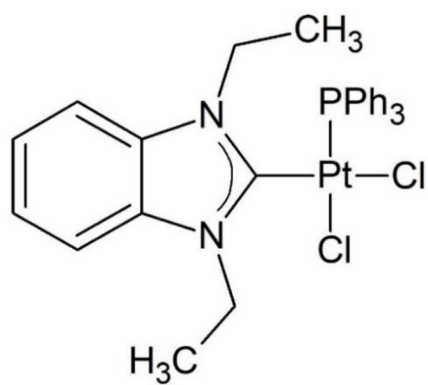
## 2.4.4 Komplex obsahující platinu použitý v experimentální části diplomové práce

Pro experimentální část diplomové práce byl vybrán komplex, jehož struktura je znázorněna na Obr. 17. Obecný vzorec komplexu je  $[(1,3\text{-diethylbenzimidazol-2-yliden})(\text{Ph}_3\text{P})(\text{Cl})_2]\text{Pt}$ , kde  $\text{Ph}_3\text{P}$  = trifenylfosfin. V následujícím textu bude označován jako komplex **9b**. Tento komplex byl poprvé studován v práci Rehm et al., 2018, ve které se autoři zabývali 11 komplexy obsahující *N*-heterocyklické karbeny.

U všech komplexů studovali autoři jejich cytotoxicitu, závislost cytotoxického účinku na proteinu p53 (mechanismus účinku komplexu **9b** by měl být na proteinu p53 závislý) a vstup komplexu do buněk. Buňky nádorové linie karcinomu tlustého střeva HCT116 byly inkubovány 5 h s komplexem **9b** o koncentraci  $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  – množství platiny nalezené v buňkách bylo  $245 \pm 18 \text{ pmol Pt}/10^6$  buněk.

Cytotoxicita komplexu **9b** byla v této publikaci studována na 7 nádorových liniích, kde proti většině z nich vykazoval značnou aktivitu. Byl účinnější než cisplatina i u multirezistentní nádorové linie karcinomu prsu MCF-7, což naznačuje, že není rozeznáván proteinem – efluxním transportérem označeným BCRP (z angl. breast cancer resistance protein), který je u této linie nadexprimován.

U vybraných komplexů byly v tomto článku studovány interakce s DNA. Pro komplex **9b** však byly provedeny pouze dva experimenty zjišťující, jakým způsobem interaguje s DNA, a to měření poklesu fluorescence ethidium bromidu (EtBr) a elektroforetické měření posunu mobility (EMSA). Komplex **9b** nevyvolal pokles fluorescence EtBr (nedošlo k nahrazení EtBr z jeho vazebných míst na molekule DNA komplexem). Při experimentu EMSA však vyvolal posun fragmentu při koncentraci  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . U vybraných komplexů autoři provedli další experimenty, díky kterým zjistili bližší informace o jejich interakci s DNA (rychlost vazby na DNA, měření teploty tání, fluorescence terbitých iontů, rozvíjení DNA či množství meziřetězcových můstků) – pro komplex **9b** tyto experimenty vykonány nebyly, proto se experimentům studujícím vazbu komplexu **9b** na DNA věnuje experimentální část diplomové práce.



Obr. 17: Strukturní vzorec komplexu **9b**. PPh<sub>3</sub> = trifenylfosfin

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Biologický materiál

- Buněčná lidská nádorová linie triple negativního karcinomu prsu MDA-MB-231: Buňky byly poskytnuty Mgr. Karlem Součkem, Ph.D. z Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR v Brně.
- Telecí thymová DNA (Sigma-Aldrich, ČR) o zásobní koncentraci  $210 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $6,56\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  nukleotidových bází).

### 3.2 Chemikálie

- Agarosa (Serva, SRN)
- Antibiotika: penicilin a streptomycin (Sigma-Aldrich, ČR)
- Deionizovaná voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ )
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, ČR)
- Dimethylformamid (DMF, Serva, SRN)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Penta, ČR)
- Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, ČR)
- DNA Loading buffer 6x (nanášecí pufr, New England Biolabs, USA)
- DNA Topoisomerasa I (Promega, USA)
- DNA Topoisomerasa I Buffer 10x (TaKaRa Bio, Japonsko)
- DNAzol – genomic DNA isolation reagent (Molecular Research Center, USA)
- Dodecylsírán sodný (SDS, Sigma-Aldrich, ČR)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Serana, SRN)
- *E. coli* RNA polymerasa holoenzym (New England Biolabs, USA)
- Ethanol (Penta, ČR)
- Ethidium bromid (Serva, SRN)
- Fetální hovězí sérum (FBS, Biosera, Francie)
- Hydrogenfosforečnan disodný (Sigma-Aldrich, ČR)
- Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, ČR)
- Chlorid draselný (Sigma-Aldrich, ČR)
- Chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich, ČR)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, ČR)

- Chloristan sodný (Sigma-Aldrich, ČR)
- Chlorid terbitý ( $TbCl_3 \cdot xH_2O$ , Wako Pure Chemical industries, Japonsko)
- Kyselina boritá (Serva, SRN)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, ČR)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich, ČR)
- MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- Neesenciální aminokyseliny – bez L-glutaminu (Sigma-Aldrich, ČR)
- pBR322 Vector (New England Biolabs, USA)
- Platinum Atomic Absorption Spectrometry Standard Solution (Sigma-Aldrich, ČR)
- pUC19 Vector (New England Biolabs, USA)
- Ribonukleotidy – ATP, CTP, GTP (New England Biolabs, USA)
- Sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA, Sigma-Aldrich, ČR)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, Sigma-Aldrich, ČR)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, ČR)
- Trypsin/kyselina ethylendiamintetraoctová (trypsin/EDTA, Sigma-Aldrich, ČR)
- Uridin-5'-trifosfát- $\gamma$ -(sulfo-1-naftyl)amid (UTP- $\gamma$ -AmNS, Jena Bioscience, SRN)

### 3.3 Přístroje, software a další pomůcky

- AIDA Image Analyzer software (AIDA Imaging, USA)
- Agilent 7500 ICP-MS spectrometer (Agilent, Japonsko)
- Analytické váhy HM-200 (A&D, Japonsko)
- Automatická počítačka buněk TC-20 (Bio-Rad, USA)
- Cary 4000 UV-ViS Spectrophotometer (Agilent, Japonsko)
- Centrifuga Sigma 3-18 K (Sigma, SRN)
- Circular dichroism spectropolarimeter JASCO J-720 (JASCO, Japonsko)
- GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism Software, USA)
- Flowbox SafeFAST Classic 212 (Faster, Itálie)
- Inkubátor MCO-18ACUV-PE (Panasonic, Japonsko)

- Elektroforetická vana Mini-Sub Cell GT Systems (Bio-Rad, USA)
- Elektroforetická vana Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad, USA)
- Kultivační nádoba T-75, centrifugační kyvety, 96ti jamková destička (TPP, Švýcarsko)
- Magnetická míchačka IKA RCT basic (Merck, SRN)
- Mikroskop NIB-100 (MIKRO, ČR)
- Multifunkční modulární reader SPARK (Schoeller, ČR)
- pH metr (Boeco, SRN)
- Předvážky (Boeco, SRN)
- Spectra por dialyzační membrána MWCO 6-8 kDa (Carl Roth, SRN)
- Spektrofotometr Beckmann DU-7400 (Beckman, USA)
- Systém pro výrobu dH<sub>2</sub>O Smart2Pure (ThermoFisher Scientific™, USA)
- Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, USA)
- Transluminátor Gel Logic 112 (Kodak, USA)
- Třepačka Universal Orbital Shaker OS-20 (Boeco, SRN)
- Varian AA280Z Zeeman Atomic Absorption Spectrometer (Varian, USA)
- Varian Cary Eclipse spectrofluorometer (Varian, USA)
- Vodní lázeň SB-12L shaking water bath (Benchmark Scientific, USA)
- Vortex V-1 Plus (Biosan, USA)
- Zdroj Enduro (Labnet, USA)
- Zdroj PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

### 3.4 Použité komplexní sloučeniny

Pro experimenty byla použita cisplatina a komplex [(1,3-diethylbenzimidazol-2-yliden)(Ph<sub>3</sub>P)(Cl)<sub>2</sub>]Pt (**9b**), kde Ph<sub>3</sub>P = trifenylfosfin (viz Obr. 17). Komplex **9b** byl syntetizován týmem prof. Rainera Schoberta z Univerzity Bayreuth v Německu. Cisplatina byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich (ČR).

Koncentrace zásobních roztoků:

- Pro testy antiproliferativní aktivity a platinace DNA: Zásobní roztok komplexu **9b** měl koncentraci 1,1 mmol·l<sup>-1</sup> a tato látka byla rozpuštěna v roztoku, který obsahoval 20 % (v/v) deionizované vody a 80 % (v/v) DMF.



Zásobní roztok cisplatiny měl koncentraci  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a cisplatina byla rozpuštěna v DMF.

- Pro ostatní experimenty: Zásobní roztok komplexu **9b** i cisplatiny měl koncentraci  $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Oba roztoky byly rozpuštěny v deionizované vodě.

### 3.5 Příprava roztoků a kultivačního média

- 0,5% (w/v) roztok MTT:
  - 0,5 g MTT bylo rozpuštěno ve 100 ml PBS (fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline) 1x (nesterilní). Následně byl roztok sterilně přefiltrován.
- Kultivační médium DMEM:
  - Připraveno přidáním 10% (w/v) teplem inaktivovaného FBS (sterilizace pomocí injekční stříkačky a filtru obsahujícího póry o velikosti  $0,2 \mu\text{m}$ ), antibiotik (streptomycin o koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a penicilin o koncentraci  $10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a 1% (v/v) neesenciální aminokyseliny.
- Zásobní roztok fosfátového pufru PBS 10x o pH 7,4:
  - Obsahuje  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok chloridu sodného,  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok chloridu draselného,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok hydrogenfosforečnanu disodného a  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok dihydrogenfosforečnanu draselného. pH 7,4 bylo dosaženo pomocí  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku hydroxidu sodného.
- Zásobní roztok TAE (Tris-acetate-EDTA) pufru 50x o pH 8,0:
  - Obsahuje  $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok tris(hydroxymethyl)aminomethanu (trisu),  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok kyseliny octové a  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok EDTA.
- Zásobní roztok TBE (Tris-borate-EDTA) pufru 5x o pH 8,3:
  - Obsahuje  $450 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok trisu,  $450 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok kyseliny borité a  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok EDTA. pH bylo upraveno pomocí  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku hydroxidu sodného.
- Alkalický pufr:
  - Obsahuje  $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok NaOH a  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA o pH 8.

## 3.6 Metody

### 3.6.1 Kultivace nádorových buněk

Pro testování antiproliferativní aktivity (cytotoxicity) bylo potřeba v rámci Experimentální části diplomové práce kultivovat buňky. Buňky nádorové linie triple negativního karcinomu prsu (MDA-MB-231) byly nejprve rozmrazeny dle standardního protokolu. Dále byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM v inkubátoru při 37 °C. Pasáž buněk proběhla dvakrát týdně.

Při pasážování buněk bylo asepticky pracováno ve flowboxu. Nejprve bylo odpipetováno médium DMEM z kultivační nádoby. Následně byly buňky promyty pomocí 5 ml 1x PBS a byl k nim přidán 1 ml trypsin/EDTA (sklizení tzv. trypsinizací), aby došlo k jejich uvolnění ze stěny nádoby. Buňky byly umístěny na přibližně 2 min do inkubátoru (37 °C). Poté k nim bylo přidáno kultivační médium a buňky byly přeneseny do nové kultivační nádoby. Růst buněk byl kontrolován pomocí mikroskopu.

Pro následný test antiproliferativní aktivity bylo potřeba buňky spočítat. Ke zjištění viability a počtu buněk v 1 ml kultivačního média byla použita automatická počítací buňky. Buňky byly obarveny pomocí trypanové modři, která se akumuluje v mrtvých buňkách, jež mají narušenou membránu. Živé buňky jsou schopné toto barvivo aktivně odčerpávat, proto se v živých buňkách nekoncentruje (Chan et al., 2020). Na podložní sklíčko se aplikovala směs, která obsahovala médium s buňkami a trypanovou modř (byla smíchána v poměru 1:1 – 10 µl trypanové modři a 10 µl média s buňkami).

### 3.6.2 Test antiproliferativní aktivity

Pro zkoumání cytotoxicity buněk byl proveden MTT test (Mosmann, 1983). Mechanismus účinku zahrnuje NAD(P)H-dependentní buněčný oxidoreduktasový enzym, který přeměňuje žlutý MTT na nerozpustný modrý formazán, který může být rozpuštěn v DMSO (Bahuguna et al., 2017).

Buňky MDA-MB-231 byly nasazeny na 96ti jamkovou destičku ( $10^4$  buněk/jamka - ve 100 µl kultivačního média) a byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 h. Poté byly buňky ošetřeny komplexy o různých koncentracích a byly ponechány v inkubátoru dalších 72 h. Finální koncentrace komplexů byly v rozmezí 0-100 µmol·l<sup>-1</sup> ve 200 µl média/jamka a koncentrace DMF v médiu nepřekročila 0,1 % (v/v), proto DMF

nemělo vliv na růst buněk. Po 72 h bylo do každé jamky přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku MTT ( $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). 96ti jamková destička byla ponechána v inkubátoru po dobu 4 h. Poté bylo médium odstraněno a formazánový produkt byl rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  DMSO na jamku. 96ti jamková destička byla ponechána 10 min na třepačce, aby došlo k úplnému rozpuštění.

Viabilita buněk byla vyhodnocena měřením absorbance při 570 nm (refereční vlnová délka 630 nm) za pomoci multifunkčního modulárního readeru SPARK. Vyhodnocení MTT testu bylo provedeno za pomoci programu GraphPad Prism 8.  $\text{IC}_{50}$  hodnoty pro cisplatinu a komplex **9b** byly odečteny z grafů závislosti % živých MDA-MB-231 na koncentraci komplexu.

### 3.6.3 Platínace DNA v buňkách

Buňky MDA-MB-231 byly nasazeny na šest 100 mm Petriho misek ( $2,5\cdot 10^6$  buněk) a po 48 h inkubace byly ošetřeny testovanými komplexy o koncentraci  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (2 Petriho misky byly ponechány jako kontroly a nebyly ošetřeny komplexem). Po 24 h byly buňky sklizeny trypsinizací a promyty pomocí 1x PBS pufru.

Kyvety obsahující kultivační médium, PBS a buňky byly centrifugovány 10 min při 2500 RPM. Následně byl supernatant odstraněn a pelet obsahující buňky byl resuspendován v 5 ml PBS a následně centrifugován za stejných podmínek jako v předchozím kroku. PBS bylo odstraněno a pelet byl uchováván v mrazáku po dobu 24 h.

Lýze buněk MDA-MB-231 byla provedena pomocí DNazolu, který slouží k izolaci genomické DNA ze vzorku. Jeho účinek je založen na použití guanidin-detergentního lýzujícího roztoku, který hydrolyzuje RNA a umožňuje selektivní precipitaci DNA ze vzorku. DNA byla precipitována pomocí ethanolu (400  $\mu\text{l}$ ), usušena a resuspendována v deionizované vodě (500  $\mu\text{l}$ ). Koncentrace DNA ve vzorku byla stanovena pomocí UV/Vis spektrofotometrie a koncentrace Pt byla určena pomocí měření na ICP-MS. Vzorky pro měření na ICP-MS byly před měřením naředěny 27,3krát v 5% HCl.

### 3.6.4 Rychlost vazby komplexu na DNA z telecího thymu v bezbuněčném prostředí

Pro sledování kinetiky vazby komplexu **9b** na DNA byla telecí thymová DNA (ttDNA) o koncentraci  $32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace je uvedena jako koncentrace nukleotidů) inkubována s komplexem **9b** při  $r_i=0,1$  v  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  při  $37^\circ\text{C}$ .  $r_i$  vyjadřuje podíl látkového množství volného Pt komplexu ( $n_{Pt}$ ) a látkového množství nukleotidových bází ( $n_{DNA}$ ) na začátku inkubace (1). V následujícím textu bude využíván symbol  $r_b$ , který vyjadřuje počet molekul platiny, které jsou skutečně navázány na nukleotidovou bázi (Suchánková et al., 2009).

$$r_i = \frac{n_{Pt}}{n_{DNA}} \quad (1)$$

Následně byly odebírány v různých časových intervalech alikvoty ( $200 \mu\text{l}$ ) z připraveného zásobního roztoku do mikrozkušavky, která obsahovala  $\text{NaCl}$  o koncentraci  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . První odběr byl proveden po inkubaci 35 min, poslední odběr po inkubaci 24 h. Jednotlivé odebrané alikvoty byly uchovávány v lednici.

Poté byla u vzorků provedena dialýza v destilované vodě, aby se odstranil nenavázaný komplex z reakční směsi. Dialýza probíhala 3 h a vždy po 1 h byla vyměněna destilovaná voda v nádobě.

Koncentrace DNA ve vzorku byla stanovena pomocí UV/ViS spektrometrie. Koncentrace platiny ve vzorku byla určena pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS) – vzorky byly pro měření naředěny 10krát v 5%  $\text{HCl}$ .

### 3.6.5 Příprava vzorků pro experimenty s DNA z telecího thymu

Pro experimenty v subkapitolách 3.6.6, 3.6.7 a 3.6.8 (měření teploty tání DNA, měření fluorescence  $\text{Tb}^{3+}$  iontů a měření spekter cirkulárního dichroismu) byly použity stejné vzorky, které byly připraveny následujícím způsobem. Telecí thymová DNA o výsledné koncentraci  $31,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $9,8\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  nukleotidových bází) byla pro tento experiment modifikována komplexem **9b** a cisplatinou na následující  $r_b$ : 0,02; 0,05; 0,07; 0,10 a rozpuštěna v  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$ . Inkubace vzorků probíhala 24 h při  $37^\circ\text{C}$ . Kontrola obsahovala pouze ttDNA o koncentraci  $31,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $\text{NaClO}_4$  o koncentraci  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 3.6.6 Měření teploty tání DNA

Pro tento experiment byly připraveny vzorky tak, jak je uvedeno v subkapitole 3.6.5. Křivky teplot tání byly zaznamenány měřením absorbance při 260 nm pomocí UV/Vis spektrofotometru Cary 4000, ve kterém se postupně zvyšovala teplota rychlostí 0,4 °C/1 min. Do spektrofotometru byly umístěny jednotlivé vzorky v křemenných kyvetách o optické dráze 1 cm. Koncentrace DNA v měřených vzorcích byla 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $3,0\cdot 10^{-5}$   $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$ . Získaný soubor jednotlivých bodů byl v programu GraphPad Prism 8 proložen funkcí – Boltzmannovou sigmoidou, u které byla provedena 1. derivace. Maximum na derivované křivce se označuje jako teplota tání  $t_m$ . Teplota tání odpovídá inflexnímu bodu na dané křivce.

### 3.6.7 Měření fluorescence $\text{Tb}^{3+}$ iontů

Pro tento experiment byly použity vzorky, které byly připraveny tak, jak je uvedeno v subkapitole 3.6.5. Výsledná koncentrace ttDNA v jednotlivých vzorcích byla 8  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $2,5\cdot 10^{-5}$   $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Finální koncentrace  $\text{Tb}^{3+}$  iontů ve vzorcích byla dvojnásobná oproti koncentraci DNA, tedy  $5\cdot 10^{-5}$   $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vzorky byly rozpuštěny v prostředí 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufru o pH 7,4. Inkubace probíhala 60 min při pokojové teplotě ve tmě. Intenzita fluorescence byla měřena pomocí přístroje Varian Cary Eclipse spectrofluorometer za použití kyvety o optické dráze 0,5 cm. Excitační vlnová délka byla 290 nm a emisní vlnová délka 546 nm.

### 3.6.8 Měření spekter cirkulárního dichroismu

Spektra cirkulárního dichroismu (CD) byla měřena pomocí JASCO J-720 spektropolarimetru. Pro tento experiment byly připraveny vzorky obsahující ttDNA o koncentraci 31,25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , jež byla modifikována komplexem (**9b**, cisplatinou) na různá  $r_b$ , jak je uvedeno v subkapitole 3.6.5. Jako blank byl použit 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$ . Tloušťka kyvety použité pro měření byla 1 cm. CD spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 220–400 nm po 0,5 nm přírůstcích rychlostí 200 nm/min.

### 3.6.9 Rozvíjení plasmidové DNA

Pro stanovení rozvíjení DNA byla provedena agarosová elektroforéza v nativním prostředí. Vzorky obsahující 0,5  $\mu\text{g}$  plasmidové DNA pUC19 modifikované

komplexe **9b** a cisplatinou na různá  $r_b$  byly připraveny v prostředí  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  a inkubovány 24 h při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Následně byl připraven 1% (w/v) agarosový gel v 1x TAE pufru. Ke vzorkům byl po inkubaci přidán nanášecí pufr, jehož objem byl vypočítán jako 1/6 vzorku, a TAE pufr, jehož objem byl vypočítán jako 1/50 vzorku. Po nanesení na gel elektroforéza probíhala 5-6 h při konstantním napětí 30-34 V. Agarosový gel byl následně ponořen na 30 min do roztoku obsahujícího  $250 \text{ } \mu\text{g}$  ethidium bromidu (EtBr) v 1x TAE pufru pro zviditelnění jednotlivých fragmentů (barvení probíhalo ve tmě). Jednotlivé proužky na gelu byly vizualizovány UV zářením pomocí přístroje Gel Logic 112.

Cílem tohoto experimentu je zjistit úhel rozvinutí plasmidové DNA. Tento úhel byl vypočítán pomocí vzorce (2).

$$\phi = -\frac{18\cdot\sigma}{r_b(c)} \quad (2)$$

kde  $\phi$  je úhel rozvinutí,  $\sigma$  je superhelikální hustota a  $r_b(c)$  je hodnota  $r_b$ , při které dochází ke komigraci superhelikální formy (SC forma) a relaxované formy (nicked relaxed form, open circular form, OC forma) plasmidové DNA (Keck & Lippard, 1992).

### 3.6.10 Stanovení množství meziřetězcových můstků

Pro stanovení množství meziřetězcových můstků (ICL) byla provedena agarosová elektroforéza v alkalickém prostředí. Nejprve byly jednotlivé vzorky obsahující  $0,5 \text{ } \mu\text{g}$  linearizovaného plasmidu pUC19 (linearizován restriční endonukleasou *EcoRI*) modifikovány cisplatinou a komplexe **9b** na následující  $r_b$ : 0,0005; 0,001; 0,0015 v prostředí  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  a inkubovány 24 h při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Pro agarosovou elektroforézu byl připraven 1% agarosový gel v deionizované vodě. K rozvažené agarose při přibližně  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  byl přidán NaCl o výsledné koncentraci  $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a EDTA (pH 8) o výsledné koncentraci  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Gel byl ponechán přes noc ponořený v alkalickém pufru.

Po inkubaci bylo k jednotlivým vzorkům přidáno  $1,2 \text{ } \mu\text{l}$   $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH. Po 10 min inkubace za laboratorní teploty byly vzorky na 5 min zahřáty na  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  a poté prudce ochlazeny na ledu. Následně byl ke vzorkům přidán nanášecí pufr, jehož výsledný objem byl vypočítán jako 1/6 vzorku. Vzorky byly naneseny na gel a elektroforéza probíhala 4 h při konstantním napětí 35 V za alkalických podmínek (alkalický agarosový gel ponořený v alkalickém pufru). Po skončení elektroforézy byl gel

ponořen do 1x TBE pufru na 30 min (neutralizace) a po opláchnutí byl následně ponořen do roztoku obsahujícího 250 µg EtBr (opět na 30 min) v 1x TAE pufru. Fragменты na gelu odpovídající jednovláknové DNA a DNA s meziřetězcovými můstky byly vizualizovány díky EtBr pomocí přístroje Gel Logic 112 a jejich intenzita byla kvantifikována pomocí softwaru AIDA image analyzer.

Frekvence meziřetězcových můstků: %ICL/Pt (množství meziřetězcových můstků na adukt) byla vypočítána podle vzorce (3).

$$\% ICL/Pt = \frac{-\ln(A)}{N \cdot r_b} \quad (3)$$

kde A je relativní intenzita proužku, který odpovídá jednovláknové DNA, N je počet nukleotidových bází v DNA molekule a  $r_b$  je stupeň modifikace (Prokop et al., 2004).

### 3.6.11 Vliv komplexu na enzym DNA topoisomerasa I

Pro stanovení vlivu komplexu **9b** a cisplatinu na rozvíjení plasmidu pUC19 enzymem DNA topoisomerasou I (DNA topoisomerasa I, topoI, EC 5.6.2.1) byla použita agarosová elektroforéza v nativním prostředí. Plasmid pUC19 byl modifikován cisplatinou a komplexem **9b** na  $r_b = 0,02$  a inkubován při 37 °C po dobu 24 h v prostředí 10 mmol·l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub>.

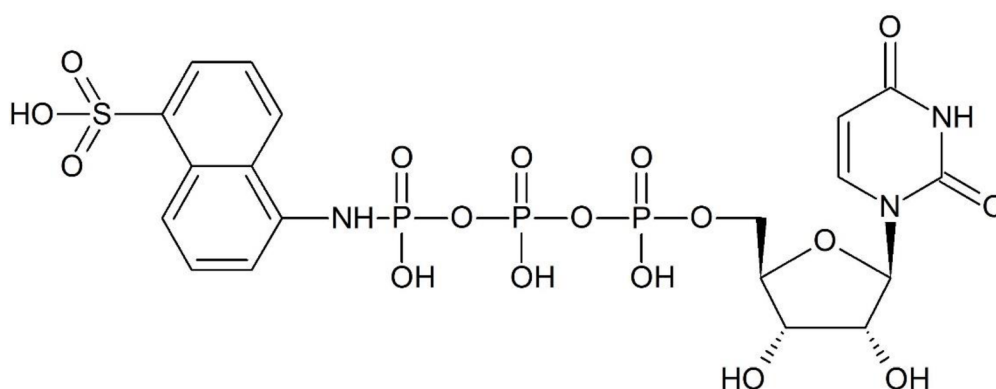
Každá reakční směs (kontrolní – bez komplexu, směs obsahující cisplatinu nebo komplex **9b**) obsahovala 3 µg plasmidu pUC19 v 60 µl 1x reakčního pufru (DNA Topoisomerase I Buffer). Do každé směsi byla přidána DNA topoisomerasa I o enzymové aktivitě 2 U·µl<sup>-1</sup> (1 µl 5x zředěného komerčního enzymu o aktivitě 10 U·µl<sup>-1</sup>). Jednotlivé směsi byly inkubovány při 37 °C a v časových intervalech 3, 6, 15, 25, 35, 45 a 55 min byly odebírány alikvoty o objemu 8 µl do mikrozkušavky obsahující 1 µl 5% SDS (zastavení reakce). Jednotlivé vzorky byly ukládány v lednici. Kontrolní vzorky (čas 0 min – bez enzymu) byly připraveny zvlášť (každý vzorek obsahoval 0,5 µg plasmidu pUC19 modifikovaného nebo nemodifikovaného komplexem v 1x TAE pufru).

Následně byl k jednotlivým vzorkům přidán nanášecí pufr (1/6 objemu vzorku) a vzorky byly nanášeny na 1% (w/v) agarosový gel v 1x TAE pufru. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 35 V cca 4,5 h. Gel byl následně 20 min barven ve tmě v roztoku obsahujícím 250 µg EtBr v 1x TAE pufru. Finální vizualizace fragmentů byla provedena díky UV záření pomocí přístroje Gel Logic 112 a jejich intenzita byla kvantifikována za pomoci softwaru AIDA image analyzer.

### 3.6.12 Vliv komplexu na enzym RNA polymerasa

Pro stanovení vlivu komplexu na transkripci DNA byla použita bakteriální nukleosidtrifosfát: RNA nukleotidyltransferasa (DNA dependentní) (RNA polymerasa, EC 2.7.7.6). Tento experiment byl proveden za pomoci cirkulární plasmidové DNA pBR322 jako templátu o koncentraci 0,96  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ . Transkripce probíhala ve 100  $\mu\text{l}$  reakční směsi, která obsahovala směs ribonukleotidů, a to konkrétně 0,1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ATP (adenosintrifosfát), 0,1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  CTP (cytidintrifosfát) a 0,1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  GTP (guanosintrifosfát), dále 2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dithiotreitol, 0,01  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  uridin-5'-trifosfát- $\gamma$ -(sulfo-1-naftyl)amid (UTP- $\gamma$ -AmNS, viz Obr. 18) a reakční pufr, jehož složení bylo 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl o pH 7,6; 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl a 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ . Kontrolní směs dále obsahovala plasmidovou DNA bez komplexu, reakční směs s komplexem obsahovala plasmid modifikovaný cisplatinou nebo komplexem **9b** na  $r_b = 0,0015$  (plasmid s komplexem byl inkubován 24 h při 37  $^\circ\text{C}$  v prostředí 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$ ). Následně byly do reakční směsi těsně před měřením přidány 2  $\mu\text{l}$  komerčního enzymu RNA polymerasy o aktivitě 1000  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Vznikající transkripční produkty byly měřeny za pomoci multifunkčního modulárního readeru SPARK. Štěpné produkty polymerace RNA byly detekovány měřením intenzity fluorescence při vlnové délce 465 nm. Excitační vlnová délka byla nastavena na 330 nm. Intenzita fluorescence byla změřena ihned po přidání enzymu v čase 0 min a následně ve zvolených časových intervalech (po 5-10 min).



Obr. 18: Strukturální vzorec uridin-5'-trifosfát- $\gamma$ -(sulfo-1-naftyl)amidu.

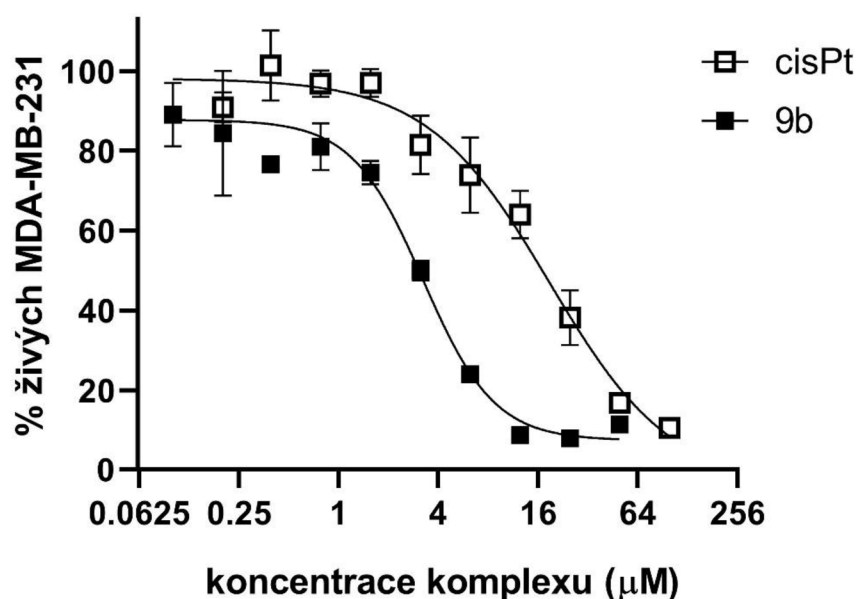


## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Test antiproliferativní aktivity

Při testování antiproliferativní aktivity bylo zjištěno, že  $IC_{50}$  (hodnota koncentrace komplexu, při které je dělení buněk inhibováno z 50 %) pro cisplatinu je  $16,95 \pm 3,33 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , zatímco pro komplex **9b** je  $3,05 \pm 0,10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , z čehož vyplývá, že testovaný komplex **9b** je vůči buňkám triple negativního karcinomu prsu 5,6krát účinnější než cisplatin. Hodnota  $IC_{50}$  byla odečtena z grafu závislosti % živých buněk MDA-MB-231 na koncentraci komplexů (viz Obr. 19).

Nízká hodnota cytotoxicity u buněk MDA-MB-231 je velmi potěšující, protože tento typ nádoru prsu je velmi těžké vyléčit. Jeho buňky nemají receptory pro estrogen, progesteron ani pro lidský růstový faktor (HER2), na které je obvykle cílena léčba (<https://www.cdc.gov/cancer/breast/triple-negative.htm>).



Obr. 19: Graf závislosti % živých buněk MDA-MB-231 na koncentraci komplexů ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), ze kterého byly odečteny hodnoty  $IC_{50}$ . Hodnoty SD byly vypočítány ze 3 měření pro cisplatinu a ze 2 měření pro komplex **9b**. Graf byl vytvořen v programu GraphPad Prism 8.

## 4.2 Platinace DNA v buňkách

Cílem diplomové práce je lépe prozkoumat, jakým způsobem komplex **9b** interaguje s DNA. Proto bylo nejprve nutné zjistit, jestli komplex do buněk proniká a jestli se v nich vůbec na DNA váže. Byl proveden experiment, jehož účelem bylo zjistit platinaci DNA u buněk vystavených Pt komplexu, tedy kolik pg platiny se navázalo na 1  $\mu\text{g}$  DNA.

Vzorky DNA izolované z buněk byly rozpuštěny ve vodě a poté byl stanoven jejich objem. Objem vzorku kontroly byl 425  $\mu\text{l}$ , cisplatiny 420  $\mu\text{l}$  a komplexu **9b** v 387  $\mu\text{l}$ . Koncentrace DNA ve vzorcích byla stanovena spektrofotometricky. Část vzorků byla odebrána a pro spektrofotometrické měření 20x zředěna vodou. Z takto určené koncentrace a objemu bylo vypočítáno množství vyizolované DNA. V Tab. 2 jsou uvedeny hodnoty absorbance změřené pomocí UV/ViS spektrofotometru při 260 nm, 280 nm a 350 nm a množství DNA ve vzorku.

Následně bylo také provedeno měření pomocí ICP-MS pro zjištění koncentrace platiny v každém vzorku. V Tab. 3 je uvedeno množství platiny ve vzorku (objem vzorku byl 3 ml). Toto množství bylo vztaženo na množství DNA. Z Tab. 3 vyplývá, že určité množství platiny se nacházelo také ve vzorku kontroly, která však daným komplexem nebyla ošetřena. Toto množství je však velmi malé, naměřená hodnota se nachází na limitu detekce použité metody a příliš se neliší od hodnoty stanovené pro blank (5% HCl).

Z Tab. 3 je patrné, že po inkubaci buněk s komplexem **9b** se v 1  $\mu\text{g}$  DNA nachází 42,13 pg platiny, zatímco v případě cisplatiny se v 1  $\mu\text{g}$  vzorku DNA nachází méně: 27,10 pg Pt. Z výsledku jednoznačně vyplývá, že v biologicky relevantních podmínkách komplex **9b** účinně proniká do buněk a váže se na jadernou DNA. Lze tvrdit, že možným mechanismem účinku způsobujícím cytotoxicitu tohoto komplexu je vazba na DNA, která bude dále zkoumána.

Je však nutné zmínit, že komplex **9b** i cisplatina obsahují ve své struktuře jeden atom platiny. Pomocí ICP-MS byla naměřena pouze koncentrace daného kovu – tuto koncentraci nelze s jistotou přepočítat na množství celého Pt komplexu, protože není jisté, zda se na DNA váže komplex celý nebo jeho část.

Tab. 2: Hodnoty absorbancí a hodnoty vypočítaného množství DNA v jednotlivých vzorcích.

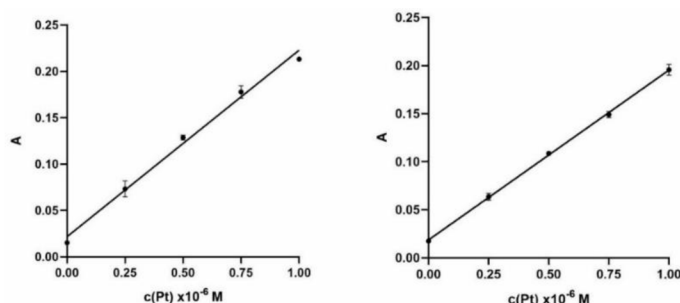
Vzorek	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>350</sub>	Množství DNA [μg]
Kontrola	0,7119	0,3317	0,0055	300,22
Cisplatina	0,6746	0,2879	0,0084	279,80
Komplex <b>9b</b>	0,6538	0,2856	0,0091	249,50

Tab. 3: Platínace DNA u buněk MDA-MB-231 vystavených Pt komplexům po dobu 24 h. Průměr a SD uvedeny v tabulce byly vypočítány ze 3 měření.

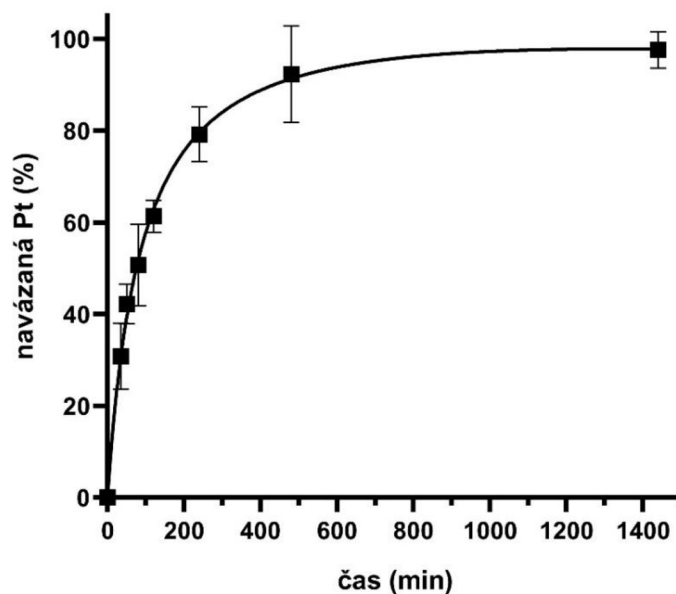
Vzorek	Množství Pt ve vzorku [ng]	pg Pt/μg DNA
Kontrola	0,44 ± 0,03	1,48
Cisplatina	7,58 ± 0,09	27,10
Komplex <b>9b</b>	10,51 ± 0,09	42,13

### 4.3 Rychlost vazby komplexu na DNA z telecího thymu v bezbuněčném prostředí

V předchozím experimentu bylo zjištěno, že v buňkách MDA-MB-231 dochází k platinaci DNA. Měření kinetiky pomůže odhalit, jaká je rychlost vazby platiny na DNA v bezbuněčném prostředí. Nejprve byly pomocí AAS změřeny absorbance standardu o známých koncentracích, ze kterých byla následně vytvořena kalibrační křivka (na Obr. 20 jsou znázorněny kalibrační křivky pro dva nezávislé experimenty A a B). Pro experiment A byla získána rovnice přímky:  $y = 0,20023x + 0,02161$  a pro experiment B:  $y = 0,17689x + 0,01847$ . Na Obr. 21 je znázorněn graf závislosti navázané Pt na čase. Koncentrace platiny v jednotlivých vzorcích byla vypočítána z kalibrační křivky.



Obr. 20: Kalibrační křivky (závislost absorbance na koncentraci platiny) pro experiment A a B. Hodnoty SD byly vypočítány ze dvou nebo tří měření (atomový absorpční spektrometr je naprogramovaný tak, aby změřil každý vzorek dvakrát, pokud však dojde k tomu, že chyba je větší než 10 %, změří daný vzorek potřetí). Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8.

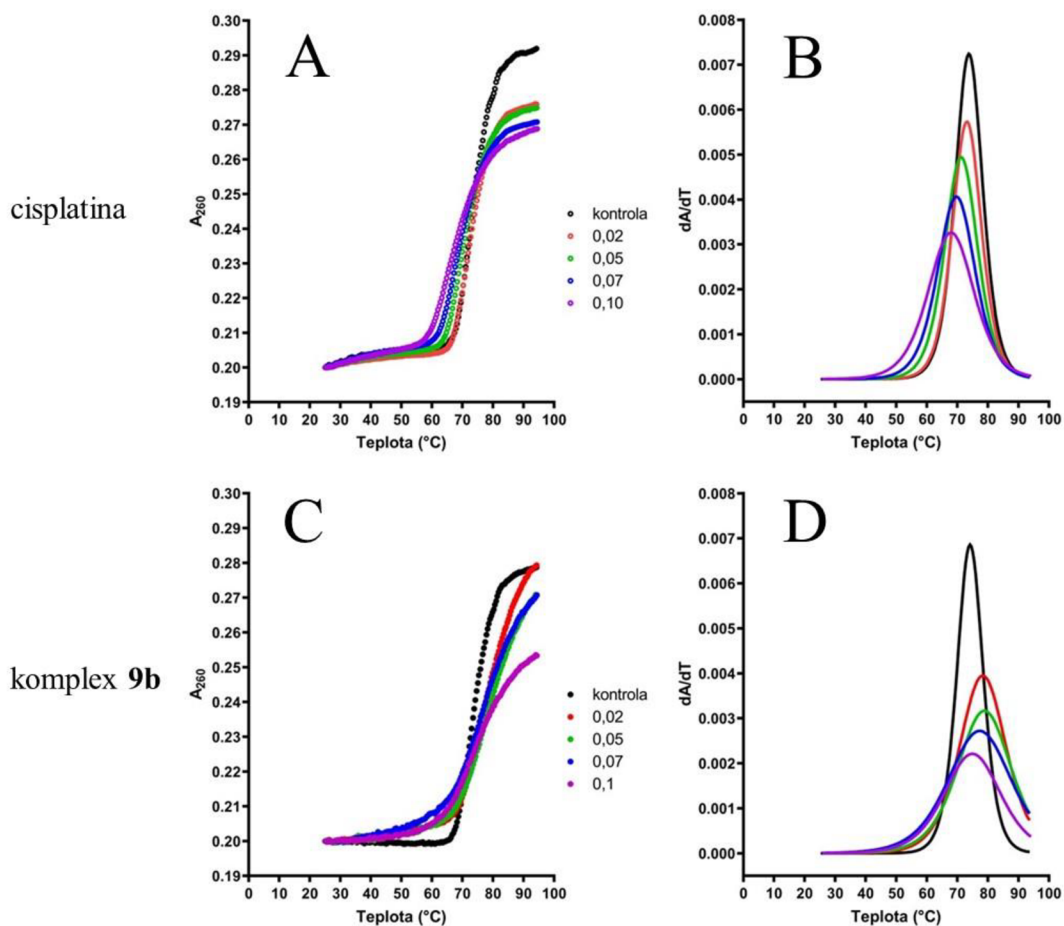


Obr. 21: Graf závislosti navázané Pt (v %) na čase (v min). Hodnoty SD byly vypočítány ze dvou nezávislých experimentů (A a B), kdy každý vzorek byl měřen dvakrát nebo třikrát. Graf byl vytvořen v programu GraphPad Prism 8.

Z Obr. 21 je patrné, že s přibývajícím časem došlo ke zvyšování množství navázané Pt na DNA. Lze tvrdit, že se komplex **9b** (či jeho část) na DNA navázal již dříve než po 24 h ze 100 %, z čehož vyplývá, že komplex **9b** se na DNA váže kvantitativně. Pro následující experimenty můžeme  $r_1$  považovat za rovno  $r_b$  ( $r_b$  vyjadřuje počet molekul komplexu platiny, které jsou skutečně navázané na jednu nukleotidovou bázi). Čas, při kterém byla Pt navázaná z 50 % ( $t_{1/2}$ ) pro komplex **9b**, byl  $75,5 \pm 13,2$  min.

#### 4.4 Měření teploty tání DNA

Na Obr. 22 jsou znázorněny denaturační křivky pro cisplatinu a komplex **9b** (grafy A a C). Tyto křivky byly proloženy v programu GraphPad Prism 8 Boltzmannovou sigmoidou a následně byla u nich provedena 1. derivace (grafy B a D). Maxima na derivovaných křivkách odpovídají teplotě tání DNA.  $t_m$  vyjadřuje teplotu, při které došlo k denuraci 50 % dvoušroubovicových molekul DNA.



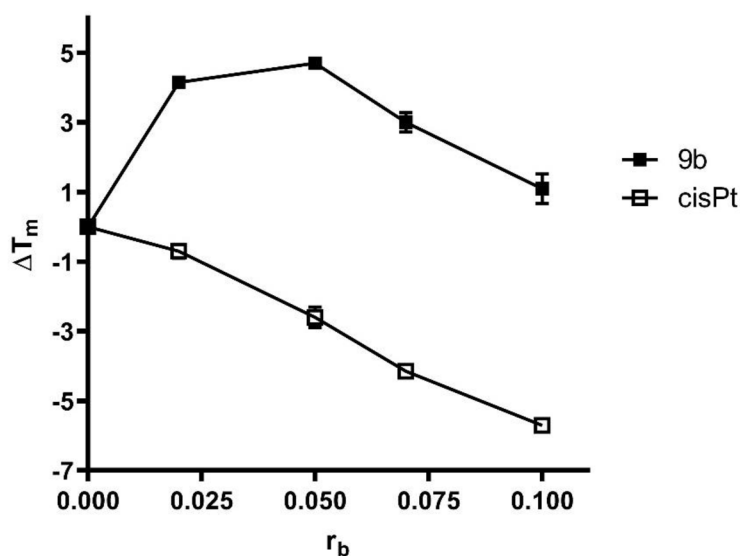
Obr. 22: Denaturační křivky pro cisplatinu a komplex **9b** (A a C). Křivky byly proloženy funkcí – Boltzmannovou sigmoidou a byla u nich provedena 1. derivace (B a D). Jedná se o reprezentativní grafy z jednoho měření. Jednotlivé vzorky byly změřeny dvakrát (viz Tab. 4). Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8.

V Tab. 4 jsou zobrazeny hodnoty teplot tání DNA, jež byla modifikována cisplatinou a komplexem **9b** (provedena 2 měření). Z Tab. 4 i z Obr. 22 je patrné, že se teplota tání DNA s rostoucím  $r_b$  u obou komplexů měnila, tato změna ale byla pro oba testované komplexy odlišná. V případě modifikace DNA cisplatinou se teplota tání postupně snižovala. Naopak modifikace komplexem **9b** měla na teplotní stabilitu DNA odlišný účinek. Při nižších stupních modifikace ( $r_b = 0,02$  a  $0,05$ ) teplota tání DNA nejprve rostla, s dalším zvyšováním modifikace však hodnota  $t_m$  klesala, takže při  $r_b = 0,1$  byla  $t_m$  modifikované DNA jen o málo ( $\sim 1$  °C) vyšší než  $t_m$  pro nemodifikovanou kontrolní DNA.

Tab. 4: Hodnoty teplot tání ttDNA, která byla modifikována cisplatinou a komplexem **9b** při  $r_b$ : 0,02; 0,05; 0,07; 0,10. Experiment byl proveden ve dvou opakováních.

$r_b$	$t_m$ [°C]			
	Komplex <b>9b</b>		Cisplatina	
0,00 (kontrola)	74,1	74,2	74,1	73,7
0,02	78,3	78,3	73,2	73,2
0,05	78,9	78,8	71,2	71,4
0,07	77,3	77,0	70,0	69,5
0,10	74,9	75,6	68,3	68,1

Na Obr. 23 je znázorněn graf závislosti  $\Delta t_m$  na  $r_b$ .  $\Delta t_m$  je rozdíl teploty tání vzorku a teploty tání kontroly:  $\Delta t_m = t_m(\text{vzorek}) - t_m(\text{kontrola})$ . Z grafu je patrné, že cisplatina se chová jinak než komplex **9b**. Zatímco u cisplatiny dochází se zvyšujícím se  $r_b$  k postupnému poklesu hodnoty  $\Delta t_m$ , pro komplex **9b** dochází nejprve k nárůstu hodnoty  $\Delta t_m$  a následnému poklesu.

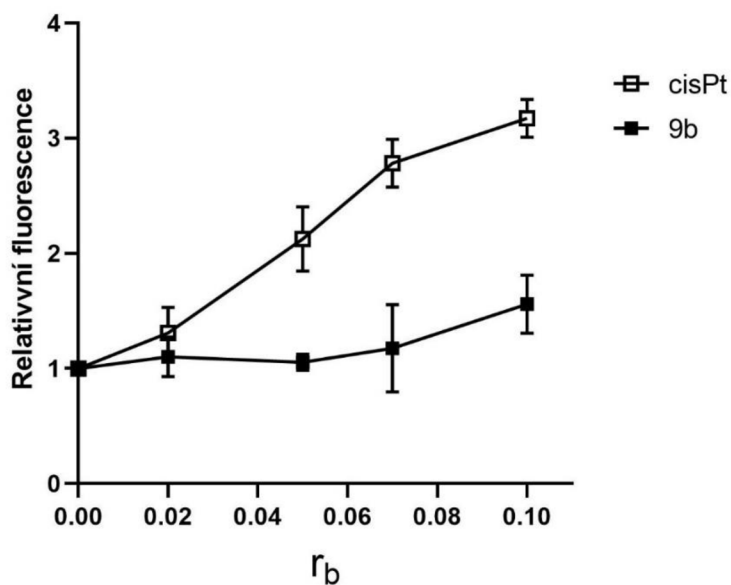


Obr. 23: Graf závislosti  $\Delta t_m$  na  $r_b$ . Hodnoty SD nejsou u některých bodů patrné, protože jsou menší než uvedený symbol. Hodnoty SD byly vypočítány ze dvou měření. Obrázek byl vytvořen pomocí programu GraphPad Prism 8.

## 4.5 Měření fluorescence $Tb^{3+}$ iontů

Měření fluorescence  $Tb^{3+}$  iontů se používá k odhalení lokálních poškození (distorzí) na molekule DNA, která mohou být vyvolána mj. i Pt(II) komplexy. Tento experiment je založen na tom, že dochází ke zvýšení relativní fluorescence při vazbě  $Tb^{3+}$  iontů na guaninová rezidua na poškozeném úseku DNA (Balcarová & Brabec, 1989).

U cisplatiny bylo pozorováno zvýšení relativní fluorescence  $Tb^{3+}$  iontů se zvyšujícím se stupněm modifikace DNA (viz Obr. 24).  $Tb^{3+}$  ionty se v tomto případě navázaly na guaninová rezidua na molekule DNA, která nebyla obsazena cisplatinou, v blízkosti míst, jež byla poškozena tímto komplexem (Balcarová & Brabec, 1989). Komplex **9b** se však choval odlišně než cisplatinu. Z Obr. 24 je patrné, že naměřená relativní fluorescence při nižších stupních modifikace ( $r_b = 0,02$  a  $0,05$ ) je podobná kontrole. U vyšších stupňů modifikace ( $r_b = 0,10$ ) se mírně zvyšuje (ale ne v takové míře jako u cisplatiny). Z tohoto experimentu tedy vyplývá, že komplex **9b** nevyvolal tak velké poškození DNA jako cisplatinu.



Obr. 24: Graf závislosti relativní fluorescence  $Tb^{3+}$  iontů na  $r_b$  pro cisplatinu a komplex **9b**. Výsledky jsou vztaženy k fluorescenci nemodifikované DNA (kontrola). Hodnoty SD byly vypočítány ze dvou měření, kdy každý vzorek byl změřen třikrát. Obrázek byl vytvořen pomocí programu GraphPad Prism 8.

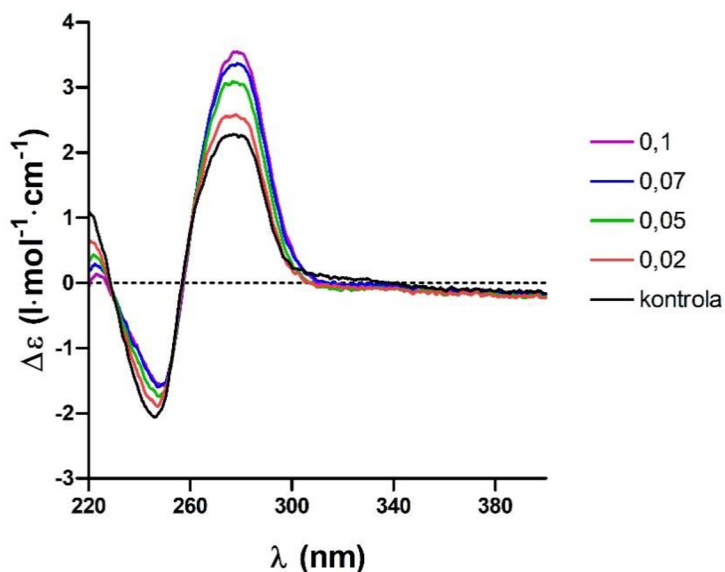
## 4.6 Měření spekter cirkulárního dichroismu

Spektra cirkulárního dichroismu byla měřena pro získání dalších informací o změně struktury molekuly DNA způsobené použitými komplexními sloučeninami. Jelikož je koncentrace DNA ve všech vzorcích stejná, je možné tyto změny vyvolané komplexy pozorovat.

Macquet & Butour, 1978 zjistili odlišnost ve spektrech cirkulárního dichroismu pro DNA, na kterou byla navázána monodentátní, *cis*-bidentátní a *trans*-bidentátní Pt komplexní sloučenina. Objevili, že DNA modifikovaná monodentátním Pt komplexem se chová podobně jako nemodifikovaná DNA. DNA modifikovaná cisplatinou a transplatinou vykazovala snížení intenzity negativního pásu při 245 nm. Při 275 nm vedla vazba transplatiny na DNA ke snížení intenzity pozitivního pásu, zatímco u cisplatiny při  $r_b=0-0,1$  došlo ke zvýšení intenzity a při  $r_b \geq 0,1$  ke snížení intenzity (Macquet & Butour, 1978). Rozdílné změny v CD spektrech DNA modifikované cisplatinou a transplatinou jsou způsobeny odlišným poškozením molekuly DNA (Brabec et al., 1990).

Na Obr. 25 je znázorněno CD spektrum pro DNA, jež byla modifikována cisplatinou, jako závislost  $\Delta\epsilon$  na vlnové délce, kde  $\Delta\epsilon$  vyjadřuje rozdíl molárních absorpčních koeficientů pravotočivého a levotočivého polarizovaného světla. Černou křivkou je znázorněna kontrola, tedy nemodifikovaná B konformace DNA. Z Obr. 25 je patrné, že se zvyšujícím se stupněm modifikace dochází k postupnému zvyšování intenzity pozitivního pásu při vlnové délce přibližně 280 nm a naopak ke snižování intenzity negativního pásu při 245 nm, což odpovídá textu výše podle Macquet & Butour, 1978. Tyto změny v konformaci DNA v daném spektru vyvolané cisplatinou mají nenedenaturační charakter, kdy nedochází k narušení vodíkových vazeb mezi bázemi. Tyto nenedenaturační změny jsou způsobeny především vnitrořetězcovými můstky, které cisplatinou s DNA tvoří (Brabec et al., 1990).

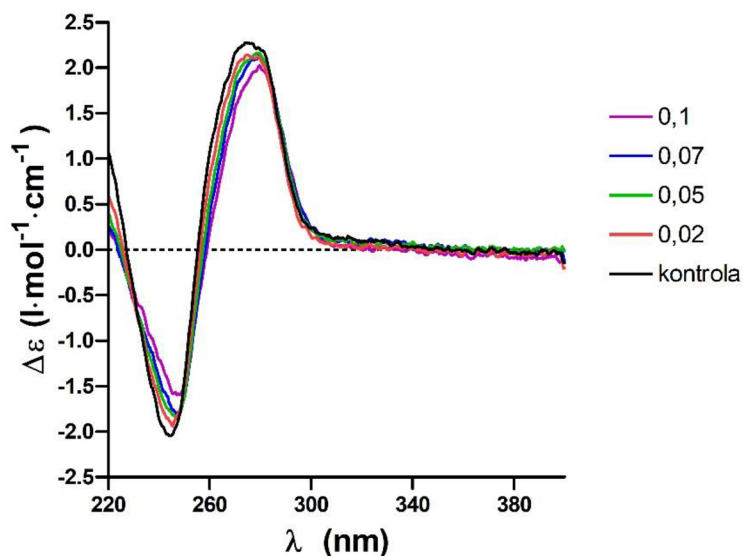




Obr. 25: CD spektrum ttDNA modifikované cisplatinou. Černou křivkou je znázorněna nemodifikovaná kontrola, barevnými křivkami DNA modifikovaná na různá  $r_b$  cisplatinou. Daná křivka je průměrem ze tří hodnot naměřených přístrojem. Obrázek byl vytvořen pomocí programu GraphPad Prism 8.

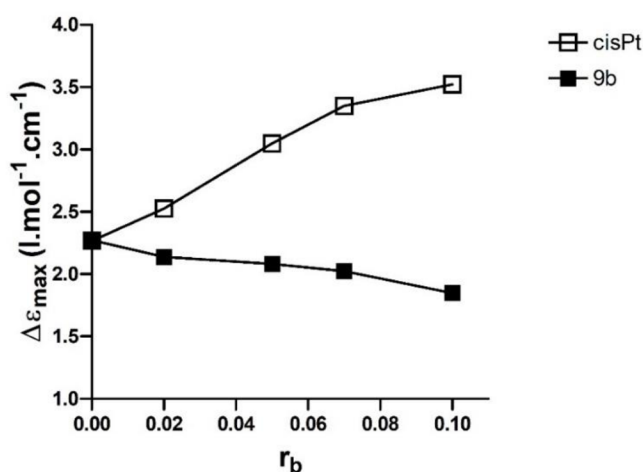
Pro DNA modifikovanou komplexem **9b** je CD spektrum znázorněno na Obr. 26. Je patrné, že jeho průběh je odlišný než u cisplatinu. Při přibližně 280 nm dochází s rostoucím stupněm modifikace ke snižování intenzity pozitivního pásu vůči DNA nemodifikované komplexem (kontrola) a také ke snižování intenzity pásu negativního při 245 nm. Brabec et al., 1990 si tento průběh spektra u DNA vysvětlují takovým poškozením molekuly DNA, které má denaturační charakter, kdy dochází k narušení vodíkových vazeb mezi jednotlivými nukleotidovými bázemi. Komplex **9b** tedy může analogicky také vyvolávat denaturační poškození molekuly DNA.

To, že dochází k postupnému snižování intenzity signálu negativního pásu u obou komplexů při 245 nm, je zřejmě způsobeno ztrátou sekundární struktury DNA – dochází tedy k postupnému rozvíjení molekuly DNA (Dowling et al., 2023). To, že oba komplexy jsou schopny rozvíjet plasmidovou DNA je potvrzeno v následující kapitole 4.7.



Obr. 26: CD spektrum ttDNA modifikované komplexem **9b**. Černou křivkou je znázorněna nemodifikovaná kontrola, barevnými křivkami DNA modifikovaná na různá  $r_b$  komplexem **9b**. Daná křivka je průměrem ze tří hodnot naměřených přístrojem. Obrázek byl vytvořen pomocí programu GraphPad Prism 8.

Na Obr. 27 je znázorněn graf závislosti maxima pozitivního pásu  $\Delta\epsilon_{\max}$  (při  $\sim 280$  nm) na stupni modifikace  $r_b$ . Z Obr. 27 a z předchozích výsledků vyplývá, že komplex **9b** svou vazbou na DNA poškozuje tuto molekulu jiným způsobem než cisplatina. U cisplatiny dochází se zvyšujícím se stupněm modifikace k postupnému nárůstu  $\Delta\epsilon_{\max}$ , zatímco u komplexu **9b** dochází k mírnému poklesu.



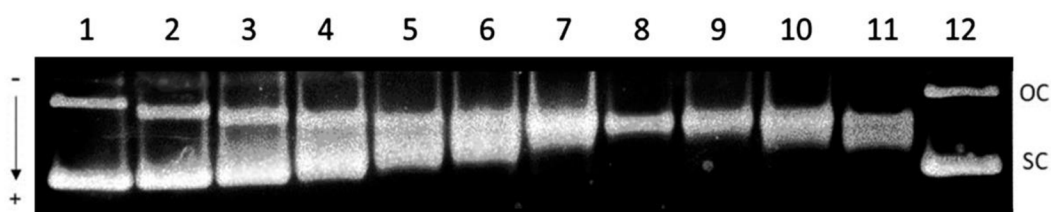
Obr. 27: Závislost maxima pozitivního pásu (při  $\sim 280$  nm) na  $r_b$  pro cisplatinu a komplex **9b**. Obrázek byl vytvořen pomocí programu GraphPad Prism 8.

## 4.7 Rozvíjení plasmidové DNA

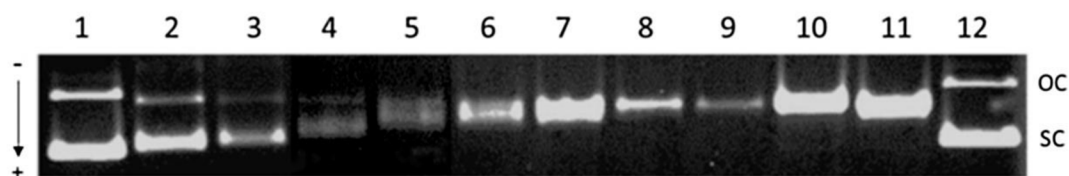
Elektroforéza v nativním agarosovém gelu byla provedena za účelem zjištění úhlu rozvinutí DNA vyvolaného vazbou studovaného komplexu **9b**. Je důležité zmínit, že superhelikální forma plasmidové DNA má negativní nadšroubovicovité vinutí a putuje agarosovým gelem rychleji, zatímco relaxovaná forma nadšroubovicovité vinutí neobsahuje a na gelu migruje pomaleji (Gibson et al., 2020).

Se zvyšujícím se stupněm modifikace DNA komplexem dochází k postupnému rozvíjení superhelikální formy plasmidové DNA – proto je na agarosovém gelu pozorováno její zpomalování. Superhelikální forma se tedy postupně přibližuje k formě relaxované. Při určitém  $r_b$  specifickém pro každý komplex dojde ke komigraci obou forem (superhelikální forma je plně rozvinuta na relaxovanou formu plasmidu). Tato hodnota  $r_b$  tedy vyjadřuje množství komplexu, které bylo potřebné k úplnému odstranění negativního nadšroubovicového vinutí plasmidové DNA. Pokud je koncentrace komplexu dále zvyšována, dochází opět k postupnému vzniku nadšroubovicového vinutí, v tomto případě však pozitivního (Keck & Lippard, 1992).

Na Obr. 28 a Obr. 29 je znázorněna migrace superhelikální a relaxované formy plasmidové DNA modifikované cisplatinou a komplexem **9b** na různá  $r_b$ . Pro stanovení úhlu rozvinutí DNA komplexem **9b** bylo nutné nejprve experimentálně stanovit superhelikální hustotu. Při výpočtu se vychází z informace, že úhel rozvinutí DNA cisplatinou je  $13^\circ$  (Keck & Lippard, 1992). Jelikož při  $r_b = 0,07$  došlo ke komigraci superhelikální a relaxované formy plasmidové DNA (viz Obr. 28), superhelikální hustota  $\sigma$  je  $-0,0506$  (vypočítáno pomocí vztahu (2) uvedeného v subkapitole 3.6.9).



Obr. 28: Rozvíjení superhelikální plasmidové DNA pUC19 cisplatinou. Horní fragment odpovídá relaxované formě (OC forma), spodní fragment odpovídá superhelikální formě (SC forma) plasmidu. Dráhy 1 a 12: kontrola (neplatinovaná DNA). Dráha 2:  $r_b=0,01$ , dráha 3:  $r_b=0,02$ , dráha 4:  $r_b=0,03$ , dráha 5:  $r_b=0,04$ , dráha 6:  $r_b=0,05$ , dráha 7:  $r_b=0,06$ , dráha 8:  $r_b=0,07$ , dráha 9:  $r_b=0,08$ , dráha 10:  $r_b=0,09$ , dráha 11:  $r_b=0,10$ . Jedná se o reprezentativní elektroforeogram z jednoho měření.



Obr. 29: Rozvíjení superhelikální plasmidové DNA pUC19 komplexem **9b**. Horní fragment odpovídá relaxované formě (OC forma), spodní fragment odpovídá superhelikální formě (SC forma) plasmidu. Dráhy 1 a 12: kontrola (neplatinovaná DNA). Dráha 2:  $r_b=0,04$ , dráha 3:  $r_b=0,05$ , dráha 4:  $r_b=0,06$ , dráha 5:  $r_b=0,07$ , dráha 6:  $r_b=0,08$ , dráha 7:  $r_b=0,09$ , dráha 8:  $r_b=0,10$ , dráha 9:  $r_b=0,11$ , dráha 10:  $r_b=0,12$ , dráha 11:  $r_b=0,13$ . Jedná se o reprezentativní elektroforeogram z jednoho měření.

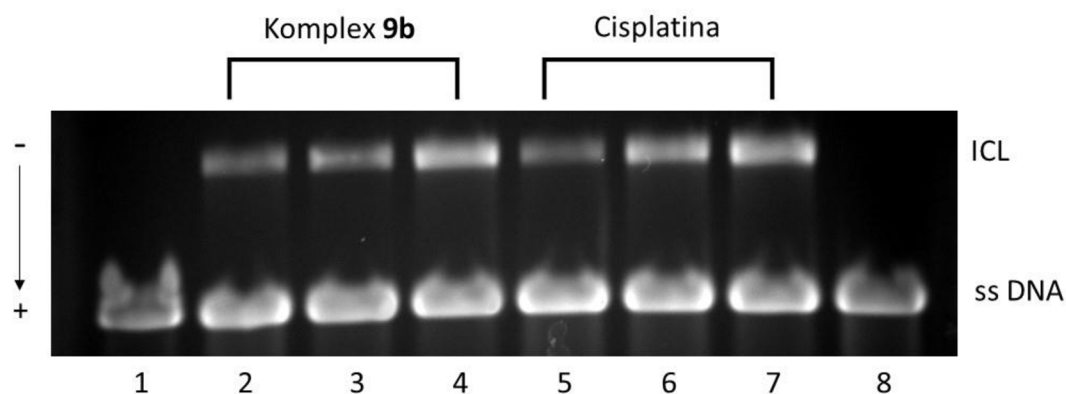
Na základě zjištěné superhelikální hustoty DNA, byl vypočítán úhel rozvinutí DNA komplexem **9b** (pro oba experimenty byla použita stejná plasmidová DNA). Ke komigraci došlo při  $r_b$  0,10 a 0,11 (viz Obr. 29). Úhel rozvinutí pro komplex **9b** je  $8,69 \pm 0,41^\circ$  (vypočítáno pomocí vztahu (2) uvedeného v subkapitole 3.6.9 na základě dvou nezávislých experimentů).

#### 4.8 Stanovení množství meziřetězcových můstků

Pro stanovení množství meziřetězcových můstků (ICL) byla provedena agarosová elektroforéza v alkalickém prostředí. Přestože meziřetězcové můstky jsou tvořeny s menší frekvencí než můstky vnitrořetězcové, jejich vznik vede k větší inhibici replikace a transkripce DNA, jelikož dochází k poškození obou vláken dvoušroubovice (Suchánková et al., 2012).

Na Obr. 30 je znázorněno množství meziřetězcových můstků vytvořených komplexem **9b** a cisplatinou. Spodní fragment neobsahuje ICL, proto migruje gelem rychleji jako jednovláknová DNA obsahující 2686 nukleotidových bází. Horní fragment migruje pomaleji, jelikož obsahuje meziřetězcové můstky (jednovláknová DNA je díky komplexu spojena ICL a migruje jako duplex obsahující 5372 bází). U obou komplexů se intenzita horního fragmentu se zvyšujícím se stupněm modifikace zvyšovala.

Množství meziřetězcových můstků na adukt (%ICL/Pt) bylo vypočítáno podle vzorce (3) uvedeného v subkapitole 3.6.10. Pro cisplatinu byla frekvence ICL na adukt  $6,6 \pm 0,3\%$  - tedy 6,6 % cisplatinu navázané na plasmidovou DNA vytvořilo meziřetězcové můstky, což je v souladu s literaturou (Brabec & Leng, 1993).



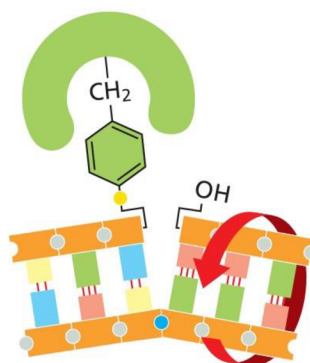
Obr. 30: Elektroforeogram znázorňující tvorbu meziřetězcových můstků u linearizované plasmidové DNA pUC19. DNA obsahující meziřetězcové můstky (ICL) odpovídá horním fragmentům (migruje pomaleji), zatímco jednovláknová DNA (ss DNA) odpovídá spodním fragmentům (migruje rychleji). Dráhy 1 a 8: kontrola (neplatinovaná DNA), dráhy 2 a 5:  $r_b=0,0005$ , dráhy 3 a 6:  $r_b=0,0010$ , dráhy 4 a 7:  $r_b=0,0015$ .

Pro komplex **9b** byla hodnota %ICL/Pt:  $8,7 \pm 1,1$  %. Z tohoto výsledku vyplývá, že tvorba meziřetězcových můstků komplexem **9b** je podobná jako u cisplatin, u studovaného komplexu je 1,3krát vyšší. Průměr a směrodatná odchylka byly vypočítány ze 3 naměřených hodnot.

#### 4.9 Vliv komplexu na enzym DNA topoisomerasa I

DNA topoisomerasa I se uplatňuje v organismu při replikaci či transkripci, kdy musí dojít k rozvinutí dvou vláken DNA. Tento enzym (spolu s DNA topoisomerasou II, EC 5.6.2.2) zabraňuje vzniku torzního napětí a „zamotání“ vláken způsobeným nadšroubovicovým vinutím DNA. TopoI je schopna se kovalentně navázat na DNA a reverzibilně štěpit fosfodiesterovou vazbu na jednom vlákně. Díky tomuto štěpení může dojít k volné rotaci DNA helixu na obou stranách štěpného místa – fosfodiesterová vazba na druhém neštěpeném vlákně DNA slouží jako tzv. otočný bod (swivel point). Mechanismus působení topoI je znázorněn na Obr. 31 (Alberts et al., 2015).

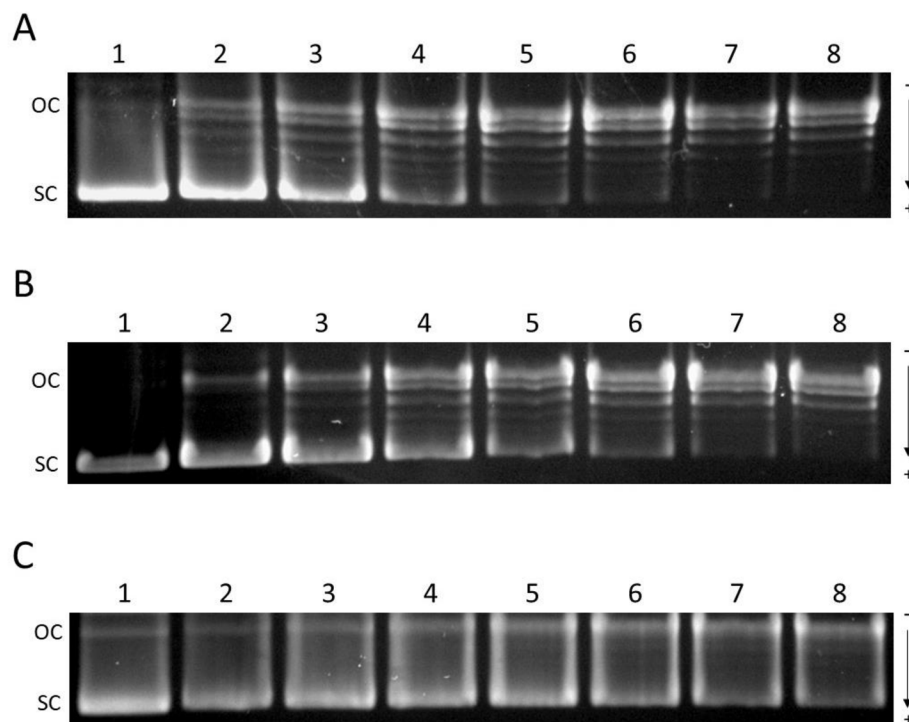
Jak již bylo zmíněno, topoisomerasy hrají v organismu významnou roli při procesování DNA. Jelikož hlavním mechanismem účinku většiny Pt komplexů je vazba na DNA, jejich protinádorové působení v organismu může být ovlivněno také činností topoisomerasy (Malina et al., 2009). V subkapitole 2.1.1 v Tab. 1 je patrné, že inhibitory topoisomerasy patří mezi významná chemoterapeutika.



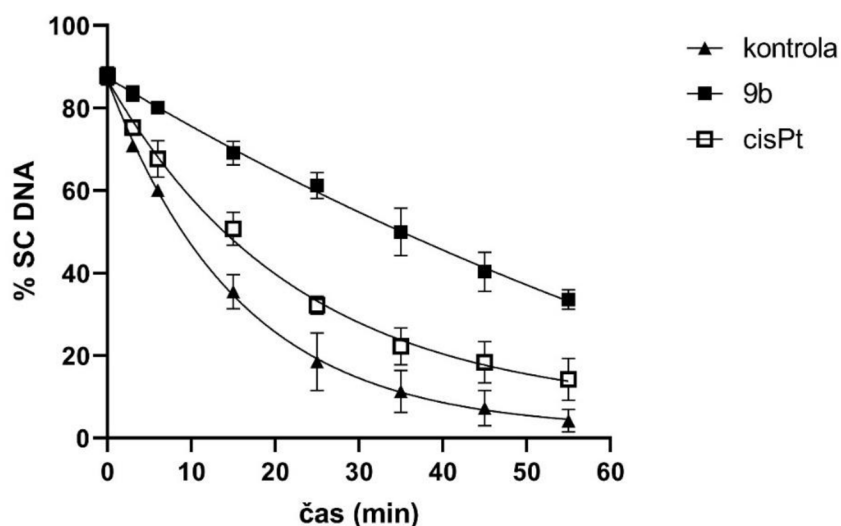
Obr. 31: Reverzibilní štěpení jednoho vlákna na molekule DNA katalyzované enzymem DNA topoisomerasou I (obsahuje v aktivním místě tyrosin). Obrázek upraven podle Alberts et al., 2015.

V rámci tohoto experimentu byl pozorován vliv komplexů na rychlost rozvíjení superhelikální plasmidové DNA na relaxovanou cirkulární DNA enzymem topoI. Je důležité zmínit, že oba komplexy rozvíjejí samy o sobě molekulu DNA (viz kapitola 4.7). Z Obr. 32 je patrné, že se zvyšující se délkou působení topoI došlo u plasmidové DNA ve všech případech k postupnému ubývání SC formy a přibývání OC formy. Modifikace DNA komplexy (Obr. 32 – část B a C) snížila rychlost rozvíjení superhelikální formy DNA topoI oproti kontrole (Obr. 32 – část A) – došlo tedy k inhibici působení daného enzymu.

Z Obr. 33 je patrné, že oba použité komplexy inhibovaly topoI, protože rozvíjení SC formy DNA bylo pomalejší než u nemodifikované plasmidové DNA. Komplex **9b** byl při inhibici rozvíjení plasmidové DNA enzymem účinnější, jelikož % SC formy klesalo v celém průběhu experimentu pomaleji než u cisplatinu. Modifikace komplexem **9b** tedy více zpomalovala rychlost enzymové reakce. Výsledky pro cisplatinu jsou v souladu s literaturou (Malina et al., 2009).



Obr. 32: Stanovení inhibice rozvíjení superhelikální formy plasmidu pUC19 enzymem topoI cisplatinou a komplexem **9b** pomocí agarosové elektroforézy. Elektroforeogramy znázorňují rozvíjení nemodifikovaného plasmidu (A), plasmidu modifikovaného cisplatinou (B) a komplexem **9b** (C). U vzorků pro experimenty A, B a C byl plasmid (modifikovaný a nemodifikovaný) inkubován s enzymem topoI a v časových intervalech od počátku inkubace byly odebírány do 1% SDS alikvoty, které odpovídají jednotlivým drahám. Dráha 1: čas 0 min (kontrola, neobsahuje enzym), dráha 2 – čas 3 min, dráha 3 – čas 6 min, dráha 4 – čas 15 min, dráha 5 – čas 25 min, dráha 6 – čas 35 min, dráha 7 – čas 45 min, dráha 8 – čas 55 min.

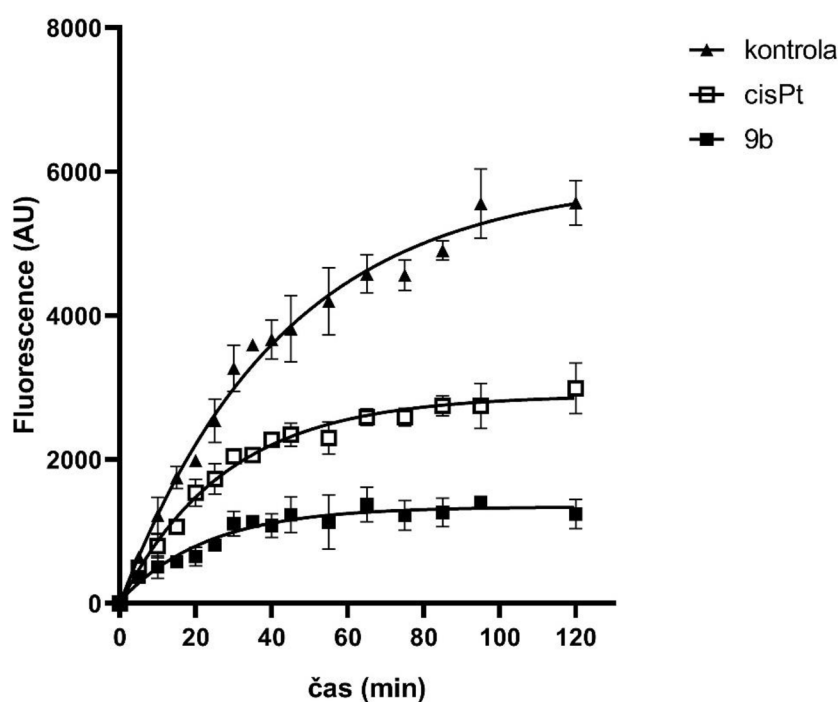


Obr. 33: Graf znázorňující závislost % SC formy plasmidové DNA na čase pro nemodifikovaný vzorek plasmidu a pro vzorky modifikované na  $r_b=0,02$  cisplatinou a komplexem **9b**. Je pozorováno jejich ovlivnění enzymu DNA topoisomerasy I. Hodnota SD byla vypočítána ze 3 nezávislých měření. Graf byl vytvořen v programu GraphPad Prism 8.

## 4.10 Vliv komplexu na enzym RNA polymerasa

Pro měření vlivu komplexu na inhibici transkripce DNA byla použita RNA polymerasa z bakterie *E. coli*. Experiment je založen na použití UTP- $\gamma$ -AmNS (strukturní vzorec – viz Obr. 18) jako jednoho z ribonukleotidů. UTP- $\gamma$ -AmNS je fluorescentní analog uridintrifosfátu. Při zainkorporování UMP do RNA během transkripce dojde ke štěpení UTP- $\gamma$ -AmNS, což vede ke zvýšení fluorescence - uvolní se  $\gamma$ -AmNS, který vykazuje vyšší fluorescenci než UTP- $\gamma$ -AmNS (Luckel et al., 2005).

Inhibice transkripce je důležitá pro mechanismus účinku komplexních sloučenin na bázi platiny (Todd & Lippard, 2009). V tomto experimentu byla měřena relativní fluorescence v určitých časových intervalech. Z Obr. 34 je patrné, že nejvíce RNA produktů v daném časovém úseku bylo vytvořeno u vzorku kontroly (dosaženo nejvyšší relativní fluorescence). Modifikace cirkulární plasmidové DNA Pt komplexem vedla ke snížení rychlosti inkorporace UMP do rostoucího RNA řetězce. Komplex **9b** byl schopen inhibovat transkripci účinněji než cisplatina.



Obr. 34: Graf znázorňující kinetiku transkripce cirkulární plasmidové DNA pBR322 (kontrola) a cirkulární plasmidové DNA pBR322 modifikované komplexem **9b** a cisplatinou. Hodnota SD vypočítána ze 3 nezávislých měření. Graf byl vytvořen pomocí programu GraphPad Prism 8.



## 4.11 Shrnutí výsledků

V Tab. 5 jsou přehledně shrnuté všechny výsledky, které byly naměřeny v rámci experimentální části. Výsledky uvedené v tabulce jsou podrobně rozebrány v kapitolách 4.1-4.10 a následně diskutovány v 5. kapitole diplomové práce.

Tab. 5: Shrnutí všech výsledků získaných v rámci experimentální části diplomové práce.

	Komplex <b>9b</b>	Cisplatina
Cytotoxicita u nádorové linie MDA-MB-231 (IC <sub>50</sub> )	3,05 ± 0,10 μmol·l <sup>-1</sup>	16,95 ± 3,33 μmol·l <sup>-1</sup>
Platinace DNA v nádorových buňkách	42,13 pg Pt/μg DNA	27,1 pg Pt/μg DNA
Kinetika vazby na DNA v bezbuněčném prostředí (t <sub>1/2</sub> )	75,5 ± 13,2 min	114 ± 6 min *
Teplotní stabilita DNA	Zvýšení a poté pokles	Pokles
Měření fluorescence Tb <sup>3+</sup> iontů	Mírné zvýšení	Zvýšení
Změna intenzity pozitivního pásu vůči kontrole (CD spektrum)	Snížení	Zvýšení
Úhel rozvinutí plasmidové DNA	8,69 ± 0,41 °	13 ° †
Množství meziřetězcových můstků (%ICL/Pt)	8,7 ± 1,1 %	6,6 ± 0,3 %
Inhibice DNA topoisomerasy I	ano	ano
Inhibice transkripce DNA	ano	ano

\* Hodnota převzata z Bancroft et al., 1990.

† Hodnota převzata z Keck & Lippard, 1992.

## 5 DISKUSE

Struktura komplexu **9b**, studovaného v této práci, je formálně odvozena od klinicky využívané cisplatiny záměnou obou amminových ligandů za *N,N*-diethylbenzimidazol-2-ylidenovou skupinu a trifenylofosfin. Protože tento komplex i jeho strukturní analoga vykazovala velmi dobrou antiproliferativní aktivitu v řadě lidských nádorových linií (Rehm et al., 2018), cílem této diplomové práce bylo přispět k porozumění mechanismu jeho působení na molekulární úrovni.

Je všeobecně přijímáno, že hlavním mechanismem účinku cisplatiny je poškození DNA, které vede k zastavení buněčného cyklu a k buněčné smrti prostřednictvím apoptózy (Brabec, 2002). Na základě analogie s cisplatinou se předpokládá, že mechanismus účinku, který je základem protinádorového působení sloučenin obsahujících ve své struktuře platinu, je komplexní proces, ve kterém hraje velmi důležitou roli právě modifikace DNA a její zpracování buněčnými složkami (Kašpárková et al., 2003). Aby došlo k potvrzení, že toto platí i v případě komplexu **9b** a že DNA je opravdu cílovým místem jeho působení, bylo nejprve stanoveno, zda se komplex **9b** váže na DNA v nádorových buňkách. Pro zvolení vhodné koncentrace pro tento experiment bylo třeba nejprve stanovit hodnotu  $IC_{50}$ . Výsledky ukázaly, že komplex je výrazně účinnější než cisplatina (5,6krát) i ve velmi agresivní a k cisplatině rezistentní nádorové linii prsního karcinomu MDA-MB-231 (Obr. 19).

Na základě měření množství Pt navázané na DNA v buňkách bylo zjištěno, že DNA je platinována více, pokud byly buňky ošetřeny komplexem **9b** než v případě ošetření stejnou koncentrací cisplatiny. To může souviset s již dříve naměřeným vyšším průnikem komplexu **9b** do buněk a s větší akumulací v nich (Rehm, 2018, měřeno pro linii HCT116). Větší průnik do buněk je pravděpodobně způsobený vyšší lipofilitou komplexu **9b** ve srovnání s cisplatinou. Při srovnání výsledků získaných pro antiproliferativní aktivitu a platinaci DNA vyplývá, že v případě komplexu **9b** se na DNA nachází přibližně 2x více Pt-adtů než v případě cisplatiny (Tab. 3), jeho účinnost však byla téměř 6x vyšší (viz Obr. 19 – měření  $IC_{50}$ ). Tento výsledek by mohl být vysvětlen dvěma způsoby. Jednak, že Pt-adt vytvořený na DNA komplexem **9b** poškozuje DNA více než cisplatina, nebo že poškození DNA není v případě komplexu **9b** jediným mechanismem, který přispívá k jeho celkovému antiproliferativnímu účinku.

Tento výsledek však prokázal, že DNA hraje roli v mechanismu působení komplexu **9b**. To je v souladu i s dříve publikovaným zjištěním, že tento komplex vykazuje p53 dependentní aktivitu (Rehm et al., 2018). Protein p53 hraje důležitou roli v buněčných odpovědích na poškození DNA (Lacroix et al., 2006). Jeho zapojení v mechanismu působení komplexu **9b** tedy ukazuje na poškození DNA v ošetřených buňkách. Proto byly další experimenty v této práci zaměřeny na zjištění, jakým způsobem komplex **9b** ovlivňuje strukturu a vlastnosti DNA. Výsledky pak byly srovnány se změnami, které na DNA vyvolává cisplatina. K těmto experimentům byla použita modelová DNA z telecího thymu a bakteriální plasmidová DNA.

Experiment zaměřený na stanovení rychlosti vazby (Obr. 21) ukázal, že komplex **9b** se váže na DNA kovalentně a po 24 h je navázáno 100 % přidaného komplexu. Rychlost vazby komplexu **9b** ( $t_m = 75,5 \pm 13,2$  min) na dvoušroubovicovou DNA v tomto *in vitro* experimentu (v bezbuněčném prostředí) byla vyšší než u cisplatiny ( $t_m = 114 \pm 6$  min, Bancroft et al., 1990). Skutečnost, že inkubace komplexu **9b** s DNA vedla k nevratné a kvantitativní vazbě usnadňuje přípravu a analýzu vzorků pro další experimenty, protože je možné připravit snadno a přesně vzorky DNA modifikované komplexem **9b** na předem zvolenou hodnotu  $n_b$ .

Další experimenty byly zaměřeny na charakterizaci změn v konformaci a stabilitě dvoušroubovice DNA vyvolaných vazbou komplexu **9b**. Získané výsledky ukázaly, že některé změny vyvolané v DNA komplexem **9b** jsou významně odlišné od změn vyvolaných cisplatinou (Tab. 5).

Stabilita DNA byla studována pomocí měření teploty tání. Tři hlavní faktory ovlivňující teplotní stabilitu DNA modifikovanou Pt(II) komplexy jsou stabilizující efekt kladného náboje navázaného Pt(II) komplexu, destabilizující efekt konformačního poškození způsobeného adukty s DNA a stabilizující efekt meziřetězcových můstků (Žaludová et al., 1996). Vazba komplexu **9b** při nižších modifikacích DNA stabilizuje (na rozdíl od cisplatiny, která DNA destabilizuje) – stabilizující faktory tedy převažují nad faktory destabilizujícími, což znamená, že distorze DNA komplexem **9b** je malá (menší než u cisplatiny), nebo komplex **9b** tvoří více meziřetězcových můstků (nebo platí obě dvě tvrzení současně). Aby bylo zjištěno, jaké tvrzení je správné, byly provedeny další experimenty – charakterizace distorze pomocí měření fluorescence  $Tb^{3+}$  iontů, měření CD spekter, rozvíjení DNA a stanovení množství meziřetězcových můstků.

Experiment zaměřený na charakterizaci lokálních poškození v molekule DNA (měření fluorescence  $Tb^{3+}$  iontů) po vazbě platnatého komplexu ukázal, že vazba komplexu **9b**, na rozdíl od cisplatinu, vyvolává jen malé lokální změny ve struktuře dvoušroubovice DNA, které jsou patrné až při vyšším stupni modifikace (Obr. 24).

Také výsledky měření CD spekter ukázaly rozdíl mezi cisplatinou a komplexem **9b** v ovlivnění struktury DNA (Obr. 25 a 26). Na rozdíl od cisplatinu, která s rostoucí koncentrací vyvolává nárůst intenzity pozitivního pásu při 280 nm, což souvisí s neneduračními změnami v DNA (Brabec et al., 1990), komplex **9b** vyvolává s rostoucím stupněm modifikace snižování intenzity pozitivního pásu, což svědčí o denuračních změnách v DNA (Brabec et al., 1990). Tento průběh je podobný spektru pro DNA, jež byla modifikovaná transplatinou (Macquet & Butour, 1978).

Komplex **9b** rozvinul plasmidovou DNA o úhel  $8,7^\circ$  (Tab. 5), který neodpovídá typické hodnotě získané pro cisplatinu ( $13^\circ$ , Keck & Lippard, 1992), ale je spíše podobný úhlu rozvíjení vyvolaného transplatinou ( $9^\circ$ , Keck & Lippard, 1992). To může svědčit o tom, že komplex **9b** tvoří adukty, které jsou odlišné od aduktů cisplatinu, nebo zastoupení různých typů aduktů vytvořených komplexem **9b** je odlišné od cisplatinu.

Komplex **9b** vykazoval mírně vyšší tvorbu meziřetězcových můstků než cisplatinu (Obr. 30 a Tab. 5). ICLs jsou vysoce toxické pro buňky, jelikož zabraňují separaci dvou vláken, což je nezbytné pro replikaci a transkripci DNA. ICLs jsou také obtížně opravovány (Suchánková et al., 2012). Mírně vyšší tvorba meziřetězcových můstků komplexem **9b** (Tab. 5) pravděpodobně přispívá k vyšší aktivitě komplexu **9b** v nádorových buňkách.

Na základě všech výsledků získaných výše lze konstatovat, že stabilizující efekt komplexu **9b** na DNA při nižších modifikacích, je pravděpodobně způsobený jednak tím, že poškození DNA komplexem **9b** je malé, a také i částečně tím, že komplex **9b** tvoří mírně vyšší množství meziřetězcových můstků. Komplex **9b** se tedy, jak již bylo zmíněno, chová jinak než cisplatinu. Bylo také zjištěno, že jeho chování vykazuje určité aspekty, které jsou podobné chování transplatinu.

V závěru Experimentální části diplomové práce bylo studováno, jak poškození DNA vyvolané komplexem **9b** ovlivňuje biologicky důležité DNA dependentní enzymatické procesy. Jednalo se konkrétně o relaxaci nadšroubovicovitého vnutí DNA a inhibici transkripce.

DNA topoisomerasy jsou esenciální enzymy, které modifikují topologii DNA a jsou zahrnuty v mnoha procesech vztahujících se k metabolismu DNA (replikace, transkripce, remodeling chromatinu, rekombinace a oprava DNA) a jsou považovány za slibné cíle chemoterapie (Palumbo et al., 2002). Další experiment byl proto zaměřen na stanovení vlivu Pt komplexu na aktivitu těchto enzymů. Jako modelový enzym byla zvolena bakteriální DNA topoisomerasa I. Její schopnost přeměnit přirozeně superhelikální plasmidovou DNA na relaxovanou cirkulární DNA byla sledována pomocí agarosové elektroforézy. Výsledky (Obr. 32 a 33) ukázaly, že přítomnost aduktů vytvořených komplexem **9b** na substrátové DNA inhibuje aktivitu topoI. Účinnost relaxace plasmidové DNA topoI byla snížena díky modifikaci komplexem **9b** významně více než v případě modifikace cisplatinou.

Poslední experiment byl zaměřen na sledování vlivu modifikace templátové plasmidové DNA na aktivitu DNA-dependentní RNA polymerasy z *E. coli*. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že přítomnost aduktů vytvořených komplexem **9b** a cisplatinou na templátové DNA vedou k předčasnému ukončení syntézy RNA a inhibici transkripce (Obr. 34). Tento efekt je dobře pozorovatelný i při velmi nízkém stupni modifikace ( $r_b = 0,0015$ ), což svědčí o vysoce účinné schopnosti Pt-adtů inhibovat syntézu RNA. Inhibice transkripce je klíčovou složkou mechanismu protinádorového účinku cisplatin (Sorenson & Eastman, 1988). Podobně jako v případě topoI byla vazba komplexu **9b** na DNA účinnější v inhibici aktivity enzymu než vazba klinicky využívané cisplatin.

Výsledky studia vlivu komplexu **9b** na enzymy procesující DNA jsou velmi zajímavé ve srovnání s výsledky experimentů diskutovaných výše, které se týkají vlivu vazby komplexu **9b** na strukturu a stabilitu molekuly DNA. Zatímco výsledky strukturních změn DNA svědčí o tom, že komplex **9b** poškozuje DNA méně než cisplatin, jeho vliv na topoI a RNA polymerasu je větší. To může souviset s většími neodstupujícími ligandy, které mohou stericky bránit enzymům v interakci se substrátovou DNA více, než relativně malé  $\text{NH}_3$  ligandy cisplatin. To by mohlo znamenat, že sterické omezení hraje významnější roli v mechanismu působení komplexu **9b** než poškození konformace DNA. Vzhledem k tomu, že obě skupiny enzymů (topoI i RNA polymerasy) hrají v mechanismu působení cisplatin a od ní odvozených cytostatik obsahujících platinu zásadní roli (Jamieson & Lippard, 1999; Aoe et al., 2004), větší schopnost inhibovat DNA-dependentní enzymy může souviset s větší antiproliferativní aktivitou komplexu **9b** (viz Obr. 19).

## 6 ZÁVĚR

Mechanismus účinku protinádorových koordinačních sloučenin na bázi platiny je velmi složitý a komplexní proces. Vazba na DNA je však pro většinu Pt komplexů klíčovou složkou jejich mechanismu působení, a proto byla studována i v této práci. Interakce s DNA byly zkoumány u nové Pt(II) komplexní sloučeniny **9b**, která stejně jako cisplatina obsahuje dva chloridové ligandy. Vazba na DNA byla charakterizována pomocí různých přístupů, které měly za cíl zjistit, jak modifikace komplexem **9b** ovlivní strukturu a stabilitu DNA a dále také procesování DNA buněčnými enzymy.

V experimentální části diplomové práce bylo provedeno mnoho experimentů, které pomohly odhalit mechanismus vazby komplexu **9b** na DNA, což naznačuje, že všechny cíle této práce byly naplněny. Studovaná komplexní sloučenina ovlivnila strukturu a stabilitu DNA jinak než cisplatina. Modifikace DNA komplexem **9b** způsobila celkově menší poškození této molekuly. Komplex **9b** měl však větší vliv na DNA topoisomerasu I a RNA polymerasu pravděpodobně díky objemným ligandům, které tento komplex obsahuje. Zajímavé je, že v některých experimentech vykazoval studovaný komplex podobné vlastnosti jako transplatina, i když se jedná o sloučeninu, která byla vytvořena jako analog cisplatiny.

Přestože v této práci bylo pro studium mechanismu účinku komplexu provedeno mnoho metod, bylo by možné interakce s DNA studovat i za pomoci dalších experimentů – např. replikační mapování Pt-DNA aduktů, studium oprav DNA modifikované komplexem či rozpoznání Pt-DNA aduktů proteinem HMGB1. Realizace těchto metod by však přesáhla rozsah této práce a metody provedené v experimentální části jsou dostatečné k popsání interakcí komplexu **9b** s DNA.

Chemoterapie je stále jednou z nejvíce používaných metod pro léčbu nádorových onemocnění. Mnoho pacientů s karcinomy je v dnešní době stále léčeno klasickými Pt(II) komplexními sloučeninami, které jsou v klinické praxi používány již od minulého století (Lebwohl & Canetta, 1998). Komplex **9b** studovaný v této práci je jedním z mnoha příkladů koordinačních sloučenin obsahujících ve své struktuře platinu, které jsou studovány pro své potencionální protinádorové účinky. Pro pokrok v nádorové terapii je důležité získávání poznatků o mechanismus účinku komplexů na molekulární úrovni, aby mohlo neustále docházet k vylepšování léčebných strategií. Výsledky získané v této práci mohou poskytnout větší základnu pro návrh nových protinádorových komplexních sloučenin a také nových chemoterapeutických strategií,

které jsou často zatíženy rezistencí organismu k léčivu či mnoha nežádoucími vedlejšími účinky, které zhoršují kvalitu života pacientů.

## 7 LITERATURA

- Ajay, S. S., Sudhindra, P., Nilmadhab, R., & Priyankar, P. (2020). Advances in novel iridium (III) based complexes for anticancer applications: A review. *Inorganica Chimica Acta*, 513. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119925>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D. O., Raff, M. C., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (Sixth edition). Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Alderden, R. A., Hall, M. D., & Hambley, T. W. (2006). The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education*, 83(5). <https://doi.org/10.1021/ed083p728>
- Aldossary, S. A. (2019). Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), 07-15. <https://doi.org/10.13005/bpj/1608>
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Federici, L. (2018). Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
- Aoe, K., Kiura, K., Ueoka, H., Tabata, M., Chikamori, M., Kohara, H., Harada, M., & Tanimoto, M. (2004). Cisplatin down-regulates topoisomerase I activity in lung cancer cell lines. *Anticancer Research*, 24(6), 3893-3898. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15736428/>
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2). <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.30892>
- Balcarová, Z., & Brabec, V. (1989). Reinterpretation of fluorescence of terbium ion-DNA complexes. *Biophysical Chemistry*, 33(1), 55-61. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(89\)80007-9](https://doi.org/10.1016/0301-4622(89)80007-9)
- Bancroft, D. P., Lepre, C. A., & Lippard, S. J. (1990). Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 112(19), 6860-6871. <https://doi.org/10.1021/ja00175a020>
- Bashir, M., Mantoo, I. A., Arjmand, F., Tabassum, S., & Yousuf, I. (2023). An overview of advancement of organoruthenium(II) complexes as prospective anticancer agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 487. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215169>
- Bhargava, A., & Vaishampayan, U. N. (2009). Satraplatin: leading the new generation of oral platinum agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(11), 1787-1797. <https://doi.org/10.1517/13543780903362437>
- Bhosle, J., & Hall, G. (2009). Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, 27(4), 173-177. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2009.01.006>
- Brabec, V., Kleinwächter, V., Butour, J. -L., & Johnson, N. P. (1990). Biophysical studies of the modification of DNA by antitumour platinum coordination complexes. *Biophysical Chemistry*, 35(2-3), 129-141. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(90\)80003-P](https://doi.org/10.1016/0301-4622(90)80003-P)
- Brabec, V., & Leng, M. (1993). DNA interstrand cross-links of trans-diamminedichloroplatinum(II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(11), 5345-5349. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5345>



- Brabec, V., Kašpárková, J., Vrána, O., Nováková, O., Cox, J. W., Qu, Y., & Farrell, N. (1999). DNA Modifications by a Novel Bifunctional Trinuclear Platinum Phase I Anticancer Agent. *Biochemistry*, 38(21), 6781-6790. <https://doi.org/10.1021/bi990124s>
- Brabec, V. (2002). DNA Modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: Their recognition and repair. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 71, 1-68. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(02\)71040-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(02)71040-4)
- Brabec, V., Hrabina, O., & Kasparkova, J. (2017). Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 351, 2-31. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.04.013>
- Brown, A., Kumar, S., & Tchounwou, P. B. (2019). Cisplatin-Base Chemotherapy of Human Cancers. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 11(4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7059781/pdf/nihms-1032734.pdf>
- Cao, J. -J., Zheng, Y., Wu, X. -W., Tan, C. -P., Chen, M. -H., Wu, N., Ji, L. -N., & Mao, Z. -W. (2019). Anticancer Cyclometalated Iridium(III) Complexes with Planar Ligands: Mitochondrial DNA Damage and Metabolism Disturbance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(7), 3311-3322. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01704>
- Centers for Disease Control and Prevention (USA). <https://www.cdc.gov/cancer/survivors/patients/treatments.htm> (26. 7. 2023).
- Centers for Disease Control and Prevention (USA). <https://www.cdc.gov/cancer/breast/triple-negative.htm> (29. 9. 2023).
- Clinical trials (USA). <https://clinicaltrials.gov/> (4.2.2024).
- Debela, D. T., Muzazu, S. G. Y., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9. <https://doi.org/10.1177/205031212111034366>
- Dhara, S. C. (1970). A rapid method for the synthesis of cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. *Indian J Chem*, 8(1), 193-194.
- Dilruba, S., & Kalayda, G. V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(6), 1103-1124. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z>
- Dowling, R. C., Carroll, G. T., Kirschman, D. L., Masthay, M. B., & Mammana, A. (2023). Circular dichroism and UV-Vis detection of UV-induced damage to nucleic acids. *Chirality*, 35(12), 973-982. <https://doi.org/10.1002/chir.23612>
- Eastman, A. (1986). Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry*, 25(13), 3912-3915. <https://doi.org/10.1021/bi00361a026>
- Facchetti, G., & Rimoldi, I. (2019). Anticancer platinum(II) complexes bearing N-heterocycle rings. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(11), 1257-1263. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.03.045>
- Florea, A. -M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, 3(1), 1351-1371. <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>
- Gabano, E., Ravera, M., & Osella, D. (2014). Pros and cons of bifunctional platinum(IV) antitumor prodrugs: two are (not always) better than one. *Dalton Transactions*, 43(26), 9813-9820. <https://doi.org/10.1039/c4dt00911h>

- Galanski, M. S., Jakupec, M. A., & Keppler, B. K. (2005). Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 12(18), 2075-2094. <https://doi.org/10.2174/0929867054637626>
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Pedro, J. -M. B. -S., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E. E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J. -P., Agostinis, P., Apte, R. N., Aranda, F., Ayyoub, M., Beckhove, P., Blay, J. -Y., Bracci, L., Caignard, A., Castelli, C., Cavallo, F., et al. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 5(24), 12472-12508. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2998>
- Garcia, J., Hurwitz, H. I., Sandler, A. B., Miles, D., Coleman, R. L., Deurloo, R., & Chinot, O. L. (2020). Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treatment Reviews*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102017>
- Gibson, E. G., Oviatt, A. A., & Osheroff, N. (2020). Two-Dimensional Gel Electrophoresis to Resolve DNA Topoisomers. *DNA Electrophoresis*, 15-24. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0323-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0323-9_2)
- Gilad, Y., Gellerman, G., Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2021). Drug Combination in Cancer Treatment—From Cocktails to Conjugated Combinations. *Cancers*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/cancers13040669>
- Heringova, P., Woods, J., Mackay, F. S., Kasparikova, J., Sadler, P. J., & Brabec, V. (2006). Transplatin Is Cytotoxic When Photoactivated: Enhanced Formation of DNA Cross-Links. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(26), 7792-7798. <https://doi.org/10.1021/jm0606692>
- Chan, L. L. -Y., Rice, W. L., Qiu, J., & Chalmers, J. (2020). Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLOS ONE*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227950>
- Chen, Y., Guo, Z., Parsons, S., & Sadler, P. J. (1998). Stereospecific and Kinetic Control over the Hydrolysis of a Sterically Hindered Platinum Picoline Anticancer Complex. *Chemistry - A European Journal*, 4(4), 672-676. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3765\(19980416\)4:4<672::AID-CHEM672>3.0.CO;2-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19980416)4:4<672::AID-CHEM672>3.0.CO;2-8)
- Chen, Y., Parkinson, J. A., Guo, Z., Brown, T., & Sadler, P. J. (1999). A New Platinum Anticancer Drug Forms a Highly Stereoselective Adduct with Duplex DNA. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(13-14), 2060-2063. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990712\)38:13/14<2060::AID-ANIE2060>3.0.CO;2-J](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990712)38:13/14<2060::AID-ANIE2060>3.0.CO;2-J)
- Jamieson, E. R., & Lippard, S. J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chemical Reviews*, 99(9), 2467-2498. <https://doi.org/10.1021/cr980421n>
- Johnstone, T. C., Kulak, N., Pridgen, E. M., Farokhzad, O. C., Langer, R., & Lippard, S. J. (2013). Nanoparticle Encapsulation of Mitaplatin and the Effect Thereof on In Vivo Properties. *ACS Nano*, 7(7), 5675-5683. <https://doi.org/10.1021/nn401905g>
- Johnstone, T. C., Suntharalingam, K., & Lippard, S. J. (2016). The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical Reviews*, 116(5), 3436-3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>
- Kartalou, M., & Essigmann, J. M. (2001). Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 478(1-2), 1-21. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00142-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00142-7)

- Kašpárková, J., Nováková, O., Najajreh, Y., Gibson, D., Perez, J. -M., & Brabec, V. (2003). Effects of a Piperidine Ligand on DNA Modification by Antitumor Cisplatin Analogues. *Chemical Research in Toxicology*, 16(11), 1424-1432. <https://doi.org/10.1021/tx034128g>
- Keck, M. V., & Lippard, S. J. (1992). Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 114(9), 3386-3390. <https://doi.org/10.1021/ja00035a033>
- Kopacz-Bednarska, A., & Król, T. (2022). Selected platinum complexes in standard and modern anti-cancer therapies. *Nowotwory. Journal of Oncology*, 72(2), 96-105. <https://doi.org/10.5603/NJO.a2022.0011>
- Lacroix, M., Toillon, R. -A., & Leclercq, G. (2006). P53 and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer*, 13(2), 293-325. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01172>
- Lebwohl, D., & Canetta, R. (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer*, 34(10), 1522-1534. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00224-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00224-X)
- Lee, Y. T., Tan, Y. J., & Oon, C. E. (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, 834, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>
- Lemaire, M. A., Schwartz, A., Rahmouni, A. R., & Leng, M. (1991). Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between cis-diamminedichloroplatinum (II) and DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5), 1982-1985. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1982>
- Li, S., Li, C., Jin, S., Liu, J., Xue, X., Eltahan, A. S., Sun, J., Tan, J., Dong, J., & Liang, X. -J. (2017). Overcoming resistance to cisplatin by inhibition of glutathione S-transferases (GSTs) with ethacraplatin micelles in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 144, 119-129. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.08.021>
- Liaw, B. C., Tsao, C. -K., Seng, S., Jun, T., Gong, Y., Galsky, M. D., & Oh, W. K. (2023). Biomarker Development Trial of Satraplatin in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The Oncologist*, 28(4), 366-e224. <https://doi.org/10.1093/oncolo/oyac224>
- LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury (USA). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547849/> (24.1.2024).
- Luckel, F., Kubo, K., Tsumoto, K., & Yoshikawa, K. (2005). Enhancement and inhibition of DNA transcriptional activity by spermine: A marked difference between linear and circular templates. *FEBS Letters*, 579(23), 5119-5122. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.095>
- Macquet, J. -P., & Butour, J. -L. (1978). A Circular Dichroism Study of DNA . Platinum Complexes. Differentiation between Monofunctional. cis-Bidentate and trans-Bidentate Platinum Fixation on a Series of DNAs. *European Journal of Biochemistry*, 83(2), 375-387. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12103.x>
- Malina, J., Vrána, O., & Brabec, V. (2009). Mechanistic studies of the modulation of cleavage activity of topoisomerase I by DNA adducts of mono- and bi-functional PtII complexes. *Nucleic Acids Research*, 37(16), 5432-5442. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp580>

- Manzotti, C., Pratesi, G., Menta, E., Domenico, R. D., Cavalletti, E., Fiebig, H. H., Kelland, L. R., Farrell, N., Polizzi, D., Supino, R., Pezzoni, G., & Zunino, F. (2000). BBR 3464: A Novel Triplatinum Complex, Exhibiting a Preclinical Profile of Antitumor Efficacy Different from Cisplatin. *Clinical Cancer Research*, 6(7), 2626-2634. <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/6/7/2626/288248/BBR-3464-A-Novel-Triplatinum-Complex-Exhibiting-a>
- Monro, S., Colón, K. L., Yin, H., Roque, J., Konda, P., Gujar, S., Thummel, R. P., Lilge, L., Cameron, C. G., & McFarland, S. A. (2019). Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chemical Reviews*, 119(2), 797-828. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00211>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- National Cancer Institute (USA). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/stem-cell-transplant> (30.7.2023).
- Ornes, S. (2013). Antibody–drug conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(34), 13695-13695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314120110>
- Palumbo, M., Gatto, B., Moro, S., Sissi, C., & Zagotto, G. (2002). Sequence-specific interactions of drugs interfering with the topoisomerase–DNA cleavage complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1587(2-3), 145-154. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(02\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00077-7)
- Parker, L. J., Italiano, L. C., Morton, C. J., Hancock, N. C., Ascher, D. B., Aitken, J. B., Harris, H. H., Campomanes, P., Rothlisberger, U., De Luca, A., Lo Bello, M., Ang, W. H., Dyson, P. J., & Parker, M. W. (2011). Studies of Glutathione Transferase P1-1 Bound to a Platinum(IV)-Based Anticancer Compound Reveal the Molecular Basis of Its Activation. *Chemistry – A European Journal*, 17(28), 7806-7816. <https://doi.org/10.1002/chem.201100586>
- Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 52-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018>
- Powers Smith, C. E., & Prasad, V. (2021). Targeted Cancer Therapies. *American Family Physician*, 103(3), 155-163. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2021/0201/p155.html>
- Prokop, R., Kasparkova, J., Novakova, O., Marini, V., Pizarro, A. M., Navarro-Ranninger, C., & Brabec, V. (2004). DNA interactions of new antitumor platinum complexes with trans geometry activated by a 2-methylbutylamine or sec-butylamine ligand. *Biochemical Pharmacology*, 67(6), 1097-1109. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.11.001>
- Ramos-Lima, F. J., Vrána, O., Quiroga, A. G., Navarro-Ranninger, C., Halámiková, A., Rybníčková, H., Hejmalová, L., & Brabec, V. (2006). Structural Characterization, DNA Interactions, and Cytotoxicity of New Transplatin Analogues Containing One Aliphatic and One Planar Heterocyclic Amine Ligand. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(8), 2640-2651. <https://doi.org/10.1021/jm0602514>
- Raymond, E., Chaney, S. G., Taamma, A., & Cvitkovic, E. (1998). Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies. *Annals of Oncology*, 9(10), 1053-1071. <https://doi.org/10.1023/A:1008213732429>

- Rehm, T., Rothemund, M., Bär, A., Dietel, T., Kempe, R., Kostrhunova, H., Brabec, V., Kasparkova, J., & Schobert, R. (2018). N , N -Dialkylbenzimidazol-2-ylidene platinum complexes – effects of alkyl residues and ancillary cis -ligands on anticancer activity. *Dalton Transactions*, 47(48), 17367-17381. <https://doi.org/10.1039/C8DT03360A>
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, 205, 698-699. <https://www.nature.com/articles/205698a0>
- Schoch, S., Gajewski, S., Rothfuß, J., Hartwig, A., & Köberle, B. (2020). Comparative Study of the Mode of Action of Clinically Approved Platinum-Based Chemotherapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186928>
- Servidei, T., Ferlini, C., Riccardi, A., Meco, D., Scambia, G., Segni, G., Manzotti, C., & Riccardi, R. (2001). The novel trinuclear platinum complex BBR3464 induces a cellular response different from cisplatin. *European Journal of Cancer*, 37(7), 930-938. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00061-2)
- Shimada, M., Itamochi, H., & Kigawa, J. (2013). Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Management and Research*, 5, 67-76. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S35785>
- Sorenson, C. M., & Eastman, A. (1988). Mechanism of cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced Cytotoxicity: Role of G2 Arrest and DNA Double-Strand Breaks. *Cancer Research*, 48(16), 4484-4488. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3395999/>
- Suchánková, T., Vojtíšková, M., Reedijk, J., Brabec, V., & Kašpárková, J. (2009). DNA and glutathione interactions in cell-free media of asymmetric platinum(II) complexes cis- and trans-[PtCl<sub>2</sub>(isopropylamine)(1-methylimidazole)]: relations to their different antitumor effects. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14(1), 75-87. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0425-0>
- Suchánková, T., Kubíček, K., Kašpárková, J., Brabec, V., & Kozelka, J. (2012). Platinum–DNA interstrand crosslinks: Molecular determinants of bending and unwinding of the double helix. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 108, 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.025>
- Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., & Kumar, S. (2021). Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*, 13, 303-328. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267383>
- Tilsed, C. M., Fisher, S. A., Nowak, A. K., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2022). Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.960317>
- Todd, R. C., & Lippard, S. J. (2009). Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*, 1(4), 280-291. <https://doi.org/10.1039/b907567d>
- van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H., Oliveira, S., & Robinson, D. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>
- Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, 39(35), 8113-8127. <https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>

- Wilson, J. J., & Lippard, S. J. (2014). Synthetic Methods for the Preparation of Platinum Anticancer Complexes. *Chemical Reviews*, 114(8), 4470-4495. <https://doi.org/10.1021/cr4004314>
- World Health Organization (USA). <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services> (5.2.2024).
- Woźniak, K., & Blasiak, J. (2002). Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochimica Polonica*, 49(3), 583-596. [http://www.actabp.pl/pdf/3\\_2002/583.pdf](http://www.actabp.pl/pdf/3_2002/583.pdf)
- Wu, H. -C., Chang, D. -K., & Huang, C. -T. (2006). Targeted Therapy for Cancer. *Molecular Cancer*, 2(2), 57-66. [https://www.researchgate.net/publication/26576352\\_Targeted\\_Therapy\\_for\\_Cancer](https://www.researchgate.net/publication/26576352_Targeted_Therapy_for_Cancer)
- Wu, Q., Qin, S. -K., Teng, F. -M., Chen, C. -J., & Wang, R. (2010). Lobaplatin arrests cell cycle progression in human hepatocellular carcinoma cells, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-43>
- Xian, C., Chen, H., Xiong, F., Fang, Y., Huang, H., & Wu, J. (2021). Platinum-based chemotherapy via nanocarriers and co-delivery of multiple drugs. *Biomaterials Science*, 9(18), 6023-6036. <https://doi.org/10.1039/D1BM00879J>
- Xue, X., You, S., Zhang, Q., Wu, Y., Zou, G. -zhang, Wang, P. C., Zhao, Y. -liang, Xu, Y., Jia, L., Zhang, X., & Liang, X. -J. (2012). Mitaplatin Increases Sensitivity of Tumor Cells to Cisplatin by Inducing Mitochondrial Dysfunction. *Molecular Pharmaceutics*, 9(3), 634-644. <https://doi.org/10.1021/mp200571k>
- Žaludová, R., Kleinwächter, V., & Brabec, V. (1996). The effect of ionic strength on melting of DNA modified by platinum(II) complexes. *Biophysical Chemistry*, 60(3), 135-142. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(96\)00010-5](https://doi.org/10.1016/0301-4622(96)00010-5)

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
ADC	Konjugát protilátka-léčivo (z angl. antibody-drug conjugate)
ATP	Adenosintrifosfát
BCRP	Efluxní transportér
CD	Církulární dichroismus
Cp	Cyklopentadienylová skupina
CTP	Cytidintrifosfát
DCA	Dichloracetát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (kultivační médium)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EA	Etakrynová kyselina
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EMSA	Elektroforetické měření posunu mobility
EtBr	Ethidium bromid
FBS	Fetální hovězí sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GSTs	Glutathiontransferasy
GTP	guanosintrifosfát
HCT116	Nádorová linie karcinomu tlustého střeva
HER2	Lidský epidermální receptor 2
HMG protein	Proteiny s vysokou pohyblivostí (z angl. high mobility group protein)
IC <sub>50</sub>	Inhibiční koncentrace
ICL	Meziřetězcové můstky
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

MCF-7	Multirezistentní nádorová linie karcinomu prsu
MDA-MB-231	Nádorová linie triple negativního karcinomu prsu
MMR	Mechanismus opravy chybného párování bází (z angl. mismatch repair)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
OC forma	Relaxovaná forma plasmidu
PBS	Fosfátový pufr
PRR	Receptory rozeznávající molekulové vzory (z angl. pattern recognition receptors)
PS	fotosenzitizér
r <sub>b</sub>	Stupeň modifikace DNA komplexem
RNA	Ribonukleová kyselina
SC forma	Superhelikální forma plasmidu
SD	Směrodatná odchylka
SDS	Dodecylsulfát sodný
TAE	Trisacetátový pufr s přídavkem EDTA
TBE	Trisborátový pufr s přídavkem EDTA
topoI	Enzym DNA topoisomerasa I
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ttDNA	DNA z telecího thymu
UBF	Jaderný transkripční faktor RNA polymerasy I
UMP	Uridinmonofosfát
UTP- $\gamma$ -AmNS	uridin-5' -trifosfát- $\gamma$ -(sulfo-1-naftyl)amid
UVA	Ultrafialové záření typu A
VEGF-A	Vaskulární endoteliální růstový faktor A