

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

DIZERTAČNÁ PRÁCA

Olomouc 2017

Mgr. Juraj Zajac

Univerzita Palackého v Olomouci

Prírodovedecká fakulta

Katedra biofyziky



Mechanistické štúdie zamerané na poznanie mechanizmov toxických účinkov komplexov prechodných kovov v nádorových bunkách

Mechanistic studies focused on understanding the toxic effects of transition metal complexes in tumor cells

Mgr. Juraj Zajac

Vedúci práce: Prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.

Olomouc 2017

BIBLIOGRAFICKÝ ZÁZNAM

Autor	Mgr. Juraj Zajac
Názov práce	Mechanistické štúdie zamerané na poznanie mechanizmov toxických účinkov komplexov prechodných kovov v nádorových bunkách
Študijný program	Fyzika
Študijný obor	Biofyzika
Vedúci práce	Prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
Rok obhajoby	2017
Kľúčové slová	cisplatina, platinová rezistencia, bunčná smrť, komplexy prechodných kovov, nanočastice

BIBLIOGRAPHIC RECORD

Author	Mgr. Juraj Zajac
Thesis	Mechanistic studies focused on understanding the toxic effects of transition metal complexes in tumor cells
Programme	Physics
Field of study	Biophysics
Supervisor	Prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
Year of defense	2017
Keywords	cisplatin, platinum resistance, cellular death, transition metal complexes, nanoparticles

Prehlasujem, že som predloženú dizertačnú prácu vypracoval samostatne s použitím literatúry citovanej v závere. Všetky publikované výsledky zahrnuté v práci boli použité so súhlasom spoluautorov.

V Olomouci dňa

Podpis

Touto cestou by som rád úprimne poďakoval svojmu školiteľovi Prof. RNDr. Viktorovi Brabcovi, DrSc. za podporu a odborné vedenie pri tvorbe predloženej práce. Veľké poďakovanie patrí aj mojím kolegom a odborníkom z oddelenia Molekulárnej biofyziky a farmakológie, Biofyzikálneho ústavu AV ČR v Brne, ktorí mi poskytli príjemné pracovné prostredie, cenné informácie a vzácny čas pri konzultovaní otázok súvisiacich so skúmanou problematikou. V neposlednom rade patrí vďaka mojej partnerke, rodine a priateľom za ich neustálu morálnu podporu.

Dizertačná práca vznikla za podpory projektov GA ČR (projekty 14-21053S a 17-09436S), MŠMT (projekt LH 14317) a UPOL (projekty Interní grantové agentúry IGA_PrF_2013_017, IGA_PrF_2014_029, IGA_PrF_2015_025, IGA_PrF_2016_013 a IGA_PrF_2017_017).

ABSTRAKT

Rakovina patrí medzi najzákernejšie a najrozšírenejšie choroby modernej doby. Predpokladá sa, že do roku 2050 sa počet pacientov diagnostikovaných na rakovinu zvýši až dvojnásobne. Aktuálny stav ako aj prognózy vedú k dramatickej potrebe pre vývoj a aplikáciu efektívnejších protinádorových liečiv. Komplexy na báze platiny reprezentujú neoddeliteľnú zložku súčasnej protinádorovej terapie. Približne polovici onkologických pacientov je podávaná chemoterapia vo forme platinových cytostatik. Najpoužívanším platinovým liečivom je cisplatina, ktorá bola prvýkrát syntetizovaná Peyronom už v roku 1845. Protinádorovú aktivitu cisplatiny objavil v roku 1965 americký biofyzik Barnett Rosenberg, ktorý tak významne prispel k pokroku v chemoterapeutickej liečbe rakoviny. Za hlavný mechanizmus účinkov cisplatiny a jej analógov ďalších generácií (karboplatina a oxaliplatina) je považovaná interakcia s bunečnou DNA. Konformačné zmeny DNA vyvolané väzbou platinových cytostatik majú za následok ovplyvnenie veľkého množstva bunečných procesov, ktoré nakoniec vedú k programovanej bunečnej smrti - apoptóze. Aj napriek úspechom majú platinové cytostatiká niekoľko závažných nedostatkov, ktoré limitujú ich použitie. Hlavným nedostatkom je slabá špecificita, ktorá je spojená s vážnymi vedľajšími účinkami. Navyše, vrodená a získaná rezistencia nádorov voči platinovým liečivám spôsobuje zníženie ich protinádorovej aktivity. Snaha prekonať nedostatky konvenčných platinových cytostatik odštartovala renesanciu v bioanorganickej chémii a viedla k syntéze tisícok nových platinových komplexov, ako aj komplexov ďalších prechodných kovov a transportných systémov pre lokalizáciu komplexov do nádorových buniek.

Jedným z konceptov pri vývoji efektívnejších protinádorových liečiv je konjugácia platinových cytostatik s inými biologicky aktívnymi látkami, ktoré majú obvykle osobitý mechanizmus účinku. Za týmto účelom bola pripravená a študovaná nová skupina derivátov cisplatiny, obsahujúcich ligandy nesteroidného protizápalového liečiva diklofenak. Bolo zistené, že tieto Pt(II) komplexy sú selektívne cytotoxické vo vybraných nádorových líniiach. Okrem toho vykazujú aktivitu v nádorových bunkách rezistentných voči cisplatine. Jeden z komplexov, $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{Dic})_2(\text{NH}_3)_2]$ s dvomi ligandami diklofenaku viazanými k Pt(II) centru cez karboxylovú skupinu, je účinnejší než samotná cisplatina a vyznačuje sa zvýšenou bunečnou akumuláciou spolu so zvýšenou väzbou na nukleárnu DNA. Mechanistické štúdie naznačujú,

že *cis*-[Pt(Dic)₂(NH₃)₂] ovplyvňuje bunecný metabolizmus glukózy a spôsobuje kolaps mitochondriálneho membránového potenciálu v nádorových bunkách. Prítomnosť molekúl diklofenaku taktiež prispieva k schopnosti komplexu blokovat' bunecný cyklus nádorových buniek a potláčať ich metastatický potenciál.

Iným prístupom je využitie kineticky inertnejších Pt(IV) komplexov a modifikácia ich axiálnych ligandov. Štúdie nových Pt(IV) derivátov oxaliplatiny s axiálnymi ligandami dichlóracetátu ukazujú, že tieto látky majú protinádorové mechanizmy spojené nielen s väzbou na nukleárnu DNA, ale aj s účinkami na mitochondrie, metabolizmus glukózy a autofágiu nádorových buniek. Komplexy sú navyše schopné prekonať vrodenu a získanu rezistenciu nádorových buniek voči klinicky používanej oxaliplatine a cisplatine. Cytotoxické účinky komplexov môžu byť dokonca zosilnené v kombinácii s protinádorovým chemoterapeutickým liečivom 5-fluorouracil.

Nanočastice rôznych formulácii reprezentujú inovatívne systémy s možnosťou selektívneho transportu protinádorových liečiv do cieľových nádorov. Táto myšlienka bola využitá pri syntéze a štúdiu novej skupiny magnetických nanočastíc modifikovaných cisplatinou. Študované nanočastice majú vo vybraných nádorových línii, vrátane buniek rezistentných, výrazne vyššiu aktivitu než samotná cisplatina. Okrem toho nanočastice nie sú cytotoxické v nenádorových bunkách, a vykazujú teda istý druh nádorovej selektivity.

Pri syntéze potenciálnych protinádorových liečiv sú čoraz častejšie využívané aj ostatné prechodné kovy, ako napríklad ruthénium alebo irídium. NAMI-A je klinicky testovaný ruthéniový komplex, ktorý selektívne inhibuje rast nádorových metastáz. Napriek dokončeniu dvoch klinických skúšok, len málo informácii existuje o správaní NAMI-A po aplikácii do krvného obehu. Z tohto dôvodu bol skúmaný vplyv chemických modifikácii NAMI-A na jeho antimetastatický potenciál. Pre simuláciu metastatickej kapacity nádorov bol využitý test adhézie vysoko invazívnych nádorových buniek. Test ukázal, že redukcia NAMI-A a formovanie aduktov s ľudským sérovým albumínom výrazne ovplyvňujú jeho účinky na bunecnú adhéziu. Toto zistenie podporuje teóriu, že chemické modifikácie NAMI-A určujú jeho farmakologickú aktivitu v metastázach nádorov. Ďalej bola študovaná nová skupina substitučne inertných a luminiscenčných irídiových komplexov typu [Ir(C^N)₂(N^N)] [PF₆] s ligandami na báze benzimidazolu. Ukázalo sa, že mechanizmus zodpovedný za cytotoxické účinky komplexov je odlišný od mechanizmu cisplatiny a nezahrňuje koordinačnú väzbou na nukleové kyseliny.

Mechanistické štúdie komplexov prechodných kovov v predloženej práci dokazujú, že racionálnym návrhom chemickej štruktúry možno dosiahnuť významnej protinádorovej účinnosti týchto chemoterapeutických látok.

ABSTRACT

Cancer is one of the most serious and widespread diseases in the modern ages. It is predicted that the number of patients diagnosed with cancer will double by 2050. Current situation as well as prognoses lead to a dramatic growth in demand for development and application of more effective anticancer drugs. Today, platinum-based complexes represent an integral part of anticancer therapy. Approximately half of oncological patients who receive chemotherapeutic treatment are given platinum-based cytostatic drugs. The most widely used platinum drug is cisplatin, which was first synthesized by Peyrone as far back as 1845. The anti-neoplastic activity of cisplatin was discovered by American biophysicist Barnett Rosenberg in 1965, who thereby significantly contributed to the progress in chemotherapeutic treatment of cancer. As the main mechanism of action of cisplatin and its analogues of next generations (carboplatin and oxaliplatin) is considered to be an interaction with cellular DNA. Conformation changes of DNA, initiated by a binding of platinum cytostatic drugs, result in an influence of many cellular processes that finally lead to the induction of programmable cell death – apoptosis. Despite the success of platinum drugs, there are several significant shortcomings that limit their use. The major disadvantage is their poor specificity, which is associated with severe side effects. In addition, the intrinsic and acquired drug resistance of tumors restricts the antitumor activity of platinum-based drugs. The effort of overcoming drawbacks of conventional platinum drugs precipitated a renaissance in bioinorganic chemistry and led to the synthesis of many thousands of platinum complexes, as well as other transition metal complexes and transport systems for the localization of complexes into tumor cells.

One of the concepts for developing more effective anticancer drugs is the conjugation of platinum cytostatics with other biologically active compounds that usually exhibit unique mechanism of action. For this purpose, a series of cisplatin derivatives containing ligands of non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac were synthesized and studied. It was found that these Pt(II) compounds are selectively cytotoxic in selected tumor cell lines. Moreover, they exhibit activity in cisplatin resistant tumor cells. One of the complexes, *cis*-[Pt(Dic)₂(NH₃)₂] with two diclofenac ligands coordinated to Pt(II) centre through the carboxylic group, is more effective than parental cisplatin and is characterized by an enhanced cellular uptake together with nuclear DNA

binding. Mechanistic studies indicate that *cis*-[Pt(Dic)₂(NH₃)₂] affects the cellular glucose metabolism and causes the collapse of mitochondrial membrane potential in tumor cells. The presence of diclofenac molecules also contributes to the ability of complex to arrest cell cycle of tumor cells and suppress their metastatic potential.

Another approach is the utilization of kinetically more inert Pt(IV) complexes and modification of their axial ligands. The studies of newly synthesized Pt(IV) derivatives of oxaliplatin containing axial dichloroacetate ligands show that these compounds have anticancer mechanisms associated not only with the nuclear DNA binding, but also with the effects on mitochondria, glucose metabolism and autophagic response of tumor cells. In addition, the complexes are able to overcome inherent and acquired resistance of tumor cells against clinically used cisplatin and oxaliplatin. The cytotoxic effects of complexes can be even more potentiated when combined with the anticancer chemotherapeutic drug 5-fluorouracil.

The nanoparticles of different formulations represent innovative systems with the possibility to selectively deliver anticancer drugs into the target tumors. This concept was used for the synthesis and investigation of novel magnetic nanoparticles modified with cisplatin. The studied nanoparticles are significantly more active than cisplatin in selected tumor cell lines including cisplatin-resistant tumor cells. Moreover, the nanoparticles are not cytotoxic in noncancerous cells, and hence they exhibit a certain kind of tumor selectivity.

There is a growing interest in taking advantage of other transition metals, such as the ruthenium or the iridium, for the synthesis of potential anticancer drugs. NAMI-A is a clinically tested ruthenium complex that selectively inhibits the growth of tumor metastases. Although two clinical studies have already been completed, very poor information exists on the behavior of NAMI-A once injected into the bloodstream. For that reason, the impact of chemical modifications of NAMI-A on its anti-metastatic potential was investigated. The adhesion test of highly invasive cancer cells was used as a simulation of tumor metastatic capacity. The test showed that the reduction and aggregation of NAMI-A with human serum albumin significantly influence its effects on cellular adhesion. This observation supports the thesis that the chemical modifications of NAMI-A determine its pharmacological activity in tumor metastases. A new class of substitutionally inert and luminescent iridium complexes of the type [Ir(C^N)₂(N^N)] [PF₆] containing benzimidazole-based ligands was further studied. It was showed that the mechanism responsible for the cytotoxic effects of these complexes

differs from that of cisplatin and is not involving coordinative binding to nucleic acids.

Mechanistic studies on transition metal complexes in present work confirm that the rational design of chemical structure may significantly enhance the anticancer activity of these chemotherapeutic compounds.

OBSAH

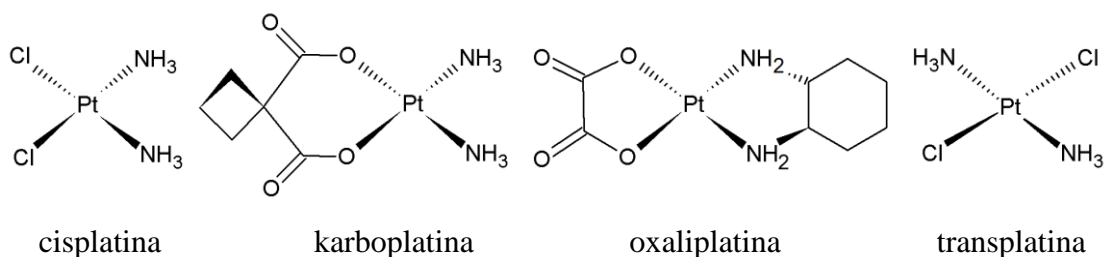
1	ÚVOD.....	15
1.1	Konvenčné platinové cytostatiká	15
1.1.1	Mechanizmus pôsobenia konvenčných platinových cytostatik	16
1.1.1.1	Bunečná akumulácia.....	17
1.1.1.2	Väzba mimo nukleárnu DNA	18
1.1.1.3	Väzba na DNA	19
1.1.2	Rezistencia nádorov voči konvenčným platinovým cytostatikám.....	21
1.1.2.1	Znížená akumulácia	22
1.1.2.2	Vnútrobunečná inaktivácia	23
1.1.2.3	Zmeny v oprave DNA	23
1.1.3	Bunečná apoptóza	28
1.2	Význam platičitých komplexov	32
1.2.1	Pt(IV) komplexy s mechanizmom podobným klasickým platinovým cytostatikám.....	33
1.2.2	Pt(IV) komplexy s duálnym mechanizmom	35
1.3	Využitie nanočastíc pri terapii platinovými cytostatikami.....	38
1.4	Komplexy ostatných prechodných kovov	40
1.4.1	Ruthéniové komplexy	40
1.4.2	Iridiové komplexy	41
1.4.2.1	Aktivácia protinádorových účinkov Ir(III) komplexov	42
2	CIELE PRÁCE	45
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	46
3.1	Použitie materiály.....	46
3.1.1	Chemikálie	46
3.1.2	Platinové komplexy obsahujúce nesteroidné protizápalové liečivo diklofenak.....	46
3.1.3	Platičité deriváty oxaliplatiny s dichlóracetátom v axiálnej pozícii	47
3.1.4	Magnetické nanočastice obsahujúce konjugáty cisplatiny s kyselinou listovou a fluorescenčnou značkou.....	48
3.1.5	Ruthéniový komplex NAMI-A	49
3.1.6	Luminiscenčné iridiové komplexy obsahujúce ligandy na báze benzimidazolu s možnosťou ďalšej funkcionalizácie	49

3.1.7	Bunečné línie	50
3.2	Metódy	51
3.2.1	Stanovenie cytotoxicity pomocou MTT testu.....	51
3.2.2	Určenie rozdeľovacích koeficientov	52
3.2.3	Bunečná akumulácia študovaných komplexov.....	52
3.2.4	Kvantifikácia väzby študovaných komplexov na nukleové kyseliny v bunkách.....	53
3.2.5	Analýza bunečného cyklu s využitím prietokovej cytometrie.....	54
3.2.6	Analýza mitochondriálneho membránového potenciálu (MMP)	54
3.2.7	Inhibícia aeróbnej glykolýzy	55
3.2.8	Produkcia laktátu	56
3.2.9	Indukcia autofágie.....	56
3.2.10	Štúdium bunečnej migrácie	57
3.2.11	Adhézny test	57
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	59
4.1	Nové protinádorovo účinné Pt(II) konjugáty obsahujúce nesteroidné protizápalové liečivo diklofenak: syntéza a duálne mechanizmy účinkov (<i>PUBLIKÁCIA Č. 1</i>).....	59
4.2	Posilnenie mitochondriálnej dysfunkcie v nádorových bunkách pomocou konjugátov metabolického modulátora dichlóracetát s Pt(IV) derivátmi oxaliplatiny (<i>PUBLIKÁCIA Č. 4</i>).....	61
4.3	Zvýšenie chemoterapeutickej odpovede nádorových buniek prostredníctvom cieľeného transportu platinových liečiv vysoko stabilnými multifunkčnými magnetickými nanočasticami pokrytými karboxymetylcelulózou (<i>PUBLIKÁCIA Č. 3</i>)	63
4.4	Vplyv väzby redukovaného NAMI-A k ľudskému sérovému albumínu na farmakokinetiku a biologickú aktivitu (<i>PUBLIKÁCIA Č. 5</i>).....	64
4.5	Protinádorovo účinné extranukleárne luminiscenčné Ir(III) komplexy obsahujúce ligandy na báze benzimidazolu s možnosťou ďalšej funkcionalizácie (<i>PUBLIKÁCIA Č. 2</i>).....	65
5	ZÁVER.....	67
6	ZOZNAM CITOVANEJ LITERATÚRY	70
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	90
8	PRÍLOHY	91

8.1	ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ.....	91
8.1.1	PUBLIKÁCIA Č. 1.....	92
8.1.2	PUBLIKÁCIA Č. 2.....	94
8.1.3	PUBLIKÁCIA Č. 3.....	96
8.1.4	PUBLIKÁCIA Č. 4.....	98
8.1.5	PUBLIKÁCIA Č. 5.....	100
8.2	ŠTRUKTÚROVANÝ ŽIVOTOPIS.....	102

1 ÚVOD

Náhodný objav protinádorových účinkov cisplatiny v 60-tych rokoch 20. storočia reprezentuje jeden z najväčších úspechov v histórii onkológie [1]. Cisplatina, karboplatina a oxaliplatina (*Obrázok 1*) sú v súčasnosti jediné platinové cytostatiká (*cyto* - bunka, *stasis* - zastavenie, látky zastavujúce bunkové delenie) používané v klinickej praxi na celom svete. Ďalšie tri liečivá: nedaplatina, lobaplatina, a heptaplatina boli schválené pre klinickú terapiu v niektorých ázijských krajinách. Aj keď sa platinové cytostatiká používajú pri liečbe nádorov už takmer 40 rokov, stále patria medzi najrozšírenejšie chemoterapeutické látky. Obrovskou známkou ich úspechu je aj fakt, že od zavedenia cisplatiny pre liečbu rakoviny mužských semenníkov, dosiahla účinnosť terapie týchto typov nádorov viac ako 95% [2]. Napriek širokému využitiu konvenčných platinových cytostatik, nové protinádorové liečivá na báze komplexov prechodných kovov nezískali schválenie pre celosvetové použitie v klinickej praxi už viac ako dekádu. Výskumné aktivity v tejto oblasti však naďalej intenzívne pokračujú s cieľom objaviť nové a účinnejšie látky bez nežiaducich účinkov [1].



Obrázok 1. Schematická reprezentácia štruktúr platinových cytostatik používaných v klinickej praxi a biologicky neaktívna transplatina. Nakreslené v programe *ACD/ChemSketch*.

1.1 Konvenčné platinové cytostatiká

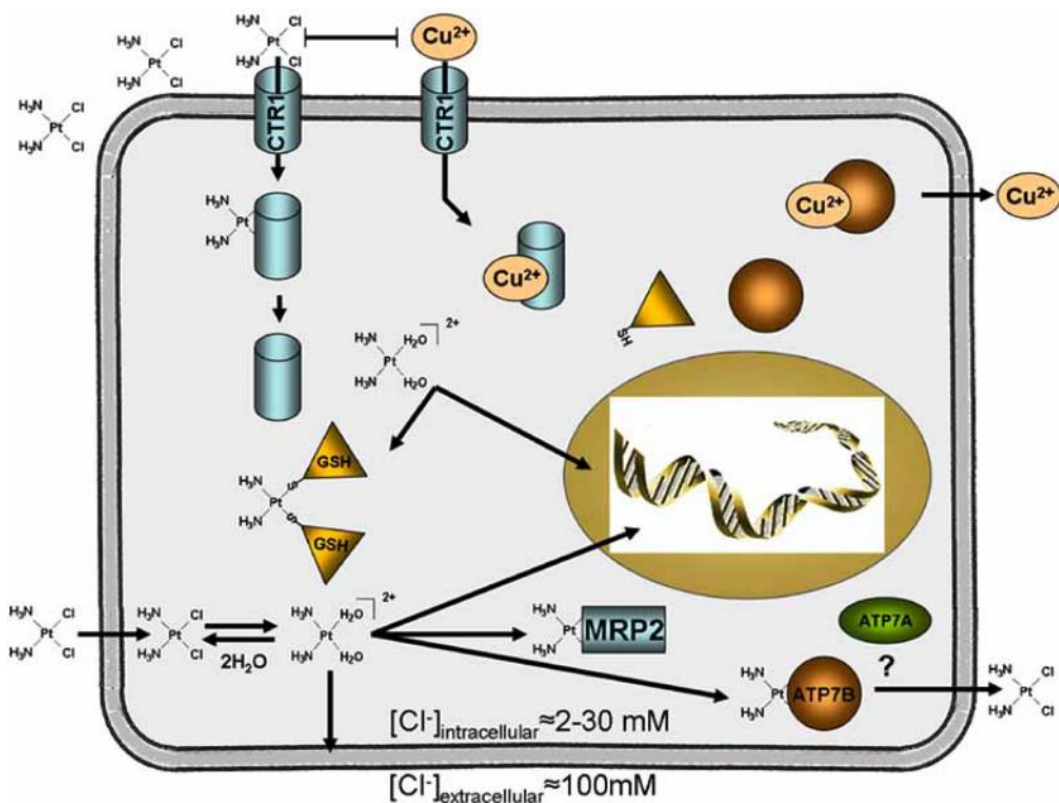
Cisplatina (Platinol, CDDP) je protinádorové liečivo v súčasnosti používané primárne pri liečbe rakoviny semenníkov, vaječníkov, močového mechúra, ale aj nádorov hlavy, krku, pľúc, mozgu, pažeráku a kŕčku maternice [3]. Použitie cisplatiny v klinickej praxi je limitované jej nepriaznivými vedľajšími účinkami (poškodenie ľadvín, sluchu, vypadávanie vlasov, zvracanie) a vrodenu alebo získanou rezistenciou. Klinický vývoj cisplatiny spočiatku prebiehal pod vedením Národného inštitútu pre výskum rakoviny (NCI, USA) v spolupráci s firmami Johnson Matthey a Engelhard Industries, známymi

spracovaním drahých kovov [4]. Johnson Matthey ďalej pokračoval vo výskume protinádorových platinových liečiv a v spolupráci s firmou Bristol-Myers vyvinuli analóg cisplatinovej prvej generácie - karboplatinu (Paraplatin, JM8) [5]. Úspech karboplatinovej spočíval v znížení toxicity na zdravé bunky a teda potlačení vedľajších účinkov [6]. Jej používanie však sprevádzala krížová rezistencia s cisplatinou. Karboplatina je v súčasnosti podávaná pri liečbe rakoviny vaječníkov ale tiež nádorov hlavy, krku, mozgu, kŕčku maternice, semenníkov, prs, pľúc a močových ciest. Výsledky klinických skúšok poukázali na rovnakú mieru prežitia pacientov pri liečbe rakoviny vaječníkov pomocou karboplatinovej než v prípade cisplatinovej a vo väčšine krajín je karboplatina základnou zložkou terapie týchto typov nádorov [7].

Oxaliplatin (Eloxatin, 1-OHP) je analóg cisplatinovej druhej generácie [8] a zároveň posledné platinové cytostatikum, ktoré získalo schválenie pre používanie v klinickej praxi na celom svete [9]. Spolu s 5-fluorouracilom je súčasťou kombinovanej terapie pri liečbe rakoviny hrubého čreva a konečníka [1]. Liečba oxaliplatinou nevykazuje krížovú rezistenciu s cisplatinou ani karboplatinou, je ale spojená s vedľajšími účinkami ako periférna zmyslová neuropatia či potlačenie krvotvorby [10].

1.1.1 Mechanizmus pôsobenia konvenčných platinových cytostatik

Mechanizmus, ktorým klasické platinové liečiva vykazujú svoj protinádorový účinok je predmetom skúmania už celé desaťročia. Množstvo experimentov bolo zameraných na štúdium látok štrukturálne podobných cisplatinovej ($cis\text{-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$), a teda neutrálnych komplexov štvorcovo-planárnej štruktúry s dvomi amínovými a dvomi aniónovými skupinami v *cis* konformácii. Amínové skupiny cisplatinovej sú často nazývané aj ako “neodstupujúce ligandy“, pretože zostávajú naviazané k centrálnemu atómu platiny počas celého procesu vnútrobunecných transformácií. Naopak, chloridové “odstupujúce ligandy“ opúšťajú koordinačnú sféru komplexu a umožňujú jeho vnútrobunecnú aktiváciu. Všeobecný mechanizmus účinku cisplatinovej a jej štruktúrnych analógov zahŕňa štyri kľúčové kroky (*Obrázok 2*): (i) bunecnú akumuláciu, (ii) hydrolýzu/aktiváciu, (iii) DNA väzbu a (iv) odpoveď bunky na poškodenie DNA vedúcej k apoptóze - programovanej bunecnej smrti [11].



Obrázok 2. Schéma znázorňujúca akumuláciu cisplatiny do buniek, jej aktiváciu a väzbu k nukleárnej DNA. Spolu s pasívnou difúziou zohrávajú dôležitú úlohu v transporte cisplatiny cez bunecnú membránu aj aktívne transportéry medi (CTR1). Po preniknutí do cytoplazmy buniek môže dôjsť k inaktivácii cisplatiny glutatiómom (GSH) alebo inými síru obsahujúcimi biomolekulami. Med' transportujúci adenosín trifosfát (ATP7B) sa podieľa na exporte cisplatiny von z bunky. Iným transportným proteínom spojeným s rezistenciou voči cisplatine je multišpecifický prenášač organických aniónov (MRP2). Prevzaté z [12].

1.1.1.1 Bunečná akumulácia

Cisplatina je najčastejšie akumulovaná do buniek pomocou dvoch transportných mechanizmov a to pasívnou difúziou cez plazmatickú membránu alebo aktívnym transportom prostredníctvom membránových proteínov [13]. Malá veľkosť molekuly cisplatiny a jej planárna geometria boli dlho považované za charakteristiky podporujúce pasívny transport do buniek. Konzistentne s touto teóriou bolo zistené, že množstvo cisplatiny naakumulovanej v bunkách je priamo úmerné aplikovanej dávke [14, 15]. Okrem toho štruktúrne analógy cisplatiny neinhibujú jej bunečnú akumuláciu [16], čo ďalej podporuje túto teóriu. Na druhej strane existujú štúdie, podľa ktorých je aktívny transport hlavným mechanizmom zodpovedným za prenos cisplatiny do vnútra buniek.

Napríklad, akumulácia cisplatiny je spojená s mierou expície bunčných transportérov medi (CTR1) [13, 17]. Podobne, účinnosť oxaliplatiny je spojená s expíciou transportérov organických katiónov (OCTs) [18]. Taktiež určité látky reagujúce s membránovými proteínmi ako ouabaín alebo amphotericín B môžu inhibovať bunčnú akumuláciu cisplatiny [13]. Kombinácia aktívneho a pasívneho transportu najlepšie vysvetľuje doterajšie výsledky výskumu, ale dôležitosť jednotlivých mechanizmov a ich vzájomné ovplyvňovanie zostávajú nevysvetlené.

V klinickej praxi je cisplatiná podávaná pacientom intravenózne vo fyziologickom roztoku a okamžite reaguje s plazmatickými proteínmi. Väzba na proteíny je výsledkom vysokej reaktivity platiny s aminokyselinami obsahujúcimi síru, napríklad cisteínom. Takmer 90% cisplatiny v krvi je viazaných k albumínu a ostatným plazmatickým proteínom, čo vedie k inaktivácii značného množstva cytostatika [19]. Zvyšná časť cisplatiny putuje prevažne do buniek, kde dochádza k jej transformácii. Substitúcia chloridových ligandov molekulami vody je proces nevyhnutný pre aktiváciu cisplatiny a jej väzbu k bunčnej DNA. V mimobunčnom prostredí je koncentrácia chloridových aniónov približne 100 mM a substitúcia ligandov výrazne potlačená. V cytoplazme buniek koncentrácia chloridových aniónov kolíše v rozmedzí 2-30 mM a uľahčuje tak proces aktivácie cisplatiny. Výsledkom je formácia katiónov $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$ a $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, ktoré sú vysoko reaktívne voči nukleofilným centráam negatívne nabitej DNA [20, 21]. Karboplatina a oxaliplatiná sa vyznačujú nižšou reaktivitou v porovnaní s cisplatinou a ich roztoky sú značne stabilnejšie [22].

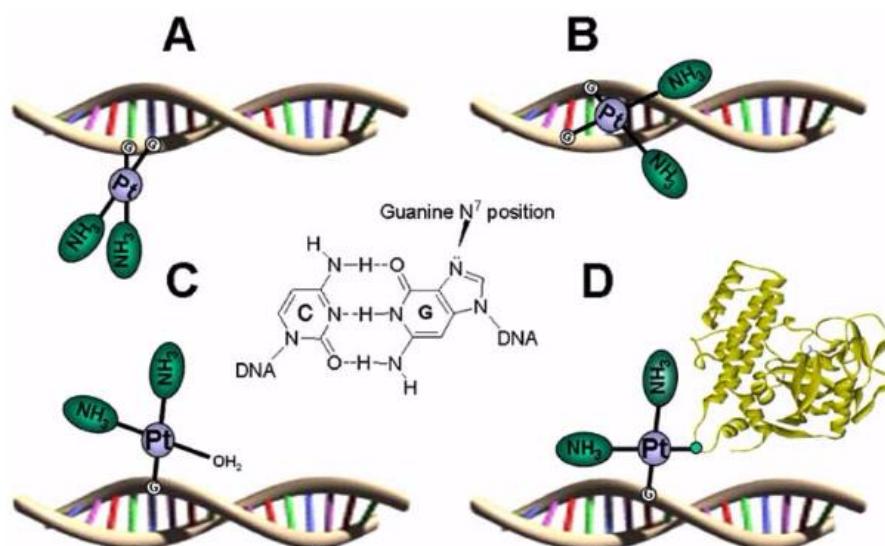
1.1.1.2 Väzba mimo nukleárnu DNA

Množstvo bunčných komponentov ako cytoskelet, proteíny či RNA obsahuje nukleofilné centrá, ktoré môžu reagovať s cisplatinou a spôsobiť jej inaktiváciu [23]. Zaujímavosťou je, že iba 5-10% z celkového množstva kovalentne viazanej cisplatiny v bunkách je obsiahnutých v nukleárnej DNA [24]. Najvýznamnejším väzobným miestom cisplatiny mimo DNA je pravdepodobne tripeptid glutatión (GSH) prítomný v bunkách v relatívne vysokých koncentráciách (0.5-10 mM). Väzba ku GSH a ostatným síru obsahujúcim biomolekulám je spojovaná s negatívnymi farmakologickými účinkami cisplatiny, ako sú vznik rezistencie a systémová toxicita [25]. Na druhej strane cisplatiná ovplyvňuje aktivitu dôležitých enzýmov, receptorov a iných proteínov skrz koordináciu k nukleofilným centráam a posilňuje tak svoj protinádorový účinok. Napríklad, väzba

cisplatiny k aminokyselinám metionín 1 (met1) alebo histidín 68 (his68), regulačného proteínu ubiquitin, inhibuje selektívnu degradáciu bunčných proteínov a môže viesť k programovanej bunčnej smrti [26].

1.1.1.3 Väzba na DNA

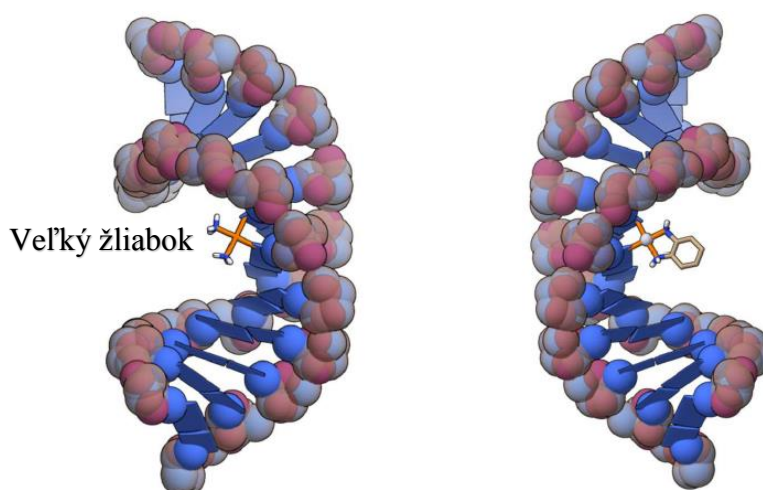
Experimentálne dáta nazbierané za posledných 40 rokov naznačujú, že nukleárna DNA je hlavným bunčným cieľom protinádorového pôsobenia konvenčných platinových cytostatik [20]. Atómy dusíku N7 guaninových a adeninových bázi lokalizovaných vo veľkom žliabku dvojzávitnicovej špirály sú najviac prístupnými a reaktívnymi nukleofilnými miestami pre koordináciu platiny v molekule DNA. *Obrázok 3* znázorňuje štrukturálne odlišné adukty formované cisplatinou na DNA. Kinetika väzby cisplatiny k DNA začína formáciou monofunkčných *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)]:DNA aduktov. Väčšina platinových centier ďalej reaguje za tvorby bifunkčných aduktov *cis*-[Pt(NH₃)₂]:DNA, známych ako vnútroreťazcové alebo medzireťazcové mostíky, ktoré potom blokujú DNA replikáciu a bránia transkripcii [27]. Asi 65% aduktov formovaných cisplatinou tvoria 1,2-d(GpG) vnútroreťazcové mostíky a zhruba 25% tvoria 1,2-d(ApG) vnútroreťazcové mostíky. Minoritne zastúpené 1,3-d(GpTpG) vnútroreťazcové mostíky (asi 10%) indukujú asymetrické usporiadanie DNA v nukleozóme a môžu hrať významnú úlohu v mechanizme protinádorového pôsobenia cisplatiny [28]. Cisplatina je schopná v menšej miere tvoriť tiež GG medzireťazcové mostíky a mostíky medzi DNA a proteínmi [25, 29, 30]. Podobné adukty tvorí karboplatina aj oxaliplatina, ale ich relatívne zastúpenie sa líši [31, 32].



Obrázok 3. Možné adukty formované medzi cisplatinou a DNA. 1,2-vnútroreťazcový mostík (A), medzireťazcový mostík (B), monofunkčný adukt (C), mostík medzi proteínom a DNA (D). Hlavné miesto väzby cisplatinu k DNA (guaninový dusík N7) je znázornené v strede obrázka. Prevzaté z [12].

Na druhej strane, *trans* izomér cisplatinu - transplatina (*trans*-[PtCl₂(NH₃)₂]) (Obrázok 1) nevykazuje protinádorové účinky aj napriek schopnosti tvoriť adukty s DNA [33]. Absencia farmakologickej aktivity transplatiny je pravdepodobne spojená s odlišným priestorovým usporiadaním ligandov okolo platinového centra a formovaním odlišných typov DNA aduktov v porovnaní s cisplatinou. Transplatina tvorí prevažne 1,3-vnútroreťazcové a medzireťazcové mostíky, pričom neformuje 1,2-vnútroreťazcové mostíky medzi dvomi priľahlými purínovými bázami [34]. Predpokladá sa, že práve 1,2-vnútroreťazcové mostíky spôsobujú ohyb DNA smerom k veľkému žliabku (Obrázok 4) a sú zodpovedné za protinádorovú aktivitu konvenčných platinových cytostatik. Bunky s takto poškodenou DNA zostávajú uväznené v G2/M fáze bunecného cyklu a spúšťajú opravné mechanizmy [35]. Adukty cisplatinu sú najefektívnejšie opravované pomocou systému NER (*nucleotide excision repair*) a jeho zvýšená aktivita môže viesť k rezistencii voči platinovým cytostatikám [36, 37]. Aby bol opravný systém DNA účinný, musí mať prístup k poškodenému miestu. Niektoré proteíny môžu zabrániť opravnému mechanizmu väzbou na toto poškodené miesto. Takými sú napríklad HMG (*high mobility group*) proteíny, ktoré špecificky rozpoznávajú úseky DNA pripomínajúce platinové adukty [38]. HMGB proteíny patria medzi najviac zastúpené proteíny v bunecnom jadre [39] a vykazujú čiastočnú afinitu k 1,2-d(GpG) vnútroreťazcovým

mostíkom [40]. Schopnosť HMGB proteínov zabrániť oprave platinových aduktov na DNA môže prispievať k zvýšenej senzitivite nádorových buniek voči platinovej chemoterapii [41]. Pokiaľ bunka nie je schopná opraviť poškodenie DNA, dochádza k expresii pro-apoptotických proteínov, uvoľneniu cytochrómu c a aktivácii vnútrobunecných kaspáz [35]. Kaspázy sú proteázy s cysteínom v aktívnom mieste, ktoré efektívne degradujú bunku v procese apoptózy. Jedným z hlavných mechanizmov, ktorými bunka spúšťa proces apoptózy vyvolaný platinovými DNA aduktami, je inhibícia génovej transkripcie [42].



Obrázok 4. Príklady 1,2-vnútroreťazcových DNA aduktov formovaných cisplatinou (vľavo) a oxaliplatinou (vpravo). Prevzaté z [43] a upravené.

1.1.2 Rezistencia nádorov voči konvenčným platinovým cytostatikám

Po uvedení cisplatinu do klinickej praxe sa pozornosť okamžite presunula k otázkam, prečo niektoré typy nádorov získali rezistenciu voči tomuto liečivu počas terapie a prečo iné typy nádorov vykazovali vrodenu rezistenciu. Naopak, niektoré štúdie sa zamerali na otázku spojenú so zvýšenou senzitivitou nádorov semenníkov pri liečbe cisplatinou [44]. In vitro experimenty s ľudskými nádorovými bunkami ukázali, že rezistencia môže byť výsledkom dvoch mechanizmov: (i) nedostatočného množstva platiny naviazanej na cieľovú DNA alebo (ii) neschopnosti vyvolať bunecnú smrť po formovaní aduktov s DNA. Množstvo buniek rezistentných voči platinovým liečivám má pozmenený fenotyp zahrnujúci akumuláciu liečiva, rozpoznanie DNA aduktov, ich opravu a apoptózu. Porozumenie molekulárnych princípov rezistencie voči konvenčným platinovým cytostatikám by mohlo viesť k novým stratégiám pri liečbe niektorých typov nádorov.

1.1.2.1 Znížená akumulácia

Bežným vysvetlením pre získanú rezistenciu nádorových buniek voči cisplatine a ostatným platinovým cytostatikám je ich znížená akumulácia v porovnaní s akumuláciou v rodičovských bunkách [45]. V bunkách rezistentných voči cisplatine boli preukázané poruchy endocytózy a lokalizácie niektorých povrchových proteínov [46]. Aktín a filamín, zložky cytoskeletu zahrnuté v procese endocytózy, boli identifikované ako proteíny schopné viazať platínu a znížená expresia alebo reorganizácia týchto proteínov bola pozorovaná v niektorých rezistentných bunkách [47]. Presné mechanizmy, ktorými poruchy cytoskeletu hrajú úlohu pri vzniku rezistencie voči platinovým cytostatikám zatiaľ zostávajú neznáme.

Nádorové bunky rezistentné k cisplatine často vykazujú krížovú rezistenciu k medi [48]. Dokaz, že transportér medi CTR1 sprostredkováva akumuláciu cisplatiny do buniek bol získaný z experimentov s ľudskými nádorovými bunkami vaječníkov [49]. Avšak, zvýšenie akumulácie medi a cisplatiny v ľudských nádorových bunkách vaječníkov transfekovaných CTR1 vektorom, v porovnaní s bunkami transfekovanými prázdny vektorom, nebolo sprevádzané nárastom formovania platinových aduktov na DNA. Navyše nebolo jasné, či znížená akumulácia cisplatiny v rezistentných bunkách bola spôsobená zníženou expresiou transportéru CTR1 alebo jeho narušenou funkciou. Je preto možné, že variácie v expresii CTR1 v ľudských nádorových bunkách majú do určitej miery za následok heterogenitu v senzitivite týchto buniek voči cisplatine.

Dva exportéri medi, ATP7A a ATP7B, boli tiež navrhnuté ako súčasť mechanizmu platinovej rezistencie [50]. Úlohou ATP7A môže byť izolácia platinových látok vo vnútrobuněčných priestoroch a zabránenie ich väzby na DNA. ATP7A je nadmerne exprimovaný v niektorých nádorových bunkách vaječníkov rezistentných k cisplatine. Navyše pacienti trpiaci rakovinou vaječníkov s expresiou ATP7A majú menšiu pravdepodobnosť vyliečenia ako pacienti, u ktorých táto expresia nebola detegovaná [51]. Bunky rakoviny vaječníkov s expresiou ATP7B a získanou rezistenciou voči cisplatine akumulujú iba 60% množstva platiny naakumulovanej v kontrolných bunkách bez ATP7B expresie [52]. Transportné proteíny MRP hrajú tiež úlohu pri aktívnom exporte platinových cytostatik, preto ich regulácia môžu mať vplyv na vznik rezistencie [53]. Skupina génov regulujúcich MRP je zložená najmenej zo siedmich členov (MRP1-7), ale nedávny výskum poukázal na dôležitosť expresie MRP2 pri predpovedaní senzitivity nádorov k platinovej terapii [54, 55].

1.1.2.2 Vnútrobučná inaktivácia

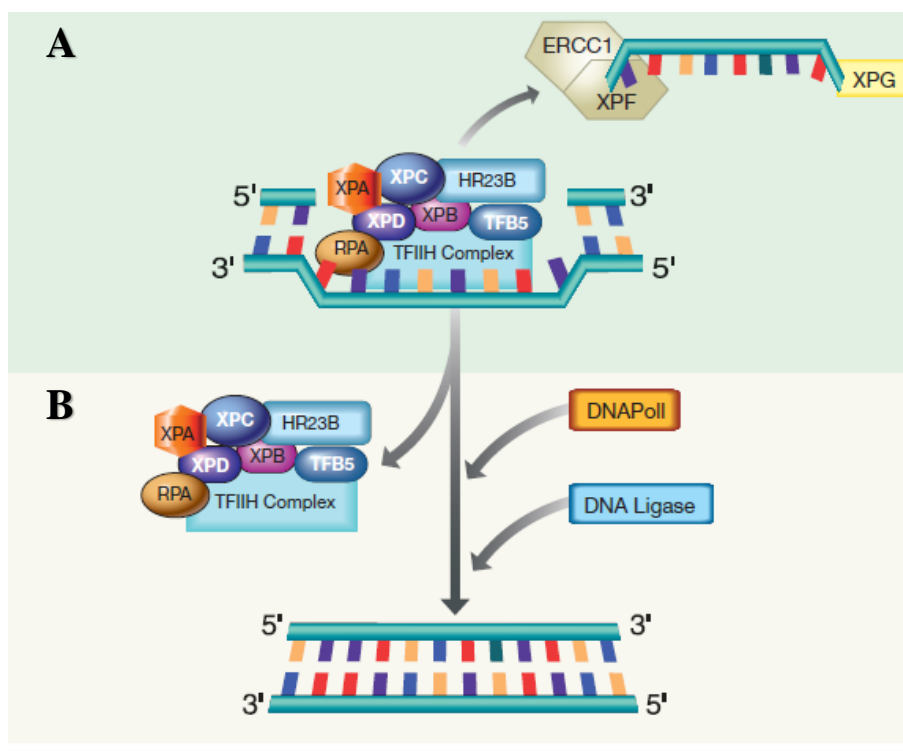
Glutatión (GSH), ktorý je najrozšírenejším vnútrobučným tiolom, prispieva spolu s metionínom, metalotioneínom a ostatnými proteínmi bohatými na cysteín k detoxikácii veľkého množstva bučných toxínov vrátane cisplatiny a jej analógov. Veľká časť cisplatiny naakumulovanej v cytoplazme je pomocou glutatión S-transferázy π (GST π) premenená na tiol-obsahujúce konjugáty, ktoré majú za následok inaktiváciu cisplatiny. Zvýšená expresia GST π spolu s γ -glutamylcysteín syntetázou (γ -GCS), enzýmom zodpovedným za syntézu GSH, sú spájané s platinovou rezistenciou u rakoviny vaječníkov, krčku maternice a pľúc [1, 56, 57]. Zníženie koncentrácie vnútrobučného glutatiónu by preto mohlo byť rozumnou stratégiou pri prekonávaní rezistencie voči konvenčným platinovým cytostatikám. Nový analóg glutatiónu, canfosfamid (TLK286), vstúpil do klinického testovania s cieľom podporiť liečbu nádorov vaječníkov. Canfosfamid postihuje nádory, ktoré nadmerne exprimujú GST π 1 a zvyšuje senzitivitu týchto nádorov voči jeho toxickým účinkom. V klinickej štúdii fázy II u 34 pacientov trpiacich nádormi vaječníkov rezistentným k liečbe platinovými cytostatikami a paklitaxelom, 15% pacientov pozitívne reagovalo na liečbu canfosfamidom a 50% pacientov vykazovalo stabilizovaný stav [58]. Klinické štúdie fázy III boli podniknuté za účelom preskúmať potenciálny účinok canfosfamidu a jeho kombinácie s karboplatinou alebo lipozomálnym doxorubicínom v rezistentných nádoroch vaječníkov [59, 60, 61]. Nanešťastie žiadna z týchto štúdií nepreukázala mimoriadne zlepšenie účinku liečby canfosamidom v porovnaní so štandardnou terapiou.

1.1.2.3 Zmeny v oprave DNA

Protinádorový účinok cisplatiny je pripísaný schopnosti tvoriť adukty s nukleárnou DNA a indukovať tak jej poškodenie. Bilancia medzi poškodením a opravou DNA určuje smrť nádorových buniek alebo ich prežitie. V závislosti na type poškodenia vstupujú do opravného procesu rôzne mechanizmy, ktoré odstraňujú platinové adukty a obnovujú štruktúru DNA [62]. Hlavnými mechanizmami pri oprave DNA sú nukleotidová excízna oprava (*nucleotide excision repair*, NER), oprava chybné spárovaných báz (*mismatch repair*, MMR), homologická rekombinácia (*homologous recombination repair*, HR), bázová excízna oprava (*base excision repair*, BER) a translézna syntéza (*translesion synthesis*, TLS). Prevaha jedného mechanizmu nad ostatnými sa môže líšiť medzi jednotlivými typmi nádorov.

Zvýšená oprava systémom NER

NER je primárny mechanizmus zodpovedný za opravu platinových aduktov na bunečnej DNA. Pri tomto mechanizme niekoľko proteínov spoločne interaguje za účelom rozpoznania a opravy poškodeného miesta v molekule DNA (Obrázok 5). Jedným z takýchto proteínov je ERCC1 (*excision repair cross-complementation group 1*), ktorý spolu s XPF (*Xeroderma Pigmentosum-F protein*) tvoria enzymatický komplex. ERCC1-XPF štiepi DNA vlákno pred tým, ako DNA polymerázy a ligázy znovu obnovia integritu dvojvlákna. Štúdie s nádorovými bunkami vaječníkov ukázali, že zvýšená expresia ERCC1 mRNA je spojená so schopnosťou buniek efektívnejšie opravovať DNA poškodenie spôsobené aduktami cisplatinu a tým prispievať k rezistencii [63]. Ďalšie experimenty poukázali na zvýšenú senzitivitu nádorových buniek voči cisplatinu po transfekcii vektorom umlčujúcim expresiu ERCC1 [64]. Úloha ERCC1, ako potencionálneho ukazovateľa miery platinovej rezistencie v nádoroch vaječníkov, je študovaná s čoraz väčším záujmom, ale žiaden definitívny zaver týkajúci sa prognózy pre pacientov trpiacich touto formou rakoviny doteraz nebol stanovený [65].

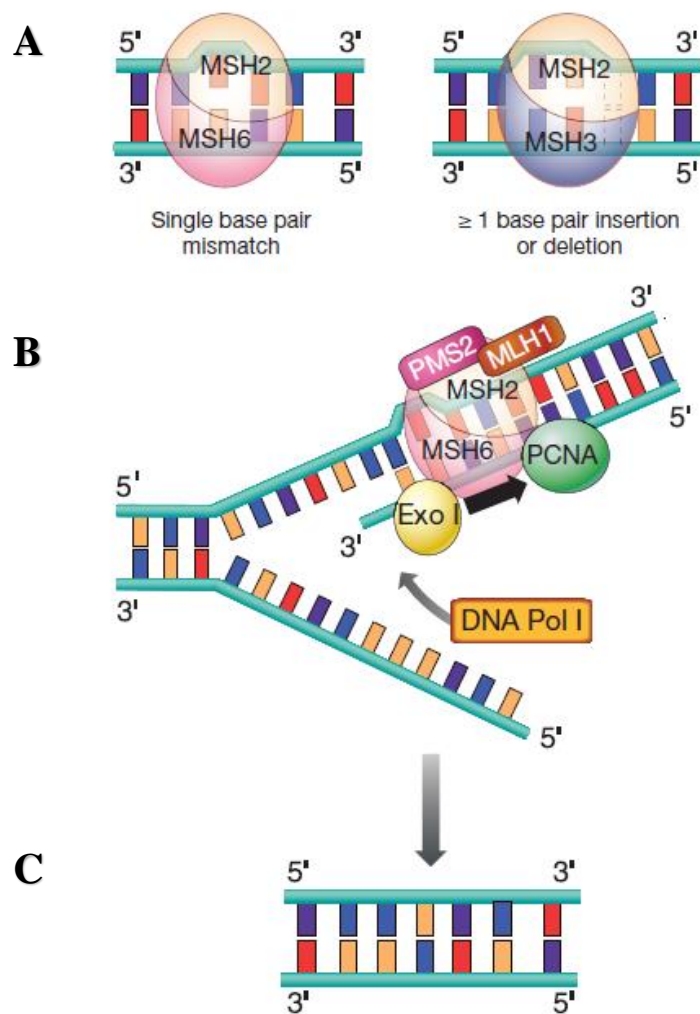


Obrázok 5. Nukleotidová excízna oprava. Výrez poškodeného úseku DNA vlákna (A) a syntéza nového vlákna pomocou DNA polymerázy a ligázy (B). Prevzaté z [66] a upravené.

Poruchy funkcie MMR

MMR systém je špecifický DNA opravný mechanizmus zahrnutý v post-replikačnej oprave chýb vytvorených DNA polymerázami, s cieľom odstrániť nesprávne sparovanie báz. Strata funkcie bunecného MMR môže čiastočne prispieť k vzniku tolerancie voči poškodeniam DNA. MMR skenuje novo syntetizovanú DNA a odstraňuje chyby spôsobené nesprávnou inkorporáciou nukleotidov. Opravný proces poostáva z troch krokov: (i) rozpoznanie, (ii) excízia a (iii) oprava poškodeného miesta, ktorých sa účastní viacero proteínov ako MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 či PMS2 (*Obrázok 6*). Inaktivácia MMR vedie k výskytu neopravených repetícií rôznych dĺžok. Tento jav je známy aj ako mikrosatelitná nestabilita (MSI) a je dôsledkom genetických alebo epigenetických zmien. Ľudské nádory s nefunkčným MMR majú zvýšenú toleranciu voči cytostatikám a teda strata funkcie MMR môže byť jednou z príčin platinovej rezistencie [67]. Väčšina týchto nádorov obsahuje práve mutácie v génoch kódujúcich proteín MLH1 alebo MSH2. Štúdium vzoriek nádorov vaječníkov odobratých 54 pacientom pred a po terapii platinovými liečivami odhalilo spojenie medzi expresiou proteínu MLH1 alebo MSH2 a klinickými parametrami prognostického významu, ako aj celkovou odpoveďou na liečbu či mierou prežitia [68]. Niekoľko štúdií poukázalo na priamu väzbu medzi inaktivitou MMR a rezistenciou voči platinovým cytostatikám, väčšinou spôsobenú dereguláciou alebo mutáciami v génoch pre MLH1, MSH2 a MSH1 [69, 70, 71].

Hypermetylácia MLH1 promótoru bola tiež identifikovaná ako jeden z príznakov poruchy funkcie MMR v niektorých typoch nádorov. Odhaduje sa, že asi 10% nádorov vaječníkov je spojených práve s touto epigenetickou zmenou [72]. Rezistencia takýchto nádorov môže byť prekonaná použitím DNA demetylačných látok ako je 2'-deoxy-5-azacytidín (decitabín, Dacogen®) v kombinácii s cisplatinou alebo karboplatinou [73]. Klinická skúška fázy II testovala kombináciu karboplatiny a decitabínu v rekurentných nádoroch vaječníkov rezistentných voči platinovým cytostatikám, pričom ukázala sľubné výsledky [74].



Obrázok 6. Schéma mechanizmu opravy chybne spárovaných báz. Rozpoznanie DNA poškodenia (A), výrez poškodeného úseku DNA vlákna a syntéza nového vlákna (B), opravená DNA (C). Proteíny zúčastnené v oprave: MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS2. Exo1 (exonukleáza), DNA Pol (DNA polymeráza), PCNA (nukleárny antigén proliferujúcich buniek). Prevzaté z [66] a upravené.

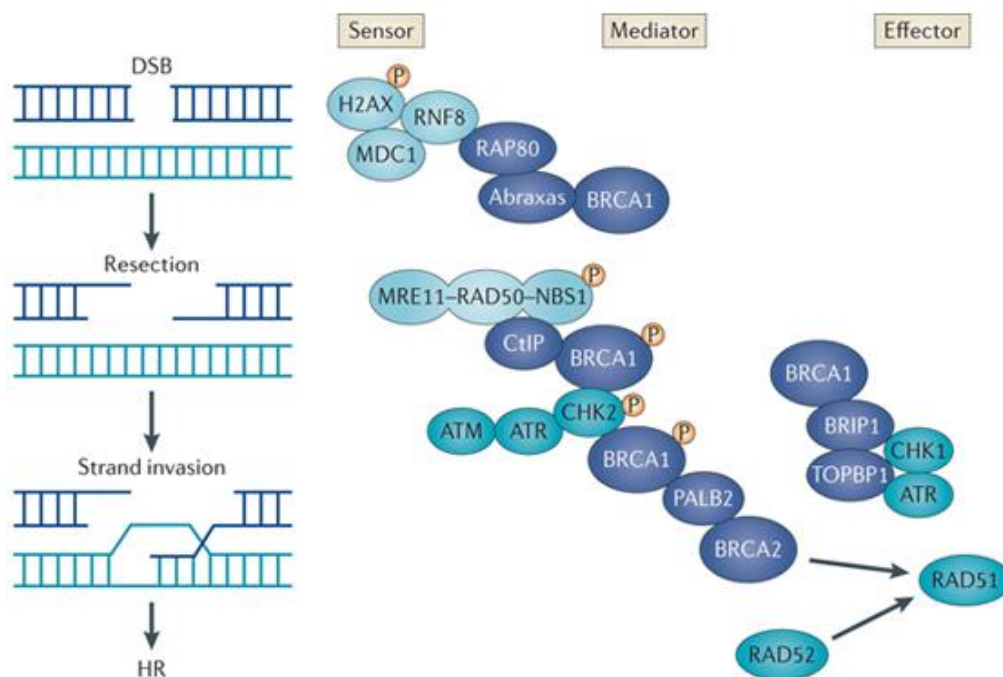
Homologická rekombinácia, úloha BRCA1/2 a bázová excízna oprava

Platinové cytostatiká tvoria na DNA okrem iného aj medzireťazcové mostíky, ktoré počas procesu replikácie spôsobujú zlomy oboch vlákien (*double-strand breaks*, DSB). DSB patria medzi najviac toxické poruchy, pretože postihujú obe vlákna DNA a teda žiadne komplementárne vlákno bez poškodenia nie je dostupné ako predloha pre jej opravu. Pokiaľ takéto poškodenia DNA nie sú účinne opravené, bunka podlieha apoptóze. Hlavným mechanizmom pre opravu DSB v bunkách je homologická rekombinácia (HR). HR systém využíva neporušený sesterský chromatid ako predlohu

pre opravu DSB bez straty informácie o správnej sekvencii, obvykle v G2 a S fáze bunecného cyklu [75].

Proteín BRCA1 (*breast cancer 1*) je súčasťou množstva bunecných mechanizmov, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri odpovedi na poškodenie DNA, regulácii bunecného cyklu a opravy DSB. Hlavnými zložkami týchto opravných mechanizmov sú proteíny ako BRCA2, RAD51 či PALB2 (Obrázok 7). Práve interakcia medzi špecifickými doménami BRCA1 a PALB2 hrá kľúčovú úlohu pri oprave DSB. Mutácie BRCA1 domén môžu potenciálne narušiť ich väzobnú interakciu a spôsobiť nesprávnu funkciu homologickej rekombinácie. Strata špecifickej funkcie BRCA1 v oprave DSB vplyvom mutácii bola zistená v niektorých formách nádorov. Primárnou funkciou BRCA2 je HR oprava, založená na schopnosti viazať sa k proteínu RAD51 a sprostredkovať tak rozpoznanie poškodeného úseku DNA. BRCA2 deficitné bunky sú charakteristické genómovou nestabilitou. Napriek tomu, že iba 5-10% nádorov vaječníkov je dedičného pôvodu, viac ako 90% týchto prípadov nesie mutácie v génoch pre BRCA1 alebo BRCA2. Nádory s mutáciou BRCA1/2 sa zvyčajne objavujú u mladých ľudí a vyznačujú sa lepšou prognózou [76, 77, 78]. Vykazujú zvýšenú senzitivitu voči platinovým liečivám, avšak pravdepodobnosť vzniku rezistencie u nich nie je výrazne znížená [79, 80]. Možným vysvetlením vzniku rezistencie by mohla byť produkcia sekundárnych mutácii BRCA1/2 s obnovenou funkciou homologickej rekombinácie [81, 82]. Táto teória ale nevysvetľuje všetky prípady platinovej rezistencie v BRCA deficitných bunkách.

Inhibítory poly-(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) predstavujú inovatívnu stratégiu pri liečbe nádorov vaječníkov a pŕs s mutáciami v BRCA génoch. Princíp terapie spočíva v inhibícii bázovej excíznej opravy (BER) a zabránení opravy jednovláknových zlomov DNA (*single-strand breaks*, SSB) vyvolaných chemoterapiou. Protinádorový účinok PARP inhibítorov je zosilnený v bunkách, ktorým chýba jeden z mechanizmov DNA opravy. V absencii opravného systému HR vyvoláva inhibícia PARP až 1000-krát vyššiu senzitivitu BRCA1/2 deficitných buniek voči poškodeniam DNA [83, 84]. Medzi najznámejšie PARP inhibítory študované v ľudských nádoroch patria olaparib a veliparib [85, 86].



Obrázok 7. Molekulárny mechanizmus opravy DNA pomocou homologickej rekombinácie. Senzorické molekuly (svetlo modré) detegujú poškodenie DNA vyvolané dvojláknovými zlomami (DSB). Signálne mediátory aktivujú efektorové molekuly s cieľom opraviť dané poškodenie. Komplexy obsahujúce BRCA1 (tmavo modré) sú kľúčovými mediátormi pri sprostredkovaní opravného mechanizmu. Prevzaté z [87]

1.1.3 Bunečná apoptóza

Apoptóza je konečná dráha mnohých foriem bunečnej smrti vyvolanej platinovými chemoterapeutikami. Molekuly indukujúce apoptózu zvyšujú senzitivitu nádorových buniek k látkam, ktoré vyvolávajú poškodenie DNA. Naopak, poruchy apoptotických signálnych dráh znižujú senzitivitu voči účinkom chemoterapie a môžu preto predstavovať dôležitý mechanizmus pre vznik chemorezistencie [88]. Miera odpovedi bunky na jej poškodenie tak závisí na bilancii medzi úrovňou proteínov, ktoré indukujú proces apoptózy a proteínmi, ktoré ho potláčajú.

Úloha proteínu p53

Stabilizácia a aktivácia nádorového supresora p53 sú kľúčovými krokmi bunečnej apoptózy vyvolanej cisplatinou a ostatnými platinovými cytostatikami. Proteín p53 je v bunkách kódovaný génom TP53. Bunky s poruchou funkcie p53 strácajú schopnosť aktivácie bunečnej smrti a získavajú toleranciu voči poškodeniam DNA vedúcu

k platinovej rezistencii [89, 90]. Hlavným faktorom zodpovedným za stratu apoptotickej funkcie proteínu p53 sú mutácie TP53 prítomné zhruba v polovici všetkých foriem rakoviny [91, 92]. Najcitlivejšie voči platinovým cytostatikám sú práve nádory pohlavných orgánov s nepozmeneným TP53, menej citlivé sú nádory vaječníkov, hlavy, hrdla a metastatické nádory močového mechúra s približne 40-60% početnosťou TP53 mutácií [93, 94, 95]. Mutácie narušujú schopnosť p53 viazať sa na bunečnú DNA a aktivovať tak kaskádu procesov vedúcich k apoptóze. Existuje len málo pochybností o tom, že deregulácia apoptotického procesu v nádorových bunkách s mutáciami proteínu p53 je hlavným mechanizmom prispievajúcim k platinovej rezistencii [96, 97]. Mutovaný p53 zamedzuje zastaveniu bunečného cyklu vo fáze G1, v ktorej sú bunky najviac citlivé voči cisplatine, a teda rezistencia vyvolaná stratou funkcie p53 je čiastočne spojená s poruchami regulácie bunečného cyklu [98]. Signálne dráhy indukované cisplatinou a jej analógmi stabilizujú a aktivujú nádorový supresor p53 zmenou jeho fosforylačného a acetylačného stavu [99, 100]. Nie je však úplne jasné, či zmeny v týchto posttranslačných modifikáciách ovplyvňujú aj samotný mechanizmus platinovej rezistencie.

Funkcia mitochondrií

Mitochondrie zabezpečujú energetické potreby bunky a ich nesprávna funkcia má za následok vznik rôznych porúch vrátane rakoviny. Mitochondrie sú zdrojom dôležitých apoptotických mediátorov a stali sa tak potenciálnym cieľom pri výskume protinádorových liečiv. Množstvo látok je schopných pozmeniť funkciu mitochondrií a selektívne stimulovať apoptotické dráhy v nádorových bunkách [101]. Na druhej strane, zmeny v mitochondriálnej funkcii nádorových buniek môžu prispieť k rezistencii voči konvenčným chemoterapeutikám [102]. Existuje iba málo informácií o tom, ako platinové cytostatiká pôsobia na mitochondrie v nádorových bunkách. Za pozornosť stojí napríklad vzťah medzi mitochondriálnou hustotou a senzitivitou buniek k cisplatine [103]. Štúdium niektorých platinových komplexov v rezistentných nádorových bunkách odhadilo protinádorové účinky spojené s mitochondriálnou depolarizáciou a následným uvoľnením apoptotických proteínov [104].

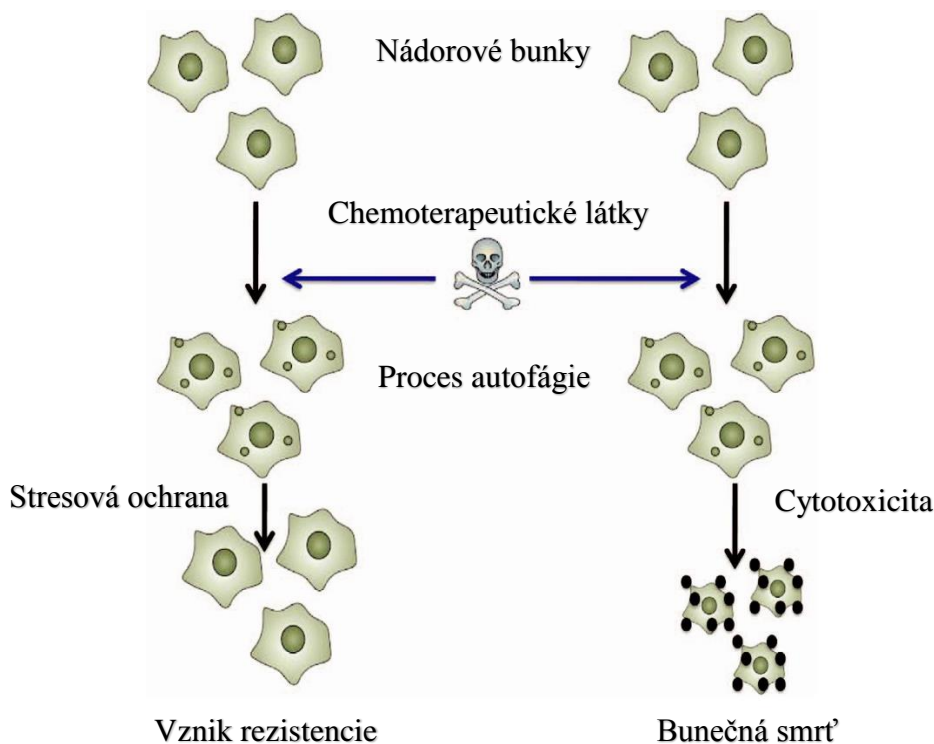
Úloha autofágie

Autofágia je katabolický proces, ktorým sú nepotrebné alebo nefunkčné cytoplazmatické zložky zabalené do dvojmembránových váčkov (autofagozómov)

a degradované pomocou lyzozomálnych enzýmov. Autofágia je nevyhnutná nielen pre prežitie buniek a organizmu v stresových podmienkach, ale účastní sa aj bunecnej smrti vyvolanej chemoterapeutickými látkami (Obrázok 8).

Molekulárna podstata regulácie autofágie nie je dodnes úplne jasná. Predpokladá sa, že tento mechanizmus zahŕňa množstvo regulačných molekúl ako napríklad proteín kinázu mTOR (*mammalian target of rapamycin*), 5-AMP-aktivovanú proteín kinázu alebo eukaryotický iniciačný faktor 2a (eIF2a). Cieľom mTOR je inhibícia autofágie v prítomnosti rastových faktorov a dostatočného prísunu živín, zatiaľ čo 5-AMP-aktivovaná proteín kináza a eIF2a riadia autofágiu pri odpovedi na nutričný a energetický nedostatok [105]. Okrem toho je autofágia sprostredkovaná množstvom príbuzných génov (Atg), ktoré sa zúčastňujú formácie autofagozómov a lyzozomálnej degradácie [106].

Výsledky nedávnych štúdií naznačujú, že rezistencia nádorových buniek voči chemoterapeutickým látkam vrátane cisplatinu určitým spôsobom súvisí s autofágiou [107, 108]. Akútna liečba cisplatinou pravdepodobne aktivuje proces autofágie, ktorý pôsobí ako ochrana voči bunecnej apoptóze a zvyšuje šance na vznik platinovej rezistencie [109, 110]. Predpokladá sa, že autofágia hrá dôležitú úlohu pri vzniku získanej formy rezistencie v nádorových bunkách pľúc [111, 112]. Inhibícia autofágie alebo umlčanie Atg5 génu v nádorových bunkách vaječníkov zvyšuje ich citlivosť k apoptóze indukovanej cisplatinou [113]. Na druhej strane niektoré platinové komplexy vykazujú zvýšenú protinádorovú aktivitu spojenú s indukciou autofágie, a to nezávisle na procesoch súvisiacich s bunecnou apoptózou [114]. Úloha autofágie pri protinádorovej terapii platinovými liečivami je preto kontroverzná a vyžaduje podrobnejšie štúdie.



Obrázok 8. Duálna úloha procesu autofágie pri chemoterapii v nádorových bunkách. Na jednej strane je autofágia aktivovaná ako ochranný mechanizmus buniek a môže viesť k vzniku rezistencie voči chemoterapeutickým látkam. Na druhej strane autofágia indukuje bunečnú smrť a je potenciálnym cieľom protinádorovej terapie. Prevzaté z [115] a upravené.

Epigenetické zmeny

Modifikácie histónov a metylácia DNA sú epigenetické javy, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri bunečných procesoch súvisiacich s rakovinou. Jednou z takýchto modifikácií je metylácia lyzínu (K) na špecifickej pozícii histónov H3 a H4. Metylácia H3-K9 v nádorových bunkách je spojená s metyláciou DNA a poruchami umlčovania génov pre nádorové supresory [116].

Posttranslačné modifikácie histónov ovplyvňujú štruktúru chromatínu a uľahčujú väzbu nukleárných faktorov, ktoré sprostredkovávajú opravné procesy DNA a transkripciu. Štúdium účinkov cisplatiny na posttranslačné modifikácie histónov v nádorových bunkách odhalilo špecifickú fosforyláciu histónu H3 na aminokyseline Ser-10 prostredníctvom proteín kinázy p38 a taktiež hyperacetyláciu histónu H4. Tieto zistenia naznačujú spojenie medzi účinkami cisplatiny a štrukturálnymi zmenami chromozómov, ktoré by mohli byť jedným z protinádorových mechanizmov [117].

Inhibítory enzýmov histón deacetyláz (HDAC) patria medzi protinádorovo účinné

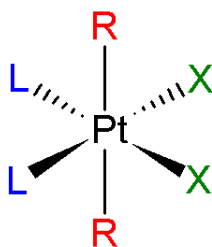
latky, ktoré spôsobujú napríklad zvýšenú expresiu génov riadiacich bunecný cyklus. Niektoré HDAC inhibítory dokážu pôsobiť synergicky s cisplatinou a zmierniť jej vedľajšie účinky. Kombinácia platinových liečiv s inhibítormi histón deacetyláz preto predstavuje potenciálny pokrok pri liečbe nádorov [118, 119].

TRAIL ako súčasť vonkajšej apoptotickej dráhy

Apoptózu indukujúci ligand TRAIL (Apo2L) patrí do skupiny cytokínov, známych aj ako faktory nádorovej nekrózy (TNF), ktoré sa podieľajú na vzniku bunecnej smrti. TRAIL je bežne exprimovaný v bunkách imunitného systému a hrá kľúčovú úlohu pri protinádorovej ochrane. TRAIL interaguje s receptormi smrti DR4 a DR5, čím dochádza k aktivácii bunecných kaspáz a indukcii apoptózy v nádorových bunkách [120, 121]. Tento objav prispel k rozvoju protinádorových liečiv so selektívnou aktiváciou dráh, ktorých sa účastní TRAIL. Takýmito látkami je napríklad ľudský rekombinantný TRAIL alebo monoklonálne protilátky proti DR4 či DR5 [122]. Niektoré štúdie poukázali na zvýšenú citlivosť rezistentných nádorových buniek k týmto látkam, a predstavujú tak potenciálny pokrok pri liečbe niektorých typov nádorov [123].

1.2 Význam platičitých komplexov

Protinádorová aktivita platičitých - Pt(IV) komplexov je známa už od dôb objavenia biologických účinkov cisplatiny [124], ale ich klinický význam sa stal predmetom štúdia len nedávno. Fyzikálno-chemické vlastnosti platičitých komplexov sa výrazne odlišujú od vlastností platnatých - Pt(II) komplexov. Platičité komplexy majú na rozdiel od štvorcovo-planárnej štruktúry platnatých komplexov väčšinou šesťosú štruktúru s geometriou osemstenu (*Obrázok 9*). Kineticky inertnejšie Pt(IV) komplexy sú značne odolné voči substitúcii odstupujúcich ligandov, čím dochádza k minimalizácii postranných reakcií pred samotnou aktiváciou komplexov vo vnútri buniek. Dva axiálne ligandy navyše umožňujú cielene vylepšiť farmakologické vlastnosti komplexov, akými sú napríklad lipofilita, stabilita, nádorová selektivita, bunecná akumulácia či doplnková biologická aktivita. Redukcia Pt(IV) centier na Pt(II) prostredníctvom straty axiálnych ligandov je nevyhnutným predpokladom pre protinádorovú aktivitu platičitých komplexov. Redukčný potenciál Pt(IV) komplexu závisí na charaktere jeho ligandov, ako aj na prítomnosti biologických redukčných činidiel [2].



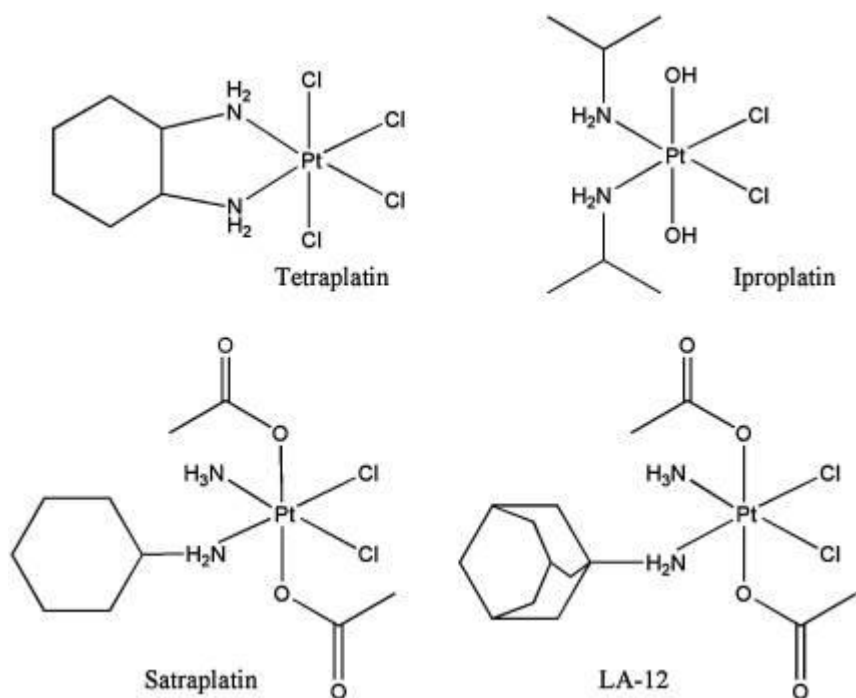
Obrázok 9. Schematická reprezentácia Pt(IV) komplexu s odstupujúcimi ekvatoriálnymi ligandami (X), neodstupujúcimi ekvatoriálnymi ligandami (L) a axiálnymi ligandami (R). Nakreslené v programe *ACD/ChemSketch* podľa [125].

1.2.1 Pt(IV) komplexy s mechanizmom podobným klasickým platinovým cytostatikám

Ormaplatina, tiež známa aj ako tetraplatina alebo tetrachlóro(*trans*-1,2-diaminocyclohexán)platina(IV) (Obrázok 10), bola jednou z prvých Pt(IV) komplexov, ktoré vstúpili do klinických skúšok. V prostredí bunecného rastového média ormaplatina rýchlo podlieha redukcii na dichlóro(*trans*-1,2-diaminocyclohexán)platinu(II) [126]. Tento aktívny Pt(II) komplex je podobný oxaliplatine, ale obsahuje R,R aj S,S izoméry. Ormaplatina vykazuje *in vitro* a *in vivo* aktivitu v niektorých nádoroch rezistentných voči cisplatine, čím sa stala potencionálnym kandidátom pre klinické testovanie [127, 128, 129]. Výsledkom fázy I klinických skúšok bolo zistenie vážnych vedľajších účinkov, najmä neurotoxicity, spôsobených rýchlou redukciovou na aktívnu Pt(II) formu v dôsledku axiálnych chloridových ligandov [130, 131].

Ďalším Pt(IV) komplexom, ktorý vstúpil do klinického testovania je iproplatina, známa aj ako JM9, CHIP alebo *cis,trans,cis*-dichlórodihydroxobis(izopropylamín)-platina(IV) (Obrázok 10) [132]. Iproplatina je štruktúrne podobná ormaplatine tým, že obsahuje dva ekvatoriálne chloridové ligandy v *cis* usporiadaní. Mechanizmus účinku iproplatiny je spojený s redukciovou Pt(IV) centra na Pt(II) a kovalentnou väzbou k DNA [133]. V dôsledku hydroxidových axiálnych ligandov je iproplatina menej náchylná k redukcii a deaktivácii biologickými redukčnými činidlami, a vykazuje tak nižšiu systémovú toxicitu než ormaplatina. Ďalšou výhodou iproplatiny je jej vysoká rozpustnosť vo vode (44 mM), umožňujúca jednoduchšiu prípravu a podávanie. Iproplatina je jeden z najviac klinicky študovaných platinových komplexov, ktorý však svojou celkovou účinnosťou zatiaľ neprekonal protinádorové účinky cisplatiny ani karboplatiny [134].

Satraplatina, známa aj ako JM216 či *trans,cis,cis*-bis(acetato)aminocyklohexylamín-dichlóroplatina(IV) (*Obrázok 10*), sa stala vďaka svojej lipofilite a stabilite prvým platínovým komplexom vhodným pre orálne podávanie [135, 136]. V krvnom obehú satraplatina podlieha redukcii za vzniku šiestich odlišných Pt(II) foriem. Amino(cyklohexylamín)-dichlóroplatina(II) vzniká stratou dvoch acetátových axiálnych ligandov a je hlavným metabolitom satraplatiny, ktorý zároveň vykazuje najvyššiu protinádorovú aktivitu [137, 138]. Protinádorový účinok satraplatiny je rovnako ako u cisplatiny spojený s tvorbou DNA aduktov, ktoré vyvolávajú proces apoptózy. Schopnosť satraplatiny prekonať rezistenciu voči cisplatine pravdepodobne vyplýva z asymetrickej povahy DNA aduktov, ktoré nie sú rozpoznávané DNA opravnými mechanizmami [139, 140]. V predklinických štúdiách satraplatina vykazovala lepšiu toxickú profil ako cisplatina, pričom bola účinná aj v ľudských nádorových bunčných líniách rezistentných k cisplatine. Výsledkom *in vivo* štúdií v myších modeloch nádorov bola výrazne zlepšená aktivita satraplatiny v porovnaní s cisplatinou, karboplatinou a ormaplatinou [135]. Vo fáze I klinických štúdií orálne podávanej satraplatiny bol limitujúcim faktorom pokles počtu krvných doštičiek a neutrofilov, zhruba u 10% pacientov tiež nevoľnosť, zvracanie a hnačky [141]. Fáza II u pacientov s metastatickým nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC) neprinesla žiadnu objektívnu odpoveď na satraplatinu [142], aj keď u 46% pacientov došlo k určitému zmierneniu. Výsledkom pokročilejšej fázy II so zvýšenými dávkami satraplatiny bola terapeutická odpoveď u 38% pacientov s malobunkovým karcinómom pľúc, nádormi hlavy a hrdla, podobná ako v prípade cisplatiny [143]. Na druhej strane, táto štúdia nezistila žiadne známky vážnej toxicity v ľadvinách alebo nervovej sústave. Klinické skúšky fázy III hodnotili účinok satraplatiny v kombinácii s prednisonom u pacientov s nádormi prostaty rezistentnými k hormonálnej terapii (HRPC) [144]. Táto štúdia bola ale pre nedostatočnú terapeutickú účinnosť predčasne ukončená. Predmetom ďalšej klinickej skúšky fázy III bola kombinácia satraplatiny a prednisonu u pacientov s HRPC, ktorý podstúpili predchádzajúcu liečbu cytostatickou látkou, väčšinou docetaxelom [145]. Výsledkom štúdie bolo zvýšenie miery prežitia pacientov a zmiernenie bolesti. Pozitívne výsledky viedli k snahe dostať satraplatinu do klinickej praxe, čo sa však nikdy nepodarilo [146]. Do fázy I klinických štúdií vstúpil aj derivát satraplatiny s označením LA-12, v ktorom bol cyklohexylamín nahradený adamantylamínom (*Obrázok 10*) [147].

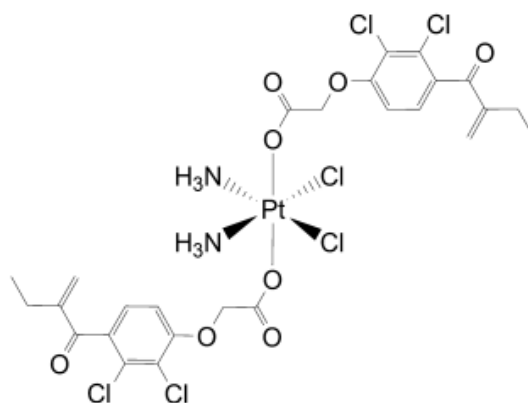


Obrázok 10. Chemické štruktúry Pt(IV) komplexov v klinickom testovaní. Prevzaté z [148].

1.2.2 Pt(IV) komplexy s duálnym mechanizmom

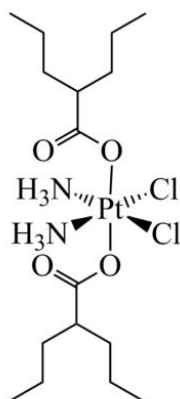
Vo všetkých prípadoch Pt(IV) komplexov, diskutovaných v predchádzajúcej časti, dochádza v dôsledku straty axiálnych ligandov k redukcii za vzniku Pt(II) formy a dvoch biologicky neaktívnych molekúl. Zapojením jedného alebo dvoch biologicky aktívnych ligandov do Pt(IV) štruktúry vzniká komplex s duálnym protinádorovým mechanizmom. Aby nedochádzalo k vzniku krížovej rezistencie s Pt(II) formami, biologické aktívne ligandy obvykle nemajú účinky spojené s väzbou na bunečnú DNA. V tejto časti je venovaná pozornosť niektorým významným zástupcom z veľkého množstva nasyntetizovaných Pt(IV) komplexov s duálnym mechanizmom.

Etakraplatina obsahuje ekvatoriálne jadro cisplatiny koordinačne spojené s dvomi axiálnymi ligandami kyseliny etakrynovej skrz jej karboxylovú skupinu (*Obrázok 11*). Vo vnútri buniek etakraplatina pod vplyvom redukcie uvoľňuje molekulu cisplatinu a dva ekvivalenty kyseliny etakrynovej [149, 150]. Etakrynová kyselina je účinný inhibítor enzýmu glutatión S-transferáza (GST), ktorý pomáha detoxikácii platinových cytostatik katalýzou ich väzby na GSH [151]. Etakrynová kyselina tak potláča platinovú rezistenciu a umožňuje etakraplatine efektívne inhibovať rast nádorových buniek rezistentných k cisplatine.



Obrázok 11. Chemická štruktúra Pt(IV) komplexu etakraplatina. Prevzaté z [150].

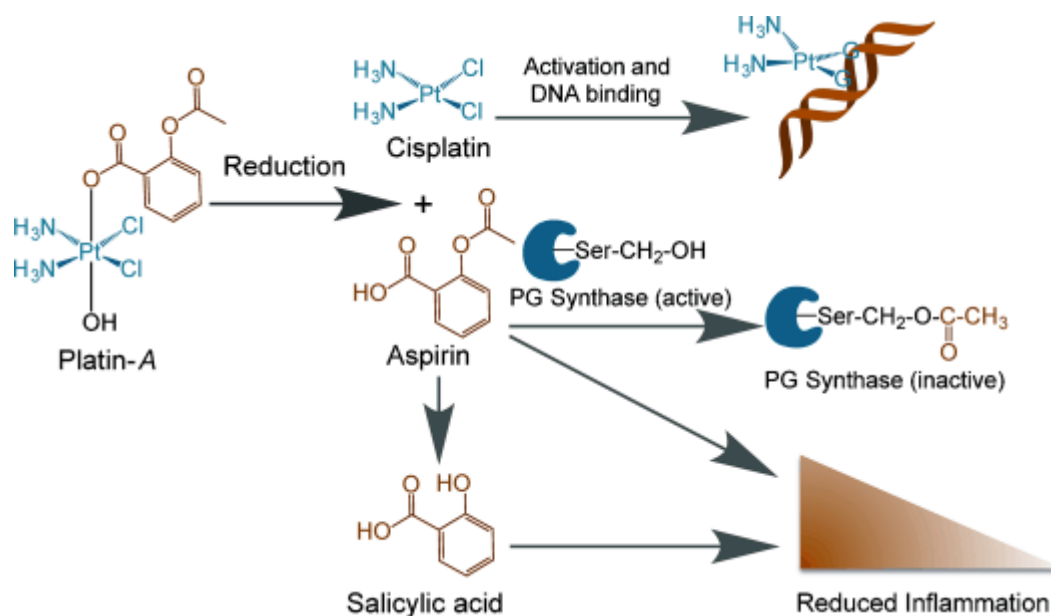
Iným príkladom Pt(IV) komplexu s duálnym účinkom je VAAP (*Obrázok 12*). Pri redukcii VAAP uvoľňuje cisplatinu a dva ekvivalenty kyseliny valproovej, ktorá je inhibítorom enzýmov histón deacetyláz (HDAC). HDAC inhibítory ovplyvňujú acetylačný stav nukleárných histónov a sprístupňujú chromatín účinkom DNA cielených terapií, akými sú napríklad platínové cytostatiká. Navyše stimulujú proteíny zahrnuté v procese diferenciácie a apoptózy. Výsledkom je, že VAAP inhibuje rast ľudských nádorových buniek asi 10-krát účinnejšie než samotná cisplatina [152]. Pt(IV) deriváty oxaliplatiny s jedným alebo dvomi ligandami kyseliny valproovej boli tiež nedávno syntetizované s cieľom vylepšiť farmakologické vlastnosti VAAP [153].



Obrázok 12. Chemická štruktúra Pt(IV) komplexu VAAP s axiálnymi ligandami valproovej kyseliny. Prevzaté z [154].

Prostaglandíny (PG) sú fyziologicky aktívne tukové látky s hormonálnou funkciou, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri zápaloch a procesoch súvisiacich so vznikom nádorov. Kľúčové kroky v biosyntéze porstaglandínov zabezpečujú enzýmy

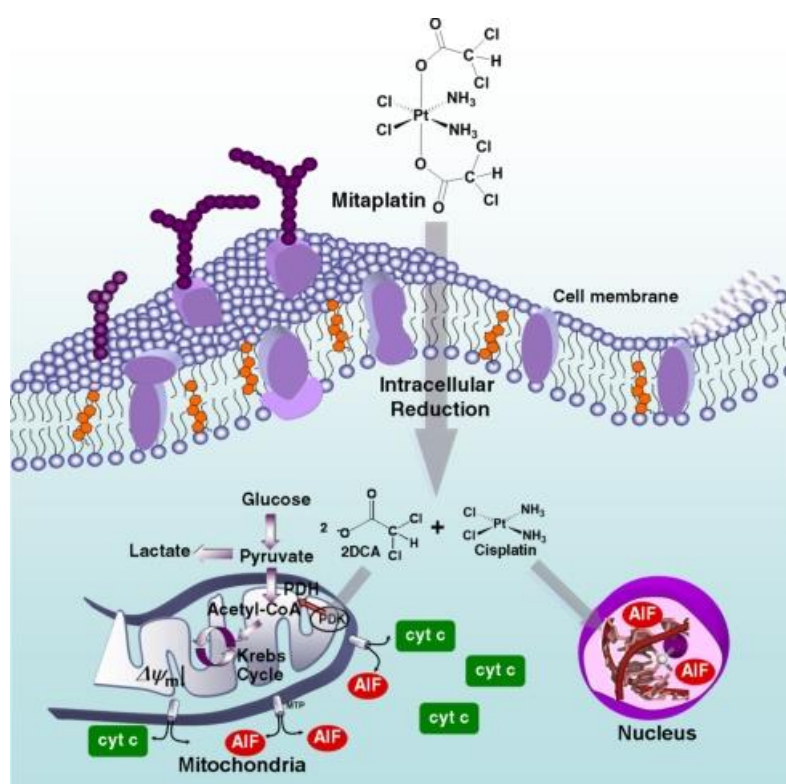
cyklooxygenázy (COX) [155]. Existuje množstvo COX inhibítorov vrátane bežne používaných nesteroidných protizápalových liečiv (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID). Prvý Pt(IV) komplex obsahujúci molekuly NSAID bol syntetizovaný dvomi nezávislými skupinami pod názvom asplatina alebo platina-A. Asplatina obsahuje jadro štrukturálne podobné cisplatine s axiálnym ligandom kyseliny acetylsalicylovej (Obrázok 13). Pod vplyvom redukcie v buněčnom prostredí dochádza k uvoľneniu cisplatiny a molekuly kyseliny acetylsalicylovej (Aspirin), ktoré spoločne pôsobia synergickým účinkom. Asplatina je schopná prekonať rezistenciu nádorových buniek voči cisplatine, pravdepodobne vďaka odlišnej buněčnej odpovedi spojenej s inhibíciou PG syntézy. In vivo experimenty ukázali zvýšenú protinádorovú účinnosť asplatiny v porovnaní s cisplatinou, spolu so zníženou systémovou toxicitou [156, 157].



Obrázok 13. Štruktúra asplatiny/platiny-A a možný mechanizmus jej protinádorového účinku. Prevzaté z [156].

Normálne bunky produkujú značnú časť potrebnej energie v mitochondriách prostredníctvom Krebsovho cyklu a oxidatívnej fosforylácie. Naproti tomu v hypoxických podmienkach väčšiny nádorov získavajú rakovinové bunky energiu prevažne aeróbnou glykolýzou. Rozdiel medzi metabolizmom v normálnych a nádorových bunkách je známy aj ako Warburgov efekt [158]. Snaha využiť Warburgovho efektu k selektívnej terapii nádorov vyústila v syntézu Pt(IV) komplexu pod názvom mitaplatina (Obrázok 14). Mitaplatina sa skladá z dvoch dichloracetátových (DCA) ligandov pripojených k štruktúre cisplatiny. Pod vplyvom redukcie vo vnútri

nádorových buniek dochádza k uvoľneniu molekúl DCA, ktoré inhibujú enzým pyruvátdehydrogenázová kináza (PDK), čo vedie k aktivácii pyruvátdehydrogenázy (PDH) a obnoveniu normálnej mitochondriálnej funkcie. DCA spôsobuje zníženie mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$) s následným uvoľnením cytochrómu c (cyt c) a premiestnením apoptózu indukujúceho faktoru (AIF) do jadra bunky. Uvoľnená cisplatina zároveň indukuje poškodenie DNA a posilňuje účinok mitaplatiny. Synergia medzi cisplatinou a DCA umožňuje mitaplatine pôsobiť selektívne na nádorové bunky pestované v prítomnosti normálnych fibroblastov [159]. Neskoršia práca ukázala, že mitaplatina je schopná prekonať rezistenciu niektorých nádorových línií k cisplatinu [160].



Obrázok 14. Chemická štruktúra a mechanizmus pôsobenia mitaplatiny. Prevzaté z [159].

1.3 Využitie nanočastíc pri terapii platinovými cytostatikami

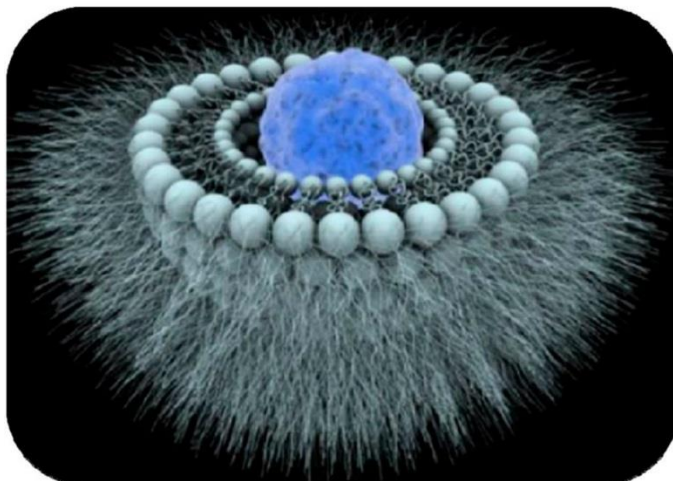
Snaha vyvinúť bezpečnejšie a selektívnejšie protinádorové liečivá viedla k využitiu transportných systémov na báze nanočastíc. Všeobecnými výhodami nanočastíc je zníženie systémovej toxicity terapeutických látok a zvýšenie ich akumulácie v cieľových miestach. Lipidové nanočastice, známe aj ako lipozómy, boli jedny z prvých a zároveň najviac študovaných nanoformulácií cisplatinu. K príprave lipozómov

a následnej enkapsulácii cisplatinu môžu byť použité lipidy rôzneho zloženia, ktoré určujú kinetiku uvoľňovania komplexu v nádorových bunkách. Ďalšie modifikácie lipozómov, ako napríklad naviazanie polyetylén glykolu (PEG), zabezpečujú dlhšiu cirkuláciu v krvnom obeh. Väzba špecifických ligandov na povrch lipozómov môže prispievať k zvýšenej nádorovej selektivitě. Takto pripravené nanočastice majú obvykle veľkosť 100-300 nm [161].

Lipoplatina (Lipoplatin™, Regulon, Inc., CA, USA) je lipozómálne viazaná cisplatinu, ktorá sa dostala do klinického testovania v roku 2001. Táto v priemere 110 nm nanočastica obsahuje jadro z vodného roztoku cisplatinu obklopené dvojitoú lipidovou membránou (*Obrázok 15*). In vitro štúdie ukázali zvýšený obsah cisplatinu v nádorových bunkách vystavených pôsobeniu lipoplatiny. In vivo štúdie odhalili selektívnu akumuláciu lipoplatiny v nádoroch spôsobenú javom zvýšenej priepustnosti a zadržavania (EPR). Lipoplatina navyše zmierňovala toxické účinky klasickej cisplatinu znížením jej akumulácie vo vitálnych orgánoch [162]. Úspešné predklinické štúdie viedli k schváleniu klinického testovania lipoplatiny v ľudských nádoroch. Klinické skúšky fázy I ukázali rozdielny farmakokinetický a distribučný profil v porovnaní s cisplatinou a pozitívne výsledky u pacientov s poruchou ľadvín. V klinických skúškach fázy II u pacientov trpiacich rakovinou pľúc však lipoplatina vykazovala vedľajšie účinky podobné cisplatině. Terapia v kombinácii s paklitaxelom výrazne znížila systémovú toxicitu a zvýšila dobu prežitia pacientov v porovnaní s tými, ktorým bol podávaný paklitaxel so samotnou cisplatinou [163]. V súčasnosti je lipoplatina testovaná v kombinácii s gemcitabínom pri liečbe lokálnych a metastatických nádorov pankreasu. Na základe doterajších úspechov má lipoplatina obrovský potenciál stať sa novým platínovým liečivom a motiváciou k vývoju ďalších platínových nanosystémov [2].

Okrem lipoplatiny boli pripravené aj ďalšie lipozómálne formulácie cisplatinu, ktoré sa zúčastnili klinických štúdií. Nanočastice SPI-77 (Alza Corporation, CA, USA) boli testované v klinických fázach I/II u pacientov s nádormi pľúc, hlavy, hrdla a vaječníkov. V testoch ukázalo SPI-77 slabú aktivitu v porovnaní s cisplatinou a neprešlo tak do ďalších výskumov [164, 165]. LiPlaCis (LiPlasome Pharma ApS, Dánsko) je na rozdiel od lipoplatiny a SPI-77 cieľovou lipozómálnou nanočasticou, ktorá uvoľňuje cisplatinu pri kontakte s enzýmom fosfolypáza A₂, nadmerne exprimovaným práve v nádorových bunkách. Klinické testovanie LiPlaCis však bolo predčasne zastavené z dôvodu nízkej bezpečnosti a slabého terapeutického účinku [166].

Z výsledkov klinických štúdií lipozómalných formulácií cisplatiny vyplýva, že pri vývoji nových nanočastíc je kľúčovým faktorom bezpečné dopravenie liečiva do cieľových miest bez straty terapeutického účinku. Množstvo ďalších systémov na báze uhlíkových, polymérnych a kovových nanočastíc je v súčasnosti študovaných v snahe vyvinúť inovatívne stratégie pre platinovú terapiu [2, 167].



Obrázok 15. Grafické znázornenie lipoplatiny. Molekuly cisplatiny (modré) sú obklopené lipidovou dvojvrstvou zloženou z PEG reťazcov vyčnievajúcich z povrchu nanočastice. Po intravenóznej aplikácii lipoplatina uniká imunitnému systému a uvoľňuje cisplatinu v nádorových bunkách. Prevzaté z [162].

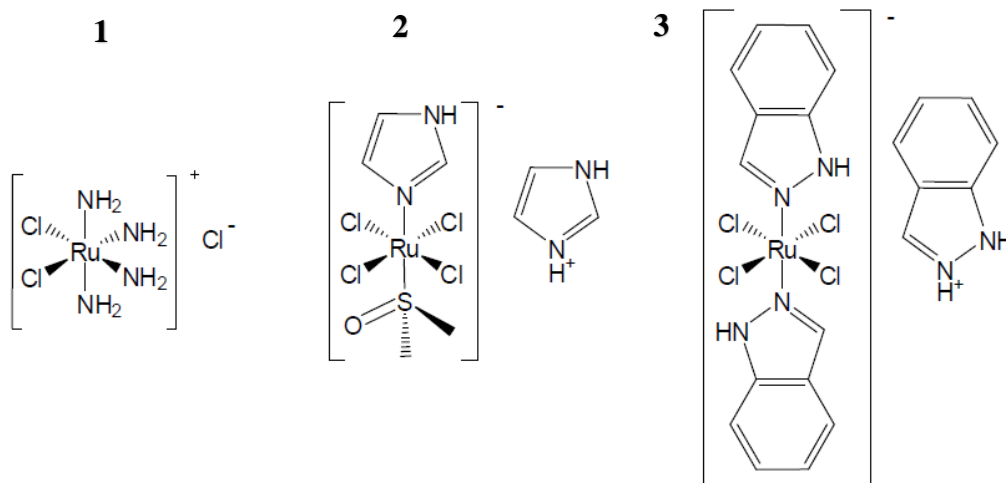
1.4 Komplexy ostatných prechodných kovov

Klinické úspechy cisplatiny stimulovali záujem o syntézu a štúdium ďalších komplexov na báze prechodných kovov. Napriek výskumu obrovského množstva analógov cisplatiny, iba dve protinádorové liečiva tohto typu, karboplatina a oxaliplatina, boli schválené pre klinické používanie na celom svete. Tisíciky ďalších platinových komplexov boli pripravené s cieľom vylepšiť terapeutické účinky konvenčných cytostatik a prekonať ich nedostatky, avšak pravdepodobnosť objavu unikátneho platinového liečiva zostala relatívne nízka. Toto poznanie viedlo k zvýšenému záujmu o komplexy ostatných prechodných kovov s potenciálne odlišnými mechanizmami účinku [168, 169].

1.4.1 Ruthéniové komplexy

Biologické účinky ruthéniových komplexov sú v posledných rokoch študované s narastajúcim záujmom hlavne vďaka ich stabilnej, dobre charakterizovanej

a predvídateľnej štruktúre, ktorá môže byť modulovaná voľbou správnych ligandov [170]. Po objave protinádorového účinku anorganického farbiva ruthéniová červeň [171] bolo zistené, že niektoré Ru(III) komplexy ako napríklad *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (Obrázok 16) takisto vykazujú aktivitu v nádorových bunkách [172]. Výsledkom ďalšieho výskumu boli prvé a doposiaľ jediné ruthéniové komplexy, ktoré vstúpili do klinického testovania: NAMI-A (imidazolium *trans*-[tetrachlorido(imidazol)(dimetylsulfoxid) ruthenát(III)]) a KP1019 (indazolium *trans*-[tetrachloridobis(1H-indazol) ruthenát(III)]) (Obrázok 16). Bolo ukázané, že NAMI-A a KP1019 zabraňujú tvorbe metastáz a inhibujú pokročilé štádia nádorov s relatívne nízkou systémovou toxicitou [173, 174, 175]. Predpokladá sa, že tieto Ru(III) komplexy sú inertné mimo prostredia nádorových buniek a práve v bunkách dochádza k ich aktivácii a väzbe na DNA [174, 176]. Avšak, celkový mechanizmus protinádorovej aktivity NAMI-A pravdepodobne súvisí s poškodením regulácie bunecného cyklu a mimobunecnej hmoty [177], zatiaľ čo KP1019 spôsobuje priamu bunecnú apoptózu prostredníctvom vnútornej mitochondriálnej dráhy a tvorbu reaktívnych foriem kyslíka [174]. NAMI-A dokončilo fázu I klinických výskumov v roku 2004 a KP1019 v roku 2008 s plánmi vstúpiť do ďalšieho testovania [178, 177].

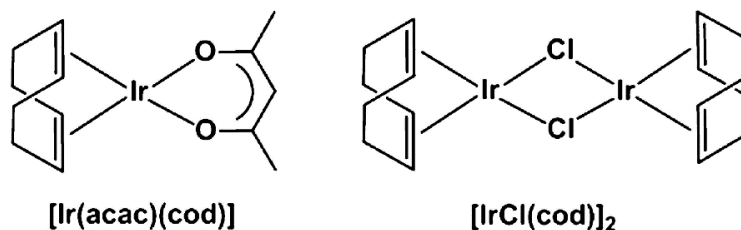


Obrázok 16. Chemické štruktúry niektorých ruthéniových komplexov: *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (1), NAMI-A (2) a KP1019 (3). Prevzaté z [43].

1.4.2 Irídiové komplexy

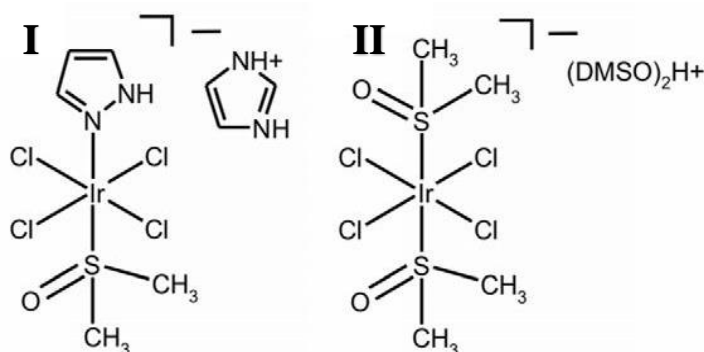
Protinádorová aktivita irídiových komplexov bola prvýkrát skúmaná krátko po objavení účinkov cisplatiny. Spočiatku bola pozornosť venovaná prevažne Ir(I)

komplexom so štvorcovo-planárnou geometriou podobnou práve cisplatine [179]. Medzi najštudovanejšie patrili komplexy $[\text{Ir}(\text{acac})(\text{cod})]$ a $[\text{IrCl}(\text{cod})]_2$ (Obrázok 17), ktoré inhibovali rast pľúcneho karcinómu v myších modeloch, či dokonca vykazovali protimetastatickú aktivitu [180, 181]. Nevýhodou týchto komplexov bola nízka stabilita a len veľmi málo sa vedelo o mechanizmoch ich biologických účinkov.



Obrázok 17. Jedny z prvých protinádorovo aktívnych Ir(I) komplexov. Prevzaté z [179].

Neskôr sa pozornosť upriamila na Ir(III) komplexy, ktoré obvykle reagujú pomalšie ako ich ruthéniové analógy diskutované v predchádzajúcej časti. Napríklad Ir(III) komplexy $[\text{ImH}][\text{trans}\{-\text{IrCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})\}]$ a $[(\text{DMSO})_2\text{H}][\text{trans}\{-\text{IrCl}_4(\text{DMSO})_2\}]$, štrukturálne podobné NAMI-A (Obrázok 18), sú kineticky a biologicky inertné [182]. Inertnosť a stabilita ale môžu byť vlastnosti, ktoré umožnia potenciálnemu liečivu dosiahnuť cieľové miesto bez vedľajších interakcií. Navyše, Ir(III) komplexy majú vysoké koordinačné číslo (6), ktoré im zabezpečuje rozsiahlu štrukturálnu diverzitu a voľbou správnych ligandov možno modulovať ich špecifické vlastnosti [179].



Obrázok 18. Štruktúry biologicky neaktívnych Ir(III) komplexov $[\text{ImH}][\text{trans}\{-\text{IrCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})\}]$ (I) a $[(\text{DMSO})_2\text{H}][\text{trans}\{-\text{IrCl}_4(\text{DMSO})_2\}]$ (II). Prevzaté z [183].

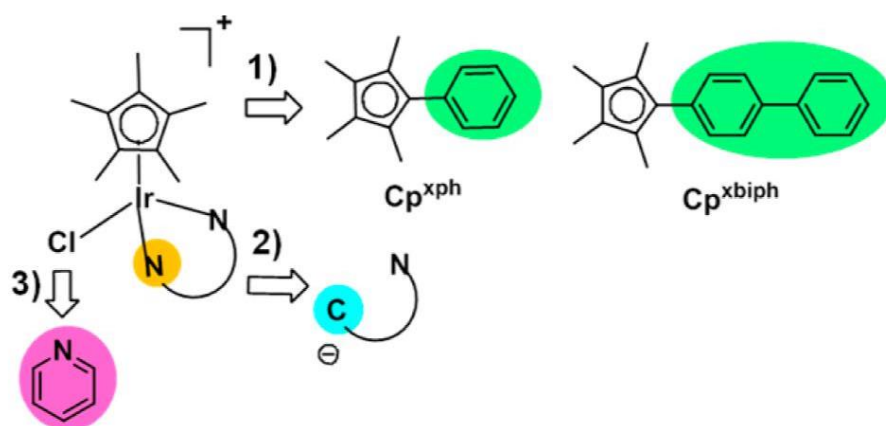
1.4.2.1 Aktivácia protinádorových účinkov Ir(III) komplexov

Veľké množstvo pôvodne neaktívnych Ir(III) komplexov sa po štrukturálnych zmenách ukázalo byť prekvapivo účinných v nádorových bunkách. Napríklad irídiové

komplexy polsendvičovej štruktúry, obsahujúce ligand pentametyl-cyklopentadienyl (Cp) (*Obrázok 19*), získali modifikáciou ligandov výraznú protinádorovú aktivitu [184]. Skríning v skupine šesťdesiatich bunčných nádorových línií (NCI-60) ukázal, že takto modifikované komplexy môžu mať porovnateľnú či dokonca vyššiu protinádorovú aktivitu než klinicky používaná oxaliplatina a cisplatina, a to prevažne v leukemických, prsných, črevných a nádorových bunkách melanómov [185]. Detailnejšie štúdie odhalili rozdiely medzi komplexami irídia a klasickými platinovými cytostatikami, vrátane mechanizmov ich pôsobenia [186, 187]. Aktivita Ir(III) komplexov polsendvičovej štruktúry v nádorových bunkách výrazne rastie s množstvom fenylových kruhov naviazaných na Cp ligand. Zvýšená lipofilita ligandov Cp^{xph} a Cp^{xbiph} uľahčuje transport komplexov cez bunčnú membránu a umožňuje ich interkaláciu (nekovalentnú väzbu) s DNA. Zaujímavosťou je, že Cp^{xph} a Cp^{xbiph} komplexy sú schopné interagovať s DNA dvojitém spôsobom. Na jednej strane modifikujú DNA pomocou interkalácie, na druhej strane sa kovalentne viažu priamo k bázam DNA, a blokujú tak jej replikáciu. DNA je teda dôležitý biologický cieľ tejto skupiny irídiových komplexov [184].

Protinádorová aktivita môže byť ďalej posilnená nahradením neutrálneho chelátového N[^]N ligandu za negatívne nabitý C[^]N analóg. Táto zámena ovplyvňuje selektivitu väzby Ir(III) komplexov k nukleobázam DNA. N[^]N komplexy tvoria preferenčne adukty na guanínoch, pričom C[^]N komplexy na adenínoch i guanínoch vo väčšom rozsahu. Navyše zámena N[^]N za C[^]N značne zvyšuje lipofilitu komplexov, čo má za následok ich vyššiu akumuláciu a aktivitu v nádorových bunkách [188]. Zväčšenie chelátového ligandu môže byť taktiež efektívnou stratégiou pre zlepšenie protinádorových účinkov komplexov irídia, obvykle zvýšením väzobnej sily interkalácie a bunčnej akumulácie [189].

Komplexy, v ktorých bol odstupujúci chloridový ligand nahradený pyridínom, vykazujú vysokú aktivitu v niektorých nádorových bunčných líniách, dokonca rádovo vyššiu než samotná cisplatina. Tieto komplexy napríklad produkujú reaktívne formy kyslíka (ROS) selektívne v nádorových bunkách [187]. Generácia ROS je všeobecne považovaná za efektívny spôsob indukcie bunčnej apoptózy [190]. Výmena chloridového ligandu môže hrať úlohu aj pri znížení reaktivity komplexov a zabránení ich deaktivácie vplyvom nežiaducich interakcií s biologickými molekulami ako je GSH [187].



Obrázok 19. Schéma možnej aktivácie protinádorových účinkov Ir(III) komplexov polsendvičovej štruktúry. Pridanie fenylovej (Cp^{xph}) alebo bifenylovej (Cp^{xbiph}) skupiny k Cp ligandu (1), nahradenie neutrálneho chelátového N^N ligandu za negatívne nabitý C^N ligand (2), výmena odstupujúceho chloridového ligandu za pyridín (3). Prevzaté z [179].

2 CIELE PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce bolo zhrnutie doterajších výsledkov týkajúcich sa bunčných experimentov s novými komplexami na báze prechodných kovov. Pomocou dostupných biofyzikálnych a biologických metód bol študovaný mechanizmus účinkov týchto komplexov v nádorových i nenádorových bunkách in vitro.

V snahe posilniť protinádorovú aktivitu konvenčných platinových cytostatik bola navrhnutá a syntetizovaná nová skupina derivátov cisplatiny obsahujúcich ligandy nesteroidného protizápalového liečiva diklofenak. Okrem toho boli syntetizované aj nové platičité deriváty oxaliplatiny s axiálnymi ligandami metabolicky aktívneho dichlóracetátu. Jedným z cieľov práce bolo stanoviť cytotoxicitu vybraných komplexov v paneli bunčných línií, vrátane rezistentných nádorových buniek. Značná pozornosť bola venovaná objasneniu mechanizmov ich cytostatického účinku.

Experimenty zamerané na štúdium cytotoxických účinkov pripravených magnetických nanočastíc mali za cieľ stanoviť úroveň protinádorovej aktivity a selektivity novej skupiny nanosystémov určenej pre transport cisplatiny, s možnosťou lokalizácie externým magnetickým poľom.

Ďalej bol študovaný vplyv kyseliny askorbovej a ľudského sérového albumínu na antiadhézne vlastnosti klinicky testovaného ruthéniového komplexu NAMI-A vo vysoko invazívnych nádorových bunkách. Cieľom štúdie bolo identifikovať chemické modifikácie zodpovedné za farmakologickú aktivitu NAMI-A v metastatických nádoroch, a získať tak užitočné podklady pre ďalší výskum.

Za účelom mechanistických štúdií nových irídiových komplexov boli stanovené ich rozdeľovacie koeficienty a miera akumulácie v nádorových bunkách. Pre identifikáciu kľúčového miesta protinádorového pôsobenia bola kvantifikovaná väzba komplexov na nukleové kyseliny izolované z buniek.

Ciele predkladanej práce smerujú ku zdokonaleniu poznatkov potrebných k vývoji nových účinnejších a bezpečnejších protinádorových liečiv na báze komplexov prechodných kovov a inovatívnych systémov určených pre ich cieleň transport.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité materiály

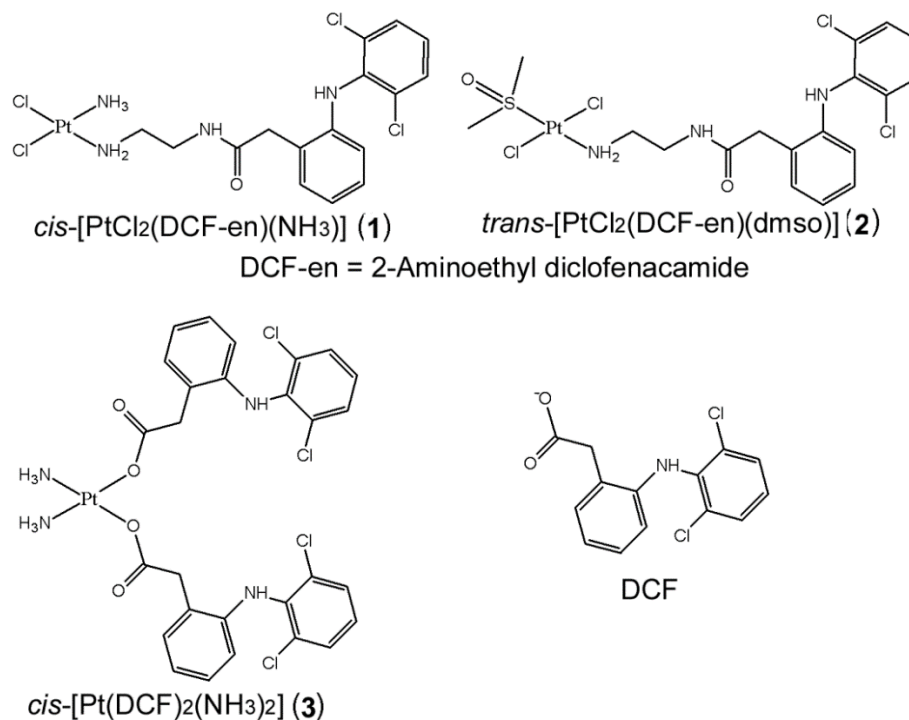
3.1.1 Chemikálie

Cisplatina (čistota $\geq 99.9\%$ na základe prvkovej hmotnostnej analýzy), oxaliplatina ($\geq 99.9\%$), dimetylsulfoxid (DMSO), N,N-dimetylformamid (DMF), oktanol ($\geq 99.9\%$), propidium jodid ($\geq 94.0\%$) a 2-[(2,6-dichlórofenyl)amino]-fenylacetát (diklofenak) sodný ($\geq 98.5\%$) boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid] bol od firmy Calbiotech (Darmstadt, Nemecko). Dichlóracetát (DCA) a 5-fluorouracil (5-FU) pre biologické experimenty boli od Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Super-čistá 30% kyselina chlorovodíková (Suprapur®) bola zakúpená od firmy Merck Millipore (Darmstadt, Nemecko). Ľudský sérový albumín (HSA), hovädzí sérový albumín (BSA) a kyselina askorbová boli od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Všetky chemikálie boli použité bez ďalšej purifikácie.

Zásobné roztoky pre biologické experimenty boli pripravené rozpustením cisplatiny a diklofenaku sodného v ddH₂O (Milli-Q®, Merck Millipore) na koncentrácie 5 a 50 mM. Oxaliplatina a 5-FU boli rozpustené v DMF na koncentráciu 25 mM a postupne riedené tak, aby výsledná koncentrácia DMF v experimentoch nepresiahla 0.1%. Zásobné roztoky boli skladované v tme pri teplote 4°C. HSA a askorbová kyselina boli rozpustené v DPBS (pH 7.4) na koncentrácie 0.5 a 10 mM bezprostredne pred ich použitím.

3.1.2 Platinové komplexy obsahujúce nesteroidné protizápalové liečivo diklofenak

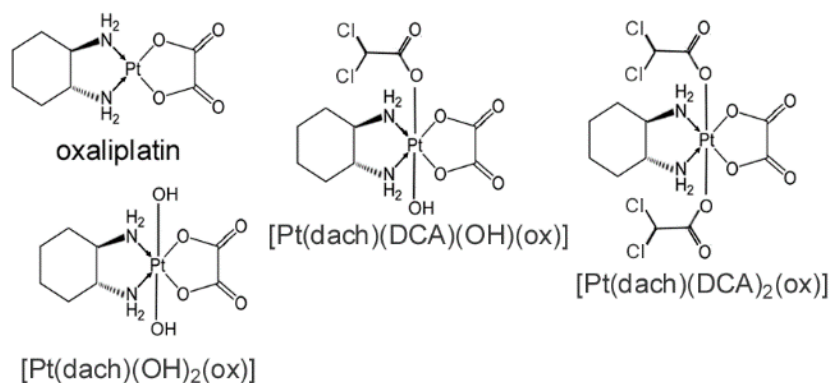
Skupina Pt(II) derivátov cisplatiny, obsahujúcich ligandy NSAID liečiva diklofenak (DCF), bola pripravená pod vedením prof. G. Natileho z *University of Bari* (Bari, Taliansko). Konjugácia DCF k platinovému centru bola uskutočnená buď prostredníctvom koordinácie diamínovej skupiny (komplexy **1** a **2**, *Obrázok 20*), alebo prostredníctvom karboxylovej skupiny samotného diklofenaku (komplex **3**). Zásobné roztoky pre bunčné štúdie boli pripravené rozpustením komplexov v DMF na koncentráciu 20 mM a postupne riedené tak, aby výsledná koncentrácia DMF v experimentoch nepresiahla 0.1%.



Obrázok 20. Štruktúry študovaných derivátov cisplatíny obsahujúcich diklofenak (DCF) [191].

3.1.3 Platičité deriváty oxaliplatíny s dichlóracetátom v axiálnej pozícii

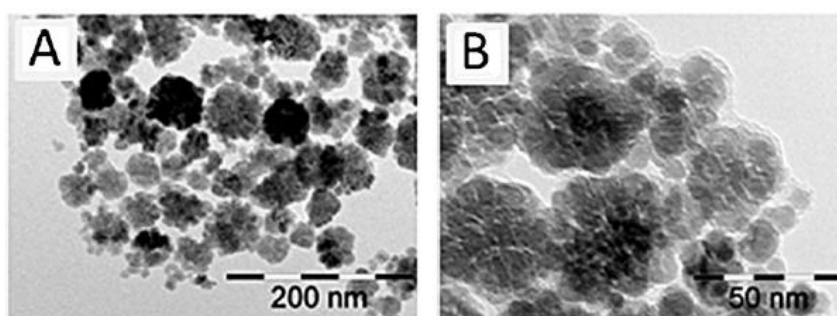
Pt(IV) deriváty oxaliplatíny s dvomi axiálnymi hydroxido ligandami ($[Pt(dach)(OH)_2(ox)]$, *dach* = R,R-1,2-diaminocyklohexán, *ox* = oxalát), s jedným axiálnym hydroxido a s jedným axiálnym DCA ligandom ($[Pt(dach)(DCA)(OH)(ox)]$), alebo s dvomi axiálnymi DCA ligandami ($[Pt(dach)(DCA)_2(ox)]$) (Obrázok 21), boli syntetizované pod vedením prof. D. Gibsona z *Hebrew University of Jerusalem* (Jeruzalem, Izrael). Experimentálne detaily pre syntézu a charakterizáciu komplexov boli uverejnené v predošlých prácach [153, 192]. Zásobné roztoky pre bunkové štúdie boli pripravené rozpustením komplexov v DMF na koncentráciu 25 mM a postupne riedené tak, aby výsledná koncentrácia DMF v experimentoch nepresiahla 0.1%.



Obrázok 21. Schematická reprezentácia študovaných Pt(IV) derivátov oxaliplatinu [193].

3.1.4 Magnetické nanočastice obsahujúce konjugáty cisplatinu s kyselinou listovou a fluorescenčnou značkou

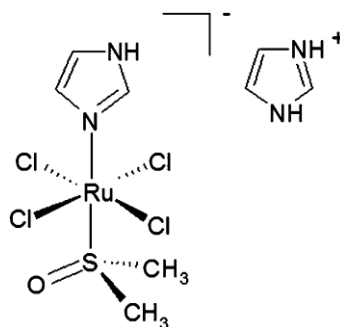
Magnetické nanočastice stabilizované karboxymetylcelulózou (cMNPs) boli pripravené skupinou prof. R. Zbořila z *Regionálneho centra pokročilých technológií a materiálov* (Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika) podľa skorej uverejneného protokolu [194], a modifikované cisplatinou za vzniku koordinačnej zlúčeniny cMNPs-cisPt. Tento komplex bol následne aktivovaný pomocou EDC a modifikovaný kyselinou listovou (cMNPs-cisPt-FA) alebo fluorescenčným činidlom Alexa Fluor 488 (cMNPs-cisPt-Alexa). Zásobne roztoky pre bunecné experimenty boli pripravené v ddH₂O a koncentrácie nanočastíc vyjadrené k množstvu platiny pomocou FAAS (Varian AA240Z, GTA120).



Obrázok 22. Štruktúry študovaných cMNPs získané transmisným elektrónovým mikroskopom [167].

3.1.5 Ruthéniový komplex NAMI-A

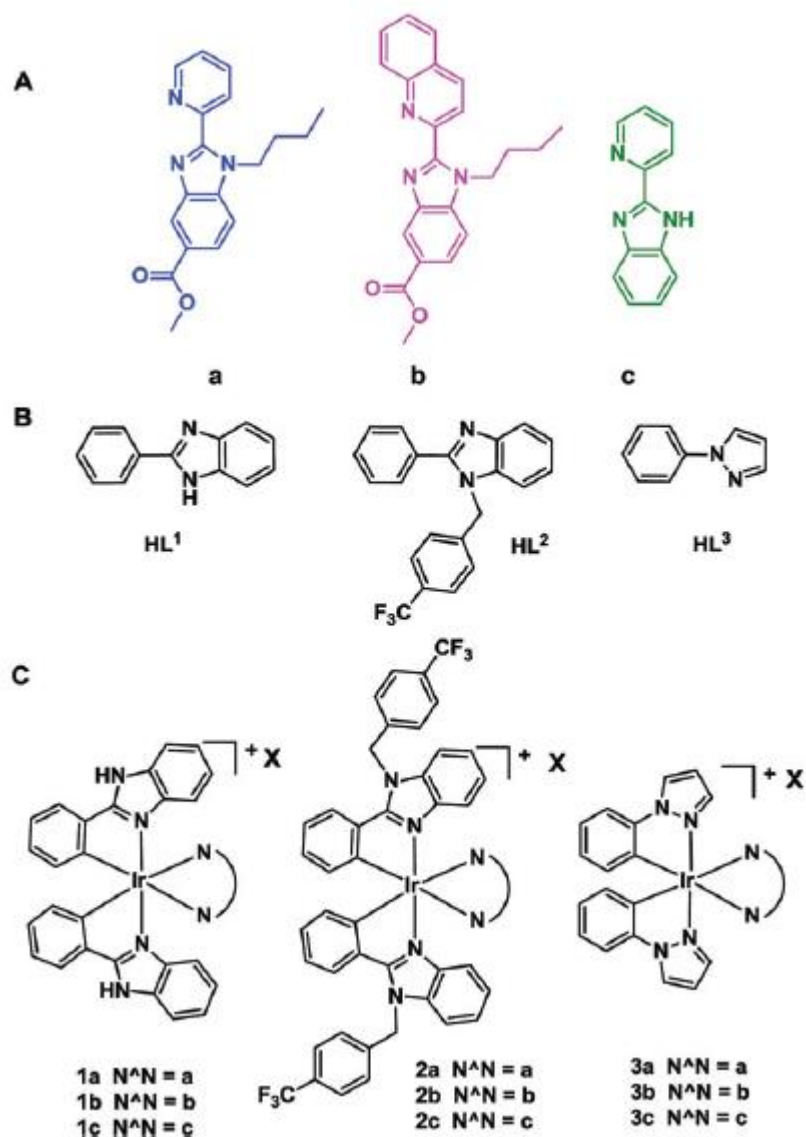
Komplex imidazolium *trans*-imidazoldimetylsulfoxid-tetrachlóróruthenát (ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im]) (NAMI-A, “New Anti-tumour Metastasis Inhibitor“) bol pripravený firmou Serichim (Torviscosa, Taliansko) podľa uverejneného postupu [195] a rozpustený v DPBS na koncentráciu 10 mM bezprostredne pred použitím.



Obrázok 23. Štruktúra Ru(III) komplexu NAMI-A [196].

3.1.6 Luminiscenčné irídiové komplexy obsahujúce ligandy na báze benzimidazolu s možnosťou ďalšej funkcionálizácie

Tri skupiny substitučne inertných a luminiscenčných Ir(III) komplexov typu [Ir(C^N)₂(N^N)] [PF₆] (Obrázok 24), obsahujúcich benzimidazolový N^N ligand (**a**, **b**) s esterovou skupinou pre ďalšiu funkcionálizáciu a butylovou skupinou pre N-substitúciu za účelom modulovania lipofilných vlastností, spolu s C^N ligandami na báze 2-fenylbenzimidazolu (**HL**¹ a **HL**²) a 1-fenylpyrazolu (**HL**³), boli syntetizované skupinou prof. J. Ruiza z *University of Murcia* (Murcia, Španielsko). Komplexy **1c**, **2c** a **3c**, obsahujúce nesubstituovaný N^N ligand 2-(2-pyridyl)-benzimidazol, boli syntetizované pre účely porovnania [197]. Zásobné roztoky pre bunkové štúdie boli pripravené rozpustením študovaných komplexov v DMSO na koncentráciu 5 mM a postupne riedené tak, aby výsledná koncentrácia DMSO v experimentoch nepresiahla 0.4%.



Obrázok 24. Schematická reprezentácia N^N (A) a C^N (B) ligandov študovaných Ir(III) komplexov (C). X = PF₆⁻ [197].

3.1.7 Bunečné línie

Ľudské ovariálne nádorové bunky A2780 senzitivne voči cisplatine, ľudské ovariálne nádorové bunky A2780cisR so získanou rezistenciou voči cisplatine, ľudské nádorové bunky prs MCF-7 prirodzene rezistentné voči cisplatine a ľudské nádorové bunky hrubého čreva SW480 boli darované od prof. B. Kepplera z *University of Vienna* (Viedeň, Rakúsko). Ľudské nádorové bunky hrubého čreva HCT116 boli darom od Dr. M. Brázdovej z *Biofyzikálneho ústavu AV ČR* (Brno, Česká republika). Vysoko invazívne bunky nádoru prs MDA-MB-231 boli darom od Dr. P. Spetosso (Cro, Aviano, Taliansko). Ľudské nenádorové bunky MRC-5 pd30 odvodené od pľúcnych fibroblastov

boli zakúpené z *Európskej kolekcie bunčných kultúr* (ECACC, Salisbury, UK). Bunky A2780 a A2780cisR boli pestované v rastovom médiu RPMI 1640 od firmy PAA (Pasching, Rakúsko) s prídavkom 10% tepelne inaktivovaného hovädzieho séra (FBS, PAA) a gentamicínu ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Serva, Heidelberg, Nemecko). Bunky MCF-7, SW480 a HCT116 boli pestované v médiu DMEM (high glucose, $4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PAA) s prídavkom 10% FBS (PAA) a gentamicínu ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Serva). Bunky MDA-MB-231 boli pestované v rastovom médiu DMEM (EuroClone®, Devon, Spojené kráľovstvo) s prídavkom 10% FBS (Gibco, Invitrogen™, Paisley, Škótsko), L-glutamínu (2 mM, EuroClone®), penicilínu ($100 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$, EuroClone®), streptomycínu ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, EuroClone®) a 1% neesenciálnych aminokyselín (NEAA, EuroClone®). Nenádorové bunky MRC-5 pd30 boli pestované v rastovom médiu DMEM (high glucose, $4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PAA) s prídavkom 10% FBS (PAA), gentamicínu ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Serva) a 1% neesenciálnych aminokyselín (NEAA, Sigma-Aldrich).

Všetky použité bunčné línie boli kultivované v podmienkach inkubátora nasýteného vlhkým vzduchom pri teplote 37°C v 5% CO_2 atmosfére a pasážované 2 až 3-krát týždenne pri dosiahnutí hodnoty konfluencie maximálne 90%. Rezistencia buniek A2780cisR bola získaná pridaním cisplatinu do rastového média na koncentráciu $1 \mu\text{M}$ každú druhú pasáž. Práca v bunčnom laboratóriu prebiehala s ohľadom na bezpečnosť podľa smerníc a predpisov *Biofyzikálneho ústavu AV ČR, v.v.i. v Brne*.

3.2 Metódy

3.2.1 Stanovenie cytotoxicity pomocou MTT testu

Účinok testovaných komplexov na bunčnú smrť bol skúmaný pomocou metódy založenej na redukcii žltého rozpustného 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný modrý formazan, tzv. MTT testu. Reakcia prebieha vplyvom činnosti enzýmov na mitochondriálnej membráne živých buniek a množstvo vzniknutého formazanu je úmerné množstvu preživších buniek. Pri experimentoch boli bunky nasadené na 96-jamkové kultivačné doštičky s plochým dnom v počte $4\text{-}10\cdot 10^3$ buniek na jamku (v závislosti na bunčnej línii) v $100 \mu\text{L}$ rastového média a ponechané v inkubátore cez noc pri teplote 37°C a 5% CO_2 atmosfére. K bunkám v jednotlivých jamkách boli následne pridané študované cytostatiká v rôznych koncentračných radách (obvykle $0\text{-}100 \mu\text{M}$) v celkovom objeme $200 \mu\text{L}$ a ponechané po dobu 24, 48 alebo 72 h pri 37°C v 5% CO_2 . Po uplynutí inkubačnej doby bolo do jamiek pridaných $10 \mu\text{L}$ čerstvého roztoku MTT ($2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a kultivačná doštička

bola ponechaná ďalšie 4 h pri 37°C v 5% CO₂. Následne bolo z jamiek odstránené médium a vzniknutý formazanový produkt bol rozpustený v 100 µL DMSO. Prežitie buniek bolo vyhodnotené spektrofotometricky zmeraním absorbancie v jednotlivých jamkách pri vlnovej dĺžke 570 nm s použitím čítačky Sunrise-Basic (TECAN, Rakúsko). Získané hodnoty absorbancie boli vzťahované k hodnote kontroly (bunky bez pridania cytostatika, 0 µM) a vyjadrené ako percentuálny podiel (%). Hodnoty IC₅₀, odpovedajúce koncentráciám študovaných látok inhibujúcich bunečný rast o 50%, boli vypočítané z kriviek znázorňujúcich závislosť prežitia buniek (%) na koncentrácii (µM) daného komplexu. Koncentrácie komplexov prítomných v bunečných médiách počas experimentov boli overované pomocou FAAS.

3.2.2 Určenie rozdeľovacích koeficientov

Lipofilita látok je parameter často spojovaný s ich transportom do vnútra buniek. Rozdeľovacie (distribučné) koeficienty (P) študovaných komplexov boli stanovené tzv. „shake-flask“ metódou vytrepávania látky medzi dve nemiešateľné fázy. Lipofilnú fázu reprezentoval 1-oktanol a ako hydrofilná fáza bola použitá voda s prídavkom NaCl (200 mM) k potlačeniu nožnej hydrolyzy odstupujúcich chloridových ligandov počas rozpúšťania komplexov. Oktanolom nasýtená voda (OSW) a vodou nasýtený 1-oktanol (WSO) boli pripravené vzájomným miešaním analyticky čistého 1-oktanolu a MQ vody po dobu 24 h. Komplexy boli rozpustené v OSW alebo WSO v závislosti na charaktere a rozpustnosti daného komplexu a následne zmiešané s protichodnou fázou v objemových pomeroch 2:1, 1:1 a 1:2. Po 30 min trepania a ustáľovania rovnováhy pri izbovej teplote boli obe fázy rozdelené centrifugáciou 5 min pri 3000 g a obsah prechodných kovov v jednotlivých fázach bol analyzovaný pomocou FAAS. Miera lipofility komplexov bola vyjadrená pomocou logaritmu hodnoty distribučných koeficientov (logP) a vypočítaná použitím vzorca $\log P = \log([c]_{\text{WSO}}/[c]_{\text{OSW}})$, kde [c] je koncentrácia komplexu v danej fáze.

3.2.3 Bunečná akumulácia študovaných komplexov

Pre štúdium vzťahov medzi in vitro cytotoxicitou a akumuláciou komplexov prechodných kovov v nádorových bunkách, bol stanovovaný celkový obsah kovov v bunkách vystavených študovaným komplexom v rôznych časových intervaloch a pri rôznych použitých koncentráciách, v závislosti na použitej bunečnej línii a charaktere daného komplexu. Pri samotnom experimente boli nádorové bunky nasadené

na 100 mm Petriho misky a ponechané cez noc v inkubátore pri teplote 37°C a 5% CO₂ atmosfére. Do rastových médií k bunkám boli potom pridané roztoky študovaných komplexov o definovanej koncentrácii a bunky boli vystavené ich pôsobeniu pri teplote 37°C a 5% CO₂. Po uplynutí požadovanej inkubačnej doby (2, 5, 10 alebo 24 h) bolo rastové médium obsahujúce zvyšky rozpustených komplexov odobraté, bunky opláchnuté teplým PBS (37°C), pozbierané 0.25% trypsínom, spočítané pomocou automatickej čítačky buniek (TC10, Bio-Rad) a centrifugované 5 min pri 250g (4°C). Bunečné pelety boli 2-krát opláchnuté studeným PBS (4°C), uložené v mrazničke na -80°C a následne mineralizované vysokotlakovým mikrovlnným systémom (CEM Mars®) v prítomnosti super-čistej 30% kyseliny chlorovodíkovej. Množstvo kovov naakumulovaných v bunkách bolo určené pomocou FAAS a ICP-MS Agilent 7500 (Agilent, Japonsko).

3.2.4 Kvantifikácia väzby študovaných komplexov na nukleové kyseliny v bunkách

Pre cisplatinu a ostatné konvenčné platinové cytostatiká je DNA predpokladaným cieľovým miestom ich protinádorového pôsobenia v bunkách. Z tohto dôvodu bola z nádorových buniek, vystavených pôsobeniu študovaných komplexov prechodných kovov, izolovaná ich DNA a podrobená analýze obsahu naviazaného kovu. Pri samotných experimentoch boli nádorové bunky nasadené a inkubované so študovanými komplexami rovnakým spôsobom ako v experimentoch s bunečnou akumuláciou. K zmrazeným bunečným peletom bol pridaný extrakčný detergent DNAzol (DNAzol®, MRC) spolu s RNázou A (100 µg/mL). DNA bola zo vzniknutého roztoku vyžrážaná 100% etanolom, 2-krát premytá 75% etanolom a rozpustená v 8 mM NaOH. Celková bunečná RNA bola získaná dezintegráciou buniek pomocou RNAzolu (RNAzol®RT, MRC) priamo na Petriho miskách. RNA bola zo vzniknutého roztoku extrahovaná centrifugáciou pri 12000g po dobu 15 min, vyžrážaná izopropanolom, 2-krát premytá 75% etanolom a rozpustená v 1 mM NaOH. Koncentrácie izolovanej DNA a RNA boli stanovené spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 260 nm. Pre odstránenie nežiadúcej interferencie vysokých koncentrácií nukleových kyselín boli vzorky rozpustené v super-čistej 30% kyseline chlorovodíkovej a podrobené analýze na obsah kovu pomocou ICP-MS Agilent 7500 (Agilent, Japonsko).

3.2.5 Analýza bunecného cyklu s využitím prietokovej cytometrie

Odpoveď nádorových buniek na účinky cytostatických látok je často sprevádzaná poruchami v regulácii bunecného cyklu. K charakterizácii účinkov študovaných komplexov prechodných kovov na zmeny bunecného cyklu bola využitá prietoková cytometria. Pri experimentoch boli ľudské nádorové bunky nasadené na 6-jamkové kultivačné doštičky ($5 \cdot 10^5$ buniek/2 mL rastového média) a ponechané cez noc v inkubátore pri teplote 37°C a 5% CO₂ atmosfére. Do jamiek bolo následne pridané čerstvé médium obsahujúce študované komplexy o definovanej koncentrácii a bunky boli vystavené ich pôsobeniu pri teplote 37°C a 5% CO₂. Po uplynutí inkubačnej doby 24 h bolo rastové médium obsahujúce zvyšky rozpustených komplexov odobraté, bunky opláchnuté teplým PBS (37°C), pozbierané pomocou 0.25% trypsínu a centrifugované 5 min pri 250g (4°C). Bunky boli 2-krát opláchnuté studeným PBS, rozsuspendované v 70% etanole a ponechané cez noc pri teplote 4°C. Takto fixované bunky boli znovu 2-krát opláchnuté vychladeným PBS a inkubované s propidium jodidom (50 µg/mL) vo Vindelovom roztoku [Tris-Cl (10 mM, pH 8.0), NaCl (10 mM), Triton X-100 (0.1%), RNáza A (100 µg/mL)] po dobu 30 min pri teplote 37°C v tme. Profily bunecného cyklu boli stanovené s využitím prietokového cytometru FACSVersé (Becton Dickinson, Nemecko) a získané dáta analyzované pomocou programu ModFit LT 4.1 (Verity Software House).

3.2.6 Analýza mitochondriálneho membránového potenciálu (MMP)

Mitochondrie zohrávajú dôležitú úlohu v procese apoptózy - programovanej bunecnej smrti. Apoptóza buniek prostredníctvom mitochondriálnej dráhy je sprevádzaná permeabilizáciou mitochondriálnej membrány spolu so stratou mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$) [198]. Účinok komplexov prechodných kovov na mitochondriálny membránový potenciál v nádorových bunkách bol študovaný s využitím laserovej skenovacej konfokálnej mikroskopie (LSCM). V týchto experimentoch bolo $1 \cdot 10^6$ nádorových buniek v 3 mL rastového média nasadených na 50 mm kultivačné misky so skleneným dnom (MatTek Corporation, Massachusetts, USA) a ponechaných cez noc v inkubátore pri teplote 37°C a 5% CO₂ atmosfére. Do rastových médií k bunkám boli potom pridané roztoky študovaných komplexov o definovanej koncentrácii a bunky boli vystavené ich pôsobeniu pri teplote 37°C a 5% CO₂. Po uplynutí inkubačnej doby (2 alebo 6 h) bolo rastové médium obsahujúce zvyšky rozpustených komplexov odobraté a nahradené 1 mL čerstvého média. K bunkám bolo

pridaných 100 μL zriedeného (1:10 s rastovým médiom) fluorescenčného farbiva JC-1 (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) s následnou inkubáciou po dobu 20 min pri teplote 37°C a 5% CO_2 . JC-1 je lipofilná kationová zlúčenina, ktorá sa selektívne nahromaďuje v mitochondriách buniek, kde mení farbu v závislosti na hodnote membránového potenciálu. Mitochondriálna depolarizácia ($\Delta\Psi_m$) je sprevádzaná nárastom pomeru fluorescence zelených J-monomérov k fluorescence červených J-agregátov. Fluorescencia JC-1 akumulovaného v nádorových bunkách bola excitovaná pomocou mikroskopu Leica SP-5 LSCM (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemecko) vybaveného komorou pre zobrazovanie živých buniek (37°C , 5% CO_2) na vlnovej dĺžke 488 nm. Emisia J-monomérov alebo J-agregátov bola detegovaná na vlnových dĺžkach 515-545 nm alebo 575-625 nm a kvantitatívne vyhodnotená pomocou programu ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA).

3.2.7 Inhibícia aeróbnej glykolýzy

Miera glykolýzy v nádorových bunkách vystavených účinkom študovaných komplexov bola stanovená pomocou analýzy množstva glukózy naakumulovanej v bunkách s využitím fluorescenčného činidla Amplex® Red (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Amplex® Red je substrát glukóza oxidázy, ktorý umožňuje merať koncentráciu glukózy v rastovom médiu na základe enzymatickej reakcie a premeny na červený fluorescenčný produkt resorufín. Pri samotných experimentoch boli nádorové bunky nasadené na 6-jamkové kultivačné doštičky ($3 \cdot 10^5$ buniek/ $1500 \mu\text{L}$ rastového média) a ponechané cez noc v inkubátore pri teplote 37°C a 5% CO_2 atmosfére. Do jamiek bolo následne pridané čerstvé médium obsahujúce študované komplexy o definovanej koncentrácii a bunky boli vystavené ich pôsobeniu pri teplote 37°C a 5% CO_2 . Po uplynutí inkubačnej doby 24 h bola z jamiek odobraná alikvotná časť rastového média a analyzovaná na obsah glukózy súpravou Amplex® Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit podľa doporučení výrobcu. Fluorescencia vzniknutého resorufínu bola excitovaná na vlnovej dĺžke 570 nm a emisia detegovaná pri 595 nm fluorimetrom Cary Eclipse (Varian). Akumulácia glukózy v bunkách bola vypočítaná ako rozdiel medzi koncentráciou glukózy v odobratom bunčnom médiu a v čistom médiu bez buniek. Pri výpočte bola využitá smernica krivky glukózového štandardu obsiahnutého v súprave. Absolútne hodnoty koncentrácie boli normalizované k počtu buniek v jednotlivých vzorkách.

3.2.8 Produkcia laktátu

Koncentrácia laktátu produkovaného nádorovými bunkami pod vplyvom účinkov študovaných komplexov bola stanovená pomocou komerčnej enzymatickej súpravy Lactate Assay Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Nádorové bunky boli nasadené na 6-jamkové kultivačné doštičky ($2 \cdot 10^5$ buniek/2 mL rastového média) a ponechané cez noc v inkubátore pri teplote 37°C a 5% CO_2 atmosfére. Následne bolo rastové médium odstránené a jamky 2-krát opláchnuté teplým PBS (37°C). K bunkám bolo pridané médium bez prídavku FBS s roztokmi študovaných komplexov o definovanej koncentrácii a bunky boli vystavené ich účinkom pri teplote 37°C a 5% CO_2 . Po uplynutí inkubačnej doby 6 h boli kultivačné doštičky centrifugované 5 min pri 1000 rpm a teplote 4°C . Z každej jamky bolo odobratých 500 μL supernatantu a premiestených do filtračných kolóniek (10 kDa). Pre odstránenie laktát dehydrogenázy zo vzoriek boli kolónky centrifugované 15 min pri 12000 rpm a teplote 4°C . Vzniknuté eluenty (50 μL) boli premiestnené do 96-jamkovej kultivačnej doštičky a zmixované s 50 μL reakčnej zmesi Lactate Assay Master Reaction Mix. Absorbancia vzniknutých roztokov v jednotlivých jamkách bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 570 nm s použitím čítačky Sunrise-Basic (TECAN, Rakúsko). Množstvo laktátu prítomného vo vzorkách bolo vypočítané pomocou smernice krivky zostrojenej pre laktátový štandard obsiahnutý v súprave. Hodnoty koncentrácie laktátu boli normalizované k počtu buniek v jednotlivých vzorkách.

3.2.9 Indukcia autofágie

Účinok študovaných komplexov prechodných kovov na úroveň autofágie v nádorových bunkách bol skúmaný pomocou súpravy na detekciu autofágie Cyto-ID® (Enzo Life Sciences) s využitím LSCM. $1 \cdot 10^6$ ľudských nádorových buniek hrubého čreva HCT116 bolo nasadených na 50 mm kultivačné misky so skleneným dnom (MatTek Corporation) a ponechaných cez noc v inkubátore pri teplote 37°C a 5% CO_2 atmosfére. Do rastových médií k bunkám boli potom pridané roztoky študovaných komplexov o definovanej koncentrácii a bunky boli vystavené ich pôsobeniu pri teplote 37°C a 5% CO_2 po dobu 24 h. Bunky boli následne 2-krát opláchnuté komerčným pufrom doplneným o 5% FBS a inkubované v prítomnosti fluorescenčných farbív Cyto-ID Green Detection Reagent a Hoechst 33342 Nuclear Stain podľa doporučení výrobcu. Fluorescencia v bunkách bola detegovaná pomocou mikroskopu Leica SP-5 LSCM vybaveného komorou pre zobrazovanie živých buniek (37°C , 5% CO_2). Pre detekciu

bunečnej autofágie bola nastavená hodnota vlnovej dĺžky excitácie na 480 nm a pre emisiu hodnoty v rozsahu 525-560 nm s použitím štandardnej konfigurácie pre FITC. Signál bunečných jadier bol excitovaný pri vlnovej dĺžke 355 nm a emisia detegovaná v rozsahu 450-500 nm s použitím konfigurácie pre DAPI. Intenzita zeleného fluorescenčného signálu autofágie bola kvantifikovaná pomocou programu ImageJ a normalizovaná k intenzite modrej fluorescencie bunečných jadier. Bunečná autofágia bola vyjadrená ako percentuálny podiel autofágie v kontrole (bunky bez pridania komplexov).

3.2.10 Štúdium bunečnej migrácie

Vplyv komplexov prechodných kovov na migračnú schopnosť nádorových buniek bol študovaný pomocou takzvaného "testu zaceľovania rany" (*wound-healing assay*). Ľudské nádorové bunky boli nasadené na 6-jamkové kultivačné doštičky a ponechané v inkubátore pri teplote 37°C a 5% CO₂ atmosfére. Po dosiahnutí súvislej vrstvy boli bunky inkubované cez noc v prítomnosti média s redukovaným množstvom séra (1% FBS) a do vrstvy buniek v jamkách bola následne pomocou špičky pipety (P200) vytvorená vertikálna ryha. Pre odstránenie odlúpených buniek boli jamky 2-krát opláchnuté teplým PBS (37°C) a do jamiek boli pridané roztoky študovaných komplexov o definovanej koncentrácii v kompletnom rastovom médiu. Takto vytvorené ryhy (rany) boli ihneď po pridaní komplexov a po uplynutí inkubačnej doby 24 h nasnímané fotoaparátom Canon EOS 1200D napojeným na inverzný mikroskop Olympus CKX41 s fázovo kontrastným objektívom 10x/0.25. Digitálne obrázky boli získané pomocou programu QuickPhoto Micro 3.1 (Promicra, Praha, Česká republika) a analyzované v programe TScratch (ETH, Zürich, Švajčiarsko) [199]. Rozsah migrácie v jednotlivých vzorkách bol stanovený z plochy pokrytej bunkami za časový interval 24 h a vyjadrený ako percentuálny pomer k migrácii kontrolných buniek (bunky bez pridania komplexov).

3.2.11 Adhézny test

Účinok komplexov prechodných kovov na schopnosť buniek adherovať k rastovému substrátu bol študovaný na vysoko invazívnych bunkách nádoru prs MDA-MB-231. Bunky boli nasadené na 25cm² kultivačné fľašky (T25) v kompletnom rastovom médiu a ponechané 48 h v inkubátore pri teplote 37°C a 5% CO₂ atmosfére. Rastové médium bolo potom zamenené médiom bez FBS s prídavkom 0.1% BSA a bunky ponechané ďalších 24 h pri 37°C a 5% CO₂. Bunky boli následne inkubované

1 h s roztokmi študovaných komplexov v DPBS (37°C, 5% CO₂), pozbierané pomocou trypsínu, scentrifugované (200g, 5 min) a rozsuspendované v médiu bez FBS s prídavkom 0.1% BSA. Na obnovu funkcie povrchových receptorov boli bunky ponechané 30 min pri izbovej teplote a znovu nasadené na 96-jamkové kultivačné doštičky v počte 1.10⁴ buniek na jamku v 100 µL média. Po 30 minútovej inkubácii pri 37°C a 5% CO₂, určenej k adhézii buniek k plastovému substrátu doštičky, bolo médium s neadherovanými bunkami odstránené a jamky jemne prepláchnuté s DPBS bez Ca²⁺ a Mg²⁺. Adherované bunky boli detegované sulforodamínom B (SRB) podľa skorej uverejneného postupu [200]. V skratke, adherované bunky v jamkách boli fixované vychladenou 10% kyselinou trichloroctovou (TCA) pri teplote 4°C po dobu 1 h. Po fixácii bola kyselina odobratá, jamky 5-krát premyté destilovanou vodou a vysušené na vzduchu. K fixovaným bunkám bolo na 30 minút pridané 100 µL roztoku SRB (0.4% v 1% kyseline octovej) pri izbovej teplote a zvyšky nenaviazaného SRB boli odstránené premytím jamiek 3-krát 1% kyselinou octovou. Jamky boli vysušené na vzduchu a SRB viazaný v bunkách bol rozpustený pomocou 10 mM Tris (tris-hydroxymetyl-aminometán, pH 10.5). Absorbancia vzniknutých roztokov v jednotlivých jamkách bola zmeraná spektrofotometrom SpectraCount (Packard, Meriden, Connecticut, USA) pri vlnovej dĺžke 570 nm a normalizovaná k absorbancii kontroly (bunky bez pridania komplexu).

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Predkladaná dizertačná práca vychádza zo súhrnu výsledkov piatich samostatných prác uverejnených v medzinárodných impaktovaných časopisoch. Výsledky sú rozdelené do niekoľkých častí podľa problematik, ktorých sa jednotlivé práce týkajú. Kópie publikovaných článkov sú súčasťou príloh.

Úvodná časť pojednáva o výsledkoch štúdia derivátov cisplatiny obsahujúcich ligandy diklofenaku a zahrňuje podrobnejšiu diskusiu, zameranú predovšetkým na objasnenie mechanizmov ich protinádorovej a protimetastatickej aktivity.

Druhá časť výsledkov sa venuje platičitém derivátom oxaliplatiny s dichlóracetátom v axiálnej pozícii. Okrem mechanizmov protinádorovej aktivity komplexov sa diskutuje aj o možnosti ďalšieho zosilnenia ich účinkov.

V tretej časti sú zhrnuté výsledky štúdia cytotoxicity pripravených magnetických nanočastíc vo vybraných buncných líniách, vrátane nenádorových buniek a buniek rezistentných voči cisplatine.

Ďalší súhrn sa týka štúdia vplyvu chemických modifikácii ruthéniového komplexu NAMI-A na adhézne vlastnosti vysoko invazívnych nádorových buniek. Spomenuté sú potenciálne mechanizmy zodpovedné za farmakologickú aktivitu NAMI-A v metastatických nádoroch.

Posledná časť sa zaoberá výsledkami akumulčných štúdií nových luminiscenčných komplexov irídia v nádorových bunkách. Stručná diskusia pojednáva o možnom mechanizme a cieľovom mieste ich protinádorového pôsobenia.

4.1 **Nové protinádorovo účinné Pt(II) konjugáty obsahujúce nesteroidné protizápalové liečivo diklofenak: syntéza a duálne mechanizmy účinkov (PUBLIKÁCIA Č. 1)**

Jedným z konceptov pri zlepšení chemoterapeutickej účinnosti konvenčných platínových cytostatik je ich konjugácia k iným protinádorovo aktívnym látkam s odlišným mechanizmom účinku. V rámci zahraničnej spolupráce bola na pracovisku prof. G. Natileho z *University of Bari* v Taliansku syntetizovaná skupina Pt(II) derivátov cisplatiny, obsahujúcich ligandy diklofenaku (*Obrázok 20*). Diklofenak (DCF) je nesteroidné protizápalové liečivo (NSAID), ktoré vykazuje protinádorové účinky spojené s inhibíciou cyklooxygenáz (COX), ale aj s ovplyvnením mitochondriálnej

aktivity a metabolizmu glukózy v nádorových bunkách [201, 202]. Konjugácia DCF k platinovému centru bola uskutočnená prostredníctvom väzby cez diamínovú skupinu (komplexy **1** a **2**), alebo karboxylovú skupinu samotného diklofenaku (komplex **3**). Komplexy **1** a **2** boli navrhnuté tak, aby pod vplyvom enzymatického štiepenia peptidovej väzby vo vnútri buniek, uvoľňovali jednu molekulu DCF a platinový komplex s dvomi odstupujúcimi chloridovými ligandami. Naproti tomu, disociácia karboxylovej skupiny oboch DCF ligandov komplexu **3** vo vnútri nádorových buniek, môže prebiehať podobne ako aktivácia karboplatiny [203, 204]. Uvoľnené molekuly DCF a aktivovanej cisplatiny by tak mohli navzájom posilniť svoje protinádorové účinky.

Z výsledkov stanovenia cytotoxicity pomocou MTT testu vyplýva, že všetky tri študované komplexy vykazujú aktivitu v nádorových bunčných líniiach. Komplex **3** má výrazne vyššiu cytotoxicitu než komplexy **1** a **2**, a je dokonca účinnejší než klinicky používaná cisplatina. Komplexy sú navyše aktívne v nádorových bunkách so získanou rezistenciou voči cisplatine. Zaujímavosťou je, že komplex **3** je najmenej cytotoxický v nenádorových bunkách, a má teda určitú nádorovú selektivitu. Tieto výsledky naznačujú, že mechanizmy zodpovedné za cytotoxické účinky študovaných komplexov sú odlišné od mechanizmov cisplatiny, a umožňujú zlepšenie terapeutických vlastností potenciálnych platinových liečiv.

Ďalšie experimenty ukázali, že bunčná akumulácia najaktívnejšieho komplexu **3** je rádovo vyššia než akumulácia cisplatiny, pričom koreluje s jeho cytotoxicitou a lipofilným charakterom. Lipofilné DCF ligandy pravdepodobne posilňujú pasívny transport komplexu cez cytoplazmatickú membránu buniek. Okrem toho bola stanovená väzba komplexu **3** na bunčnú DNA, ktorá mnohonásobne prevyšuje väzbu samotnej cisplatiny. Analýza bunčného cyklu nádorových buniek HeLa taktiež odhalila rozdiely medzi účinkom komplexu **3** a cisplatinou. Podiel buniek blokových vo fáze S bol v porovnaní s cisplatinou znížený, zatiaľ čo podiel buniek vo fáze G₂/M sa významne zvýšil. DCF ligandy teda významným spôsobom ovplyvňujú transportný mechanizmus komplexu **3** a jeho účinok na bunčný cyklus nádorových buniek.

Nedávne štúdie naznačujú, že jedným z mechanizmov protinádorovej aktivity DCF je zníženie nadmernej produkcie laktátu, ktorá je spájaná so slabou terapeutickou prognózou niektorých typov nádorov [205, 201]. Enzymatická analýza bunčných médií ukázala, že komplex **3** výraznou mierou inhibuje produkciu laktátu u nádorových buniek vaječníkov. Navyše, účinkom komplexu **3** dochádza ku kolapsu mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$) v týchto bunkách. Podobné výsledky boli získané

aj u buniek vystavených účinkom voľného DCF, avšak neboli pozorované pre samotnú cisplatinu. Mechanizmus protinádorovej aktivity komplexu **3** tak zjavne súvisí s prítomnosťou DCF ligandov, ktoré ovplyvňujú metabolizmus a mitochondriálnu funkciu nádorových buniek.

Zvýšená expresia COX-2 je často spojovaná s karcinogéznou a metastatickým potenciálom nádorov [206]. Z tohto dôvodu boli aktivity komplexov študované aj v COX-2 pozitívnych nádorových bunkách HeLa a HT-29. Cytotoxicity komplexov **1** a **2** boli v oboch línách rovnaké, ale vyššie než cytotoxicita cisplatinu. Aktivita týchto komplexov je pravdepodobne spojená s inhibíciou COX-2 pod vplyvom DCF ligandov, a nie je preto závislá na ich priestorovej konfigurácii. Experimenty ďalej ukázali, že komplex **3** inhibuje bunečnú adhéziu a migráciu, a teda potláča charakteristiky typické pre metastatické nádorové bunky. Inhibičný účinok voľného DCF sa prejavil až pri rádovo vyšších koncentráciách, ale nebol preukázaný pre samotnú cisplatinu.

Výsledky bunečných experimentov naznačujú, že konjugácia Pt(II) komplexov s molekulami NSAID, akými je napríklad DCF, môže viesť k vzniku potenciálnych terapeutických látok s unikátnymi mechanizmami protinádorového a protimetastatického účinku.

4.2 Posilnenie mitochondriálnej dysfunkcie v nádorových bunkách pomocou konjugátov metabolického modulátora dichlóracetát s Pt(IV) derivátmi oxaliplatiny (PUBLIKÁCIA Č. 4)

Platičité deriváty cisplatinu a jej analógov, obsahujúce axiálne ligandy protinádorovo aktívnych látok, predstavujú novú triedu platinových komplexov so sľubnými terapeutickými účinkami. Znížená reaktivita Pt(IV) komplexov umožňuje obmedzenie nežiadúcich interakcií s biologickými látkami, kým komplexy nedorazia do nádorových buniek, kde dôjde k ich redukcii a uvoľnení aktívnych Pt(II) foriem spolu s aktívnymi molekulami axiálnych ligandov. Na zahraničnom pracovisku prof. D. Gibsona z *Hebrew University of Jerusalem* v Izraeli bola syntetizovaná nová skupina Pt(IV) derivátov oxaliplatiny, s dvomi axiálnymi hydroxido ligandami ($[Pt(dach)(OH)_2(ox)]$, $dach = R,R-1,2$ -diaminocyklohexán, $ox = oxalát$), s jedným axiálnym hydroxido a s jedným axiálnym DCA ligandom ($[Pt(dach)(DCA)(OH)(ox)]$), alebo s dvomi axiálnymi DCA ligandami ($[Pt(dach)(DCA)_2(ox)]$) (*Obrázok 21*). Dichlóracetátové (DCA) ligandy boli vybrané kvôli preukázaným protinádorovým účinkom DCA, spojeným so zmenami metabolizmu a mitochondriálnej funkcie v

nádoroch [207, 208].

Cytotoxicity komplexov boli stanovené v piatich nádorových bunčných líniách pomocou MTT testu a boli porovnané s účinkami samotnej oxaliplatiny a voľného DCA. Výsledky ukázali, že cytotoxicita voľného DCA je približne o tri rády vyššia ako cytotoxicita oxaliplatiny. Kvôli prítomnosti biologicky neaktívnych axiálnych hydroxido ligandov bola cytotoxicita komplexu $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{OH})_2(\text{ox})]$ nižšia než cytotoxicita oxaliplatiny. Nahradenie axiálnych hydroxido ligandov za DCA ligandy spôsobilo výrazne zvýšenie cytotoxických účinkov, a to úmerne k ich počtu. Komplex $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ vykazoval vyššiu cytotoxicitu ako komplex $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})(\text{OH})(\text{ox})]$, a dokonca vyššiu ako samotná oxaliplatina. Navyše, vrodenná a získaná rezistencia nádorových buniek voči cisplatine a oxaliplatine bola prekonaná ako dôsledok transformácie oxaliplatiny na $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$.

Pre zistenie možného vzťahu medzi akumuláciou a cytotoxicitou komplexov v nádorových bunkách bola určená ich bunčná koncentrácia v rôznych časoch. Experimenty ukázali, že akumulácia Pt(IV) komplexov v nádorových bunkách rastie s počtom axiálnych DCA ligandov, a to vo všetkých časových intervaloch. Prítomnosť DCA ligandov zvyšuje lipofilitu komplexov, a určuje tak mieru ich pasívneho transportu do vnútra buniek. Cytotoxické účinky komplexov v nádorových bunkách teda korelujú s ich akumuláciou. Výsledky ďalej naznačujú, že mechanizmy bunčnej akumulácie študovaných komplexov sú odlišné od mechanizmov oxaliplatiny a pomáhajú komplexom prekonať platinovú rezistenciu nádorových buniek.

Ďalšie štúdie boli zamerané na určenie možných účinkov molekúl DCA, dopravených do nádorových buniek ako súčasť Pt(IV) konjugátov s oxaliplatinou. Analýza mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$) nádorových buniek SW480 odhadila, že $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ spôsobuje výraznú redukciu $\Delta\psi_m$ v porovnaní s bunkami vystavenými oxaliplatine, cisplatine alebo $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{OH})_2(\text{ox})]$. Ako pozitívna kontrola voľný DCA skutočne spôsobil pokles $\Delta\psi_m$, avšak pri koncentrácii, ktorá bola o tri rády vyššia ako koncentrácia $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$. Podobné výsledky boli získané aj pri stanovení účinkov $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ na inhibíciu aeróbnej glykolýzy v SW480 bunkách. Výsledky týchto štúdií ukazujú, že $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ ovplyvňuje mitochondriálne a metabolické funkcie nádorových buniek, pravdepodobne vďaka metabolicky aktívnemu DCA, dopravenému do buniek vo forme axiálnych ligandov. Zaujímavosťou je, že $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ spôsobuje významnú indukciu autofágie v bunkách HCT116, pričom štatisticky významné účinky oxaliplatiny v týchto bunkách

neboli pozorované. Mechanizmus cytotoxicity [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] teda môže súvisieť s autofágiou, ako už bolo pozorované aj u iných platinových komplexov [113, 114].

Nedávne štúdie ukázali, že protinadorové účinky oxaliplatiny a DCA môžu byť posilnené v kombinácii s 5-fluorouracilom (5-FU) [209, 210]. Toto pozorovanie viedlo k štúdiu cytotoxických účinkov oxaliplatiny a [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] v zmesi s externým 5-FU. Cytotoxicita zmesi [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] s 5-FU v bunkách HCT116 bola mierne vyššia ako cytotoxicita zmesi oxaliplatiny s 5-FU. Navyše, cytotoxicity oboch zmesí boli vyššie ako cytotoxicity samotnej oxaliplatiny, samotného [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] či samotného 5-FU. Metóda kombinačných indexov (CI) potvrdila, že účinky oxaliplatiny a [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] v kombinácii s 5-FU sú synergické.

4.3 Zvýšenie chemoterapeutickej odpovede nádorových buniek prostredníctvom cieľeného transportu platinových liečiv vysoko stabilnými multifunkčnými magnetickými nanočasticami pokrytými karboxymetylcelulózou (PUBLIKÁCIA Č. 3)

Použitie nanočastíc, riadených externým magnetickým poľom, predstavuje inovatívnu stratégiu pri cieľenom transporte látok do špecifických oblastí tela. Tieto nanočastice by mohli byť použité k aplikácii protinadorových liečiv a ich lokalizácii do cieľových nádorov, čím by došlo k značnému zníženiu vedľajších účinkov spojených s chemoterapiou. V tejto práci boli študované magnetické nanočastice stabilizované karboxymetylcelulózou (cMNPs, *Obrázok 22*), ktoré boli pripravené skupinou prof. R. Zbořila z *Regionálneho centra pokročilých technológií a materiálov* v Olomouci. Nanočastice boli konjugované k cisplatine (cMNPs-cisPt) a následne modifikované kyselinou listovou (cMNPs-cisPt-FA) alebo fluorescenčným činidlom Alexa Fluor 488 (cMNPs-cisPt-Alexa). Kyselina listová (FA) má vysokú afinitu k folátovým receptorom, nadmerne exprimovaným na povrchu niektorých nádorových buniek, a môže tak pomôcť pri cieľenom transporte nanočastíc do nádorov [211]. Modifikácia činidlom Alexa navyše umožňuje fluorescenčnú detekciu nanočastíc vo vnútri buniek.

Cytotoxické účinky študovaných nanočastíc boli stanovené v paneli nádorových buniek, bežne používaných k štúdiu cytotoxických účinkov komplexov prechodných kovov. Výsledky ukázali, že všetky cMNPs-cisPt majú významnú aktivitu v nádorových bunkách. Cytotoxicity nanočastíc cMNPs-cisPt, cMNPs-cisPt-FA a cMNPs-cisPt-Alexa, v bunkách A2780 a SW480 (senzitívnych voči cisplatine), boli približne 2-krát vyššie než cytotoxicita cisplatiny. Cytotoxicity v bunkách A2780cisR

a MCF-7, so získanou a vrodenu rezistenciou voči cisplatine, boli dokonca ešte signifikantnejšie v porovnaní s cisplatinou (asi 30-krát pre A2780cisR, 2.3-krát pre MCF-7). Ďalej bolo zistené, že modifikácia cMNPs-cisPt pomocou FA a Alexa nemá výrazný vplyv na výslednú cytotoxicitu nanočastíc. Okrem toho, samotné cMNPs neboli cytotoxické v žiadnej z použitých bunčných línií, a teda konjugácia cisplatiny hrá dôležitú úlohu pri cytotoxických účinkoch nanočastíc.

Na rozdiel od výrazných cytotoxických účinkov v nádorových bunkách, boli cytotoxicity študovaných cMNPs-cisPt v nenádorových bunkách MRC-5 pd30 o jeden až dva rády nižšie. Nanočastice tak vykazujú selektivitu voči nádorovým bunkám. Získané výsledky naznačujú, že konjugácia platinových liečiv s magnetickými nanočasticami môže viesť k unikátnym protinádorovým účinkom, schopným prekonať rezistenciu nádorových buniek voči platinovej chemoterapii a potlačiť jej vedľajšie účinky.

4.4 Vplyv väzby redukovaného NAMI-A k ľudskému sérovému albumínu na farmakokinetiku a biologickú aktivitu (PUBLIKÁCIA Č. 5)

NAMI-A je jedným z dvoch ruthéniových komplexov testovaných v klinických skúškach. Schopnosť NAMI-A selektívne inhibovať rast nádorových metastáz je považovaná za unikátnu terapeutickú vlastnosť. Nanešťastie, existuje len málo údajov o mechanizmoch účinku a správaní NAMI-A po jeho aplikácii do krvného obehu. Keďže chemické modifikácie zodpovedné za antimetastatickú aktivitu NAMI-A nie sú známe, akákoľvek informácia o štruktúrnom stave alebo biologickej interakcii, môže pomôcť pri identifikácii aktívnych foriem NAMI-A a prípadnom zlepšení terapeutického účinku. V rámci vedecko-výskumnej zahraničnej stáže, na pracovisku prof. G. Savu z *University of Trieste* v Taliansku, bol skúmaný vplyv kyseliny askorbovej a ľudského sérového albumínu (HSA) na antimetastatický potenciál NAMI-A. Kyselina askorbová je významne biologické redukčné činidlo, pričom existuje možnosť, že NAMI-A podlieha jej redukcii po aplikácii do krvného obehu. Takto redukovaná forma by mohla interagovať s HSA, ktorý je najzastúpenejším proteínom v krvnej plazme.

Pre simuláciu a vyhodnotenie metastatickej kapacity nádorov bol použitý test adhézie vysoko invazívnych buniek nádoru pfs MDA-MB-231. Test ukázal, že HSA nemá významný účinok na adhéziu buniek k rastovému substrátu. Naopak, účinok NAMI-A spôsobuje signifikantnú inhibíciu bunecnej adhézie, približne o 80% oproti kontrolným bunkám. Adukty NAMI-A-HSA inhibujú bunecnú adhéziu menej

než samotné NAMI-A, a to nezávisle na koncentračnom pomere NAMI-A:HSA. Tvorba aduktov s HSA však spôsobuje štatisticky významnú inhibíciu bunečnej adhézie (60-70%) v porovnaní s kontrolou. V podmienkach bunečného stresu, ako je napríklad rast nádorového tkaniva, bunky vo zvýšenej miere konzumujú albumín [212]. Je teda možné, že adukty NAMI-A s albumínom tvoria spoločný transportný systém, umožňujúci dopravenie liečiva do nádorových metastáz. Absencia závislosti inhibičných účinkov aduktov na koncentračnom pomere NAMI-A:HSA naznačuje, že veľkosť aplikovanej dávky NAMI-A do krvného obehu by mohla byť nepodstatná pre výsledný farmakologický účinok.

Experimenty ďalej ukázali, že redukcia NAMI-A kyselinou askorbovou je zodpovedná za mierne zlepšenie antiadhézných účinkov. Tieto výsledky sú konzistentné s in vivo účinkami na pľúcne metastázy, kedy bolo NAMI-A zámerne redukované tesne pred aplikáciou do pokusných zvierat [213]. Redukcia NAMI-A kyselinou askorbovou v prítomnosti nadbytku HSA spôsobila výraznú inhibíciu bunečnej adhézie, približne o 60% oproti kontrolným bunkám. Tento účinok je porovnateľný s účinkom spôsobeným aduktami NAMI-A-HSA v absencii redukčného činidla.

Získané výsledky podporujú teóriu o tom, že NAMI-A po aplikácii do krvného obehu interaguje s plazmatickými proteínmi, pričom ich adukty môžu byť zodpovedné za selektívne protimetastatické účinky. Redukcia NAMI-A zrejme uľahčuje formovanie aduktov, a ovplyvňuje tak celkovú farmakologickú aktivitu.

4.5 Protinádorovo účinné extranukleárne luminiscenčné Ir(III) komplexy obsahujúce ligandy na báze benzimidazolu s možnosťou ďalšej funkcionalizácie (PUBLIKÁCIA Č. 2)

V snahe vyvinúť nové a účinnejšie protinádorové liečivá na báze prechodných kovov sa pozornosť upriamila aj na komplexy irídia. Na zahraničnom pracovisku prof. J. Ruiza z *University of Murcia* v Španielsku boli syntetizované tri skupiny substitučne inertných a luminiscenčných Ir(III) komplexov typu $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]$, obsahujúce ligandy rôzne modifikovaného benzimidazolu (*Obrázok 24*). Výsledky bunečných experimentov ukázali, že niektoré z týchto komplexov vykazujú cytotoxicitu a nádorovú selektivitu, ktorá je mnohonásobne vyššia než u klinicky používanej cisplatiny.

Lipofilita komplexov prechodných kovov je často spájaná so zvýšenou

akumuláciou a aktivitou v nádorových bunkách. Pre štúdium mechanizmov cytotoxických účinkov a bunečnej akumulácie študovaných Ir(III) komplexov, bola stanovená miera ich lipofility pomocou rozdeľovacích koeficientov ($\log P$). Hodnoty $\log P$ dvoch najaktívnejších komplexov **2a** a **3a** sú približne rovnaké a poukazujú na značne lipofilný charakter ($\log P > 0$). Keďže cisplatina je známa svojim hydrofilným charakterom ($\log P < 0$), rozdiel v cytotoxických účinkoch medzi cisplatinou a Ir(III) komplexami môže súvisieť s rozdielom v ich charaktere a bunečnej akumulácii. K podpore tejto hypotézy bola stanovená akumulácia študovaných komplexov v nádorových bunkách pŕs MCF-7. Experimenty ukázali, že bunečná akumulácia komplexov **2a** a **3a** je približne 8-krát vyššia než akumulácia cisplatiny a skutočne koreluje s ich cytotoxicitou. Okrem toho, väzba oboch komplexov na nukleárnu DNA bola podstatne nižšia než väzba cisplatiny, pričom rozdiely v ich väzbe na celkovú bunečnú RNA neboli štatisticky významné.

Výsledky teda naznačujú, že mechanizmus zodpovedný za cytotoxické účinky študovaných Ir(III) komplexov v nádorových bunkách je odlišný od mechanizmu cisplatiny a pravdepodobne nesúvisí s koordinačnou väzbou na nukleové kyseliny.

5 ZÁVER

Predkladaná dizertačná práca je napísaná formou súhrnu piatich uverejnených prác, zameraných na štúdium mechanizmov toxických účinkov komplexov prechodných kovov v nádorových bunkách

V snahe posilniť protinádorové účinky konvenčných platinových cytostatik bola navrhnutá a študovaná nová skupina derivátov cisplatiny obsahujúcich ligandy nesteroidného protizápalového liečiva diklofenak. Z výsledkov práce vyplýva, že tieto Pt(II) komplexy sú výrazne aktívne v paneli nádorových bunčných línií, dokonca aktívnejšie než samotná cisplatina, a to i v rezistentných nádorových bunkách. Komplex **3**, obsahujúci dva ligandy diklofenaku, sa vyznačuje aktivitou v COX-2 pozitívnych bunkách a zvýšenou bunčnou akumuláciou. Mimo klasických účinkov spojených s väzbou na nukleárnu DNA, komplex **3** ovplyvňuje bunčný metabolizmus glukózy a spôsobuje kolaps mitochondriálneho membránového potenciálu v nádorových bunkách. Ligandy diklofenaku navyše prispievajú k schopnosti komplexu blokať bunčný cyklus nádorových buniek a potláčať ich metastatický potenciál. Konjugácia Pt(II) komplexov s biologicky aktívnymi molekulami, akými sú napríklad NSAID, môže viesť k vzniku potenciálnych terapeutických látok s unikátnymi mechanizmami protinádorového a protimetastatického účinku.

Platičité deriváty oxaliplatiny, s axiálnymi ligandami metabolicky aktívneho dichlóracetátu, predstavujú novú triedu platinových komplexov so sľubnými terapeutickými účinkami. Experimentálne výsledky naznačujú, že tieto Pt(IV) komplexy majú protinádorový mechanizmus spojený s účinkami na mitochondriálnej funkcii, metabolizmus glukózy a autofágiu v nádorových bunkách. Okrem toho sú komplexy schopné prekonať rezistenciu nádorových buniek voči oxaliplatine a cisplatine. Cytotoxické účinky komplexov môžu byť navyše posilnené v kombinácii s 5-fluorouracilom. Pt(IV) komplexy s biologicky aktívnymi ligandami v axiálnej pozícii tak predstavujú koncept efektívnejších protinádorových liečiv, schopných prekonať nedostatky konvenčných platinových cytostatik.

V ďalšej časti práce bola študovaná nová skupina magnetických nanočastíc stabilizovaných karboxymetylcelulózou, s možnosťou ich lokalizácie pomocou magnetického poľa. Nanočastice boli modifikované cisplatinou a boli stanovené ich cytotoxické účinky v paneli bunčných línií. Výsledky experimentov ukazujú,

že takto modifikované nanočastice majú výrazne vyššiu aktivitu než samotná cisplatina a to vo všetkých testovaných nádorových líniiach, vrátane buniek rezistentných voči cisplatine. Navyiac, nanočastice nie sú cytotoxické v nenádorových bunkách, a vykazujú teda nádorovú selektivitu. Bolo zistené, že konjugácia modifikovaných nanočastíc ku kyseline listovej alebo fluorescenčnému činidlu Alexa nemá vplyv na ich výslednú aktivitu. Pre porovnanie boli použité nanočastice bez modifikácie cisplatinou, ktoré nevykazujú takmer žiadne cytotoxické účinky. Chemoterapia na báze magnetických nanočastíc predstavuje koncept selektívneho transportu protinádorových liečiv do cieľových nádorov, s potenciálom výrazne zvýšiť ich efektivitu a potlačiť nežiadúce účinky.

V rámci vedecko-výskumnej zahraničnej stáže bol skúmaný vplyv kyseliny askorbovej a ľudského sérového albumínu na antimetastatické účinky klinicky testovaného ruthéniového komplexu NAMI-A. Bolo ukázané, že formovanie aduktov s ľudským albumínom výrazne znižuje účinky NAMI-A na adhéziu nádorových buniek. Naopak, redukcia kyselinou askorbovou spôsobuje posilnenie antiadhézneho účinku NAMI-A, v súlade s in vivo experimentami. Redukcia NAMI-A v prítomnosti nadbytku ľudského albumínu nemá významný vplyv na adhézne účinky vzniknutých aduktov, ale uľahčuje ich formovanie. Napriek tomu, že NAMI-A po aplikácii do krvného obehu pravdepodobne interaguje s plazmatickými proteínmi, ich konjugácia môže prispieť k selektívnemu transportu komplexu do nádorových metastáz a k zlepšeniu jeho farmakologických vlastností. Identifikácia chemických modifikácií NAMI-A, zodpovedných za jeho antimetastatické účinky, poskytuje užitočné informácie potrebné pre ďalší výskum.

V neposlednom rade bola študovaná nová skupina substitučne inertných a luminiscenčných irídiových komplexov typu $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]$ obsahujúcich ligandy na báze benzimidazolu. Výsledky mechanistických štúdií ukázali, že akumulácia týchto Ir(III) komplexov v nádorových bunkách je signifikantne vyššia ako akumulácia cisplatiny, pričom koreluje s ich lipofilným charakterom a cytotoxickými účinkami. Kvantifikácia väzby komplexov na nukleárnu DNA a celkovú bunecnú RNA v nádorových bunkách naznačuje, že mechanizmus zodpovedný za cytotoxické účinky komplexov je odlišný od mechanizmu cisplatiny a nesúvisí s koordinačnou väzbou na nukleové kyseliny.

Prínosom dizertačnej práce bolo zdokonalenie poznatkov potrebných k vývoju nových účinnejších a bezpečnejších protinádorových liečiv na báze komplexov

prechodných kovov, ale aj inovatívnych systémov určených pre ich cielený transport. Štúdie mechanizmov toxických účinkov nových metalokomplexov prispeli k riešeniu rady projektov zameraných na problematiku molekulárnej biofyziky a farmakológie.

6 ZOZNAM CITOVANEJ LITERATÚRY

- [1] L. Kelland, „The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy,“ *Nature Reviews Cancer*, zv. 7, pp. 573-584, 2007.
- [2] T. C. Johnstone, K. Suntharalingam a S. J. Lippard, „The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(VI) Prodrugs,“ *Chemical Reviews*, zv. 116, pp. 3436-3486, 2016.
- [3] D. Lebwohl a R. Canetta, „Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: An Historical Perspective and an Update,“ *European Journal of Cancer*, zv. 34, pp. 1522-1534, 1998.
- [4] B. Rosenberg, „Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the Search Goes On,“ rev. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Zürich, Lippert, B., Ed.; Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999.
- [5] M. J. Cleare a J. D. Hoeschele, „Studies on the Antitumor Activity of Group VIII Transition Metal Complexes. Part 1. Platinum(II) Complexes,“ *Bioinorganic Chemistry*, zv. 2, pp. 187-210, 1973.
- [6] D. S. Alberts a R. T. Dorr, „New Perspectives on an Old Friend: Optimizing Carboplatin for the Treatment of Solid Tumors,“ *Oncologist*, zv. 3, pp. 15-34, 1998.
- [7] K. Aabo, M. Adams, P. Adnitt, D. S. Alberts, A. Athanazziou, V. Barley, D. R. Bell, U. Bianchi, G. Bolis, M. F. Brady, H. S. Brodovsky a e. al, „Chemotherapy in Advanced Ovarian Cancer: Four Systematic Meta-Analyses of Individual Patient Data from 37 Randomized Trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group,“ *British Journal of Cancer*, zv. 78, pp. 1479-1487, 1998.
- [8] F. Levi, G. Metzger, C. Massari a G. Milano, „Oxaliplatin: Pharmacokinetics and Chronopharmacological Aspects,“ *Clinical Pharmacokinetics*, zv. 38, pp. 1-21, 2000.
- [9] J. Graham, M. Muhsin a P. Kirkpatrick, „Fresh from the Pipeline: Oxaliplatin,“ *Nature Reviews Drug Discovery*, zv. 3, pp. 11-12, 2004.
- [10] J. L. Misset, H. Bleiberg, W. Sutherland, M. Bekradda a E. Cvitkovic, „Oxaliplatin Clinical Activity: A Review,“ *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, zv. 35, pp. 75-93, 2000.
- [11] T. C. Johnstone, K. Suntharalingam a S. J. Lippard, „Third Row Transition Metals for the Treatment of Cancer,“ *Philosophical Transactions of the Royal Society, A*, zv. 373, p. 20140185, 2015.

- [12] V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo a J. M. Perez, „Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity,“ *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, zv. 7, pp. 3-18, 2007.
- [13] D. P. Gately a S. B. Howell, „Cellular Accumulation of the Anticancer Agent Cisplatin: A Review,“ *British Journal of Cancer*, zv. 67, pp. 1171-1176, 1993.
- [14] G. R. Gale, C. R. Morris, L. M. Atkins a A. B. Smith, „Binding of an Antitumor Platinum Compound to Cells as Influenced by Physical Factors and Pharmacologically Active Agents.,“ *Cancer Research*, zv. 33, pp. 813-818, 1973.
- [15] M. Ogawa, G. R. Gale a S. S. Keirn, „Effects of cis-Diamminedichloroplatinum (NSC 119875) on Murine and Human Hemopoietic Precursor Cells,“ *Cancer Research*, zv. 35, pp. 1398-1401, 1975.
- [16] P. A. Andrews, S. C. Mann, S. Velury a S. B. Howell, „Cisplatin Uptake Mediated Cisplatin-Resistance in Human Ovarian Carcinoma Cells,“ rev. *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, Boston, Nicoli, M., Ed.; Springer US, 1988.
- [17] S. B. Howell, R. Safaei, C. A. Larson a M. J. Sailor, „Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs,“ *Molecular Pharmacology*, zv. 77, pp. 887-894, 2010.
- [18] S. Zhang, K. S. Lovejoy, J. E. Shima, L. L. Lagpacan, Y. Shu, A. Lapuk, Y. Chen, T. Komori, J. W. Gray, X. Chen, S. J. Lippard a K. M. Giacomini, „Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity,“ *Cancer Research*, zv. 66, pp. 8847-8857, 2006.
- [19] I. Judson a L. R. Kelland, „New developments and approaches in the platinum arena,“ *Drugs*, zv. 59, pp. 29-36, 2000.
- [20] E. R. Jamieson a S. J. Lippard, „Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts,“ *Chemical Reviews*, zv. 99, pp. 2467-2489, 1999.
- [21] S. E. Miller a D. A. House, „The Hydrolysis Products of Cis-diamminedichloroplatinum(II) 5.,“ *Inorganica Chimica Acta*, zv. 187, pp. 125-132, 1991.
- [22] A. J. Di Pasqua, D. J. Kerwood, Y. Shi, J. Goodisman a J. C. Dabrowiak, „Stability of Carboplatin and Oxaliplatin in Their Infusion Solutions Is Due to Self-Association,“ *Dalton Transactions*, zv. 40, pp. 4821-4825, 2011.
- [23] P. Jordan a M. Carmo-Fonseca, „Molecular Mechanisms Involved in Cisplatin Cytotoxicity.,“ *Cellular and Molecular Life Sciences*, zv. 57, pp. 1229-1235, 2000.
- [24] M. Akaboshi, K. Kawai, Y. Ujeno, S. Takada a T. Miyahara, „Binding Characteristics of (-)-(R)-2-aminomethylpyrrolidine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-2-platinum(II) to DNA, RNA and Protein Molecules

- in HeLa Cells and Its Lethal Effect: Comparison with Cis- and Trans-diamminedichloroplatinums(II).," *Japanese Journal of Cancer Research* , zv. 85, pp. 106-111, 1994.
- [25] M. A. Fuertes, C. Alonso a J. M. Perez, „Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance,“ *Chemical Reviews*, zv. 103, pp. 645-662, 2003.
- [26] T. Peleg-Shulman a D. Gibson, „Cisplatin–Protein Adducts Are Efficiently Removed by Glutathione but Not by 5'-Guanosine Monophosphate,“ *Journal of the American Chemical Society*, zv. 123, pp. 3171-3172, 2001.
- [27] D. Payet, F. Gaucheron, M. Sip a M. Leng, „Instability of the Monofunctional Adducts in Cis-[Pt(NH₃)₂(N7-N-Methyl-2-Diazapyrenium)Cl](2+)-Modified DNA: Rates of Cross-Linking Reactions in Cis-Platinum-Modified DNA,“ *Nucleic Acids Research*, zv. 21, p. 5846–5851, 1993.
- [28] A. J. Danford, D. Wang, Q. Wang, T. T. D. a L. S. J., „Platinum Anticancer Drug Damage Enforces a Particular Rotational Setting of DNA in Nucleosomes,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, zv. 102, p. 12311–12316, 2005.
- [29] A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. J. den Hartog, P. H. M. Lohman a J. Reedijk, „Adducts of the Antitumor Drug cis-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation, Identification, and Quantitation,“ *Biochemistry*, zv. 24, pp. 707-713, 1985.
- [30] M. Kartalou a J. M. Essigmann, „Recognition of Cisplatin Adducts by Cellular Proteins,“ *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, zv. 478, pp. 1-21, 2001.
- [31] F. A. Blommaert, H. C. M. van Dijk-Knijenburg, F. J. Dijt, L. den Engelse, R. A. Baan, F. Berends a A. M. J. Fichtinger-Schepman, „Formation of DNA Adducts by the Anticancer Drug Carboplatin: Different Nucleotide Sequence Preferences in Vitro and in Cells,“ *Biochemistry*, zv. 34, pp. 8474-8480, 1995.
- [32] J. M. Woynarowski, W. G. Chapman, C. Napier, M. C. Herzig a P. Juniewicz, „Sequence- and Region-Specificity of Oxaliplatin Adducts in Naked and Cellular DNA,“ zv. 54, %1. vyd. 770-777, 1998.
- [33] X. L. Yang a A. H. Wang, „Structural Studies of Atom-Specific Anticancer Drugs Acting on DNA,“ *Pharmacology & Therapeutics*, zv. 83, pp. 181-215, 1999.
- [34] M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso a J. M. Perez, „Novel Concepts in the Development of Platinum Antitumor Drugs,“ *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, zv. 2, pp. 539-551, 2002.
- [35] D. Wang a S. J. Lippard, „Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs,“ *Nature Reviews Drug Discovery* , zv. 4, pp. 307-320, 2005.

- [36] C. A. Rabik a M. E. Dolan, „Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents,“ *Cancer Treatment Reviews*, zv. 33, pp. 9-23, 2007.
- [37] N. Graf, W. H. Ang, G. Zhu, M. Myint a S. J. Lippard, „Role of Endonucleases XPF and XPG in Nucleotide Excision Repair of Platinated DNA and Cisplatin/Oxaliplatin Cytotoxicity,“ *ChemBioChem*, zv. 12, pp. 1115-1123, 2011.
- [38] M. E. Bianchi, M. Beltrame a G. Paonessa, „Specific Recognition of Cruciform DNA by Nuclear Protein HMG1,“ *Science*, zv. 243, pp. 1056-1059, 1989.
- [39] J. O. Thomas a A. A. Travers, „HMG1 and 2, and Related Architectural DNA-Binding Proteins,“ *Trends in Biochemical Sciences*, zv. 26, pp. 167-174, 2001.
- [40] P. M. Pil a S. J. Lippard, „Specific Binding of Chromosomal Protein HMG1 to DNA Damaged by the Anticancer Drug Cisplatin,“ *Science*, zv. 256, pp. 234-237, 1992.
- [41] S. Park a S. J. Lippard, „Redox State-Dependant Interaction of HMGB1 and Cisplatin-Modified DNA,“ *Biochemistry*, zv. 50, pp. 2567-2574, 2011.
- [42] R. C. Todd a S. J. Lippard, „Inhibition of Transcription by Platinum Antitumor Compounds,“ *Metallomics*, zv. 1, pp. 280-291, 2009.
- [43] B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright a J. R. Aldrich-Wright, „Metal Complex Interactions with DNA,“ *Dalton Transactions*, zv. 44, pp. 3505-3526, 2015.
- [44] M. C. Walker, C. N. Parris a J. R. Masters, „Diferential Sensitivities of Human Testicular and Bladder Tumor Cell Lines to Chemotherapeutic Drugs,“ *Journal of the National Cancer Institute*, zv. 79, pp. 213-216, 1987.
- [45] L. R. Kelland, P. Mistry, G. Abel, S. Y. Loh, C. F. O'Neill, B. A. Murrer a K. R. Harrap, „Mechanism-Related Circumvention of Ccquired Cis-Diamminedichloroplatinum(II) Resistance Using Two Pairs of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines by Ammine/Amine Platinum(IV) Dicarboxylates,“ *Cancer Research*, zv. 52, pp. 3857-3864, 1992.
- [46] X. J. Liang, D. W. Shen, S. Garfield a M. M. Gottesman, „Mislocalization of Membrane Proteins Associated with Multidrug Resistance in Cisplatin-Resistant Cancer Cell Lines,“ *Cancer Research*, zv. 63, pp. 5909-5916, 2003.
- [47] D. W. Shen, X. J. Liang, M. A. Gawinowicz a M. M. Gottesman, „Identification of Cytoskeletal [14C]Carboplatin-Binding Proteins Reveals Reduced Expression Expression and Disorganization of Actin and Filamin in Cisplatin-Resistant Cell Lines,“ *Molecular Pharmacology*, zv. 66, p. 789-793, 2004.
- [48] K. Katano, A. Kondo, R. Safaei, A. Holzer, G. Samimi, M. Mishima, Y. M. Kuo, M. Rochdi a S. B. Howell, „Acquisition of Resistance to Cisplatin Is Accompanied

- by Changes in the Cellular Pharmacology of Copper," *Cancer Research*, zv. 62, p. 6559–6565, 2002.
- [49] A. K. Holzer, G. Samimi, K. Katano, W. Naerdemann, X. Lin, R. Safaei a S. B. Howell, „The Copper Influx Transporter Human Copper Transport Protein 1 Regulates the Uptake of Cisplatin in Human Ovarian Carcinoma Cells," *Molecular Pharmacology*, zv. 66, pp. 817-823, 2004.
- [50] G. Samimi, K. Katano, A. K. Holzer, R. Safaei a S. B. Howell, „Modulation of the Cellular Pharmacology of Cisplatin and Its Analogs by the Copper Exporters ATP7A and ATP7B," *Molecular Pharmacology*, zv. 66, pp. 25-32, 2004.
- [51] G. Samimi, N. M. Varki, S. Wilczynski, R. Safaei, D. S. Alberts a S. B. Howell, „Increase in Expression of the Copper Transporter ATP7A During Platinum Drug-Based Treatment is Associated with Poor Survival in Ovarian Cancer Patients," *Clinical Cancer Research*, zv. 9, pp. 5853-5859, 2003.
- [52] K. Nakayama, A. Kanzaki, K. Ogawa, K. Miyazaki, N. Neamati a Y. Takebayashi, „Copper-Transporting P-Type Adenosine Triphosphatase (ATP7B) As A Cisplatin Based Chemoresistance Marker in Ovarian Carcinoma: Comparative Analysis with Expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP," *International Journal of Cancer*, zv. 101, pp. 488-495, 2002.
- [53] P. Borst, S. Rottenberg a J. Jonkers, „How Do Real Tumors Become Resistant to Cisplatin?," *Cell Cycle*, zv. 7, pp. 1353-1359, 2008.
- [54] P. V. Korita, T. Wakai, Y. Shirai, Y. Matsuda, J. Sakata, M. Takamura, M. Yano, A. Sanpei, Y. Aoyagi, K. Hatakeyama a Y. Ajioka, „Multidrug Resistance-Associated Protein 2 Determines the Efficacy of Cisplatin in Patients with Hepatocellular Carcinoma," *Oncology Reports*, zv. 23, pp. 965-972, 2010.
- [55] M. Kool, M. de Haas, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, M. J. van Eijk, J. A. Juijn, F. Baas a P. Borst, „Analysis of Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-Associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines," *Cancer Research*, zv. 57, pp. 3537-3547, 1997.
- [56] M. Sakamoto, A. Kondo, K. Kawasaki, T. Goto, H. Sakamoto, K. Miyake, Y. Koyamatsu, T. Akiya, H. Iwabuchi, T. Muroya, K. Ochiai, T. Tanaka, Y. Kikuchi a Y. Tenjin, „Analysis of Gene Expression Profiles Associated with Cisplatin Resistance in Human Ovarian Cancer Cell Lines and Tissues Using cDNA Microarray," *Human Cell*, zv. 14, pp. 305-315, 2001.
- [57] M. Li, C. Balch, J. S. Montgomery, M. Jeong, J. H. Chung, P. Yan, T. Huang, S. Kim a K. P. Nephew, „Integrated Analysis of DNA Methylation and Gene Expression Reveals Specific Signaling Pathways Associated with Platinum Resistance in Ovarian Cancer," *BMC Medical Genomics*, zv. 2, 2009.

- [58] J. J. Kavanagh, D. M. Gershenson, H. Choi, L. Lewis, K. Patel, G. L. Brown, A. Garcia a D. R. Spriggs, „Multi-Institutional Phase 2 Study of TLK286 (TELCYTA, A Glutathione S-Transferase P1-1 Activated Glutathione Analog Prodrug) in Patients with Platinum and Paclitaxel Refractory or Resistant Ovarian Cancer,“ *International Journal of Gynecological Cancer*, zv. 15, pp. 593-600, 2005.
- [59] I. Vergote, N. Finkler, J. del Campo, A. Lohr, J. Hunter, D. Matei, J. Kavanagh, J. B. Vermorken, L. Meng, M. Jones, G. Brown a S. Kaye, „Phase 3 Randomised Study of Canfosfamide (Telcyta, TLK286) Versus Pegylated Liposomal Doxorubicin or Topotecan As Third-Line Therapy in Patients with Platinum-Refractory or -Resistant Ovarian Cancer,“ *European Journal of Cancer*, zv. 45, pp. 2324-2332, 2009.
- [60] P. Rose, R. Edwards, N. Finkler, M. Seiden, L. Duska a C. Krasner, „Phase 3 Study: Canfosfamide (C, TLK286) Plus Carboplatin (P) Vs Liposomal Doxorubicin (D) As 2nd Line Therapy of Platinum (P) Resistant Ovarian Cancer (OC),“ *Journal of Clinical Oncology*, zv. 25, p. 281s., 2007.
- [61] I. Vergote, N. J. Finkler, J. B. Hall, O. Melnyk, R. P. Edwards, M. Jones, J. G. Keck, L. Meng, G. L. Brown, E. M. Rankin, J. J. Burke a R. V. Boccia, „Randomized Phase III Study of Canfosfamide in Combination With Pegylated Liposomal Doxorubicin Compared With Pegylated Liposomal Doxorubicin Alone in Platinum-Resistant Ovarian Cancer,“ *International Journal of Gynecological Cancer*, zv. 20, pp. 772-780, 2010.
- [62] E. Reed, „Platinum-DNA Adduct, Nucleotide Excision Repair and Platinum Based Anti-Cancer Chemotherapy,“ *Cancer Treatment Reviews*, zv. 24, pp. 331-344, 1998.
- [63] M. Dabholkar, J. Vionnet, F. Bostick-Bruton, J. J. Yu a E. Reed, „Messenger RNA Levels of XPAC and ERCC1 in Ovarian Cancer Tissue Correlate with Response to Platinum-Based Chemotherapy,“ *Journal of Clinical Investigation*, zv. 94, pp. 703-708, 1994.
- [64] M. Selvakumaran, D. A. Pisarcik, R. Bao, A. T. Yeung a T. C. Hamilton, „Enhanced Cisplatin Cytotoxicity by Disturbing the Nucleotide Excision Repair Pathway in Ovarian Cancer Cell Lines,“ *Cancer Research*, zv. 63, pp. 1311-1316, 2003.
- [65] S. Smith, D. Su, I. A. Rigault de la Longrais, P. Schwartz, M. Puopolo, T. J. Rutherford, G. Mor, H. Yu a D. Katsaros, „ERCC1 Genotype and Phenotype in Epithelial Ovarian Cancer Identify Patients Likely to Benefit from Paclitaxel Treatment in Addition to Platinum-Based Therapy,“ *Journal of Clinical Oncology*, zv. 25, pp. 5172-5179, 2007.

- [66] I. Diaz-Padilla a A. Poveda, „DNA Repair–Based Mechanisms of Platinum Resistance in Epithelial Ovarian Cancer: From Bench to Bedside,“ *Clinical Ovarian and Other Gynecologic Cancer*, zv. 3, pp. 29-35, 2010.
- [67] D. A. Anthony a S. B. Kaye, „Drug Resistance : The Clinical Perspective,“ *Methods in Molecular Medicine*, zv. 28, pp. 1-15, 1999.
- [68] G. Samimi, D. Fink, N. M. Varki, A. Husain, W. J. Hoskins, D. S. Alberts a S. B. Howell, „Analysis of MLH1 and MSH2 Expression in Ovarian Cancer Before and After Platinum Drug-Based Chemotherapy,“ *Clinical Cancer Research*, zv. 6, pp. 1415-1421, 2000.
- [69] J. Helleman, I. L. van Staveren, W. N. Dinjens, P. F. van Kuijk, K. Ritstier, P. C. Ewing, M. E. van der Burg, G. Stoter a E. M. Berns, „Mismatch Repair and Treatment Resistance in Ovarian Cancer,“ *BMC Cancer*, zv. 6, p. 201, 2006.
- [70] Y. Watanabe, M. Koi, H. Hemmi, H. Hoshai a K. Noda, „A Change in Microsatellite Instability Caused by Cisplatin-Based Chemotherapy of Ovarian Cancer,“ *British Journal of Cancer*, zv. 85, pp. 1064-1069, 2001.
- [71] D. Fink, S. Nebel, P. S. Norris, R. N. Baergen, S. P. Wilczynski, M. J. Costa, M. Haas, S. A. Cannistra a S. B. Howell, „Enrichment for DNA Mismatch Repair-Deficient Cells During Treatment with Cisplatin,“ *International Journal of Cancer*, zv. 77, pp. 741-746, 1998.
- [72] M. A. Murphy a N. Wentzensen, „Frequency of Mismatch Repair Deficiency in Ovarian Cancer,“ *International Journal of Cancer*, zv. 129, pp. 1914-1922, 2011.
- [73] R. Brown a J. A. Plumb, „Demethylation of DNA by Decitabine in Cancer Chemotherapy,“ *Expert Review of Anticancer Therapy*, zv. 4, pp. 501-510, 2004.
- [74] D. Matei, F. Fang, C. Shen, J. Schilder, A. Arnold, Y. Zeng, W. A. Berry, T. Huang a K. P. Nephew, „Epigenetic Resensitization to Platinum in Ovarian Cancer,“ *Cancer Research*, zv. 72, pp. 2197-2205, 2010.
- [75] G. Tapia a I. Diaz-Padilla, „Molecular Mechanisms of Platinum Resistance in Ovarian Cancer,“ rev. *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update*, InTech, 2013.
- [76] Y. Ben David, A. Chetrit, G. Hirsh-Yechezkel, E. Friedman, B. D. Beck, U. Beller, G. Ben-Baruch, A. Fishman, H. Levavi, F. Lubin, J. Menczer, B. Piura, J. P. Struewing a B. Modan, „Effect of BRCA Mutations on The Length of Survival in Epithelial Ovarian Tumors,“ *Journal of Clinical Oncology*, zv. 20, pp. 463-466, 2002.
- [77] I. Cass, R. L. Baldwin, T. Varkey, R. Moslehi, S. A. Narod a B. Y. Karlan, „Improved Survival in Women with BRCA-Associated Ovarian Carcinoma,“ *Cancer*, zv. 97, pp. 2187-2195, 2003.

- [78] D. S. Tan, C. Rothermundt, K. Thomas, E. Bancroft, R. Eeles, S. Shanley, A. Ardern-Jones, A. Norman, S. B. Kaye a M. E. Gore, „"BRCAness" Syndrome in Ovarian Cancer: A Case-Control Study Describing The Clinical Features and Outcome of Patients with Epithelial Ovarian Cancer Associated with BRCA1 and BRCA2 Mutations,“ *Journal of Clinical Oncology*, zv. 26, pp. 5530-5536, 2008.
- [79] D. Yang, S. Khan, Y. Sun, K. Hess, I. Shmulevich, A. K. Sood a W. Zhang, „Association of BRCA1 and BRCA2 Mutations with Survival, Chemotherapy Sensitivity, and Gene Mutator Phenotype in Patients with Ovarian Cancer,“ *The Journal of the American Medical Association*, zv. 306, pp. 1557-1565, 2011.
- [80] J. Weberpals, K. Garbuio, A. O'Brien, K. Clark-Knowles, S. Doucette, O. Antoniouk, G. Goss a J. Dimitroulakos, „The DNA Repair Proteins BRCA1 and ERCC1 As Predictive Markers in Sporadic Ovarian Cancer,“ *International Journal of Cancer*, zv. 124, pp. 806-815, 2008.
- [81] S. L. Edwards, R. Brough, C. J. Lord, R. Natrajan, R. Vatcheva, D. A. Levine, J. Boyd, J. S. Reis-Filho a A. Ashworth, „Resistance to Therapy Caused by Intragenic Deletion in BRCA2,“ *Nature*, zv. 451, pp. 1111-1115, 2008.
- [82] E. M. Swisher, W. Sakai, B. Y. Karlan, K. Wurz, N. Urban a T. Taniguchi, „Secondary BRCA1 Mutations in BRCA1-Mutated Ovarian Carcinomas with Platinum Resistance,“ *Cancer Research*, zv. 68, pp. 2581-2586, 2008.
- [83] M. S. Satoh, G. G. Poirier a T. Lindahl, „Dual Function for Poly(ADP-Ribose) Synthesis in Response to DNA Strand Breakage,“ *Biochemistry*, zv. 33, pp. 7099-7106, 1994.
- [84] H. Farmer, N. McCabe, C. J. Lord, A. N. Tutt, D. A. Johnson, T. B. Richardson, M. Santarosa, K. J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N. M. Martin, S. P. Jackson, G. C. Smith a A. Ashworth, „Targeting The DNA Repair Defect in BRCA Mutant Cells as A Therapeutic Strategy,“ *Nature*, zv. 434, pp. 917-921, 2005.
- [85] P. C. Fong, J. Spicer, S. Reade, A. Reid, L. Vidal, J. H. Schellens, A. Tutt, P. A. Harris, S. Kaye a J. S. De Bono, „Phase I Pharmacokinetic (PK) and Pharmacodynamic (PD) Evaluation of A Small Molecule Inhibitor of Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP), KU-0059436 (Ku) in Patients (P) with Advanced Tumours,“ *Journal of Clinical Oncology*, p. 3022, 2006.
- [86] S. Kummar, J. Ji, R. Morgan, H. J. Lenz, S. L. Puhalla, C. P. Belani, D. R. Gandara, D. Allen, B. Kiesel, J. H. Beumer, E. M. Newman, L. Rubinstein, A. Chen, Y. Zhang, L. Wang, R. J. Kinders, R. E. Parchment a e. al., „A Phase I Study of Veliparib in Combination with Metronomic Cyclophosphamide in Adults with Refractory Solid Tumors and Lymphomas,“ *Clinical Cancer Research*, zv. 18, pp. 1726-1734, 2012.

- [87] R. Roy, J. Chun a S. N. Powell, „BRCA1 and BRCA2: Different Roles in A Common Pathway of Genome Protection,“ *Nature Reviews Cancer*, zv. 12, pp. 68-78, 2012.
- [88] Z. H. Siddik, "Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance," *Oncogene*, vol. 22, pp. 7265-7279, 2003.
- [89] M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein a R. W. Craig, „Participation of p53 Protein in The Cellular Response to DNA Damage,“ *Cancer Research*, zv. 51, pp. 6304-6311, 1991.
- [90] W. Dempke, W. Voigt, A. Grothey, B. T. Hill a H. J. Schmoll, „Cisplatin Resistance and Oncogenes--A Review,“ *Anti-Cancer Drugs*, zv. 11, pp. 225-236, 2000.
- [91] M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein a C. C. Harris, „p53 Mutations in Human Cancers,“ *Science*, zv. 253, pp. 49-53, 1991.
- [92] T. Soussi, „The p53 Tumor Suppressor Gene: from Molecular Biology to Clinical Investigation,“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, zv. 910, pp. 121-137, 2000.
- [93] A. S. Sarkis, D. F. Bajorin, V. E. Reuter, H. W. Herr, G. Netto, Z. F. Zhang, P. K. Schultz, C. Cordon-Cardo a H. I. Scher, „Prognostic Value of p53 Nuclear Overexpression in Patients with Invasive Bladder Cancer Treated with Neoadjuvant MVAC,“ *Journal of Clinical Oncology*, zv. 13, pp. 1384-1390, 1995.
- [94] J. Houldsworth, H. Xiao, V. V. Murty, W. Chen, B. Ray, V. E. Reuter, G. J. Bosl a R. S. Chaganti, „Human Male Germ Cell Tumor Resistance to Cisplatin Is Linked to TP53 Gene Mutation,“ *Oncogene*, zv. 16, pp. 2345-2349, 1998.
- [95] A. Reles, W. H. Wen, A. Schmider, C. Gee, I. B. Runnebaum, U. Kilian, L. A. Jones, A. El-Naggar, C. Minguillon, I. Schönborn, O. Reich, R. Kreienberg, W. Lichtenegger a M. F. Press, „Correlation of p53 Mutations with Resistance to Platinum-Based Chemotherapy and Shortened Survival in Ovarian Cancer,“ *Clinical Cancer Research*, zv. 7, pp. 2984-2997, 2001.
- [96] S. Fan, W. S. el-Deiry, I. Bae, J. Freeman, D. Jondle, K. Bhatia, A. J. Fornace, I. Magrath, K. W. Kohn a P. M. O'Connor, „p53 Gene Mutations are Associated with Decreased Sensitivity of Human Lymphoma Cells to DNA Damaging Agents,“ *Cancer Research*, zv. 54, pp. 5824-5830, 1994.
- [97] P. Perego, M. Giarola, S. C. Righetti, R. Supino, C. Caserini, D. Delia, M. A. Pierotti, T. Miyashita, J. C. Reed a F. Zunino, „Association Between Cisplatin Resistance and Mutation of p53 Gene and Reduced Bax Expression in Ovarian Carcinoma Cell Systems,“ *Cancer Research*, zv. 56, pp. 556-562, 1996.

- [98] M. A. Shah a G. K. Schwartz, „Cell Cycle-Mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy,“ *Clinical Cancer Research*, zv. 7, pp. 2168-2181, 2001.
- [99] N. D. Lakin a S. P. Jackson, „Regulation of p53 in Response to DNA Damage,“ *Oncogene*, zv. 18, pp. 7644-7655, 1999.
- [100] D. W. Meek, „Mechanisms of Switching on p53: A Role for Covalent Modification?,“ *Oncogene*, zv. 18, pp. 7666-7675, 1999.
- [101] S. J. Ralph a J. Neuzil, „Mitochondria as Targets for Cancer Therapy,“ *Molecular Nutrition & Food Research*, zv. 53, pp. 9-28, 2009.
- [102] A. M. Florea a D. Büsselberg, „Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects,“ *Cancers*, zv. 3, pp. 1351-1371, 2011.
- [103] W. Qian, M. Nishikawa, A. M. Haque, M. Hirose, M. Mashimo, E. Sato a M. Inoue, „Mitochondrial Density Determines the Cellular Sensitivity to Cisplatin-Induced Cell Death,“ *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, zv. 289, pp. C1466-C1475, 2005.
- [104] A. Muscella, N. Calabriso, F. P. Fanizzi, S. A. De Pascali, L. Urso, A. Ciccarese, D. Migoni a S. Marsigliante, „[Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)], a New Pt Compound Exerting Fast Cytotoxicity in MCF-7 Breast Cancer Cells via the Mitochondrial Apoptotic Pathway,“ *British Journal of Pharmacology*, zv. 153, pp. 34-49, 2008.
- [105] D. J. Klionsky, „Autophagy: From Phenomenology to Molecular Understanding in Less than a Decade,“ *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, zv. 8, pp. 931-937, 2007.
- [106] N. Mizushima, „Autophagy: Process and Function,“ *Genes & Development*, zv. 21, pp. 2861-2873, 2007.
- [107] Z. J. Yang, C. E. Chee, S. Huang a F. Sinicrope, „Autophagy Modulation for Cancer Therapy,“ *Cancer Biology & Therapy*, zv. 11, pp. 169-176, 2011.
- [108] P. Maycotte a A. Thorburn, „Autophagy and cancer therapy,“ *Cancer Biology & Therapy*, zv. 11, pp. 127-137, 2011.
- [109] T. R. O'Donovan, G. C. O'Sullivan a S. L. McKenna, „Induction of Autophagy by Drug-Resistant Esophageal Cancer Cells Promotes Their Survival and Recovery Following Treatment with Chemotherapeutics,“ *Autophagy*, zv. 7, pp. 509-524, 2011.
- [110] Z. Zou, L. Wu, H. Ding, Y. Wang, Y. Zhang, X. Chen, X. Chen, C. Y. Zhang, Q. Zhang a K. Zen, „MicroRNA-30a Sensitizes Tumor Cells to Cis-Platinum via

- Suppressing Beclin 1-Mediated Autophagy," *Journal of Biological Chemistry* , zv. 287, pp. 4148-4156, 2012.
- [111] J. H. Ren, W. S. He, L. Nong, Q. Y. Zhu, K. Hu, R. G. Zhang, L. L. Huang, F. Zhu a G. Wu, „Acquired Cisplatin Resistance in Human Lung Adenocarcinoma Cells is Associated with Enhanced Autophagy," *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, zv. 25, pp. 75-80, 2010.
- [112] B. Sirichanchuen, T. Pengsuparp a P. Chanvorachote, „Long-Term Cisplatin Exposure Impairs Autophagy and Causes Cisplatin Resistance in Human Lung Cancer Cells," *Molecular and Cellular Biochemistry*, zv. 364, pp. 11-18, 2012.
- [113] J. Wang a G. S. Wu, „Role of Autophagy in Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells," *Journal of Biological Chemistry* , zv. 289, pp. 17163-17173, 2014.
- [114] J. Garcia-Cano, G. Ambroise, R. Pascual-Serra, M. C. Carrion, L. Serrano-Oviedo, M. Ortega-Muelas, F. J. Cimas, S. Sabater, M. J. Ruiz-Hidalgo, I. S. Perez, A. Mas, F. A. Jalon, A. Vazquez a R. Sanchez-Prieto, „Exploiting the Potential of Autophagy in Cisplatin Therapy: A New Strategy to Overcome Resistance," *Oncotarget*, zv. 6, pp. 15551-15565, 2015.
- [115] X. Sui, R. Chen, Z. Wang, Z. Huang, N. Kong, M. Zhang, W. Han, F. Lou, J. Yang, Q. Zhang, X. Wang, C. He a H. Pan, „Autophagy and Chemotherapy Resistance: A Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment," *Cell Death and Disease*, zv. 4, 2013.
- [116] P. H. Abbosh, J. S. Montgomery, J. A. Starkey, M. Novotny, E. G. Zuhowski, M. J. Egorin, A. P. Moseman, A. Golas, K. M. Brannon, C. Balch, T. H. Huang a K. P. Nephew, „Dominant-Negative Histone H3 Lysine 27 Mutant Derepresses Silenced Tumor Suppressor Genes and Reverses the Drug-Resistant Phenotype in Cancer Cells," *Cancer Research*, zv. 66, pp. 5582-5591, 2006.
- [117] D. Wang a S. J. Lippard, „Cisplatin-Induced Post-Translational Modification of Histones H3 and H4," *Journal of Biological Chemistry*, zv. 279, pp. 20622-20625, 2004.
- [118] M. Drottar, M. C. Liberman, R. R. Ratan a D. W. Roberson, „The Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate Protects Against Cisplatin-Induced Hearing Loss in Guinea Pigs," *Laryngoscope*, zv. 116, pp. 292-296, 2006.
- [119] M. A. Asgar, G. Senawong, B. Sripa a T. Senawong, „Synergistic Anticancer Effects of Cisplatin and Histone Deacetylase Inhibitors (SAHA and TSA) on Cholangiocarcinoma Cell Lines," *International Journal of Oncology* , zv. 48, pp. 409-420, 2016.
- [120] S. Shamimi-Noori, W. S. Yeow, M. F. Ziauddin, H. Xin, T. L. Tran, J. Xie, A. Loehfelm, P. Patel, J. Yang, D. S. Schrupp, B. L. Fang a D. M. Nguyen, „Cisplatin Enhances the Antitumor Effect of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-

- Inducing Ligand Gene Therapy via Recruitment of the Mitochondria-Dependent Death Signaling Pathway," *Cancer Gene Therapy*, zv. 15, pp. 356-370, 2008.
- [121] T. Wenger, J. Mattern, R. Penzel, N. Gassler, T. L. Haas, M. R. Sprick, H. Walczak, P. H. Krammer, K. M. Debatin a I. Herr, „Specific Resistance Upon Lentiviral TRAIL Transfer by Intracellular Retention of TRAIL Receptors," *Cell Death and Differentiation* , zv. 13, pp. 1740-1751, 2006.
- [122] A. C. Bellail, L. Qi, P. Mulligan, V. Chhabra a C. Hao, „TRAIL Agonists on Clinical Trials for Cancer Therapy: The Promises and the Challenges," *Reviews on Recent Clinical Trials* , zv. 4, pp. 34-41, 2009.
- [123] X. X. Wu, O. Ogawa a Y. Kakehi, „TRAIL and Chemotherapeutic Drugs in Cancer Therapy," *Vitamins and Hormones*, zv. 67, pp. 365-383, 2004.
- [124] B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko a V. H. Mansour, „Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents," *Nature*, zv. 222, pp. 385-386, 1969.
- [125] J. J. Wilson a S. J. Lippard, „Synthetic Methods for the Preparation of Platinum Anticancer Complexes," *Chemical Reviews*, zv. 114, pp. 4470-4495, 2014.
- [126] G. R. Gibbons, S. Wyrick a S. G. Chaney, „Rapid Reduction of Tetrachloro(D,L-trans)1,2-Diaminocyclohexaneplatinum(IV) (Tetraplatin) in RPMI 1640 Tissue Culture Medium," *Cancer Research*, zv. 49, pp. 1402-1407, 1989.
- [127] W. K. Anderson, D. A. Quagliato, R. D. Haugwitz, V. L. Narayanan a M. K. Wolpert-DeFilippes, „Synthesis, Physical Properties, and Antitumor Activity of Tetraplatin and Related Tetrachloroplatinum(IV) Stereoisomers of 1,2-Diaminocyclohexane," *Cancer Treatment Reports*, zv. 70, pp. 997-1002, 1986.
- [128] A. Rahman, J. K. Roh, M. K. Wolpert-DeFilippes, A. Goldin, J. M. Venditti a P. V. Woolley, „Therapeutic and Pharmacological Studies of Tetrachloro(d,l-trans)1,2-Diaminocyclohexane Platinum (IV) (Tetraplatin), A New Platinum Analogue," *Cancer Research*, zv. 48, pp. 1745-1752, 1988.
- [129] R. J. Parker, J. A. Vionnet, F. Bostick-Bruton a E. Reed, „Ormaplatin Sensitivity/Resistance in Human Ovarian Cancer Cells Made Resistant to Cisplatin," *Cancer Research*, zv. 53, pp. 242-247, 1993.
- [130] K. D. Tutsch, R. Z. Arzoomanian, D. Alberti, M. B. Tombes, C. Feierabend, H. I. Robins, D. R. Spriggs a G. Wilding, „Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of An One-Hour Infusion of Ormaplatin (NSC 363812)," *Investigational New Drugs*, zv. 17, pp. 63-72, 1999.
- [131] T. J. O'Rourke, G. R. Weiss, P. New, H. A. Burris, G. Rodriguez, J. Eckhardt, J. Hardy, J. G. Kuhn, S. Fields, G. M. Clark a D. D. von Hoff, „Phase I Clinical Trial of Ormaplatin (Tetraplatin, NSC 363812)," *Anti-Cancer Drugs*, zv. 5, pp. 520-526, 1994.

- [132] L. Pendyala, J. W. Cowens, G. B. Chheda, S. P. Dutta a P. J. Creaven, „Identification of cis-Dichloro-bis-isopropylamine Platinum(II) as A Major Metabolite of Iproplatin in Humans,“ *Cancer Research*, zv. 48, pp. 3533-3536, 1988.
- [133] L. Pendyala, A. V. Arakali, P. Sansone, J. W. Cowens a P. J. Creaven, „DNA Binding of Iproplatin and Its Divalent Metabolite cis-Dichloro-bis-Isopropylamine Platinum (II),“ *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, zv. 27, pp. 248-250, 1990.
- [134] V. H. Bramwell, D. Crowther, S. O'Malley, R. Swindell, R. Johnson, E. H. Cooper, N. Thatcher a A. Howell, „Activity of JM9 in Advanced Ovarian Cancer: A Phase I-II Trial,“ *Cancer Treatment Reports*, zv. 69, pp. 409-416, 1985.
- [135] L. R. Kelland, G. Abel, M. J. McKeage, M. Jones, P. M. Goddard, M. Valenti, B. A. Murrer a K. R. Harrap, „Preclinical Antitumor Evaluation of Bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine Platinum(IV): An Orally Active Platinum Drug,“ *Cancer Research*, zv. 53, pp. 2581-2586, 1993.
- [136] A. Bhargava a U. N. Vaishampayan, „Satraplatin: Leading the New Generation of Oral Platinum Agents,“ *Expert Opinion on Investigational Drugs*, zv. 18, pp. 1787-1797, 2009.
- [137] F. I. Raynaud, P. Mistry, A. Donaghue, G. K. Poon, L. R. Kelland, C. F. Barnard, B. A. Murrer a K. R. Harrap, „Biotransformation of the Platinum Drug JM216 Following Oral Administration to Cancer Patients,“ *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, zv. 38, pp. 155-162, 1996.
- [138] T. C. Johnstone a S. J. Lippard, „Improvements in the Synthesis and Understanding of the Iodo-Bridged Intermediate en Route to the Pt(IV) Prodrug Satraplatin,“ *Inorganica Chimica Acta*, zv. 424, pp. 254-259, 2015.
- [139] A. Vaisman, S. E. Lim, S. M. Patrick, W. C. Copeland, D. C. Hinkle, J. J. Turchi a S. G. Chaney, „Effect of DNA Polymerases and High Mobility Group Protein 1 on the Carrier Ligand Specificity for Translesion Synthesis past Platinum–DNA Adducts,“ *Biochemistry*, zv. 38, pp. 11026-11039, 1999.
- [140] M. Wei, S. M. Cohen, A. P. Silverman a S. J. Lippard, „Effects of Spectator Ligands on the Specific Recognition of Intrastrand Platinum-DNA Cross-Links by High Mobility Group Box and TATA-Binding Proteins,“ *The Journal of Biological Chemistry*, zv. 276, pp. 38774-38780, 2001.
- [141] S. Vouillamoz-Lorenz, T. Buclin, F. Lejeune, J. Bauer, S. Leyvraz a L. A. Decosterd, „Pharmacokinetics of Satraplatin (JM216), an Oral Platinum (IV) Complex Under Daily Oral Administration for 5 or 14 Days,“ *Anticancer Research*, zv. 23, pp. 2757-2765, 2003.
- [142] I. Judson, T. Cerny, R. Epelbaum, D. Dunlop, J. Smyth, B. Schaefer, M. Roelvink, S. Kaplan a A. Hanauske, „Phase II Trial of the Oral Platinum Complex JM216 in

- Non-Small-Cell Lung Cancer: An EORTC Early Clinical Studies Group Investigation," *Annals of Oncology*, zv. 8, pp. 604-606, 1997.
- [143] H. Choy, C. Park a M. Yao, „Current Status and Future Prospects for Satraplatin, an Oral Platinum Analogue," *Clinical Cancer Research*, zv. 14, pp. 1633-1638, 2008.
- [144] C. N. Sternberg, P. Whelan, J. Hetherington, B. Paluchowska, P. H. Slee, K. Vekemans, P. Van Erps, C. Theodore, O. Koriakine, T. Oliver, D. Lebwohl, M. Debois, A. Zurlo a L. Collette, „Phase III Trial of Satraplatin, an Oral Platinum Plus Prednisone vs. Prednisone Alone in Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer," *Oncology*, zv. 68, pp. 2-9, 2005.
- [145] C. N. Sternberg, D. Petrylak, F. Witjes, J. Ferrero, J. Eymard, S. Falcon, K. Chatta, D. Vaughn, W. Berry a O. Sartor, „Satraplatin (S) Demonstrates Significant Clinical Benefits for the Treatment of Patients with HRPC: Results of a Randomized Phase III Trial," *American Society of Clinical Oncology*, zv. 25, p. 5019, 2007.
- [146] G. B. Inc., „ORPLATNA Satraplatin Capsules: Advisory Committee Briefing Document, NDA 21-801," USA Food and Drug Administration, 2007.
- [147] P. Bouchal, J. Jarkovsky, K. Hrazdilova, M. Dvorakova, I. Struharova, L. Hernychova, J. Damborsky, P. Sova a B. Vojtesek, „The New Platinum-Based Anticancer Agent LA-12 Induces Retinol Binding Protein 4 in Vivo," *Proteome Science*, zv. 9, p. 68, 2011.
- [148] H. Varbanov, S. M. Valiahdi, A. A. Legin, M. A. Jakupec, A. Roller, M. Galanski a B. K. Keppler, „Synthesis and Characterization of Novel Bis(Carboxylato)Dichloridobis(Ethylamine)Platinum(IV) Complexes with Higher Cytotoxicity than Cisplatin," *European Journal of Medicinal Chemistry*, zv. 46, pp. 5456-5464, 2011.
- [149] W. H. Ang, I. Khalaila, C. S. Allardyce, L. Juillerat-Jeanneret a P. J. Dyson, „Rational Design of Platinum(IV) Compounds to Overcome Glutathione-S-Transferase Mediated Drug Resistance," *Journal of the American Chemical Society*, zv. 127, pp. 1382-1383, 2005.
- [150] L. J. Parker, L. C. Italiano, C. J. Morton, N. C. Hancock, D. B. Ascher, A. J. B., H. H. Harris, P. Campomanes, U. Rothlisberger, A. De Luca, M. Lo Bello, W. H. Ang, P. J. Dyson a M. W. Parker, „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*, zv. 17, pp. 7806-7816, 2011.
- [151] D. M. Townsend a K. D. Tew, „The Role of Glutathione-S-Transferase in Anti-Cancer Drug Resistance," *Oncogene*, zv. 22, pp. 7369-7375, 2003.

- [152] J. Yang, X. Sun, W. Mao, M. Sui, J. Tang a Y. Shen, „Conjugate of Pt(IV)-Histone Deacetylase Inhibitor as a Prodrug for Cancer Chemotherapy,“ *Molecular Pharmaceutics*, zv. 9, pp. 2793-2800, 2012.
- [153] V. Novohradsky, L. Zerzankova, J. Stepankova, O. Vrana, R. Raveendran, D. Gibson, J. Kasparkova a V. Brabec, „Antitumor platinum(IV) derivatives of oxaliplatin with axial valproato ligands,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, zv. 140, pp. 72-79, 2014.
- [154] T. C. Johnstone, J. J. Wilson a S. J. Lippard, „Monofunctional and Higher-Valent Platinum Anticancer Agents,“ *Inorganic Chemistry*, zv. 52, pp. 12234-12249, 2013.
- [155] O. C. Trifan a T. Hla, „Cyclooxygenase-2 Modulates Cellular Growth and Promotes Tumorigenesis,“ *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, zv. 7, pp. 207-222, 2003.
- [156] R. K. Pathak, S. Marrache, J. H. Choi, T. B. Berding a S. Dhar, „The Prodrug Platin-A: Simultaneous Release of Cisplatin and Aspirin,“ *Angewandte Chemie*, zv. 53, pp. 1963-1967, 2014.
- [157] Q. Cheng, H. Shi, H. Wang, Y. Min, J. Wang a Y. Liu, „The Ligation of Aspirin to Cisplatin Demonstrates Significant Synergistic Effects on Tumor Cells,“ *Chemical Communications*, zv. 50, pp. 7427-7430, 2014.
- [158] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley a C. B. Thompson, „Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation,“ *Science*, zv. 324, pp. 1029-1033, 2009.
- [159] S. Dhar a S. J. Lippard, „Mitaplatin, a Potent Fusion of Cisplatin and the Orphan Drug Dichloroacetate,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, zv. 106, pp. 22199-22204, 2009.
- [160] X. Xue, S. You, Q. Zhang, Y. Wu, G.-z. Zou, P. C. Wang, Y.-l. Zhao, Y. Xu, L. Jia, X. Zhang a X.-J. Liang, „Mitaplatin Increases Sensitivity of Tumor Cells to Cisplatin by Inducing Mitochondrial Dysfunction,“ *Molecular Pharmaceutics*, zv. 9, pp. 634-644, 2012.
- [161] A. Babu, N. Amreddy a R. Ramesh, „Nanoparticle-Based Cisplatin Therapy for Cancer,“ *Therapeutic Delivery*, zv. 6, pp. 115-119, 2015.
- [162] G. P. Stathopoulos a T. Boulikas, „Lipoplatin Formulation Review Article,“ *Journal of Drug Delivery*, zv. 2012, 2012.
- [163] A. Ravaioli, M. Papi, E. Pasquini, M. Marangolo, B. Rudnas, M. Fantini, S. V. Nicoletti, F. Drudi, I. Panzini, E. Tamburini, L. Gianni a G. Pasini, „Lipoplatin Monotherapy: A Phase II Trial of Second-Line Treatment of Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer,“ *Journal of Chemotherapy*, zv. 21, pp. 86-90, 2009.

- [164] N. Seetharamu, E. Kim, H. Hochster, F. Martin a F. Muggia, „Phase II Study of Liposomal Cisplatin (SPI-77) in Platinum-Sensitive Recurrences of Ovarian Cancer,“ *Anticancer Research*, zv. 30, pp. 541-545, 2010.
- [165] E. S. Kim, C. Lu, F. R. Khuri, M. Tonda, B. S. Glisson, D. Liu, M. Jung, W. K. Hong a R. S. Herbst, „A Phase II Study of STEALTH Cisplatin (SPI-77) in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer,“ *Lung Cancer*, zv. 34, pp. 427-432, 2001.
- [166] M. J. de Jonge, M. Slingerland, W. J. Loos, E. A. Wiemer, H. Burger, R. H. Mathijssen, J. R. Kroep, M. A. den Hollander, D. van der Biessen, M. H. Lam, J. Verweij a H. Gelderblom, „Early Cessation of the Clinical Development of LiPlaCis, a Liposomal Cisplatin Formulation,“ *European Journal of Cancer*, zv. 46, pp. 3016-3021, 2010.
- [167] Z. Medrikova, V. Novohradsky, J. Zajac, O. Vrana, J. Kasparkova, A. Bakandritsos, M. Petr, R. Zboril a V. Brabec, „Enhancing Tumor Cell Response to Chemotherapy through the Targeted Delivery of Platinum Drugs Mediated by Highly Stable, Multifunctional Carboxymethylcellulose-Coated Magnetic Nanoparticles,“ *Chem. Eur. J.*, zv. 22, pp. 9750-9759, 2016.
- [168] I. Ott a R. Gust, „Non Platinum Metal Complexes as Anti-cancer Drugs,“ *Archiv der Pharmazie, Chemistry in Life Sciences*, zv. 340, pp. 117-126, 2007.
- [169] M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger a B. K. Keppler, „Antitumour Metal Compounds: More than Theme and Variations,“ *Dalton Transactions*, zv. 14, pp. 183-194, 2008.
- [170] A. Bergamo, C. Gaiddon, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen a G. Sava, „Approaching Tumour Therapy Beyond Platinum Drugs: Status of the Art and Perspectives of Ruthenium Drug Candidates,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, zv. 106, pp. 90-99, 2012.
- [171] L. J. Anghileri, „The In Vivo Inhibition of Tumor Growth by Ruthenium Red: Its Relationship with the Metabolism of Calcium in the Tumor,“ *Cancer Research and Clinical Oncology*, zv. 83, pp. 213-217, 1975.
- [172] M. J. Clarke, „Oncological Implications of the Chemistry of Ruthenium,“ *Metal Ions in Biological Systems*, zv. 11, pp. 231-283, 1980.
- [173] G. Sava, K. Clerici, I. Capozzi, M. Cocchietto, R. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni a A. Perbellini, „Reduction of Lung Metastasis by ImH[trans-RuCl₄(DMSO)Im]: Mechanism of the Selective Action Investigated on Mouse Tumors,“ *Anti-Cancer Drugs*, zv. 10, pp. 129-138, 1999.
- [174] C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas a B. K. Keppler, „From Bench to Bedside--Preclinical and Early Clinical Development of the Anticancer Agent Indazolium Trans-[tetrachlorobis(1H-

- indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A),“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, zv. 100, pp. 891-904, 2006.
- [175] M. Galanski, V. B. Arion, M. A. Jakupec a B. K. Keppler, „Recent Developments in the Field of Tumor-Inhibiting Metal Complexes,“ *Current Pharmaceutical Design*, zv. 9, pp. 2078-2089, 2003.
- [176] E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo a G. Sava, „Ruthenium antimetastatic agents,“ *Current Topics in Medicinal Chemistry*, zv. 4, pp. 1525-1535, 2004.
- [177] E. S. Antonarakis a A. Emadi, „Ruthenium-Based Chemotherapeutics: Are They Ready for Prime Time?,“ *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, zv. 66, pp. 1-9, 2010.
- [178] C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson a B. K. Keppler, „KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent--Preclinical Development and Results of A Clinical Phase I Study in Tumor Patients,“ *Chemistry & Biodiversity*, zv. 5, pp. 2140-2155, 2008.
- [179] Z. Liu a P. J. Sadler, „Organoiridium Complexes: Anticancer Agents and Catalysts,“ *Accounts of Chemical Research*, zv. 47, pp. 1174-1185, 2014.
- [180] T. Giraldi, G. Sava, G. Mestroni, G. Zassinovich a D. Stolfa, „Antitumor Action of Rhodium (I) and Iridium (I) Complexes,“ *Chemico-Biological Interactions*, zv. 22, pp. 231-238, 1978.
- [181] G. Sava, S. Zorzet, L. Perissin, G. Mestroni, G. Zassinovich a A. Bontempi, „Coordination Metal Complexes of Rh(I), Ir(I) and Ru(II): Recent Advances on Antimetastatic Activity on Solid Mouse Tumors,“ *Inorganica Chimica Acta*, zv. 137, pp. 69-71, 1987.
- [182] L. Messori, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, P. Zanello, A. Bergamo, G. Sava a P. Mura, „Molecular Structure, Solution Chemistry and Biological Properties of the Novel [ImH][trans-IrCl(4)(Im)(DMSO)], (I) and of the Orange Form of [(DMSO)(2)H][trans-IrCl(4)(DMSO)(2)], (II), Complexes,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, zv. 95, pp. 37-46, 2003.
- [183] Y. Geldmacher, M. Oleszak a W. S. Sheldrick, „Rhodium(III) and Iridium(III) Complexes as Anticancer Agents,“ *Inorganica Chimica Acta*, zv. 393, pp. 84-102, 2012.
- [184] Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, S. A. Fletcher, A. Kisova, O. Vrana, L. Salassa, P. C. Bruijninx, G. J. Clarkson, V. Brabec a P. J. Sadler, „Organometallic Half-Sandwich Iridium Anticancer Complexes,“ *Journal of Medicinal Chemistry*, zv. 54, pp. 3011-3026, 2011.
- [185] A. Habtemariam, Z. Liu, J. J. Soldevila, A. M. Pizarro a P. J. Sadler, „Novel Iridium/Rhodium Anti-Cancer Compounds“. PCT Patent WO/2011/148124, 1 12 2011.

- [186] J. M. Hearn, I. Romero-Canelón, B. Qamar, Z. Liu, I. Hands-Portman a P. J. Sadler, „Organometallic Iridium(III) Anticancer Complexes with New Mechanisms of Action: NCI-60 Screening, Mitochondrial Targeting, and Apoptosis,“ *ACS Chemical Biology*, zv. 8, pp. 1335-1343, 2013.
- [187] Z. Liu, I. Romero-Canelón, B. Qamar, J. M. Hearn, A. Habtemariam, N. P. Barry, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson a P. J. Sadler, „The Potent Oxidant Anticancer Activity of Organoiridium Catalysts,“ *Angewandte Chemie International Edition*, zv. 53, pp. 3941-3946, 2014.
- [188] Z. Liu, L. Salassa, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson a P. J. Sadler, „Contrasting Reactivity and Cancer Cell Cytotoxicity of Isoelectronic Organometallic Iridium(III) Complexes,“ *Inorganic Chemistry*, zv. 50, pp. 5777-5783, 2011.
- [189] S. Schäfer a W. S. Sheldrick, „Coligand Tuning of the DNA Binding Properties of Half-Sandwich Organometallic Intercalators,“ *Journal of Organometallic Chemistry*, zv. 692, pp. 1300-1309, 2007.
- [190] D. Trachootham, J. Alexandre a P. Huang, „Targeting Cancer Cells by ROS-Mediated Mechanisms: A Radical Therapeutic Approach?,“ *Nature Reviews. Drug Discovery*, zv. 8, pp. 579-591, 2009.
- [191] F. P. Intini, J. Zajac, V. Novohradsky, T. Saltarella, C. Pacifico, V. Brabec, G. Natile a J. Kasparkova, „Novel Antitumor Platinum(II) Conjugates Containing the Nonsteroidal Anti-inflammatory Agent Diclofenac: Synthesis and Dual Mechanisms of Antiproliferative Effects,“ *Inorganic Chemistry*, zv. 56, pp. 1483-1497, 2017.
- [192] E. Wexselblatt, R. Raveendran, S. Salameh, A. Friedman-Ezra, E. Yavin a D. Gibson, „On the Stability of Pt(IV) Pro-Drugs with Haloacetato Ligands in the Axial Positions,“ *Chemistry A European Journal*, zv. 21, pp. 3108-3114, 2014.
- [193] J. Zajac, H. Kostrhunova, V. Novohradsky, O. Vrana, R. Raveendran, D. Gibson, J. Kasparkova a V. Brabec, „Potentiation of mitochondrial dysfunction in tumor cells by conjugates of metabolic modulator dichloroacetate with a Pt(IV) derivative of oxaliplatin,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, zv. 156, pp. 89-97, 2016.
- [194] A. Bakandritsos, G. Mattheolabakis, G. Chatzikyriakos, T. Szabo, V. Tzitzios, D. Kouzoudis, S. Couris a K. Avgoustakis, „Doxorubicin Nanocarriers Based on Magnetic Colloids with a Bio-polyelectrolyte Corona and High Non-Linear Optical Response: Synthesis, Characterization, and Properties,“ *Advanced Functional Materials*, zv. 21, pp. 1465-1475, 2011.
- [195] G. Mestroni, E. Alessio a G. Sava, „New salts of anionic complexes of Ru(III) as antimetastatic and antineoplastic agents.“. Patent PCT C 07F 15/00 A61K 31/28, WO 98/00431, 1998.

- [196] S. Pillozzi, L. Gasparoli, M. Stefanini, M. Ristori, M. D'Amico, E. Alessio, F. Scaletti, A. Becchetti, A. Arcangeli a L. Messori, „NAMI-A is highly cytotoxic toward leukaemia cell lines: evidence of inhibition of KCa 3.1 channels,“ *Dalton Transactions*, zv. 43, pp. 12150-12155, 2014.
- [197] J. Yellol, S. A. Pérez, G. Yellol, J. Zajac, A. Donaire, G. Vigueras, V. Novohradsky, C. Janiak, V. Brabec a J. Ruiz, „Highly Potent Extranuclear-Targeted Luminescent Iridium(III) Antitumor Agents Containing Benzimidazole-Based Ligands with A Handle for Functionalization,“ *Chemical Communications*, zv. 52, pp. 14165-14168, 2016.
- [198] D. Green a G. Kroemer, „The pathophysiology of mitochondrial cell death,“ *Science*, zv. 305, pp. 626-629, 2004.
- [199] T. Gebäck, M. M. Schulz, P. Koumoutsakos a M. Detmar, „TScratch: A Novel and Simple Software Tool for Automated Analysis of Monolayer Wound Healing Assays,“ *BioTechniques*, zv. 46, pp. 265-274, 2009.
- [200] P. Skehan, R. Soreng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. Warren, H. Bokesch, S. Kenney a M. Boyd, „New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening,“ *J Natl Cancer Inst*, zv. 82, pp. 1107-1112, 1990.
- [201] E. Gottfried, S. A. Lang, K. Renner, A. Bosserhoff, W. Gronwald, M. Rehli, S. Einhell, I. Gedig, K. Singer, A. Seilbeck, A. Mackensen, O. Grauer, P. Hau, K. Dettmer, R. Andreesen, P. J. Oefner a M. Kreutz, „New Aspects of an Old Drug – Diclofenac Targets MYC and Glucose Metabolism in Tumor Cells,“ *PLoS ONE*, zv. 8, 2013.
- [202] I. Petrescu a C. Tarba, „Uncoupling Effects of Diclofenac and Aspirin in the Perfused Liver and Isolated Hepatic Mitochondria of Rat,“ *Biochimica et Biophysica Acta*, zv. 1318, pp. 385-394, 1997.
- [203] X. Wang, H. Li, X. Du, J. Harris, Z. Guo a H. Sun, „Activation of Carboplatin and Nedaplatin by the N-Terminus of Human Copper Transporter 1 (hCTR1),“ *Chemical Science*, zv. 3, pp. 3206-3215, 2012.
- [204] W. Neumann, B. C. Crews, M. B. Sarosi, C. M. Daniel, K. Ghebreselasie, M. S. Scholz, L. J. Marnett a E. Hey-Hawkins, „Conjugation of Cisplatin Analogues and Cyclooxygenase Inhibitors to Overcome Cisplatin Resistance,“ *ChemMedChem*, zv. 10, pp. 183-192, 2015.
- [205] F. Yamasaki, K. Kurisu, Y. Kajiwara, W. Y., T. Takayasu, Y. Akiyama, T. Saito, R. Hanaya a K. Sugiyama, „Magnetic Resonance Spectroscopic Detection of Lactate is Predictive of a Poor prognosis in Patients with Diffuse Intrinsic Pontine Glioma,“ *Neuro-Oncology*, zv. 13, pp. 791-801, 2011.
- [206] N. Ghosh, R. Chaki, V. Mandal a S. C. Mandal, „COX-2 as a Target for Cancer Chemotherapy,“ *Pharmacological Reports*, zv. 62, pp. 233-244, 2010.

- [207] S. Bonnet, S. L. Archer, J. Allalunis-Turner, A. Haromy, C. Beaulieu, R. Thompson, C. T. Lee, G. D. Lopaschuk, L. Puttagunta, S. Bonnet, G. Harry, K. Hashimoto, C. J. Porter, M. A. Andrade, B. Thebaud a E. D. Michelakis, „A Mitochondria-K⁺ Channel Axis is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth,“ *Cancer Cell*, zv. 11, pp. 37-51, 2007.
- [208] J. G. Pan a T. W. Mak, „Metabolic Targeting as An Anticancer Strategy: Dawn of A New Era?,“ *Science's STKE*, zv. 381, p. e14, 2007.
- [209] I. Berindan-Neagoe, C. Braicu, V. Pileczki, R. C. Petric, N. Miron, O. Balacescu, D. Iancu a T. Ciuleanu, „5-Fluorouracil Potentiates the Anti-Cancer Effect of Oxaliplatin on Colo320 Colorectal Adenocarcinoma Cells,“ *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, zv. 22, pp. 37-43, 2013.
- [210] Y. Xuan, H. Hur, I. H. Ham, J. Yun, J. Y. Lee, W. Shim, Y. B. Kim, G. Lee, S. U. Han a Y. K. Cho, „Dichloroacetate Attenuates Hypoxia-Induced Resistance to 5-Fluorouracil in Gastric Cancer Through the Regulation of Glucose Metabolism,“ *Experimental Cell Research*, zv. 321, pp. 219-230, 2014.
- [211] J. Sudimack a R. J. Lee, „Targeted Drug Delivery via the Folate Receptor,“ *Advanced Drug Delivery Reviews*, zv. 41, pp. 147-162, 2000.
- [212] G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, J. C. Stewart, G. Hartung, W. Maier-Borst a D. L. Heene, „Plasma Protein (Albumin) Catabolism by the Tumor Itself--Implications for Tumor Metabolism and the Genesis of Cachexia,“ *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, zv. 26, pp. 77-100, 1997.
- [213] G. Sava, A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, C. Casarsa, M. Cocchietto, A. Furlani, V. Scarcia, B. Serli, E. Iengo, E. Alessio a G. Mestroni, „Influence of Chemical Stability on the Activity of the Antimetastasis Ruthenium Compound NAMI-A,“ *European Journal of Cancer*, zv. 38, pp. 427-435, 2002.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

5-FU	5-fluorouracil
AMP	adenozín monofosfát
BSA	hovädzí sérový albumín
CI	kombinačný index
cMNPs	magnetické nanočastice stabilizované karboxymetylcelulózou
COX	cyklooxygenáza
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DCA	dichlóracetát
DCF	diklofenak
ddH ₂ O	dva-krát destilovaná voda
DPBS	Dulbeccov fosfátový pufor
EDC	1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid
FA	kyselina listová
FAAS	bezplameňová atómová absorpčná spektrometria
FITC	fluoresceín izotiokyanát
GSH	glutatión
GST	glutatión S-transferáza
HDAC	histón deacetylázy
HSA	ľudský sérový albumín
ICP-MS	hmotnostná spektrometria s využitím indukčne viazanej plazmy
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin iodid
LSCM	laserová skenovacia konfokálna mikroskopia
MNPs	magnetické nanočastice
MRP	proteín spojený s multi-rezistenciou
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid
NSAID	nesteroidné protizápalové liečivá
PBS	fosfátový pufor
PDK	pyruvátdehydrogenázová kináza
ROS	reaktívne formy kyslíka

8 PRÍLOHY

8.1 ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ

1. Intini F.P.,* **Zajac J.**,* Novohradsky V., Saltarella T., Pacifico C., Brabec V., Natile G., Kasparikova J. (2017) Novel antitumor platinum(II) conjugates containing the non-steroidal anti-inflammatory agent diclofenac: Synthesis and dual mechanisms of antiproliferative effects. *Inorganic Chemistry* **56**, 1483-1497

* Intini F.P. a Zajac J. sa podieľali na vzniku práce rovnakým podielom, uvedené v práci na strane 1495

2. Yellol J., Pérez S.A., Yellol G., **Zajac J.**, Donaire A., Viguera G., Novohradsky V., Janiak Ch., Brabec V., Ruiz J. (2016) Highly potent extranuclear-targeted luminescent iridium(III) antitumor agents containing benzimidazole-based ligands with a handle for functionalization. *Chemical Communications* **52**, 14165-14168

3. Medřiková Z., Novohradsky V., **Zajac J.**, Vrana O., Kasparikova J., Bakandritsos A., Petr M., Zbořil R., Brabec V. (2016) Enhancing tumor cell response to chemotherapy through targeted delivery of Pt drugs mediated by highly stable, multifunctional carboxymethylcellulose coated magnetic nanoparticles. *Chemistry - A European Journal* **22**, 9750-9759

4. **Zajac J.**, Kostrhunova H., Novohradsky V., Vrana O., Raveendran R., Gibson D., Kasparikova J., Brabec V. (2016) Potentiation of mitochondrial dysfunction in tumor cells by conjugates of metabolic modulator dichloroacetate with a Pt(IV) derivative of oxaliplatin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **156**, 89-97

5. Novohradsky V., Bergamo A., Cocchietto M., **Zajac J.**, Brabec V., Mestroni G., Sava G. (2015) Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics and biological activity. *Dalton Transactions* **44**, 1905-1913

8.1.1 PUBLIKÁCIA Č. 1

NOVEL ANTITUMOR PLATINUM(II) CONJUGATES CONTAINING THE NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY AGENT DICLOFENAC: SYNTHESIS AND DUAL MECHANISMS OF ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS

Francesco Paolo Intini,* **Juraj Zajac**,* Vojtech Novohradsky, Teresa Saltarella,
Concetta Pacifico, Viktor Brabec, Giovanni Natile, Jana Kasparikova

Inorganic Chemistry **56** (2017), 1483-1497

* F. P. Intini a J. Zajac sa podieľali na vzniku práce rovnakým podielom
(uvedené v práci na strane 1495)

Prehlasujem, že môj podiel na príprave tejto práce je nasledujúci:

Stanovenie cytotoxicity a akumulácie Pt(II) komplexov, obsahujúcich nesteroidné protizápalové liečivo diklofenak, vo vybraných bunčných líniách. Kvantifikácia väzby komplexov na DNA izolovanú z nádorových buniek a určenie rozdeľovacích koeficientov. Analýza účinku komplexov na bunčný cyklus, mitochondriálny membránový potenciál, metabolizmus glukózy a migračné schopnosti nádorových buniek. Podiel na spísaní rukopisu publikácie.

Novel Antitumor Platinum(II) Conjugates Containing the Nonsteroidal Anti-inflammatory Agent Diclofenac: Synthesis and Dual Mechanisms of Antiproliferative Effects

Francesco Paolo Intini,[†] Juraj Zajac,^{‡,§} Vojtech Novohradsky,[‡] Teresa Saltarella,[†] Concetta Pacifico,[†] Viktor Brabec,^{‡,§} Giovanni Natile,^{*,†} and Jana Kasparkova^{*,‡,§}

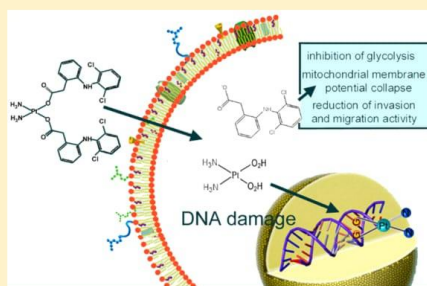
[†]Department of Chemistry, University of Bari "Aldo Moro", 70125 Bari, Italy

[‡]Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Kralovopolska 135, 61265 Brno, Czech Republic

[§]Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, Slechtitelu 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

Supporting Information

ABSTRACT: One concept how to improve anticancer effects of conventional metallodrugs consists in conjugation of these compounds with other biologically (antitumor) active agents, acting by a different mechanism. Here, we present synthesis, biological effects, and mechanisms of action of new Pt(II) derivatives containing one or two nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac (DCF) ligands also known for their antitumor effects. The antiproliferative properties of these metallic conjugates show that these compounds are potent and cancer cell selective cytotoxic agents exhibiting activity in cisplatin resistant and the COX-2 positive tumor cell lines. One of these compounds, compound **3**, in which DCF molecules are coordinated to Pt(II) through their carboxylic group, is more potent than parental conventional Pt(II) drug cisplatin, free DCF and the congeners of **3** in which DCF ligands are conjugated to Pt(II) via a diamine. The potency of **3** is due to several factors including enhanced internalization that correlates with enhanced DNA binding and cytotoxicity. Mechanistic studies show that **3** combines multiple effects. After its accumulation in cells, it releases Pt(II) drug capable of binding/damaging DNA and DCF ligands, which affect distribution of cells in individual phases of the cell cycle, inhibit glycolysis and lactate transport, collapse mitochondrial membrane potential, and suppress the cellular properties characteristic of metastatic progression.



INTRODUCTION

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are frequently used as analgesics, anti-inflammatories and antipyretics.¹ Several studies have shown that the influences of NSAIDs are essentially based on the inhibition of the cyclooxygenase enzyme system (COX) that is involved in the conversion of arachidonic acid to prostaglandins, prostacyclin, and thromboxane.^{2–5} Several recent *in vitro* and *in vivo* studies have also reported chemopreventive and chemotherapeutic effects of NSAIDs. In addition, clinical trials demonstrated that NSAIDs cause the regression of pre-existing adenomas in patients with familial adenomatous polyposis, and prevent the development of colon tumors in carcinogen-treated animals.^{6–9} Studies on colorectal carcinomas have also shown that COX inhibitors reduce tumor growth and angiogenesis by inhibiting expression of pro-angiogenic factors (such as *vascular endothelial growth factor*) which are frequently overexpressed.¹⁰

Notably, the NSAIDs, such as indomethacin, ibuprofen, and aspirin, exhibit antitumor activity only at relatively high (millimolar) concentrations, which limits their pharmacological applications as antitumor drugs.^{10–13} This is so because at

neutral pH these NSAIDs are monoanionic and therefore do not efficiently accumulate in tumor cells. Recently, various NSAIDs were used as ligands in derivatives of metal-based drugs. Examples are derivatives of ruthenium(II)- or osmium(II)-*p*-cymene complexes¹⁴ and Pt(II) or Pt(IV) derivatives of antitumor cisplatin or oxaliplatin.^{13,15,16} Notably, the presence of NSAID ligands in Pt(II) or Pt(IV) conjugates renders these derivatives of cisplatin or oxaliplatin hydrophobic. Consequently, because of the higher lipophilicity of these conjugates their transport across cell membranes is facilitated. Thus, they efficiently accumulate in tumor cells treated with these agents already at concentrations more than 3 orders of magnitude lower (micromolar) than those required from free NSAIDs. The design of these Pt-NSAID conjugates was based on the premise that attaching NSAIDs to the derivatives of cisplatin or oxaliplatin should result in simultaneous release inside the cell of two antiproliferative agents that act by different mechanisms on different cellular targets. Thus, the platinum conjugates

Received: October 24, 2016

Published: January 19, 2017

! Z dôvodu dodržania autorských práv nie je priložená plná verzia publikácie.

Článok je v plnom texte dostupný na stránkach:

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.inorgchem.6b02553>

8.1.2 PUBLIKÁCIA Č. 2

HIGHLY POTENT EXTRANUCLEAR-TARGETED LUMINESCENT IRIIDIUM(III) ANTITUMOR AGENTS CONTAINING BENZIMIDAZOLE-BASED LIGANDS WITH A HANDLE FOR FUNCTIONALIZATION

Jyoti Yellol, Sergio A. Pérez, Gorakh S. Yellol, **Juraj Zajac**, Antonio Donaire, Gloria Vigueras, Vojtech Novohradsky, Christoph Janiak, Viktor Brabec,

Chemical Communications **52** (2016), 14165-14168

Prehlasujem, že môj podiel na príprave tejto práce je nasledujúci:

Stanovenie akumulácie luminiscenčných Ir(III) komplexov, obsahujúcich ligandy na báze benzimidazolu, v nádorových bunkách MCF-7. Kvantifikácia väzby študovaných komplexov na nukleové kyseliny izolované z buniek MCF-7. Určenie rozdeľovacích koeficientov pomocou FAAS a výpočet logP hodnôt. Podiel na spísaní rukopisu publikácie.

.....



Cite this: *Chem. Commun.*, 2016, 52, 14165

Received 29th September 2016,
Accepted 11th November 2016

DOI: 10.1039/c6cc07909a

www.rsc.org/chemcomm

Highly potent extranuclear-targeted luminescent iridium(III) antitumor agents containing benzimidazole-based ligands with a handle for functionalization†

Jyoti Yellol,^a Sergio A. Pérez,^a Gorakh Yellol,^a Juraj Zajac,^{bc} Antonio Donaire,^a Gloria Viguera,^a Vojtech Novohradsky,^b Christoph Janiak,^d Viktor Brabec^{*bc} and José Ruiz^{*a}

A series of 6 substitutionally inert and luminescent iridium(III) antitumor agents of the type $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]$ containing a benzimidazole $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligand with an ester group as a handle for further functionalization has been prepared. They exhibit IC_{50} values in the high nanomolar range in some ovarian and breast cancer cell lines (approximately $100\times$ more cytotoxic than cisplatin (CDDP) in MDA-MB-231) and are located in the actin cortex predominantly as shown by confocal luminescence microscopy. This discovery could open the door to a new large family of drug bioconjugates with diverse and simultaneous functions.

Platinum-based drugs such as CDDP, carboplatin, and oxaliplatin are widely used against various solid tumors including genitourinary, colorectal, and non-small cell lung cancers.¹ These complexes are known to exert their anti-cancer activity mainly via extensive DNA-adduct formation, which triggers apoptotic cell death.² However, their effectiveness is still hindered by clinical problems, including acquired or intrinsic resistance,³ a limited spectrum of activity, and high toxicity leading to side effects.⁴ Other precious metals such as ruthenium and iridium have attracted increasing attention as therapeutic agents,^{5,6} as well as biomolecular and cellular probes.⁷ On the other hand, benzimidazole has been shown to be a widely used pharmacophore,⁸ and some benzimidazole half-sandwich iridium(III) compounds have been recently shown by us to act as either anti-angiogenic

agents^{6d} or inhibitors of amyloid- β aggregation.^{6h} Accordingly, in continued efforts of developing novel better metallodrugs, here we disclose a series of substitutionally inert and luminescent iridium(III) antitumor agents of the type $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]$ (Chart 1) containing a benzimidazole $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligand (**a** and **b** in Chart 1A) with an ester group as a handy tool for further functionalization and a butyl group for *N*-substitution chosen initially to modulate the lipophilic properties of the final complex, together with various $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ ligands based on 2-phenylbenzimidazole (**HL**¹ and **HL**² in Chart 1B) and 1-phenylpyrazole (**HL**³). The iridium complexes **1c**, **2c** and **3c** containing the non-substituted $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligand 2-(2-pyridyl)-benzimidazole have also been prepared for comparison purposes.

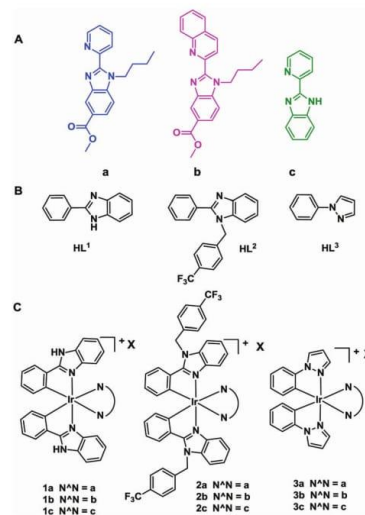


Chart 1 Structures of compounds included in this study.

^a Departamento de Química Inorgánica and Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, and Biomedical Research Institute of Murcia (IMIB-Arrixaca), E-30071 Murcia, Spain.

E-mail: jruiz@um.es; Tel: +34 868887455

^b Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. Kralovopolska 135, 612 65 Brno, Czech Republic. E-mail: brabec@ibp.cz

^c Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, Slechtitelu 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

^d Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, D-40225 Düsseldorf, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthesis, characterization data and biological study details. CCDC 1483570 and 1483571. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c6cc07909a

! Z dôvodu dodržania autorských práv nie je priložená plná verzia publikácie.

Článok je v plnom texte dostupný na stránkach:

<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2016/CC/C6CC07909A#!divAbstract>

8.1.3 PUBLIKÁCIA Č. 3

ENHANCING TUMOR CELL RESPONSE TO CHEMOTHERAPY THROUGH TARGETED DELIVERY OF PT DRUGS MEDIATED BY HIGHLY STABLE, MULTIFUNCTIONAL CARBOXYMETHYLCELLULOSE COATED MAGNETIC NANOPARTICLES

Zdenka Medrikova, Vojtech Novohradsky, **Juraj Zajac**, Oldrich Vrana, Jana Kasparikova, Aristides Bakandritsos, Martin Petr, Radek Zboril, Viktor Brabec

Chemistry - A European Journal **22** (2016), 9750-9759

Prehlasujem, že môj podiel na príprave tejto práce je nasledujúci:

Prevedenie experimentov zameraných na určenie cytotoxicity magnetických nanočastíc, obsahujúcich konjugáty cisplatiny s kyselinou listovou a fluorescenčnou značkou, v nádorových a nenádorových bunkách. Podiel na spísaní rukopisu publikácie.

Drug Delivery

Enhancing Tumor Cell Response to Chemotherapy through the Targeted Delivery of Platinum Drugs Mediated by Highly Stable, Multifunctional Carboxymethylcellulose-Coated Magnetic Nanoparticles

Zdenka Medříková^{+, [a]} Vojtech Novohradský^{+, [b]} Juraj Zajac^[b, c] Oldřich Vrána^[b]
Jana Kasparkova^[b] Aristides Bakandritsos^[a] Martin Petr^[a] Radek Zbořil^{*, [a]} and
Viktor Brabec^{*, [b]}

Abstract: The fabrication of nanoparticles using different formulations, and which can be used for the delivery of chemotherapeutics, has recently attracted considerable attention. We describe herein an innovative approach that may ultimately allow for the selective delivery of anticancer drugs to tumor cells by using an external magnet. A conventional antitumor drug, cisplatin, has been incorporated into new carboxymethylcellulose-stabilized magnetite nanoparticles conjugated with the fluorescent marker Alexa Fluor 488 or

folic acid as targeting agent. The magnetic nanocarriers possess exceptionally high biocompatibility and colloidal stability. These cisplatin-loaded nanoparticles overcome the resistance mechanisms typical of free cisplatin. Moreover, experiments aimed at the localization of the nanoparticles driven by an external magnet in a medium that mimics physiological conditions confirmed that this localization can inhibit tumor cell growth site-specifically.

Introduction

There is increasing interest in improving systems for delivery of the already approved anticancer drugs. A number of nanocarriers for the application of drugs have already been examined, for example, liposomal capsules,^[1] mineral and metallic nanoparticles (NPs; silica, gold, gold-coated iron oxide, or Prussian blue derived iron oxide),^[2] polymeric NPs,^[3] carbon nanotubes,^[4] micelle formulations,^[5] and dendrimers.^[6] Nevertheless, a search for new innovative nanodelivery systems offering improved efficacy and reduced toxicity, side-effects, and frequency of administration of conventional drugs continues.

Recently, various nanodelivery systems have also been used to improve the chemotherapeutic effectivity of cisplatin [*cis*-diamminedichloridoplatinum(II)] and its derivatives (see Ref. [7] for recent reviews). These platinum drugs are the most effective anticancer agents, but their clinical use is still connected with several limitations, including lack of selectivity, dose-limiting toxic side-effects, low bioavailability, and short retention in the bloodstream.^[8] Therefore, there is now a clear focus on the development of targeted platinum drugs and the NP-based delivery of platinum drugs appears to be a strategy for facilitating drug delivery and overcoming at least some of these limitations.^[7]

The use of nanoparticles that can be controlled and moved with an external magnetic field represents a well-established method for facilitating drug release at a specific site. This strategy could be used in patients to ensure that drugs are directed only towards solid tumors, thereby leaving healthy tissue/organs intact and greatly reducing the side-effects associated with chemotherapy. Thus, as an alternative to polymeric delivery systems, the use of magnetic nanoparticles (MNPs) stabilized by polymers in drug delivery is increasingly being explored. There are three features critical to the clinical development of effective drug-delivery NPs: The core material of the NPs, surface modifiers, and the therapeutic payload.^[9]

Engineered MNPs are a cutting-edge tool in medicine because they can be simultaneously functionalized with biocompatible polymers, guided by a magnetic field, and visualized by magnetic resonance imaging (MRI).^[10] Thus, specifically designed MNPs have been recognized as having potential in

[a] Dr. Z. Medříková,⁺ Dr. A. Bakandritsos, Dr. M. Petr, Prof. R. Zbořil
Regional Centre of Advanced Technologies and Materials
Department of Physical Chemistry
Faculty of Science, Palacky University
17. listopadu 12, 77146 Olomouc (Czech Republic)
E-mail: radek.zboril@upol.cz

[b] Dr. V. Novohradský,⁺ J. Zajac, Dr. O. Vrána, Prof. J. Kasparkova,
Prof. V. Brabec
Institute of Biophysics
Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i.
Kralovopolska 135, 612 65 Brno (Czech Republic)
E-mail: brabec@ibp.cz

[c] J. Zajac
Department of Biophysics
Faculty of Science, Palacky University
17. listopadu 12, 77146 Olomouc (Czech Republic)

[*] Both authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article can be found under:
<http://dx.doi.org/10.1002/chem.201600949>.

! Z dôvodu dodržania autorských práv nie je priložená plná verzia publikácie.

Článok je v plnom texte dostupný na stránkach:

<http://onlinelibrary.wiley.com/wol1/doi/10.1002/chem.201600949/abstract>

8.1.4 PUBLIKÁCIA Č. 4

POTENTIATION OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN TUMOR CELLS BY CONJUGATES OF METABOLIC MODULATOR DICHLOROACETATE WITH A Pt(IV) DERIVATIVE OF OXALIPLATIN

Juraj Zajac, Hana Kostrhunova, Vojtech Novohradsky, Oldrich Vrana, Raji
Raveendran, Dan Gibson, Jana Kasparikova, Viktor Brabec

Journal of Inorganic Biochemistry **156** (2016), 89-97

Prehlasujem, že môj podiel na príprave tejto práce je nasledujúci:

Stanovenie cytotoxicity, akumulácie a DNA väzby Pt(IV) derivátov oxaliplatiny, obsahujúcich metabolicky modulátor dichloracetát, v nádorových bunkách. Analýza účinku komplexov na zmenu mitochondriálneho membránového potenciálu, mieru glykolýzy a indukciu autofágie v bunkách. Štúdium vplyvu rôznych kombinácií 5-fluorouracilu (FU) s oxaliplatinou a komplexom [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] na cytotoxicitu v nádorových bunkách konečníka, stanovenie kombinačných indexov (CI). Podiel na spísaní rukopisu publikácie.

.....



Potential of mitochondrial dysfunction in tumor cells by conjugates of metabolic modulator dichloroacetate with a Pt(IV) derivative of oxaliplatin



Juraj Zajac^{a,b}, Hana Kostrhunova^a, Vojtech Novohradsky^a, Oldrich Vrana^a, Raji Raveendran^c, Dan Gibson^c, Jana Kasparkova^b, Viktor Brabec^{a,*}

^a Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

^b Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

^c Institute for Drug Research, School of Pharmacy, The Hebrew University, Jerusalem 91120, Israel

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2015

Received in revised form 20 October 2015

Accepted 8 December 2015

Available online 31 December 2015

Keywords:

Platinum-dichloroacetate conjugates

Mitochondrial dysfunction

Glucose metabolism

Autophagy

5-Fluorouracil

Cancer therapy

ABSTRACT

The molecular and cellular mechanisms of enhanced toxic effects in tumor cells of the Pt(IV) derivatives of anti-tumor oxaliplatin containing axial dichloroacetate (DCA) ligands were investigated. DCA ligands were chosen because DCA has shown great potential as an apoptosis sensitizer and anticancer agent reverting the Warburg effect. In addition, DCA reverses mitochondrial changes in a wide range of cancers, promoting tumor cell apoptosis in a mitochondrial-dependent pathway. We demonstrate that (i) the transformation of oxaliplatin to its Pt(IV) derivatives containing axial DCA ligands markedly enhances toxicity in cancer cells and helps overcome inherent and acquired resistance to cisplatin and oxaliplatin; (ii) a significant fraction of the intact molecules of DCA conjugates with Pt(IV) derivative of oxaliplatin accumulates in cancer cells where it releases free DCA; (iii) mechanism of biological action of the Pt(IV) derivatives of oxaliplatin containing DCA ligands is connected with the effects of DCA released in cancer cells from the Pt(IV) prodrugs on mitochondria and metabolism of glucose; (iv) treatments with the Pt(IV) derivatives of oxaliplatin containing DCA ligands activate an autophagic response in human colorectal cancer cells; (v) the toxic effects in cancer cells of the Pt(IV) derivatives of oxaliplatin containing DCA ligands can be potentiated if cells are treated with these prodrugs in combination with 5-fluorouracil. These properties of the Pt(IV) derivatives of oxaliplatin containing DCA ligands provide opportunities for further development of new platinum-based agents with the capability of killing cancer cells resistant to conventional antitumor platinum drugs used in the clinic.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Limitations connected with the use of cisplatin and its platinum(II) derivatives to treat cancer, such as inherent or acquired resistance and side effects [1], represent impetus to search for new antitumor platinum drugs. One concept for the design of new platinum anticancer drugs is to use substitutionally inert Pt(IV) complexes derived from cisplatin or its analogs containing axial ligands that are anti-proliferative agents or inhibitors to specific pathways related to resistance to cisplatin, capable of enhancing the efficacy of the platinum drug. Design of new antitumor Pt(IV) complexes is predicated on the assumption that the inertness of the Pt(IV) complexes will substantially reduce the extent of unwanted interactions with biological molecules before the prodrugs reach the cancer cells, and that they will be activated inside the cancer cells by reduction to release the cytotoxic Pt(II) complexes as well as the axial ligands.

* Corresponding author.

E-mail address: brabec@ibp.cz (V. Brabec).

Few years ago, the synthesis, characterization, and anticancer properties of the Pt(IV) prodrug Mitaplatin (c,t,c -[Pt(NH₃)₂(O₂CHCl₂)₂Cl₂]), which contains two dichloroacetate (DCA) ligands in the axial positions were reported [2–4]. DCA ligands were chosen because DCA has shown great potential as an apoptosis sensitizer and anticancer agent reverting the Warburg effect by inhibiting the activity of pyruvate dehydrogenase kinase, an important enzyme in tumor cells. DCA reverses mitochondrial changes in a wide range of cancers, promoting tumor cell apoptosis in a mitochondrial-dependent pathway and consequently making tumor cells selectively more unprotected to processes typical for death in normal cells [5–7]. Although the clinical use of DCA as an anticancer drug still requires additional examinations, it has been shown that DCA can be used in combination with other cancer therapies [8,9] including platinum-based drugs [10]. Interestingly, DCA showed synergistic antitumor effect in colorectal cancer cells in vitro in combination with 5-fluorouracil (5-FU) [11], which exhibits synergistic anticancer activity with oxaliplatin [12,13] and even more interestingly DCA was shown very recently to induce autophagy in colorectal cancer cells [9]. Mitaplatin was designed to release, following cellular uptake, by

! Z dôvodu dodržania autorských práv nie je priložená plná verzia publikácie.

Článok je v plnom texte dostupný na stránkach:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013415301331>

8.1.5 PUBLIKÁCIA Č. 5

INFLUENCE OF THE BINDING OF REDUCED NAMI-A TO HUMAN SERUM ALBUMIN ON THE PHARMACOKINETICS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Vojtech Novohradsky, Alberta Bergamo, Moreno Cocchietto, **Juraj Zajac**, Viktor
Brabec, Giovanni Mestroni, Gianni Sava

Dalton Transactions **44** (2015), 1905-1913

Prehlasujem, že môj podiel na príprave tejto práce je nasledujúci:

Stanovenie účinku NAMI-A, redukovaného NAMI-A ich aduktov s ľudským sérovým albumínom (HSA) na adhéziu nádorových buniek MDA-MB-231. Podiel na spísaní rukopisu publikácie.

.....

Cite this: *Dalton Trans.*, 2015, **44**,
1905

Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics and biological activity

V. Novohradský,^{a,b} A. Bergamo,^c M. Cocchiello,^c J. Zajac,^{a,b} V. Brabec,^a G. Mestroni^c and G. Sava*^{c,d}

NAMI-A is a ruthenium-based drug endowed with the unique property of selectively targeting solid tumour metastases. Although two clinical studies had already been completed, limited information exists on the behavior of NAMI-A after injection into the bloodstream. PK data in humans informs us of a rather low free drug concentration, of a relatively high half-life time of elimination and of a linear relationship between the administered dose and the corresponding AUC for up to toxic doses. In the present study, we examined the chemical kinetics of albumin binding with or without the presence of reducing agents, and we evaluated how these chemical aspects might influence the *in vivo* PK and the *in vitro* ability of NAMI-A to inhibit cell migration, which is a bona fide, rapid and easy way to suggest anti-metastatic properties. The experimental data support the binding of NAMI-A to serum albumin. The reaction is facilitated when the drug is in its reduced form and, in agreement with already reported data, the adduct formed with albumin maintains the biological activity of the ruthenium drug. The formation of the adduct is favored by low ratios of NAMI-A : HSA and by the reduction of the drug with ascorbic acid. The difference in *in vivo* PK and the faster binding to albumin of the reduced NAMI-A seem to suggest that the drug is not rapidly reduced immediately upon injection, even at low doses. Most probably, cell and protein binding prevail over the reduction of the drug. This observation supports the thesis that the reduction of the drug before injection must be considered relevant for the pharmacological activity of NAMI-A against tumour metastases.

Received 17th September 2014,
Accepted 14th November 2014
DOI: 10.1039/c4dt02865awww.rsc.org/dalton

Introduction

The development of metal based compounds as drugs for the treatment of cancer, which initially focused almost only on platinum, is today extended to other transition metals, among which ruthenium appears to be one of the most attractive candidates.^{1–3} There are objective and opportunistic reasons to stress the role of ruthenium for metal-based anticancer drugs. The main reason is related to the generally more tolerated toxicity of the ruthenium compounds compared to the classical platinum complexes when they are tested in living beings.^{4–7} The opportunistic reason is that among the many metal compounds synthesized and studied in more than 50 years, after

the discovery of cisplatin, only two ruthenium complexes, namely, imidazolium *trans*-imidazoledimethylsulphoxide-tetrachlororuthenate (NAMI-A) and sodium *trans*-bis-indazole-tetrachlororuthenate (KP1339), have moved to clinical studies in humans.^{8,9} NAMI-A is attractive because of its ability to target solid tumor metastases rather than to exert a non-selective tumor toxicity.^{4,10–12} In fact, tumor metastases represent the main target of cancer chemotherapy and their eradication is the only way to cure the disease.^{13–16} NAMI-A, although with a still only-presumed target and mechanism of action,^{17–20} represents a metal-based compound endowed with innovative properties, matching a currently unmet need of oncological treatments. If there is very little doubt about the metastasis selectivity,^{10,12,21} limited information exists on the behavior of NAMI-A once injected into the bloodstream. PK data in humans informs us of a rather low free drug concentration, of a relatively high half-life time of elimination and of a linear relationship between the administered dose and the corresponding AUC up to toxic doses.⁸ However, there are at least two unanswered questions: (a) what is the preferred oxidation state of the metal center with which NAMI-A binds to plasma proteins? and (b) is the albumin-adduct endowed with the same biological activities of free NAMI-A? Both these questions

^aInstitute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic. Fax: +420 541240499; Tel: +420 541517148

^bDepartment of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17.Listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

^cCallerio Foundation Onlus, via A. Fleming 22, 34127-Trieste, Italy. E-mail: gsava@units.it

^dDepartment of Life Sciences, University of Trieste, via A. Fleming 22, 34127-Trieste, Italy

! Z dôvodu dodržania autorských práv nie je priložená plná verzia publikácie.

Článok je v plnom texte dostupný na stránkach:

<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2015/DT/c4dt02865a#!divAbstract>

8.2 ŠTRUKTÚROVANÝ ŽIVOTOPIS

Osobné údaje

Meno: Mgr. Juraj Zajac
Dátum narodenia: 15. 1. 1988
Bydlisko: Andreja Sládkoviča 57/674, 018 51 Nová Dubnica, Slovensko
Telefón: +421 902 221870
E-mail: zajacee@gmail.com
Národnosť: slovenská

Vzdelanie

2013 – súčasnosť Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Biofyzika
doktorský študijný program
Téma dizertačnej práce: *Mechanistické štúdie zamerané na poznanie mechanizmov toxických účinkov komplexov prechodných kovov v nádorových bunkách*

2010 – 2013 Prírodovedecká fakulta, Masarykova univerzita v Brne
Aplikovaná biofyzika
udelený titul Mgr.
Téma diplomovej práce: *Využitie plazmy pre sterilizáciu*

2008 – 2010 Prírodovedecká fakulta, Masarykova univerzita v Brne
Lekárska fyzika
udelený titul Bc.
Téma bakalárskej práce: *Röntgenová rádiografia*

Pracovné skúsenosti

01/2016 – súčasnosť Oddelenie molekulárnej biofyziky a farmakológie
Biofyzikálny ústav AV ČR, Brno
výskumný pracovník

Vedecko-výskumné zahraničné stáže

01/2017 – 04/2017 Rothberg International School
Prírodovedecká fakulta, Hebrejská univerzita
Jeruzalem, Izrael

02/2014 – 05/2014 Callerio Foundation Onlus
Prírodovedecká fakulta, Univerzita v Terste
Terst, Taliansko

Príspevky na konferenciách

28/08 – 01/09/2016 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference
EuroBIC 13, Budapešť, Maďarsko
*Potentiation of mitochondrial dysfunction in tumor cells
by conjugates of metabolic modulator dichloroacetate
with a Pt(IV) derivative of oxaliplatin*
plagát

11/4 – 12/4/2014 Functional metal complexes that bind to biomolecules
COST, CM1105, Terst, Taliansko
Potentialities of Metal-based compounds targeting proteins

Jazykové znalosti

slovenčina – materský jazyk

čeština – aktívne

angličtina – pokročilý

španielčina – mierne pokročilý

ruština – pasívne

Univerzita Palackého v Olomouci

Prírodovedecká fakulta

Katedra biofyziky



Mechanistické štúdie zamerané na poznanie mechanizmov toxických účinkov komplexov prechodných kovov v nádorových bunkách

Mechanistic studies focused on understanding the toxic effects of transition metal complexes in tumor cells

Autoreferát k dizertačnej práci

Olomouc 2017

Juraj Zajac

Uchádzač

Mgr. Juraj Zajac

Školiteľ

Prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.

Oponenti

Miesto a termín obhajoby

S dizertačnou prácou a posudkami je možné sa zoznámiť na študijnom oddelení
Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

ABSTRAKT

Rakovina patrí medzi najzákernejšie a najrozšírenejšie choroby modernej doby. Predpokladá sa, že do roku 2050 sa počet pacientov diagnostikovaných na rakovinu zvýši až dvojnásobne. Aktuálny stav ako aj prognózy vedú k dramatickej potrebe pre vývoj a aplikáciu efektívnejších protinádorových liečiv. Komplexy na báze platiny reprezentujú neoddeliteľnú zložku súčasnej protinádorovej terapie. Približne polovici onkologických pacientov je podávaná chemoterapia vo forme platinových cytostatik. Najpoužívaným platinovým liečivom je cisplatina, ktorá bola prvýkrát syntetizovaná Peyronom už v roku 1845. Protinádorovú aktivitu cisplatiny objavil v roku 1965 americký biofyzik Barnett Rosenberg, ktorý tak významne prispel k pokroku v chemoterapeutickej liečbe rakoviny. Za hlavný mechanizmus účinkov cisplatiny a jej analógov ďalších generácií (karboplatina a oxaliplatina) je považovaná interakcia s bunečnou DNA. Konformačné zmeny DNA vyvolané väzbou platinových cytostatik majú za následok ovplyvnenie veľkého množstva bunečných procesov, ktoré nakoniec vedú k programovanej bunečnej smrti - apoptóze. Aj napriek úspechom majú platinové cytostatiká niekoľko závažných nedostatkov, ktoré limitujú ich použitie. Hlavným nedostatkom je slabá špecificita, ktorá je spojená s vážnymi vedľajšími účinkami. Navyše, vrodená a získaná rezistencia nádorov voči platinovým liečivám spôsobuje zníženie ich protinádorovej aktivity. Snaha prekonať nedostatky konvenčných platinových cytostatik odštartovala renesanciu v bioanorganickej chémii a viedla k syntéze tisícok nových platinových komplexov, ako aj komplexov ďalších prechodných kovov a transportných systémov pre lokalizáciu komplexov do nádorových buniek.

Jedným z konceptov pri vývoji efektívnejších protinádorových liečiv je konjugácia platinových cytostatik s inými biologicky aktívnymi látkami, ktoré majú obvykle osobitý mechanizmus účinku. Za týmto účelom bola pripravená a študovaná nová skupina derivátov cisplatiny, obsahujúcich ligandy nesteroidného protizápalového liečiva diklofenak. Bolo zistené, že tieto Pt(II) komplexy sú selektívne cytotoxické vo vybraných nádorových líniiach. Okrem toho vykazujú aktivitu v nádorových bunkách rezistentných voči cisplatine. Jeden z komplexov, $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{Dic})_2(\text{NH}_3)_2]$ s dvomi ligandami diklofenaku viazanými k Pt(II) centru cez karboxylovú skupinu, je účinnejší než samotná cisplatina a vyznačuje sa zvýšenou bunečnou akumuláciou spolu so zvýšenou väzbou na nukleárnu DNA. Mechanistické štúdie naznačujú,

že *cis*-[Pt(Dic)₂(NH₃)₂] ovplyvňuje bunecný metabolizmus glukózy a spôsobuje kolaps mitochondriálneho membránového potenciálu v nádorových bunkách. Prítomnosť molekúl diklofenaku taktiež prispieva k schopnosti komplexu blokovat' bunecný cyklus nádorových buniek a potlácat' ich metastatický potenciál.

Iným prístupom je využitie kineticky inertnejších Pt(IV) komplexov a modifikácia ich axiálnych ligandov. Štúdie nových Pt(IV) derivátov oxaliplatiny s axiálnymi ligandami dichloracetátu ukazujú, že tieto látky majú protinádorové mechanizmy spojené nielen s väzbou na nukleárnu DNA, ale aj s účinkami na mitochondrie, metabolizmus glukózy a autofágiu nádorových buniek. Komplexy sú navyše schopné prekonať vrodenu a získanu rezistenciu nádorových buniek voči klinicky používanej oxaliplatine a cisplatine. Cytotoxické účinky komplexov môžu byť dokonca zosilnené v kombinácii s protinádorovým chemoterapeutickým liečivom 5-fluorouracil.

Nanočastice rôznych formulácii reprezentujú inovatívne systémy s možnosťou selektívneho transportu protinádorových liečiv do cieľových nádorov. Táto myšlienka bola využitá pri syntéze a štúdiu novej skupiny magnetických nanočastíc modifikovaných cisplatinou. Študované nanočastice majú vo vybraných nádorových línii, vrátane buniek rezistentných, výrazne vyššiu aktivitu než samotná cisplatina. Okrem toho nanočastice nie sú cytotoxické v nenádorových bunkách, a vykazujú teda istý druh nádorovej selektivity.

Pri syntéze potenciálnych protinádorových liečiv sú čoraz častejšie využívané aj ostatné prechodné kovy, ako napríklad ruthénium alebo irídium. NAMI-A je klinicky testovaný ruthéniový komplex, ktorý selektívne inhibuje rast nádorových metastáz. Napriek dokončeniu dvoch klinických skúšok, len málo informácii existuje o správaní NAMI-A po aplikácii do krvného obehu. Z tohto dôvodu bol skúmaný vplyv chemických modifikácii NAMI-A na jeho antimetastatický potenciál. Pre simuláciu metastatickej kapacity nádorov bol využitý test adhézie vysoko invazívnych nádorových buniek. Test ukázal, že redukcia NAMI-A a formovanie aduktov s ľudským sérovým albumínom výrazne ovplyvňujú jeho účinky na bunecnú adhéziu. Toto zistenie podporuje teóriu, že chemické modifikácie NAMI-A určujú jeho farmakologickú aktivitu v metastázach nádorov. Ďalej bola študovaná nová skupina substitučne inertných a luminiscenčných irídiových komplexov typu [Ir(C^N)₂(N^N)] [PF₆] s ligandami na báze benzimidazolu. Ukázalo sa, že mechanizmus zodpovedný za cytotoxické účinky komplexov je odlišný od mechanizmu cisplatiny a nezahrňuje koordinačnú väzbou na nukleové kyseliny.

Mechanistické štúdie komplexov prechodných kovov v predloženej práci dokazujú, že racionálnym návrhom chemickej štruktúry možno dosiahnuť významnej protinádorovej účinnosti týchto chemoterapeutických látok.

ABSTRACT

Cancer is one of the most serious and widespread diseases in the modern ages. It is predicted that the number of patients diagnosed with cancer will double by 2050. Current situation as well as prognoses lead to a dramatic growth in demand for development and application of more effective anticancer drugs. Today, platinum-based complexes represent an integral part of anticancer therapy. Approximately half of oncological patients who receive chemotherapeutic treatment are given platinum-based cytostatic drugs. The most widely used platinum drug is cisplatin, which was first synthesized by Peyrone as far back as 1845. The anti-neoplastic activity of cisplatin was discovered by American biophysicist Barnett Rosenberg in 1965, who thereby significantly contributed to the progress in chemotherapeutic treatment of cancer. As the main mechanism of action of cisplatin and its analogues of next generations (carboplatin and oxaliplatin) is considered to be an interaction with cellular DNA. Conformation changes of DNA, initiated by a binding of platinum cytostatic drugs, result in an influence of many cellular processes that finally lead to the induction of programmable cell death – apoptosis. Despite the success of platinum drugs, there are several significant shortcomings that limit their use. The major disadvantage is their poor specificity, which is associated with severe side effects. In addition, the intrinsic and acquired drug resistance of tumors restricts the antitumor activity of platinum-based drugs. The effort of overcoming drawbacks of conventional platinum drugs precipitated a renaissance in bioinorganic chemistry and led to the synthesis of many thousands of platinum complexes, as well as other transition metal complexes and transport systems for the localization of complexes into tumor cells.

One of the concepts for developing more effective anticancer drugs is the conjugation of platinum cytostatics with other biologically active compounds that usually exhibit unique mechanism of action. For this purpose, a series of cisplatin derivatives containing ligands of non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac were synthesized and studied. It was found that these Pt(II) compounds are selectively cytotoxic in selected tumor cell lines. Moreover, they exhibit activity in cisplatin resistant tumor cells. One of the complexes, *cis*-[Pt(Dic)₂(NH₃)₂] with two diclofenac ligands coordinated to Pt(II) centre through the carboxylic group, is more effective than parental cisplatin and is characterized by an enhanced cellular uptake together with nuclear DNA

binding. Mechanistic studies indicate that *cis*-[Pt(Dic)₂(NH₃)₂] affects the cellular glucose metabolism and causes the collapse of mitochondrial membrane potential in tumor cells. The presence of diclofenac molecules also contributes to the ability of complex to arrest cell cycle of tumor cells and suppress their metastatic potential.

Another approach is the utilization of kinetically more inert Pt(IV) complexes and modification of their axial ligands. The studies of newly synthesized Pt(IV) derivatives of oxaliplatin containing axial dichloroacetate ligands show that these compounds have anticancer mechanisms associated not only with the nuclear DNA binding, but also with the effects on mitochondria, glucose metabolism and autophagic response of tumor cells. In addition, the complexes are able to overcome inherent and acquired resistance of tumor cells against clinically used cisplatin and oxaliplatin. The cytotoxic effects of complexes can be even more potentiated when combined with the anticancer chemotherapeutic drug 5-fluorouracil.

The nanoparticles of different formulations represent innovative systems with the possibility to selectively deliver anticancer drugs into the target tumors. This concept was used for the synthesis and investigation of novel magnetic nanoparticles modified with cisplatin. The studied nanoparticles are significantly more active than cisplatin in selected tumor cell lines including cisplatin-resistant tumor cells. Moreover, the nanoparticles are not cytotoxic in noncancerous cells, and hence they exhibit a certain kind of tumor selectivity.

There is a growing interest in taking advantage of other transition metals, such as the ruthenium or the iridium, for the synthesis of potential anticancer drugs. NAMI-A is a clinically tested ruthenium complex that selectively inhibits the growth of tumor metastases. Although two clinical studies have already been completed, very poor information exists on the behavior of NAMI-A once injected into the bloodstream. For that reason, the impact of chemical modifications of NAMI-A on its anti-metastatic potential was investigated. The adhesion test of highly invasive cancer cells was used as a simulation of tumor metastatic capacity. The test showed that the reduction and aggregation of NAMI-A with human serum albumin significantly influence its effects on cellular adhesion. This observation supports the thesis that the chemical modifications of NAMI-A determine its pharmacological activity in tumor metastases. A new class of substitutionally inert and luminescent iridium complexes of the type [Ir(C[^]N)₂(N[^]N)][PF₆] containing benzimidazole-based ligands was further studied. It was showed that the mechanism responsible for the cytotoxic effects of these complexes

differs from that of cisplatin and is not involving coordinative binding to nucleic acids.

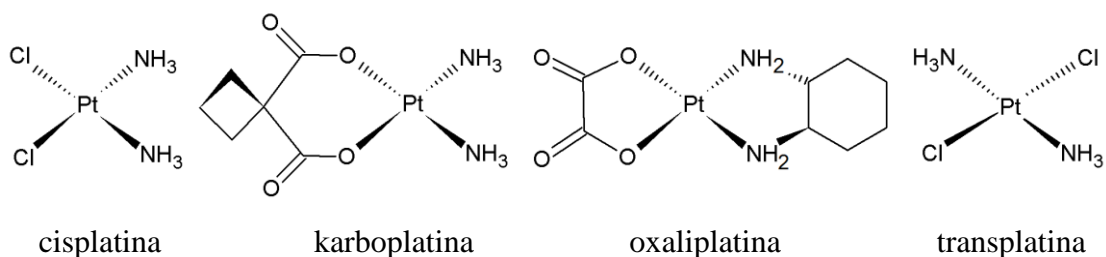
Mechanistic studies on transition metal complexes in present work confirm that the rational design of chemical structure may significantly enhance the anticancer activity of these chemotherapeutic compounds.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
1.1	Konvenčné platinové cytostatiká	8
1.1.1	Mechanizmus pôsobenia konvenčných platinových cytostatik	9
1.1.2	Rezistencia nádorov voči konvenčným platinovým cytostatikám.....	10
1.2	Význam platičitých komplexov	11
1.3	Využitie nanočastíc pri terapii platinovými cytostatikami.....	11
1.4	Komplexy ostatných prechodných kovov	12
1.4.1	Ruthéniové komplexy	12
1.4.2	Irídiové komplexy	13
2	CIELE PRÁCE.....	15
3	VÝSLEDKY A DISKUSIA	16
3.1	Nové protinádorovo účinné Pt(II) konjugáty obsahujúce nesteroidné protizápalové liečivo diklofenak: syntéza a duálne mechanizmy účinkov (PUBLIKÁCIA Č. 1).....	16
3.2	Posilnenie mitochondriálnej dysfunkcie v nádorových bunkách pomocou konjugátov metabolického modulátora dichlóracetát s Pt(IV) derivátmi oxaliplatiny (PUBLIKÁCIA Č. 4).....	18
3.3	Zvýšenie chemoterapeutickej odpovede nádorových buniek prostredníctvom cieleného transportu platinových liečiv vysoko stabilnými multifunkčnými magnetickými nanočasticami pokrytými karboxymetylcelulózou (PUBLIKÁCIA Č. 3)	20
3.4	Vplyv väzby redukovaného NAMI-A k ľudskému sérovému albumínu na farmakokinetiku a biologickú aktivitu (PUBLIKÁCIA Č. 5).....	21
3.5	Protinádorovo účinné extranukleárne luminiscenčné Ir(III) komplexy obsahujúce ligandy na báze benzimidazolu s možnosťou ďalšej funkcionalizácie (PUBLIKÁCIA Č. 2).....	22
4	ZÁVER.....	24
5	ZOZNAM CITOVANEJ LITERATÚRY	27
6	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	32
7	ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ	33
8	ŠTRUKTÚROVANÝ ŽIVOTOPIS	34

1 ÚVOD

Náhodný objav protinádorových účinkov cisplatiny v 60-tych rokoch 20. storočia reprezentuje jeden z najväčších úspechov v histórii onkológie [1]. Cisplatina, karboplatina a oxaliplatina (*Obrázok 1*) sú v súčasnosti jediné platinové cytostatiká (*cyto* - bunka, *stasis* - zastavenie, látky zastavujúce bunkové delenie) používané v klinickej praxi na celom svete. Ďalšie tri liečivá: nedaplatina, lobaplatina, a heptaplatina boli schválené pre klinickú terapiu v niektorých ázijských krajinách. Aj keď sa platinové cytostatiká používajú pri liečbe nádorov už takmer 40 rokov, stále patria medzi najrozšírenejšie chemoterapeutické látky. Obrovskou známkou ich úspechu je aj fakt, že od zavedenia cisplatiny pre liečbu rakoviny mužských semenníkov, dosiahla účinnosť terapie týchto typov nádorov viac ako 95% [2]. Napriek širokému využitiu konvenčných platinových cytostatik, nové protinádorové liečivá na báze komplexov prechodných kovov nezískali schválenie pre celosvetové použitie v klinickej praxi už viac ako dekádu. Výskumné aktivity v tejto oblasti však naďalej intenzívne pokračujú s cieľom objaviť nové a účinnejšie látky bez nežiaducich účinkov [1].



Obrázok 1. Schematická reprezentácia štruktúr platinových cytostatik používaných v klinickej praxi a biologicky neaktívna transplatina. Nakreslené v programe *ACD/ChemSketch*.

1.1 Konvenčné platinové cytostatiká

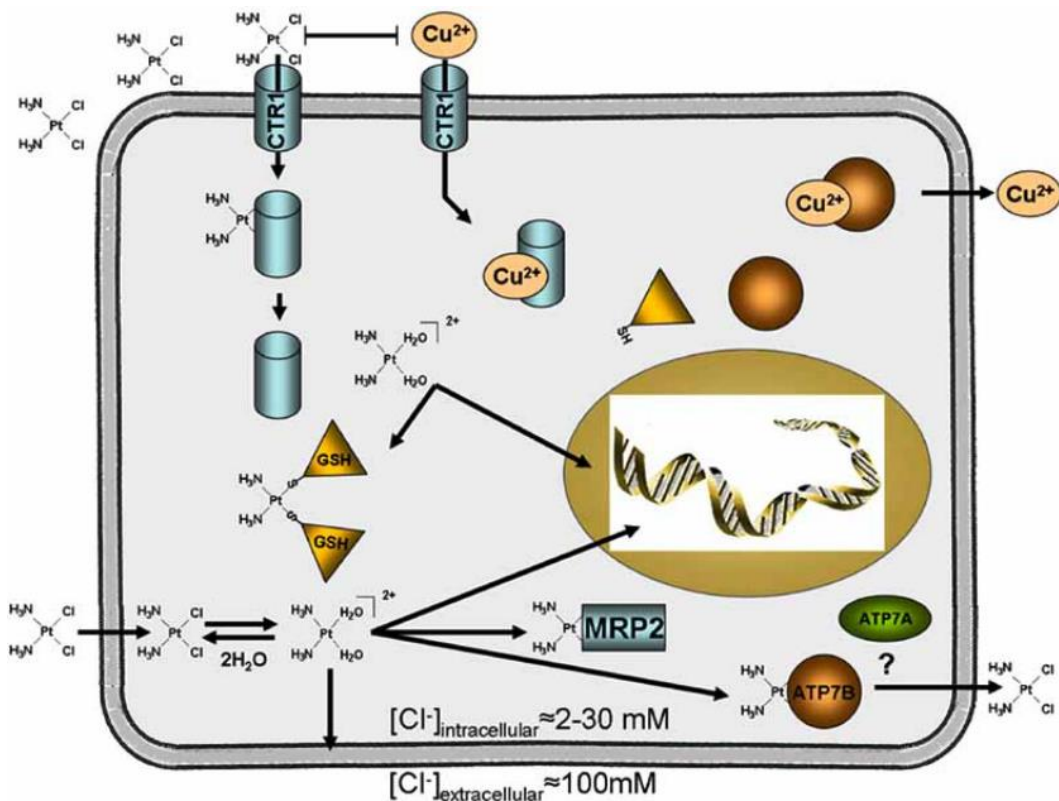
Cisplatina (Platinol, CDDP) je protinádorové liečivo v súčasnosti používaná primárne pri liečbe rakoviny semenníkov, vaječníkov, močového mechúra, ale aj nádorov hlavy, krku, pľúc, mozgu, pažeráku a krčku maternice [3]. Použitie cisplatiny v klinickej praxi je limitované jej nepriaznivými vedľajšími účinkami (poškodenie ľadvín, sluchu, vypadávanie vlasov, zvracanie) a vrodenu alebo získanou rezistenciou. Klinický vývoj cisplatiny spočiatku prebiehal pod vedením Národného inštitútu pre výskum rakoviny (NCI, USA) v spolupráci s firmami Johnson Matthey a Engelhard Industries, známymi

spracovaním drahých kovov [4]. Johnson Matthey ďalej pokračoval vo výskume protinádorových platinových liečiv a v spolupráci s firmou Bristol-Myers vyvinuli analóg cisplatinovej prvej generácie - karboplatinu (Paraplatin, JM8) [5]. Úspech karboplatinovej spočíval v znížení toxicity na zdravé bunky a teda potlačení vedľajších účinkov [6]. Jej používanie však sprevádzala krížová rezistencia s cisplatinou. Karboplatina je v súčasnosti podávaná pri liečbe rakoviny vaječníkov ale tiež nádorov hlavy, krku, mozgu, kŕčku maternice, semenníkov, prs, pľúc a močových ciest. Výsledky klinických skúšok poukázali na rovnakú mieru prežitia pacientov pri liečbe rakoviny vaječníkov pomocou karboplatinovej než v prípade cisplatinovej a vo väčšine krajín je karboplatina základnou zložkou terapie týchto typov nádorov [7].

Oxaliplatin (Eloxatin, 1-OHP) je analóg cisplatinovej druhej generácie [8] a zároveň posledné platinové cytostatikum, ktoré získalo schválenie pre používanie v klinickej praxi na celom svete [9]. Spolu s 5-fluorouracilom je súčasťou kombinovanej terapie pri liečbe rakoviny hrubého čreva a konečníka [1]. Liečba oxaliplatinou nevykazuje krížovú rezistenciu s cisplatinou ani karboplatinou, je ale spojená s vedľajšími účinkami ako periférna zmyslová neuropatia či potlačenie krvotvorby [10].

1.1.1 Mechanizmus pôsobenia konvenčných platinových cytostatik

Mechanizmus, ktorým klasické platinové liečiva vykazujú svoj protinádorový účinok je predmetom skúmania už celé desaťročia. Množstvo experimentov bolo zameraných na štúdium látok štruktúrne podobných cisplatinovej ($cis\text{-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$), a teda neutrálnych komplexov štvorcovo-planárnej štruktúry s dvomi amínovými a dvomi aniónovými skupinami v *cis* konformácii. Amínové skupiny cisplatinovej sú často nazývané aj ako “neodstupujúce ligandy“, pretože zostávajú naviazané k centrálnemu atómu platiny počas celého procesu vnútrobunecných transformácií. Naopak, chloridové “odstupujúce ligandy“ opúšťajú koordinačnú sféru komplexu a umožňujú jeho vnútrobunecnú aktiváciu. Všeobecný mechanizmus účinku cisplatinovej a jej štruktúrnych analógov zahŕňa štyri kľúčové kroky (*Obrázok 2*): (i) bunecnú akumuláciu, (ii) hydrolýzu/aktiváciu, (iii) DNA väzbu a (iv) odpoveď bunky na poškodenie DNA vedúcej k apoptóze - programovanej bunecnej smrti [11].



Obrázok 2. Schéma znázorňujúca akumuláciu cisplatiny do buniek, jej aktiváciu a väzbu k nukleárnej DNA. Spolu s pasívnou difúziou zohrávajú dôležitú úlohu v transporte cisplatiny cez bunecnú membránu aj aktívne transportéry medi (CTR1). Po preniknutí do cytoplazmy buniek môže dôjsť k inaktivácii cisplatiny glutatiónom (GSH) alebo inými síru obsahujúcimi biomolekulami. Med' transportujúci adenosín trifosfát (ATP7B) sa podieľa na exporte cisplatiny von z bunky. Iným transportným proteínom spojeným s rezistenciou voči cisplatine je multišpecifický prenášač organických aniónov (MRP2). Prevzaté z [12].

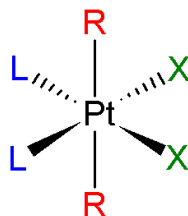
1.1.2 Rezistencia nádorov voči konvenčným platinovým cytostatikám

Po uvedení cisplatiny do klinickej praxe sa pozornosť okamžite presunula k otázkam, prečo niektoré typy nádorov získali rezistenciu voči tomuto liečivu počas terapie a prečo iné typy nádorov vykazovali vrodennú rezistenciu. Naopak, niektoré štúdie sa zamerali na otázku spojenú so zvýšenou senzitivitou nádorov semenníkov pri liečbe cisplatinou [13]. In vitro experimenty s ľudskými nádorovými bunkami ukázali, že rezistencia môže byť výsledkom dvoch mechanizmov: (i) nedostatočného množstva platiny naviazanej na cieľovú DNA alebo (ii) neschopnosti vyvolať bunecnú smrť po formovaní aduktov s DNA. Množstvo buniek rezistentných voči platinovým liečivám má pozmenený fenotyp zahrnujúci akumuláciu liečiva, rozpoznanie DNA aduktov,

ich opravu a apoptózu. Porozumenie molekulárnych princípov rezistencie voči konvenčným platinovým cytostatikám by mohlo viesť k novým stratégiám pri liečbe niektorých typov nádorov.

1.2 Význam platičitých komplexov

Protinádorová aktivita platičitých - Pt(IV) komplexov je známa už od dôb objavenia biologických účinkov cisplatiny [14], ale ich klinický význam sa stal predmetom štúdia len nedávno. Fyzikálno-chemické vlastnosti platičitých komplexov sa výrazne odlišujú od vlastností platnatých - Pt(II) komplexov. Platičité komplexy majú na rozdiel od štvorcovo-planárnej štruktúry platnatých komplexov väčšinou šesťosú štruktúru s geometriou osemstenu (Obrázok 3). Kineticky inertnejšie Pt(IV) komplexy sú značne odolné voči substitúcii odstupujúcich ligandov, čím dochádza k minimalizácii postranných reakcií pred samotnou aktiváciou komplexov vo vnútri buniek. Dva axiálne ligandy navyše umožňujú cielene vylepšiť farmakologické vlastnosti komplexov, akými sú napríklad lipofilita, stabilita, nádorová selektivita, bunčná akumulácia či doplnková biologická aktivita. Redukcia Pt(IV) centier na Pt(II) prostredníctvom straty axiálnych ligandov je nevyhnutným predpokladom pre protinádorovú aktivitu platičitých komplexov. Redukčný potenciál Pt(IV) komplexu závisí na charaktere jeho ligandov, ako aj na prítomnosti biologických redukčných činidiel [2].



Obrázok 3. Schematická reprezentácia Pt(IV) komplexu s odstupujúcimi ekvatoriálnymi ligandami (X), neodstupujúcimi ekvatoriálnymi ligandami (L) a axiálnymi ligandami (R). Nakreslené v programe *ACD/ChemSketch* podľa [15].

1.3 Využitie nanočastíc pri terapii platinovými cytostatikami

Snaha vyvinúť bezpečnejšie a selektívnejšie protinádorové liečivá viedla k využitiu transportných systémov na báze nanočastíc. Všeobecnými výhodami nanočastíc je zníženie systémovej toxicity terapeutických látok a zvýšenie ich akumulácie v cieľových miestach. Lipidové nanočastice, známe aj ako lipozómy, boli jedny z prvých a zároveň najviac študovaných nanoformulácií cisplatiny. K príprave lipozómov

a následnej enkapsulácii cisplatinu môžu byť použité lipidy rôzneho zloženia, ktoré určujú kinetiku uvoľňovania komplexu v nádorových bunkách. Ďalšie modifikácie lipozómov, ako napríklad naviazanie polyetylén glykolu (PEG), zabezpečujú dlhšiu cirkuláciu v krvnom obeh. Väzba špecifických ligandov na povrch lipozómov môže prispievať k zvýšenej nádorovej selektivitě. Takto pripravené nanočastice majú obvykle veľkosť 100-300 nm [16]. Z výsledkov klinických štúdií lipozómálnych formulácií cisplatinu vyplýva, že pri vývoji nových nanočastíc je kľúčovým faktorom bezpečné dopravenie liečiva do cieľových miest bez straty terapeutického účinku. Množstvo ďalších systémov na báze uhlíkových, polymérnych a kovových nanočastíc je v súčasnosti študovaných v snahe vyvinúť inovatívne stratégie pre platinovú terapiu [2, 17].

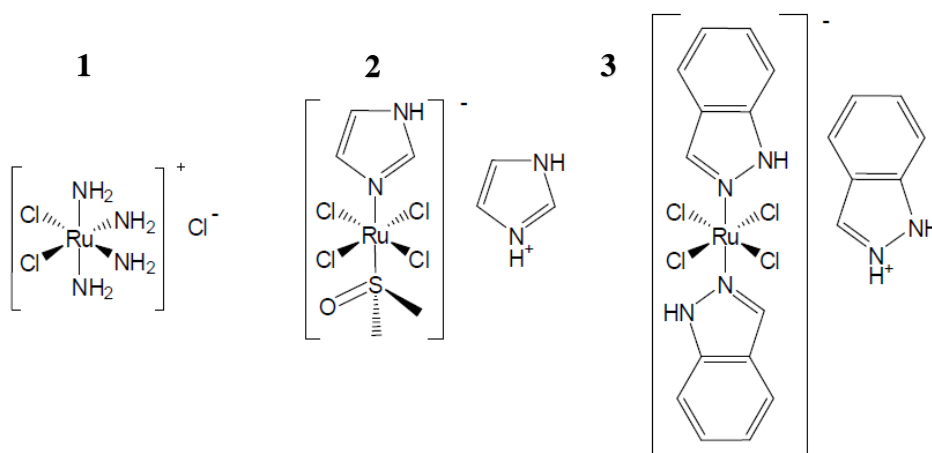
1.4 Komplexy ostatných prechodných kovov

Klinické úspechy cisplatinu stimulovali záujem o syntézu a štúdium ďalších komplexov na báze prechodných kovov. Napriek výskumu obrovského množstva analógov cisplatinu, iba dve protinádorové liečiva tohto typu, karboplatina a oxaliplatina, boli schválené pre klinické používanie na celom svete. Tisíce ďalších platinových komplexov boli pripravené s cieľom vylepšiť terapeutické účinky konvenčných cytostatik a prekonať ich nedostatky, avšak pravdepodobnosť objavy unikátneho platinového liečiva zostala relatívne nízka. Toto poznanie viedlo k zvýšenému záujmu o komplexy ostatných prechodných kovov s potenciálne odlišnými mechanizmami účinku [18, 19].

1.4.1 Ruthéniové komplexy

Biologické účinky ruthéniových komplexov sú v posledných rokoch študované s narastajúcim záujmom hlavne vďaka ich stabilnej, dobre charakterizovanej a predvídateľnej štruktúre, ktorá môže byť modulovaná voľbou správnych ligandov [20]. Po objave protinádorového účinku anorganického farbiva ruthéniová červeň [21] bolo zistené, že niektoré Ru(III) komplexy ako napríklad *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (*Obrázok 4*) takisto vykazujú aktivitu v nádorových bunkách [22]. Výsledkom ďalšieho výskumu boli prvé a doposiaľ jediné ruthéniové komplexy, ktoré vstúpili do klinického testovania: NAMI-A (imidazolium *trans*-[tetrachlorido(imidazol)(dimetylsulfoxid) ruthenát(III)]) a KP1019 (indazolium *trans*-[tetrachloridobis(1H-indazol) ruthenát(III)]) (*Obrázok 4*). Bolo ukázané, že NAMI-A a KP1019 zabraňujú tvorbe metastáz a inhibujú pokročilé

štádia nádorov s relatívne nízkou systémovou toxicitou [23, 24, 25]. Predpokladá sa, že tieto Ru(III) komplexy sú inertné mimo prostredia nádorových buniek a práve v bunkách dochádza k ich aktivácii a väzbe na DNA [24, 26]. Avšak, celkový mechanizmus protinádorovej aktivity NAMI-A pravdepodobne súvisí s poškodením regulácie bunčného cyklu a mimobunčnej hmoty [27], zatiaľ čo KP1019 spôsobuje priamu bunčnú apoptózu prostredníctvom vnútornej mitochondriálnej dráhy a tvorbu reaktívnych foriem kyslíka [24]. NAMI-A dokončilo fázu I klinických výskumov v roku 2004 a KP1019 v roku 2008 s plánmi vstúpiť do ďalšieho testovania [28, 27].



Obrázok 4. Chemické štruktúry niektorých ruthéniových komplexov: *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (1), NAMI-A (2) a KP1019 (3). Prevzaté z [29].

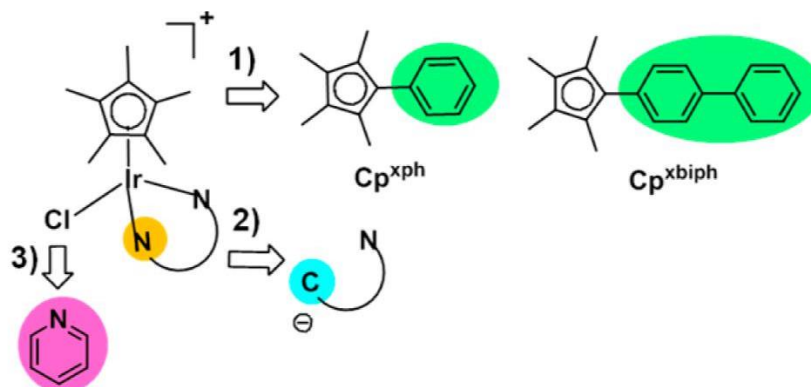
1.4.2 Irídiové komplexy

Veľké množstvo pôvodne neaktívnych Ir(III) komplexov sa po štrukturálnych zmenách ukázalo byť prekvapivo účinných v nádorových bunkách. Napríklad irídiové komplexy polsendvičovej štruktúry, obsahujúce ligand pentametyl-cyklopentadienyl (Cp) (Obrázok 5), získali modifikáciou ligandov výraznú protinádorovú aktivitu [30]. Skrining v skupine šesťdesiatich bunčných nádorových línii (NCI-60) ukázal, že takto modifikované komplexy môžu mať porovnateľnú či dokonca vyššiu protinádorovú aktivitu než klinicky používaná oxaliplatina a cisplatina, a to prevažne v leukemických, prsných, črevných a nádorových bunkách melanómov [31]. Detailnejšie štúdie odhalili rozdiely medzi komplexami irídia a klasickými platínovými cytostatikami, vrátane mechanizmov ich pôsobenia [32, 33]. Aktivita Ir(III) komplexov polsendvičovej štruktúry v nádorových bunkách výrazne rastie s množstvom fenylových kruhov naviazaných na Cp ligand. Zvýšená lipofilita ligandov Cp^{xph} a Cp^{xbiph} uľahčuje transport

komplexov cez bunečnú membránu a umožňuje ich interkaláciu (nekovalentnú väzbu) s DNA. Zaujímavosťou je, že Cp^{xph} a Cp^{xbiph} komplexy sú schopné interagovať s DNA dvojitém spôsobom. Na jednej strane modifikujú DNA pomocou interkalácie, na druhej strane sa kovalentne viažu priamo k bázam DNA, a blokujú tak jej replikáciu. DNA je teda dôležitý biologický cieľ tejto skupiny irídiových komplexov [30].

Protinádorová aktivita môže byť ďalej posilnená nahradením neutrálneho chelátového $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligandu za negatívne nabitý $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ analóg. Táto zámena ovplyvňuje selektivitu väzby Ir(III) komplexov k nukleobázam DNA. $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ komplexy tvoria preferenčne adukty na guanínoch, pričom $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ komplexy na adenínoch i guanínoch vo väčšom rozsahu. Navyše zámena $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ za $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ značne zvyšuje lipofilitu komplexov, čo má za následok ich vyššiu akumuláciu a aktivitu v nádorových bunkách [34]. Zväčšenie chelátového ligandu môže byť taktiež efektívnou stratégiou pre zlepšenie protinádorových účinkov komplexov irídia, obvykle zvýšením väzobnej sily interkalácie a bunečnej akumulácie [35].

Komplexy, v ktorých bol odstupujúci chloridový ligand nahradený pyridínom, vykazujú vysokú aktivitu v niektorých nádorových bunečných líniách, dokonca rádovo vyššiu než samotná cisplatina. Tieto komplexy napríklad produkujú reaktívne formy kyslíka (ROS) selektívne v nádorových bunkách [33]. Generácia ROS je všeobecne považovaná za efektívny spôsob indukcie bunečnej apoptózy [36]. Výmena chloridového ligandu môže hrať úlohu aj pri znížení reaktivity komplexov a zabránení ich deaktivácie vplyvom nežiaducich interakcií s biologickými molekulami ako je GSH [33].



Obrázok 5. Schéma možnej aktivácie protinádorových účinkov Ir(III) komplexov polsendvičovej štruktúry. Pridanie fenylovej (Cp^{xph}) alebo bifenylovej (Cp^{xbiph}) skupiny k Cp ligandu (1), nahradenie neutrálneho chelátového $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligandu za negatívne nabitý $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ ligand (2), výmena odstupujúceho chloridového ligandu za pyridín (3). Prevzaté z [37].

2 CIELE PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce bolo zhrnutie doterajších výsledkov týkajúcich sa bunčných experimentov s novými komplexami na báze prechodných kovov. Pomocou dostupných biofyzikálnych a biologických metód bol študovaný mechanizmus účinkov týchto komplexov v nádorových i nenádorových bunkách in vitro.

V snahe posilniť protinádorovú aktivitu konvenčných platinových cytostatik bola navrhnutá a syntetizovaná nová skupina derivátov cisplatiny obsahujúcich ligandy nesteroidného protizápalového liečiva diklofenak. Okrem toho boli syntetizované aj nové platičité deriváty oxaliplatiny s axiálnymi ligandami metabolicky aktívneho dichlóracetátu. Jedným z cieľov práce bolo stanoviť cytotoxicitu vybraných komplexov v paneli bunčných línií, vrátane rezistentných nádorových buniek. Značná pozornosť bola venovaná objasneniu mechanizmov ich cytostatického účinku.

Experimenty zamerané na štúdium cytotoxických účinkov pripravených magnetických nanočastíc mali za cieľ stanoviť úroveň protinádorovej aktivity a selektivity novej skupiny nanosystémov určenej pre transport cisplatiny, s možnosťou lokalizácie externým magnetickým poľom.

Ďalej bol študovaný vplyv kyseliny askorbovej a ľudského sérového albumínu na antiadhézne vlastnosti klinicky testovaného ruthéniového komplexu NAMI-A vo vysoko invazívnych nádorových bunkách. Cieľom štúdie bolo identifikovať chemické modifikácie zodpovedné za farmakologickú aktivitu NAMI-A v metastatických nádoroch, a získať tak užitočné podklady pre ďalší výskum.

Za účelom mechanistických štúdií nových irídiových komplexov boli stanovené ich rozdeľovacie koeficienty a miera akumulácie v nádorových bunkách. Pre identifikáciu kľúčového miesta protinádorového pôsobenia bola kvantifikovaná väzba komplexov na nukleové kyseliny izolované z buniek.

Ciele predkladanej práce smerujú ku zdokonaleniu poznatkov potrebných k vývoji nových účinnejších a bezpečnejších protinádorových liečiv na báze komplexov prechodných kovov a inovatívnych systémov určených pre ich cieleň transport.

3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Predkladaná dizertačná práca vychádza zo súhrnu výsledkov piatich samostatných prác uverejnených v medzinárodných impaktovaných časopisoch. Výsledky sú rozdelené do niekoľkých častí podľa problematik, ktorých sa jednotlivé práce týkajú. Kópie publikovaných článkov sú súčasťou príloh.

Úvodná časť pojednáva o výsledkoch štúdia derivátov cisplatiny obsahujúcich ligandy diklofenaku a zahrňuje podrobnejšiu diskusiu, zameranú predovšetkým na objasnenie mechanizmov ich protinádorovej a protimetastatickej aktivity.

Druhá časť výsledkov sa venuje platičitém derivátom oxaliplatiny s dichlóracetátom v axiálnej pozícii. Okrem mechanizmov protinádorovej aktivity komplexov sa diskutuje aj o možnosti ďalšieho zosilnenia ich účinkov.

V tretej časti sú zhrnuté výsledky štúdia cytotoxicity pripravených magnetických nanočastíc vo vybraných bunčných líniách, vrátane nenádorových buniek a buniek rezistentných voči cisplatine.

Ďalší súhrn sa týka štúdia vplyvu chemických modifikácii ruthéniového komplexu NAMI-A na adhézne vlastnosti vysoko invazívnych nádorových buniek. Spomenuté sú potenciálne mechanizmy zodpovedné za farmakologickú aktivitu NAMI-A v metastatických nádoroch.

Posledná časť sa zaoberá výsledkami akumulčných štúdií nových luminiscenčných komplexov irídia v nádorových bunkách. Stručná diskusia pojednáva o možnom mechanizme a cieľovom mieste ich protinádorového pôsobenia.

3.1 Nové protinádorovo účinné Pt(II) konjugáty obsahujúce nesteroidné protizápalové liečivo diklofenak: syntéza a duálne mechanizmy účinkov (PUBLIKÁCIA Č. 1)

Jedným z konceptov pri zlepšení chemoterapeutickej účinnosti konvenčných platínových cytostatik je ich konjugácia k iným protinádorovo aktívnym látkam s odlišným mechanizmom účinku. V rámci zahraničnej spolupráce bola na pracovisku prof. G. Natileho z *University of Bari* v Taliansku syntetizovaná skupina Pt(II) derivátov cisplatiny, obsahujúcich ligandy diklofenaku. Diklofenak (DCF) je nesteroidné protizápalové liečivo (NSAID), ktoré vykazuje protinádorové účinky spojené s inhibíciou cyklooxygenáz (COX), ale aj s ovplyvnením mitochondriálnej aktivity a metabolizmu

glukózy v nádorových bunkách [38, 39]. Konjugácia DCF k platinovému centru bola uskutočnená prostredníctvom väzby cez diamínovú skupinu (komplexy **1** a **2**), alebo karboxylovú skupinu samotného diklofenaku (komplex **3**). Komplexy **1** a **2** boli navrhnuté tak, aby pod vplyvom enzymatického štiepenia peptidovej väzby vo vnútri buniek uvoľňovali jednu molekulu DCF a platinový komplex s dvomi odstupujúcimi chloridovými ligandami. Naproti tomu, disociácia karboxylovej skupiny oboch DCF ligandov komplexu **3** vo vnútri nádorových buniek, môže prebiehať podobne ako aktivácia karboplatiny [40, 41]. Uvoľnené molekuly DCF a aktivovanej cisplatiny by tak mohli navzájom posilniť svoje protinádorové účinky.

Z výsledkov stanovenia cytotoxicity pomocou MTT testu vyplýva, že všetky tri študované komplexy vykazujú aktivitu v nádorových bunčných líniiach. Komplex **3** má výrazne vyššiu cytotoxicitu než komplexy **1** a **2**, a je dokonca účinnejší než klinicky používaná cisplatina. Komplexy sú navyše aktívne v nádorových bunkách so získanou rezistenciou voči cisplatine. Zaujímavosťou je, že komplex **3** je najmenej cytotoxický v nenádorových bunkách, a má teda určitú nádorovú selektivitu. Tieto výsledky naznačujú, že mechanizmy zodpovedné za cytotoxické účinky študovaných komplexov sú odlišné od mechanizmov cisplatiny, a umožňujú zlepšenie terapeutických vlastností potenciálnych platinových liečiv.

Ďalšie experimenty ukázali, že bunčná akumulácia najaktívnejšieho komplexu **3** je rádovo vyššia než akumulácia cisplatiny, pričom koreluje s jeho cytotoxicitou a lipofilným charakterom. Lipofilné DCF ligandy pravdepodobne posilňujú pasívny transport komplexu cez cytoplazmatickú membránu buniek. Okrem toho bola stanovená väzba komplexu **3** na bunčnú DNA, ktorá mnohonásobne prevyšuje väzbu samotnej cisplatiny. Analýza bunčného cyklu nádorových buniek HeLa taktiež odhalila rozdiely medzi účinkom komplexu **3** a cisplatinou. Podiel buniek blokových vo fáze S bol v porovnaní s cisplatinou znížený, zatiaľ čo podiel buniek vo fáze G₂/M sa významne zvýšil. DCF ligandy teda významným spôsobom ovplyvňujú transportný mechanizmus komplexu **3** a jeho účinok na bunčný cyklus nádorových buniek.

Nedávne štúdie naznačujú, že jedným z mechanizmov protinádorovej aktivity DCF je zníženie nadmernej produkcie laktátu, ktorá je spájaná so slabou terapeutickou prognózou niektorých typov nádorov [42, 38]. Enzymatická analýza bunčných médií ukázala, že komplex **3** výraznou mierou inhibuje produkciu laktátu u nádorových buniek vaječníkov. Navyše, účinkom komplexu **3** dochádza ku kolapsu mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$) v týchto bunkách. Podobné výsledky boli získané

aj u buniek vystavených účinkom voľného DCF, avšak neboli pozorované pre samotnú cisplatinu. Mechanizmus protinádorovej aktivity komplexu **3** tak zjavne súvisí s prítomnosťou DCF ligandov, ktoré ovplyvňujú metabolizmus a mitochondriálnu funkciu nádorových buniek.

Zvýšená expresia COX-2 je často spojovaná s karcinogéznou a metastatickým potenciálom nádorov [43]. Z tohto dôvodu boli aktivity komplexov študované aj v COX-2 pozitívnych nádorových bunkách HeLa a HT-29. Cytotoxicity komplexov **1** a **2** boli v oboch línách rovnaké, ale vyššie než cytotoxicita cisplatinu. Aktivita týchto komplexov je pravdepodobne spojená s inhibíciou COX-2 pod vplyvom DCF ligandov, a nie je preto závislá na ich priestorovej konfigurácii. Experimenty ďalej ukázali, že komplex **3** inhibuje bunečnú adhéziu a migráciu, a teda potláča charakteristiky typické pre metastatické nádorové bunky. Inhibičný účinok voľného DCF sa prejavil až pri rádovo vyšších koncentráciách, ale nebol preukázaný pre samotnú cisplatinu.

Výsledky bunečných experimentov naznačujú, že konjugácia Pt(II) komplexov s molekulami NSAID, akými je napríklad DCF, môže viesť k vzniku potenciálnych terapeutických látok s unikátnymi mechanizmami protinádorového a protimetastatického účinku.

3.2 Posilnenie mitochondriálnej dysfunkcie v nádorových bunkách pomocou konjugátov metabolického modulátora dichlóracetát s Pt(IV) derivátmi oxaliplatiny (PUBLIKÁCIA Č. 4)

Platičité deriváty cisplatinu a jej analógov, obsahujúce axiálne ligandy protinádorovo aktívnych látok, predstavujú novú triedu platinových komplexov so sľubnými terapeutickými účinkami. Znížená reaktivita Pt(IV) komplexov umožňuje obmedzenie nežiadúcich interakcií s biologickými látkami, kým komplexy nedorazia do nádorových buniek, kde dôjde k ich redukcii a uvoľnení aktívnych Pt(II) foriem spolu s aktívnymi molekulami axiálnych ligandov. Na zahraničnom pracovisku prof. D. Gibsona z *Hebrew University of Jerusalem* v Izraeli bola syntetizovaná nová skupina Pt(IV) derivátov oxaliplatiny, s dvomi axiálnymi hydroxido ligandami ($[Pt(dach)(OH)_2(ox)]$, $dach = R,R-1,2$ -diaminocyklohexán, $ox = oxalát$), s jedným axiálnym hydroxido a s jedným axiálnym DCA ligandom ($[Pt(dach)(DCA)(OH)(ox)]$), alebo s dvomi axiálnymi DCA ligandami ($[Pt(dach)(DCA)_2(ox)]$). Dichlóracetátové (DCA) ligandy boli vybrané kvôli preukázaným protinádorovým účinkom DCA, spojeným so zmenami metabolizmu a mitochondriálnej funkcie v nádoroch [44, 45].

Cytotoxicity komplexov boli stanovené v piatich nádorových bunčných líniách pomocou MTT testu a boli porovnané s účinkami samotnej oxaliplatiny a voľného DCA. Výsledky ukázali, že cytotoxicita voľného DCA je približne o tri rády vyššia ako cytotoxicita oxaliplatiny. Kvôli prítomnosti biologicky neaktívnych axiálnych hydroxido ligandov bola cytotoxicita komplexu $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{OH})_2(\text{ox})]$ nižšia než cytotoxicita oxaliplatiny. Nahradenie axiálnych hydroxido ligandov za DCA ligandy spôsobilo výrazne zvýšenie cytotoxických účinkov, a to úmerne k ich počtu. Komplex $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ vykazoval vyššiu cytotoxicitu ako komplex $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})(\text{OH})(\text{ox})]$, a dokonca vyššiu ako samotná oxaliplatina. Navyše, vrodená a získaná rezistencia nádorových buniek voči cisplatine a oxaliplatine bola prekonaná ako dôsledok transformácie oxaliplatiny na $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$.

Pre zistenie možného vzťahu medzi akumuláciou a cytotoxicitou komplexov v nádorových bunkách bola určená ich bunčná koncentrácia v rôznych časoch. Experimenty ukázali, že akumulácia Pt(IV) komplexov v nádorových bunkách rastie s počtom axiálnych DCA ligandov, a to vo všetkých časových intervaloch. Prítomnosť DCA ligandov zvyšuje lipofilitu komplexov, a určuje tak mieru ich pasívneho transportu do vnútra buniek. Cytotoxické účinky komplexov v nádorových bunkách teda korelujú s ich akumuláciou. Výsledky ďalej naznačujú, že mechanizmy bunčnej akumulácie študovaných komplexov sú odlišné od mechanizmov oxaliplatiny a pomáhajú komplexom prekonať platinovú rezistenciu nádorových buniek.

Ďalšie štúdie boli zamerané na určenie možných účinkov molekúl DCA, dopravených do nádorových buniek ako súčasť Pt(IV) konjugátov s oxaliplatinou. Analýza mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$) nádorových buniek SW480 odhadila, že $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ spôsobuje výraznú redukciu $\Delta\Psi_m$ v porovnaní s bunkami vystavenými oxaliplatine, cisplatine alebo $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{OH})_2(\text{ox})]$. Ako pozitívna kontrola voľný DCA skutočne spôsobil pokles $\Delta\Psi_m$, avšak pri koncentrácii, ktorá bola o tri rády vyššia ako koncentrácia $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$. Podobné výsledky boli získané aj pri stanovení účinkov $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ na inhibíciu aeróbnej glykolýzy v SW480 bunkách. Výsledky týchto štúdií ukazujú, že $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ ovplyvňuje mitochondriálne a metabolické funkcie nádorových buniek, pravdepodobne vďaka metabolicky aktívnemu DCA, dopravenému do buniek vo forme axiálnych ligandov. Zaujímavosťou je, že $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ spôsobuje významnú indukciu autofágie v bunkách HCT116, pričom štatisticky významné účinky oxaliplatiny v týchto bunkách neboli pozorované. Mechanizmus cytotoxicity $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{DCA})_2(\text{ox})]$ teda môže súvisieť

s autofágiou, ako už bolo pozorované aj u iných platinových komplexov [46, 47].

Nedávne štúdie ukázali, že protinadorové účinky oxaliplatiny a DCA môžu byť posilnené v kombinácii s 5-fluorouracilom (5-FU) [48, 49]. Toto pozorovanie viedlo k štúdiu cytotoxických účinkov oxaliplatiny a [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] v zmesi s externým 5-FU. Cytotoxicita zmesi [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] s 5-FU v bunkách HCT116 bola mierne vyššia ako cytotoxicita zmesi oxaliplatiny s 5-FU. Navyše, cytotoxicity oboch zmesí boli vyššie ako cytotoxicity samotnej oxaliplatiny, samotného [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] či samotného 5-FU. Metóda kombinačných indexov (CI) potvrdila, že účinky oxaliplatiny a [Pt(dach)(DCA)₂(ox)] v kombinácii s 5-FU sú synergické.

3.3 Zvýšenie chemoterapeutickej odpovede nádorových buniek prostredníctvom cieľeného transportu platinových liečiv vysoko stabilnými multifunkčnými magnetickými nanočasticami pokrytými karboxymetylcelulózou (PUBLIKÁCIA Č. 3)

Použitie nanočastíc, riadených externým magnetickým poľom, predstavuje inovatívnu stratégiu pri cieľenom transporte látok do špecifických oblastí tela. Tieto nanočastice by mohli byť použité k aplikácii protinadorových liečiv a ich lokalizácii do cieľových nádorov, čím by došlo k značnému zníženiu vedľajších účinkov spojených s chemoterapiou. V tejto práci boli študované magnetické nanočastice stabilizované karboxymetylcelulózou (cMNPs), ktoré boli pripravené skupinou prof. R. Zbořila z *Regionálneho centra pokročilých technológií a materiálov* v Olomouci. Nanočastice boli konjugované k cisplatine (cMNPs-cisPt) a následne modifikované kyselinou listovou (cMNPs-cisPt-FA) alebo fluorescenčným činidlom Alexa Fluor 488 (cMNPs-cisPt-Alexa). Kyselina listová (FA) má vysokú afinitu k folátovým receptorom, nadmerne exprimovaným na povrchu niektorých nádorových buniek, a môže tak pomôcť pri cieľenom transporte nanočastíc do nádorov [50]. Modifikácia činidlom Alexa navyše umožňuje fluorescenčnú detekciu nanočastíc vo vnútri buniek.

Cytotoxické účinky študovaných nanočastíc boli stanovené v paneli nádorových bunčných línií, bežne používaných k štúdiu cytotoxických účinkov komplexov prechodných kovov. Výsledky ukázali, že všetky cMNPs-cisPt majú významnú aktivitu v nádorových bunkách. Cytotoxicity nanočastíc cMNPs-cisPt, cMNPs-cisPt-FA a cMNPs-cisPt-Alexa, v bunkách A2780 a SW480 (senzitívnych voči cisplatine), boli približne 2-krát vyššie než cytotoxicita cisplatiny. Cytotoxicity v bunkách A2780cisR a MCF-7, so získanou a vrodenu rezistenciou voči cisplatine, boli dokonca

ešte signifikantnejšie v porovnaní s cisplatinou (asi 30-krát pre A2780cisR, 2.3-krát pre MCF-7). Ďalej bolo zistené, že modifikácia cMNPs-cisPt pomocou FA a Alexa nemá výrazný vplyv na výslednú cytotoxicitu nanočastíc. Okrem toho, samotné cMNPs neboli cytotoxické v žiadnej z použitých bunčných línií, a teda konjugácia cisplatiny hrá dôležitú úlohu pri cytotoxických účinkoch nanočastíc.

Na rozdiel od výrazných cytotoxických účinkov v nádorových bunkách, boli cytotoxicity študovaných cMNPs-cisPt v nenádorových bunkách MRC-5 pd30 o jeden až dva rády nižšie. Nanočastice tak vykazujú selektivitu voči nádorovým bunkám. Získané výsledky naznačujú, že konjugácia platinových liečiv s magnetickými nanočasticami môže viesť k unikátnym protinádorovým účinkom, schopným prekonať rezistenciu nádorových buniek voči platinovej chemoterapii a potlačiť jej vedľajšie účinky.

3.4 Vplyv väzby redukovaného NAMI-A k ľudskému sérovému albumínu na farmakokinetiku a biologickú aktivitu (PUBLIKÁCIA Č. 5)

NAMI-A je jedným z dvoch ruthéniových komplexov testovaných v klinických skúškach. Schopnosť NAMI-A selektívne inhibovať rast nádorových metastáz je považovaná za unikátnu terapeutickú vlastnosť. Nanešťastie, existuje len málo údajov o mechanizmoch účinku a správaní NAMI-A po jeho aplikácii do krvného obehu. Keďže chemické modifikácie zodpovedné za antimetastatickú aktivitu NAMI-A nie sú známe, akákoľvek informácia o štruktúrnom stave alebo biologickej interakcii, môže pomôcť pri identifikácii aktívnych foriem NAMI-A a prípadnom zlepšení terapeutického účinku. V rámci vedecko-výskumnej zahraničnej stáže, na pracovisku prof. G. Savu z *University of Trieste* v Taliansku, bol skúmaný vplyv kyseliny askorbovej a ľudského sérového albumínu (HSA) na antimetastatický potenciál NAMI-A. Kyselina askorbová je významne biologické redukčné činidlo, pričom existuje možnosť, že NAMI-A podlieha jej redukcii po aplikácii do krvného obehu. Takto redukovaná forma by mohla interagovať s HSA, ktorý je najzastúpenejším proteínom v krvnej plazme.

Pre simuláciu a vyhodnotenie metastatickej kapacity nádorov bol použitý test adhézie vysoko invazívnych buniek nádoru pŕs MDA-MB-231. Test ukázal, že HSA nemá významný účinok na adhéziu buniek k rastovému substrátu. Naopak, účinok NAMI-A spôsobuje signifikantnú inhibíciu bunecnej adhézie, približne o 80% oproti kontrolným bunkám. Aduky NAMI-A-HSA inhibujú bunecnú adhéziu menej než samotné NAMI-A, a to nezávisle na koncentračnom pomere NAMI-A:HSA. Tvorba

aduktov s HSA však spôsobuje štatisticky významnú inhibíciu bunecnej adhézie (60-70%) v porovnaní s kontrolou. V podmienkach bunecného stresu, ako je napríklad rast nádorového tkaniva, bunky vo zvýšenej miere konzumujú albumín [51]. Je teda možné, že adukty NAMI-A s albumínom tvoria spoločný transportný systém, umožňujúci dopravu liečiva do nádorových metastáz. Absencia závislosti inhibičných účinkov aduktov na koncentračnom pomere NAMI-A:HSA naznačuje, že veľkosť aplikovanej dávky NAMI-A do krvného obehu by mohla byť nepodstatná pre výsledný farmakologický účinok.

Experimenty ďalej ukázali, že redukcia NAMI-A kyselinou askorbovou je zodpovedná za mierne zlepšenie antiadhézných účinkov. Tieto výsledky sú konzistentné s in vivo účinkami na pľúcne metastázy, kedy bolo NAMI-A zámerne redukované tesne pred aplikáciou do pokusných zvierat [52]. Redukcia NAMI-A kyselinou askorbovou v prítomnosti nadbytku HSA spôsobila výraznú inhibíciu bunecnej adhézie, približne o 60% oproti kontrolným bunkám. Tento účinok je porovnateľný s účinkom spôsobeným aduktami NAMI-A-HSA v absencii redukčného činidla.

Získané výsledky podporujú teóriu o tom, že NAMI-A po aplikácii do krvného obehu interaguje s plazmatickými proteínmi, pričom ich adukty môžu byť zodpovedné za selektívne protimetastatické účinky. Redukcia NAMI-A zrejme uľahčuje formovanie aduktov, a ovplyvňuje tak celkovú farmakologickú aktivitu.

3.5 Protinádorovo účinné extranukleárne luminiscenčné Ir(III) komplexy obsahujúce ligandy na báze benzimidazolu s možnosťou ďalšej funkcionalizácie (PUBLIKÁCIA Č. 2)

V snahe vyvinúť nové a účinnejšie protinádorové liečivá na báze prechodných kovov sa pozornosť upriamila aj na komplexy irídia. Na zahraničnom pracovisku prof. J. Ruiza z *University of Murcia* v Španielsku boli syntetizované tri skupiny substitučne inertných a luminiscenčných Ir(III) komplexov typu $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]$, obsahujúce ligandy rôzne modifikovaného benzimidazolu. Výsledky bunecných experimentov ukázali, že niektoré z týchto komplexov vykazujú cytotoxicitu a nádorovú selektivitu, ktorá je mnohonásobne vyššia než u klinicky používanej cisplatiny.

Lipofilita komplexov prechodných kovov je často spájaná so zvýšenou akumuláciou a aktivitou v nádorových bunkách. Pre štúdium mechanizmov cytotoxických účinkov a bunecnej akumulácie študovaných Ir(III) komplexov, bola

stanovená miera ich lipofility pomocou rozdeľovacích koeficientov ($\log P$). Hodnoty $\log P$ dvoch najaktívnejších komplexov **2a** a **3a** sú približne rovnaké a poukazujú na značne lipofilný charakter ($\log P > 0$). Keďže cisplatina je známa svojim hydrofilným charakterom ($\log P < 0$), rozdiel v cytotoxických účinkoch medzi cisplatinou a Ir(III) komplexami môže súvisieť s rozdielom v ich charaktere a bunečnej akumulácii. K podpore tejto hypotézy bola stanovená akumulácia študovaných komplexov v nádorových bunkách pŕs MCF-7. Experimenty ukázali, že bunečná akumulácia komplexov **2a** a **3a** je približne 8-krát vyššia než akumulácia cisplatiny a skutočne koreluje s ich cytotoxicitou. Okrem toho, väzba oboch komplexov na nukleárnu DNA bola podstatne nižšia než väzba cisplatiny, pričom rozdiely v ich väzbe na celkovú bunečnú RNA neboli štatisticky významné.

Výsledky teda naznačujú, že mechanizmus zodpovedný za cytotoxické účinky študovaných Ir(III) komplexov v nádorových bunkách je odlišný od mechanizmu cisplatiny a pravdepodobne nesúvisí s koordinačnou väzbou na nukleové kyseliny.

4 ZÁVER

Predkladaná dizertačná práca je napísaná formou súhrnu piatich uverejnených prác, zameraných na štúdium mechanizmov toxických účinkov komplexov prechodných kovov v nádorových bunkách

V snahe posilniť protinádorové účinky konvenčných platinových cytostatik bola navrhnutá a študovaná nová skupina derivátov cisplatiny obsahujúcich ligandy nesteroidného protizápalového liečiva diklofenak. Z výsledkov práce vyplýva, že tieto Pt(II) komplexy sú výrazne aktívne v paneli nádorových bunčných línií, dokonca aktívnejšie než samotná cisplatina, a to i v rezistentných nádorových bunkách. Komplex **3**, obsahujúci dva ligandy diklofenaku, sa vyznačuje aktivitou v COX-2 pozitívnych bunkách a zvýšenou bunčnou akumuláciou. Mimo klasických účinkov spojených s väzbou na nukleárnu DNA, komplex **3** ovplyvňuje bunčný metabolizmus glukózy a spôsobuje kolaps mitochondriálneho membránového potenciálu v nádorových bunkách. Ligandy diklofenaku navyše prispievajú k schopnosti komplexu blokovat' bunčný cyklus nádorových buniek a potláčať ich metastatický potenciál. Konjugácia Pt(II) komplexov s biologicky aktívnymi molekulami, akými sú napríklad NSAID, môže viesť k vzniku potenciálnych terapeutických látok s unikátnymi mechanizmami protinádorového a protimetastatického účinku.

Platičité deriváty oxaliplatiny, s axiálnymi ligandami metabolicky aktívneho dichlóracetátu, predstavujú novú triedu platinových komplexov so sľubnými terapeutickými účinkami. Experimentálne výsledky naznačujú, že tieto Pt(IV) komplexy majú protinádorový mechanizmus spojený s účinkami na mitochondriálnej funkcii, metabolizmus glukózy a autofágiu v nádorových bunkách. Okrem toho sú komplexy schopné prekonať rezistenciu nádorových buniek voči oxaliplatine a cisplatine. Cytotoxické účinky komplexov môžu byť navyše posilnené v kombinácii s 5-fluorouracilom. Pt(IV) komplexy s biologicky aktívnymi ligandami v axiálnej pozícii tak predstavujú koncept efektívnejších protinádorových liečiv, schopných prekonať nedostatky konvenčných platinových cytostatik.

V ďalšej časti práce bola študovaná nová skupina magnetických nanočastíc stabilizovaných karboxymetylcelulózou, s možnosťou ich lokalizácie pomocou magnetického poľa. Nanočastice boli modifikované cisplatinou a boli stanovené ich cytotoxické účinky v paneli bunčných línií. Výsledky experimentov ukazujú,

že takto modifikované nanočastice majú výrazne vyššiu aktivitu než samotná cisplatina a to vo všetkých testovaných nádorových líniiach, vrátane buniek rezistentných voči cisplatine. Navyiac, nanočastice nie sú cytotoxické v nenádorových bunkách, a vykazujú teda nádorovú selektivitu. Bolo zistené, že konjugácia modifikovaných nanočastíc ku kyseline listovej alebo fluorescenčnému činidlu Alexa nemá vplyv na ich výslednú aktivitu. Pre porovnanie boli použité nanočastice bez modifikácie cisplatinou, ktoré nevykazujú takmer žiadne cytotoxické účinky. Chemoterapia na báze magnetických nanočastíc predstavuje koncept selektívneho transportu protinádorových liečiv do cieľových nádorov, s potenciálom výrazne zvýšiť ich efektivitu a potlačiť nežiadúce účinky.

V rámci vedecko-výskumnej zahraničnej stáže bol skúmaný vplyv kyseliny askorbovej a ľudského sérového albumínu na antimetastatické účinky klinicky testovaného ruthéniového komplexu NAMI-A. Bolo ukázané, že formovanie aduktov s ľudským albumínom výrazne znižuje účinky NAMI-A na adhéziu nádorových buniek. Naopak, redukcia kyselinou askorbovou spôsobuje posilnenie antiadhézneho účinku NAMI-A, v súlade s in vivo experimentami. Redukcia NAMI-A v prítomnosti nadbytku ľudského albumínu nemá významný vplyv na adhézne účinky vzniknutých aduktov, ale uľahčuje ich formovanie. Napriek tomu, že NAMI-A po aplikácii do krvného obehu pravdepodobne interaguje s plazmatickými proteínmi, ich konjugácia môže prispieť k selektívnemu transportu komplexu do nádorových metastáz a k zlepšeniu jeho farmakologických vlastností. Identifikácia chemických modifikácií NAMI-A, zodpovedných za jeho antimetastatické účinky, poskytuje užitočné informácie potrebné pre ďalší výskum.

V neposlednom rade bola študovaná nová skupina substitučne inertných a luminiscenčných irídiových komplexov typu $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]$ obsahujúcich ligandy na báze benzimidazolu. Výsledky mechanistických štúdií ukázali, že akumulácia týchto Ir(III) komplexov v nádorových bunkách je signifikantne vyššia ako akumulácia cisplatiny, pričom koreluje s ich lipofilným charakterom a cytotoxickými účinkami. Kvantifikácia väzby komplexov na nukleárnu DNA a celkovú bunecnú RNA v nádorových bunkách naznačuje, že mechanizmus zodpovedný za cytotoxické účinky komplexov je odlišný od mechanizmu cisplatiny a nesúvisí s koordinačnou väzbou na nukleové kyseliny.

Prínosom dizertačnej práce bolo zdokonalenie poznatkov potrebných k vývoju nových účinnejších a bezpečnejších protinádorových liečiv na báze komplexov

prechodných kovov, ale aj inovatívnych systémov určených pre ich cielený transport. Štúdie mechanizmov toxických účinkov nových metalokomplexov prispeli k riešeniu rady projektov zameraných na problematiku molekulárnej biofyziky a farmakológie.

5 ZOZNAM CITOVANEJ LITERATÚRY

- [1] L. Kelland, „The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy,“ *Nature Reviews Cancer*, zv. 7, pp. 573-584, 2007.
- [2] T. C. Johnstone, K. Suntharalingam a S. J. Lippard, „The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(VI) Prodrugs,“ *Chemical Reviews*, zv. 116, pp. 3436-3486, 2016.
- [3] D. Lebwohl a R. Canetta, „Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: An Historical Perspective and an Update.,“ *European Journal of Cancer*, zv. 34, pp. 1522-1534, 1998.
- [4] B. Rosenberg, „Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the Search Goes On,“ rev. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Zürich, Lippert, B., Ed.; Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999.
- [5] M. J. Cleare a J. D. Hoeschele, „Studies on the Antitumor Acitivity of Group VIII Transition Metal Complexes. Part 1. Platinum(II) Complexes,“ *Bioinorganic Chemistry*, zv. 2, pp. 187-210, 1973.
- [6] D. S. Alberts a R. T. Dorr, „New Perspectives on an Old Friend: Optimizing Carboplatin for the Treatment of Solid Tumors,“ *Oncologist*, zv. 3, pp. 15-34, 1998.
- [7] K. Aabo, M. Adams, P. Adnitt, D. S. Alberts, A. Athanazziou, V. Barley, D. R. Bell, U. Bianchi, G. Bolis, M. F. Brady, H. S. Brodovsky a e. al, „Chemotherapy in Advanced Ovarian Cancer: Four Systematic Meta-Analyses of Individual Patient Data from 37 Randomized Trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group,“ *British Journal of Cancer*, zv. 78, pp. 1479-1487, 1998.
- [8] F. Levi, G. Metzger, C. Massari a G. Milano, „Oxaliplatin: Pharmacokinetics and Chronopharmacological Aspects,“ *Clinical Pharmacokinetics*, zv. 38, pp. 1-21, 2000.
- [9] J. Graham, M. Muhsin a P. Kirkpatrick, „Fresh from the Pipeline: Oxaliplatin,“ *Nature Reviews Drug Discovery*, zv. 3, pp. 11-12, 2004.
- [10] J. L. Misset, H. Bleiberg, W. Sutherland, M. Bekradda a E. Cvitkovic, „Oxaliplatin Clinical Activity: A Review,“ *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, zv. 35, pp. 75-93, 2000.
- [11] T. C. Johnstone, K. Suntharalingam a S. J. Lippard, „Third Row Transition Metals for the Treatment of Cancer,“ *Philosophical Transactions of the Royal Society, A*, zv. 373, p. 20140185, 2015.

- [12] V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo a J. M. Perez, „Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity,“ *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, zv. 7, pp. 3-18, 2007.
- [13] M. C. Walker, C. N. Parris a J. R. Masters, „Diferential Sensitivities of Human Testicular and Bladder Tumor Cell Lines to Chemotherapeutic Drugs,“ *Journal of the National Cancer Institute*, zv. 79, pp. 213-216, 1987.
- [14] B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko a V. H. Mansour, „Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents,“ *Nature*, zv. 222, pp. 385-386, 1969.
- [15] J. J. Wilson a S. J. Lippard, „Synthetic Methods for the Preparation of Platinum Anticancer Complexes,“ *Chemical Reviews*, zv. 114, pp. 4470-4495, 2014.
- [16] A. Babu, N. Amreddy a R. Ramesh, „Nanoparticle-Based Cisplatin Therapy for Cancer,“ *Therapeutic Delivery*, zv. 6, pp. 115-119, 2015.
- [17] Z. Medrikova, V. Novohradsky, J. Zajac, O. Vrana, J. Kasparikova, A. Bakandritsos, M. Petr, R. Zboril a V. Brabec, „Enhancing Tumor Cell Response to Chemotherapy through the Targeted Delivery of Platinum Drugs Mediated by Highly Stable, Multifunctional Carboxymethylcellulose-Coated Magnetic Nanoparticles,“ *Chem. Eur. J.*, zv. 22, pp. 9750-9759, 2016.
- [18] I. Ott a R. Gust, „Non Platinum Metal Complexes as Anti-cancer Drugs,“ *Archiv der Pharmazie, Chemistry in Life Sciences*, zv. 340, pp. 117-126, 2007.
- [19] M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger a B. K. Keppler, „Antitumour Metal Compounds: More than Theme and Variations,“ *Dalton Transactions*, zv. 14, pp. 183-194, 2008.
- [20] A. Bergamo, C. Gaiddon, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen a G. Sava, „Approaching Tumour Therapy Beyond Platinum Drugs: Status of the Art and Perspectives of Ruthenium Drug Candidates,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, zv. 106, pp. 90-99, 2012.
- [21] L. J. Anghileri, „The In Vivo Inhibition of Tumor Growth by Ruthenium Red: Its Relationship with the Metabolism of Calcium in the Tumor,“ *Cancer Research and Clinical Oncology*, zv. 83, pp. 213-217, 1975.
- [22] M. J. Clarke, „Oncological Implications of the Chemistry of Ruthenium,“ *Metal Ions in Biological Systems*, zv. 11, pp. 231-283, 1980.
- [23] G. Sava, K. Clerici, I. Capozzi, M. Cocchietto, R. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni a A. Perbellini, „Reduction of Lung Metastasis by ImH[trans-RuCl₄(DMSO)Im]: Mechanism of the Selective Action Investigated on Mouse Tumors,“ *Anti-Cancer Drugs*, zv. 10, pp. 129-138, 1999.
- [24] C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas a B. K. Keppler, „From Bench to Bedside--Preclinical and Early Clinical Development of

- the Anticancer Agent Indazolium Trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A),“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, zv. 100, pp. 891-904, 2006.
- [25] M. Galanski, V. B. Arion, M. A. Jakupec a B. K. Keppler, „Recent Developments in the Field of Tumor-Inhibiting Metal Complexes,“ *Current Pharmaceutical Design*, zv. 9, pp. 2078-2089, 2003.
- [26] E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo a G. Sava, „Ruthenium antimetastatic agents,“ *Current Topics in Medicinal Chemistry*, zv. 4, pp. 1525-1535, 2004.
- [27] E. S. Antonarakis a A. Emadi, „Ruthenium-Based Chemotherapeutics: Are They Ready for Prime Time?,“ *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, zv. 66, pp. 1-9, 2010.
- [28] C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessler, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson a B. K. Keppler, „KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent--Preclinical Development and Results of A Clinical Phase I Study in Tumor Patients,“ *Chemistry & Biodiversity*, zv. 5, pp. 2140-2155, 2008.
- [29] B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright a J. R. Aldrich-Wright, „Metal Complex Interactions with DNA,“ *Dalton Transactions*, zv. 44, pp. 3505-3526, 2015.
- [30] Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, S. A. Fletcher, A. Kisova, O. Vrana, L. Salassa, P. C. Bruijninx, G. J. Clarkson, V. Brabec a P. J. Sadler, „Organometallic Half-Sandwich Iridium Anticancer Complexes,“ *Journal of Medicinal Chemistry*, zv. 54, pp. 3011-3026, 2011.
- [31] A. Habtemariam, Z. Liu, J. J. Soldevila, A. M. Pizarro a P. J. Sadler, „Novel Iridium/Rhodium Anti-Cancer Compounds“. PCT Patent WO/2011/148124, 1 12 2011.
- [32] J. M. Hearn, I. Romero-Canelón, B. Qamar, Z. Liu, I. Hands-Portman a P. J. Sadler, „Organometallic Iridium(III) Anticancer Complexes with New Mechanisms of Action: NCI-60 Screening, Mitochondrial Targeting, and Apoptosis,“ *ACS Chemical Biology*, zv. 8, pp. 1335-1343, 2013.
- [33] Z. Liu, I. Romero-Canelón, B. Qamar, J. M. Hearn, A. Habtemariam, N. P. Barry, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson a P. J. Sadler, „The Potent Oxidant Anticancer Activity of Organoiridium Catalysts,“ *Angewandte Chemie International Edition*, zv. 53, pp. 3941-3946, 2014.
- [34] Z. Liu, L. Salassa, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson a P. J. Sadler, „Contrasting Reactivity and Cancer Cell Cytotoxicity of Isoelectronic Organometallic Iridium(III) Complexes,“ *Inorganic Chemistry*, zv. 50, pp. 5777-5783, 2011.

- [35] S. Schäfer a W. S. Sheldrick, „Coligand Tuning of the DNA Binding Properties of Half-Sandwich Organometallic Intercalators,“ *Journal of Organometallic Chemistry*, zv. 692, pp. 1300-1309, 2007.
- [36] D. Trachootham, J. Alexandre a P. Huang, „Targeting Cancer Cells by ROS-Mediated Mechanisms: A Radical Therapeutic Approach?,“ *Nature Reviews. Drug Discovery*, zv. 8, pp. 579-591, 2009.
- [37] Z. Liu a P. J. Sadler, „Organoiridium Complexes: Anticancer Agents and Catalysts,“ *Accounts of Chemical Research*, zv. 47, pp. 1174-1185, 2014.
- [38] E. Gottfried, S. A. Lang, K. Renner, A. Bosserhoff, W. Gronwald, M. Rehli, S. Einhell, I. Gedig, K. Singer, A. Seilbeck, A. Mackensen, O. Grauer, P. Hau, K. Dettmer, R. Andreesen, P. J. Oefner a M. Kreutz, „New Aspects of an Old Drug – Diclofenac Targets MYC and Glucose Metabolism in Tumor Cells,“ *PLoS ONE*, zv. 8, 2013.
- [39] I. Petrescu a C. Tarba, „Uncoupling Effects of Diclofenac and Aspirin in the Perfused Liver and Isolated Hepatic Mitochondria of Rat,“ *Biochimica et Biophysica Acta*, zv. 1318, pp. 385-394, 1997.
- [40] X. Wang, H. Li, X. Du, J. Harris, Z. Guo a H. Sun, „Activation of Carboplatin and Nedaplatin by the N-Terminus of Human Copper Transporter 1 (hCTR1),“ *Chemical Science*, zv. 3, pp. 3206-3215, 2012.
- [41] W. Neumann, B. C. Crews, M. B. Sarosi, C. M. Daniel, K. Ghebreselasie, M. S. Scholz, L. J. Marnett a E. Hey-Hawkins, „Conjugation of Cisplatin Analogues and Cyclooxygenase Inhibitors to Overcome Cisplatin Resistance,“ *ChemMedChem*, zv. 10, pp. 183-192, 2015.
- [42] F. Yamasaki, K. Kurisu, Y. Kajiwara, W. Y., T. Takayasu, Y. Akiyama, T. Saito, R. Hanaya a K. Sugiyama, „Magnetic Resonance Spectroscopic Detection of Lactate is Predictive of a Poor prognosis in Patients with Diffuse Intrinsic Pontine Glioma,“ *Neuro-Oncology*, zv. 13, pp. 791-801, 2011.
- [43] N. Ghosh, R. Chaki, V. Mandal a S. C. Mandal, „COX-2 as a Target for Cancer Chemotherapy,“ *Pharmacological Reports*, zv. 62, pp. 233-244, 2010.
- [44] S. Bonnet, S. L. Archer, J. Allalunis-Turner, A. Haromy, C. Beaulieu, R. Thompson, C. T. Lee, G. D. Lopaschuk, L. Puttagunta, S. Bonnet, G. Harry, K. Hashimoto, C. J. Porter, M. A. Andrade, B. Thebaud a E. D. Michelakis, „A Mitochondria-K⁺ Channel Axis is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth,“ *Cancer Cell*, zv. 11, pp. 37-51, 2007.
- [45] J. G. Pan a T. W. Mak, „Metabolic Targeting as An Anticancer Strategy: Dawn of A New Era?,“ *Science's STKE*, zv. 381, p. e14, 2007.

- [46] J. Wang a G. S. Wu, „Role of Autophagy in Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells,“ *Journal of Biological Chemistry* , zv. 289, pp. 17163-17173, 2014.
- [47] J. Garcia-Cano, G. Ambroise, R. Pascual-Serra, M. C. Carrion, L. Serrano-Oviedo, M. Ortega-Muelas, F. J. Cimas, S. Sabater, M. J. Ruiz-Hidalgo, I. S. Perez, A. Mas, F. A. Jalon, A. Vazquez a R. Sanchez-Prieto, „Exploiting the Potential of Autophagy in Cisplatin Therapy: A New Strategy to Overcome Resistance,“ *Oncotarget*, zv. 6, pp. 15551-15565, 2015.
- [48] I. Berindan-Neagoe, C. Braicu, V. Pileczki, R. C. Petric, N. Miron, O. Balacescu, D. Iancu a T. Ciuleanu, „5-Fluorouracil Potentiates the Anti-Cancer Effect of Oxaliplatin on Colo320 Colorectal Adenocarcinoma Cells,“ *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* , zv. 22, pp. 37-43, 2013.
- [49] Y. Xuan, H. Hur, I. H. Ham, J. Yun, J. Y. Lee, W. Shim, Y. B. Kim, G. Lee, S. U. Han a Y. K. Cho, „Dichloroacetate Attenuates Hypoxia-Induced Resistance to 5-Fluorouracil in Gastric Cancer Through the Regulation of Glucose Metabolism,“ *Experimental Cell Research*, zv. 321, pp. 219-230, 2014.
- [50] J. Sudimack a R. J. Lee, „Targeted Drug Delivery via the Folate Receptor,“ *Advanced Drug Delivery Reviews*, zv. 41, pp. 147-162, 2000.
- [51] G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, J. C. Stewart, G. Hartung, W. Maier-Borst a D. L. Heene, „Plasma Protein (Albumin) Catabolism by the Tumor Itself-- Implications for Tumor Metabolism and the Genesis of Cachexia,“ *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, zv. 26, pp. 77-100, 1997.
- [52] G. Sava, A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, C. Casarsa, M. Cocchietto, A. Furlani, V. Scarcia, B. Serli, E. Iengo, E. Alessio a G. Mestroni, „Influence of Chemical Stability on the Activity of the Antimetastasis Ruthenium Compound NAMI-A,“ *European Journal of Cancer*, zv. 38, pp. 427-435, 2002.

6 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

5-FU	5-fluorouracil
CI	kombinačný index
cMNPs	magnetické nanočastice stabilizované karboxymetylcelulózou
COX	cyklooxygenáza
DCA	dichlóracetát
DCF	diklofenak
FA	kyselina listová
GSH	glutatión
HSA	ľudský sérový albumín
MNPs	magnetické nanočastice
MRP	proteín spojený s multi-rezistenciou
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid
NSAID	nesteroidné protizápalové liečivá
ROS	reaktívne formy kyslíka

7 ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ

1. Intini F.P.,* **Zajac J.**,* Novohradsky V., Saltarella T., Pacifico C., Brabec V., Natile G., Kasparkova J. (2017) Novel antitumor platinum(II) conjugates containing the non-steroidal anti-inflammatory agent diclofenac: Synthesis and dual mechanisms of antiproliferative effects. *Inorganic Chemistry* **56**, 1483-1497

* Intini F.P. a Zajac J. sa podieľali na vzniku práce rovnakým podielom, uvedené v práci na strane 1495

2. Yellol J., Pérez S.A., Yellol G., **Zajac J.**, Donaire A., Viguera G., Novohradsky V., Janiak Ch., Brabec V., Ruiz J. (2016) Highly potent extranuclear-targeted luminescent iridium(III) antitumor agents containing benzimidazole-based ligands with a handle for functionalization. *Chemical Communications* **52**, 14165-14168

3. Medříková Z., Novohradsky V., **Zajac J.**, Vrana O., Kasparkova J., Bakandritsos A., Petr M., Zbořil R., Brabec V. (2016) Enhancing tumor cell response to chemotherapy through targeted delivery of Pt drugs mediated by highly stable, multifunctional carboxymethylcellulose coated magnetic nanoparticles. *Chemistry - A European Journal* **22**, 9750-9759

4. **Zajac J.**, Kostrhunova H., Novohradsky V., Vrana O., Raveendran R., Gibson D., Kasparkova J., Brabec V. (2016) Potentiation of mitochondrial dysfunction in tumor cells by conjugates of metabolic modulator dichloroacetate with a Pt(IV) derivative of oxaliplatin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **156**, 89-97

5. Novohradsky V., Bergamo A., Cocchietto M., **Zajac J.**, Brabec V., Mestroni G., Sava G. (2015) Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics and biological activity. *Dalton Transactions* **44**, 1905-1913

8 ŠTRUKTÚROVANÝ ŽIVOTOPIS

Osobné údaje

Meno: Mgr. Juraj Zajac
Dátum narodenia: 15. 1. 1988
Bydlisko: Andreja Sládkoviča 57/674, 018 51 Nová Dubnica, Slovensko
Telefón: +421 902 221870
E-mail: zajacee@gmail.com
Národnosť: slovenská

Vzdelanie

2013 – súčasnosť Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Biofyzika
doktorský študijný program
Téma dizertačnej práce: *Mechanistické štúdie zamerané na poznanie mechanizmov toxických účinkov komplexov prechodných kovov v nádorových bunkách*

2010 – 2013 Prírodovedecká fakulta, Masarykova univerzita v Brne
Aplikovaná biofyzika
udelený titul Mgr.
Téma diplomovej práce: *Využitie plazmy pre sterilizáciu*

2008 – 2010 Prírodovedecká fakulta, Masarykova univerzita v Brne
Lekárska fyzika
udelený titul Bc.
Téma bakalárskej práce: *Röntgenová rádiografia*

Pracovné skúsenosti

01/2016 – súčasnosť Oddelenie molekulárnej biofyziky a farmakológie
Biofyzikálny ústav AV ČR, Brno
výskumný pracovník

Vedecko-výskumné zahraničné stáže

01/2017 – 04/2017 Rothberg International School
Prírodovedecká fakulta, Hebrejská univerzita
Jeruzalem, Izrael

02/2014 – 05/2014 Callerio Foundation Onlus
Prírodovedecká fakulta, Univerzita v Terste
Terst, Taliansko

Príspevky na konferenciách

28/08 – 01/09/2016 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference
EuroBIC 13, Budapešť, Maďarsko
*Potentiation of mitochondrial dysfunction in tumor cells
by conjugates of metabolic modulator dichloroacetate
with a Pt(IV) derivative of oxaliplatin*
plagát

11/4 – 12/4/2014 Functional metal complexes that bind to biomolecules
COST, CM1105, Terst, Taliansko
Potentialities of Metal-based compounds targeting proteins

Jazykové znalosti

slovenčina – materský jazyk

čeština – aktívne

angličtina – pokročilý

španielčina – mierne pokročilý

ruština – pasívne