

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Ovlivnění migrace a invazivity buněk prsního
karcinomu vybraným protinádorově účinným
komplexem ruthenia**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------|-------------------------------------|
| Autor: | Bc. Tereza Cyříková |
| Studijní program: | N0512A130009 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D. |
| Rok: | 2022 |

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

V Olomouci dne.....

.....

Bc. Tereza Cyřiková

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala školitelce mé diplomové práce Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnovala. Taktéž děkuji hlavně za ochotu a trpělivost, kterou mi věnovala v Laboratoři molekulární biofyziky a farmakologie a s jakou vstřícností ostatních kolegů jsem se zde setkala. Taktéž děkuji za její trpělivost, kterou se mnou během psaní této diplomové práce měla.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Tereza Cyříková |
| Název práce | Ovlivnění migrace a invazivity buněk prsního karcinomu vybraným protinádorově účinným komplexem ruthenia |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2022 |

Abstrakt

Nádorové onemocnění prsu ohrožuje značnou část žen. Mezi nejnebezpečnější podtypy se řadí triple negativní karcinom prsu. Pro tento typ rakoviny prsu prozatím neexistuje zcela efektivní léčba. Hlavní problém v léčbě tohoto typu karcinomu spočívá mimo jiné ve vysoké pravděpodobnosti tvorby vzdálených metastáz. K terapii se v současné době kromě dalších způsobů léčby používají různá cytostatika a jejich kombinace. Mezi běžná cytostatika se řadí léky na bázi platiny, které jsou efektivně využívány v terapii celé řady malignit. Bohužel aplikace takovýchto cytostatik sebou nese řadu nevýhod včetně nežádoucích vedlejších účinků na organismus pacienta. Tyto nevýhody motivují vědce a lékaře k syntéze a testování nových léčiv. Kromě konvenčních platinových cytostatik jsou vyvíjena nová potenciální léčiva na bázi jiných těžkých kovů, která by byla efektivnějšími cytostatiky a zároveň neměla tolik nežádoucích vedlejších účinků. V rámci předkládané diplomové práce byl testován vliv nového dichloro komplexu ruthenia s ligandem 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitrilem na buněčnou linii MDA-MB-231 odvozenou od triple negativního karcinomu prsu. Pro srovnání byly veškeré experimenty provedeny také s klinicky využívanou cisplatinou. V rámci práce byly využity metody jako test antiproliferativní aktivity, zacelování rýhy, re-adheze a invazivity. Rutheniový komplex prokázal lepší antiproliferativní, antimigrační a antiadhezní aktivitu oproti cisplatině na buňkách triple negativního karcinomu prsu MDA-MB-231 a jeví se jako slibný kandidát pro užití v léčbě triple negativního karcinomu prsu.

| | |
|---------------|---|
| Klíčová slova | karcinom prsu, TNBC, cisplatin, rutheniové komplexy, MDA-MB-231 |
| Počet stran | 60 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Bc. Tereza Cyříková |
| Title | The impact of selected antitumor ruthenium complex on migration and invasiveness of breast carcinoma cells |
| Type of thesis | Diploma |
| Department | Department of Biochemistry |
| Supervisor | Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D. |
| The year of presentation | 2022 |

Abstract

A large number of women are at risk for breast cancer. Triple negative breast cancer is one of the most dangerous subtypes. Currently, there is no fully effective treatment for this kind of breast cancer. Treatment of this kind of cancer is extremely difficult, among other things, due to formation of distant metastasis. In addition to other treatments, various cytostatics and their combinations are currently used for therapy. Commonly used cytostatics include platinum based drugs, which are effectively used in the treatment of a wide range of malignancies. Unfortunately, the application of such cytostatics has a number of undesirable side effects on the patient's body. These disadvantages motivate scientists and physicians to synthesize and test new drugs. In addition to conventional platinum cytostatics, new potential drugs based on other heavy metals are being developed that could be effective cytostatics and would not have as many undesirable side effects. The effect of a new dichloro complex of ruthenium with the ligand 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromene-3-carbonitrile on the cell line MDA-MB-231 derived from triple negative breast cancer was tested in the diploma thesis. For comparison, all experiments were also performed with clinically used cisplatin. Methods such as antiproliferative activity test, wound-healing assay, re-adhesion and invasion test were used in the thesis. The ruthenium complex showed better antiproliferative, anti-migration and anti-adhesion activity compared to cisplatin on MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells and appears to be a promising candidate for use in the treatment of triple negative breast cancer.

| | |
|----------------------|---|
| Keywords | Breast cancer, TNBC, cisplatin, ruthenium complexes, MDA-MB-231 |
| Number of pages | 60 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 1 |
| 2 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 3 |
| 2.1 | Nádorové onemocnění..... | 3 |
| 2.1.1 | Metastatická kaskáda | 3 |
| 2.1.2 | Invazivita a migrace nádorových buněk | 5 |
| 2.2 | Rakovina prsu..... | 6 |
| 2.2.1 | Typy karcinomu prsu | 7 |
| 2.2.2 | Triple negativní karcinom prsu | 9 |
| 2.2.3 | Léčba triple negativního karcinomu prsu..... | 11 |
| 2.3 | Cisplatina v terapii nádorových onemocnění | 12 |
| 2.3.1 | Vstup cisplatinu do buněk..... | 14 |
| 2.3.2 | Vazba cisplatinu na DNA..... | 15 |
| 2.3.3 | Buněčná rezistence..... | 17 |
| 2.4 | Komplexy ruthenia v terapii nádorových onemocnění | 19 |
| 2.4.1 | Ruthenité komplexy | 20 |
| 2.4.2 | Ruthenaté komplexy..... | 21 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 25 |
| 3.1 | Materiál | 25 |
| 3.1.1 | Biologický materiál..... | 25 |
| 3.1.2 | Chemikálie | 25 |
| 3.1.3 | Použité komplexy..... | 26 |
| 3.1.4 | Roztoky a kultivační média..... | 26 |
| 3.2 | Přístroje a software..... | 27 |
| 3.3 | Metody..... | 27 |
| 3.3.1 | Kultivace nádorových buněk..... | 27 |
| 3.3.2 | Test antiproliferativní aktivity..... | 28 |
| 3.3.3 | Test zacelování rýhy | 30 |
| 3.3.4 | Re-adhezní test..... | 31 |
| 3.3.5 | Invazní test | 32 |
| 4 | VÝSLEDKY..... | 35 |
| 4.1 | Antiproliferativní aktivita | 35 |
| 4.2 | Antimigrační aktivita..... | 37 |
| 4.3 | Antiadhezní aktivita | 42 |
| 4.4 | Antiinvazní aktivita | 43 |
| 5 | DISKUZE | 45 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 50 |

| | |
|--------------------------------|----|
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 51 |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK..... | 60 |

Cíle práce

1. Na základě studia odborné literatury zpracovat rešerši na uvedené téma.
2. Osvojit si práci s liniemi lidských nádorových buněk v aseptickém prostředí.
3. Studovat vliv nového komplexu ruthenia na linii buněk lidského triple negativního karcinomu prsu se zaměřením na antiproliferativní a antiinvazní aktivitu.
4. Výsledky testování diskutovat s daty dostupnými pro další komplexy kovů v odborné literatuře.

1 Úvod

Rakovina se řadí mezi velmi nebezpečné choroby, které ohrožují velkou část populace. Počet nově diagnostikovaných pacientů s maligním nádorem každoročně stoupá. Ačkoliv incidence zhoubných nádorů stále roste, mortalita se díky dynamicky se vyvíjejícím diagnostickým metodám a novým způsobům léčby nezvyšuje. V České republice je rakovina prsu u žen nejvíce se vyskytující nádorové onemocnění, naopak u mužů je nejvíce zastoupena rakovina prostaty. S využitím moderních diagnostických metod a následně vhodně zvolené léčby (chirurgická léčba, chemoterapie, radioterapie, hormonální léčba, biologická léčba atd.) se šance na uzdravení pacienta mnohonásobně zvyšuje.

Jedním z nejhůře léčitelných podtypů rakoviny prsu je triple negativní karcinom prsu (TNBC). U tohoto typu karcinomu jsou možnosti léčby limitované. Ačkoliv mohou pacientky pozitivně reagovat na radiační terapii nebo chemoterapii s využitím cytostatik, neexistuje prozatím naprosto specifická léčba. Z důvodu nedostatku molekulárních cílů a špatné prognózy u pacientek trpících tímto onemocněním, je důležité se zaměřit na zlepšení a vývoj terapie pro tento typ rakoviny.

V současné době se k léčbě rakoviny prsu používají mimo jiné léky na bázi platiny. Nejznámějším z nich je *cis*-diammindichloroplatnatý komplex (cDDP), lépe známý jako cisplatina. Přestože je cisplatina jedním z neúčinnějších a nejdéle používaných léčiv při léčbě zhoubných nádorů prsu, byly u mnoha pacientů zjištěny vedlejší účinky a rozvoj chemorezistence. Ačkoliv jsou cisplatina a její deriváty velmi využívanými cytostatiky, došlo v průběhu let k zaměření na jiné léčebné prostředky, které by mohly překonat jak vedlejší účinky, které mají negativní dopad na zdraví pacienta, tak i případnou rezistenci buněk k léčivům na bázi platiny.

Kromě komplexů platiny se tak dostávají do popředí komplexy dalších těžkých kovů, mezi nimiž mají důležité postavení komplexy ruthenia. Některé z nich jsou ve fázi klinických testů pro využití v protinádorové terapii jako nová cytostatika. Další látky jsou navrhovány, syntetizovány a intenzivně zkoumány. Bylo popsáno hned několik mechanismů biologického účinku pro různé rutheniové komplexy, kdy tyto látky vykazovaly také menší nežádoucí vedlejší účinky ve srovnání s cisplatinou a byly schopné překonávat rezistenci buněk vůči platinovým léčivům.

V rámci experimentální části předkládané práce byl testován vliv nového dichloro komplexu ruthenia s ligandem 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromen-3-

karbonitrem na antiproliferativní aktivitu, adhezenci a invazivitu triple negativní buněčné linie karcinomu prsu MDA-MB-231. Tento komplex se v předchozích experimentech jevil jako slibný kandidát pro použití v protinádorové terapii. Schmitt *et al.*, (2018) při testování na celém panelu lidských nádorových buněk zjistili, že tento komplex vykazuje vysokou antiproliferativní aktivitu. Pro porovnání byly všechny experimenty v této práci provedeny také s klinicky využívanou cisplatinou.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Nádorové onemocnění

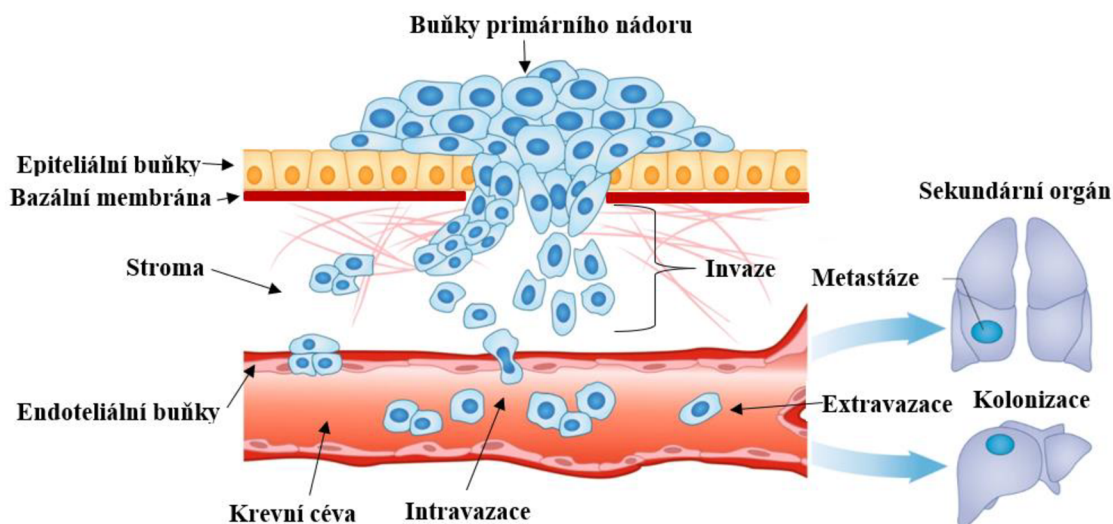
Podstatou nádorového onemocnění je nekontrolovaný růst buněk, který vede ke vzniku karcinomu. Karcinomy lze rozdělit do dvou typů: maligní a benigní. Maligní karcinom je obzvláště nebezpečný z důvodu možnosti jeho šíření do okolních tkání, kde se mohou zakládat druhotná ložiska, tzv. metastázy. Šíření probíhá skrze krevní řečiště nebo lymfatický systém. Pro tento typ karcinomu je důležité, aby byla léčba nasazena co nejdříve a předešlo se tak dalšímu šíření. Není podmínkou, že každé zmnožení buněk vede k tvorbě maligního karcinomu. V lidském organismu se může vyskytnout také benigní karcinom, který je v růstu omezen, nešíří se do okolních tkání a nemá na zdraví pacienta takový vliv jako tomu je u maligních karcinomů (Patel, 2020).

Znaky, které popisují maligní chování nádoru, charakterizovali Hanahan & Weinberg v roce 2000. Mezi tyto faktory zařadili nezávislost nádorových buněk na normálních růstových faktorech (soběstačnost v produkci růstových signálů). Dále necitlivost nádorových buněk k signálům zastavujícím buněčný cyklus, vyhýbání nádorových buněk apoptóze, indukci angiogeneze (novotvorba cév umožňuje zásobování nádoru živinami a kyslíkem) nádorovými buňkami, uchovávání délky telomer (neomezený replikační potenciál), schopnost nádorových buněk vytvořit v jiných částech organismu druhotná nádorová ložiska, tzv. metastázy (Hanahan & Weinberg, 2000; Nenclares & Harrington, 2020). O jedenáct let později stejní autoři aktualizovali tyto poznatky s tím, že k nim přidali ještě další čtyři znaky. Jedná se o deregulaci energetického metabolismu, vyhýbání se reakcím imunitního systému, zánět a genomová nestabilita. (Hanahan & Weinberg, 2011; Nenclares & Harrington, 2020).

2.1.1 Metastatická kaskáda

Pojem metastáza je odvozen z řeckého slova *meta*, což znamená další a slova *statis*, což znamená umístění. Toto trefné označení také velmi dobře vystihuje samotný proces metastázování, při kterém se buňky z primárního nádoru šíří do jiných orgánů (Obr. 1). Jedná se o několikastupňový proces, jehož výsledkem je tvorba metastáz. Právě metastázy jsou častým důvodem úmrtí pacientek s diagnostikovaným maligním karcinomem prsu. Metastázování do konkrétních orgánů není náhodné. Jedná se o cílený proces, řízený zřejmě skrze expresi chemokinových receptorů nádorovými buňkami. Tyto receptory by buňkám s největší pravděpodobností měly umožnit nalezení vhodné tkáně

pro jejich rozvoj (Talmadge & Fidler, 2010; Retsas, 2017). Předpokladem každé buňky, která se může oddělit od primárního povrchu a tvořit v určitém místě metastázy, jsou především znaky jako schopnost motility, invaze a kolonizace sekundárního místa v organismu.



Obr. 1: Schématické znázornění metastatické kaskády. Na začátku dochází k EMT přechodu buněk do mezenchymálního fenotypu. V dalším kroku dochází k invazi buněk přes bazální membránu a interakci s ECM. Poté následuje intravazace buněk do krevní cévy. Krevní cévou putují k cílovým orgánům a opouštějí krevní řečiště (extravazace). Sekundární orgány jsou kolonizovány za vzniku metastáz (Upraveno podle Novikov *et al.*, 2021; Bergers & Fendt, 2021).

Klíčovým krokem pro přeměnu nádorových buněk schopných se oddělit od povrchu, invadovat a tvořit metastázy je epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT). Jedná se o přechodný proces, při němž buňky ztrácejí svou epiteliální organizaci a přeměňují se do mezenchymálního fenotypu. EMT nádorových buněk zahrnuje několik charakteristických znaků. Jedním z nich je snížení nebo ztráta epiteliálního spojovacího proteinu E-kadherinu. E-kadherin se při EMT translokuje z membrán do jader a je nahrazen N-kadherinem. Exprese N-kadherinu vede k modifikaci cytoskeletu buněk. Tyto změny umožňují buňkám jejich oddělení od primárního nádoru. EMT může být indukován několika faktory (např. integriny, hepatocytární růstový faktor, epidermální růstový faktor nebo transformační růstový faktor β) (van Zijl *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2018; Eslami-S *et al.*, 2020).

Dalším krokem v kaskádě je invaze, kdy nádorové buňky z primárního nádoru pronikají lokálně skrze extracelulární matrix (ECM) do okolních tkání. Invazivní schopnost buněk je ovlivněna vyšší expresí proteás, které se podílí na štěpení ECM. Tímto se mohou buňky dostat do bazální membrány až do stromatu. Buňky stromatu mohou

navíc zvyšovat jejich agresivní potenciál a tím se podílet na zvýšení jejich migrační a invazní aktivity. Dále následuje proces intravazace, což je krok, který označuje pronikání nádorových buněk přes bazální membránu krevních cév až do krevního řečiště a tím tak do vzdálených orgánů ať už individuálně nebo ve shlucích. V této části následuje interakce s epiteliálními buňkami, čímž dojde k tvorbě volné vazby a následně vazby pevné mezi nádorovou buňkou a buňkami v epitelu. Tvorby pevnějších vazeb se zúčastní adhezivní molekuly (hlavně E-selektin). Samotná adheze nádorových buněk je zprostředkována integriny. Jedná se o skupinu buněčných receptorů, které jsou zodpovědné za uvolnění nádorových buněk od endoteliálních buněk, vazbu buněk k ECM a přenos signálů mezi vnějším prostředím a buňkou (Welch & Hurst, 2019; Hofmanová, 2013).

Potom, co je vytvořena pevná vazba, iniciují nádorové buňky tzv. diapedézu čili prostup endotelem. Posledním krokem je extravazace neboli překonání bariéry stěny cév a následný prostup přes bazální membránu v nové tkáni. Nádorové buňky se v nové tkáni uchytí a začnou se dělit. Dochází k degradaci tkáně a proteolytická aktivita je narušena (lysozomální a serinové proteázy, metaloproteinázy), čímž je umožněn nádorový růst a tvorba mikrometastáz. Buňky znovu zahajují proces proliferace, čímž dojde ke vzniku makroskopicky detekovatelných metastáz a v konečném důsledku k metastatické kolonizaci. Ta může trvat několik měsíců či let (Valastyan & Weinberg, 2011; Kovaříková *et al.*, 2014).

2.1.2 Invazivita a migrace nádorových buněk

Nádorové buňky jsou charakteristické jejich možností adaptace na podmínky vnějšího prostředí. Každá nádorová buňka prochází cyklickým procesem zvaným invazivita. Jedná se o jeden z důležitých znaků metastatické kaskády. Invaze zahrnuje několik nezbytných znaků: změnu tvaru nádorových buněk, přechod buněk několika morfologickými typy a migraci nádorových buněk z primárního nádoru přes ECM do okolních tkání (Friedl & Wolf, 2010; Friedl & Alexander, 2011). Buňka může migrovat buď samostatně nebo naopak kolektivně. V prvním případě buňka neinteraguje s okolními buňkami a schopnost mezibuněčné komunikace chybí. Ve skupině buněk dochází k jejich interakci a adhezi (Friedl & Wolf, 2010).

Lze rozlišit několik typů schopnosti migrace nádorových buněk skrze ECM. Prvním způsobem migrace buněk je jejich protlačení přes ECM (1) améboidním pohybem bez proteolytického štěpení ECM (Wolf *et al.*, 2003). Améboidní buňky se pohybují přes

ECM tak, že se přizpůsobují jejich tvarem a protlačují se vytvořenými tkáňovými mezerami. Migrace buněk je zprostředkována kontrakcí kortikálního aktinomyosinového cytoskeletu či nízkou adhezní silou (Friedl *et al.*, 2001). Tento pohyb buněk je charakteristický pro leukémie, lymfomy či malobuněčný karcinom plic (mohou být také zachyceny u jiných typů nádorů). Améboidní migrace se vyskytuje spíše u buněk s nízkou hustotou ECM (Wolf *et al.*, 2003; Madsen & Sahai, 2010).

Dalším způsobem migrace buněk je (2) mezenchymální pohyb přes ECM skrze díry, které tvoří nádorové buňky. Tento pohyb je závislý na degradaci ECM s využitím metaloproteinás. Mezenchymální migrace se vyskytuje spíše u buněk s vyšší hustotou ECM. Vyšší hustota je zprostředkována vnímáním fokálních adhezí přes integriny nebo proteiny jako fibronectin, vinculin, talin. Tento typ je charakteristický pro sarkomy měkkých tkání nebo se vyskytuje u nádorů pojivých tkání (Wolf *et al.*, 2007; Sabeih *et al.*, 2009; Friedl & Alexander, 2011).

Dalším způsobem migrace buněk je (3) kolektivní pohyb. Tento pohyb zahrnuje dlouhodobou adhezi několika buněk (tzv. následné buňky) s vedoucími buňkami (Ilina & Friedl, 2009). Kolektivní pohyb je odlišný v závislosti na typu buňky či napadané tkáňové struktuře (Friedl & Gilmour, 2009). Existují dva hlavní typy kolektivního pohybu. První z nich zahrnuje široké řetězce buněk, které jsou ovládané několika vedoucími buňkami. Druhý z nich zahrnuje lineární mnohobuněčné řetězce buněk, které jsou ovládané jednou či dvěma vedoucími buňkami. Jedná se o nejpomalejší způsob pohybu nádorových buněk (Weigel *et al.*, 2012). V některých případech se může vyskytnout (4) vícebuněčné proudění, které je charakterizováno málo adherentními nebo neadherentními buňkami, které putují stejným směrem (Friedl & Alexander, 2011).

2.2 Rakovina prsu

Rakovina prsu je jedním z nejčastěji diagnostikovaných maligních onemocnění na celém světě, jímž trpí přibližně 12 % žen. Z hlediska úmrtnosti se rakovina prsu řadí celkově na 5. místo ve světě (Ferlay *et al.*, 2015). S využitím moderních diagnostických metod a následně vhodné léčby (chirurgická léčba, chemoterapie, radioterapie, hormonální léčba, biologická léčba) se šance na uzdravení pacientek mnohonásobně zvyšuje.

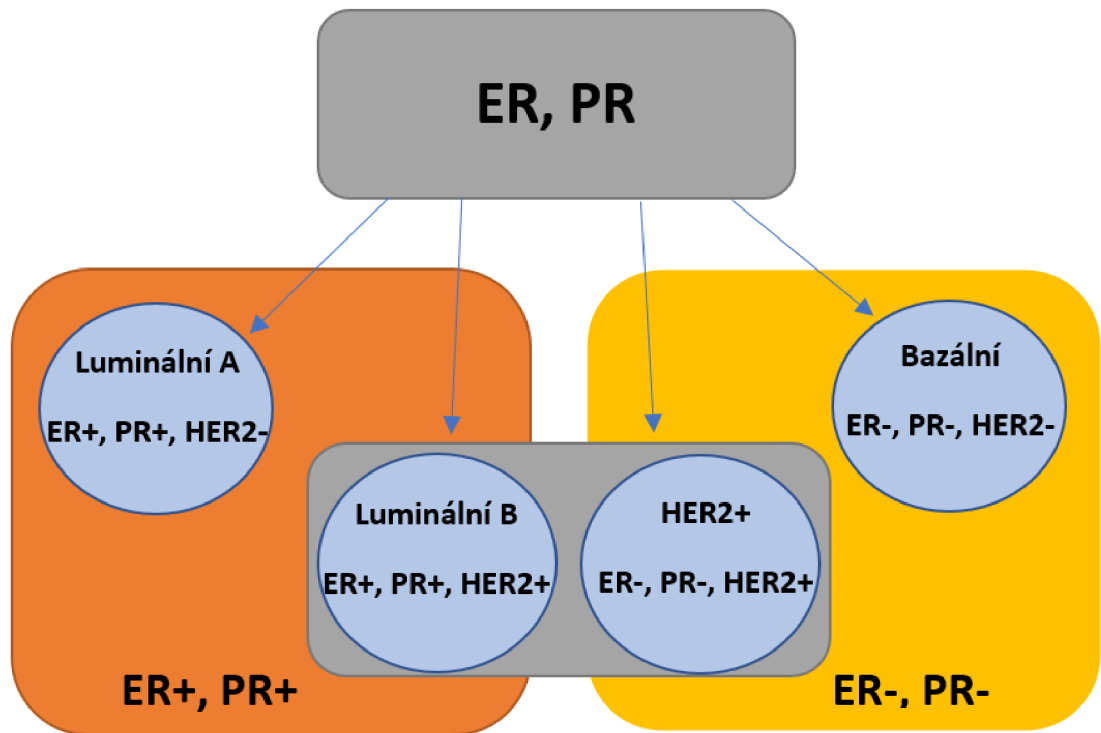
Mezi možné rizikové faktory tohoto onemocnění se řadí genové mutace (v případě rakoviny prsu se jedná o mutaci genu BRCA1 (breast cancer1) a BRCA2 (breast cancer2)). Dále pozdní nástup klimakteria (po 55. roce života), brzký věk menarché (před

11. rokem života), věk pacientky, případně nadměrné užívání alkoholu, kouření a obezita. Naopak jako prevence tohoto maligního onemocnění je bráno kojení, porod, či fyzická aktivita (Momenimovahed & Salehiniya, 2019). Uvádí se, že pouze 5–10 % diagnostikovaných případů rakoviny prsu je přidruženo s genovou predispozicí. Ostatní rizikové faktory mají vliv na vznik 90–95 % nově diagnostikovaných případů rakoviny prsu. (Castelló *et al.*, 2015).

Diagnostika rakoviny prsu bývá obtížná, protože ženy bývají v počátcích zcela bez symptomů. Konečný verdikt se potvrzuje na základě laboratorního vyšetření. Včasná diagnostika onemocnění a pravidelné monitorování stavu jsou jedny z hlavních předpokladů pro úspěšnou léčbu. K diagnostice rakoviny jsou využívány nádorové markery, které u rakoviny prsu umožňují navržení účinného léčebného přístupu, případně se mohou využít k hodnocení stavu onemocnění po nastolení léčby nebo detekci metastáz. Mezi nádorové markery, které jsou produkovány rakovinnými buňkami a umožňují detekci rakoviny prsu patří: CA 15-3 (nádorový antigen), CA 27-29, CEA (karcinoembryonální antigen), TPA (tkáňový polypeptidový antigen), ER (estrogenový receptor), PR (progesteronový receptor), HER2 (lidský epidermální receptor 2) a Ki-67 (Zaha, 2014; Kabel, 2017).

2.2.1 Typy karcinomu prsu

Na základě profilu genové exprese byly charakterizovány tři základní typy nádorového onemocnění prsu. Jedná se o nádory luminální, které zahrnují přítomnost hormonálních receptorů v buňce. Patří sem receptory hormonů exprimujících estrogenu (ER) a receptory hormonů exprimujících progesteronu (PR). Dále neluminální typ – tzv. HER2 typ (buňky exprimující lidský epidermální receptor 2). Třetím typem jsou nádory bazální, které zahrnují triple negativní nádory a vyznačují se negativitou všech tří receptorů (ER-, PR-, HER2-) (Obr. 2) (Barzaman *et al.*, 2020).



Obr. 2: Schématické znázornění různých typů rakoviny prsu. Oranžové a žluté čtverce zobrazují typy rakoviny prsu na základě exprese ER/PR, pozitivní v oranžovém čtverci (Luminální A, Luminální B) a negativní (HER2+, bazální) ve žlutém čtverci. Šedý obdélník uprostřed zobrazuje přítomnost HER2+ v Luminálním B typu a HER2+ typu (upraveno podle Sandhu *et al.*, 2010).

Luminální typ je rozdělen do dvou podtypů luminálního A a luminálního B. Výskyt ER a PR hormonálních receptorů ovlivňuje vytvořený karcinom, který je na jejich přítomnosti závislý. Karcinomy s přítomností ER a PR receptorů jsou léčeny hormonálně a u žen se jedná o nejvíce se vyskytující typ. Zahrnuje přibližně 60–70 % diagnostikovaných případů (Sandhu *et al.*, 2010; Hamdan *et al.*, 2019; Barzaman *et al.*, 2020). Obecně lze říct, že oba podtypy (jak luminální A, tak luminální B) jsou méně agresivní a mají lepší prognózu (přibližně 80–85% přežití), než je tomu u HER2 a TNBC typu. To, že je u pacientek s uvedeným typem nádoru velké procento přežití, je dáno dostupností účinné terapie ve formě antiestrogenové léčby – tamoxifen. Jedná se o blokátor estrogenu, který při vazbě na estrogení receptory blokuje účinek estrogenních hormonů, což v konečném důsledku vede ke zmenšení nádoru. Dále se využívá letrozol, anastrozol a exemestan, jež taktéž eliminují produkci estrogenu inhibicí aromatázy, která hraje důležitou roli v biosyntéze estrogenu. Inhibicí tohoto enzymu, dochází k omezení vzniku hormonu estrogenu, kterého je tak méně pro stimulaci růstu

buněk karcinomu (Osborne & Tripathy, 2005; Sandhu *et al.*, 2010; Reinert & Barrios, 2015).

Dalším typem je transmembránový protein HER2, který je členem rodiny receptorů epidermálního růstového faktoru (EGFR) s tyrosinkinasovou aktivitou. Proteiny epidermálního růstového faktoru jsou známé regulací buněčných procesů, jako je diferenciace nebo proliferace (Wagner *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2017). Vysoká exprese HER2 receptoru je spojena s agresivním bujením buněk. Tento typ rakoviny postihuje až 30 % žen a je spojen s obtížnějším průběhem léčby a vyšším rizikem tvorby metastáz. Jak již bylo zmíněno, tento typ má horší prognózu (přibližně 50–60% přežití). V dnešní době jsou pacientky pozitivní na HER2 léčeny monoklonálními protilátkami – trastuzumabem a pertuzumabem, které se vážou na různé domény receptoru HER2 a inhibují růst nádorových buněk (Slamon *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 2009; Sandhu *et al.*, 2010). Dále inhibitorem domén tyrosinkinasy HER2 – lapatinibem, který cílí na HER2 receptory, čímž zpomaluje nebo zastavuje růst nádorových buněk (Ross *et al.*, 2009; Opdam *et al.*, 2012).

2.2.2 Triple negativní karcinom prsu

Třetím typem rakovinového onemocnění prsu jsou nádory bazální, které zahrnují TNBC. Bazální nádory se vyskytují přibližně u 15–20 % žen a jsou spojeny se špatnou prognózou (Foulkes & Reis-Filho, 2010; Sandhu *et al.*, 2010). Z hlediska problematiky řešené v této práci se jedná o nejdůležitější typ, jelikož právě na buňkách odvozených od tohoto typu nádoru byla sledována účinnost rutheniového komplexu vybraného pro experimentální část. TNBC se vyznačuje negativitou všech tří receptorů (ER, PR a HER2 receptoru). Bylo zjištěno, že diagnóza TNBC je spojena s vyšším rizikem úmrtnosti na rozdíl od ostatních typů karcinomu prsu hlavně proto, že tento typ karcinomu je agresivnější. Triple negativní karcinomy jsou zvláště nebezpečné, protože u nich dochází k metastázování do jiných orgánů, nejvíce do mozku a plic. U tohoto typu karcinomu jsou možnosti léčby limitované. Ačkoliv pacientky mohou pozitivně reagovat na radiační terapii nebo chemoterapii s využitím cytostatik, neexistuje prozatím specifická léčba (Dent *et al.*, 2009). Vývojem efektivní léčby se tedy v současné době zabývá mnoho vědců a lékařů.

Pro tento typ nádoru neexistuje specifická léčba zejména kvůli heterogenitě onemocnění a nedostatku přesně určených molekulárních cílů. Tento typ onemocnění bývá častěji diagnostikován u mladších patientek a také u žen převážně afroamerického původu (Morris *et al.*, 2007; Lehmann *et al.*, 2011). Ačkoliv mají pacientky s TNBC vyšší

míru klinické odpovědi na neadjuvantní chemoterapii, přesto mají horší prognózu přežití. Přibližně 30 % žen přežívá zhruba po dobu 5 let (Dent *et al.*, 2007). Jedním z dalších poznatků, který byl při identifikaci TNBC zjištěn, byla častá diagnostika TNBC (až 70 % nově diagnostikovaných případů) u pacientek nesoucích mutaci BRCA1. BRCA1 se zapojuje do regulace buněčného cyklu a taktéž hraje roli při opravě dvouřetězcových zlomů a tím při udržení stability DNA. U karcinomů s mutací BRCA2 genu bylo zjištěno, že 16–23 % karcinomů jsou TNBC (Perou *et al.*, 2000; D'Andrea & Grompe, 2003; Haffty *et al.*, 2006; Stevens *et al.*, 2013). V současné době probíhají klinické studie, zabývající se využitím enzymu poly (ADP-ribosa) polymerasy (PARP) (např. olaparib) v léčbě TNBC, zejména v kombinované terapii s dalšími látkami. PARP by mohla představovat přínos z hlediska terapie TNBC při zjištěné mutaci BRCA1 nebo BRCA2. PARP mají důležitou funkci při opravě jednořetězcových zlomů DNA mechanismem náhrady jednotlivých bází (BER = base excision repair). Inhibitory PARP by měly zabránit opravám DNA nádorových buněk, což v konečném důsledku vede ke zvýšení citlivosti buněk TNBC na chemoterapeutika. V současné době probíhá celkem 15 klinických studií s olaparibem pro léčbu TNBC (Rouleau *et al.*, 2010; Sonnenblick *et al.*, 2015; Hwang *et al.*, 2019).

Pro porozumění TNBC se Lehmann *et al.*, (2011) pokusili analyzovat profily genové exprese pacientů s diagnostikovaným triple negativním karcinomem prsu, přičemž se jim povedlo identifikovat sedm podtypů TNBC. Jedná se podtyp bazální 1 (BL1), bazální 2 (BL2), mesenchymální (M), mesenchymální kmenové buňky (MSL), luminální androgenní receptor (LAR), imunomodulační (IM) a nestabilní (UNS). Každý z těchto podtypů je charakterizován rozdílnými molekulárními změnami, což může souviset s tím, že různé podtypy mohou mít odlišnou terapeutickou odpověď vůči cílené léčbě. Profil BL1 podtypu je tvořen geny zapojujícími se do regulace buněčného cyklu, buněčného dělení a reakce na poškození DNA. BL2 podtyp je charakterizován expresí genů zapojených do signalizace růstového faktoru. IM podtyp zahrnuje geny imunitních buněk a signalizace cytokinů (Lehmann *et al.*, 2011; Kalimutho *et al.*, 2015; Bareche *et al.*, 2018; Garrido-Castro *et al.*, 2019). M a MSL (kmenové buňky) podtypy jsou zapojené do procesu EMT, což je důležitý proces pro epiteliální buňky, který buňkám během embryonálního vývoje organismu potažmo vývoje v dospělosti, umožní změnit jejich fenotyp a migrovat. Z hlediska nádorového onemocnění to souvisí s progresivitou nádorů, kdy EMT vede k uvolnění buněk z primárního nádoru, které se pak mohou šířit v rámci organismu (Arumugam *et al.*, 2009; Thiery *et al.*, 2009). MSL kromě toho bývají často

spojovány s procesem angiogeneze a signalizace růstového faktoru. LAR podtyp je spojen se stimulací nebo potlačením buněčné proliferace v závislosti na aktivovaných signálních dráhách. Ačkoliv byly jednotlivé podtypy dobře charakterizovány, ani jeden podtyp se zatím neosvědčil jako vhodný kandidát pro potencionální cílenou léčbu TNBC (Gerratana *et al.*, 2018; Garrido-Castro *et al.*, 2019).

2.2.3 Léčba triple negativního karcinomu prsu

Pro možnou cílenou terapeutickou léčbu TNBC byly studovány receptory jako: receptor růstového faktoru fibroblastů (FGFR), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR) a epidermální růstový faktor (EGFR). Ty by mohly fungovat jako potenciální cíle při vývoji nových léků za účelem přesně definované léčby pacientek s diagnostikou TNBC (Hwang *et al.*, 2019).

FGFR by měl být zodpovědný za základní regulační procesy v buňce (proliferace, migrace, diferenciace) vedoucí k růstu nádoru. V rámci předklinické studie na xenoimplantátových myších modelech, kde byl použit lucitanib (inhibitor FGFR) v kombinaci s paclitaxelem, byla zjištěna významná regrese tumoru. To by mohl být jeden z důkazů, který označuje FGFR jako potencionální cíl léčby TNBC. V klinické praxi prozatím nebyly tyto poznatky zhodnoceny (Bello *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2019).

VEGFR hraje významnou roli v procesu zvaném vaskularizace. Procesem vaskularizace se rozumí vznik cév v tkáni, což je důležité při vývoji tkání a orgánů v normálním stavu. Nicméně při růstu nádorů má vaskularizace význam negativní, a to, že zajišťuje výživu nádorových buněk. Tvorba nových cév výrazně přispívá k metastatickým a proliferativním vlastnostem TNBC. Jak už bylo zmíněno, obezita je jeden z faktorů, který může zapříčinit vznik nádorového onemocnění prsu. V rámci provedených experimentálních testů vykazovaly obezní myši vyšší hladinu VEGFR v séru ve srovnání s neobezními myšmi (Miyazawa-Hoshimoto *et al.*, 2005). Testy provedené u žen prokázaly, že hladina VEGFR byla výrazně vyšší u žen s TNBC ve srovnání se zdravou populací (přibližně 54 % vs. 23 %) (Tang *et al.*, 2009; Elkashif *et al.*, 2018; Hwang *et al.*, 2019). Několik klinických studií se zabývalo studiem bevacizumabu (monoklonální protilátka zacílena na VEGFR) u pacientek s TNBC. Výsledky však nebyly dostatečně přesvědčivé a nebyly prokázány terapeutické výhody bevacizumabu v adjuvantní léčbě ani v neoadjuvantní léčbě. Kvůli nesrovnalostem v terapeutickém přínosu bevacizumabu bylo původní schválení Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv

(Food and Drug Administration) v roce 2008 pro použití tohoto léčiva v roce 2010 zrušeno (Hwang *et al.*, 2019).

EGFR se podílí na proliferaci a progresi různých typů nádorových buněk. U receptoru EGFR bylo zjištěno, že existuje korelace mezi jeho expresí a TNBC. Vyšší exprese EGFR se objevuje přibližně u 40–90 % patientek s diagnostikovaným TNBC a často u karcinomu prsu souvisejícím s mutací BRCA1. Nadměrnou expresí se rozumí vysoký počet kopií genu EGFR, nikoliv jeho mutace (Park *et al.*, 2014; Hwang *et al.*, 2019). Ačkoliv se EGFR zpočátku ukázal jako vhodný terapeutický cíl pro léčbu TNBC, tak výsledné klinické studie ukázaly, že u patientek s TNBC často docházelo k výskytu recidivy a velká část patientek nereagovala na tuto léčbu (Corkery *et al.*, 2009). Pro léčbu TNBC doposud nebyla schválena žádná léčiva, která by cílila na EGFR. Podle dostupných webových stránek Národního institutu zdraví (www.clinicaltrials.gov) je v současné době několik inhibitorů EGFR ve fázi klinických testů (např. afatinib, dasatinib) (Li *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2017; Hwang *et al.*, 2019).

Slibným přístupem pro léčbu TNBC může být také imunoterapie (podání protilátek pembrolizumab nebo atezolizumab v klinické studii I přineslo pozitivní výsledky u 19–33 % patientek s TNBC). Kromě imunoterapie by mohl být potencionálním cílem molekulární chaperon HSP90 (Heat shock protein 90), jehož inhibice by mohla ovlivnit různé signální dráhy zapojené do progresu nádoru (Cheng *et al.*, 2012).

Národní onkologický institut (National Comprehensive Cancer Network) v roce 2017 uvedl, že na základě dostupných studií o léčbě TNBC je doporučeno zaměřit se na systémovou adjuvantní léčbu patientek s TNBC, neboť přímá cílená léčba není prozatím k dispozici. Evropská společnost pro lékařskou onkologii (European Society for Medical Oncology) doporučuje použití karboplatiny, stejně tak jako užití antracyklinů a taxanů. V případě diagnostiky TNBC u patientek nesoucích současně mutaci BRCA se doporučuje podávání inhibitorů PARP (olaparib – schválen v roce 2018) (Le & Gelmon, 2018).

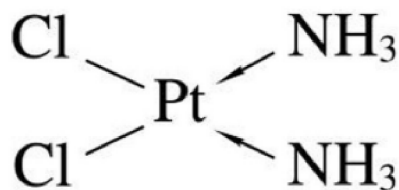
2.3 Cisplatina v terapii nádorových onemocnění

K léčbě rakoviny prsu jsou také často využívány léky na bázi platiny. Nejznámějším z nich je *cis*-diammindichloroplatnatý komplex, lépe známý jako cisplatina (Lebwohl & Canetta, 1998). Podstatou biologického účinku tohoto léčiva je vytvoření aduktů na DNA. Tyto adukty mohou způsobit strukturální změny DNA, po jejichž rozpoznání na ně buňka reaguje, a pokud nejsou opraveny, může dojít k smrti buňky např. apoptózou.

Ačkoliv je cisplatina nejučinnějším a nejdéle používaným léčivem při léčbě zhoubných nádorů, byly u mnoha pacientů zjištěny vedlejší účinky. Mezi nejvíce se vyskytující byly zařazeny nefrotoxicita (porucha funkce ledvin), ototoxicita (zhoršení sluchu), hepatotoxicita (porucha funkce jater) a neurotoxicita (porucha funkce nervů). Dále se objevovaly nepříznivé účinky jako zvracení, padání vlasů, chudokrevnost a alergické reakce. Léčba cisplatinou může mít u pacientek další negativní následky jako je rozvoj chemorezistence nádorových buněk (Köberle *et al.*, 2010; Dasari & Tchounwou, 2014; Manohar & Leung, 2018).

Kromě léčby rakoviny prsu je cisplatina využívána také v rámci léčby široké škály dalších typů rakovin (např. rakovina plic, varlat nebo vaječníků) (Ghosh, 2019). Uvádí se, že terapii spojenou s podáváním cisplatinou využívá až 50 % pacientek po celém světě (Galanski *et al.*, 2005). Postupem času byly od cisplatinou odvozeny její deriváty, které byly taktéž testovány v rámci klinických studií.

Cisplatina je anorganická molekula. Na centrální atom platiny (ox. stav II) jsou navázány dva atomy chloru a dvě aminové skupiny (Obr. 3). Odstupující chloridové ligandy umožňují tomuto komplexu platiny v konečném důsledku vytvářet vazby s DNA. Amino skupiny jsou naopak na centrální atom platiny velmi silně navázány a neodstupují (Goodsell, 2006). Cisplatina byla poprvé syntetizována v roce 1845 italským chemikem Michele Peyronem. Její biologické vlastnosti zůstaly skryty až do roku 1965, kdy je pomohl objasnit experiment amerického biofyzika Dr. Barnetta Rosenberga. Ten zkoumal vliv elektrického pole na růst bakterií *Escherichia coli*. Do nádoby s bakteriemi a živným médiem obsahujícím amonné soli umístil platinové elektrody. Po připojení zdroje napětí na elektrody se bakteriální buňky přestaly dělit, avšak bez inhibice jejich růstu. V konečném důsledku došlo ke vzniku dlouhých filament při růstu bakterií. Později bylo zjištěno, že během elektrolýzy probíhající na platinových elektrodách vznikaly sloučeniny platiny, které byly zodpovědné za filamentózní růst bakterií (Rosenberg *et al.*, 1965; Trimmer & Essigmann, 1999).

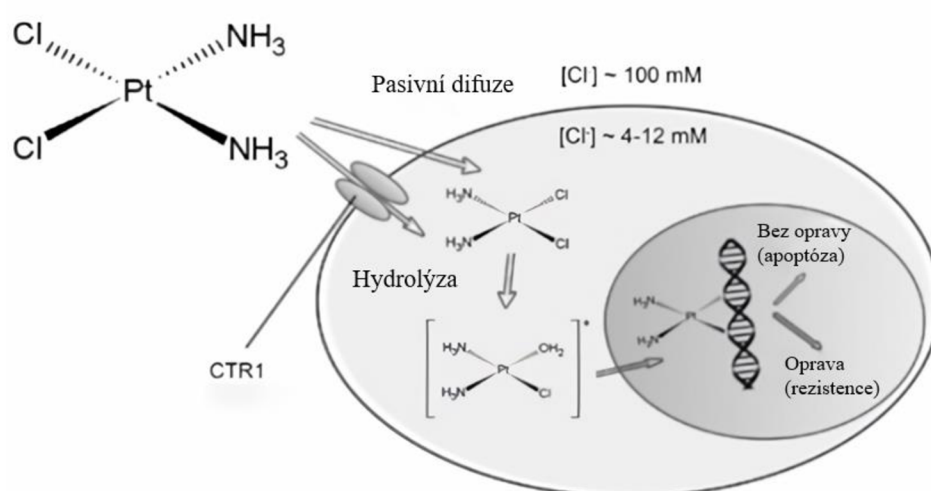


Obr. 3: Chemická struktura cisplatinou (převzato z Dai *et al.*, 2017).

O pár let později byly zahájeny předklinické farmakologické a toxikologické testy na modelu myši (Schaepi *et al.*, 1973). Díky pozitivním výsledkům získaným z předchozích experimentů, byla platinová sloučenina cisplatina schválena v roce 1978 Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jako protinádorové léčivo (Kelland, 2007). Účinnost tohoto komplexu vedla v průběhu let k syntéze derivátů cisplatiny i dalších platinových sloučenin, které byly a jsou i v současné době taktéž intenzivně testovány (Dasari & Tchounwou, 2014).

2.3.1 Vstup cisplatiny do buněk

Po objevení pozitivního účinku v léčbě různých typů rakovin, se pozornost zaměřila na výzkum mechanismu působení tohoto protinádorového léčiva. Prvním krokem samotné aplikace cisplatiny je její intravenózní podání. To se provádí formou infuze ve fyziologickém roztoku. Následně se cisplatina dostává krevním řečištěm do celého těla včetně cílové tkáně. Uvádí se, že přibližně 65–95 % cisplatiny se může navázat na proteiny krevní plazmy zhruba do 24 hodin od podání. Toto navázání není výhodné, neboť vede k deaktivaci cisplatiny (Ivanov *et al.*, 1998; Alderden *et al.*, 2006). Díky vysoké koncentraci chloridových iontů (100 mM) v krevním řečišti zůstává cisplatina v nezměněné formě, dokud se nedostane do buňky (Petrović & Todorović, 2016; Ghosh, 2019). Cisplatina může pronikat do buňky pasivní difuzí, protože v cytoplazmě buňky je oproti krevnímu řečišti nízká koncentrace chloridových iontů (4–12 mM) (Obr. 4).

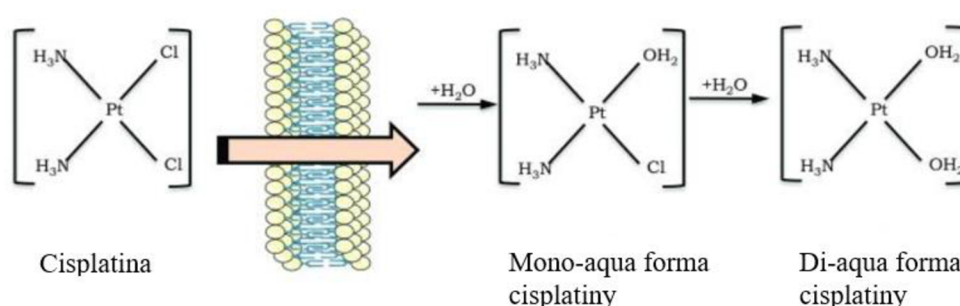


Obr. 4: Vstup cisplatiny do buňky a mechanismus působení. Nejprve je cDDP importována do buňky pomocí pasivní difuze na základě rozdílné koncentrace chloridových iontů v krevním řečišti a cytoplazmě buňky. Další možnost je její import přes membránové transportéry. Po importu do buňky se cDDP hydrolyzuje a dochází k reakci s DNA (upraveno podle Browning *et al.*, 2017).

Novější studie ukázaly, že k transportu cisplatiny do buňky může docházet také aktivně s využitím membránových transportérů, konkrétně transportérů mědi Ctr1 a Ctr2 (copper transporter 1, 2) nebo transportéru organických kationtů Oct2 (organic cation transporter 2) (Petrović & Todorović, 2016; Amable, 2016; Jain *et al.*, 2017). Studie taktéž ukázaly, že přítomnost membránového transportéru Ctr1 má vliv na akumulaci cisplatiny. Při jeho zvýšené expresi v buněčných liniích, byla zjištěna vyšší hladina akumulace cisplatiny (Dasari & Tchounwou, 2014). Naopak buňky, které jsou rezistentní na cDDP, často vykazují mimo jiné méně Ctr a tedy i sníženou hladinu mědi (Katano *et al.*, 2002).

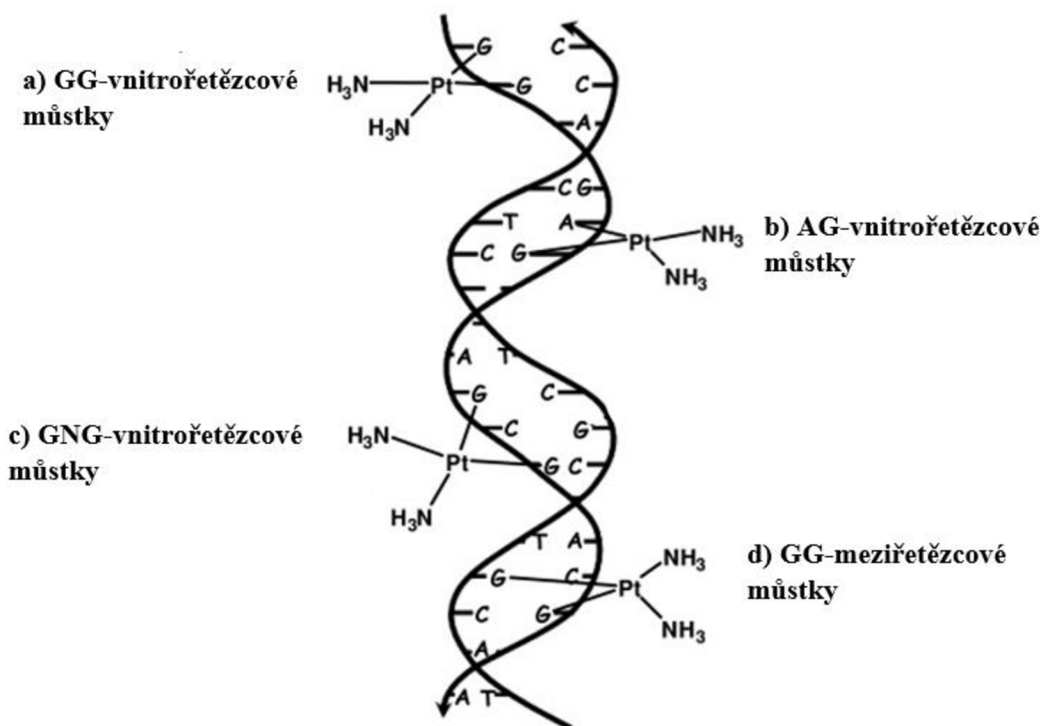
2.3.2 Vazba cisplatiny na DNA

Po vstupu cisplatiny do cytoplazmy buňky dochází k hydrolýze vazeb mezi atomy chloru a platiny (Obr. 5). Atomy chloru jsou v molekule cisplatiny nahrazeny molekulami vody, právě díky menší koncentraci chloridových iontů v cytoplazmě (4–12 mM) (Dasari & Tchounwou, 2014). Po vstupu do buňky vznikne nejprve po výměně jednoho atomu chloru za molekulu vody mono-aqua forma cisplatiny. Dále pak tento komplex putuje cytoplazmou, až dojde k odstoupení druhého atomu chloru, čímž vznikne di-aqua forma cisplatiny. Při této záměně získává cisplatina kladný náboj a chová se jako elektrofilní činidlo, čímž může reagovat s nukleofilními místy DNA (Jain *et al.*, 2017). Po vytvoření aquatovaných forem cisplatiny a doputování do jádra buňky dochází k jejich reakci s DNA. Základním principem je vytvoření funkčních aduktů mezi cisplatinou a DNA, na čemž závisí samotná účinnost cisplatiny (Johnstone *et al.*, 2015; Amable, 2016).



Obr. 5: Schématické znázornění aquatace cisplatiny. Proces aktivace cisplatiny probíhá výměnou jednoho a dále druhého chloridu za molekuly vody (vznik mono-aquatované a di-aquatované formy cisplatiny) (převzato z Rocha *et al.*, 2018).

Cisplatina se v rámci DNA přednostně váže na nejvíce nukleofilní místo, což jsou atomy dusíku v poloze 7 (N7) purinové báze guaninu, čímž vznikají mono-funkční adukty. Ty se mohou přeměňovat na adukty bi-funkční, které způsobují tzv. zesíťování DNA. Tento proces v konečném součtu generuje vnitřetězcové a meziřetězcové můstky (Eastman, 1987; Alderden *et al.*, 2006). Nejčastěji se vyskytující můstky, které se podílí na změně struktury DNA, jsou GG-vnitřetězcové můstky (Obr. 6a). U těchto můstků se předpokládá, že jsou mnohem významnější z hlediska cytotoxicity, nežli tomu je u GNG-vnitřetězcových můstků. GG-vnitřetězcové můstky vznikají mezi dvěma purinovými bázemi guaninu a tvoří přibližně 60 % vytvořených aduktů. Dále pak můstky vznikají mezi purinovými bázemi guaninu a adeninu (AG-vnitřetězcové můstky), kdy tento typ reprezentuje asi 20 % vytvořených aduktů (Obr. 6b) (Kelland, 1993). GNG-vnitřetězcové můstky vznikají mezi dvěma guaniny oddělenými jednou bází a tvoří asi 10 % aduktů cisplatin vytvořených na DNA (Obr. 6c). Posledním můstkem je GG-meziřetězcový, který se tvoří mezi dvěma guaniny v komplementárních řetězcích (Obr. 6d). Tvoří přibližně 5–10 % aduktů cisplatin (Vrana, 1996).



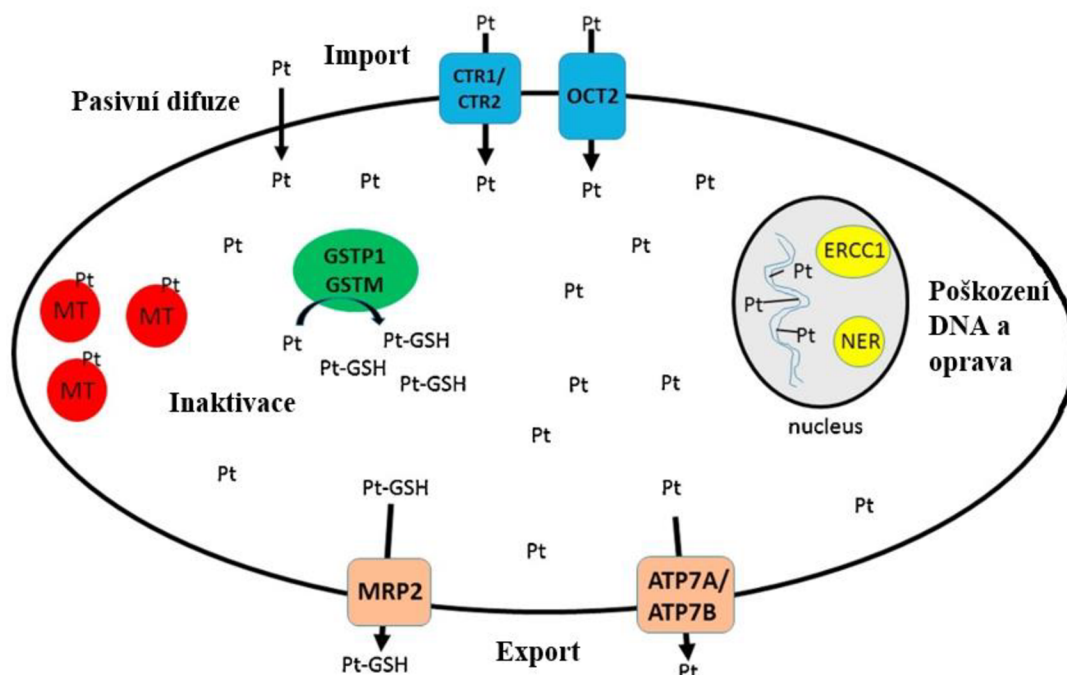
Obr. 6: Grafické znázornění aduktů DNA-cisplatin. a) GG vnitřetězcové můstky, b) AG vnitřetězcové můstky, c) GNG vnitřetězcové můstky, d) GG meziřetězcové můstky (upraveno podle Pizarro & Sadler, 2009).

Vytvořené adukty se podílí na změnách, respektive deformaci DNA, čímž se rozumí ohýbání a odvíjení dvoušroubovice (Johnstone *et al.*, 2016). Strukturální změny DNA mohou vést k narušení základních funkcí buněk, a to k blokaci transkripce či replikace. Toto poškození může být opraveno systémy jako nukleotidová excizní oprava (NER), která představuje nejvýznamnější mechanismus pro odstranění aduktů cisplatin (Galluzzi *et al.*, 2012). Dále oprava chybného párování bází – „mismatch oprava“ (MMR), homologní rekombinace (HR) a nehomologní spojování konců (NHEJ). Pokud je oprava narušena vytvořenými adukty nebo dojde až k nadměrnému poškození DNA, dojde ke spuštění apoptózy – programované buněčné smrti (Siddik, 2003; Kunkel & Erie, 2005; Martin *et al.*, 2008).

2.3.3 Buněčná rezistence

Jak už bylo zmíněno, rozvoj chemorezistence je jedním z hlavních problémů při podávání léčiv na bázi cisplatin. Tím, že se buňky stávají rezistentními, jsou schopné být odolné vůči podávaným dávkám léku. V nádorové tkáni se již mohou nacházet buňky s přirozenou rezistencí nebo buňky, které jsou schopny se adaptovat na cytotoxické prostředí a stát se rezistentními. V tomto případě mluvíme o získané rezistenci (Köberle *et al.*, 2010). Rozvoj rezistence na podaná cytostatika je ovlivněn několika faktory. Jedná se např. o nadměrnou akumulaci aplikovaného léčiva, inaktivaci vazbou na určitý protein, či zvýšenou reparaci klíčových míst poškození na cílových molekulách DNA opravnými systémy buněk (Siddik, 2003; Rocha *et al.*, 2018).

Jsou známy také další způsoby, kdy je buňka schopna snížit import cisplatin do buněk, potažmo zabránit vazbě na DNA. Jedním z nich je snížená exprese transportních kanálů Ctr1. Ty se společně s Ctr2 podílí na aktivním transportu kovu do buňky (Obr. 7). Tímto dochází k menší absorpci léčiva (Amable, 2016). Kromě cílových molekul DNA se cDDP může vázat na další proteiny. Často se jedná např. o látky obsahující síru, tedy metalothioneiny, především glutathion. Tyto interakce jsou však považovány za nechtěné, protože způsobují inaktivaci cDPP. Při reakci cDPP a glutathionu vzniká konjugát, který je exportován skrze proteiny spojené s multilékovou rezistencí (MRP2). Jedná se o membránové transportéry využívající ATP (adenosin trifosfát), které jsou schopné zajistit zvýšený eflux konjugátu cDDP-glutathion mimo buňku (Borst *et al.*, 2000; Amable, 2016).



Obr. 7: Schématické znázornění importu, vazby na DNA, exportu cDDP z buňky a oprav poškození DNA cisplatinou. Cisplatinu prochází buněčnou membránou pasivní difúzí nebo transmembránovými transportéry (CTR1, CTR2 a OCT2). Jakmile se cisplatinu dostane do jádra buňky, váže se na DNA a způsobuje tvorbu aduktů. Poškození může být opraveno opravnými systémy jako: NER, NHEJ, HR, MMR nebo ERCC1 (protein podílející se na opravách DNA). Cisplatinu je inaktivována glutathion-s-transferázou, která k cisplatině přidává glutathion (GSH). Konjugát cisplatinu-GSH je exportován přes MRP2 transportéry. Cisplatinu exportují také kanály jako: ATP7A a ATP7B. Inaktivace cisplatinu může být výsledkem vazby metalothioneinových proteinů (MT) (upraveno podle Amable, 2016).

Právě díky rozvoji rezistence na cisplatinu a vedlejším účinkům bylo v průběhu let odvozeno od cisplatinu několik jejích derivátů. Za zmínku stojí hlavně karboplatina a oxaliplatina, které byly schváleny po celém světě na základě výsledků klinických studií (Shah & Dizon, 2009; Wilson & Lippard, 2014). Hlavní výhodou karboplatiny je její menší cytotoxicita, která je dána pomalejší hydrolyzou, a tedy i pomalejší tvorbou aduktů na DNA. Karboplatina se používá k léčbě podobného spektra nádorů jako je tomu u cDDP (Mlcouskova *et al.*, 2012). Oxaliplatina zaznamenala úspěch při léčbě rakoviny tlustého střeva a konečníku v kombinaci s 5-fluorouracilem a kyselinou folinovou. Tato kombinace byla pojmenována FOLFOX a je prakticky jediným cytostatikem stále používaným v rámci léčby kolorektálního karcinomu (Galluzzi *et al.*, 2012). Od objevu účinků cisplatinu a jejích derivátů se zvýšil zájem o další sloučeniny kovů, které mají slibnou cytotoxickou aktivitu na nádorových buněčných liniích prsu rezistentních k cisplatině a mohly by představovat nové možnosti léčby rakoviny jakožto chemoterapeutická léčiva.

2.4 Komplexy ruthenia v terapii nádorových onemocnění

Ačkoliv jsou cisplatina a její deriváty velmi využívanými cytostatiky, došlo v průběhu let k zaměření na vývoj nových chemoterapeutik, která by mohla překonat jak vedlejší účinky, které mají negativní dopad na zdraví pacienta, tak i případnou rezistenci buněk k léčivům na bázi platiny (Kelland, 2007). Do popředí se tak dostávají komplexy kovů, mezi nimiž mají důležité postavení komplexy ruthenia.

Ruthenium se vyskytuje ve třech oxidačních stavech: (II), (III), (IV). V nádorové terapii mají nejvýznamnější postavení komplexní sloučeniny ruthenia obsahující Ru v oxidačních stavech (II) a (III). Oxidační stav (IV) byl charakterizován jako nestabilní, čímž bylo omezeno další zkoumání komplexů obsahujících Ru v tomto oxidačním stupni v protinádorové léčbě. Komplexy Ru (II) a (III) byly dále testovány *in vivo*. Bylo zjištěno, že tyto komplexy jsou z hlediska termodynamiky a kinetiky poměrně stabilní (Poynton *et al.*, 2017). Konkrétně v případě Ru (II) bylo navíc zjištěno, že vykazuje mnohem lepší protinádorovou aktivitu a díky svému oxidačnímu stavu je také stabilnější, než je tomu u Ru (III) (Duan *et al.*, 2009).

Při testech s rutheniovými komplexy, které obsahovaly Ru v oxidačním stupni (II) nebo (III) bylo zjištěno, že vedly k mírnějším vedlejším účinkům nežli cisplatina a také k omezení růstu nádoru na několika myších modelech s různými injektovanými typy nádorů, což činí tyto sloučeniny slibnými kandidáty pro další zkoumání (Meier-Menches *et al.*, 2018). Při zkoumání interakcí s proteiny, konkrétně se sérovým transferinem, bylo Trondlem *et. al.* (2014) navrženo, že by mohly být transportní mechanismy transferinu využívány rutheniem při vstupu do buňky. Nádorové buňky většinou vyžadují mnohem větší přísun železa než zdravé buňky a často exprimují větší počet receptorů transferinu. Tohoto jevu by mohlo využít ruthenium za účelem pasivního a většího transportu do nádorových buněk za použití transportního mechanismu transferinu. Využití transportního mechanismu transferinu rutheniem při importu do buněk je zajímavým faktem a důvodem k dalšímu výzkumu tohoto fenoménu, případně jeho konsekvencí. Naznačuje totiž, že nádorové buňky by mohly mnohem lépe přijímat a akumulovat rutheniové sloučeniny oproti běžně používaným protinádorovým lékům. Obecně se dá říct, že na mechanismus biologického účinku rutheniových i dalších kovových komplexů má důležitý vliv také povaha připojeného ligandu/ligandů, které mohou významně ovlivňovat jejich aktivitu (Kratz & Beyer, 1998; Luck & Mason, 2013; Strauch, 2021).

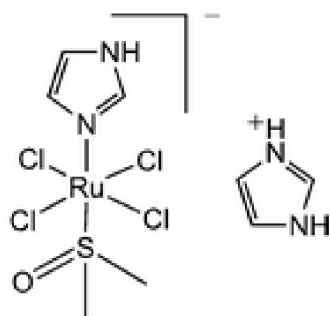
2.4.1 Ruthenité komplexy

V rámci klinického testování byly zatím zkoumány tři různé sloučeniny ruthenia s oxidačním stavem (III) – NAMI-A, KP1019 a KP1339. Ve srovnání s cisplatinou vykazovaly menší vedlejší účinky, avšak podobnou či nižší protinádorovou účinnost. Některé z uvedených látek pak měly schopnost „obejít“ získanou rezistenci nádorových buněk k cisplatině, čímž by mohly být potenciálně užitečné při léčbě nádorů rezistentních k léčbě cisplatinou. U těchto látek byl pozorován také antimetastatický potenciál (Zeng *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2017).

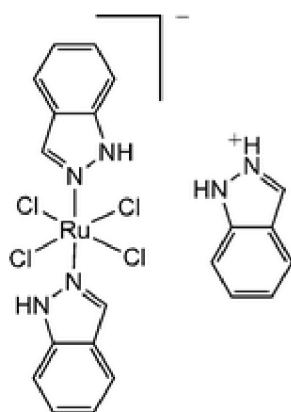
Komplex $[\text{ImH}]^+[\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO-S})\text{Im}]^-$ (Im = imidazol) označovaný jako NAMI-A (Obr. 8) byl původně považován za velmi nadějně rutheniové cytostatikum. Během testů na několika buněčných liniích se tento komplex NAMI-A jevil přibližně 1000krát méně cytotoxický, nežli cisplatina (Pluim *et al.*, 2004). Zajímavostí a možným budoucím benefitem této látky v protinádorové terapii měl být její antimetastatický účinek, který byl během testů mnohem výraznější při podání v nízkých dávkách ve srovnání s dávkami vyššími (Alessio & Messori, 2019). Výzkum, kterým se zabýval Sava *et al.*, (1992a) na myších se solidním metastazujícím karcinomem plic, prokázal, že NAMI-A se spíše podílel na snížení tvorby metastáz a tím i zpomalení průběhu nemoci, než že by zabraňoval růstu primárního nádoru. Podobné výsledky byly zaznamenány u melanomu B16 a MCa prsního karcinomu (Sava *et al.*, 1992a; Sava *et al.*, 1992b; Sava *et al.*, 1998). Nicméně výskyt velkého množství vedlejších účinků (nevolnost, zvracení, malátnost) doprovázejících podání této látky, zastavil další vývoj ve druhé fázi klinických testů. NAMI-A bylo při testování shledáno nedostatečně efektivním pro další použití (Leijen *et al.*, 2015; Shu *et al.*, 2019).

Dalším nadějným chemoterapeutikem se jevil $[\text{IndH}]^+[\text{trans-RuCl}_4(\text{Ind})_2]^-$ (Ind = indazol) označovaný jako komplex KP1019 (Obr. 9). Tento komplex je charakteristický výraznou cytotoxickou aktivitou vůči nádorovým buňkám *in vitro* a také primárním nádorům *in vivo*. Tímto se liší od NAMI-A, jehož cytotoxicita byla nízká v experimentech prováděných *in vivo*. KP1019 byl úspěšně testován při léčbě kolorektálního karcinomu u buněk rezistentních na cisplatinu v první fázi klinických testů. Nebyly zjištěny žádné znatelné vedlejší účinky, což byl rozdíl oproti NAMI-A. Na druhou stranu jeho nedostatečná rozpustnost ve vodě vedla k syntéze jeho sodné soli označované jako KP1339. Tato sůl je ve vodě velmi dobře rozpustná a tím umožňuje jednodušší výrobu

a aplikaci pacientům. Oba tyto komplexy by tak mohly být velmi slibnými cytostatiky pro použití k protinádorové léčbě (Trondl *et al.*, 2014).



Obr. 8: Chemická struktura NAMI-A (převzato z Jakupec *et al.*, 2008).



Obr. 9: Chemická struktura KP1019 (převzato z Jakupec *et al.*, 2008)

2.4.2 Ruthenaté komplexy

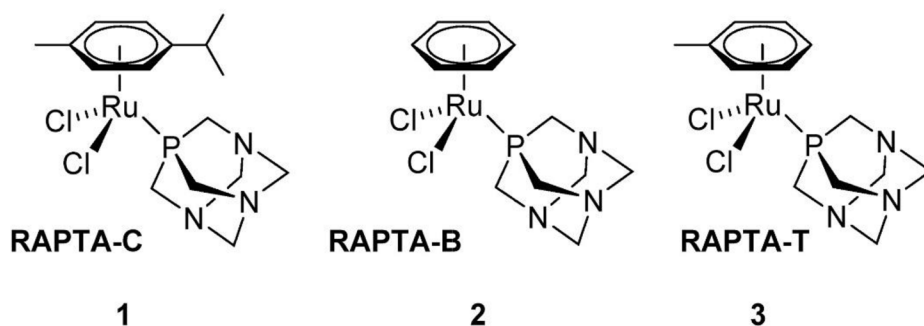
V posledních letech se do popředí dostávají organokovové sloučeniny ruthenia s oxidačním stavem (II) s přítomností η^6 -arenového ligandu. Arenový ligand se podílí na stabilizaci ruthenia (II). Tyto sloučeniny (obecný vzorec: $[\text{Ru}(\eta^6\text{-aren})(\text{en})\text{Cl}]^+$, kde *en* = ethylendiamin) jsou velmi přínosné z hlediska jejich jednoduché syntézy či strukturální variability. Bylo prokázáno, že vykazovaly jak významnou protinádorovou aktivitu *in vivo*, tak *in vitro*. Taktéž byly účinné u buněk rezistentních na cDDP (Morris *et al.*, 2001; Aird *et al.*, 2002).

Biologickým cílem těchto komplexů může být podobně jako u látek na bázi platiny jaderná DNA. Avšak princip vazby těchto látek na DNA je poněkud odlišný nežli např. u cDDP. Komplex Ru (II) s areny je hydrolyzován, kdy však odstupuje pravděpodobně jen jeden atom chloru a dochází k aquataci za vzniku: $[\text{Ru}(\eta^6\text{-aren})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, který se

může vázat na DNA. Konkrétně na atomy dusíku v poloze 7 (N7) heterocyklické báze guaninu za tvorby monofunkčních aduktů (Chen *et al.*, 2002; Habtemariam *et al.*, 2006). V rámci sloučenin Ru (II) s areny se dostala nejvíce do popředí rodina komplexů RAPTA (Obr. 10), která je charakteristická amfifilním ligandem PTA (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantan). Tento ligand se může podílet na zvýšené rozpustnosti sloučenin (Murray *et al.*, 2016).

Prvním zástupcem je $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymen})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ označovaný jako RAPTA-C. U něj byla zjištěna pozoruhodná antimetastatická a antiangiogenní aktivita, ačkoliv jeho cytotoxicita nebyla tak vysoká. Je schopen interagovat s velkým množstvím biologických cílů (kupříkladu proteiny jako katepsin B, cyklin D kináza). V rámci *in vivo* studie u myši s karcinomem prsu MCa bylo zjištěno, že sloučenina nebyla sice přímo účinná proti primárnímu nádoru, nicméně se významně podílela na snížení počtu a hmotnosti plicních metastáz, které pocházely z primárního nádoru. Tímto se potvrdilo, že sloučenina RAPTA se jeví jako velmi slibná, co se týká její antimetastatické aktivity (Mitra & Samuelson, 2014; Murray *et al.*, 2016).

Kromě RAPTA-C byla připravena sloučenina $[\text{Ru}(\eta^6\text{-toluen})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ označovaná jako RAPTA-T. U ní bylo zjištěno, že se velmi významně podílela na redukci tvorby metastáz u invazivní linie MDA-MB-231 a také na snížené migraci buněk přibližně o 50 %. Při testech prováděných *in vivo* na modelu myši s karcinomem prsu se tento výsledek potvrdil. U myši došlo ke 35% snížení hmotnosti plicních metastáz (Bergamo, 2008). Posledním slibným kandidátem s protinádorovou aktivitou se jevila sloučenina $[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzen})\text{Cl}_2(\text{pta})]$ označena jako RAPTA-B. Ta jevila velmi podobné výsledky jako sloučenina RAPTA-C při *in vivo* testech provedených na myši (Murray *et al.*, 2016). Slibná protinádorová aktivita, která se vyskytovala u všech těchto sloučenin by tak mohla v rámci klinických testů přinést nové možnosti pro léčbu rakoviny prsu. Závažným problémem těchto sloučenin však zůstává sklon k hydrolyze ještě před podáním pacientovi, které by zamezilo odštěpení chloridových ligandů, nikoliv pak v nádorových buňkách, kde je toto žádoucí. Dále také nutnost podání ve fyziologickém roztoku (Ang *et al.*, 2006).



Obr. 10: Chemické struktury ruthenatých komplexů – (1) RAPTA-C, (2) RAPTA-B, (3) RAPTA-T (převzato z Murray *et al.*, 2016).

V této diplomové práci byl zkoumán nový komplex ruthenia, konkrétně dichloro komplex ruthenia s ligandem 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitrilem, který v předchozích testech vykazoval velmi slibné výsledky při testování antiproliferativní aktivity na celém panelu lidských nádorových buněk (Schmitt *et al.*, 2018).

Naftopyrany jsou látky destabilizující mikrotubuly (MDA). Jejich účinek spočívá ve vazbě na tubulin, což přispívá k inhibici polymerace tubulinu a v konečném důsledku inhibici tvorby dělicího vřeténka. Tento postup vede k zastavení buněčného cyklu a indukci apoptózy. MDA se díky tomu jeví jako vysoce antiproliferativní látky. Schmitt *et al.*, (2018) se na základě těchto informací rozhodli provést syntézu ruthenatých sloučenin s areny nesoucími naftopyranové ligandy pro zjištění, zdali bude tento komplex vykazovat podobné vlastnosti, jako se jevíly u naftopyranů společně s vlastnostmi ruthenia s areny (vazba na DNA, antiangiogenní aktivita).

V této práci bude zkoumán vliv výše popsaného rutheniového komplexu na triple negativní buněčnou linii karcinomu prsu MDA-MB-231. Tato linie má velmi invazivní a agresivní fenotyp. Je odvozena od lidského adenokarcinomu prsu. Tato buněčná linie je adherentní a vyznačuje se absencí tří receptorů – ER, PR a HER2. V rámci 3D kultury se linie MDA-MB-231 vyznačuje tzv. hvězdicovitým charakterem, pro který je typické jeho přemostění do více buněčných kolonií (Kenny *et al.*, 2007; Foulkes & Reis-Filho, 2010).

Jak už bylo řečeno (*viz* kapitola 2.2.1), u tohoto typu karcinomu jsou způsoby léčby velmi omezené a mechanismy vzniku karcinomu zatím nejsou dostatečně popsány. V této době prozatím není dostupná přesně cílená léčba, i když v některých případech může být volba radiační terapie nebo chemoterapie s využitím cytostatik účinná (Dent *et al.*, 2009). Z důvodu nedostatku molekulárních cílů a špatné prognózy u pacientů, je důležité se

zaměřit na zlepšení a vývoj terapie pro tento typ rakoviny. Proto bylo také cílem této práce zaměřit se na linii odvozenou právě od takto agresivního typu karcinomu. Jelikož jedním z hlavních důvodů špatné prognózy u pacientů s triple negativním karcinomem prsu je vznik vzdálených metastáz, byl v rámci této diplomové práce zkoumán vliv dichloro komplexu ruthenia s ligandem 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitrilem jednak na proliferaci a především také na invazní aktivitu buněk triple negativní linie karcinomu prsu MDA-MB-231. Pro porovnání byly experimenty provedeny také s klinicky využívanou cisplatinou. Pro účely diplomové práce byl výše zmíněný komplex ruthenia označen jako komplex (1).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

- Buňky lidského triple negativního karcinomu prsu MDA-MB-231 (ATCC – American Type Culture Collection, USA)

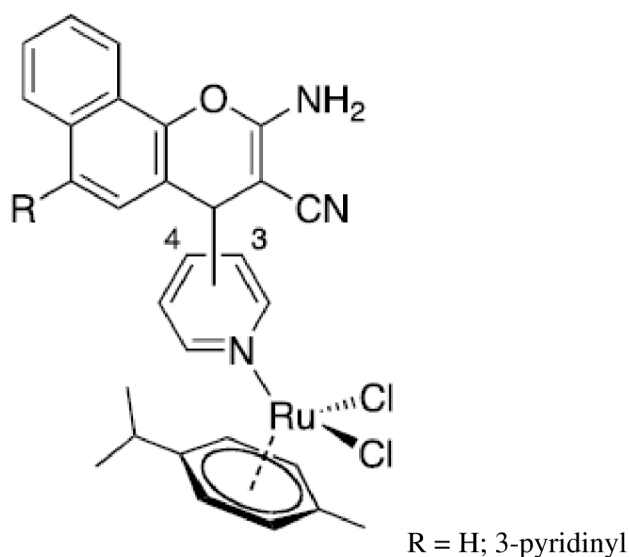
3.1.2 Chemikálie

- Antibiotika (ATB): směs Penicilinu a Streptomycinu (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Chlorid draselný (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Deionizovaná voda (dH₂O) byla použita k přípravě všech roztoků
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Dimethylformamid (DMF, Serva, Německo)
- Ethanol (Penta, Česká republika)
- Fetální hovězí sérum (FBS = Fetal Bovine Serum, Biosera, Francie)
- Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Hovězí sérový albumin (BSA = Bovine Serum Albumin, Takara, Japonsko)
- Hydrogenfosforečnan disodný (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Krystalová violet (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Kultivační médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biosera, Francie)
- Kyselina boritá (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Kyselina trichloroctová (TCA, Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Kyselina octová (Serva, Německo)
- Matrigel (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Neesenciální aminokyseliny (AMK, Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Neutrální červeň (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylfenazine hydrochlorid, Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Sulforhodamin B (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, Serva, Německo)

- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Trypsin/Kyselina ethylendiamintetraoctová (Trypsin/EDTA, Sigma-Aldrich, Česká republika)

3.1.3 Použité komplexy

- Cisplatina (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Rutheniový komplex (dichloro komplex ruthenia s ligandem 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitrilem) (Obr. 11). Tato látka byla pro testování poskytnuta prof. Schobertem, University of Bayreuth, Německo. Obě látky byly před použitím rozpuštěny v DMF a dále ředěny dle potřeby.



Obr. 11: Chemická struktura komplexu (1) – dichloro komplex ruthenia s ligandem 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitrilem.

3.1.4 Roztoky a kultivační média

- Kultivační médium DMEM: s 10 % (w/v) FBS, ATB (penicilin 10 U·ml⁻¹, streptomycin 10 µg·ml⁻¹), neesenciální AMK
- Krystalová violet 0.1% (w/v), pH 9: 200 mmol·l⁻¹ kyseliny borité (H₃BO₃), 20 mg krystalová violet, 2 % ethanol (EtOH)
- Médium s neutrální červení (1:100): 250 µl zásobní roztok neutrální červeně, 25 ml kultivační médium bez ATB, FBS
- Odbarvovací roztok neutrální červeně: 50 % ethanol (EtOH), 49 % deionizovaná voda (dH₂O), 1 % kyselina octová (CH₃COOH)

- Sulforhodamin B 0.4% (w/v): 400 mg sulforhodaminu B, 100 ml 1% kyseliny octové (CH_3COOH), uchovávat nejdéle 6 měsíců při teplotě 4 °C
- Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS) 10× pH 7.4: 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid sodný (NaCl), 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid draselný (KCl), 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrogenfosforečnan disodný (Na_2HPO_4), 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), pH fosfátového pufru bylo upraveno pomocí 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH na pH 7.4
- Zásobní roztok neutrální červeně: 40 mg neutrální červeně, 10 ml PBS 1×, uchovávat nejdéle 2 měsíce ve tmě při pokojové teplotě

3.2 Přístroje a software

- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Automatická počítačka buněk TC-20 (Bio-Rad Laboratories, USA)
- CO_2 inkubátor: model MCO-18AC-PE (Panasonic Biomedical, Japonsko)
- Digestoř Forlab (Block, Česká republika)
- GraphPad Prism4 (GraphPad Prism Software, USA)
- Invertovaný mikroskop NIB-100 (MIKRO, Česká republika)
- ImageJ (USA)
- Laminární box SafeFAST Classic 212 (Faster, Itálie)
- Magnetická míchačka RCT basic (IKA®, Německo)
- Multifunkční modulární reader SPARK Tecan (Schoeller, Česká republika)
- pH metr (Boeco, Německo)
- Třepačka Universal Orbital Shaker OS-20 (Boeco, Německo)
- Vodní lázeň SB-12L shaking water bath (Benchmark Scientific, USA)
- Výrobník dH_2O Smart2Pure (Thermo Scientific™, USA)
- Microsoft Excel (Microsoft, USA)

3.3 Metody

3.3.1 Kultivace nádorových buněk

První metoda, kterou bylo nezbytné si osvojit pro zahájení experimentální práce, byla kultivace nádorových buněk. Prvním krokem bylo rozmražení 1 ml buněčné linie MDA-MB-231 (buňky uloženy v tekutém dusíku) dle standartního protokolu. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM s přidavkem 10 % tepelně inaktivovaného fetálního

hovězího séra (před přidáním do média bylo toto sérum přefiltrováno přes filtr s velikostí pórů 0.22 μm), neesenciálních aminokyselin a antibiotik (penicilin a streptomycin) při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Buňky byly pravidelně kontrolovány pod mikroskopem a po dosažení konfluence (zhruba 2krát týdně) pasážovány s využitím roztoku trypsin/EDTA.

Pasážování bylo provedeno dle standartního protokolu:

Buňky byly zkontrolovány s využitím invertovaného mikroskopu (NIB-100). Z kultivační láhve bylo odebráno veškeré médium. Buňky byly opatrně opláchnuty 5 ml PBS 1 \times . Po oplachu byl přidán 1 ml roztoku trypsin/EDTA. Buňky byly drženy za kultivačních podmínek až do jejich oddělení od povrchu kultivační láhve (cca 3 min), což bylo ověřeno pomocí mikroskopu. Buňky byly následně resuspendovány v plnohodnotném kultivačním médiu, spočítány s využitím automatické počítačky a sazeny na novou kultivační láhev T-75 v počtu $1,5 \times 10^6$ buněk v 11 ml kultivačního média, případně použity pro experimenty.

Proto, aby bylo možné nasadit přesný počet buněk do kultivačních nádob, bylo třeba před provedením každého experimentu spočítat buňky. Pro počítání buněk bylo využito barvivo trypanová modř, které umožňuje stanovit životaschopnost buněk, tzv. viabilitu. Tento postup je založen na integritě cytoplazmatické membrány. Ta by měla být u živých buněk neporušená, a naopak u mrtvých buněk narušená. V případě neporušené cytoplazmatické membrány u živých buněk barvivo nedifunduje do buňky. Za situace, kdy by barvivo proniklo do intracelulárního prostoru, jsou živé buňky schopny barvivo rychle transportovat ven. Při vizualizaci jsou pozorovány jako bezbarvé. Naopak mrtvé buňky, které mají cytoplazmatickou membránu narušenou, se jeví při vizualizaci jako modré (Kim *et al.*, 2016).

K počítání buněk byla využita automatická počítačka, do které bylo vloženo speciální sklíčko. Na toto sklíčko byla napipetována obarvená buněčná suspenze (10 μl buněčná suspenze + 10 μl trypanová modř). S využitím automatické počítačky byl detekován celkový počet buněk, z něhož bylo získáno procentuální zastoupení počtu živých buněk na základě analýzy obrazu.

3.3.2 Test antiproliferativní aktivity

Pro stanovení antiproliferativní aktivity komplexu (1) a cDDP na linii MDA-MB-231 byly buňky sazeny do 96-jamkové kultivační destičky v počtu 10 000 buněk na jamku v destičce ve 100 μl kultivačního média. Buňky byly drženy za kultivačních podmínek

(37 °C, 5% CO₂) za tmy v kultivačním inkubátoru po dobu 24 hodin. Poté byly buňky ošetřeny cisplatinou v rozsahu koncentrací 80 μmol·l⁻¹ – 0.78 μmol·l⁻¹ a dále komplexem (1), jehož rozsah koncentrací byl 30 μmol·l⁻¹ – 3.75 μmol·l⁻¹. Zásobní roztoky testovaných komplexů byly připraveny rozpuštěním těchto látek v DMF a dále ředěny kultivačním médiem dle potřeby. Koncentrace DMF nepřesáhla hodnotu 0.2 %, aby neovlivňovala životaschopnost použitých buněk. Po ošetření buněk zvolenými komplexy, byly buňky inkubovány po dobu 72 hodin při 37 °C a v 5% atmosféře oxidu uhličitého.

Antiproliferativní aktivita zvolených komplexů byla stanovena po 72 hodinách od ošetření s využitím kolorimetrického testu s neutrální červení. Toto barvivo umožňuje rozlišit živé buňky od mrtvých na základě toho, že je schopno proniknout pasivní difuzí do živých buněk, kde se ukládá do organel zvaných lysozomy. Zde se váže na fosfátové skupiny lysozomální matrix (Repetto *et al.*, 2008).

Nejprve bylo připraveno médium s neutrální červení o koncentraci 40 μg·ml⁻¹, které bylo získáno naředěním zásobního roztoku neutrální červeně kultivačním médiem DMEM (bez obsahu FBS, ATB a neesenciálních AMK). Médium bylo přefiltrováno přes filtr s velikostí pórů 0.45 μm. Kultivační médium s obsahem testovaných látek bylo z 96-jamkové kultivační destičky odstraněno a buňky opláchnuty 100 μl PBS 1× na každou jamku v panelu. Do každé jamky s buňkami bylo napipetováno 100 μl média s neutrální červení a buňky byly inkubovány po dobu 2 hodin. Následně bylo z kultivační destičky odstraněno médium s barvivem a buňky byly promyty 150 μl PBS 1× na každou jamku. Poté následovalo přidání 150 μl odbarvovacího roztoku do každé jamky. Destička byla třepána po dobu 10 minut při 150 rpm.

Posledním krokem bylo změření absorbance spektrofotometricky v každé jamce kultivační destičky při vlnové délce 540 nm. Po zjištění naměřených hodnot absorbance byla určena antiproliferativní aktivita pro testované komplexy. V programu Microsoft Excel byla zhotovena tabulka, ve které byly spočteny průměry hodnot absorbance, které odpovídaly jednotlivým koncentracím zvolených komplexů. Dále byl využit program GraphPad Prism4, ve kterém byly zjištěny hodnoty IC₅₀ (The Half Maximal Inhibitory Concentration, tedy hodnoty koncentrací cisplatinu nebo komplexu (1), při kterých přežije 50 % buněk), na základě grafické závislosti viability buněk [%] na koncentraci testované látky [μmol·l⁻¹]. S využitím programu Microsoft Excel byly vypočteny aritmetické průměry a směrodatné odchylky hodnot IC₅₀ obou testovaných látek.

3.3.3 Test zacelování rýhy

Zacelování rýhy (tzv. wound-healing esej) je běžně využívaná jednoduchá metoda k zjištění schopnosti a rychlosti migrace buněk *in vitro*. Jelikož je migrace nezbytnou součástí metastázování nádorových buněk, je tento test využíván také ke studiu účinnosti protinádorových léků na migrační aktivitu vybraných buněk (Kovaříková *et al.*, 2014).

Vlastní test zahrnuje několik kroků. Prvním a nezbytným krokem je nasazení buněk na kultivační misku a jejich kultivace k dosažení konfluentní monovrstvy. Po tomto kroku následuje vytvoření rýhy (rány) v buněčné monovrstvě např. špičkou pipety. Následuje ošetření buněk testovanými látkami. Nádorové buňky mají tendenci migrovat ke středu rýhy (musí být zvolena vhodná linie, právě např. MDA-MB-231 buňky), aby ji zacelily. Některé látky jsou však schopny ovlivnit tyto migrační vlastnosti. Posledním krokem je pořízení fotografií buněk před začátkem experimentu a dále v různých časových intervalech během kultivace. Experiment je zakončen vyhodnocením snímků a určením „úspěšnosti“ migrace buněk kontrolních a dále ošetřených vybranými komplexy (Rodriguez *et al.*, 2005; Grada *et al.*, 2017).

Buňky byly sazeny v počtu 2 500 000 buněk na 6 cm Petriho misky ve 4 ml kultivačního média. Byly kultivovány po dobu 24 hodin v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Po zkontrolování přisedlých buněk pod mikroskopem bylo odpipetováno původní médium a buňky byly opláchnuty PBS 1×. Po opláchnutí bylo do každé Petriho misky připipetováno 4 ml média DMEM s 1% FBS. Buňky byly kultivovány 24 hodin v inkubátoru.

Po 24 hodinách byla vytvořena pomocí plastové špičky (200 µl) od automatické pipety „rýha“ v monovrstvě buněk. Původní médium bylo odpipetováno a došlo dvakrát k oplachu buněk pomocí PBS 1×. K buňkám byly připipetovány 4 ml kultivačního média s testovanými látkami (cDDP, komplex (1)) o koncentraci odpovídající 65 % jejich IC₅₀ po 72 hodinách (koncentrace pro cDDP 34.151 µmol·l⁻¹, koncentrace pro komplex (1) 14.245 µmol·l⁻¹). Jedna Petriho miska byla vybrána jako kontrola, tudíž k ní byly napipetovány jen 4 ml kultivačního média (bez testovaných látek). S využitím fotoaparátu připojeného k invertovanému mikroskopu byly pořízeny fotografie všech vzorků. Poté byly misky ponechány v inkubátoru dalších 24 hodin. Po této době došlo opět k vyfotografování, a to samé bylo provedeno i po 48 hodinách od vytvoření rýhy. Na základě pořízených fotografií byly v programu ImageJ stanoveny plochy rýh všech vzorků. V programu GraphPad Prism4 byly získané hodnoty ploch rýh normalizovány

k hodnotám získaným v čase 0 hodin, který představuje 100% nezacelenou plochu rýhy. Následně byl proveden t-test, jehož účelem bylo určit, zda se výsledky měření pro zvolené látky statisticky významně liší od kontroly či vzájemně mezi použitými látkami.

3.3.4 Re-adhezní test

Pro studium schopnosti buněk ošetřených testovanými látkami přisedat na kultivační povrch byl využit re-adhezní test. Tato esej umožňuje testovat, zda jsou buňky po oddělení schopny znovu přilnout k povrchu kultivační nádoby. V této části práce byla testována schopnost cDDP a komplexu (1) ovlivnit adhezní vlastnosti buněk MDA-MB-231 *in vitro*. Re-adhezní test byl proveden s využitím barvení re-adherovaných buněk sulforhodaminem B (Novohradský *et al.*, 2015).

Buňky byly sazeny v počtu 1 500 000 buněk na 6 cm Petriho misky ve 4 ml kultivačního média DMEM a byly kultivovány po dobu 48 hodin při 37 °C a 5% CO₂. Po uplynutí 48 hodin bylo z Petriho misek odpipetováno původní médium a buňky byly opláchnuty PBS 1×. Po opláchnutí bylo do každé Petriho misky napipetováno médium DMEM s 0.1 % BSA. Buňky byly drženy v inkubátoru po dobu 24 hodin.

Poté byly buňky ošetřeny testovanými komplexy (cDDP, komplex (1)) o koncentracích rovných čtyřnásobku jejich IC₅₀ po 72 hodinách. Po ošetření byly buňky umístěny na 2 hodiny do inkubátoru. Po 2 hodinách bylo z Petriho misek odpipetováno původní médium a buňky byly opláchnuty PBS 1×. Do každé kultivační misky byly připipetovány 2 ml kultivačního média s přidavkem 0.1% BSA. Buňky byly opatrně odděleny od kultivačního povrchu pomocí speciální škrabky a ponechány ve formě suspenze po dobu 20 minut pro rekonstituci receptorů na jejich povrchu. Dalším krokem bylo sazení buněk na 96-jamkovou kultivační destičku v počtu 30 000 buněk na jamku ve 100 μl plnohodnotného média, čemuž předcházelo jejich spočítání na automatické počítače. Buňky byly drženy v inkubátoru po dobu 30 minut při 37 °C a 5% CO₂. Poté byly re-adherované buňky barveny sulforhodaminem B.

Na základě barvení sulforhodaminem B (SRB) lze stanovit celkový obsah proteinů v buňkách adherentních i suspenzních kultur. Princip tohoto testu je založen na schopnosti sulforhodaminu B vytvořit elektrostatické vazby s proteinovými aminokyselinovými zbytky kyseliny trichloroctové (TCA) fixovaných buněk. Vazba je ovlivněna pH. Při mírně kyselém pH se barvivo váže na protein fixovaných buněk, čímž je umožněno stanovení obsahu proteinů. Při mírně zásaditém pH je barvivo naopak odstraňováno ven z buněk (Skehan *et al.*, 1990; Vichai & Kirtikara, 2006). Barvení SRB

našlo své uplatnění například při testování toxicity látek. V tomto případě bylo barvení využito ke stanovení množství re-adherovaných buněk.

Při barvení sulforhodaminem B byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem a z kultivační destičky bylo opatrně vyklepnuto původní médium. Buňky byly propláchnuty PBS 1×. Do každé jamky bylo připipetováno 100 µl 10% kyseliny trichloroctové. Buňky byly ponechány v lednici při teplotě 4 °C po dobu 1 hodiny, aby došlo k jejich fixaci. Po uplynutí 1 hodiny byla z destičky opatrně vyklepnuta kyselina trichloroctová a došlo třikrát k opláchnutí vzorků deionizovanou vodou. Destička byla poté ponechána pro její usušení po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po 15 minutách bylo do každé jamky napipetováno 100 µl sulforhodaminového barviva a buňky byly barveny po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

Po uplynutí 30 minut bylo sulforhodaminové barvivo opatrně vyklepnuto a vzorky byly třikrát propláchnuty 1% kyselinou octovou. Poté, co byla kyselina octová odpařena, bylo do každé jamky napipetováno 100 µl 10 mmol·l⁻¹ Tris. Destička byla umístěna na třepačku při 120 rpm na 5 minut. Po rozpuštění barviva byla spektrofotometricky zjištěna intenzita zbarvení roztoku v jednotlivých jamkách destičky měřením absorbance při vlnové délce světla 570 nm. Množství navázaného sulforhodaminu B je úměrné celkovému množství buněčných proteinů. S vyšší absorbancí byl detekován i vyšší počet re-adherovaných buněk. S pomocí zjištěných hodnot absorbance byla stanovena schopnost re-adheze buněk ošetřených zvolenými komplexy.

K vyhodnocení výsledků sulforhodaminového testu byl zvolen program GraphPad Prism4, v němž byly hodnoty testovaných látek vztaženy ke kontrole, která představuje 100 % re-adherovaných buněk. Byl proveden také t-test, jehož účelem bylo porovnání, zda se výsledky měření statisticky významně liší mezi použitými látkami.

3.3.5 Invazní test

Invazní test je metoda, pomocí které lze stanovit motilitu a invazivitu nádorových buněk. Nezbytnou součástí tohoto testu je vícejamková destička s inzerty, které jsou odděleny mikroporézní membránou. V samotném inzertu jsou buňky umístěné v živném médiu. V jamce destičky se pak nachází médium s obsahem chemoatraktantu. Mezi nimi je již zmíněná membrána, která představuje fyzikální bariéru, jíž jsou schopny buňky překonat jen aktivní migrací. Pokrytí membrány je různé, nejčastěji se volí matrice jako kolagen nebo matrigel, které jsou svým složením blízké extracelulární matrix (ECM). Během buněčné invaze dochází k interakci nádorových buněk s komponentami ECM

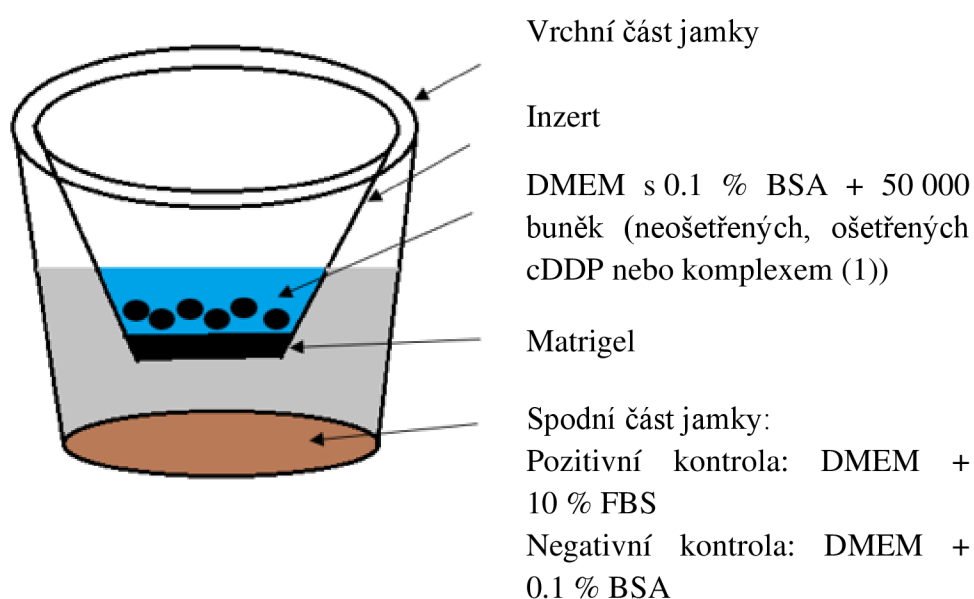
a proteolytické degradaci složek ECM. Buňky se nakonec vizualizují např. krystalovou violetí a buněčná migrace je vyhodnocena jako podíl buněk, které prošly membránou z celkového počtu všech buněk (Kovaříková *et al.*, 2014).

Příprava inzertů pro experiment byla následující: K inzertům vloženým v destičce bylo napipetováno médium DMEM smíchané s matrigelem dle pokynů výrobce. Inzerty byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin pro polymeraci gelu. K inzertům s matrigelem bylo napipetováno 100 μ l čistého média DMEM a inzerty byly třepány po dobu 90 minut při 70 rpm. Následně bylo odsáto médium DMEM a inzerty byly promyty médiem DMEM k odstranění rekonstituovaného matrigelu. Takto připravené inzerty byly ihned použity pro experiment.

Buňky byly sazeny v počtu 500 000 buněk na 4 cm Petriho misky v 1 ml kultivačního média DMEM s přídavkem ATB, 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin. Buňky byly kultivovány po dobu 48 hodin při 37 °C a 5% CO₂. Následně bylo z Petriho misek odpipetováno původní médium. Poté byly buňky opláchnuty PBS 1 \times a k buňkám bylo napipetováno médium DMEM s 0.1 % BSA. Buňky byly drženy v inkubátoru 24 hodin za kultivačních podmínek. Buňky byly ošetřeny vybranými komplexy (cDDP, komplex (1)) o koncentracích rovných čtyřnásobku jejich IC₅₀ a inkubovány po dobu 60 minut.

Z Petriho misek ošetřených danými komplexy bylo odebráno původní médium a byl proveden oplach PBS 1 \times . Buňky byly seškrábány, resuspendovány v médiu DMEM s 0.1 % BSA a spočítány. Buňky byly sazeny na inzerty připravené dle postupu popsaného výše v počtu 50 000 buněk na inzert v 200 μ l média DMEM s 0.1 % BSA dle Obr. 12. Buňky byly inkubovány po dobu 96 hodin při 37 °C v 5% atmosféře CO₂.

Po uplynutí 96 hodin bylo médium DMEM z inzertů odsáto a jednotlivé jamky společně s inzerty byly vysušeny. Buňky byly fixovány pomocí glutaraldehydu po dobu 15 minut za stálého třepání při 70 rpm. Potom byl odstraněn glutaraldehyd a inzerty byly vysušeny. Dále byly inzerty třikrát propláchnuty destilovanou vodou a usušeny volně na vzduchu při laboratorní teplotě.



Obr. 12: Schématické znázornění uspořádání invazního testu. Inzert s buňkami je umístěn v jamce panelu naplněné atraktantem (médiem s 10 % FBS) či médiem s 0.1 % BSA v případě negativní kontroly.

Po usušení byly buňky na membránách inzertů barveny pomocí krystalové violeti. Destička s barvivem obsahující inzerty byla umístěna na 20 minut na třepačku. Následoval oplach vzorků třikrát destilovanou vodou a inzerty byly vysušeny. Po vysušení byly membrány z inzertů vyříznuty pomocí skalpelu a umístěny do čistých jamek desky, do kterých bylo napipetováno 500 μ l 10% kyseliny octové. Vzorky byly třepány po dobu 15 minut při 70 rpm. Poté byla změřena absorbance při 570 nm.

K vyhodnocení výsledků invazního testu byl zvolen program GraphPad Prism4. Hodnoty absorbance získané pro vzorky ošetřené testovanými komplexy byly vztaženy ke kontrole, která představuje 100 % invadovaných buněk. Byl proveden také t-test, jehož účelem bylo porovnání, zdali se výsledky měření statisticky významně liší.

4 VÝSLEDKY

Vývoj účinné a cílené léčby triple negativního karcinomu prsu je stále aktuálním tématem, kterým se zabývá mnoho vědců. Důležité poznatky v tomto směru přináší také základní výzkum. Pro TNBC je charakteristická tvorba vzdálených metastáz v různých orgánech, která je spojena se špatnou prognózou. Vývoj nových léčiv proti TNBC se ubírá různými směry a jedním z možných východisek by mohlo být právě využití již zmíněných komplexů ruthenia.

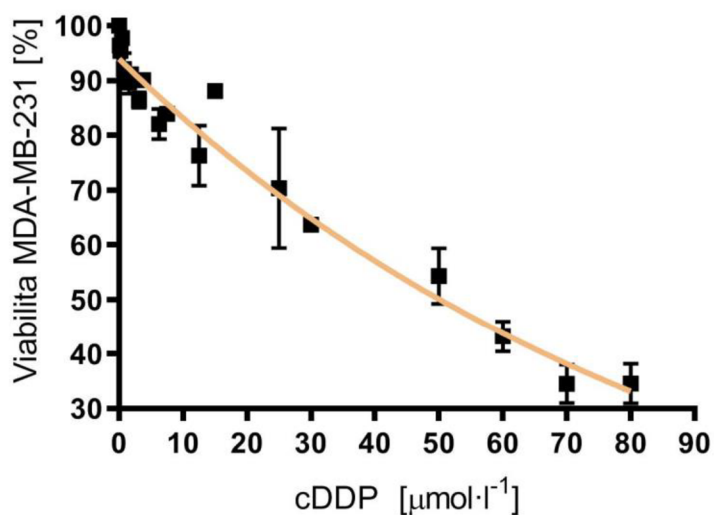
V rámci předkládané diplomové práce byl v Laboratoři molekulární biofyziky a farmakologie, KBF, UPOL zkoumán vliv dichloro komplexu ruthenia s ligandem 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitrilem na invazivitu a adhezi buněk triple negativního karcinomu prsu MDA-MB-231. Pro srovnání byly všechny experimenty provedeny také s klinicky využívanou cisplatinou. K stanovení vlivu obou zmíněných komplexů na buněčnou linii karcinomu prsu bylo provedeno několik testů. Konkrétně byla stanovena antiproliferativní aktivita nového komplexu ruthenia (komplex 1) a cisplatin. Dále byla zkoumána migrační aktivita buněk (test zacelování rýhy) po ošetření danými látkami. Taktéž byla stanovena re-adhezní aktivita (schopnost znovu přilnout ke kultivačnímu povrchu) nádorových buněk po ošetření danými komplexy. Posledním experimentem bylo stanovení invazivity nádorových buněk. Stanovení antiproliferativní a re-adhezní aktivity bylo spojeno také s využitím běžných kolorimetrických testů (barvení neutrální červení a sulforhodaminem B). Postupy práce pro tyto testy jsou popsány v kapitole Metody. Výsledky této práce jsou shrnuty v následujících kapitolách.

4.1 Antiproliferativní aktivita

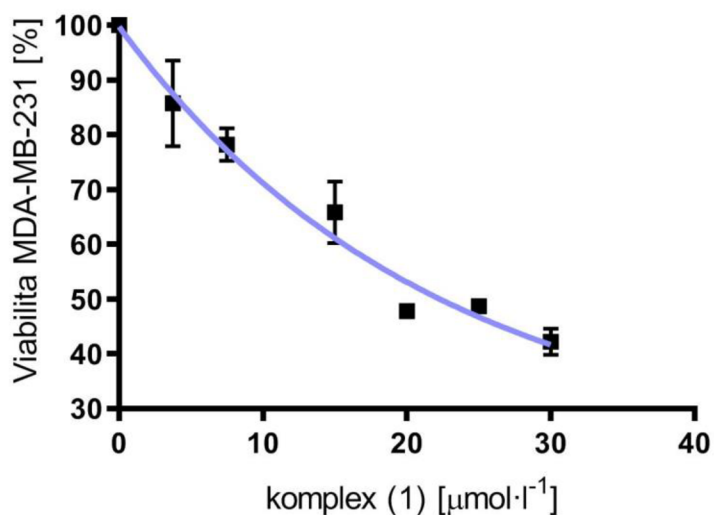
Prvním experimentem praktické části práce bylo stanovení antiproliferativní aktivity komplexu (1) a cisplatin s využitím barvení neutrální červení. Zvolený test je založen na schopnosti živých buněk vázat neutrální červeň do lysozomů (barvivo proniká do živých buněk pasivní difuzí). Díky tomu je umožněno srovnat vliv různých koncentrací zvolených látek na jimi ošetřené buňky a stanovit viabilitu buněk v závislosti na koncentraci komplexu.

Aby bylo možné zjistit, která z vybraných látek dosahuje lepší antiproliferativní aktivity na nádorové buňky, bylo nutné buňky ošetřit zvolenými komplexy o řadě různých koncentrací (viz kapitola 3.3.2). Nejvyšší koncentrace pro cDDP činila

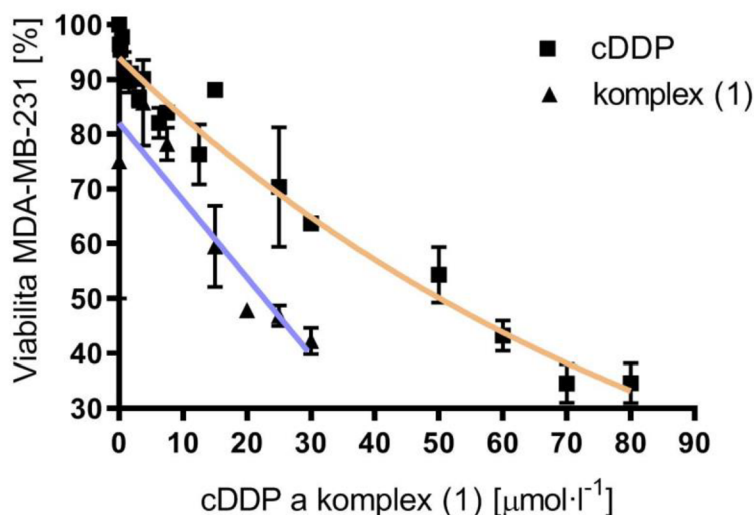
$80 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, naopak pro komplex (1) byla stanovena nejvyšší koncentrace $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po ošetření danými komplexy byly buňky drženy v inkubátoru po dobu 72 hodin a následně byla stanovena antiproliferativní aktivita. První graf (Obr. 13) znázorňuje vliv cDDP na viabilitu (% živých buněk) MDA-MB-231. Druhý graf (Obr. 14) znázorňuje vliv komplexu (1) na tuto linii. Třetí graf (Obr. 15) je pak porovnáním výsledků z předchozích dvou grafů pro obě testované látky.



Obr. 13: Graf znázorňující viabilitu buněk MDA-MB-231 v závislosti na koncentraci cDDP. Data představují průměr ze tří nezávislých měření provedených v kvadruplikátu a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.



Obr. 14: Graf znázorňující viabilitu buněk MDA-MB-231 v závislosti na koncentraci komplexu (1). Data představují průměr ze tří nezávislých měření provedených v kvadruplikátu a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.



Obr. 15: Graf znázorňující viabilitu buněk MDA-MB-231 v závislosti na koncentraci cDDP a komplexu (1). Data představují průměr ze tří nezávislých měření provedených v kvadruplikátu a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.

Tab. 1: Hodnoty IC_{50} pro cisplatinu a komplex (1) na linii buněk MDA-MB-231 při ošetření danými látkami po dobu 72 hodin.

| Testovaný komplex | Hodnota IC_{50} |
|-------------------|--|
| cDDP | $52.541 \pm 1.385 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| Komplex (1) | $21.916 \pm 3.141 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ |

S využitím programu GraphPad Prism4 byly na základě grafické závislosti viability buněk [%] na koncentraci testované látky získány hodnoty IC_{50} testovaných látek (Tab. 1). S pomocí Excelu byly zjištěny aritmetické průměry a směrodatné odchylky pro každou testovanou látku.

Na základě výše uvedených grafů a tabulky se zaznamenanou hodnotou IC_{50} bylo zjištěno, že komplex (1) vykazuje na testované linii zhruba 2.4x vyšší antiproliferativní aktivitu v porovnání s cisplatinou a je tedy slibným kandidátem pro další testování.

4.2 Antimigrační aktivita

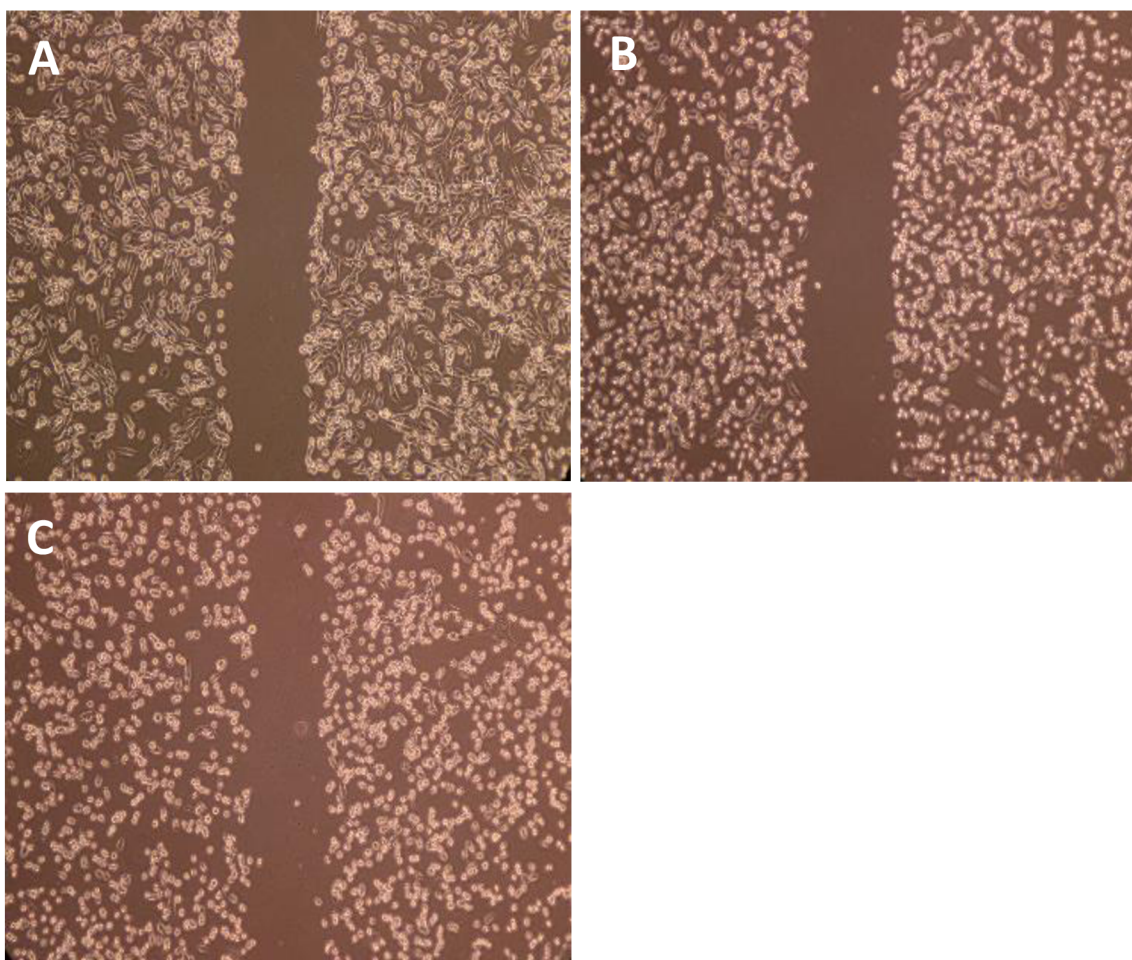
Jak již bylo zmíněno výše v této práci, hlavním problémem při léčbě pacientek s TNBC je často tvorba vzdálených metastáz v různých orgánech. Další experimenty byly tedy zaměřeny na stanovení vlivu zvolených sloučenin na vlastnosti nádorových buněk spojené s metastazováním. Druhou metodou, která byla v experimentální části zvolena, byl test zacelování rýhy (wound-healing esej). Tato metoda byla vybrána, protože umožňuje vcelku jednoduše zachytit migraci buněk, která je typická právě pro

metastazující linii MDA-MB-231 a také vliv vybraných látek na tuto migrační aktivitu buněk. Již zmíněná rýha se v kultuře buněk může vytvořit několika způsoby. V této práci byla k danému účelu využita špička z automatické pipety.

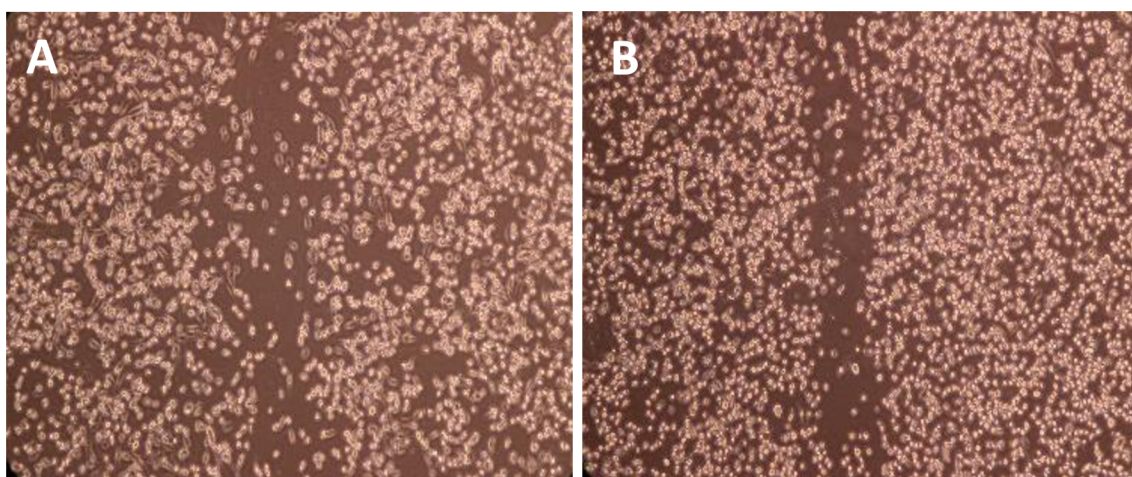
Metoda umožňuje sledovat migraci buněk po ošetření danými látkami v pravidelných časových intervalech díky možnosti vizualizace buněk pomocí mikroskopu s připojeným fotoaparátém pro případný záznam. Konkrétně při experimentech v této práci byly komplexy ošetřené buňky fotografovány v čase 0, 24 a 48 hodin od ošetření.

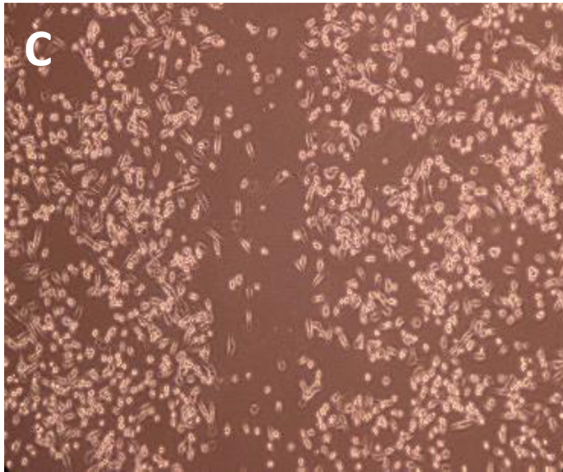
Výsledky testu zacelování rýhy jsou zobrazeny na reprezentativních fotografiích (Obr. 16–18). Při každém pokusu bylo použito stejné zvětšení mikroskopu, a to 200x. Obrázky 16 (A), (B), (C) zachycují kulturu buněk MDA-MB-231 vyfotografovanou ihned po ošetření zvolenými látkami. Obrázky 17 (A), (B), (C) zobrazují kulturu buněk MDA-MB-231 vyfotografovanou 24 hodin od ošetření. Obrázky 18 (A), (B), (C) zachycují kulturu buněk MDA-MB-231 vyfotografovanou 48 hodin od ošetření.

V případě obrázků 16 (A), (B), (C), které byly pořízeny ihned po ošetření testovanými látkami, nejsou téměř žádné rozdíly mezi neošetřenými a ošetřenými vzorky. U obrázků, které byly pořízeny 24 hodin po ošetření vybranými látkami, jsou patrné jisté odlišnosti. V případě neošetřené kontrolní kultury buněk MDA-MB-231 (Obr. 17A) byla již po 24 hodinách kultivace jasně vidět snaha buněk zacelit vytvořenou rýhu. Jejich migrace nebyla ničím ovlivněna, a proto buňky zacelovaly rýhu nejsnáze. U buněk, které byly ošetřeny cisplatinou (Obr. 17B) byla taktéž vidět schopnost buněk migrovat k rýze a zacelit ji. Dalo by se říct, že ačkoliv byly buňky ošetřeny cisplatinou, tak se jejich schopnost zacelit rýhu vcelku podobala schopnosti buněk, které ošetřené nebyly. U buněk ošetřených komplexem (1) (Obr. 17C) byl vidět nejmarkantnější rozdíl z těchto tří srovnání. V daných vzorcích byla po ošetření zvoleným komplexem nejvíce vidět schopnost ovlivňovat migraci buněk a tím tak bránit v zacelování rýhy. U obrázků, které byly pořízeny 48 hodin po ošetření vybranými látkami, byly vidět největší rozdíly. U neošetřených buněk (Obr. 18A) a buněk ošetřených cisplatinou (Obr. 18B) byla vidět plně „zarostlá“ rýha. Lze říct, že schopnost ovlivňovat migraci buněk nebyla v případě ošetření cisplatinou téměř zaznamenána či byla velmi slabá. Naopak v případě buněk ošetřených komplexem (1) (Obr. 18C) byla migrační aktivita buněk velmi silně postižena. Rýha zůstala nezacelena. Komplex (1) tedy dosáhl lepší antimigrační aktivity než cDDP, u které došlo po 48 hodinách téměř k úplnému zacelení rýhy.



Obr. 16: Kultury buněk MDA-MB-231 vyfotografované ihned po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 200x. (A) Neošetřená kultura buněk MDA-MB-231. (B) Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená cDDP. (C) Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (1). Buňky byly ošetřeny testovanými komplexy o koncentracích jejich 65 % IC_{50} .



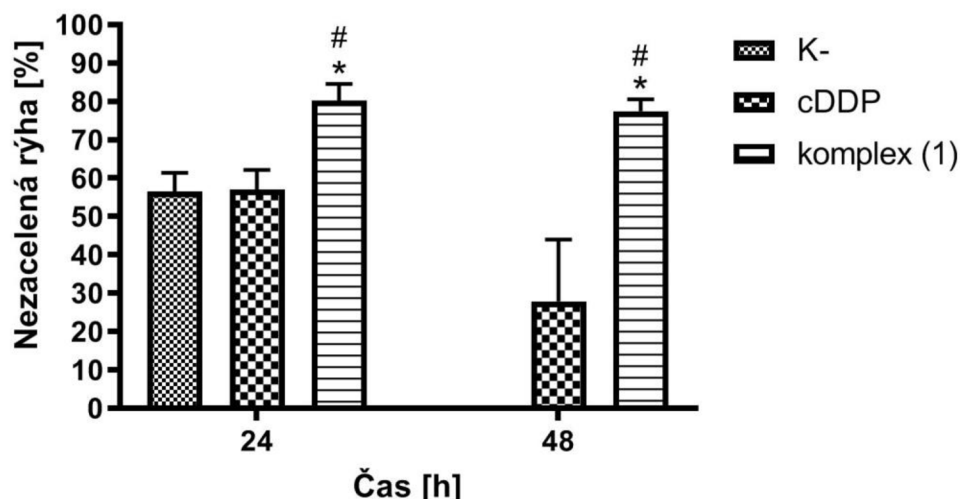


Obr. 17: Kultury buněk MDA-MB-231 vyfotografované 24 hodin po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 200x. (A) Neošetřená kultura buněk MDA-MB-231. (B) Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená cDDP. (C) Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (1). Buňky byly ošetřeny testovanými komplexy o koncentracích jejich 65 % IC₅₀.



Obr. 18: Kultury buněk MDA-MB-231 vyfotografované 48 hodin po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 200x. (A) Neošetřená kultura buněk MDA-MB-231. (B) Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená cDDP. (C) Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (1). Buňky byly ošetřeny testovanými komplexy o koncentracích jejich 65 % IC₅₀.

Výsledky testování vlivu zvolených látek na migrační aktivitu buněk MDA-MB-231 byly zaznamenány do grafu (Obr. 19). Ten zobrazuje schopnost buněk nezacelit rýhu po 24 a 48 hodinách od ošetření testovanými látkami vyjádřenou v [%] (vztaženo k migrační aktivitě neošetřených kontrolních buněk v čase 0 hodin, která představuje 100% nezacelenou plochu rýhy). U vzorků vyfotografovaných 24 hodin po ošetření buněk cisplatinou bylo zjištěno, že vytvořená rýha nebyla buňkami zacelena přibližně z 57 % (vztaženo k ploše rýhy v čase 0 hodin). Tento výsledek byl podobný výsledkům získaným u kontrolních buněk po 24 hodinách, kde rýha nebyla buňkami zacelena také přibližně z 57 % (vztaženo k ploše rýhy v čase 0 hodin). Při srovnání výsledků u buněk ošetřených cisplatinou po 24 hodinách s plochou rýhy buněk ošetřených cisplatinou po 48 hodinách, vytvořená rýha nebyla buňkami zacelena zhruba z 28 % (vztaženo k ploše rýhy v čase 0 hodin). Získané hodnoty pro jednotlivá opakování se však poměrně lišily, někde došlo k úplnému zacelení rýhy. Široké rozpětí u jednotlivých opakování pro tento typ ošetření představuje také velká chybová úsečka v grafu (Obr. 19) pro ošetření cDDP a vzorek vyfotografovaný 48 hodin po vytvoření rýhy. U kontrolních buněk došlo po 48 hodinách k úplnému zacelení plochy rýhy. U buněk ošetřených komplexem (1), které byly vyfotografované 24 hodin po ošetření bylo zjištěno, že vytvořená rýha nebyla buňkami zacelena přibližně z 80 % (vztaženo k ploše rýhy v čase 0 hodin). 48 hodin po ošetření buněk vytvořená rýha nebyla buňkami zacelena zhruba z 77 % (vztaženo k ploše rýhy v čase 0 hodin). Při porovnání výsledků nezacelené plochy rýhy buňkami ošetřenými cisplatinou a komplexem (1) bylo možné zejména po 48 hodinách detekovat kvantitativní rozdíl z hlediska procentuálního zastoupení nezacelené plochy rýhy, ten byl u buněk ošetřených komplexem (1) přibližně o 50 % větší než u cisplatin. Komplex (1) se na základě těchto výsledků jeví jako potencionálně účinný z hlediska antimigrační aktivity, která byla zaznamenána a byla přibližně 2.8x větší než u cisplatin. Získaná data byla také podrobena t-testu, který byl zvolen s úmyslem zjistit, zdali je mezi vybranými látkami (cDDP a komplex (1)) statisticky významný rozdíl v účinnosti na migrační aktivitu buněk. Bylo zjištěno, že rozdíly ve výsledcích mezi cisplatinou a komplexem (1) jsou signifikantní ($P < 0.05$). Při porovnání mezi vybranými látkami a kontrolou byl taktéž zaznamenán signifikantní rozdíl ($P < 0.05$).



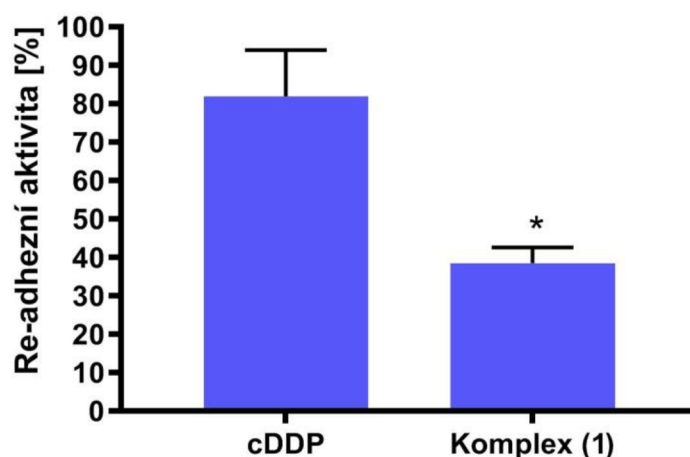
Obr. 19: Graf vyjadřující schopnost buněk MDA-MB-231 nezacelit rýhu po 24 a 48 hodinách od ošetření cDDP a komplexem (1) vyjádřenou jako % migrační aktivity neošetřených kontrolních buněk v čase 0 hodin. Buňky byly ošetřeny testovanými komplexy o koncentracích jejich 65 % IC₅₀. Hodnoty s hvězdičkou jsou statisticky významně odlišné od kontroly (P < 0.05). Hodnoty s křížkem jsou statisticky významně odlišné od cisplatinu (P < 0.05). Data představují průměr ze dvou nezávislých měření provedených v duplikátu a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.

4.3 Antiadhezní aktivita

Třetí metodou, která byla v této diplomové práci zvolena byl re-adhezní test. Triple negativní buněčná linie karcinomu prsu MDA-MB-231, která byla pro tuto práci použita, je charakterizována jako linie s agresivním a progresivním fenotypem. Také pro zhoubné triple negativní karcinomy je typická tvorba vzdálených metastáz, které ve většině případů způsobí smrt pacientek s tímto diagnostikovaným typem onemocnění. Schopnost tvorby nových metastáz je několika krokový proces, který zahrnuje schopnost buněk oddělit se z primárního nádoru, putovat organismem a tvořit vzdálená ložiska v dalších orgánech. Tento experiment byl zvolen pro ověření schopnosti uvedených látek ovlivnit přilnavost (adhezi) buněk k růstovému substrátu. Právě změna „přilnavosti“ buněk je jedním z předpokladů nezbytných pro vznik metastáz, kdy se buňky nejprve odpoutávají ze vzájemných vazeb a odlučují od bazální membrány. Uvedený krok je součástí metastatické kaskády a je nezbytný pro celý proces metastázování.

Výsledky re-adhezního testu byly zaznamenány do grafu (Obr. 20), který zobrazuje re-adhezní aktivitu buněk ošetřených zvolenými testovanými látkami vyjádřenou v [%] (vztaženo k re-adhezní aktivitě neošetřených kontrolních buněk, která představuje 100% schopnost re-adheze buněk). U buněk, které byly ošetřené cisplatinou, byla zjištěna vyšší

re-adhezní aktivita (v průměru až 81.9 %). Buňky, které byly ošetřené komplexem (1) dosáhly 2x menší re-adhezní aktivity (v průměru 38.51 %).



Obr. 20: Srovnání re-adhezní aktivity buněk MDA-MB-231 ošetřených cDDP a komplexem (1) vyjádřené jako % re-adhezní aktivity kontrolních neošetřených buněk. Buňky byly ošetřeny testovanými komplexy o koncentracích rovných čtyřnásobku jejich IC_{50} . Hodnota získaná pro komplex (1) označená hvězdičkou je statisticky významně odlišná od hodnoty pro cDDP ($P < 0.05$). Data představují průměr ze tří nezávislých měření provedených v duplikátu a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.

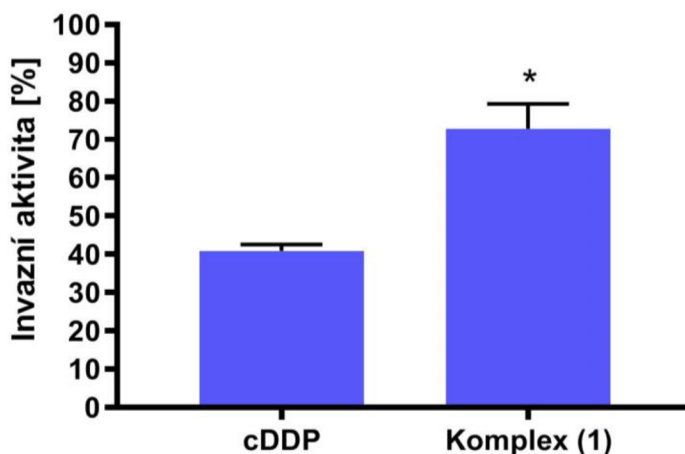
Z těchto výsledků je patrné, že buňky ošetřené cDDP se v této práci jevily jako více schopné znovu přisedat ke kultivačnímu podkladu, nežli tomu bylo u komplexu (1). Komplex (1) způsobil významné snížení re-adhezní schopnosti buněk MDA-MB-231, kdy byl podle uvedených výsledků více než 2x účinnější v porovnání s cisplatinou, což by v přeneseném smyslu mohlo naznačovat i na možnost omezení tvorby nových metastáz u pacientek s TNBC, jež by byly léčeny danou látkou. Získaná data byla také podrobena t-testu, který byl zvolen s úmyslem zjistit, zdali je mezi vybranými výsledky, tedy příslušnými látkami (cDDP a komplex (1)) statisticky významný rozdíl v účinnosti na re-adhezní aktivitu buněk. Bylo zjištěno, že rozdíly ve výsledcích re-adhezní aktivity mezi cisplatinou a komplexem (1) jsou signifikantní ($P < 0.05$).

4.4 Antiinvazní aktivita

Rakovina je progresivní onemocnění, při kterém může docházet k tvorbě metastáz. Ty jsou schopné šířit se v rámci celého organismu a kolonizovat orgány. Jak již bylo zmíněno výše, důležitými kroky tvorby metastáz jsou migrace, invaze a adheze buněk. Proto je také jejich studium klíčové při stanovení účinnosti testovaných léčiv. Poslední metodou, která byla vybrána pro testování invazní aktivity buněk ošetřených zvolenými sloučeninami, byl invazní test. Tímto testem bylo možné analyzovat schopnost buněk

MDA-MB-231 prostupovat membránou potaženou matrigelem (model ECM) za atraktantem po ošetření danými léčivými.

Výsledky invazního testu byly zaznamenány do grafu (Obr. 21), který zobrazuje invazní aktivitu buněk ošetřených zvolenými testovanými látkami vyjádřenou v [%] (vztaženo k invazní aktivitě neošetřených kontrolních buněk, která představuje 100 % invadovaných buněk). U buněk, které byly ošetřeny cisplatinou, bylo zjištěno, že invadovaly méně skrze matrigel, než v případě buněk ošetřených komplexem (1). Buňky ošetřené cisplatinou vykázaly přibližně 41 % invazní aktivity, buňky ošetřené komplexem (1) pak vykázaly přibližně 73 % invazní aktivity. Při porovnání procentuálních schopností buněk invadovat skrze matrigel, bylo možné usuzovat u buněk ošetřených komplexem (1) na menší antiinvazivní aktivitu, která se jeví přibližně 1.8x menší, než tomu je u buněk ošetřených cisplatinou. Získaná data byla také podrobena t-testu, který byl zvolen za účelem zjistit, zdali je mezi vybranými látkami (cDDP a komplex (1)) navzájem a při srovnání s kontrolou statisticky významný rozdíl v účinnosti na antiinvazivní aktivitu buněk. Bylo zjištěno, že rozdíly ve výsledcích antiinvazivní aktivity mezi cisplatinou a komplexem (1) jsou signifikantní ($P < 0.05$).



Obr. 21: Srovnání invazní aktivity buněk MDA-MB-231 ošetřených cDDP a komplexem (1) vyjádřené jako % invazní aktivity kontrolních neošetřených buněk. Buňky byly ošetřeny testovanými komplexy o koncentracích rovných čtyřnásobku jejich IC_{50} . Hodnota získaná pro komplex (1) označená hvězdičkou je statisticky významně odlišná od hodnoty pro cDDP ($P < 0.05$). Data představují průměr ze tří nezávislých měření provedených v duplikátu a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.

5 DISKUZE

Buňky triple negativního karcinomu prsu jsou charakteristické agresivním fenotypem, což se projevuje také jejich oddělováním od primárního ložiska nádoru a tvorbou vzdálených metastáz. Některé výzkumy naznačují, že při léčbě TNBC by mohly být využity rutheniové komplexy, které představují novou třídu cytostatik. Cílem této diplomové práce bylo stanovit antiproliferativní aktivitu nového dichloro komplexu ruthenia s ligandem 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitrilem a dále účinnost na invazivitu a adherenci buněk triple negativní buněčné linie karcinomu prsu MDA-MB-231. Pro srovnání byly experimenty doplněny také testováním účinnosti cisplatiny, jakožto běžně používaného a vysoce rozšířeného cytostatika, na uvedené linii.

Komplex (1) byl vybrán pro testování účinnosti na buněčné linii triple negativního karcinomu prsu na základě pozitivních výsledků testování antiproliferativní aktivity, které byly získány na celém panelu lidských nádorových buněk, data publikovaná Schmitt *et al.*, (2018). Při testování antiproliferativní aktivity na linii MDA-MB-231 v této práci bylo zjištěno, že účinnost komplexu (1) je ve srovnání s konvenční cisplatinou vyšší. Hodnota IC_{50} (koncentrace testovaných látek, při které přežije 50 % buněk) stanovená 72 hodin po ošetření buněk testovanými látkami byla $21.916 \pm 3.141 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro komplex (1), respektive $52.541 \pm 1.385 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro cisplatinu. Při porovnání výsledků získaných v této práci vykazovala tedy cisplatinu přibližně 2.4x menší antiproliferativní aktivitu oproti testovanému komplexu (1). Na základě dostupné literatury, která se zabývala studiem antiproliferativní aktivity ruthenioových komplexů na buněčné linii MDA-MB-231, bylo zjištěno následující. Wu *et al.*, (2014) provedli syntézu dichloro komplexu ruthenia s ligandem imidazolfenanthrolinem. Jeho aktivita by měla být založena na zamezení tvorby invadopodií a zabránění buňkám karcinomu prsu tvořit metastázy skrze inhibici S-fáze buněčného cyklu. Pojem invadopodia se rozumí výběžky buněčné membrány některých nádorových buněk, které se podílí na degradaci ECM v průběhu EMT. Tuto sloučeninu testovali autoři článku na linii buněk MDA-MB-231 a zjistili, že zmíněný komplex dosahuje hodnoty $IC_{50} 20.8 \pm 0.40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento výsledek přibližně odpovídá zjištěné hodnotě antiproliferativní aktivity komplexu (1) v této práci. Popolin *et al.*, (2017) se zabývali studiem bifosfinbipyridinového komplexu ruthenia s ligandem hexafluorofosfátem na proliferaci buněk MDA-MB-231. V rámci tohoto výzkumu bylo zjištěno, že rutheniový komplex dosáhl aktivity vyjádřené jako $IC_{50} 31.16 \pm 0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což byla poněkud vyšší hodnota, nežli tomu bylo v této práci.

Nicméně při porovnání s výsledkem, který byl získán v této práci u cisplatiny, dosáhla hodnota bifosfinbipyridinového komplexu ruthenia přibližně 1.7x vyšší antiproliferativní aktivity. U tohoto komplexu nebyl stanoven přesný mechanismus účinku, nicméně podle autorů by se mohl podobat mechanismu účinku cisplatiny. Při testování výše uvedených rutheniových komplexů na triple negativní buněčnou linii karcinomu prsu byla taktéž prokázána jejich schopnost inhibovat migraci a schopnost buněk invadovat do okolních tkání. Závěrem článku bylo navrženo testované sloučeniny ruthenia pro další testování na základě dosud získaných slibných výsledků. Wu *et al.*, (2014) se taktéž podíleli na testování antiproliferativní aktivity cisplatiny na linii buněk MDA-MB-231, u níž zjistili hodnotu IC_{50} $36.1 \pm 0.28 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V rámci této práce byla zjištěna hodnota IC_{50} $52.541 \pm 1.385 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nutno poznamenat, že antiproliferativní aktivita byla v tomto případě zjištěna 24 hodin od ošetření cisplatinou MTT testem (redukce žluté solubilní tetrazoliové soli MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylyltetrazolium bromid) na nerozpustný formazan)), kdežto to v této práci došlo ke stanovení po 72 hodinách pomocí barvení neutrální červení.

Migrace je jedním z důležitých kroků metastatické kaskády. V rámci stanovení vlivu testovaných látek na migrační aktivitu buněk triple negativního karcinomu prsu pomocí testu zacelování rýhy bylo na základě přiložených fotografií a grafu zjištěno následující. Z přiložených fotografií je patrné, že komplex (1) nejvíce ovlivňoval migrační aktivitu buněk při zacelování rýhy. Tento výsledek byl patrný již 24 hodin po ošetření daným komplexem. 48 hodin po ošetření bylo ovlivnění migrační schopnosti buněk ještě znatelnější. Tento výsledek byl zaznamenán i v grafu (Obr. 19). Z fotografií (Obr. 17B, 18B) nádorových buněk ošetřených cisplatinou byla vidět schopnost buněk migrovat k rýze a zacelit ji. Po 48 hodinách došlo téměř k úplnému zacelení rýhy stejně jako u kontrolních buněk. Při srovnání výsledků pro obě testované látky je patrné, že cisplatina dosáhla menší antimigrační aktivity, tudíž i menší účinnosti v porovnání s komplexem (1). To, že bylo dosaženo slibných výsledků v tomto testu by mohlo být způsobeno strukturou komplexu (1), který je tvořen naftopyrany. Naftopyrany se podílí na narušení tvorby mikrotobulů a tím zabraňují vzniku dělicího vřetenka. Na základě těchto poznatků lze předpokládat, že na buňkách ošetřených komplexem (1) by se mohly tyto vlastnosti projevit a tím by tak mohla být ovlivněna proliferace buněk. To, že byla proliferace ovlivněna mohou demonstrovat přiložené fotografie z testu zacelování rýhy, především fotografie pořízené 48 hodin po ošetření komplexem (1). Wu *et al.*, (2014) zkoumali u dichloro komplexu ruthenia s ligandem imidazolfenanthrolinem jeho vliv na migrační

aktivitu nádorových buněk MDA-MB-231 pomocí testu zacelování rýhy. Po ošetření buněk daným komplexem byla zjištěna větší schopnost ovlivnit migrační aktivitu buněk, nežli tomu bylo v případě neošetřených buněk. Popolin *et al.*, (2017) se u bifosfinbipyridinového komplexu ruthenia s ligandem hexafluorofosfátem zabývali taktéž migrační aktivitou buněk MDA-MB-231 ošetřených daným komplexem. Podobně jako v předchozím případě po ošetření bifosfinbipyridinovým komplexem ruthenia zde byla pozorována větší schopnost ovlivnit migrační aktivitu buněk ve srovnání s kontrolou.

Pro linii MDA-MB-231 je charakteristický agresivní fenotyp, což se projevuje jejich oddělováním od primárního ložiska nádoru a tvorbou vzdálených metastáz. Schopnost buněk znovu adherovat k růstovému substrátu je jeden z důležitých kroků metastatického procesu. Schopnost nádorových buněk přilnout k určitému podkladu je zprostředkována integriny. V rámci testování v této práci byla u buněk ošetřených komplexem (1) zjištěna menší re-adhezní aktivita (přibližně 2x menší), nežli tomu bylo v případě buněk ošetřených cisplatinou. Komplex (1) se na základě zjištěných výsledků jeví účinnější (38.51 % re-adhezní aktivity) ve smyslu zabránění nádorovým buňkám znovu přisednout ke kultivačnímu povrchu, nežli v případě ošetření cisplatinou (81.9 % re-adhezní aktivity). Tento výsledek by taktéž mohl znamenat, že by při eventuální léčbě komplexem (1) by mohlo dojít k zabránění vzniku nových metastáz. Na základě dostupné literatury se Popolin *et al.*, (2017) u bifosfinbipyridinového komplexu ruthenia s ligandem hexafluorofosfátem zabývali taktéž zkoumáním přilnavosti buněk MDA-MB-231. Po ošetření daným komplexem bylo u linie buněk MDA-MB-231 zjištěno, že dosahovaly přibližně 65 % re-adhezní aktivity ve srovnání s kontrolními buňkami u různých typů kultivačních povrchů. Tento výsledek je poněkud vyšší při srovnání s re-adhezní aktivitou buněk ošetřených komplexem (1) v této práci. Nicméně je tento výsledek stále nižší než v případě buněk ošetřených cDDP v této práci. V tomto článku byla navržena hypotéza, proč by mohl být tento rutheniový komplex dobrým kandidátem na antimetastatické léčivo. Klíčovým faktorem by v mechanismu účinku této látky mohla být vazba s integriny, jakožto receptory zodpovědné za uvolnění nádorových buněk od endoteliálních buněk, vazbu buněk k ECM a přenos signálů mezi vnějším prostředím a buňkou. Při vytvoření vazby mezi integriny a rutheniovými komplexy by mohlo dojít k inhibici exprese adhezních molekul, které jsou nezbytné právě pro vytvoření vazby mezi nádorovými buňkami a ECM. Nicméně toto tvrzení je nutné dále prozkoumat. Další možnou hypotézou, proč by mohl být rutheniový komplex účinný v zabránění přisednutí

buněk k určitému povrchu v procesu metastázování, je jeho schopnost ovlivnit strukturu cytoskeletu. Právě integrita buněčné adheze je zprostředkována cytoskeletem. Tuto hypotézu se snažili Popolin *et al.*, (2017) otestovat na linii buněk MDA-MB-231 s pomocí barviva faloidinu (vizualizace aktinových struktur). Po inkubaci buněk ošetřených rutheniovým komplexem s faloidinem, bylo zjištěno, že aplikace uvedeného komplexu ovlivnila hustotu cytoskeletu buněk. Podobný výsledek byl zaznamenán u komplexu NAMI-A v roce 2004, kdy byla taktéž zjištěna modifikace struktury aktinového cytoskeletu u buněk HeLa (linie lidských buněk pocházejících z maligního karcinomu děložního čípku) (Sava *et al.*, 2004). Schmitt *et al.*, (2018) se taktéž zabývali studiem efektu komplexu (1) na organizaci cytoskeletu. Uvedení autoři nejprve testovali nižší koncentraci komplexu (1), přičemž nebyla zjištěna viditelná změna. Dále proto zvolili větší koncentraci a zjistili, že při inkubaci komplexu (1) s buňkami melanomu 518A2 došlo k úplnému narušení organizace mikrotubulů skrze inhibici polymerace tubulinu. Tyto poznatky by mohly naznačovat slibné použití rutheniových komplexů jakožto protinádorových léčiv především u invazivních typů rakovin. Zde by se mohl projevit jejich účinek při zabránění přisednutí buněk oddělených od primárního nádoru k růstovému substrátu a tím i potencionální schopnost omezit vznik nových metastáz.

V metastatickém procesu je taktéž důležitým krokem invaze buněk, která je nezbytná pro přesun nádorových buněk z primárního nádoru přes ECM do okolních tkání. Proto byl invazní test zvolen jako poslední metoda při testování účinnosti komplexu (1). V rámci testování byla u buněk ošetřených komplexem (1) zjištěna vyšší invazní aktivita (přibližně 1.8x vyšší), nežli tomu bylo v případě cisplatinu. Výsledky tohoto testu by mohly naznačovat, že cDDP účinněji brání buňkám invadovat skrze matrigel ve srovnání s komplexem (1). Tento fakt je však v rozporu s poznatky předchozích testů, kdy se právě komplex (1) jevil účinněji a vykazoval větší vliv na migraci a adherenci buněk dané linie ve srovnání s cDDP. Tento výsledek by mohl být ovlivněn antiproliferativní aktivitou komplexu (1), kdy ve srovnání s cisplatinou byla tato látka mnohem účinnější. V případě provedeného testu antiproliferativní aktivity, jejíž hodnoty byly vyjádřeny jako hodnoty IC_{50} bylo zjištěno, že cDDP dosáhla vyšší hodnoty IC_{50} , tudíž její schopnost ovlivnit životaschopnost buněk byla oproti komplexu (1) menší. Na základě těchto výsledků je možno předpokládat, že byl počet buněk, které invadovaly srze matrigel u vzorků ošetřených cDDP větší, než v případě buněk ošetřených komplexem (1). Tento poznatek by se mohl promítnout do výsledku invazního testu a neodrážet skutečnou situaci, kdy buněk ošetřených cDDP bylo více z hlediska získané hodnoty IC_{50} , i když byly použity

ekvitoxické hodnoty koncentrací. Toto tvrzení by však bylo potřeba ještě nadále prostudovat, zejména by bylo vhodné invadované buňky buď to spočítat, nebo srovnat více koncentrací testovaných látek. Na základě dostupných výsledků invazní aktivity, které provedl Wu *et al.*, (2014) u dichloro komplexu ruthenia s ligandem imidazolfenanthrolinem bylo zjištěno, že použití tohoto komplexu, obzvláště ve vyšších koncentracích výrazně zabránilo buňkám MDA-MB-231 invadovat skrze matrigel. Podobný výsledek zaznamenali i autoři Popolin *et al.*, (2017) u buněk MDA-MB-231 ošetřených bifosfinbipyridinovým komplexem ruthenia s ligandem hexafluorofosfátem. Ačkoliv se u komplexu (1) takových to výsledků nepodařilo dosáhnout, je třeba zmínit, že v ostatních provedených testech vykazoval velmi pozitivní výsledky. Prokázal lepší antiproliferativní, antimigrační a antiadhezní aktivitu oproti cisplatině na buňkách triple negativního karcinomu prsu MDA-MB-231. Výsledky získané v této práci by mohly být základem pro další testování komplexu (1) jakožto slibné kandidátní látky pro použití v léčbě triple negativního karcinomu prsu.

6 ZÁVĚR

Rakovina prsu je velmi nebezpečné onemocnění, které ohrožuje velkou část žen po celém světě. Triple negativní karcinom prsu je charakterizován jako nejnebezpečnější typ rakoviny prsu. Pro tento typ nádoru je charakteristické metastázování do dalších orgánů s čímž souvisí malá šance na uzdravení pacientů. Pro TNBC zatím neexistuje zcela efektivní léčba, ačkoliv někteří pacienti mohou pozitivně reagovat na podání platinových cytostatik či další způsoby terapie. Z toho důvodu jsou testována nová potencionální léčiva, která by mohla být na toto onemocnění účinná. V této práci byl studován komplex ruthenia, konkrétně dichloro komplex ruthenia s ligandem 2-amino-4-(3-pyridinyl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitrilem, na linii MDA-MB-231. Byl testován vliv této látky na proliferaci, adhezní a invazní aktivitu uvedených buněk.

Bylo zjištěno, že antiproliferativní aktivita komplexu (1) byla přibližně 2.4x vyšší ve srovnání s konvenční cisplatinou. Hodnota IC_{50} stanovená 72 hodin po ošetření buněk testovanými látkami byla $21.916 \pm 3.141 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro komplex (1) a $52.541 \pm 1.385 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro cisplatinu.

Při stanovení vlivu testovaných látek na migrační aktivitu buněk MDA-MB-231 bylo zjištěno, že komplex (1) více ovlivňoval migrační aktivitu buněk při zacelení rýhy na rozdíl od buněk ošetřených cDDP.

Dále byla testována schopnost buněk znovu adherovat k růstovému substrátu. U buněk ošetřených komplexem (1) byla zjištěna menší re-adhezní aktivita (přibližně 2x menší), nežli tomu bylo v případě buněk ošetřených cisplatinou. Komplex (1) se na základě zjištěných výsledků jeví účinnější (38.51 % re-adhezní aktivity), nežli v případě ošetření cisplatinou (81.9 % re-adhezní aktivity).

V rámci invazního testu byla u buněk ošetřených komplexem (1) zjištěna vyšší invazní aktivita (přibližně 1.8x vyšší), nežli tomu bylo v případě cisplatinu. Výsledky tohoto testu by mohly naznačovat, že cDDP účinněji brání buňkám invadovat skrze matrigel ve srovnání s komplexem (1). Tento výsledek by bylo vhodné dále prostudovat, zvláště by bylo vhodné invadované buňky spočítat nebo srovnat více koncentrací testovaných látek.

Na základě uvedených výsledků v této práci bylo zjištěno, že komplex (1) prokázal lepší antiproliferativní, antimigrační a antiadhezní aktivitu oproti cisplatině na buňkách triple negativního karcinomu prsu MDA-MB-231. Komplex (1) se jeví jako slibný kandidát pro užití v léčbě triple negativního karcinomu prsu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aird, R.E., Cummings, J., Ritchie, A.A., Muir, M., Morris, R.E., Chen, H., Sadler, P.J., Jodrell, D.I. (2002). In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. *British Journal of Cancer* **86**, 1652-1657. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600290>
- Alderden, R.A., Hall, M.D., Hambley, T.W. (2006). The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education* **83**, 728. <https://doi.org/10.1021/ed083p728>
- Alessio, E. & Messori, L. (2019). NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules* **24**, 1995. <https://doi.org/10.3390/molecules24101995>
- Amable, L. (2016). Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research* **106**, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>
- Ang, W.H., Daldini, E., Scolaro, C., Scopelliti, R., Juillerat-Jeannerat, L., Dyson, P.J. (2006). Development of Organometallic Ruthenium–Arene Anticancer Drugs That Resist Hydrolysis. *Inorganic Chemistry* **45**, 9006-9013. <https://doi.org/10.1021/ic061008y>
- Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K.F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J.L., Gallick, G.E., Logsdon, C.D., McConkey, D.J., Choi, W. (2009). Epithelial to Mesenchymal Transition Contributes to Drug Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Research* **69**, 5820-5828. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2819>
- Bareche, Y., Venet, D., Ignatiadis, M., Aftimos, P., Piccart, M., Rothe, F., Sotiriou, C. (2018). Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Annals of Oncology* **29**, 895-902. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy024>
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M.H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology* **84**, 106535. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>
- Bello, E., Taraboletti, G., Colella, G., Zucchetti, M., Forestieri, D., Licandro, S.A., Berndt, A., Richter, P., D'Incalci, M., Cavalletti, E., Giavazzi, R., Camboni, G., Damia, G. (2013). The Tyrosine Kinase Inhibitor E-3810 Combined with Paclitaxel Inhibits the Growth of Advanced-Stage Triple-Negative Breast Cancer Xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* **12**, 1311-140. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0275-T>
- Bergamo, A., Masi, A., Dyson, P.J., Sava, G. (2008). Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound. *International Journal of Oncology* **33**, 1281-9. <https://doi.org/10.3892/ijo00000119>
- Bergers, G. & Fendt, S.-M. (2021). The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nature Reviews Cancer* **21**, 162-180. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00320-2>
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. (2000). A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **92**, 1295-1302. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>
- Browning, R.J., Reardon, P.J.T., Parhizkar, M., Pedley, R.B., Edirisinghe, M., Knowles, J.C., Stride, E. (2017). Drug Delivery Strategies for Platinum-Based Chemotherapy. *ACS Nano* **11**, 8560-8578. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04092>
- Castelló, A., Martín, M., Ruiz, A., Casas, A.M., Baena-Cañada, J.M., Lope, V., Antolín, S., Sánchez, P., Ramos, M., Antón, A., Muñoz, M., Bermejo, B., De Juan-Ferré, A., Jara, C., Chacón, J.I., Jimeno, M.A., Rosado, P., Díaz, E., Guillem, V., Lluch, A., Carrasco, E., Pérez-Gómez, B., Vioque, J., Pollán, M., EpiGEICAM researchers (2015). Lower Breast Cancer Risk among Women following the World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research Lifestyle Recommendations: EpiGEICAM Case-Control Study. *PLOS ONE* **10**, e0126096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126096>
- Chen, H., Parkinson, J.A., Parsons, S., Coxall, R.A., Gould, R.O., Sadler, P.J. (2002). Organometallic Ruthenium(II) Diamine Anticancer Complexes: Arene-Nucleobase Stacking and Stereospecific Hydrogen-Bonding in Guanine Adducts. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 3064-3082. <https://doi.org/10.1021/ja017482e>

- Cheng, Q., Chang, J.T., Geradts, J., Neckers, L.M., Haystead, T., Spector, N.L., Lyerly, H.K. (2012). Amplification and high-level expression of heat shock protein 90 marks aggressive phenotypes of human epidermal growth factor receptor 2 negative breast cancer. *Breast Cancer Research* **14**, R62. <https://doi.org/10.1186/bcr3168>
- Corkery, B., Crown, J., Clynes, M., O'Donovan, N. (2009). Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology* **20**, 862-867. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn710>
- Dai, G., Yu, L., Yang, J., Xia, K., Zhang, Z., Liu, G., Gao, T., Guo, W. (2017). The synergistic antitumor effect of cinobufagin and cisplatin in human osteosarcoma cell line *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget* **8**, 85150-85168. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19554>
- D'Andrea, A.D. & Grompe, M. (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nature Reviews Cancer* **3**, 23-34. <https://doi.org/10.1038/nrc970>
- Dasari, S. & Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* **740**, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Dent, R., Hanna, W.M., Trudeau, M., Rawlinson, E., Sun, P., Narod, S.A. (2009). Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **115**, 423-428. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0086-2>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., Narod, S.A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research* **13**, 4429-4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Duan, L., Fischer, A., Xu, Y., Sun, L. (2009). Isolated Seven-Coordinate Ru(IV) Dimer Complex with [HOHOH]⁻ Bridging Ligand as an Intermediate for Catalytic Water Oxidation. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 10397-10399. <https://doi.org/10.1021/ja9034686>
- Eastman, A. (1987). The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & Therapeutics* **34**, 155-166. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(87\)90009-x](https://doi.org/10.1016/0163-7258(87)90009-x)
- Elkashif, A., McCarthy, H., Buckley, N. (2018). Personalising the Fight against Triple Negative Breast Cancer. **13**, 20-27. <https://dx.doi.org/10.16966/jbcra.106>
- Eslami-S, Z., Cortés-Hernández, L.E., Alix-Panabières, C. (2020). The Metastatic Cascade as the Basis for Liquid Biopsy Development. *Frontiers in Oncology* **10**, 1055. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01055>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *International Journal of Cancer* **136**, E359-E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Foulkes, W.D. & Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **11**. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
- Friedl, P. & Alexander, S. (2011). Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell* **147**, 992-1009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>
- Friedl, P., Borgmann, S., Bröcker, Eva.-B. (2001). Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *Journal of Leukocyte Biology* **70**, 491-509. <https://doi.org/10.3410/f.1003679.37654>
- Friedl, P. & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 445-457. <https://doi.org/10.1038/nrm2720>
- Friedl, P. & Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology* **188**, 11-19. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909003>
- Galanski, M., Jakupec, M., Keppler, B. (2005). Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches. *Current Medicinal Chemistry* **12**, 2075-2094. <https://doi.org/10.2174/0929867054637626>

- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**, 1869-1883. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>
- Gao, D., Mittal, V., Ban, Y., Lourenco, A.R., Yomtoubian, S., Lee, S. (2018). Metastatic tumor cells – genotypes and phenotypes. *Frontiers in Biology* **13**, 277-286. <https://doi.org/10.1007/s11515-018-1513-3>
- Garrido-Castro, A.C., Lin, N.U., Polyak, K. (2019). Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discovery* **9**, 176-198. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1177>
- Gerratana, L., Basile, D., Buono, G., De Placido, S., Giuliano, M., Minichillo, S., Coinu, A., Martorana, F., De Santo, I., Del Mastro, L., De Laurentiis, M., Puglisi, F., Arpino, G. (2018). Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype. *Cancer Treatment Reviews* **68**, 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.06.005>
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* **88**, 102925. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>
- Goodsell, D.S. (2006). The Molecular Perspective: Cisplatin. *Stem Cells* **24**, 514-515. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-csc2>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology* **137**, e11-e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
- Habtemariam, A., Melchart, M., Fernández, R., Parsons, S., Oswald, I.D.H., Parkin, A., Fabbiani, F.P.A., Davidson, J.E., Dawson, A., Aird, R.E., Jodrell, D.I., Sadler, P.J. (2006). Structure–Activity Relationships for Cytotoxic Ruthenium(II) Arene Complexes Containing N,N-, N,O-, and O,O-Chelating Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 6858-6868. <https://doi.org/10.1021/jm060596m>
- Haffty, B.G., Yang, Q., Reiss, M., Kearney, T., Higgins, S.A., Weidhaas, J., Harris, L., Hait, W., Toppmeyer, D. (2006). Locoregional Relapse and Distant Metastasis in Conservatively Managed Triple Negative Early-Stage Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **24**, 5652-5657. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.5664>
- Hamdan, D., Nguyen, T.T., Leboeuf, C., Meles, S., Janin, A., Bousquet, G. (2019). Genomics applied to the treatment of breast cancer. *Oncotarget* **10**, 4786-4801. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27102>
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hwang, S.-Y., Park, S., Kwon, Y. (2019). Recent therapeutic trends and promising targets in triple negative breast cancer. *Pharmacology & Therapeutics* **199**, 30-57. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.006>
- Ilina, O. & Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *Journal of Cell Science* **122**, 3203-3208. <https://doi.org/10.1242/jcs.036525>
- Ivanov, A.I., Christodoulou, J., Parkinson, J.A., Barnham, K.J., Tucker, A., Woodrow, J., Sadler, P.J. (1998). Cisplatin Binding Sites on Human Albumin. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 14721-14730. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14721>
- Jain, A., Jahagirdar, D., Nilendu, P., Sharma, N.K. (2017). Molecular approaches to potentiate cisplatin responsiveness in carcinoma therapeutics. *Expert Review of Anticancer Therapy* **17**, 815-825. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1356231>
- Jakupec, M.A., Galanski, M., Arion, V.B., Hartinger, C.G., Keppler, B.K. (2008). Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.*, 183-194. <https://doi.org/10.1039/B712656P>
- Johnstone, T.C., Suntharalingam, K., Lippard, S.J. (2015). Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical,*

- Johnstone, T.C., Suntharalingam, K., Lippard, S.J. (2016). The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical Reviews* **116**, 3436-3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>
- Kabel, A.M. (2017). Tumor markers of breast cancer: New perspectives. *Journal of Oncological Sciences* **3**, 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.01.001>
- Kalimutho, M., Parsons, K., Mittal, D., López, J.A., Srihari, S., Khanna, K.K. (2015). Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **36**, 82-846. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.08.009>
- Katano, K., Kondo, A., Safaei, R., Holzer, A., Samimi, G., Mishima, M., Kuo, Y.-M., Rochdi, M., Howell, S.B. (2002). Acquisition of Resistance to Cisplatin Is Accompanied by Changes in the Cellular Pharmacology of Copper. *Cancer Research* **62**, 6559-6565. <https://doi.org/10.1016/jrsta.2015.0521>
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* **7**, 573-584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>
- Kelland, L. (1993). New platinum antitumor complexes. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **15**, 191-219. [https://doi.org/10.1016/1040-8428\(93\)90042-3](https://doi.org/10.1016/1040-8428(93)90042-3)
- Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., Gray, J.W., Bissell, M.J. (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology* **1**, 84-96. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>
- Kim, S.I., Kim, H.J., Lee, H.-J., Lee, K., Hong, D., Lim, H., Cho, K., Jung, N., Yi, Y.W. (2016). Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. *Analytical Biochemistry* **492**, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.09.010>
- Köberle, B., Tomicic, M.T., Usanova, S., Kaina, B. (2010). Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1806**, 172-182. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.004>
- Kovaříková, P., Michalová, E., Knopfová, L., Bouchal, P. (2014). Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk. *Klin Onkol* **27**, 22-27. <https://doi.org/10.14735/amko20141S22>
- Kratz, F. & Beyer, U. (1998). Serum Proteins as Drug Carriers of Anticancer Agents: A Review. *Drug Delivery* **5**, 281-299. <https://doi.org/10.3109/10717549809065759>
- Kunkel, T.A. & Erie, D.A. (2005). DNA MISMATCH REPAIR. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 681-710. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243>
- Le, D. & Gelmon, K.A. (2018). Olaparib tablets for the treatment of germ line BRCA-mutated metastatic breast cancer. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **11**, 833-839. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1513321>
- Lebwohl, D. & Canetta, R. (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer* **34**, 1522-1534. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(98\)00224-x](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(98)00224-x)
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 2750-2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Leijen, S., Burgers, S.A., Baas, P., Pluim, D., Tibben, M., van Werkhoven, E., Alessio, E., Sava, G., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M. (2015). Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Investigational New Drugs* **33**, 201-214. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0179-1>
- Li, D., Ambrogio, L., Shimamura, T., Kubo, S., Takahashi, M., Chirieac, L.R., Padera, R.F., Shapiro, G.I., Baum, A., Himmelsbach, F., Rettig, W.J., Meyerson, M., Solca, F., Greulich, H., Wong, K.-K. (2008). BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor

- highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **27**, 4702-4711. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.109>
- Luck, A.N. & Mason, A.B. (2013). Structure and dynamics of drug carriers and their interaction with cellular receptors: Focus on serum transferrin. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.11.001>
- Madsen, C.D. & Sahai, E. (2010). Cancer Dissemination—Lessons from Leukocytes. *Developmental Cell* **19**, 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.013>
- Manohar, S. & Leung, N. (2018). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of Nephrology* **31**, 15-25. <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0392-z>
- Martin, L.P., Hamilton, T.C., Schilder, R.J. (2008). Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways. *Clinical Cancer Research* **14**, 1291-1295. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2238>
- Meier-Menches, S.M., Gerner, C., Berger, W., Hartinger, C.G., Keppler, B.K. (2018). Structure–activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents – towards clinical development. *Chemical Society Reviews* **47**, 909-928. <https://doi.org/10.1039/c7cs00332c>
- Mitra, R. & Samuelson, A.G. (2014). Substitution-Modulated Anticancer Activity of Half-Sandwich Ruthenium(II) Complexes with Heterocyclic Ancillary Ligands: Anticancer Activity of Half-Sandwich Ruthenium(II) Complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2014**, 3536-3546. <https://doi.org/10.1002/ejic.201402205>
- Miyazawa-Hoshimoto, S., Takahashi, K., Bujo, H., Hashimoto, N., Yagui, K., Saito, Y. (2005). Roles of degree of fat deposition and its localization on VEGF expression in adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **288**, E1128-E1136. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00003.2004>
- Mlcouskova, J., Stepankova, J., Brabec, V. (2012). Antitumor carboplatin is more toxic in tumor cells when photoactivated: enhanced DNA binding. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **17**, 891-898. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0906-z>
- Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy* **11**, 151-164. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0906-z>
- Morris, G.J., Naidu, S., Topham, A.K., Guiles, F., Xu, Y., McCue, P., Schwartz, G.F., Park, P.K., Rosenberg, A.L., Brill, K., Mitchell, E.P. (2007). Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African–American and Caucasian patients: A single-institution compilation compared with the National Cancer Institute’s Surveillance, Epidemiology, and end results database. *Cancer* **110**, 876-884. <https://doi.org/10.1002/ncr.22836>
- Murray, B.S., Babak, M.V., Hartinger, C.G., Dyson, P.J. (2016). The development of RAPTA compounds for the treatment of tumors. *Coordination Chemistry Reviews* **306**, 86-114. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.06.014>
- Nenclares, P. & Harrington, K.J. (2020). The biology of cancer. *Medicine* **48**, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.001>
- Novikov, N.M., Zolotaryova, S.Y., Gautreau, A.M., Denisov, E.V. (2021). Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer* **124**, 102-114. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01149-0>
- Novohradský, 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. <https://doi.org/10.1039/c4dt02865a>
- Opdam, F.L., Guchelaar, H., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M. (2012). Lapatinib for Advanced or Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist* **17**, 536-542. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0461>
- Osborne, C. & Tripathy, D. (2005). Aromatase Inhibitors: Rationale and Use in Breast Cancer. *Annual Review of Medicine* **56**, 103-116. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.062804.103324>

- Park, H.S., Jang, M.H., Kim, E.J., Kim, H.J., Lee, H.J., Kim, Y.J., Kim, J.H., Kang, E., Kim, S.-W., Kim, I.A., Park, S.Y. (2014). High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Modern Pathology* **27**, 1212-1222. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.251>
- Patel, A. (2020). Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology* **6**, 1488. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P.O., Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Petrović, M. & Todorović, D. (2016). Biochemical and molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer cells. *Medicine and Biology* **18**, 12-18. <https://doi.org/10.1005/56435658>
- Pizarro, A.M. & Sadler, P.J. (2009). Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* **91**, 1198-1211. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.017>
- Pluim, D., van Waardenburg, R.C.A.M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M. (2004). Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **54**, 71-78. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0773-6>
- Popolin, C.P., Reis, J.P.B., Becceneri, A.B., Graminha, A.E., Almeida, M.A.P., Corrêa, R.S., Colina-Vegas, L.A., Ellena, J., Batista, A.A., Cominetti, M.R. (2017). Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells. *PLOS ONE* **12**, e0183275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183275>
- Poynton, F.E., Bright, S.A., Blasco, S., Williams, D.C., Kelly, J.M., Gunnlaugsson, T. (2017). The development of ruthenium(II) polypyridyl complexes and conjugates for *in vitro* cellular and *in vivo* applications. *Chemical Society Reviews* **46**, 7706-7756. <https://doi.org/10.1039/C7CS00680B>
- Qian, X.-L., Zhang, J., Li, P.-Z., Lang, R.-G., Li, W.-D., Sun, H., Liu, F.-F., Guo, X.-J., Gu, F., Fu, L. (2017). Dasatinib inhibits c-src phosphorylation and prevents the proliferation of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) cells which overexpress Syndecan-Binding Protein (SDCBP). *PLOS ONE* **12**, e0171169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171169>
- Qiu, K., Wang, J., Song, C., Wang, L., Zhu, H., Huang, H., Huang, J., Wang, H., Ji, L., Chao, H. (2017). Crossfire for Two-Photon Photodynamic Therapy with Fluorinated Ruthenium (II) Photosensitizers. *ACS Applied Materials & Interfaces* **9**, 18482-18492. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02977>
- Reinert, T. & Barrios, C.H. (2015). Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **7**, 304-320. <https://doi.org/10.1177/1758834015608993>
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* **3**, 1125-1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Retsas, S. (2017). Cancer and the arts: metastasis—as perceived through the ages. *ESMO Open* **3**, 226-230. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2017-000226>
- Rocha, C., Silva, M., Quinet, A., Cabral-Neto, J., Menck, C. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics* **73**, e478. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>
- Rodriguez, L.G., Wu, X., Guan, J.L. (2005). Wound-Healing Assay. *Cell Migration* **9**, 20-30. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9023>
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698-699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>
- Ross, J.S., Slodkowska, E.A., Symmans, W.F., Pusztai, L., Ravdin, P.M., Hortobagyi, G.N. (2009). The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2

- Therapy and Personalized Medicine. *The Oncologist* **14**, 320-368. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0230>
- Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., Poirier, G.G. (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature Reviews Cancer* **10**, 293-301. <https://doi.org/10.1038/nrc2812>
- Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., Weiss, S.J. (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *Journal of Cell Biology* **185**, 11-19. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807195>
- Sandhu, R., Parker, J.S., Jones, W.D., Livasy, C.A., Coleman, W.B. (2010). Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *Laboratory Medicine* **41**, 364-372. <https://doi.org/10.1309/LMLIK0VIE3CJK0WD>
- Sava, G., Capozzi, I., Clerici, K., Gagliardi, G., Alessio, E., Mestroni, G. (1998). Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. *Clin Exp Metastasis* **4**, 371-379. <https://doi.org/10.1023/a:1006521715400>
- Sava, G., Frausin, F., Cocchietto, M., Vita, F., Podda, E., Spessotto, P., Furlani, A., Scarcia, V., Zabucchi, G. (2004). Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A. *European Journal of Cancer* **40**, 1383-1396. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.01.034>
- Sava, G., Pacor, S., Mestroni, G., Alessio, E. (1992a). Effects of the Ru(III) complexes [mer-RuCl₃(DMSO)₂Im]₃ and Na[trans-RuCl₄(DMSO)Im] on solid mouse tumors. *Anticancer Drugs* **1**, 25-31. <https://doi.org/10.1097/00001813-199202000-00005>
- Sava, G., Pacor, S., Mestroni, G., Alessio, E. (1992b). Na[trans-RuCl₄(DMSO)Im], a metal complex of ruthenium with antimetastatic properties. *Clinical & Experimental Metastasis* **10**, 273-280. <https://doi.org/10.1007/BF00133563>
- Schaeppli, U., Heyman, I.A., Fleischman, R.W., Rosenkrantz, H., Ilievski, V., Phelan, R., Cooney, D.A., Davis, R.D. (1973). cis-Dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119 875): Preclinical toxicologic evaluation of intravenous injection in dogs, monkeys and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **25**, 230-241. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(73\)80009-2](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(73)80009-2)
- Schmitt, F., Kasparikova, J., Brabec, V., Begemann, G., Schobert, R., Biersack, B. (2018). New (arene)ruthenium(II) complexes of 4-aryl-4H-naphthopyrans with anticancer and anti-vascular activities. *Journal of Inorganic Biochemistry* **184**, 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.013>
- Shah, N. & Dizon, D.S. (2009). New-generation platinum agents for solid tumors. *Future Oncology* **5**, 33-42. <https://doi.org/10.2217/14796694.5.1.33>
- Shu, L., Qin, L., Min, S., Pan, H., Zhong, J., Guo, J., Sun, Q., Yan, X., Chen, C., Tang, B., Xu, Q. (2019). Genetic analysis of DNA methylation and hydroxymethylation genes in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* **84**, 24213-24216. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.025>
- Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-7279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **82**, 1107-1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G. (1987). Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification. **235**, 7. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>
- Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H.A., Piccart, M. (2015). An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. *Nature Reviews Clinical Oncology* **12**, 27-41. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.163>
- Stevens, K.N., Vachon, C.M., Couch, F.J. (2013). Genetic Susceptibility to Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research* **73**, 2025-2030. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1699>

- Strauch, A. R. (2021): *Bimetalické komplexy a jejich vlastnosti*. [Bakalářská práce]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Česká republika.
- Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P., Zhu, H.-P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences* **13**, 1387-1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Talmadge, J.E. & Fidler, I.J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research* **70**, 5649-5669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>
- Tang, H.-S., Feng, Y.-J., Yao, L.-Q. (2009). Angiogenesis, Vasculogenesis, and Vasculogenic Mimicry in Ovarian Cancer: *International Journal of Gynecological Cancer* **19**, 605-610. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181a389e6>
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**, 871-890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Trimmer, E.E. & Essigmann, J.M. (1999). Cisplatin. *Essays Biochem* **34**, 191-211. <https://doi.org/10.1042/bse0340191>
- Trondl, R., Heffeter, P., Kowol, C.R., Jakupec, M.A., Berger, W., Keppler, B.K. (2014). NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem. Sci.* **5**, 2925-2932. <https://doi.org/10.1039/C3SC53243G>
- Valastyan, S. & Weinberg, A.R. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* **14**, 275-292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
- Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* **1**, 1112-1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
- Vrana, O. (1996). Superhelical torsion controls DNA interstrand cross-linking by antitumor cis-diamminedichloroplatinum(II). *Nucleic Acids Research* **24**, 3918-3925. <https://doi.org/10.1093/nar/24.20.3918>
- Wagner, M.J., Stacey, M.M., Liu, B.A., Pawson, T. (2013). Molecular Mechanisms of SH2- and PTB-Domain-Containing Proteins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, 008987-008987. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008987>
- Weigel, B., Bakker, G.-J., Friedl, P. (2012). Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion: Principles of interface guidance and microvesicle dynamics. *IntraVital* **1**, 32-43. <https://doi.org/10.4161/intv.21223>
- Welch, D.R. & Hurst, D.R. (2019). Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Research*, **15** 3011-3027. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>
- Wilson, J.J. & Lippard, S.J. (2014). Synthetic Methods for the Preparation of Platinum Anticancer Complexes. *Chemical Reviews* **114**, 4470-4495. <https://doi.org/10.1021/cr4004314>
- Wolf, K., Müller, R., Borgmann, S., Bröcker, Eva.-B., Friedl, P. (2003). Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* **102**, 3262-3269. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3791>
- Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology* **9**, 893-904. <https://doi.org/10.1038/ncb1616>
- Wu, Q., He, J., Mei, W., Zhang, Z., Wu, X., Sun, F. (2014). Arene ruthenium complex, a potent inhibitor against proliferation, migration and invasion of breast cancer cells, reduces stress fibers, focal adhesions and invadopodia. *Metallomics* **6**, 2204-2212. <https://doi.org/10.1039/c4mt00158c>
- Zaha, D.C. (2014). Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology* **5**, 382. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.382>
- Zeng, L., Gupta, P., Chen, Y., Wang, E., Ji, L., Chao, H., Chen, Z.-S. (2017). The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. *Chemical Society Reviews* **46**, 5771-5804. <https://doi.org/10.1039/c7cs00195a>

Zijl V.F., Krupitza, G., Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **728**, 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.002>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| ADP | Adenosindifosfát |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| ATB | Antibiotika |
| BSA | Hovězí sérový albumin |
| cDDP | <i>cis</i> -diammindichloroplatnatý komplex |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| DMF | Dimethylformamid |
| ECM | Extracelulární matrix |
| EGFR | Receptor epidermálního růstového faktoru |
| EMT | Epiteliálně-mezenchymální přechod |
| ER | Estrogeny |
| FBS | Fetální hovězí sérum |
| FGFR | Receptor růstového faktoru fibroblastů |
| HER2 | Lidský epidermální receptor 2 |
| HR | Homologní rekombinace |
| NER | Nukleotidová excizní oprava DNA |
| NHEJ | Nehomologní spojování konců DNA |
| MDA | Látky destabilizující mikrotubuly |
| MMR | „Mismatch“ oprava chybného párování bází DNA |
| PARP | Poly (ADP-ribose) polymerasa |
| PBS | Roztok fosfátového pufru |
| PR | Progesterony |
| SRB | Sulforhodamin B |
| TCA | Kyselina trichloroctová |
| TNBC | Triple negativní karcinom prsu |
| TPA | Tkáňový polypeptidový antigen |
| VEGFR | Receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru |