

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Vliv nových biologicky aktivních komplexů ruthenia  
a osmia na invazivitu a adherenci nádorových buněk**

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracovala:	<b>Bc. Eliška Krampolová</b>
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.</b>
Rok odevzdání práce:	2019

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Krampolová
Název práce	Vliv nových biologicky aktivních komplexů ruthenia a osmia na invazivitu a adherenci nádorových buněk
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	

V léčbě mnoha nádorových onemocnění se v současnosti uplatňují především metalofarmaka na bázi platiny. Použití těchto látek v klinické praxi má však mnohé nevýhody a omezení, proto jsou syntetizovány a testovány nové sloučeniny nejen na bázi platiny, ale i dalších přechodných kovů. V této diplomové práci byl testován účinek nových komplexů ruthenia a osmia na buňkách MDA-MB-231 kultivovaných *in vitro*. Tato buněčná linie je odvozena od triple negativní varianty karcinomu prsu. Problém v úspěšné léčbě daného onemocnění v praxi představuje mimo jiné vysoké riziko tvorby vzdálených metastáz. Z tohoto důvodu je předložená diplomová práce zaměřena především na studium vlivu zmíněných látek na invazivitu a adherenci buněk MDA-MB-231. V kapitole Výsledky a diskuze lze nalézt shrnutí a vyhodnocení získaných experimentálních dat. Testovaný rutheniový komplex dosahuje v porovnání s cisplatinou a osmiovým analogem nejslibnější antiproliferační aktivity na testované buněčné kultuře MDA-MB-231.

Klíčová slova	karcinom prsu, MDA-MB-231, rutheniový komplex, osmiový komplex, metastatická kaskáda
Počet stran	68
Jazyk	Český

## Bibliographic identification

Author's first name and surname	B.Sc. Eliška Krampolová
Title of thesis	Influence of new biologically active ruthenium and osmium complexes on the invasiveness and adherence of cancer cells
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	M.Sc. Jitka Prachařová, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	

Nowadays platinum-based metallopharmaceutics are used in the treatment of many human malignancies. However, the use of these substances in clinical practice is connected with many disadvantages and limitations. Therefore new compounds not only based on platinum but also on other transition metals are synthesized and tested. In this diploma thesis, the effect of the new complexes of ruthenium and osmium on MDA-MB-231 cells was tested *in vitro*. This cell line is derived from a triple negative variant of breast carcinoma. High metastatic potential seems to be the main problem in a successful treatment of this malignancy. Thus, the presented thesis is mainly focused on the study of the influence of these substances on the invasiveness and adherence of MDA-MB-231 cells. In the Results and discussion chapter, can be find a summary and evaluation of the experimental data. Ruthenium complex shows the most promising antiproliferative activity on the tested cell culture MDA-MB-231 compared to cisplatin and the osmium analogue.

Keywords	breast cancer, MDA-MB-231, ruthenium complex, osmium complex, metastatic cascade
Number of pages	68
Language	Czech

## PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jitky Prachařové, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 24. 4. 2019

.....

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za velkou vstřícnost, odborné konzultace a vedení diplomové práce. Také děkuji Mgr. Haně Crlíkové za trpělivost a podnětné rady při práci v laboratoři. Oběma děkuji za ochotu a čas, který mi věnovaly. Rovněž děkuji svým blízkým za podporu při zpracování diplomové práce, ale i při celém studiu.

Materiální podpora pro experimentální část této práce byla podpořena studentským grantovým projektem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA\_PřF\_2019\_030).

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	adenosintrifosfát
BSA	Bovine Serum Albumin
CAMs	buněčné adhezní molekuly
cDDP	<i>cis</i> -diamindichloroplatnatý komplex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor
EMT	epiteliálně-mezenchymatická tranzice (přechod)
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	fibroblastový růstový faktor
GFs	růstové faktory
HGF	hepatocytární růstový faktor
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
ILK	integrinem spojená kináza
LOX	lysyl oxygenáza
MAPK	mitogenem aktivovaná kináza
MLCs	lehké řetězce myozinu
MMPs	matrixové metaloproteázy
PBS	fosfátový pufr
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
SRB	sulforhodamin B
TCA	kyselina trichloroctová
TGF $\beta$	transformační růstový faktor $\beta$
TIMPs	endogenní tkáňové inhibitory
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TRIS	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

# OBSAH

OBSAH.....	7
I. ÚVOD.....	9
II. CÍLE PRÁCE.....	10
III. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
III. 1. VZNIK NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ.....	11
III. 1. 1. Hlavní příčiny vzniku nádorového onemocnění.....	13
III. 1. 2. Invazivita a tvorba metastáz.....	15
III. 2. MECHANISMY NÁDOROVÉ INVAZIVITY NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI.....	15
III. 2. 1. Metastatická kaskáda.....	15
III. 2. 2. Epiteliálně-mezenchymální přechod.....	16
III. 2. 3. Interakce nádorových buněk s extracelulární matrix.....	21
III. 2. 4. Vliv aktinu a myozinu na migraci nádorových buněk.....	22
III. 2. 5. Role proteáz.....	23
III. 3. MECHANISMY INVAZIVITY NÁDOROVÝCH BUNĚK MEZIBUNĚČNOU HMOTOU.....	24
III. 3. 1. ECM.....	24
III. 3. 2. Invazní struktury.....	25
III. 3. 3. Způsoby buněčné migrace.....	26
III. 4. KOMPLEXY RUTHENIA A OSMIA V LÉČBĚ NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	28
IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
IV. 1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	33
IV. 1. 2. Použité komplexy.....	34
IV. 1. 3. Použité roztoky.....	35
IV. 2. PŘÍSTROJE.....	35
IV. 3. METODY.....	36
IV. 3. 1. Kultivace buněk.....	36
IV. 3. 2. Počítání buněk.....	36
IV. 3. 3. Test cytotoxicity.....	37
IV. 3. 4. Wound-healing esej.....	38
IV. 3. 5. Re-adhezní test.....	39
IV. 3. 6. SRB test.....	39
V. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
1. TEST CYTOTOXICITY.....	41

2. WOUND-HEALING ESEJ.....	44
3. RE-ADHEZNÍ TEST.....	50
VI. ZÁVĚR.....	54
VII. LITERATURA.....	56
VIII. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	67
IX. SEZNAM TABULEK.....	68



## I. ÚVOD

Nádorová onemocnění patří k velmi závažným civilizačním chorobám naší doby. Počet pacientů s diagnostikovaným zhoubným nádorem každým rokem roste. Jedním z hlavních důvodů růstu incidence je zvyšující se průměrný věk obyvatel, stejně jako zlepšující se diagnostické metody. Ty jsou schopné odhalit malignity již ve velmi ranném stádiu, díky čemuž umožňují včasné zahájení léčby a zvyšují tak šance pacientů na uzdravení. Mezi nejčastější nádorová onemocnění v České republice patří karcinom prostaty u mužů, u žen je to karcinom prsu.

Je známo, že za většinu úmrtí na nádorová onemocnění je zodpovědná progresse a tvorba sekundárních nádorů (metastáz) ve vzdálených orgánech. Obecně je však tvorba metastáz velice neefektivní proces a ke vzniku sekundárních ložisek nádoru dochází jen velmi zřídka. Jedná se totiž o komplexní děj, při kterém buňky primárního tumoru musí překonat řadu překážek. Nejčastěji bývá metastázování zahájeno přes krevní řečiště, kam se z místa primárního nádoru uvolňují tzv. cirkulující nádorové buňky. Bylo popsáno, že nádorové buňky jsou schopné dočasně měnit svůj fenotyp a díky tomu se snadněji šířit do celého těla.

V předkládané diplomové práci byl testován vliv nových biologicky aktivních komplexů ruthenia a osmia na invazivitu a adherenci triple-negativní buněčné linie karcinomu prsu MDA-MB-231.

## II. CÍLE PRÁCE

Cíle této diplomové práce byly stanoveny takto:

1. Shromáždit informace dostupné v odborné literatuře a vytvořit rešerši na dané téma.
2. Zvládnout techniku práce s kulturami lidských nádorových buněk.
3. Testovat vliv nových komplexů ruthenia a osmia na invazivitu a adherenci buněk lidského adenokarcinomu prsu MDA-MB-231.
4. Získané výsledky srovnat s údaji v odborných publikacích.

### III. TEORETICKÁ ČÁST

#### III. 1. VZNIK NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

*Rakovina* je obecné označení skupiny přibližně sta klinicky definovaných onemocnění způsobených zhoubným nádorem. *Nádor* je heterogenní tkáň, kterou tvoří nejenom buňky nádorové, ale i buňky podpůrné, např. fibroblasty, endotelové buňky nebo buňky imunitního systému. *Nádory benigní (nezhoubné)* vykazují autonomní růst, ale jejich buňky neinvadují okolní struktury a nezakládají sekundární nádory. Až nádory, jejichž buňky jsou schopné invazivního růstu a tvorby metastáz označujeme jako *nádory maligní* neboli *zhoubné*. Charakteristickým znakem zhoubných nádorů je nekontrolované dělení buněk a jejich schopnost šířit se z místa vzniku, tzv. primárního nádoru, do dalších částí těla a tvořit sekundární nádory (metastázy) v dalších tkáních a orgánech. Proces, kterým se z normálních buněk stávají buňky nádorové, se označuje jako *maligní transformace* (Weinberg, 2014).

Zhoubné nádory dále pojmenováváme dle místa jejich vzniku. Přibližně 85 % případů rakoviny zahrnuje nádory epiteliálních buněk, které označujeme jako *karcinomy*. Nádory pocházející z mezodermálních buněk (např. kostí, svalů) označujeme jako *sarkomy* a nádory tvořené z buněk žlázových tkání (např. nádorové buňky prsu) jako *adenokarcinomy*. Také vlastnosti jednotlivých typů nádorových buněk se mohou lišit v závislosti na místě jejich vzniku. Například buňky způsobující rakovinu kůže se vyznačují řadou odlišností od zhoubného nádoru plic. Hlavní faktory vzniku rakoviny jsou v každé cílové tkáni odlišné. Ultrafialové záření (UV záření) ze slunečního svitu může nejsnáze působit na kůži, zatímco dýchání cigaretového kouře poškozuje především plíce. Navíc bylo zjištěno, že existují značné rozdíly v molekulárních mechanismech zapojených v karcinogenezi (jinak také tumorogenezi – tj. proces vzniku nádorových buněk z buněk zdravých) různých typů buněk a také v procesu šíření buněk z místa jejich vzniku. Podle typu nádorových buněk také musí být vždy zvolena optimální léčba. Chirurgické odstranění zhoubného nádoru je vhodnější u maligního melanomu (zhoubného nádoru kůže) než u nádoru plic (Pecorino, 2008). Nicméně přestože se u různých typů nádorů molekulární a buněčné procesy částečně liší, vedou vždy ke stejnému cíli. Tyto poznatky přehledně formulovali v roce 2000 Hanahan a Weinberg, kteří publikovali v časopise *Cell* tzv. šest získaných znaků nádoru.

### **1. Nezávislost na růstových faktorech.**

- Normální zdravé buňky potřebují vnější růstové faktory, aby se mohly dělit.
- Nádorové buňky jsou na normálních růstových faktorech nezávislé.

### **2. Poškozená regulace buněčného cyklu.**

- Normální buňky reagují na inhibiční signály pro zachování homeostázy (většina buněk v těle se právě nedělí).
- Nádorové buňky nereagují na inhibiční faktory buněčného cyklu.

### **3. Deregulace apoptózy.**

- Normální buňky jsou odstraněny pomocí apoptózy (tj. programovaná buněčná smrt), často v důsledku poškození DNA.
- Nádorové buňky se vyhýbají apoptóze.

### **4. Neomezený replikační potenciál.**

- Během celého života dochází v normálních buňkách ke zkracování koncových částí chromozomů, telomer. Ty se postupně zkracují po každé replikaci DNA. Počet dělení buněk a replikace jejich DNA je tak omezený a dochází k senescenci.
- Nádorové buňky si zachovávají stálou délku telomer, což vede k neomezenému replikačnímu potenciálu.

### **5. Angiogeneze**

- Normální buňky jsou závislé na zásobování kyslíkem a živinami krví, ale cévní řečiště je u dospělého organismu víceméně neměnné.
- Nádorové buňky indukují novotvorbu cév, tzv. proces angiogeneze, nezbytných pro růst, přežití a expanzi nádoru.

### **6. Invazivita a metastázování**

- Normální buňky většinou zůstávají na svém místě v těle a nemigrují.

- Nádorové buňky jsou schopny pohybu v organismu a na novém místě mohou tvořit sekundární ložiska, tzv. metastázy. Pohyb nádorových buněk v organismu je hlavní příčinou úmrtí na rakovinu.

(Hanahan *et* Weinberg, 2000; Pecorino, 2008)

Stejní autoři v roce 2011 revidovali tuto práci a doplnili ji o další 4 znaky:

7. **Deregulace buněčné energetiky.**
8. **Únik před imunitním systémem.**
9. **Genomová nestabilita a mutace.**
10. **Nádorový zánět.**

Poslední dva znaky se vztahují ke zhoubným nádorům. Genomová nestabilita a nádorový zánět společně přímo umožňují nádorovým buňkám metastázovat.

(Hanahan *et* Weinberg, 2011)

### **III. 1. 1. Hlavní příčiny vzniku nádorového onemocnění**

Vzhledem k neustále vzrůstajícímu výskytu rakovinových onemocnění ve vyspělých zemích světa je nezbytné snažit se objasnit příčiny jejich vzniku, vyvíjet nové metody boje proti těmto nemocem, stejně jako pokusit se jim předcházet ([www.who.int](http://www.who.int); [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov); Jemal *et al.* 2011; Shahjehan *et al.* 2018; Nautiyal *et al.* 2018; Liang *et al.* 2018).

*Kancerogeneze* je dlouhodobý několikastupňový proces, při kterém se z normálních buněk stávají buňky nádorové, které vytváří samotný nádor díky působení vnitřních a vnějších faktorů – kancerogenů. Působení těchto faktorů na organismus může vést ke změnám na úrovni DNA kódující onkogeny a nádorové supresory. Faktory vyvolávající vznik nádorových onemocnění dělíme na kancerogeny chemické, fyzikální a biologické (Slabý *et al.* 2015).

Jedny z nejúčinnějších kancerogenů jsou kancerogeny chemické, které rozdělujeme na přímo a nepřímo působící látky. Na molekulární úrovni je mechanismus účinku obou skupin činidel stejný. Mezi nukleotidy DNA a kancerogenem jsou vytvářeny kovalentní vazby, na které buňka nejprve zareaguje aktivací svých opravných mechanismů a dále buď přejde do apoptózy, anebo přežije a získanou mutaci přeneše do další generace. Tím dochází k iniciaci kancerogeneze. Mezi přímo působící chemické

faktory patří alkylační a acylační látky. Nejvýznamnější nepřímo působící chemické kancerogeny jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), které jsou přítomné ve fosilních palivech, dále aromatické aminy a azobarviva (Slabý *et al.* 2015).

Mezi fyzikální kancerogeny řadíme různé druhy záření. Ionizující záření dělíme na částicové (korpuskulární) záření  $\alpha$  a  $\beta$ , dalším typem ionizujícího záření je elektromagnetické (fotonové) rentgenové (X) záření a  $\gamma$  záření. Všechny druhy ionizujícího záření poškozují přímo nebo nepřímo DNA buněk. Přímé poškození DNA je způsobeno tvorbou zlomů při přenosu energie, častější je ale nepřímé poškození genetické informace. Při vzniku tohoto typu poškození je substrátem reakce voda, obsažená hojně v buňkách i mezibuněčné hmotě. Radiolýzou vody vznikají tzv. reaktivní formy kyslíku, které negativně působí na významné struktury organismu. Ultrafialové záření (UV záření) poškozuje DNA buněk tvorbou pyrimidinových dimerů. Toto poškození DNA může být opraveno procesem nukleotidové excizní reparace. Při silné expozici UV záření je ale proces opravy nedostatečně rychlý a vznikají tak mutace, které se mohou přenášet do dalších generací (Pecorino, 2008; Knowles *et Selby*, 2005).

Schopnost vyvolávat nádory u zvířat a člověka mají také některé viry a bakterie. Onkogenní viry lze rozdělit na RNA viry (retroviry) a DNA viry. Významnější jsou v přírodě retroviry, například retrovirus HTLV-1 (lidský T-lymfotropní virus typu 1). Virová částice proniká do buňky a přináší sem enzym reverzní transkriptázu, která přepíše virovou RNA do DNA. Vznikne tzv. DNA provirus, který je integrován do DNA hostitele. Oproti tomu DNA viry interagují s nádorovými supresory a následně je inaktivují, díky čemuž dochází ke zvýšené proliferaci buněk. Většinou je ale pro iniciaci tohoto procesu potřeba přítomnost dalších mutací v DNA pro nádorové supresory. Mezi DNA viry řadíme například opičí virus SV40, lidské papilomaviry (HPV), Virus Epstein-Baarové (EBV), Herpesvirus 8 nebo Virus hepatitidy B. K rozvoji nádorového onemocnění mohou přispět také bakteriální nákazy. Jednou z nich je bakteriální infekce *Helicobacter pylori* vedoucí ke vzniku karcinomu žaludku, která je spojena především s biologickými procesy v souvislosti s chronickým zánětem (Knowles *et Selby*, 2005; Slabý *et al.* 2015).

### III. 1. 2. Invazivita a tvorba metastáz

Většina buněk v lidském organismu po diferenciaci zůstává na jednom konkrétním místě v tkáni nebo orgánu (vyjma hematopoetických buněk) (Slabý *et al.* 2015). Jaterní buňky (hepatocyty) zůstávají v játrech a nemůžeme je najít v plicích a naopak. Orgány těla mají přesně vymezené hranice definované svým okolním prostředím. Strukturální součást prostředí, které obklopuje orgány, je tvořena proteiny extracelulární matrix (ECM). Nádorové buňky se od normálních buněk liší schopností překonávat ECM, šířit se do dalších částí lidského těla a tam tvořit sekundární nádory, tzv. metastázy (Pecorino, 2008). Schopnost metastázovat rozděluje nádorové buňky na benigní a maligní, jak již bylo zmíněno výše. Přesné mechanismy invazivity a metastázování budou popsány v následujících kapitolách.

## III. 2. MECHANISMY NÁDOROVÉ INVAZIVITY NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI

### III. 2. 1. Metastatická kaskáda

Metastázování nádoru je vysoce komplexní proces, který závisí na množství interakcí mezi šířícími se buňkami nádoru a tkáněmi těla hostitele. Buňky musí splnit několik předpokladů, aby mohlo ke vzniku sekundárních nádorů dojít. Buňky primárního nádoru podstupují tzv. epiteliálně mezenchymální přechod, čímž získávají invazní vlastnosti. Průběh vzniku vzdálených metastáz označujeme pojmem *metastatická kaskáda* (Slabý *et al.* 2015).

Proces šíření tumorů začíná invazí nádorových buněk z primárního místa nádoru do okolních fyziologických tkání. Následuje *intravazace* neboli prostoupení jednotlivých buněk nádoru (anebo buněk ve skupině) do cévního nebo lymfatického řečiště, pohyb těchto buněk v oběhovém systému, zachycení nádorových buněk v kapilárním ložisku vzdáleného orgánu, *extravazaci* neboli vystoupení nádorových buněk z cévy nebo lymfy do cílové tkáně. Zde mohou buňky zůstat až několik let v klidovém stádiu, tzv. dormanci, anebo mohou začít okamžitě proliferovat a růst na novém místě těla hostitele. Tento konečný krok vzniku metastázy nazýváme *metastatická kolonizace* (Weinberg, 2014).

Aby mohly buňky migrovat z místa primárního ložiska, je nutné překonat omezení, která spojují a udržují sousední buňky pohromadě u sebe – buněčnou adhezi.

Buněčné adhezní molekuly (CAMs) jsou proteiny, které se exprimují na membráně buněk a zprostředkovávají jejich vzájemné rozpoznávání a také jejich vzájemné extracelulární „zaháčkování“. Většina CAMs patří do jedné z pěti proteinových rodin, kterými jsou: kadheriny, integriny, imunoglobuliny, selektiny a lymfocytové homingové receptory. CAMs jsou zapojeny do mnoha fyziologických i patologických procesů a dnes je již známo, že hrají klíčovou roli při procesu metastázování.

Kadheriny jsou kalcium-dependentní transmembránové glykoproteiny, které přes kateniny interagují s cytoskeletem (Bozzuto *et al.* 2010). Kateniny se často váží na transkripční faktory a indukují v jádře genovou expresi. Pro uvolnění buněk je tedy potřeba potlačit funkci těchto proteinů. Jedním z nejvýznamnějších kadherinů je E-kadherin. E-kadherin svou extracelulární částí udržuje mezibuněčná spojení epitelových buněk a svou intracelulární částí je navázaný na  $\beta$ -katenin,  $\alpha$ -katenin a p120-katenin, což jej propojuje s cytoskeletem. Ztráta E-kadherinu je pozorována u mnoha nádorových onemocnění. Pravděpodobně tak tento protein působí v procesu metastázování supresivně (Weinberg, 2014). K omezení funkce E-kadherinu může dojít mutací jeho genu, hypermetylací promotoru, transkripční represí (zvýšenou expresí Slug a Snail represorů) anebo přímo na úrovni proteinu jeho proteolytickou degradací. E-kadherin je rovněž potlačen v procesu tzv. epiteliálně-mezenchymální tranzice (Wells *et al.* 2008).

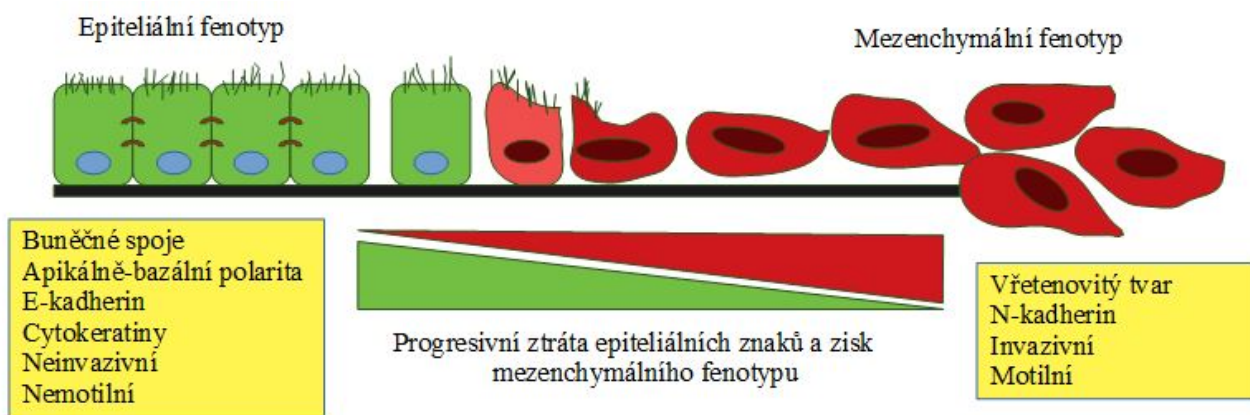
### III. 2. 2. Epiteliálně-mezenchymální přechod

Epiteliálně-mezenchymální přechod (tranzice, EMT) je přechodný reverzibilní proces, při kterém se buňky přeměňují z epiteliálního do mezenchymálního fenotypu. (Viz. **Obr. 1.**) Tato schopnost buněk je klíčová v embryonálním vývoji při gastrulaci a uzavírání neurální lišty. Bylo ale zjištěno, že hraje významnou roli i v průběhu šíření nádorů (Thiery *et Sleeman*, 2006). Nádorové buňky ale, na rozdíl od normálních buněk, neprojdou úplnou přeměnou v mezenchymální buňky (Hugo *et al.* 2007).

EMT je řadou proteinových modifikací a transkripčních změn, vznikajících v důsledku definovaného množství extracelulárních signálů. To může vést k dlouhodobé, ale reverzibilní změně buňky (Hugo *et al.* 2007). Mezi hlavní znaky EMT patří redukce mezibuněčné adherence transkripční represí genů pro některé klíčové proteiny (např. cytokeratiny) a delokalizace kadherinů (adherens junctions), occludinu a kladinu (tight junctions) a také desmoplakinu (dezmozomy).  $\beta$ -katenin



(molekula spojená s E-kadherinem) často mizí z buněčné membrány a přemísťuje se do jádra, kde se účastní signální dráhy EMT (Klymkowsky, 2005). Ztráta epiteliálního E-kadherinu je pak vyvážena získkem mezenchymálního N-kadherinu (Yilmaz *et* Christofori, 2009). Obvodová F-aktinová vlákna cytoskeletu jsou nahrazena sítí stresových vláken. Tyto změny dávají buňkám schopnost se od sebe oddělit, dále umožňují konverzi z apikálně-bazální polarity (typické pro epitelové buňky) na buňky nepolarizované. Buňky nabývají variabilních tvarů a vyznačují se proměnlivou buněčnou adhezí, což způsobí jejich lepší pohyblivost (Lee *et al.* 2006). Expresse epiteliálních intermediálních filament (např. cytokeratinů) je potlačena a expresse ekvivalentního mezenchymálního filamentárního proteinu vimentinu se naopak zvyšuje. Často se objevuje také zvýšení exprese matrixových metaloproteáz (MMPs), jako například MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 a MMP-14, které pravděpodobně usnadňují oddělení buněk (prostřednictvím štěpení E-kadherinu) a proniknutí buněk přes bazální membránu (Hay, 1995). Kompletní přehled EMT markerů je uveden v tabulce **Tab. 1**.



**Obr. 1.** Epiteliálně – mezenchymální přechod. Zdroj: Vlastní kresba, inspirováno <https://krebsforschung.meduniwien.ac.at/forschung-research/research-focuses/tumor-progression-and-metastasis/paola-martinelli/research-projects/>, staženo dne 6. 2. 2019

Jedním z prvních receptorů, který byl identifikován jako „spouštěč“ oddělování mezibuněčných spojů epiteliálních buněk, byl Met tyrozin-kinázový receptor. Aktivace Met přes jeho ligand, hepatocytární růstový faktor (HGF), zvyšuje migrační aktivitu širokého spektra buněčných linií *in vitro* (Lee *et al.* 2006).

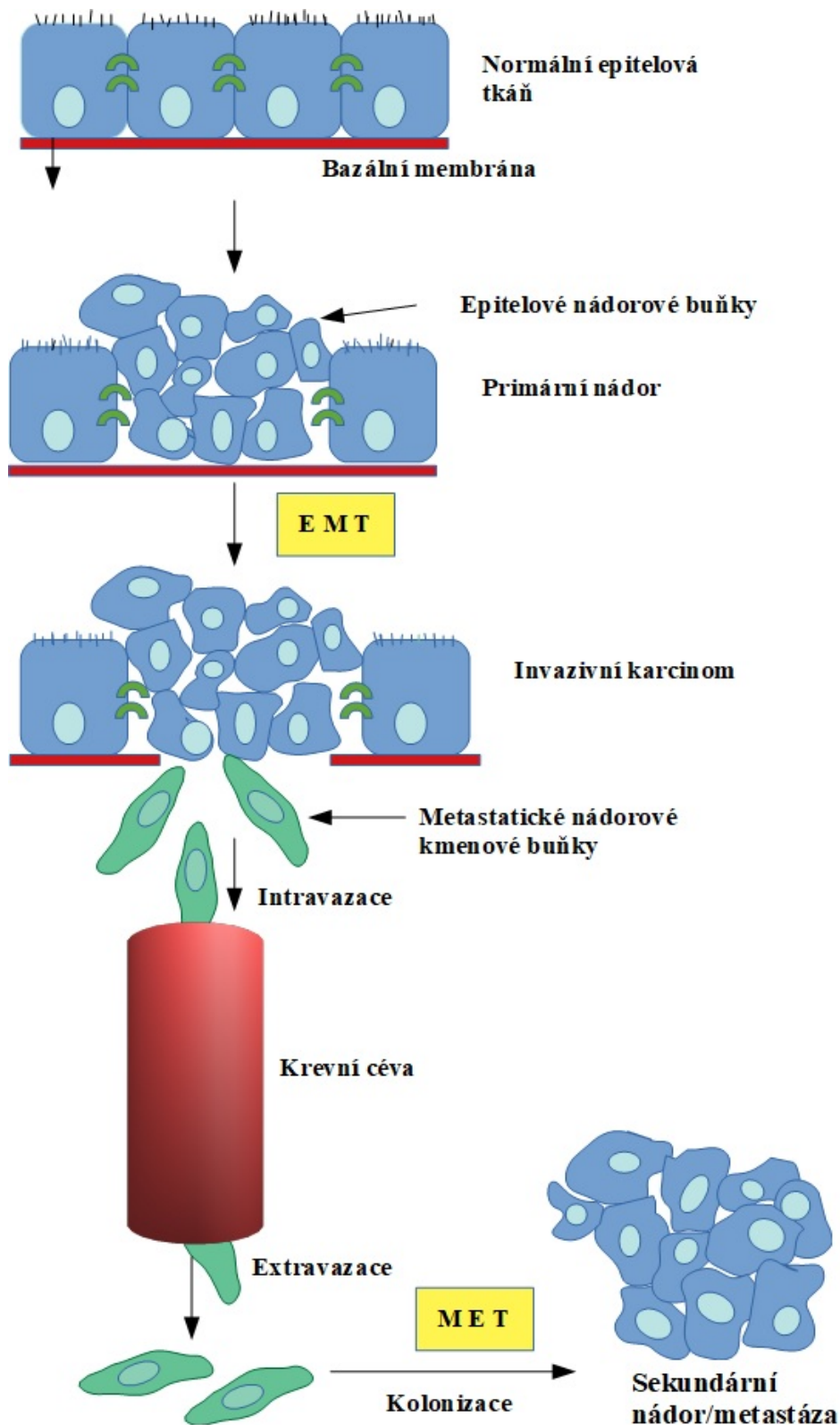
Významnou roli pro aktivaci EMT tedy hrají receptory, především ale řada růstových faktorů, přítomných v nádorovém mikroprostředí. Mezi tyto růstové faktory řadíme například epidermální růstový faktor (EGF), transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), hepatocytární růstový faktor (HGF), fibroblastové růstové faktory (FGF), inzulinu podobný růstový faktor (IGF) a tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Tyto růstové faktory způsobují zvýšenou expresi Snail1 a/nebo Snail2 při EMT. Zvýšení jejich exprese probíhá přes tyrozin-kinázový receptor, který může zároveň aktivovat fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K) a Ras, který dále aktivuje mitogenem aktivovanou kinázu (MAPK), což vede k Snail1/2 upregulaci (Christiansen *et al.* Rajasekaran, 2006). Snail2 a další zástupci Snail rodiny (např. Snail1) indukují EMT represi transkripce E-kadherinu, který je klíčovým proteinem buněčné adherence (Batlle *et al.* 2000; Bolos *et al.* 2003). TGF $\beta$  v EMT může ovlivňovat také signální dráhy malé GTPázy RhoA a Rac1, Ras, PI3K, MAPK, s integrinem spojené kinázy (ILK) a Notch signální dráhu.

**Tab. 1. Markery EMT.** (Převzato z Lee *et al.* 2006)

Zvýšená přítomnost proteinů	Snížená přítomnost proteinů	Zvýšená aktivita proteinů	Proteiny kumulující-se v jádře	Funkční markery <i>in vitro</i>
N-kadherin	E-kadherin	ILK	$\beta$ -katenin	Zvýšená migrace
Vimentin	Desmoplakin	GSK-3 $\beta$	Smad 2/3	Zvýšená invazivita
Fibronektin	Cytokeratiny	Rho	NF $\kappa$ B	Prodlužování buněk
Snail1 (Snail)			Snail1 (Snail)	Rezistence k anoikis
Snail2 (Slug)			Snail2 (Slug)	
Twist			Twist	
FOXC2				
MMP-2, -3, -9				
Integrin $\alpha\beta$ 6				

Jak již bylo zmíněno výše, proces EMT je reverzibilní. Po extravazaci nádorových buněk a jejich adhezi k místu budoucího sekundárního tumoru podstupují buňky *mezenchymálně-epiteliální reverzní tranzici (MER $T$ )*, což je proces reverzní k EMT (Lee *et al.* 2006). Vzhledem k této skutečnosti můžeme pochopit, proč buňky v místě sekundárního nádoru mají stejnou morfologii, jako buňky v primárním ložisku, přestože v průběhu metastatické kaskády musely podstoupit řadu strukturních

i funkčních změn. Buňky ztrácejí svůj přechodně mezenchymální fenotyp, mění svou strukturu a morfologii, vznikají nová mezibuněčná spojení a stávají se znova buňkami epitelovými, včetně obnovení exprese E-kadherinu. Schéma insemínace sekundárních nádorů přehledně zobrazuje obrázek **Obr. 2**. Na modelu E-kadherin negativní buněčné linie karcinomu prsu MDA-MB-231, která byla inokulována do tukových polštářků myši, bylo zjištěno, že sekundární plicní metastázy exprimovaly E-kadherin. Z E-kadherin negativní buňky tedy mohou vznikat E-kadherin pozitivní metastázy (Wells *et al.* 2008).



**Obr. 2.** Schéma inseminace sekundárních nádorů. Na začátku proliferují transformované epiteliální buňky a tvoří primární nádor. V následujícím kroku se epiteliální buňky podrobí EMT, vstupují do lymfy nebo krevních cév (intravazace), které vedou k vzdáleným orgánům, kde opouštějí oběh (extravazace) a podstupují přechod z mezenchymálního na epiteliální fenotyp (MET) za vzniku sekundárních metastáz. Zdroj: Vlastní kresba, převzato z Mishra *et* Johnsen, 2014.

### III. 2. 3. Interakce nádorových buněk s extracelulární matrix

Rakovinné onemocnění se vyznačuje ztrátou fyziologické organizační struktury tkání a aberantním chováním buněčných komponent. Množství genetických mutací a epigenetických změn vyústí až v transformaci buněk. Nádory bývají také někdy přirovnávány k ranám, které se nikdy plně nezhojí (Schafer *et Werner*, 2008). To proto, že nádorové stroma vykazuje některé z charakteristik v nezhojené ráně (Bissell *et Radisky*, 2001).

Například nádory jsou typicky tužší než okolní fyziologická tkáň. Větší tuhost nádorů je vyvolána ukládáním a remodelací ECM rezidentními fibroblasty a zvýšením kontraktility transformovaného epitelu (Butcher *et al.* 2009; Levental *et al.* 2009). Chemokiny a růstové faktory (GFs) navíc indukují zánět (De Wever *et al.* 2008) a mění aktivitu T lymfocytů (Tan *et Coussens*, 2007). Zánět tkáně podněcuje aktivitu stromálních fibroblastů a indukuje jejich transdiferenciaci na myofibroblasty, čímž zahajuje a podporuje tkáňovou desmoplazii (De Wever *et al.* 2008, Desmouliere *et al.* 2004). Myofibroblasty ukládají velké množství proteinů ECM, vylučují GFs a vyvíjejí silné kontraktilní síly na ECM (De Wever *et al.* 2008; Desmouliere *et al.* 2004). V důsledku toho se nově uložená a remodelovaná kolagenová a elastinová vlákna přeorientují a následně zesítují lysyl oxidázu (LOX) a transglutaminázu, čímž se vytvářejí větší, tužší fibrily, které dále posilují ECM tkáň (Butcher *et al.* 2009, Erler *et Weaver*, 2009, Levental *et al.* 2009, Lucero *et Kagan*, 2006, Payne *et al.* 2007, Rodriguez *et al.* 2008). MMPs, které jsou vylučovány a aktivovány nádorovými buňkami a myofibroblasty (De Wever *et al.* 2008, Kessenbrock *et al.* 2010), také přispívají k remodelaci bazální membrány obklopující nádor a uvolňují a aktivují s ECM-spojené GFs (Bosman *et Stamenkovic*, 2003, Kessenbrock *et al.* 2010). Uvolňování GFs, včetně vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), zvyšuje vaskulární propustnost a podporuje růst nových cév. Existuje zesilovací systém mezi tumor-asociovaným ECM tuhnutím spojeným s následnou reciprokou rezistencí ECM. Ta je indukována rezidentními nádorovými buňkami a také myoepiteliální a buňkou generovanou kontraktilitou a působí jako pozitivní zpětnovazebná smyčka k posílení růstu nádoru a jeho přežití. Tento proces vyvolává angiogenezi, invazivitu buněk a nakonec podporuje proces metastázování (Butcher *et al.* 2009, Erler *et Weaver*, 2009, Paszek *et Weaver*, 2004, Paszek *et al.* 2005).

### III. 2. 4. Vliv aktinu a myozinu na migraci nádorových buněk

Aby se mohly nádorové buňky pohybovat, je potřeba určitá síla k překonání faktorů, které působí proti buněčnému pohybu (např. adheze buňka-buňka nebo buňka-ECM, odpor okolního prostředí atd.). Ve zdravých buňkách se F-aktin shlukuje s vlákny myosinu II, složenými z těžkých a lehkých regulačních řetězců, a tvoří proteinový komplex, který využívá energii z hydrolyzy ATP ke zvýšení kontrakce aktin-myosinu (O'Connel *et al.* 2007; Vale *et al.* Milligan, 2000). Výsledná kontraktilní síla pohání morfologickou reorganizaci a remodelaci extracelulární matrix, což usnadňuje pohyb buněk.

Fosforylace lehkých řetězců myosinu II (MLC) je klíčovým mechanismem pro regulaci kontraktility aktinu a myosinu (Somlyo *et al.* Somlyo, 2000). MLC fosforylace podporuje uvolňování konce těžkého řetězce myosinu, což umožňuje jeho shromáždění do vláken a usnadňuje spojení myosinové hlavy s F-aktinem. Když je multimerní myosin spojen s více než jedním aktinovým vláknem způsobí, že vlákna se pohybují vzájemně vůči sobě, a tím vytvářejí kontraktilní sílu.

Bylo publikováno, že fosforylace MLC je zprostředkována četnými kinázami, včetně: Rho-regulované kinázy ROCK1 a ROCK2, ROCK-regulované ZIPK, MRCKa a MRCKb, ILK, DAPK1 a 2, DRAK 1 a 2, PAK a MLCK (Olson *et al.* Sahai, 2009). Schopnost těchto různých kináz fosforylovat MLC nabízí více možných signálních cest směřujících ke společnému cíli - regulaci kontraktility aktin-myosinu. I když by bylo obtížné definovat všechny podmínky a typy buněk, ve kterých specifická kináza fosforyluje MLC, studie s inhibitory malých molekul naznačují, že ROCK1 a ROCK2 jsou hlavní kinázy nezávislé na vápníku, zatímco MLCK je hlavní kináza závislá na vápníku (Olson *et al.* Sahai, 2009). Vápník může usnadnit MLC fosforylaci, stejně tak může přispět k metastázování rakovinných buněk vazbou na proteiny, jako například na protein S100A4 (Garrett *et al.* 2006).

Existují velmi silné důkazy z klinických studií, které prokazují významnou roli nadměrné exprese proteinu S100A4 při zvýšení metastázování a špatné prognóze u široké řady nádorů včetně nádorů prsu, kolorektálních, pankreatických a ledvinových nádorů. S100A4 podporuje schopnost buněk metastázovat pravděpodobně indukovaním remodelace ECM a/nebo přes interakce s receptory na povrchu buňky. Předpokládá se, že S100A4 působí vazbou na těžký řetězec myosinu II (Kriajevska *et al.* 1994) a podporuje zvýšenou směrovou pohyblivost posunem rovnováhy mezi organelami v buňce (Li *et al.* Bresnick, 2006). Navíc protein S100A4 může také ovlivnit kontraktilitu

aktin-myosinu přímou vazbou na F-aktin (Watanabe *et al.* 1993) a na aktin-vázací protein tropomyosin (Takenaga *et al.* 1994).

Tropomyosiny pocházejí ze čtyř odlišných genů (a, b, c, d), které jsou transkribovány a sestříhány do více než 40 tropomyosinových isoform (Gunning *et al.* 2005; Stehn *et al.* 2006). Ačkoli hrají klíčovou úlohu v kontrakci svalů a jsou závislé na vápníku, jejich role v buňkách není tak dobře definována. Různé isoformy se zdají mít odlišné biologické funkce. Expresí konkrétní isoformy jsou tropomyosiny schopné regulovat aktinový cytoskelet. Expres tropomyosinových isoform je také často pozměněna v nádorech. Zdá se, že některé isoformy rekrutují myosin k aktinovým vláknům (Bryce *et al.* 2003) a ovlivňují aktivitu myozinové hlavy, ATPázy a kontraktilitu (Fanning *et al.* 1994). Tropomyosin pravděpodobně rovněž zvyšuje tuhost aktinového vlákna (Adami *et al.* 2003) a chrání F-aktin před působením kofilinu (Ono *et al.* 2002) a gelsolinu (Ishikawa *et al.* 1989). Některé isoformy však ve skutečnosti snižují aktivní hladiny myosinu a podporují propojení kofilinu s aktinovými vlákny, což vede k tvorbě lamellipodií – výběžků cytoplazmatické membrány (Bryce *et al.* 2003). Navíc se isoformy třídí do různých buněčných kompartmentů a tyto distribuce se mohou během vývoje organismu nebo v nádorových buňkách měnit. Výsledkem je, že regulace aktin-myosinu může být ovlivněna i jinými faktory kromě úrovní exprese tropomyosinu (Olson *et al.* Sahai, 2009).

### **III. 2. 5. Role proteáz**

Aby nádorové buňky získaly schopnost invadovat do okolních tkání, je potřeba také zapojení specifických proteáz, které jsou schopny „tvořit cestu“ nádorovým buňkám přes ECM a stroma. Serinové proteázy a matrixové metaloproteázy (MMPs) jsou dvě rodiny enzymů, které jsou pro tento proces klíčové (Friedl *et al.* Wolf, 2003). Některé nádorové buňky dokáží přímo syntetizovat MMPs, častěji ale indukují jejich produkci v okolních tkáních (Kessenbrock *et al.* 2010). Extracelulární matrix metaloproteázový regulátor genové exprese (EMMPRIN) je zvýšeně exprimován v membráně nádorových buněk a indukuje produkci MMPs v přilehlých stromálních buňkách (Biswas *et al.* 1995). MMPs jsou schopny degradovat nejenom všechny strukturální komponenty ECM, ale také další proteiny umístěné na vnější straně buněk (např. EGFs), díky čemuž hrají významnou roli v procesu metastázování, mimo jiné především během procesu angiogeneze. Běžně je exprese těchto zinek-dependentních proteináz přísně regulována na několika úrovních. Patří sem transkripční i post-transkripční modifikace a regulace

MMPs na úrovni proteinu jejich aktivátory a inhibitory. Aktivita MMPs dále závisí i na přesné lokalizaci na povrchu buňky (Sternlicht *et* Werb, 2001). MMPs jsou syntetizovány jako neaktivní formy enzymů, které musí projít procesem „sestříhu“, aby se staly enzymy biologicky aktivními. Dále jejich funkci a aktivitu regulují tzv. endogenní tkáňové inhibitory (TIMPs). Narušení rovnováhy mezi MMPs a TIMPs může způsobit schopnost invazivity nádorových buněk (Galis *et al.* 1994; Visse *et* Nagase, 2003; Nagase *et al.* 2006). MMPs jsou zvýšeně exprimovány ve většině nádorů a jejich expresní profil může indikovat stupeň nádorové progresu u některých druhů rakoviny.

### **III. 3. MECHANISMY INVAZIVITY NÁDOROVÝCH BUNĚK MEZIBUNĚČNOU HMOTOU**

#### **III. 3. 1. ECM**

*Extracelulární matrix* (ECM) je nebuněčnou složkou organismů, přítomnou ve všech tkáních a orgánech. Zajišťuje nejenom základní fyziologickou oporu buněčných komponent, ale je také důležitým prostředkem zahajujícím základní biochemické a biomechanické procesy, které jsou nezbytné pro tkáňovou morfogenezu, diferenciaci a homeostázu (Frantz *et al.* 2010). ECM je vysoce dynamická struktura, která se neustále remodeluje, buď enzymaticky nebo neenzymaticky, a její molekulární složky (kolagen, proteoglykany a glykoproteiny) jsou podrobeny nesčítelným posttranslačním modifikacím. Význam ECM je možné pochopit při studiu široké škály syndromů, které mohou pocházet z genetických abnormalit proteinů ECM (Jarvelainen *et al.* 2009).

Mezi základní složky ECM se řadí voda, bílkoviny a polysacharidy. Každá tkáň má ale ECM s jedinečným složením a morfologií, která je generována během vývoje tkáně prostřednictvím dynamického biochemického a biofyzikálního přenosu informace mezi různými buněčnými složkami (např. epiteliální, fibroblast, adipocyt, endoteliální elementy) a měnícím se buněčným a proteinovým mikroprostředím. Ve skutečnosti je fyzikální, morfologické a biochemické složení ECM nejen specifické pro jednotlivé tkáně, ale také do značné míry heterogenní (Frantz *et al.* 2010).

Adheze buněk k ECM je zprostředkována pomocí ECM receptorů, jako jsou integriny, syndekany a rodina receptorů diskoidinové domény (Harburger *et* Calderwood, 2009; Humphries *et al.* 2006; Leitinger *et* Hohenester, 2007; Xian *et al.* 2010). Adheze zprostředkovává vazbu cytoskeletu k ECM a omezuje migraci buněk skrz ECM (Schmidt *et* Friedl, 2010).



Těmito svými fyzikálními a biochemickými vlastnostmi ECM generuje biochemické a mechanické vlastnosti každého orgánu, jako je jeho pevnost v tahu a tlaku a pružnost, dále také zprostředkovává ochranu buňce tím, že zajišťuje extracelulární homeostázu a zadržování vody uvnitř buňky. ECM také řídí vazbu růstových faktorů a interakci s receptory na povrchu buněk, čímž může vyvolat signální transdukcii a regulovat transkripci genů (Frantz *et al.* 2010). Biochemické, biomechanické, ochranné a organizační vlastnosti ECM se mohou značně lišit v závislosti na typu tkáně (např. plíce vs. kůže vs. kosti) a dokonce i uvnitř jedné tkáně (např. renální kůra vs. renální medulla), ale také jeden fyziologický stav k jinému (normální vs. rakovinný) (Frantz *et al.* 2010).

### III. 3. 2. Invazní struktury

Rakovinné buňky mají jedinečnou schopnost přizpůsobit se různým podmínkám prostředí. To je umožněno různými variantami morfologie buněk a jejich migračních charakteristik (Friedel *et al.* 2011). *In vivo* bylo pozorováno, že nádorové buňky jsou schopné migrovat v lidském organismu z místa primárního nádoru samostatně jako jednotlivé buňky, jako buněčné proudy a nebo také často jako dobře organizované adherentní kolektivy. Na jiném vhodném místě poté vytváří sekundární nádory neboli metastázy.

Během *in vitro* studií bylo identifikováno několik vnitřních faktorů regulujících migrační režim a morfologii buněk. Na rakovinných buňkách migrujících jednotlivě bylo pozorováno, že zvýšení kontraktility aktin-myozinu podporuje migraci podobnou amoebidu, zatímco nižší kontraktilita (a/nebo zvýšená adheze) podporuje více mezenchymální fenotypy (Wolf *et al.* 2003; Sahai *et al.* Marshall, 2003; Sanz-Moreno *et al.* 2008; Bergert *et al.* 2012). Zesílení interakcí buňka-buňka pomocí kadherinů a vazby buněk s ECM prostřednictvím integrinů může podpořit kolektivní migraci rakovinných buněk (Friedel *et al.* 2011). V současné době není dobře objasněno, jak morfologie buněk ovlivňuje schopnost nebo tendenci buněk migrovat jednotlivě nebo kolektivně. Nicméně, buňky s améboidní morfologií mají tendenci migrovat jednotlivě nebo v proudu několika buněk, zatímco epitelální buňky migrují většinou kolektivně.

Buňky s mezenchymální morfologií se mohou nejsnadněji přepínat mezi režimy samostatné buňky, proudu buněk a kolektivní migrace. Například u MDCK buněk (které mají mezenchymální fenotyp) ošetřených hepatocytárním růstovým faktorem

může zvýšená regulace N-kadherinové aktivity podporovat přechod od migrace jednotlivých buněk do kolektivní migrace buněk (Shih *et al.* 2012).

Vedle vnitřních faktorů hraje významnou roli při určování režimu migrace a morfologie rakovinných buněk také rakovinné mikroprostředí.

Jednotlivé způsoby buněčné migrace jsou popsány v následující kapitole.

### III. 3. 3. Způsoby buněčné migrace

Migrace jednotlivých buněk je charakterizována nedostatečnou adhezí buněk k ECM a nízkou korelací v migračním vzoru mezi buňkou a jejími sousedy. Buňky, které migrují jednotlivě, mohou vykazovat různé fenotypy.

#### Améboidní migrace

Buňky, které migrují s nízkou adhezní silou nebo s vysokou kontraktilitou zprostředkovanou aktomyozinem, mají morfologicky sférické tvary. Tento způsob migrace označujeme jako améboidní migraci, podle améby *Dictyostelium discoideum*, která se pohybuje tímto mechanismem (Friedl *et al.* 2001). Améboidní pohyb, který využívá Rac-dependentní filopodia, je charakteristický pro buňky s malými nebo difúzně uspořádanými adhezními místy, která vytvářejí slabou až zanedbatelnou přilnavost k substrátu (Lämmermann *et al.* 2009). Améboidní buňky mají tendenci migrovat bez proteolytického štěpení ECM, protože jsou si schopné přizpůsobením svého tvaru a stlačením ECM a tkání tvořit tzv. „cesty“ (Wolf *et al.* 2003). Původ améboidních nádorů je často hematopoetický nebo neuroektodermální, včetně leukémií, lymfomů a malobuněčného karcinomu plic. Nicméně i ve většině jiných typů nádorů jsou detekovány améboidní typy migrace (Madsen *et al.* 2010; Wolf *et al.* 2003).

Motilita podobná améboidní se vyskytuje v několika variantách:

- 1) buňky, které rychle mění svou morfologii, mají krátké tenké výčnělky a pohybují se ve vysokých rychlostech (0,4-5  $\mu\text{m}/\text{min}$ );
- 2) pomalé velké buňky s chaotickými pohyby;
- 3) buňky s krátkými buněčnými výčnělky spojenými s proteolytickou aktivitou a pohybující se nízkou rychlostí (0,1  $\mu\text{m}/\text{min}$ ).

### **Mezenchymální migrace**

Když jsou cytoskeletální výčnělky a adhezní schopnosti buněk silně vyvinuty, invazivní buňky mají vřetenovitý tvar, prodlouženou morfologii se soustředěnými adhezními místy ECM, která zahrnují multimolekulární integrinové klastry a také zajišťují proteolytickou aktivitu vůči substrátům ECM (Wolf *et al.* 2007). Proteázy lokalizované na povrchu buňky vytvářejí malé mikrotraktury, kterými mohou prostupovat migrující buňky (Friedl *et al.* 2009). Zatímco přední výčnělky buněk mezenchymálního fenotypu postupují přes ECM relativně rychle (0,4  $\mu\text{m}/\text{min}$ ), v některých případech zadní část buněk zůstává nehybná, což vede ve výsledku k relativně pomalému pohybu (0,2  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Mezenchymálně migrující nádorové buňky pocházejí z nádorů pojivové tkáně, včetně sarkomů měkkých tkání. Pocházejí také ze všech ostatních typů nádorů poté, co nádorové buňky de-diferencují a ztrácejí mezibuněčnou adhezi (Brabletz *et al.* 2001; Friedl *et al.* 2009; Sanz-Moreno *et al.* 2008).

**Vícebuněčné proudění** je charakterizováno málo adherentními nebo neadherentními buňkami, které migrují po stejné cestě. Buňky v proudech dosahují rychlosti 1-2  $\mu\text{m}/\text{min}$  a mají výrazně delší a rovnější cesty ve srovnání s izolovanými migračními buňkami a mohou vykazovat améboidní nebo mezenchymální fenotyp (Friedel *et al.* 2011).

**Kolektivní migrace** je charakterizována skupinami buněk, které udržují mezibuněčné adheze po dlouhou dobu a vykazují vysokou korelaci ve směru mezi sousedními buňkami během migrace. Buňky se pohybují buď jako úzké lineární řetězce vedené jednou vedoucí buňkou, nebo jako široké, nepravidelně tvarované řetězce, které obsahují více buněk uprostřed, a jsou vedeny několika vedoucími buňkami (Friedel *et al.* 2011; Alexander *et al.* 2013; Weigelin *et al.* 2012). Kolektivně migrující buňky mohou vykazovat mezenchymální nebo epiteliální fenotyp. Fenotypy se také mohou v některých případech lišit mezi "vedoucími" a "následujícími" buňkami (Khalil *et al.* 2010). Kolektivní migrace je typicky nejpomalejším způsobem migrace rakovinných buněk (0,01-0,05  $\mu\text{m}/\text{min}$ ).

### III. 4. KOMPLEXY RUTHENIA A OSMIA V LÉČBĚ NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Protinádorová léčiva na bázi platiny, jako je například cisplatina, karboplatina a oxaliplatina, jsou jedny z nejčastěji používaných léčiv v klinické praxi při léčbě různých druhů rakoviny .

Mezi nejznámější zástupce léčiv na bázi platiny patří cisplatina (*cis*-diamindichloroplatnatý komplex, cDDP). CDDP je z chemického hlediska neutrální koordinační sloučenina, která je tvořená centrálním atomem platiny. Na centrální atom se váží dvě amonné skupiny a dva atomy chlóru v *cis* geometrii. Vazba amonných skupin je koordinační (pevná), na rozdíl od atomů chlóru, které jsou navázány slabě a ve vodném roztoku mohou být nahrazeny vodou nebo hydroxidovými anionty (Bruhn *et al.*, 1990). V krevním řečišti je poměrně vysoká koncentrace chloridových iontů, zatímco v buňkách je nižší. Atomy chlóru v cytoplazmě proto lehce odstupují a jsou nahrazeny vodou. Díky tomu se cisplatina aktivuje ihned když se dostane do buněk. V této aktivované formě cisplatina reaguje jako elektrofilní činidlo s jakýmkoli nukleofilním činidlem, například s dusíkovými atomy nukleových kyselin. Díky cisplatině dochází k tzv. zesíťování DNA (cross-linking), kde se platina nejčastěji váže na N7 pozici imidazolového kruhu dvou sousedních guaninů (60-65% všech aduktů), anebo méně často na jeden adenin a jeden guanin (20% aduktů). Bylo popsáno více typů vazby k DNA řetězci, ve všech případech ale zůstávají 2 amonné skupiny navázány k molekule cisplatiny (Brabec *et al.* 2017). Několik studií naznačuje, že cisplatina kromě DNA aduktů tvoří také DNA-platina-proteinové adukty (Wozniak *et al.* 2000).

Tvorba aduktů DNA-platina (tedy také změna konformace DNA) je pravděpodobně zodpovědná za cytotoxický efekt cisplatiny. Většina těchto aduktů je ale rozpoznána množstvím DNA-vazebných proteinů a může být odstraněna pomocí několika buněčných opravných mechanismů. Nedávno byla publikována zajímavá studie, popisující místa v genomu, kde tvoří cisplatina adukty nejčastěji. Z této studie je zřejmé, že cílem cisplatiny je mimo jiné také mitochondriální DNA (Shu *et al.* 2016).

Přes nesmírnou oblíbenost léčiv na bázi platiny je ale jejich používání limitováno některými vedlejšími účinky (toxicitou), zároveň také vývojem rezistence. Jako příklad můžeme uvést nefrotoxicitu, jaterní toxicitu, periferní neuropatie, myelotoxicitu a gastrointestinální toxicitu (Guan *et al.* 2015). Tyto závažné vedlejší

účinky omezují použitelnost léčiv na bázi platiny. Na základě tohoto zjištění byla v minulých letech vyvinuta snaha o hledání nových látek, které by byly protinádorovou aktivitou podobné minulé generaci léčiv, ale zároveň vykazovaly nižší úroveň toxicity. Nejen oblíbené platnaté soli vykazují antiproliferační vlastnosti. Některé přechodné kovy (Os, Re, Ru, Ti, Pd, Au, Mn, Cu) mají podobné účinky. Takové sloučeniny se od platnatých komplexů liší strukturou (nejsou planární s *cis*-konfigurací) a některé z nich jsou účinné i proti nádorům, které jsou vůči platině rezistentní.

Ruthenium se za fyziologických podmínek vyskytuje v několika oxidačních stavech ( $\text{Ru}^{\text{II}}$ ,  $\text{Ru}^{\text{III}}$  a  $\text{Ru}^{\text{IV}}$ ). Rutheniové komplexy vykazují stejnou kinetiku substituce ligandů jako platnaté komplexy ( $\text{Pt}^{\text{II}}$ ) ve vodném roztoku. Díky tomu mohou být alternativou k léčivům na bázi platiny. V posledních desetiletích bylo vyvinuto a testováno několik rutheniových komplexů ( $\text{Ru}^{\text{II}}$  a  $\text{Ru}^{\text{III}}$ ), u kterých byla prokázána antiproliferační aktivita u různých typů nádorů. Při vývoji nových rutheniových komplexů je zejména důležité se zaměřit na jejich rozpustnost, možnost cílené aplikace a absorpce. Lakomska a její spolupracovníci vyvinuli dva  $\text{Ru}^{\text{III}}$  komplexy s triazolpyrimidinovými ligandy (Lakomska *et al.* 2013). Ukázalo se, že přidáním objemných heterocyklických ligandů se cytotoxicita obou komplexů zvýšila. Tyto komplexy například vynikají velkou účinností proti lidskému karcinomu plic A-549 a T47D buněčné linii karcinomu prsu s  $\text{IC}_{50}$  hodnotou v rozmezí 0.02-2.4 nM. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  vyjadřuje koncentraci testované látky, při které přežívá 50 % buněk. Studie připisují tak velkou cytotoxicitu vysoké lipofilitě nových komplexů, která obecně zvyšuje prostupnost látek do buněk. Pierroz a jeho spolupracovníci syntetizovali sérii  $\text{Ru}^{\text{II}}$  polypyridylových komplexů, které jsou nasycené a inertní (Pierroz *et al.* 2012). Tyto komplexy mají cytotoxicitu (hodnoty  $\text{IC}_{50}$ ) pro 3 testované kultury buněk srovnatelnou s hodnotami cisplatinu a při léčbě cisplatinu-rezistentních karcinomů mají lepší účinnost než cisplatinu. Bylo zjištěno, že cílem těchto komplexů je mitochondriální DNA nádorů, kde indukují apoptózu. Je zajímavé, že takto malé strukturální změny při vývoji kovových komplexů mohou mít významný dopad na jejich výslednou cytotoxicitu i cílenou lokalizaci. Li a spolupracovníci také syntetizovali několik  $\text{Ru}^{\text{II}}$  komplexů (Li *et al.* 2012). Tyto komplexy byly testovány na několika nádorových buněčných liniích a také pro kontrolu na nenádorové buněčné linii lidských fibroblastů (HS68). Díky tomu byla prokázána selektivní cytotoxicita vůči nádorovým buňkám, ale velmi malá toxicita proti normálním zdravým HS68 buňkám. Komplexy pravděpodobně indukují kaspáz-

dependentní apoptózu v nádorových buňkách prostřednictvím superoxidů. Qian a jeho spolupracovníci prezentovali Ru<sup>II</sup> komplexy, které se preferenčně akumulují v mitochondriích HeLa buněk a indukují apoptózu mitochondriální cestou, což zahrnuje reaktivní kyslíkové radikály, depolarizaci mitochondriální membrány a aktivaci Bcl-2 a kaspáz (Qian *et al.* 2013). Sadler, Dyson a ostatní vyvinuli sérii Ru<sup>II</sup> komplexů s aromatickými uhlovodíky s protinádorovou aktivitou. Tyto organokovové sloučeniny jsou stabilní v živém organismu, jsou amfifilní a velmi účinné proti různým modelovým nádorům (Kilpin *et al.* 2013; Khan *et al.* 2014; Romero-Canelon *et al.* 2013). Ru<sup>II</sup>-heterocykly nabízejí základ pro inkorporaci široké škály funkčních skupin do kovového centra nebo do pozice ligandů (Ang *et al.* 2011; Barry *et al.* 2012).

Největšího úspěchu bylo ale dosaženo až s vývojem tří různých sloučenin ruthenia, NAMI-A, KP1019 a NKP1339, které již začaly být klinicky testovány (Zeng *et al.* 2017). Tyto komplexy vykazují podobnou účinnost, ale také relativně nízkou obecnou hodnotu toxicity ve srovnání s protinádorovými léčivými látkami na bázi platiny (Qiu *et al.* 2017) a mohly by být potenciálně užitečné při léčbě metastatických nádorů anebo nádorů rezistentních k léčbě cisplatinou. Všechny tyto komplexy jsou strukturně podobné, ale mají rozdílnou cytotoxickou aktivitu. Látka NAMI-A vykazuje malou aktivitu vůči primárním nádorům, ale je velmi užitečná proti sekundárním nádorům, například inhibuje vznik/progresi plicních metastáz. Oproti tomu látka KP1019 vykazuje potenciální aktivitu vůči primárním nádorům, zejména kolorektálnímu karcinomu, který vykazuje rezistenci vůči cisplatině. Nutno podotknout, že oba zmíněné komplexy jsou jen málo aktivní *in vitro*, ale jsou lépe tolerovány u *in vivo* klinických aplikací (Sava *et al.* 2011). Nicméně výsledky stále nejsou stoprocentní. Látka NAMI-A byla testována na zvířatech a bylo zjištěno, že může poškozovat ledviny a zvyšovat hladiny sérového kreatininu (Magnarin *et al.* 2000). Látka KP1019 je také toxická pro ledviny, navíc poškozuje i kostní dřeň (Keppler *et al.* 1990). Před zavedením do klinické praxe bude proto třeba dalšího výzkumu mechanismu biologického účinku těchto látek.

Vedle intenzivního výzkumu a vývoje rutheniových komplexů během posledních let zůstávají biologicky aktivní osmiové komplexy jen málo popsány. Nicméně osmium nabízí několik odlišných vlastností od ruthenia, které by mohly být užitečné. Za fyziologických podmínek se jedná o relativně stabilní a inertní sloučeniny. K vývoji osmiových komplexů byly použity různé strategie, často byla také vytvořena strukturní

analogů k ruthenioým sloučeninám. Díky tomu vznikla strukturně různorodá knihovna osmiových komplexů zahrnující mononukleární koordinační komplexy, multinukleární klustery a organoosmiové sloučeniny se širokou škálou chemických a biologických vlastností (Colangelo *et al.* 2005; Kong *et al.* 2008; Barry *et al.* 2010; Hartinger *et al.* 2011).

Mechanismus účinku protinádorových osmiových komplexů není stále dost dobře objasněn. Osmiové<sup>(II)</sup> heterocyklické komplexy obsahující ligandy s deriváty azopyridinu vykazují cytotoxicitu proti řadě nádorových buněčných linií v řádech nanomolů (Fu *et al.* 2010). Podobné osmiové komplexy byly testovány na buněčné linii malobuněčného karcinomu plic A549 a bylo zjištěno, že indukují apoptózu zprostředkovanou mitochondriemi a blokují vstup buněk do S-fáze buněčného cyklu (van Rijt *et al.* 2014). Polypyridylové osmiové(II) komplexy inhibují protein-protein interakce (Liu *et al.* 2016; Yang *et al.* 2017). Buněčná linie karcinomu prsu HMLER ošetřená osmium(IV)nitrido komplexem [OsCl<sub>3</sub>N(phen)] měla o 50 % menší výskyt změn v genetické informaci buněk, které kumulací mohou vést k nádorovému bujení. Pro studium mechanismu působení osmiových komplexů byla sestavena shRNA knihovna. Díky této knihovně mohly být provedeny experimenty, které naznačují, že mechanismus účinku osmiových komplexů zahrnuje porušení DNA řetězců, aktivaci dráhy p53, zastavení buněčného cyklu v G2/M bodě a kaspáz-dependentní apoptózu. Druhá cesta je přes indukci stresu endoplazmatického retikula, vedoucí k up-regulaci proteinů, zvětšení endoplazmatického retikula a p53-dependentní apoptózu (Berger *et al.* 2018).

Jak již bylo zmíněno výše, nové látky s možnou protinádorovou aktivitou je před zavedením do klinické praxe nutné testovat. K tomu se používají vybrané buněčné linie. Jednou z těchto používaných testovacích buněčných linií je linie *MDA-MB-231*, kterou jsem se zabývala i v této diplomové práci.

*MDA-MB-231* je vysoce agresivní, invazivní a velmi špatně diferencovaná triple negativní buněčná linie adenokarcinomu prsu. Mezi základní znaky této buněčné linie patří snížení exprese estrogenních receptorů (ER), dále progesteronového receptoru (PR) a HER2 receptoru (receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2) (Liu *et al.* 2003; Chavez *et al.* 2010).

Podobně jako u jiných invazivních nádorových buněčných linií je schopnost buněk *MDA-MB-231* metastázovat zprostředkována proteolytickou degradací ECM. V důsledku chybějící exprese ER a PR a amplifikace HER2 byla buněčná linie nejprve

klasifikována jako "bazální" buněčná linie rakoviny prsu. Nicméně nyní víme, že se MDA-MB-231 buněčná linie řadí do molekulárního subtypu s nízkou hladinou klaudinu, jelikož vykazuje down-regulaci klaudinu-3 a klaudininu-4, nízkou expresi Ki-67 proliferačního markeru, obohacení pro markery spojené s epiteliálně-mezenchymálním přechodem a expresi genů spojených s kmenovými buňkami rakoviny prsu (cancer stem cells, CSC), jako je CD44+CD24-/low fenotyp (Holiday *et Speirs*, 2011).

Ve 3D kultuře vykazuje buněčná linie endoteliální morfologii (Harrell *et al.* 2014) a je charakterizována svým invazivním fenotypem. Tvoří stelátové projekce, které často přemostují více buněčných kolonií (Kenny *et al.* 2007).

Triple-negativní karcinom prsu je agresivní forma rakoviny prsu s omezenými možnostmi léčby. Pochopení molekulární podstaty triple-negativního karcinomu prsu je proto velmi důležité pro vývoj nové účinnější léčby. V důsledku toho bylo provedeno mnoho studií o potenciálně účinných látkách pro tento konkrétní typ rakoviny prsu s použitím buněčné linie MDA-MB-231.

MDA-MB-231 buněčná linie je především hojně využívána pro výzkum kostních metastáz (Simmons *et al.* 2015). Byly také izolovány subklony buněk MDA-MB-231, které se přednostně metastázuji do kostí, mozku a plic myší po intraventrikulární injekci, a tak umožňují identifikaci genů a biochemických cest, které jsou potenciálními mediátory tvorby metastáz na konkrétní místa organismu (Chavez *et al.* 2010; Bos *et al.* 2009; Kang *et al.* 2003; Minn *et al.* 2005; Minn *et al.* 2005).



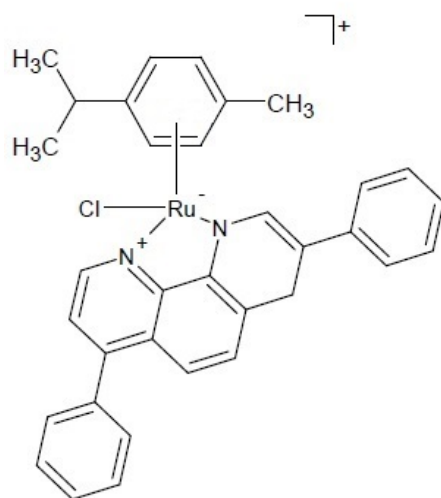
## IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### IV. 1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

- Buňky lidského triple negativního adenokarcinomu prsu - linie MDA-MB-231: European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie
- Růstové médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): Biosera, Francie
- Fetální bovinní sérum (FBS = Fetal Bovine Serum): Sigma, Česká republika
- Antibiotika
  - penicilin: Sigma, Česká republika
  - streptomycin: Sigma, Česká republika
- Neesenciální aminokyseliny: Sigma, Česká republika
- Bovinní sérový albumin (BSA = Bovine Serum Albumin): Takara, Japonsko
- Trypsin/EDTA: Sigma, Česká republika
- Dimethylsulfoxid (DMSO): Duchefa, Nizozemsko
- Trypanová modř: Sigma, Česká republika
- Neutrální červeň (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylfenazine hydrochlorid): Sigma, Česká republika
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS): Serva, Německo
- Kyselina trichloroctová (TCA): Sigma, Česká republika
- Kyselina octová: Sigma, Česká republika
- Sulforhodamin B: Sigma, Česká republika
- Ethanol: Penta, Česká republika
- Chlorid sodný: Sigma, Česká republika
- Chlorid draselný: Sigma, Česká republika
- Hydrogenfosforečnan disodný: Sigma, Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný: Sigma, Česká republika

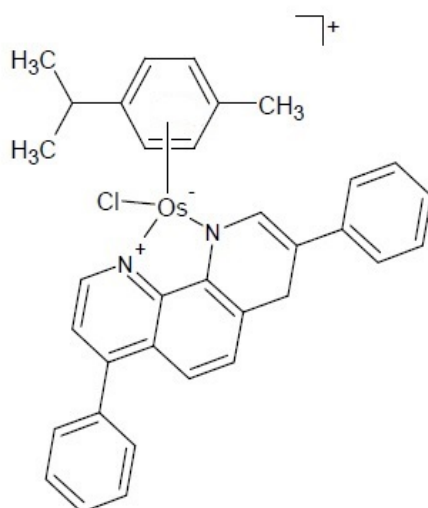
#### IV. 1. 2. Použité komplexy

- Cisplatina (*cis*-diamindichloroplatnatý komplex): Sigma, Česká republika
- Komplex 1 – (C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>ClRuPF<sub>6</sub>) – viz. Obr. 3.



**Obr. 3.** Chemická struktura komplexu (1).

- Komplex 2 – (C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>ClOsPF<sub>6</sub>) – viz. Obr. 4.



**Obr. 4.** Chemická struktura komplexu (2).

Komplexy (1) a (2) laskavě poskytl doc. Štarha (RCPTM, Olomouc). Všechny látky byly vždy těsně před použitím rozpuštěny v DMSO a dále ředěny dle potřeby.

### IV. 1. 3. Použité roztoky

Fosfátový pufr 10x 7,4 pH (PBS 10x)

- 150 mM chlorid sodný (NaCl)
- 2 mM chlorid draselný (KCl)
- 10 mM hydrogenfosforečnan disodný (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
- 2 mM dihydrogenfosforečnan draselný (KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Zásobní roztok neutrální červeně

- 40 mg neutrální červeně
- 10 ml PBS 1×
- Uchovávat nejdéle 2 měsíce ve tmě při pokojové teplotě

Odbarvovací roztok neutrální červeně

- 50 % ethanol (EtOH)
- 49 % deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- 1 % kyselina octová (CH<sub>3</sub>COOH)

Sulforhodamin B 0.4% w/v

- 400 mg sulforhodaminu B
- 100 ml 1% kyseliny octové (CH<sub>3</sub>COOH)
- Uchovávat nejdéle 6 měsíců při teplotě 4 °C

## IV. 2. PŘÍSTROJE

- Vodní lázeň: SB-12L shaking water bath, Benchmark Scientific, USA
- CO<sub>2</sub> inkubátor: MCO-18AC-PE CO<sub>2</sub> incubator, Panasonic Biomedical, Japonsko
- Automatická počítací buněk: TC20 automated cell counter, Bio-Rad Laboratories, USA
- Destičkový spektrofotometr: SynergyMx, BioTek Instruments, USA
- Laminární box: SafeFAST Classic 212, Faster, Itálie
- Mikroskop: NIB-100, MIKRO, spol. s.r.o.

- Třepačka: Universal Orbital Shaker OS-20, BOECO, Německo

## **IV. 3. METODY**

### **IV. 3. 1. Kultivace buněk**

Buňky MDA-MB-231 byly kultivovány v médiu DMEM s přidavkem antibiotik (penicilin  $10 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  a streptomycin  $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin. Buňky byly drženy v inkubátoru při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  a atmosféře s 5% obsahem  $\text{CO}_2$ . Po dosažení 85-95% konfluence (vytvoření jednotné souvislé vrstvy těchto adherentních buněk) byly buňky dle standardního protokolu pasážovány za pomoci trypsinu/EDTA. Pasáž probíhala v závislosti na rychlosti růstu buněk zhruba 2x týdně. Práce byla prováděna v aseptickém prostředí.

Před začátkem práce byly kultivační médium a fosfátový pufr přehřátý ve vodní lázni na teplotu  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , trypsin byl rozmrazen při pokojové teplotě. Buňky v T-75 kultivační lahvi (TPP, Švýcarsko) byly zkontrolovány pod mikroskopem. Následně bylo v laminárním boxu za aseptických podmínek odsáto staré kultivační médium a buňky byly opláchnuty PBS  $1\times$ . Po odsátí fosfátového pufru bylo k buňkám připipetováno 1.5 ml trypsinu a kultivační láhev byla umístěna na 2 min do inkubátoru. Dále byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem, opatrně sklepany z kultivačního povrchu a v laminárním boxu opláchnuty plnohodnotným kultivačním médiem. Opětovným nasáváním a vypouštěním buněk pipetou byly rozvolněny buněčné shluky, za účelem vytvoření homogenní buněčné suspenze. Do nové kultivační láhve bylo napipetováno 10 ml kultivačního média s obsahem séra, antibiotik a neesenciálních aminokyselin a 2 ml buněčné suspenze obsahující  $10^6$  buněk. Kultivační láhev byla umístěna v inkubátoru pro další práci.

### **IV. 3. 2. Počítání buněk**

Pro testování cytotoxicity vybraných komplexů a SRB test bylo nutné znát přesný počet buněk v buněčné suspenzi. Za tímto účelem bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze z kultivační láhve a obarveno přidáním 10  $\mu\text{l}$  trypanové modře. Vzorek byl pipetován na speciální počítací sklíčko a vložen do automatické počítačky. Celkový počet buněk, procento a celkový počet živých buněk bylo následně vyhodnoceno na automatické

počítače na základě analýzy obrazu. Mrtvé a živé buňky vykazují odlišnosti v propustnosti jejich cytoplazmatických membrán pro trypanovou modř. Trypanová modř je kyselé azobarvivo, které velmi rychle zabarvuje mrtvé buňky, které mají narušenou integritu cytoplazmatické membrány, na rozdíl od živých buněk. Živé buňky přes svoji intaktní buněčnou membránu barvivo nepropustí, případně jej aktivně transportují ven z vnitrobuněčného prostoru (Freshney, 2005).

### IV. 3. 3. Test cytotoxicity

Pro testování cytotoxicity vybraných komplexů byly buňky sazeny na 96-jamkové destičky v počtu 10 000 buněk na jamku ve 100  $\mu\text{l}$  kultivačního média a drženy po dobu 24 hodin v inkubátoru za kultivačních podmínek. Buňky byly poté ošetřeny cisplatinou v rozsahu koncentrací 0.2  $\mu\text{M}$  až 100  $\mu\text{M}$  nebo komplexy (1) a (2) v rozsahu koncentrací 0.1  $\mu\text{M}$  až 50  $\mu\text{M}$ . Komplexy byly vždy těsně před použitím rozpuštěny v 10% DMSO a následně ředěny do kultivačního média. Koncentrace DMSO v médiu nebyla nikdy vyšší než 0.2 %, aby neovlivňovala životaschopnost buněk. Po ošetření byly buňky drženy v inkubátoru po dobu 72 hodin. Cytotoxicita byla následně stanovena pomocí testu s neutrální červení.

Neutrální červeně je barvivo schopné pasivní difúzí pronikat do živých buněk a ukládat se do sekundárních lysozomů, kde se váže na fosfátové skupiny lysozomální matrix. Na základě toho jsme schopni odlišit živé buňky od mrtvých. (Repetto *et al.* 2008).

Nejprve bylo naředěním zásobního roztoku neutrální červeně kultivačním médiem DMEM (bez obsahu fetálního bovinního séra, antibiotik a neesenciálních aminokyselin) na koncentraci 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  připraveno médium s neutrální červení. Z 96-jamkové destičky bylo opatrně vyklepnuto staré kultivační médium a buňky byly v laminárním boxu opláchnuty 100  $\mu\text{l}$  PBS 1 $\times$  na jednu jamku. Následně bylo do jamek k buňkám připipetováno 100  $\mu\text{l}$ /jamka předem připraveného média s neutrální červení a buňky byly přeneseny do inkubátoru na dobu 2 hodin. Poté bylo z destičky odstraněno médium s barvivem a buňky byly opláchnuty 150  $\mu\text{l}$  PBS 1 $\times$  na jednu jamku. Do každé jamky bylo připipetováno 150  $\mu\text{l}$  odbarvovacího roztoku neutrální červeně a destička byla po dobu 5 minut umístěna na třepačku při 150 rpm. Absorbance v jednotlivých jamkách destičky byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Na základě naměřených hodnot absorbance byla stanovena cytotoxicita pro vybrané testované látky.

Byla vytvořena tabulka v programu Microsoft Excel, kde byly vypočteny průměry hodnot absorbance, které byly dále přiřazeny k příslušným koncentracím testovaných látek. Dále bylo pracováno s programem GraphPad Prism4 (GraphPadPrism Software, Inc., USA), kde byly z grafické závislosti viability buněk [%] na koncentraci testované látky [ $\mu\text{M}$ ] vypočteny hodnoty  $\text{IC}_{50}$  (The Half Maximal Inhibitory Concentration), tedy hodnoty koncentrací platiny nebo komplexů (1) či (2), při kterých daná látka způsobí smrt 50 % buněk. Pomocí programu Microsoft Excel (Microsoft, USA) byly vypočteny aritmetické průměry a směrodatné odchylky hodnot  $\text{IC}_{50}$  obou testovaných látek.

#### IV. 3. 4. Wound-healing esej

Wound-healing esej je jednoduchá a levná metoda, také jedna z prvních metod, které byly vyvinuty pro studium migrační aktivity buněk *in vitro*. Principem metody je napodobování migrace buněk při hojení ran *in vivo*. Základní kroky zahrnují vytvoření "rány" v buněčné monovrstvě, zachycení fotografií buněk na začátku experimentu a dále v pravidelných časových intervalech během kultivace, a nakonec porovnání snímků za účelem kvantifikace úspěšnosti migrace buněk (Rodriguez, 2005).

Buňky byly sazeny na 6 cm Petriho misky v počtu 2 500 000 buněk na misku ve 4 ml kultivačního média a byly drženy v inkubátoru při 37 °C a 5%  $\text{CO}_2$  po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byly misky zkontrolovány pod mikroskopem. Následně bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS 1 $\times$ . Do misek byly připipetovány 4 ml média s 1 % FBS a buňky byly ponechány v tomto médiu do druhého dne v inkubátoru. Po 24 hodinách byla pomocí plastové špičky (200  $\mu\text{l}$ ) od automatické pipety vytvořena „jizva“ v buněčné monovrstvě. Poté bylo odsáto médium a buňky byly dvakrát opláchnuty PBS 1 $\times$ . Dále byly k buňkám přidány 4 ml kultivačního média obsahující testované látky (cDDP, komplex (1) nebo (2)) o koncentraci odpovídající 65 %  $\text{IC}_{50}$  daných látek po 72 hodinách (hodnoty  $\text{IC}_{50}$  viz **Tab. 2.**). V jedné z Petriho misek byly k buňkám pipetovány pouze 4 ml kultivačního média (bez testovaných látek) pro kontrolu. Buňky byly vyfotografovány a dále drženy v inkubátoru, následně byly vyfoceny po 24 hodinách digitálním fotoaparátem.

**Tab. 2.** Tabulka hodnot  $IC_{50}$  pro dané komplexy použité pro wound-healing esej na MDA-MB-231 buňkách.

Testovaný komplex	Hodnota $IC_{50}$	65 % $IC_{50}$
cDDP	15.200 $\mu\text{M}$	9.88 $\mu\text{M}$
Komplex (1)	0.830 $\mu\text{M}$	0.540 $\mu\text{M}$
Komplex (2)	1.134 $\mu\text{M}$	0.737 $\mu\text{M}$

#### IV. 3. 5. Re-adhezní test

Buňky byly sazeny na 6 cm Petriho misky v počtu 1 500 000 buněk na misku ve 4 ml kultivačního média DMEM s přidavkem antibiotik (penicilin  $10 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  a streptomycin  $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin a byly drženy v inkubátoru po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách bylo z kultivačních misek odsáto staré médium a buňky byly opláchnuty PBS 1×. Do každé z misek bylo připipetováno médium DMEM obsahující 10 % fetálního bovinního séra a 0.1 % BSA a buňky byly umístěny do inkubátoru na 24 hodin. V dalším kroku byly buňky ošetřeny komplexy cDDP, (1) nebo (2) o koncentracích rovných čtyřnásobku jejich  $IC_{50}$ , která byla zjištěna experimentálně během měření cytotoxicity, a byly umístěny do inkubátoru. Po uplynutí 1 hodiny a 40 minut bylo z kultivačních misek odsáto médium, buňky byly opláchnuty PBS 1× a do každé misky byly připipetovány 2 ml kultivačního média s přidavkem 0.1% BSA. Buňky byly opatrně seškrabány ze dna kultivační nádoby a důkladně resuspendovány automatickou pipetou za účelem oddělení buněk od sebe a vytvoření homogenní buněčné suspenze. Buňky byly ponechány 15 minut při pokojové teplotě pro rekonstituci povrchových receptorů. Buňky byly spočítány na automatické počítače a nasazeny na 96-jamkové destičky v počtu 30 000 buněk na jamku ve 100  $\mu\text{l}$  média. Buňky byly ponechány v inkubátoru po dobu 30 minut při 37 °C a 5%  $\text{CO}_2$ . Následně byly re-adherované buňky barveny sulforhodaminem B dle postupu uvedeného níže (viz SRB test).

#### IV. 3. 6. SRB test

Sulforhodaminový test je velmi vhodný pro kvantifikaci schopnosti invazivity nádorových buněk a zároveň umožňuje stanovit míru cytotoxicity léčiv. Tato metoda je založena na schopnosti sulforhodaminu B vytvářet elektrostatické vazby s bázemi aminokyselinových zbytků buněk, které jsou fixované kyselinou trichloroctovou. Vazba

závisí, mimo jiné, také na pH. Za kyselých podmínek se barvivo váže do buněk, za mírně zásaditého pH může být barvivo naopak extrahováno (Skehan, 1990).

Re-adherované buňky (*viz* Re-adhezní test) byly zkontrolovány pod mikroskopem. Z destičky bylo vyklepnuto médium a buňky byly dvakrát propláchnuty PBS 1x. Do každé jamky bylo připipetováno 100  $\mu$ l 10% kyseliny trichloroctové. Takto ošetřené buňky byly umístěny v lednici při teplotě 4 °C po dobu 1 hodiny, čímž došlo k jejich fixaci. Po ukončení fixace byla kyselina z destičky odstraněna a vzorky byly třikrát propláchnuty deionizovanou vodou. Destičky s buňkami byly sušeny při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l sulforhodaminového barviva a buňky byly takto barveny po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Barvivo bylo z desek vyklepnuto a vzorky byly třikrát propláchnuty 1% kyselinou octovou. Po odpaření kyseliny octové bylo k buňkám přidáno po 100  $\mu$ l 10mM Tris na jamku v desce a destička byla umístěna na třepačku při 60 rpm na 5 minut (Skehan, 1990). Po rozpuštění barviva byla intenzita zbarvení v jamkách desky stanovena spektrofotometricky při vlnové délce světla 570 nm. Čím bylo tmavší zbarvení roztoku (a vyšší absorbance), tím byl vyšší počet re-adherovaných buněk. Na základě naměřených hodnot absorbance byla stanovena schopnost re-adherence buněk ošetřených vybranými látkami. Výsledky měření byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism4 (GraphPadPrism Software, Inc., USA). Hodnoty testovaných látek byly vztaženy ke kontrole, která představuje 100 % re-adherovaných buněk. Dále byl proveden t-test, který slouží k porovnání, zda se výsledky měření pro testované látky statisticky významně liší od kontroly.



## V. VÝSLEDKY A DISKUZE

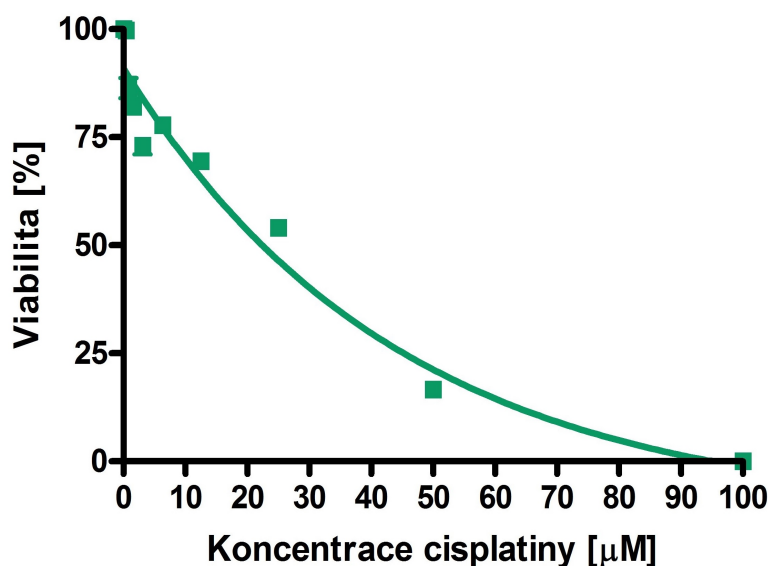
V této kapitole jsou uvedeny výsledky experimentů provedených v Laboratoři molekulární biofyziky a farmakologie Univerzity Palackého v Olomouci v rámci praktické části předložené diplomové práce. Hlavním cílem práce bylo testování cytotoxicity vybraných kovových komplexů a jejich vlivu na adherenci a invazní vlastnosti triple-negativní buněčné linie karcinomu prsu MDA-MB-231. Konkrétně byla měřena cytotoxická aktivita nového komplexu ruthenia (1) a také jeho přesného analogu na bázi osmia (2). Dále byla testována schopnost buněk (po ošetření danými komplexy) re-adherovat ke kultivačnímu povrchu a také zacelit „ránu“ vytvořenou v buněčné monovrstvě. Všechny experimenty byly pro kontrolu a možnost srovnání provedeny také s cDDP. Výsledky byly získány za použití kolorimetrických testů, konkrétně barvení neutrální červení a sulforhodaminem B, dále byla také provedena wound-healing esej a re-adhezní test. Postup práce pro dané testy je popsán v kapitole Metody. Výsledky mé práce jsou shrnuty v následujících kapitolách.

### 1. TEST CYTOTOXICITY

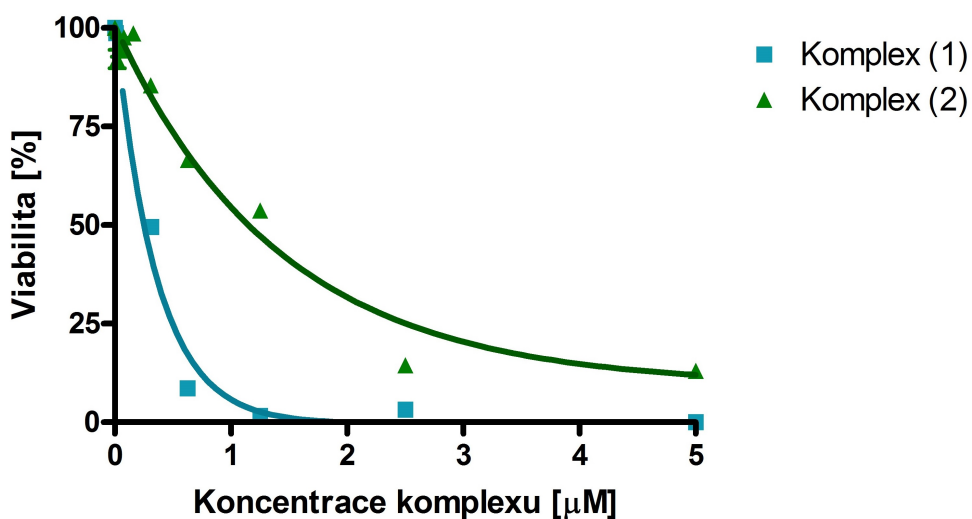
Na úvod praktické části diplomové práce bylo nutno stanovit hodnoty cytotoxicity pro cisplatinu i testované komplexy ruthenia a osmia. Pro toto testování byl vybrán protokol barvení neutrální červení. Tento test poskytuje kvantitativní odhad počtu životaschopných buněk v kultuře. Jedná se o jeden z nejpoužívanějších testů cytotoxicity s mnoha biomedicínskými a environmentálními aplikacemi především díky nízké ceně a vysoké citlivosti. Metoda je založena na schopnosti životaschopných buněk začlenit a vázat neutrální červeně v lyzozomech. Buňky se kultivují v tkáňových kultivačních deskách s 96 jamkami a ošetří se dle protokolu barvení. Destičky se potom inkubují po dobu 2 hodin s médiem obsahujícím neutrální červeně. Buňky se následně promyjí, barvivo se extrahuje a následně se odečte pomocí spektrofotometru absorbance v každé jamce destičky.

Testování cytotoxicity bylo experimentálně provedeno tak, že buňky byly vysazeny na 96-jamkové kultivační destičky v hustotě 10 000 buněk ve 100  $\mu$ l kultivačního média a po 24 hodinách v inkubátoru byly ošetřeny příslušným kovovým komplexem. Rozsah koncentrací pro cDDP byl stanoven na 0.2 – 100  $\mu$ M a pro

komplexy (1) a (2) pak 0.1 – 50  $\mu\text{M}$ . Po ošetření byly buňky drženy v inkubátoru po dobu 72 hodin a následně byla vyhodnocena cytotoxicita pomocí testu s neutrální červení. První reprezentativní graf (**Obr. 5.**) vyjadřuje vliv koncentrace cDDP na přežívání (viabilitu) buněk MDA-MB-231. V dalším grafu (**Obr. 6.**) byly porovnány testované komplexy (1) a (2).



**Obr. 5.** Graf závislosti viability MDA-MB-231 buněk na koncentraci cDDP.



**Obr. 6.** Graf závislosti viability MDA-MB-231 buněk na koncentraci komplexů (1) a (2).

Z grafických závislostí viability MDA-MB-231 buněk na koncentraci testovaných látek byly také pomocí programu GraphPad Prism4 vypočteny jejich hodnoty cytotoxicity, které byly vyjádřeny jako hodnoty IC<sub>50</sub>. Hodnota IC<sub>50</sub> vyjadřuje, jaká koncentrace daného komplexu způsobí smrt 50 % testovaných buněk. **Tabulka 3** vyjadřuje aritmetické průměry IC<sub>50</sub> pro každý z komplexů včetně směrodatných odchylek, které byly vypočteny pomocí programu Microsoft Excel.

**Tab. 3.** Hodnoty IC<sub>50</sub> pro cisplatinu, komplex (1) a komplex (2) testované na buňkách MDA-MB-231 ošetřených danými látkami po dobu 72 hodin.

Testovaný komplex	Hodnota IC <sub>50</sub>
cDDP	21.217 ± 3.130 μM
Komplex (1)	0.251 ± 0.002 μM
Komplex (2)	1.134 ± 0.012 μM

Z uvedených grafů i hodnot IC<sub>50</sub> vyplývá, že nejméně toxická pro buňky MDA-MB-231 je cisplatina (IC<sub>50</sub> je 21.217 ± 3.130 μM), na druhou stranu nejslibnějších výsledků dosahuje komplex (1) s hodnotou IC<sub>50</sub> 0.251 ± 0.002 μM.

Cytotoxicita cisplatinu na buněčné linii MDA-MB-231 již byla dříve několikrát testována. Bylo zjištěno, že hodnota IC<sub>50</sub> je 22 ± 4 μM (Dunne *et al.* 2018). Jiná studie uvádí hodnotu IC<sub>50</sub> 22.1 μM (Fan *et al.* 2017). Tyto hodnoty jsou ve shodě s mými výsledky. Obě studie však vyhodnocovaly cytotoxicitu již po 48 hodinách, zatímco v této práci byla testována až po 72 hodinách.

Na buněčné linii MDA-MB-231 byly nedávno testovány podobné komplexy ruthenia a osmia, a to konkrétně Ru<sup>(II)</sup> a Os<sup>(II)</sup> batofenantrolinové komplexy obsahující dichloracetátový ligand. Tyto komplexy vykazují selektivní toxicitu u některých druhů rakovinných buněk a významný efekt je patrný zejména právě na vysoce progresivní triple-negativní buňky MDA-MB-231. Dle provedeného výzkumu lepšího účinku dosahuje osmiový komplex s hodnotou IC<sub>50</sub> = 0.50 ± 0.02. Rutheniový komplex má menší účinek (IC<sub>50</sub> = 0.86 ± 0.01) zřejmě proto, že relativně snadno a rychle uvolňuje dichloracetátový ligand díky hydrolýze ještě předtím, než vstoupí do cytoplazmy. Oba jmenované komplexy úspěšně zabraňují triple-negativním buňkám migrovat, invadovat do okolních tkání a re-adherovat k povrchu. Jejich aktivita spočívá v blokaci matrixových metaloproteáz a v regulaci akvaporinů. Cytostatické a anti-metastatické

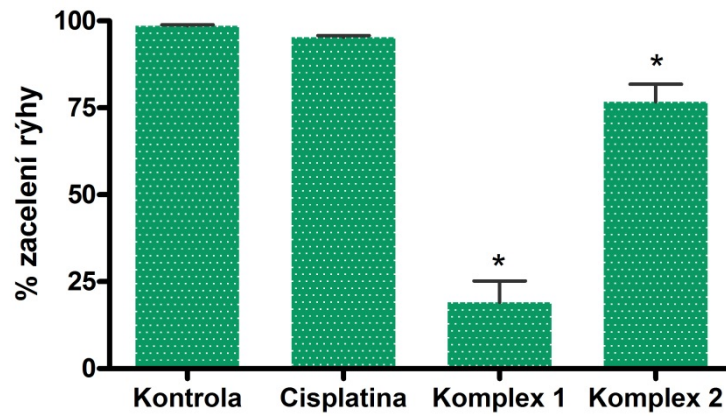
vlastnosti testovaných komplexů umožňují vývoj nových léčiv na bázi kovů, které mohou být cíleně použity pro léčbu triple-negativních variant nádorových buněk. (Pracharova *et. al* 2018)

## 2. WOUND-HEALING ESEJ

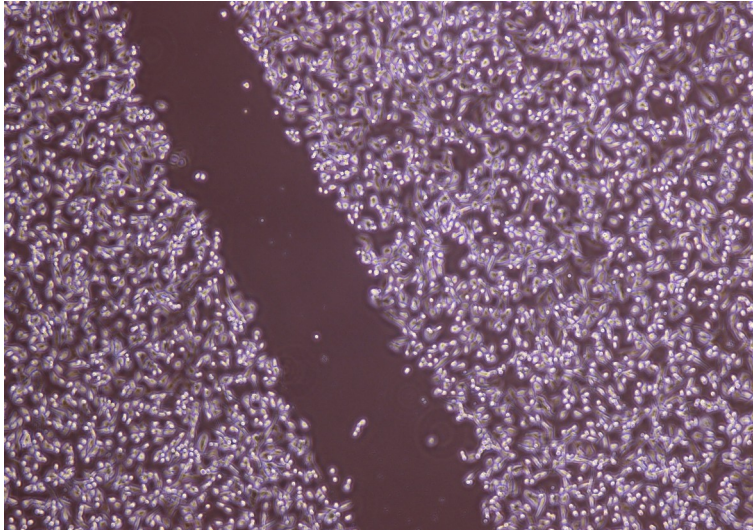
Pro studium migrační aktivity buněk *in vitro* byla vybrána wound-healing esej. Principem této metody je napodobování migrace buněk při hojení ran *in vivo*. Základní kroky zahrnují vytvoření rýhy v buněčné monovrstvě, zachycení fotografií buněk na začátku experimentu a dále v pravidelných časových intervalech během kultivace. Poté následuje porovnání snímků za účelem kvantifikace úspěšnosti migrace buněk.

Buňky byly sazeny na 6 cm Petriho misky v hustotě 2 500 000 buněk/miska ve 4 ml kultivačního média a byly drženy 24 hodin v inkubátoru za kultivačních podmínek. Po 24 hodinách byla do buněčné monovrstvy špičkou od automatické pipety (200  $\mu$ l) vytvořena „jizva“ a k buňkám byly přidány testované komplexy o koncentraci odpovídající 65 % jejich  $IC_{50}$ . Buňky byly vyfoceny digitálním fotoaparátem ihned po vytvoření rýhy a poté po 24 hodinách. Podrobný popis postupu viz. kapitola Metody.

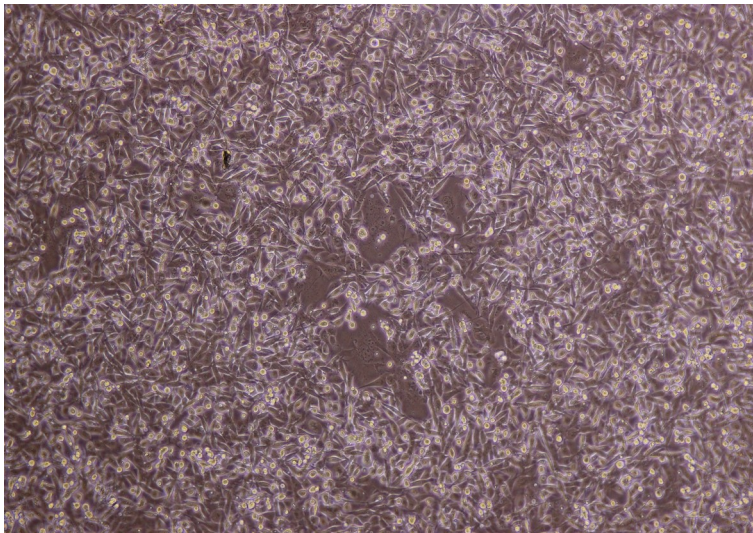
Výsledky byly vyhodnoceny na základě porovnání fotografií v čase 0 h a poté po 24 h od aplikace testovaných látek. Výsledky experimentu jsou patrné z reprezentativních fotografií (**Obr. 8.-13.**). Všechny fotografie byly pořízeny při zvětšení mikroskopu 100x. Obrázky 8 a 9 zobrazují buněčnou monovrstvu MDA-MB-231 buněk ošetřenou cisplatinou, obrázky 10 a 11 zobrazují stejné buňky ošetřené komplexem (1) a nakonec obrázky 12 a 13 zobrazují tyto buňky ošetřené komplexem (2). Pro lepší srovnání byl vytvořen v programu GraphPad Prism4 také graf (**Obr. 7.**), vyjadřující procento zacelení rýhy po 24 hodinách od aplikace testovaných látek.



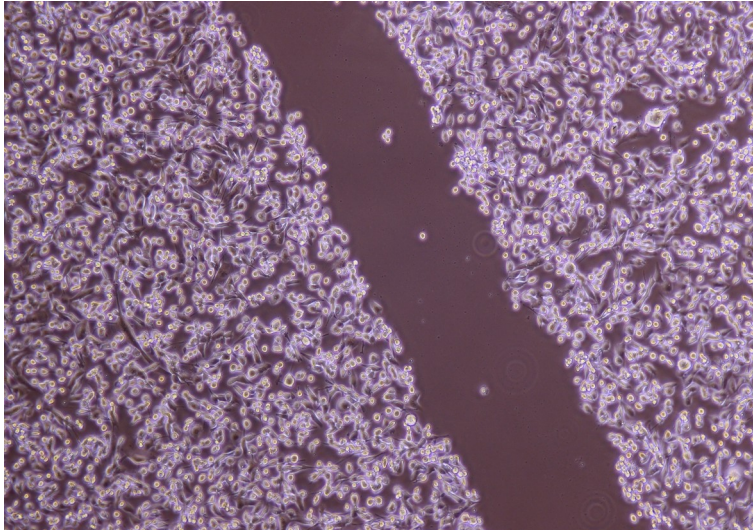
**Obr. 7.** Graf vyjadřující schopnost MDA-MB-231 buněk zacelit rýhu vytvořenou při wound-healing esejí. Hodnoty s hvězdičkou jsou statisticky významně odlišné od kontroly ( $P < 0.05$ ).



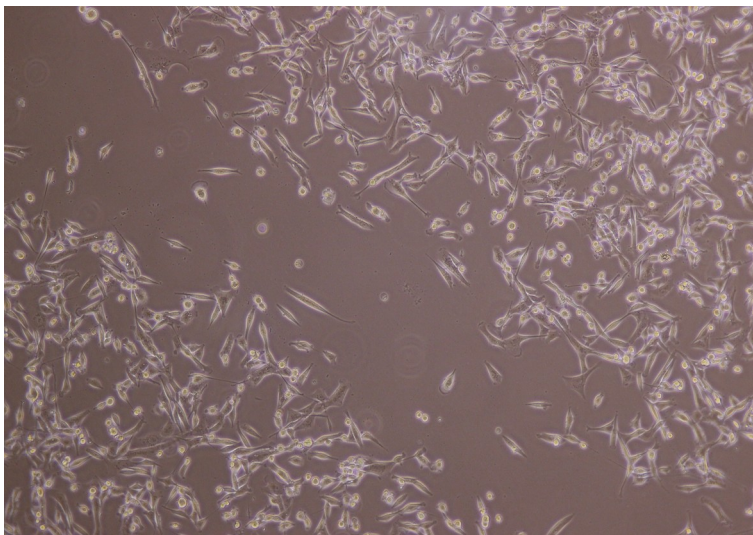
**Obr. 8.** Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená cDDP a vyfotografovaná ihned po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.



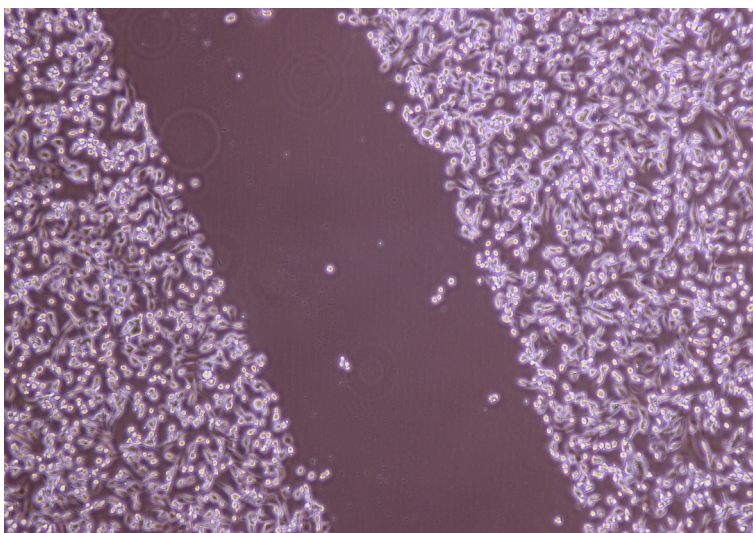
**Obr. 9.** Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená cDDP a vyfotografovaná 24 hodin po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.



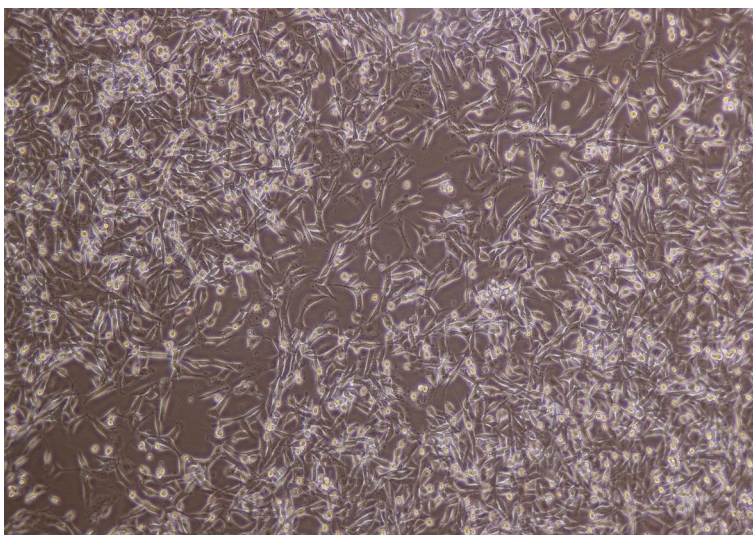
**Obr. 10.** Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (1) a vyfotografovaná ihned po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.



**Obr. 11.** Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (1) a vyfotografovaná 24 hodin po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.



**Obr. 12.** Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (2) a vyfotografovaná ihned po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.



**Obr. 13.** Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (2) a vyfotografovaná 24 hodin po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.

Z přiložených fotografií i z grafu je patrné, že výsledky wound-healing eseje odpovídají předešlému testování cytotoxické aktivity daných komplexů pomocí testu barvení neutrální červení. Opět můžeme říci, že rutheniový komplex (1) dosahuje nejslibnější antiproliferační aktivity, následuje osmiový komplex a nejhůře (nejméně) účinná je cisplatina, u které došlo po 24 hodinách téměř k úplnému zacelení rýhy.



Maligní nádorové buňky jsou schopné migrovat z místa primárního nádoru, invadovat do tkání a krevního řečiště. Díky tomu se přemísťují do jiného místa organismu, kde tvoří metastázy. Jeden možný přístup, jak zlepšit protirakovinné účinky konvenčních metalofarmak spočívá v konjugaci těchto sloučenin s jinými biologicky aktivními (protinádorovými) látkami s jiným mechanismem účinku. V roce 2015 byla popsána syntéza, biologické účinky a mechanismy působení nových derivátů Pt<sup>(II)</sup>, které obsahují jeden nebo také dva nesteroidní protizánětlivé diklofenakové (DCF) ligandy, které jsou známé pro své protinádorové účinky. Antiproliferativní vlastnosti těchto kovových konjugátů ukazují, že tyto sloučeniny by mohly být použity jako potenciálně účinná a selektivní cytotoxická činidla nádorových buněk, vykazující aktivitu u nádorových buněk rezistentních k cisplatině a nádorových buněčných linií pozitivních na COX-2. Zmiňovaný výzkum byl proveden na buněčné linii HT-29 a HeLa nádorových buňkách a bylo zjištěno, že buňky ošetřené nově syntetizovanou sloučeninou 3 ztrácí schopnost migrace, zřejmě díky ligandům DCF v tomto komplexu. Pro potvrzení této hypotézy byl testován antimigrační efekt cisplatin, sloučeniny 3 a samotného DCF pomocí několika metod. Jednou z nich byla také wound-healing esej na HeLa buněčné linii. Když po 24 hodinách dojde během testu k zacelení ráhy, dochází k normální migraci buněk. Při ošetření buněk vybranými komplexy by měla být migrace omezena, a tedy i schopnost buněk „zacelit“ ráhu menší. Čím větší ráha tedy po ošetření buněčné kultury daným komplexem zůstane, tím vyšší je protimigrační aktivita testované látky. Vědci měřili „ráhu bez buněčné vrstvy“ po 24 hodinách od ošetření cisplatinou, sloučeninou 3 a samotným DCF při jejich hodnotách 65 % IC<sub>50</sub>. Zjistili, že sloučenina 3 znatelně omezila schopnost HeLa buněk zacelit ráhu, podobně jako samotný DCF, který inhiboval migraci buněk také. Na druhou stranu u kontrolní kultury buněk došlo ke 100% zacelení rány, velmi podobně jako u rovněž testované cisplatin. Výsledky tohoto výzkumu naznačují, že výskyt DCF ligandu ve sloučenině 3 přispívá k inhibici invazní a migrační schopnosti nádorových buněk. Ukázalo se, že sloučenina 3, ve které jsou molekuly DCF koordinovány s Pt<sup>(II)</sup> přes jejich karboxylovou skupinu, je účinnější než původní Pt<sup>(II)</sup> léčivo - cisplatina. Účinnost sloučeniny 3 je způsobena několika faktory, včetně lepší schopnosti vazby na DNA a zvýšení cytotoxicity (Intini *et. al* 2015).

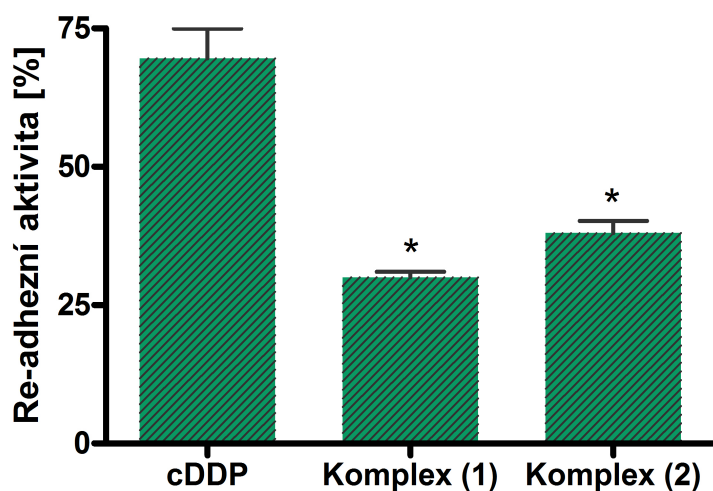
### 3. RE-ADHEZNÍ TEST

Schopnost metastázování nádorových buněk je kromě migračních a invazních vlastností také úzce spjata s jejich přilnavostí. V tomto experimentu byla testována schopnost komplexů (1) a (2) inhibovat adhezní vlastnosti buněk MDA-MB-231 *in vitro*. Pro tento účel byl použit re-adhezní test dle protokolu Novohradsky *et. al* 2015.

Re-adhezní test zahrnuje několik kroků. V této práci byly buňky sazeny na 6 cm Petriho misky v počtu 1 500 000 buněk na misku ve 4 ml kultivačního média DMEM s přidavkem antibiotik (penicilin  $10 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  a streptomycin  $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin. Po 48 hodinách bylo z kultivačních misek odsáto staré médium, které bylo nahrazeno médiem DMEM, obsahujícím 10 % fetálního bovinního séra a 0.1 % BSA a buňky byly umístěny do inkubátoru na 24 hodin. V dalším kroku byly buňky ošetřeny komplexy cDDP, (1) nebo (2) o koncentracích rovných čtyřnásobku jejich  $\text{IC}_{50}$ , která byla zjištěna experimentálně během měření cytotoxicity, a buňky byly umístěny do inkubátoru. Po uplynutí 1 hodiny a 40 minut bylo z kultivačních misek odsáto médium, buňky byly opláchnuty PBS  $1 \times$  a do každé misky byly připipetovány 2 ml kultivačního média s přidavkem 0.1% BSA. Buňky byly opatrně seškrabány ze dna kultivační nádoby a důkladně resuspendovány automatickou pipetou za účelem oddělení buněk od sebe a vytvoření homogenní buněčné suspenze. Buňky byly následně ponechány 15 minut při pokojové teplotě pro rekonstituci povrchových receptorů. Nakonec byly buňky spočítány na automatické počítače a nasazeny na 96-jamkové destičky v počtu 30 000 buněk na jamku ve 100  $\mu\text{l}$  média a byly ponechány v inkubátoru po dobu 30 minut při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ . Následně byly re-adherované buňky barveny sulforhodaminem B.

Protokol se sulforhodaminem B (Skehan *et al.* 1990) se často využívá k provádění cenově výhodného testování cytotoxicity v buněčných studiích (Vichai a Kirtikara, 2006). Tato metoda je založena na vlastnosti SRB, který se váže na bílkoviny za mírně kyselých podmínek a následně může být extrahován. Množství navázaného barviva odráží buněčnou proliferaci (Orellana *et al.* 2016). Tento test se omezuje na manuální nebo poloautomatický skrining a může být účinným a citlivým měřítkem pro testování chemoterapeutických léčiv nebo malých molekul v adherentních buňkách. Může být také využit při hodnocení vlivů modulace genové exprese (knockdown, upregulace genové exprese) (Kasinski *et al.* 2015). Postup barvení byl již podrobně popsán v kapitole Metody.

Výsledky tohoto testování zobrazuje graf (**Obr. 14.**), který ukazuje re-adhezní aktivitu buněk ošetřených vybranými testovanými komplexy vyjádřenou v [%] (vztaženo k re-adhezní aktivitě neošetřených kontrolních buněk). Nejvyšší re-adhezní aktivity dosahovaly buňky ošetřené cisplatinou (v průměru až 69.59 %), tato látka se zde proto jeví jako nejméně účinná v boji proti novým metastázám. Naopak oba testované komplexy (1) i (2) způsobily významné snížení re-adhezní schopnosti buněk MDA-MB-231. Konkrétně nejlepších výsledků dosáhl komplex (1), který byl dle uvedených výsledků více než 2x účinnější v porovnání s cisplatinou (s aktivitou dosahující pouze 30.02 %). Komplex (2) vykazoval mírně nižší účinnost (38.04 %), než komplex (1).



**Obr. 14.** Graf vyjadřující re-adhezní aktivitu buněk MDA-MB-231 ošetřených cisplatinou, komplexem (1) a komplexem (2). Hodnoty s hvězdičkou jsou statisticky významně odlišné od cDDP ( $P < 0.05$ ).

V programu GraphPad Prism4 byl také proveden t-test za účelem zjištění, zda je mezi testovanými komplexy (1) a (2) statisticky významný rozdíl v účinnosti na re-adhezní aktivitu buněk v porovnání s cDDP. Bylo zjištěno, že rozdíly ve výsledcích mezi cDDP a oběma testovanými látkami signifikantní jsou ( $P < 0.05$ ).

Jak již bylo dříve v této práci zmíněno, buněčná linie MDA-MB-231 se řadí mezi triple-negativní linie karcinomu prsu. Triple-negativní karcinom je klinicky definovaný jako nádor, vyznačující se nepřítomností estrogenních receptorů (ER), progesteronových receptorů i Her-2 receptorů. Pro tento typ nádorů máme stále nedostatek dostupných léčiv a vysoké riziko recidivy onemocnění značně komplikuje léčbu této malignity. Léčiva na bázi platiny jsou v současnosti nejpoužívanější v terapii těchto typů nádorů, i přes relativně vysokou toxicitu. Je také známo, že při opakovaném podávání cDDP dané nádory vykazují rezistenci. To jsou jedny z hlavních důvodů, proč vědci hledají nové alternativy léčby.

Polypyridinové rutheniové komplexy Ru<sup>(II)</sup> jsou již delší dobu považovány za vynikající protinádorová činidla, která inhibují proliferaci buněk rakoviny prsu. Nicméně stále nebyly plně objasněny jejich účinky na metastatickou aktivitu těchto buněk. V loňském roce byla testována skupina polypyridinových ruthenioých komplexů koordinovaných s deriváty fenazinu na buněčné linii MDA-MB-231. Výsledky ukázaly, že tato skupina komplexů projevila inhibiční účinek na buněčnou kulturu MDA-MB-231, který je srovnatelný s účinkem cisplatiny. Zejména jeden ze syntetizovaných komplexů, komplex Ru(bpy)<sub>2</sub>BEDPPZ: R = -C≡C(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), účinně inhiboval migraci a invazní aktivitu buněk MDA-MB-231 *in vitro* a potlačoval jejich schopnost adheze a tvorby stresových vláken. Na modelovém organismu *Danio rerio* se prokázalo, že testovaný komplex účinně blokuje metastázování buněk MDA-MB-231 v krevních cévách a omezuje angiogenezi. Další studie ukázaly, že mechanismy účinku těchto látek mohou zahrnovat apoptózu zprostředkovanou přes poškození DNA. Všechny tyto výsledky naznačují, že rutheniové komplexy na bázi fenazinu mohou působit jako silná činidla inhibující metastázování nádorových buněk prsu (Zhao *et. al* 2018).

Vědecká skupina z Portugalska nedávno syntetizovala jiné rutheniové komplexy, které testovala na dvou různých buněčných liniích rakoviny prsu (MCF-7 a MDA-MB-231). Tyto komplexy vykazovaly ve stejných experimentálních podmínkách lepší cytotoxicitu než cisplatina. Mohou být proto také potenciální náhradou v léčbě nádorů rezistentních k cisplatině (Côrte-Real *et al.* 2019).

Právě tyto slibné výsledky účinků kovových komplexů na nádorové buňky mne motivovaly k testování vybraného rutheniového komplexu a jeho osmiového analogu v mojí diplomové práci. Na základě provedených experimentů v laboratoři v rámci této práce byl potvrzen významný antiproliferační účinek těchto sloučenin.

Osmiové komplexy na buněčné linii MDA-MB-231 zřejmě prozatím testovány nebyly. Kvůli jejich výhodným vlastnostem a podobnosti s rutheniovými komplexy je však možné, že by mohly potenciálně vůči těmto nádorovým buňkám vykazovat slibné antiproliferační a anti-metastatické účinky, což dokazuje i moje diplomová práce.

## VI. ZÁVĚR

Hlavní příčinou úmrtí na nádorová onemocnění nebývají primární nádory. Většinou se stav pacienta významně zhorší, když dojde k progresi onemocnění, charakterizované především insemiací sekundárních nádorů (metastáz) ve vzdálených orgánech. Tvorba metastáz je vysoce komplexní a dlouhodobý proces, při kterém buňky primárního nádoru musí překonat řadu překážek. Přesto ale vznik metastáz není vzácný. Triple-negativní buněčná linie karcinomu prsu MDA-MB-231 je známá jako velmi agresivní, metastaticky aktivní linie nádorových buněk. Právě z uvedených důvodů je často používána jako model k testování potenciálních nových léčiv. Pro vývoj výhodné léčebné strategie daného typu nádorů je však nutný další rozsáhlý výzkum. Proto i hlavním cílem mojí práce bylo testování cytotoxicity vybraných nových kovových komplexů a jejich vlivu na adherenci a invazní vlastnosti této triple-negativní buněčné linie karcinomu prsu MDA-MB-231.

V první části práce byla měřena cytotoxická aktivita nového komplexu ruthenia (1) a také jeho přesného analogu na bázi osmia (2). Pro možnost srovnání byla také otestována cytotoxicita cDDP. Pro toto testování byl vybrán protokol barvení neutrální červení. Tento test poskytuje kvantitativní odhad počtu životaschopných buněk v kultuře. Hodnoty cytotoxicity byly vyjádřeny jako hodnoty  $IC_{50}$ , tedy hodnoty koncentrace testovaného komplexu, při které přežije 50 % buněk. Bylo zjištěno, že nejméně toxická pro buňky MDA-MB-231 je cisplatina ( $IC_{50}$  je  $21.217 \pm 3.130 \mu\text{M}$ ), na druhou stranu nejslibnějších výsledků dosahuje komplex (1) s hodnotou  $IC_{50}$   $0.251 \pm 0.002 \mu\text{M}$ .

Dalším předmětem zájmu bylo studium migrační aktivity buněk *in vitro*, a to pomocí wound-healing eseje. Principem této metody je napodobování migrace buněk při hojení ran *in vivo*. Výsledky wound-healing eseje odpovídají předešlému testování cytotoxické aktivity daných komplexů. I během tohoto experimentu bylo zjištěno, že rutheniový komplex (1) dosahuje nejslibnější antiproliferační aktivity, následuje osmiový komplex a nejhůře (nejméně) účinný je platnatý komplex, u kterého došlo po 24 hodinách téměř k úplnému zacelení rýhy.

Posledním cílem této práce bylo testování schopnosti buněk MDA-MB-231 re-adherovat k povrchu kultivační desky. Pro tento experiment byl vybrán protokol barvení se sulforhodaminem B, který je cenově i časově výhodný, zároveň poskytuje dostatečně

citlivé měřítko buněčné proliferace. Toto testování ukázalo, že nejvyšší aktivity dosahovaly buňky ošetřené cisplatinou (v průměru až 69.59 %), tato látka je proto nejméně účinná v boji proti novým metastázám. Nejlepších výsledků naopak dosahuje komplex (1), který je dle mých výsledků více než 2x účinnější v porovnání s cisplatinou (s aktivitou dosahující pouze 30.02 %).

Závěrem této práce je zjištění, že testovaný rutheniový komplex dosahuje v porovnání s cisplatinou a osmiovým analogem nejslibnější antiproliferační aktivity na testované buněčné kultuře MDA-MB-231. Tato látka je tedy kandidátem pro další testování a možné použití v léčbě zmíněného typu nádorových onemocnění.

## VII. LITERATURA

- Adami R, Cintio O, Trombetta G, Choquet D, Grazi E** (2003) *On the stiffness of the natural actin filament decorated with alexa fluor tropomyosin*. *Biophys Chem* 104: 469–476.
- Alexander S, Weigelin B, Winkler F, Friedl P** (2013) *Preclinical intravital microscopy of the tumour-stroma interface: invasion, metastasis, and therapy response*. *Curr Opin Cell Biol* 25: 659-671.
- Ang WH, Casini A, Sava G, Dyson PJ** (2011) *Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action*. *J Organomet Chem* 696:989-998.
- Barry NP, Sadler PJ** (2012) *Dicarbido-closo-dodecarborane-containing half-sandwich complexes of ruthenium, osmium, rhodium and iridium: biological relevance and synthetic strategies*. *Chem Soc Rev* 41: 3264-3279.
- Barry NPE, Edafe F, Dyson PJ, Therrien B** (2010) *Anticancer activity of osmium metalla-rectangles*. *Dalton Trans* 39:2816-2820.
- Battle E, Sancho E, Franci C, Dominiques D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A** (2000) *The transcription factor is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. *Nat Cell Biol* 2: 84–89.
- Berger G, Grauwet K, Zhang H, Husseya AM, Nowicki MO, Wang DI, Chiocca EA, Lawler SE, Lippard SJ** (2018) *Anticancer activity of osmium(VI) nitrido complexes in patient-derived glioblastoma initiating cells and in vivo mouse models*. *Cancer Letters* 416: 138-148.
- Bergert M, Chandradoss SD, Desai RA, Paluch E** (2012) *Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 14434-14439.
- Bissell MJ, Radisky D** (2001) *Putting tumours in context*. *Nat Rev Cancer* 1: 46–54.
- Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K** (1995) *The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily*. *Cancer Res* 55(2): 434–439.
- Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A** (2003) *The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: A comparison with Snail and E47 repressors*. *Cell Sci* 116: 499–511.



- Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J (2009)** *Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain.* Nature 459(7249): 1005–1009.
- Bosman FT, Stamenkovic I (2003)** *Functional structure and composition of the extracellular matrix.* J Pathol 200: 423–428.
- Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A (2010)** *Molecular aspects of tumor cell migration and invasion.* Ann Ist Super Sanità 1: 66–80.
- Brabec V, Hrabina O, Kasparkova J (2017)** *Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents.* Coordination Chemistry Reviews 351: 2-31.
- Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T (2001)** *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment.* Proc Natl Acad Sci USA 98: 10356-10361
- Bruhn SL, Toney JH, Lippard SJ (1990)** *Biological Processing of DNA Modified by Platinum Compounds.* Bioinorganic Chemistry 38: 477-516.
- Bryce NS, Schevzov G, Ferguson V, Percival JM, Lin JJC, Matsumura F, Bamburg JR, Jeffrey PL, Hardeman EC, Gunning P, Weinberger RP (2003)** *Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms.* Mol Biol Cell 14: 1002–1016.
- Butcher DT, Alliston T, Weaver VM (2009)** *A tense situation: forcing tumour progression.* Nat Rev Cancer 9:108–122.
- Colangelo D, Ghiglia AL, Ghezzi AR, Ravera M, Rosenberg E, Spada F, Osella D (2005)** *Water-soluble benzoheterocycle trisium clusters as potential inhibitors of telomerase enzyme.* J Inorg Biochem 99: 505-512.
- Côrte-Real L, Karas B, Gírio P, Moreno A, Avecilla F, Marques F, Buckley BT, Cooper KR, Doherty C, Falson P, Garcia MH, Valente A (2019)** *Unprecedented inhibition of P-gp activity by a novel ruthenium-cyclopentadienyl compound bearing a bipyridine-biotin ligand.* Eur J Med Chem. 163: 853-863.
- De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M (2008)** *Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth.* Int J Cancer 123: 2229–2238.
- Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G (2004)** *The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior.* Int J Dev Biol 48: 509–517.
- Dunne M, Dou YN, Drake DM, Spence T, Gontijo SML, Wells PG, Allen C (2018)** *Hyperthermia-mediated drug delivery induces biological effects at the tumor and*

- molecular levels that improve cisplatin efficacy in triple negative breast cancer. Journal of Controlled Release 282: 35-45.*
- Erler JT, Weaver VM** (2009) *Three-dimensional context regulation of metastasis. Clin Exp Metastasis 26: 35–49.*
- Fan X, Zhou S, Zheng M, Deng X, Yi Y, Huang T** (2017) *MiR-199a-3p enhances breast cancer cell sensitivity to cisplatin by downregulating TFAM (TFAM). Biomedicine & Pharmacotherapy 88: 507-514.*
- Fanning AS, Wolenski JS, Mooseker MS, Izant JG** (1994) *Differential regulation of skeletal muscle myosin-II and brush border myosin-I enzymology and mechanochemistry by bacterially produced tropomyosin isoforms. Cell Motil Cytoskeleton 29: 29–45.*
- Frantz Ch, Stewart K M, Weaver V M** (2010) *The extracellular matrix at a glance. J Cell Sci 123(24): 4195-4200.*
- Freshney RI** (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Fifth Edition. John Wiley & Sons, New York. ISBN-10 0-471-45329-3.*
- Friedl P, Alexander S** (2011) *Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. Cell 147: 992-1009.*
- Friedl P, Borgmann S, Bröcker EB** (2001) *Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. J Leukoc Biol 70: 491-509*
- Friedl P, Gilmour D** (2009) *Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 445-457*
- Friedl P, Wolf K** (2003) *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat Rev Cancer 3: 362–374.*
- Fu Y, Habtemariam A, Pizarro AM, van Rijt SH, Healey DJ, Cooper PA, Shnyder SD, Clarkson GJ, Sadler PJ** (2010) *Organometallic osmium arene complexes with potent cancer cell cytotoxicity. J Med Chem 53: 8192-8196.*
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P** (1994) *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest 94(6): 2493–2503.*
- Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR** (2006) *S100A4, a mediator in metastasis. J Biol Chem 281: 677–680.*

- Guan X, Ma F, Fan Y, Zhu W, Hong R, Xu B** (2015) *Platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis on randomized-controlled trials*. *Anti-Cancer Drugs* 26: 894-901.
- Gunning PW, Schevzov G, Kee AJ, Hardeman EC** (2005) *Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function*. *Trends Cell Biol* 15: 333–341.
- Hanahan D, Weinberg RA** (2000) *The hallmarks of cancer*. *Cell* 100: 57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA** (2011) *Hallmarks of cancer: The Next Generation*. *Cell* 144: 646–674.
- Harburger D S, Calderwood D A** (2009) *Integrin signalling at a glance*. *J Cell Sci* 122: 159-163.
- Harrell JC, Pfefferle AD, Zalles N, Prat A, Fan C, Khramtsov A, Olopade OI, Troester MA, Dudley AC, Perou CM** (2014) *Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis*. *Clin Exp Metastasis* 31(1): 33–45.
- Hartinger CG, Phillips AD, Nazarov AA** (2011) *Polynuclear ruthenium, osmium and gold complexes. The quest for innovative anticancer chemotherapeutics*. *Curr Top Med Chem* 11: 2688-2702.
- Hay ED** (1995) *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. *Acta Anat (Basel)* 154: 8–20.
- Holiday DL, Speirs V** (2011) *Choosing the right cell line for breast cancer research*. *Breast Canc Res* 13(14): 215.
- Huber MA, Beug H, Wirth T** (2004) *Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage*. *Cell Cycle* 3: 1477–1480.
- Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW** (2007) *Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression*. *J Cell Physiol* 213: 374-383.
- Humphries J D, Humphries M J** (2006) *Integrin ligands at a glance*. *J Cell Sci* 119: 3901-3903.
- Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S** (2010) *Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer*. *Breast Dis* 32(12): 35–48.
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK** (2006) *Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis*. *Cancer Res* 66: 8319–8326.

- Intini FP, Zajac J, Novohradsky V, Saltarella T, Pacifico C, Brabec V, Natile G, Kasparkova J** (2006) *Novel Antitumor Platinum(II) Conjugates Containing the Nonsteroidal Anti-inflammatory Agent Diclofenac: Synthesis and Dual Mechanism of Antiproliferative Effects*. *Inorganic Chemistry* 56(3): 1483–1497.
- Ishikawa R, Yamashiro S, Matsumura F** (1989) *Differential modulation of actin-severing activity of gelsolin by multiple isoforms of cultured rat cell tropomyosin. Potentiation of protective ability of tropomyosins by 83-kDa nonmuscle caldesmon*. *J Biol Chem* 264: 7490–7497.
- Jarvelainen H, Sainio A, Koulu M, Wight T, Penttinen R** (2009) *Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy*. *Pharmacol. Rev.* 61: 198–223
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D** (2011) *Global Cancer Statistics*. *CA Cancer J Clin.* 61(2): 69–90.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massagué J** (2003) *A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone*. *Cancer Cell* 3(6): 537–549.
- Kasinski AL, Kelnar K, Stahlhut C, Orellana E, Zhao J, Shimer E, Dysart S, Chen X, Bader AG, Slack FJ** (2015) *A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer*. *Oncogene* 34(27): 3547–3555.
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, Lorenz K, Lee EH, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, Gray JW, Bissell MJ** (2007) *The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression*. *Mol Oncol* 1(1): 84–96.
- Keppler BK, Berger MR, Heim ME** (1990) *New tumour-inhibiting metal complexes*. *Cancer Treat Rev* 17: 261–277.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z** (2010) *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. *Cell* 141(1): 52–67.
- Khalil AA, Friedl P** (2010) *Determinants of leader cells in collective cell migration*. *Integr Biol* 2: 568–574.
- Khan FA, Therrien B, Süß-Fink G, Zava O, Dyson PJ** (2013) *Arene ruthenium dichloro complexes containing isonicotinic ester ligands: synthesis, molecular structure and cytotoxicity*. *J Organomet Chem* 730: 49–56.

- Kilpin KJ, Cammack SM, Clavel CM, Dyson PJ** (2013) *Ruthenium(II) arene PTA (RAPTA) complexes: impact of enantiomerically pure chiral ligands*. Dalton Trans 42: 2008-2014.
- Klymkowsky MW** (2006) *Beta-catenin and its regulatory network*. Hum Pathol 36: 225–227.
- Knowles MA, Selby PJ** (2005) *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. United States: Oxford University Press Inc., Fourth Edition.
- Kong KV, Leong WE, Ng SP, Nguyen TH, Lim LHK** (2008) *Osmium carbonyl clusters: a new class of apoptosis inducing agents*. ChemMedChem 3: 1269-1275.
- Kriajevska MV, Cardenas MN, Grigorian MS, Ambartsumian NS, Georgiev GP, Lukanidin EM** (1994) *Non-muscle myosin heavy chain as possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene*. J Biol Chem 269: 19679–19682.
- Lakomska I, Fandzloch M, Muziol T, Lis T, Jezierska J** (2013) *Synthesis, characterization and antitumor properties of two highly cytotoxic ruthenium(III) complexes with bulky triazolopyrimidine ligands*. Dalton Trans 42: 6219-6226.
- Lämmermann T, Sixt M** (2009) *Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration*. Curr Opin Cell Biol 21: 636-644
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW** (2006) *The epithelial mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol 172: 973–981.
- Leitinger B, Hohenester E** (2007) *Mammalian collagen receptors*. Matrix Biol. 26: 146-155.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, et al** (2009) *Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling*. Cell 139: 891–906.
- Li L, Wong YS, Chen T, Fan C, Zheng W** (2012) *Ruthenium complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers*. Dalton Trans 41: 1138-1141.
- Li ZH, Bresnick AR** (2006) *The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA*. Cancer Res 66: 5173–5180.
- Liang L, Wang Y, Lu S, Kong M, Lin Y, Cuzzucoli F, Wang P, Wang S** (2018) *Microchips for detection of exfoliated tumor cells in urine for identification of bladder cancer*. Anal Chim Acta 1044: 93-101.

- Liu LJ, Wang W, Kang TS, Liang JX, Liu C, Kwong DW, Wong VK, Ma DL, Leung CH** (2016) *Antagonizing STAT5B dimerization with an osmium complex*. *Sci Rep* 6: 36044.
- Liu H, Zang C, Fenner MH, Possinger K, Elstner E** (2003) *PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro*. *Breast Cancer Res Treat* 79(1): 63–74.
- Lorentzen A, Bamber J, Sadok A, Elson-Schwab I, Marshall CJ** (2011) *An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells*. *J Cell Sci* 124: 1256-1267
- Lucero HA, Kagan HM** (2006) *Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function*. *Cell Mol Life Sci* 63: 2304–2316.
- Madsen CD, Sahai E** (2010) *Cancer dissemination-lessons from leukocytes*. *Dev Cell* 19: 13-26
- Magnarin M, Bergamo A, Carotenuto ME, Zorzet S, Sava G** (2000) *Increase of tumour infiltrating lymphocytes in mice treated with antimetastatic doses of NAMI-A*. *Anticancer Res* 20: 2939-2944.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J** (2005) *Genes that mediate breast cancer metastasis to lung*. *Nature* 436(7050): 518–524.
- Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R, Massagué J** (2005) *Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumours*. *J Clin Invest* 115(1): 44–55.
- Mishra VK, Johnsen SA** (2014) *Targeted therapy of epigenomic regulatory mechanisms controlling the epithelial to mesenchymal transition during tumor progression*. *Cell Tissue Res*. 356(3): 617-630.
- Nagase H, Visse R, Murphy G** (2006) *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. *Cardiovasc Res* 69(3): 562–573.
- Nautiyal N, Holford TR** (2018) *A spatiotemporal back-calculation approach to estimate cancer incidence measures*. *Statistics in Medicine* 37: 4472–4489.
- Novohradsky V, Bergamo A, Cocchietto M, Zajac J, Brabec V, Mestroni G, Sava G** (2015) *Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics and biological activity*. *Dalton Trans* 44(4): 1905–1913.

- O'Connell CB, Tyska MJ, Mooseker MS** (2007) *Myosin at work: motor adaptations for a variety cellular functions*. *Biochim Biophys Acta* 1773: 615–630.
- Olson MF, Sahai E** (2009) *The actin cytoskeleton in cancer cell motility*. *Clin Exp Metastasis* 26: 273–287.
- Ono S, Ono K** (2002) *Tropomyosin inhibits ADF/cofilindependent actin filament dynamics*. *J Cell Biol* 156: 1065-1076.
- Orellana EA, Kasinski AL** (2016) *Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation*. *Bio. Protoc.* 1984 Vol.6.
- Paluch E, Sykes C, Prost J, Bornens M** (2006) *Dynamic modes of the cortical actomyosin gel during cell locomotion and division*. *Trends Cell Biol* 16: 5-10
- Paszek MJ, Weaver VM** (2004) *The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy*. *J mammary Gland Biol Neoplasia* 9: 325–342.
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D, et al** (2005) *Tensional homeostasis and the malignant phenotype*. *Cancer Cell* 8: 241–254.
- Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA** (2007) *Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer-a prospect*. *J Cell Biochem* 101: 1338–1354.
- Pecorino L** (2008) *Molecular Biology of Cancer*. United States: Oxford University Press Inc., Second Edition.
- Pierroz V, Joshi T, Leonidova A, Mari C, Schur J, Ott I, Spiccia L, Ferrari S, Gasser G** (2012) *Molecular and cellular characterization of the biological effects of ruthenium(II) complexes incorporatins 2-pyridyl-2-pyrimidine-4-carboxylic acid*. *J Am Chem Soc* 134: 20376-20387.
- Poincloux R, Collin O, Lizárraga F, Romao M, Debray M, Piel M, Chavrier P** (2011) *Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1943-1948
- Pracharova J, Novohradsky V, Kostrhunova H, Starha P, Travnicek Z, Kasparkova J, Brabec V** (2018) *Half-sandwich Os(ii) and Ru(ii) bathophenanthroline complexes: anticancer drug candidates with unusual potency and a cellular activity profile in highly invasive triple-negative breast cancer cells*. *Dalton Transactions* 35: 12197-12208
- Qian C, Wang JQ, Song CL, Wang LL, Ji LN, Chao H** (2013) *The induction of mitochondria-mediated poptosis in cancer cells by ruthenium(II) asymmetric complexes*. *Metallomics* 5: 844-854.

- Qui 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 Appl. Mater. Interfaces 9: 18482-18492.
- Repetto G, Peso de IA, Zurita LJ** (2008) *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. Nat Protoc 3: 1125–1131.
- Rodriguez C, Rodriguez-Sinovas A, Martinez-Gonzales J** (2008) *Lysyl oxidase as a potential therapeutic target*. Drug News Perspect 21: 218–224.
- Rodriguez LG, Wu X, Guan JL** (2005) *Wound-Healing Assay*. Methods Mol Biol. 294: 23-29
- Romero-Canelon I, Salassa L, Sadler PJ** (2013) *The contrasting activity of iodido versus chlorido ruthenium and osmium arene aro-and imino-pyridine anticancer complexes: control of cell selectivity, cross-resistance, p53 dependence, and apoptosis pathway*. J Med Chem 56: 1291-1300.
- Sahai E, Marshall CJ** (2003) *Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis*. Nat Cell Biol 5: 711-719.
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ** (2008) *Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement*. Cell 135: 510-523.
- Sava G, Bergamo A, Dyson PJ** (2011) *Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: what comes next?* Dalton Trans 40: 9069-9075.
- Shahjehan F, Merchea A, Cochuyt JJ, Li Z, Colibaseanu DT, Kasi PM** (2018) *Body Mass Index and Long-Term Outcomes in Patients With Colorectal Cancer*. Front. Oncol. 8: 620.
- Shih W, Yamada S** (2012) *N-cadherin-mediated cell–cell adhesion promotes cell migration in a three-dimensional matrix*. J Cell Sci 125: 3661-3670.
- Shu X, Xiong X, Song J, He C, Yi C** (2016) *Base Resolution Analysis of Cisplatin-DNA Adducts at the Genome Scale*. Chem Int Ed 55: 14246-14249.
- Schafer M, Werner S** (2008) *Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited*. Nat Rev Mol Cell Biol 9: 628–638.
- Schmidt S, Friedl P** (2010) *Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms*. Cell Tissue Res. 339: 83-92.



- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR** (1990) *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J Natl Cancer Inst. 82: 1107–1112.
- Simmons JK, Hildreth BE, Supsayhad W, Elshafae SM, Hassan BB, Dirksen WP, Toribio RE, Rosol TJ** (2015) *Animal Models of Bone Metastasis*. Vet Pathol 52(5): 827–841.
- Slabý et al.** (2015) *Molekulární medicína*. Praha: Galén.
- Somlyo AP, Somlyo AV** (2000) *Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II*. J Physiol 522: 177-185
- Stehn JR, Schevzov G, O'Neill GM, Gunning PW** (2006) *Specialisation of the tropomyosin composition of actin filaments provides new potential targets for chemotherapy*. Curr Cancer Drug Targets 6: 245-256
- Sternlicht MD, Werb Z** (2001) *How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour*. Annu Rev Cell Dev Biol 17: 463–516.
- Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S, Hasegawa Y, Sato K, Endo H** (1994) *Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin*. J Cell Biol 124: 757–768.
- Tan TT, Coussens LM** (2007) *Humoral immunity, inflammation and cancer*. Curr Opin Immunol 19: 209–216.
- Thiery JP, Sleeman JP** (2006) *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol 7: 131–42.
- Vale RD, Milligan RA** (2000) *The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins*. Science 288: 88–95.
- van Rijt SH, Romero-Canelon I, Fu Y, Shnyder SD, Sadler PJ** (2014) *Potent organometallic osmium compounds induce mitochondria-mediated apoptosis and S-phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells*. Metallomics 6: 1014-1022.
- Vichai V, Kirtikara K** (2006) *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. Nat Protoc. 1(3): 1112-1116.
- Visse R, Nagase H** (2003) *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ Res 92(8): 827–839.

- Watanabe Y, Usada N, Minami H, Morita T, Tsugane S, Ishikawa R, Kohama K, Tomida Y, Hidaka H** (1993) *Calvasculin as a factor affecting the microfilament assemblies in rat fibroblasts transfected by src gene.* FEBS Lett 324: 51–55.
- Weigelin B, Bakker GJ, Friedl P** (2012) *Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion.* Intravital 1: 32-43.
- Weinberg RA** (2014) *The biology of Cancer.* United States: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Wells A, Yates C, Shepard CR** (2008) *E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas.* Clin Exp Metastasis 25: 621–628.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Brocker E-B, Friedl P** (2003) *Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal–amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis.* J Cell Biol 160: 267-277.
- Wolf K, Müller R, Borgmann S, Bröcker EB, Friedl P** (2003) *Amoeboid change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases.* Blood 102: 3262-3269
- Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack MS, Friedl P** (2007) *Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion.* Nat Cell Biol 9: 893-904
- Wozniak K, Walter Z** (2000) *Induction of DNA-protein cross-links by platinum compounds.* Naturforsch C 55: 731-736.
- Xian X, Gopal S, Couchman J R** (2010) *Syndecans as receptors and organizers of the extra cellular matrix.* Cell Tissue Res. 339: 31-46.
- Yang C, Wang W, Li GD, Zhong HJ, Dong ZZ, Wong CY, Kwong DW, Ma DL, Leung CH** (2017) *Anticancer osmium complex inhibitors of the HIF-1alpha and p300 protein-protein interaction.* Sci Rep 7: 42860.
- Yilmaz M, Christofori G** (2009) *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion.* Cancer Metastasis Rev 28: 15–33.
- Zeng L, Gupta P, Chen Y, Wang E, Ji L, Chao H, Chen ZS** (2017) *The development of anticancer ruthenium(ii) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials.* Chem Soc Rev 46: 5771-5804.
- Zhao X, Li L, Yu G, Zhang S, Li Y, Wu Q, Huang X, Mei W** (2018) *Nucleus-enriched Ruthenium Polypyridine Complex Acts as a Potent Inhibitor to Suppress*

*Triple-negative Breast Cancer Metastasis In vivo.* Comput Struct Biotechnol. 17: 21-30.

***World Health Organization: WHO.***

Dostupné z: <http://www.who.int>

staženo dne: 13.10.2017

***National Cancer Institute: NIH.***

Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>

staženo dne: 20.12.2018

## VIII. SEZNAM OBRÁZKŮ

1. Epiteliálně – mezenchymální přechod.
2. Schéma inseminace sekundárních nádorů.
3. Chemická struktura komplexu (1).
4. Chemická struktura komplexu (2).
5. Graf závislosti viability MDA-MB-231 buněk na koncentraci cDDP.
6. Graf závislosti viability MDA-MB-231 buněk na koncentraci komplexů (1) a (2).
7. Graf vyjadřující schopnost MDA-MB-231 buněk zacelit rýhu vytvořenou při wound-healing eseji.
8. Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená cDDP a vyfotografovaná ihned po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.
9. Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená cDDP a vyfotografovaná 24 hodin po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.
10. Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (1) a vyfotografovaná ihned po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.
11. Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (1) a vyfotografovaná 24 hodin po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.
12. Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (2) a vyfotografovaná ihned po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.

13. Kultura buněk MDA-MB-231 ošetřená komplexem (2) a vyfotografovaná 24 hodin po vytvoření rýhy. Fotografováno při zvětšení 100x.
14. Graf vyjadřující re-adhezní aktivitu buněk MDA-MB-231 ošetřených cisplatinou, komplexem (1) a komplexem (2). Hodnoty s hvězdičkou jsou statisticky významně odlišné od cDDP ( $P < 0.05$ ).

## **IX. SEZNAM TABULEK**

1. Markery EMT.
2. Tabulka hodnot  $IC_{50}$  pro dané komplexy použité pro wound-healing esej na MDA-MB-231 buňkách.
3. Hodnoty  $IC_{50}$  pro cisplatinu, komplex (1) a komplex (2) testované na buňkách MDA-MB-231.