

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Stanovenie vplyvu nového platinového komplexu  
s protinádorovým účinkom na filamentáciu baktérií  
*Escherichia coli***

## BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	<b>Simona Galbavá</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a génové inženýrstvo
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.</b>
Rok:	2022



Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím zo zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznamovaná s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa .....

Chcela by som poďakovať vedúcej mojej práce Mgr. Jitke Prachařovej Ph.D. za vecné rady, ochotu, trpezlivosť a venovaný čas pri spracovávaní tejto bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať Oddeleniu molekulárnej biofyziky a farmakológie Katedry biofyziky PŕF UPOL za príjemné pracovné prostredie. Taktiež by som chcela poďakovať grantu IGA\_PŕF\_2019\_030 za použitý materiál. V neposlednej rade chcem poďakovať svojej rodine za podporu pri písaní tejto bakalárskej práce.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Simona Galbavá
Názov práce	Stanovenie vplyvu nového platinového komplexu s protinádorovým účinkom na filamentáciu baktérií <i>Escherichia coli</i>
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochemie
Vedúci práce	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

**Abstrakt:** Chemoterapeutiká ako cisplatina a jej analógy hrajú už desiatky rokov dôležitú rolu v liečbe nádorových ochorení. Napriek vysokej účinnosti majú tieto látky na báze platiny mnohé nevýhody a obmedzenia. Jedná sa najmä o nežiaduce účinky na organizmus pacienta a prirodzenú či opakovaným podávaním farmaceutika získanú rezistenciu niektorých nádorov voči liečbe. Uvedené nedostatky sú impulzom pre vývoj nových protinádorových liečiv. V poslednej dobe sú okrem platinových syntetizované a testované komplexy ďalších ťažkých kovov. Nutným krokom vo vývoji nových liečiv je najmä stanovenie biologického cieľa danej látky. Ide o miesto v bunke, ktoré je zmenené pôsobením liečiva a jeho modifikácia je zodpovedná za protinádorové účinky použitej zlúčeniny. Počas mnohých štúdií bolo potvrdené, že biologickým cieľom platinových cytostatík je DNA v jadre nádorových buniek. V predloženej bakalárskej práci bolo testované, či je DNA taktiež biologickým cieľom platinového komplexu 1,3-DACH. Spravili sme experimenty zamerané na sledovanie vplyvu uvedenej látky na filamentáciu baktérií *Escherichia coli*. Tento druh experimentu sa používa k potvrdeniu DNA ako biologického cieľa pre zlúčeniny ťažkých kovov nakoľko filamentačný rast je výsledok zastavenia delenia no nie rastu baktérii. Inhibícia delenia nastáva v dôsledku procesov vyvolaných naviazaním komplexov na DNA. Pre porovnanie boli použité vzorky ošetrované cisplatinou, o ktorej je známe, že inhibuje delenie no nezastavuje rast bakteriálnych buniek. Vďaka tomuto pôsobeniu, rastú baktérie *E.coli* v dlhých filamentoch. Zo získaných výsledkov je patrné, že cisplatina vykazuje v porovnaní so zlúčeninou 1,3-DACH intenzívnejší vplyv na delenie bakteriálnych buniek, avšak 1,3-DACH má taktiež významný inhibičný efekt a DNA je teda jeho biologickým cieľom. V práci bol ďalej skúmaný efekt ďalších dvoch nových komplexov platiny na delenie baktérií *E.coli*, pričom tieto nové látky neukázali žiadny efekt na bakteriálnu kultúru.

Kľúčové slová	Cisplatina, chemoterapeutikum, protirakovinová aktivita, kovové komplexy, oprava DNA
Počet strán	61
Jazyk	Slovenský

## Bibliographic identification

Autor's first name and surname	Simona Galbavá
Title	The effect of a new platinum complex with anticancer activity on filamentation of <i>Escherichia coli</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
The year of presentation	2022

**Abstract:** Chemotherapeutics such as cisplatin and its analogues have played an important role in the treatment of cancer for decades. Despite the high efficiency, these platinum-based substances have many disadvantages and limitations. In particular, it is the undesirable effect on the patient's body and the inherited or repeated administration of the pharmaceuticals acquired resistance of some tumors to treatment. These shortcomings are an impulse for the development of new anticancer drugs. Recently, complexes of other heavy metals have been synthesized and tested in addition to platinum-based complexes. In particular, the determination of the biological target of the substance is a necessary step in the development of new drugs. It is a site in the cell that is altered by drug action and its modification is responsible for the antitumor effects of the compound used. During many studies, it has been confirmed that the biological target of platinum cytostatics is DNA in the tumor cell nucleus. In the submitted bachelor thesis, it was tested whether the DNA is the biological target of the 1,3-DACH platinum complex. Performed experiments were focused on observation filamentation of bacteria *Escherichia coli* after treatment with 1,3-DACH complex. This kind of experiments is used to confirm DNA as a biological target for heavy metal compounds, as filament growth is the result of inhibition of cellular division without stopping bacterial growth. This division inhibition occurs as a result of processes induced by binding of complexes to DNA. Samples treated with cisplatin were used as reference samples, cisplatin inhibits cell division but does not stop cell growth. Due to this action, *E. coli* bacteria grow in long filaments. The results show that cisplatin has a more pronounced effect on bacterial cell division compared to the 1,3-DACH compound, but 1,3-DACH also has a significant inhibitory effect and thus DNA is its biological target. Further, the influence of the other two new platinum complexes on cell division of *E. coli* was investigated showing no inhibition effect on bacterial culture

Keywords	Cisplatin, chemotherapeutics, anticancer activity, metal complexes, DNA repair
Number of pages	61
Language	Slovak

## Obsah

1. Úvod.....	9
1. Teoretická časť.....	10
1.1. Platínové komplexy s protinádorovým účinkom .....	10
1.2. Molekulárny mechanizmus účinku cisplatiny.....	14
1.2.1. Vstup cisplatiny do organizmu a buniek.....	14
1.2.2. Cieľové miesto cisplatiny .....	15
1.2.3. DNA adukty cisplatiny.....	16
1.2.4. Bunková odpoveď baktérie <i>E.coli</i> na cisplatinu .....	18
1.3. Ďalšie možné ciele cisplatiny.....	25
1.4. Komplexy na báze ďalších ťažkých kovov.....	27
2. Materiál a metódy .....	31
2.1. Biologický materiál.....	31
2.2. Chemikálie .....	31
2.4. Metódy .....	31
2.4.1. Kultivácia baktérií.....	31
2.4.2. Ošetrovanie baktérií testovanými látkami.....	32
2.4.3. Pozorovanie baktérií a mikroskopia.....	33
3. Výsledky a diskusia .....	33
4. Záver .....	47
6. Zoznam použitej literatúry .....	48

## Ciele práce

- 1) Zhromaždiť najnovšie dáta týkajúce sa študovanej problematiky.
- 2) Spracovať literárnu rešerš na dané téma.
- 3) Študovať vplyv komplexu 1,3-DACH na filamentáciu *Escherichia coli*.
- 4) Na základe získaných výsledkov stanoviť, či je DNA biologickým cieľom tejto látky.
- 5) Výsledky štúdie zrovnat' s dátami pre ďalšie kovové komplexy v odbornej literatúre.



## 1. Úvod

Nádorové ochorenia patria k civilizačným chorobám, ktoré sa v posledných rokoch vyskytujú čoraz častejšie. K liečbe nádorových ochorení sa v klinickej praxi veľmi často využívajú chemoterapeutiká na báze platiny ako je cisplatina a jej analógy. Vo väčšine prípadov má liečba mnoho vedľajších účinkov a nie je trvácna. Vývoj nových liečiv sa preto zameriava na chemické zlúčeniny, ktoré majú malé vedľajšie účinky pri zachovaní rovnakého alebo lepšieho terapeutického efektu. Vďaka tomuto vznikajú nie len nové látky na báze iných ťažkých kovov ale stále je aktuálna aj syntéza a výskum nových komplexov platiny. Protinádorové účinky zlúčenín platiny používaných v klinickej praxi spočívajú v interakcii liečiva s DNA v jadre rakovinových buniek, ktorá je spojená s nasledujúcou biologickou odpoveďou na vzniknutú modifikáciu DNA a môže viesť až k vyvolaniu programovej smrti nádorových buniek. Mechanizmus interakcie liečiva s DNA nie je totožný pre všetky komplexy platiny. Jeden z experimentov, ktorým sa dá preukázať, že biologickým cieľom je DNA, je sledovanie vplyvu danej látky na filamentačný rast u baktérií *Escherichia coli*. Keď použitá zlúčenina inhibuje delenie buniek no nie ich rast, prerastajú bakteriálne bunky do dlhých filamentov. Filamentácia je jeden z prvých indikátorov, že biologickým cieľom zlúčeniny je DNA.

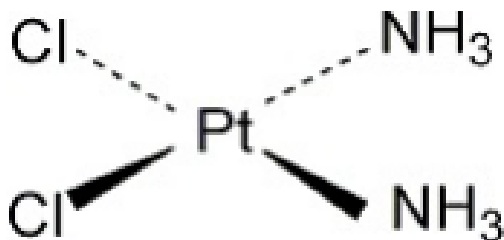
## 1. Teoretická časť

### 1.1. Platinové komplexy s protinádorovým účinkom

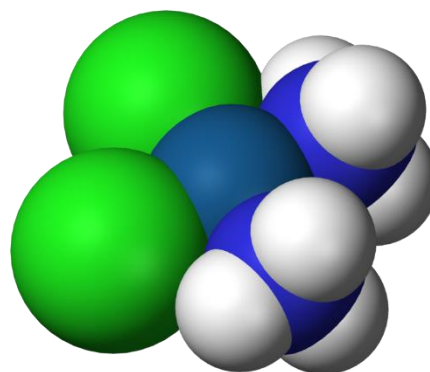
Platina sa nachádza v desiatej skupine periodickej tabuľky medzi prechodnými kovmi. Platinové komplexy majú biologické vlastnosti, vďaka ktorým sa môžu radiť aj k účinným chemoterapeutikám proti nádorovým ochoreniam. Najznámejším protinádorovým liečivom na báze platiny je cisplatina (*cis*-diammindichloroplatnatý komplex, cDDP). Schopnosť cisplatiny potlačovať delenie bakteriálnych buniek objavil Barnett Rosenberg z Michiganskej štátnej univerzity. Študoval vplyv elektrického poľa na rast baktérie *Escherichia coli* pomocou platinových elektród (Rosenberg *et al.*, 1965, Rosenberg *et al.*, 1980). Do nádoby s príslušnými baktériami a živným roztokom obsahujúcim amónne soli umiestnil elektródy zapojené do elektrického prúdu. V takomto prostredí došlo elektrolýzou materiálu platinových elektród k vzniku zlúčeniny, ktorá spôsobila zastavenie delenia bakteriálnych buniek, no bez inhibície ich rastu. Dochádzalo k uvoľňovaniu platiny do roztoku chloridu amónneho, s ktorým následne reagovala za vzniku aktívnych komplexov  $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_6$ . (Rosenberg *et al.*, 1999). Výsledky tohto objavu podnietili vedeckú komunitu k ďalšiemu výskumu cisplatiny, testovaním na nádorových bunkách a následným klinickým testom. Vďaka výborným výsledkom uvedených testov sa stala cisplatina a následne aj jej analógy ústrednými potenciálnymi zlúčeninami pre liečbu nádorových ochorení.

**Cisplatina** je neutrálny komplex s planárnou štruktúrou (Obr. 1, 2).

Aminoskupiny sú naviazané silnou koordinačnou väzbou na centrálny atóm platiny, ktorá sa nachádza v II oxidačnom stupni. Medzi atómami chlóru a platiny je väzba slabšia, čo môže viesť k ich nahradeniu nukleofilmi. Vo vodných roztokoch a na svetle sa rozkladá na menej účinné komplexy.



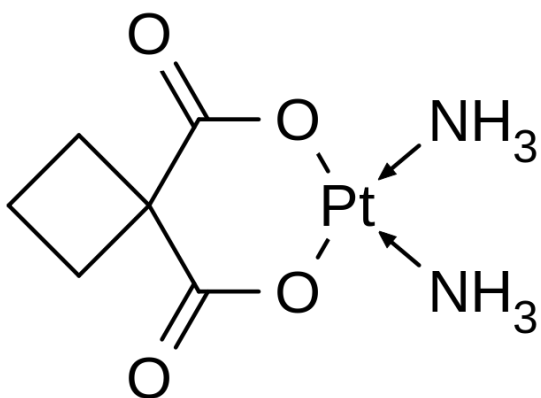
Obrázok 1: Vzorec cisplatiny (Roseberg, 1999)



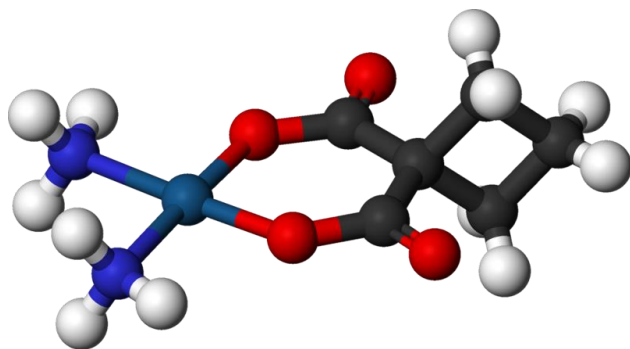
Obrázok 2: 3D štruktúrny vzorec cisplatiny (<https://en.wikipedia.org/wiki/Cisplatin>)

Obrovská úspešnosť pri klinických testoch vyvolala veľký predaj tohto cytostatika. Jej použitie sa žiaľ vzťahuje najmä na liečbu nádorov orgánov pohlavného ústrojenstva a to semenníkov a vaječníkov, ďalej močového mechúra a malígnych nádorov krku a hlavy (Kostova, 2006). Práve jej malé spektrum pôsobnosti je jedným z hlavných nevýhod tohto lieku (Perez, 1998). Medzi najrozšírenejšie typy rakoviny patrí rakovina pľúsok, podžalúdkovej žľazy a kolorektálny karcinóm. Tieto malignity bohužiaľ vykazujú prirodzenú rezistenciu voči liečbe s využitím cisplatiny (Brabec *at* Kasparkova, 2005). Ďalšou z nevýhod sú jej vedľajšie účinky. Najčastejším z nich je nefrotoxicita. Cisplatina poškodzuje tubulárnu funkciu obličiek, čo vedie ku klesnutiu hladiny magnézia a zníženej účinnosti glomerulárnej filtrácie. Medzi vedľajšie účinky ďalej patrí myelotoxicita, teda narušenie krvotvorby v kostnej dreni, porušenie nervových dráh, periférna neuropatia a poškodenie sluchu (výpadky pre vysoké tóny; Adam *et al.*, 2003). Potlačenie alebo aspoň zmiernenie niektorých z vedľajších účinkov je možné, no napriek tomu predstavujú komplikácie pri liečbe chemoterapiou pomocou cisplatiny významnú záťaž pre organizmus pacienta. Ďalším negatívom je mutagenný účinok často vyvolaný pri liečbe cisplatinou, vďaka čomu môžu v konečnom dôsledku v tele vzniknúť aj ďalšie nádory. Rovnako závažným problémom je taktiež častý vznik rezistencie nádorov na cisplatinu pri opakovanom podaní. Vo väčšine testovaných prípadov, bunky vystavené cisplatinе aktivovali adaptačnú odpoveď, ktorá ich urobila menej citlivými na antiproliferačné a cytotoxické účinky lieku a nakoniec došlo k obnove ich proliferácie vytvorením rezistencie na liečivo. Veľká časť pacientov liečených cisplatinou je teda predurčená k recidíve nádoru a terapeutickému zlyhaniu (Galluzzi *et al.*, 2014). Kvôli týmto dôvodom je dôležité vyvinúť liečivo s menšími nežiaducimi účinkami.

**Karboplatina** (*cis*-diammin-(1,1-cyklobutándikarboxyláto)platnatý komplex) je biologicky aktívnym derivátom cisplatiny (Blommaert, 1995; Obr. 3, 4) Odvodzuje sa nahradením dvoch slabo viazaných chlórov cyklobutánodikarboxylátovým ligandom. Ten vo vode disociuje pomalšie než chlór v cisplatinе. Dôsledkom toho je vyššia stabilita karboplatiny a teda menšia toxicita no zachovanie terapeutických účinkov. Karboplatina má nižšiu neurotoxicitu a nefrotoxicitu v porovnaní s cisplatinou (McKeage, 2000). Nežiaducim účinkom je však útlm krvotvorby, môže taktiež spôsobovať dermatitídu, mukozitu, alergické reakcie, zmeny chutí (Adam *et al.*, 2003).

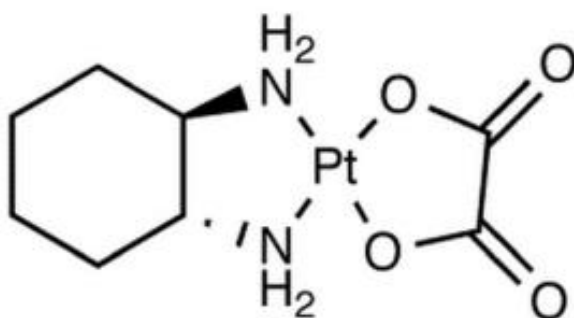


Obrázok 3: Vzorec karboplatiny (<https://sh.wikipedia.org/wiki/Karboplatin>)

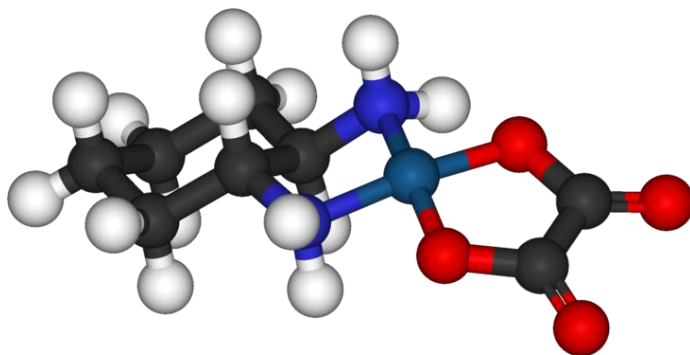


Obrázok 4: 3D štruktúrny vzorec karboplatiny  
(<https://sh.wikipedia.org/wiki/Karboplatin>)

**Oxaliplatina** ((1R,2R-diaminocyklohexán)oxalátplatnatý komplex) je ďalším analógom vzniknutým nahradením chloridových atómov a amónnych iónov oxalátovým ligandom a diaminocyklohexánom (DACH Obr. 5, 6). Často sa kombinuje s 5-fluorouracilom a aktívnou formou kyseliny listovej. Táto kombinácia je účinná voči



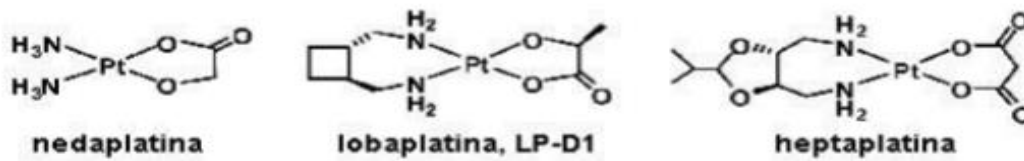
Obrázok 5: Vzorec oxaliplatiny (<https://en.wikipedia.org/wiki/Oxaliplatin>)



Obrázok 6: 3D štruktúrny vzorec oxaliplatiny  
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Oxaliplatin>)

kolorektálnemu karcinómu. Oxaliplatina má však negatívny účinok na gastrointestinálny trakt a nervovú sústavu (Brabec *et* Kasparkova, 2005). Poruchy nervovej sústavy môžu viesť k poškodeniu prehltnia. Môže dôjsť k nevoľnosti a zvracaniu. Tieto symptómy sa prejavujú akútne po vnútrožilnom podaní a sú dobre ovplyvniteľné sérotonínom (Adam, 2003). V porovnaní s cisplatinou je jej účinnosť vyššia a toxicita voči obličkám nižšia. Nebola zistená krížová rezistencia s cisplatinou a karboplatinou (Tashiro *et al.*, 1989).

**Nedaplatina, lobaplatina, heptaplatina** sú látky, ktorých mechanizmus biologického účinku je stále predmetom výskumu (Obr. 7). V praxi sa používajú v Japonsku a Latinskej Amerike a nepoužívajú sa v Českej republike. Nedaplatina má na platínu naviazané rovnaké  $\text{NH}_3$  ligandy ako cDDP a karboplatina no obsahuje odlišnú odstupujúcu skupinu. Lobaplatina a heptaplatina sa štruktúrne približujú oxaliplatine. Odlišujú sa odstupujúcimi ligandami. Lieky obsahujúce tieto komplexy majú menej závažné vedľajšie účinky. V organizme pôsobia necielene, čiže zasahujú aj zdravé normálne bunky. Tento problém je spoločný pre všetky vyššie opísané látky (Hannon, 2007).



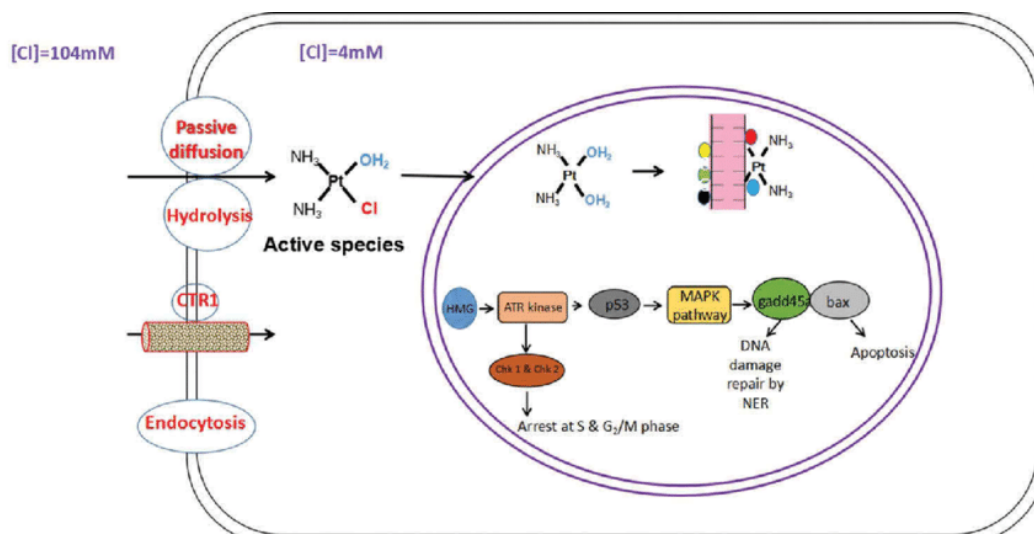
Obrázok 7: Vzorce nedaplatiny, lobaplatiny a heptaplatiny (Pizarro et Sadler, 2009)

## 1.2. Molekulárny mechanizmus účinku cisplatiny

### 1.2.1. Vstup cisplatiny do organizmu a buniek

Cisplatinu sa podáva pacientom intravenózne v nereaktívnej forme. V krvnom riečisku ľudského tela je vysoká koncentrácia chloridových iónov (približne 100 mM), čiže chloridové ligandy hydrolyzujú v krvi oveľa pomalšie ako v bunke, kde je ich koncentrácia podstatne nižšia.

V minulosti sa predpokladalo, že cisplatinu preniká do bunky pomocou pasívnej difúzie. No novšie výskumy naznačujú, že cDDP môže byť do bunky transportovaná aktívne. Na tomto prenose sa podieľajú prenášače medi ako napríklad Ctr1 (copper transporter 1; Howell *et al.*, 2010), ktorý udržiava homeostázu medi v organizme. Predpokladá sa, že cisplatinu a meď sa vyskytujú súčasne v bunke a prechádzajú cez ten istý pór (Jain *et al.*, 2017). Po vstupe cisplatiny cez cytoplazmatickú membránu bunky dochádza k odstúpeniu jedného atómu chlóru. Táto zmena sa deje na základe zmeny



Obrázok 8: Schéma transportu cisplatiny do bunky (Jain et al., 2017)

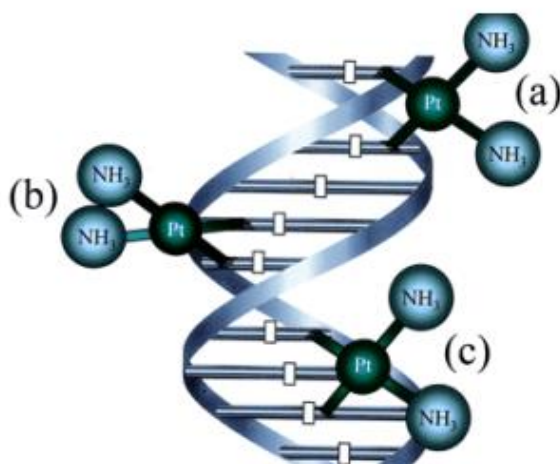
iónovej sily prostredia a vedie k vytvoreniu monoakvaformy cisplatiny. Následne komplex putuje cytoplazmou k miestu terapeutického účinku a dochádza k odstúpeniu aj druhého chloridového ligandu za vzniku diakvaformy. Tá je kladne nabitá a preto je vysoko reakčná so záporne nabitou molekulou DNA v jadre bunky (Obr. 8).

### 1.2.2. Cieľové miesto cisplatiny

K prvým indikátorom, že biologickým cieľom cisplatiny je DNA v jadre bunky patria výskumy, ktorými bol zistený filamentačný rast baktérií *E. coli*. Ďalším ukazovateľom je lýza buniek *E. coli* obsahujúcich bakteriofága  $\lambda$ , ktoré boli ošetrované cisplatinou. Túto reakciu spôsobujú interakcie DNA s DNA poškodzujúcimi substanciami v dôsledku čoho sa inhibuje bunkové delenie v lyzogénnych baktériách (Johnston *et al.*, 2013). Počas iného výskumu sa pomocou rádioaktívne označených prekurzorov zistilo, že cDDP inhibuje syntézu DNA (Elizabeth *et Lippard*, 1999). Prostredníctvom ďalšieho výskumu bolo sledované množstvo naviazanej platiny v HeLa bunkách a bolo porovnané pre rôzne biomakromolekuly. Výsledky vykazovali 22 naviazaných platinových atómov na 1 molekulu DNA. Pri molekule RNA sa množstvo naviazaných platinových atómov líšilo vzhľadom na druh RNA a to rôznym pomerom atómov platiny k typu RNA. Pri mRNA to bol 1 atóm Pt k 1 molekule mRNA, 1 atóm Pt k 30 molekul rRNA a 1 atóm Pt na 1500 molekul tRNA (Pascoe *et Roberts*, 1974).

Experimentálne bolo potvrdené, že dominantná cieľová štruktúra pre platinové cytostatiká je DNA. Viazu sa koordinačnou väzbou a menia štruktúru DNA tak, že už ďalej nie je možné replikovať DNA bunkovým aparátom. Poškodenie môže byť tak významné, že vedie k aktivácii proapoptických signálnych dráh a k bunkovej smrti (Maltsumoto *et al.*, 1997).

Pri reakcii s molekulou DNA dochádza najprv k elektrostatickým interakciám medzi záporne nabitým fosfátovým skeletom a kladne nabitým platinovým akvatovaným komplexom (mono- aj diakvaforma). Cisplatina sa prednostne viaže na dve bezprostredne susediace báze v jednom reťazci DNA (Hemminki *et Ludlum.*, 1984). Kovalentne sa viaže cez odstupujúci ligand vody na dusík v pozícii 7 (N7) purínových bází (adenín a guanín). Vytvorí sa monofunkčný adukt cisplatiny na DNA. Okrem monofunkčných aduktov môžu vznikáť aj bifunkčné adukty a to v prípade sterickej blízkosti druhého ligandu a reaktívnej pozície na heterocyklickej bázi. Takto môžu vznikáť vnútroreťazcové (IAC- intrastrand-crosslink) alebo medzireťazcové



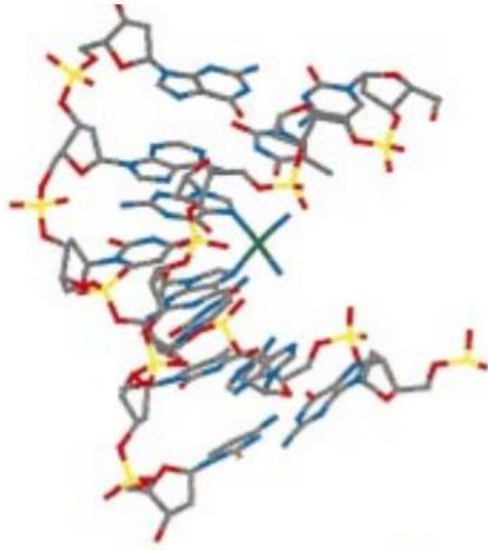
Obrázok 9: Typy aduktov tvorených cisplatinou. (a) medzireťazcový mostík, (b) vnútroreťazcový mostík 1,2-d(GpG), (c) 1,3-GXG-vnútroreťazcový mostík (Gonzalez, 2001)

(IEC- interstrand-crosslink) mostíky (Mattern *et al.*, 1982, Obr. 9). Vytvorené adukty spôsobujú lokálnu denaturáciu, výsledkom čoho je deformácia DNA. Pod touto deformáciou rozumieme ohyb a rozvinutie DNA, čo spôsobuje blokáciu replikácie a transkripcie. Aj samotný adukt platiny predstavuje prekážku pre polymerázu čo prispieva k blokácii replikácie. Pokiaľ nie je dané poškodenie opravené, smeruje táto bunka k apoptóze.

### 1.2.3. DNA adukty cisplatiny

Cisplatina tvorí DNA adukty, ktoré vedú ku konformačným zmenám v DNA. Najvyskytujúcejší vnútroreťazový mostík je 1,2-GG a 1,2-AG (Obr. 10). Dochádza k lokálnemu rozvinutiu helixu o 9-11°. Os helixu sa ohne smerom k veľkému žliabku približne o 60°. Malý žliabok helixu sa stáva plytším. Celkovým ohnutím helixu sa deformujú aj báze DNA. Vrtul'ovo sa skrúcajú no zachovávajú si medzi sebou vodíkové väzby.





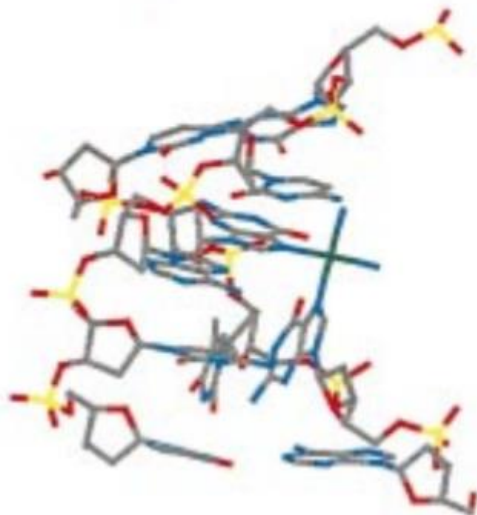
Obrázok 10: 1,2-vnútroreťazový mostík vytvorený interakciou cisplatiny a DNA (Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, 1995)

Platinové atómy sú vytlačené z priestoru guanínových báz a vytvorí sa sférické pnutie (Jamieson *et al.*, 1999).

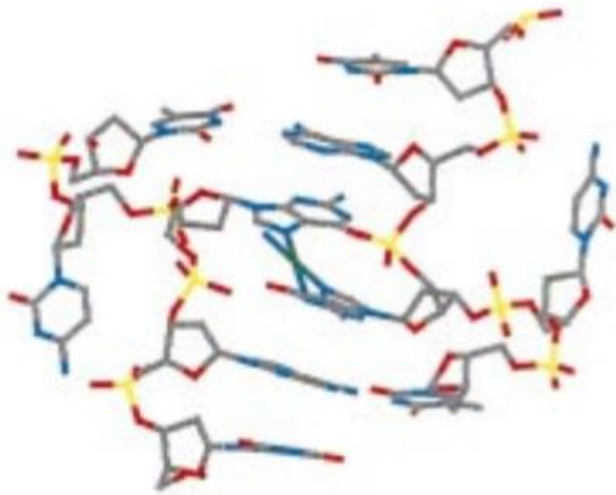
Ďalší z aduktov cisplatiny je 1,3-vnútroreťazový mostík d(GpNpG, Obr. 11).

Spôsobuje rozvinutie o  $19^\circ$  a os helixu sa ohýba o približne  $30^\circ$  smerom k veľkému žliabku (Fichtinger-Schepman, *et al.*, 1985).

Mostík sa môže vytvoriť aj na protiahlych sekvenciách 5'-GC-3'. V takomto prípade hovoríme o medzireťazových mostíkoch. Tie sa nachádzajú vo vnútri helixu



Obrázok 11: 1,3-vnútroreťazový mostík vytvorený interakciou cisplatiny a DNA, (Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, 1995)



Obrázok 12: Medzireťazcový mostík (Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, 1995)

a komplementárne báze, ktoré nie sú zahrnuté v mostíku sú vytláčané von z helixu. Vytvárajú sa tak deformácie prispievajúce k nepravidelnostiam DNA. Ovplyvňujú aspoň 4 okolité báze. V prípade, že cisplatina spôsobí vznik mostíkov, a to vždy v malom žliabku, dôjde k zmene na ľavotočivú dvojjávitnicu (Jamieson *et* Lippard, 1999). Mostík ohýba os závitnice o 20-40° k malému žliabku a rozvíja o 76-80° (Fichtinger-Schepman *et* Van der Veer, 1985).

#### 1.2.4. Bunková odpoveď baktérie *E.coli* na cisplatinu

Existuje mnoho rôznych druhov rakovín a každá z nich má iné vlastnosti a preto je nepravdepodobné, že by sa našiel jeden liek na všetky druhy. Z tohto dôvodu je dôležité čo najlepšie pochopiť molekulárny mechanizmus zodpovedný za moduláciu bunkovej odpovedi a tak optimalizovať nové terapeutické stratégie pre použitie cisplatinu. Je niekoľko proteínov, ktoré rozpoznávajú ohýbanie DNA indukované špecifickými aduktmi cisplatinu. Lézie DNA sú rozpoznávané makromolekulami, ktoré rozpoznávajú poškodenia a môžu tieto chyby spôsobené aduktmi cisplatinu opraviť.

V bunkách *E. coli* sa ako odpoveď na poškodenie DNA spúšťa súbor neprepojených génov vytvárajúcich SOS dráhu. Aktivácia uvedenej dráhy môže podporiť prežitie buniek tým, že sa zvýši hladina enzýmov zodpovedajúcich za opravu

DNA. Regulácia týchto enzýmov je sprostredkovaná proteínom LexA, ktorý pri nepoškodenej DNA udržuje nižšiu hladinu opravných enzýmov (Little, Mount, 1982). RecBCD je enzým *E. coli* potrebný k oprave dvojlákových zlomov DNA pomocou homologickej rekombinácie. Oprava zahŕňa kopírovanie nepoškodeného vlákna homologickej sekvencie DNA a spojenie tejto kópie s poškodeným reťazcom. Prvým krokom je spracovanie DNA poškodenej aduktom tak aby sa vytvorili voľné 3'-jednovlákové chvosty (Kowalczykowski *et al.*, 2000). K vytvoreniu jednovlákových chvostov je potrebný vyššie spomenutý RecBCD a jeho interakcie s oktamérou sekvenciou nazývanou Chi. Proteín RecBCD je enzým, ktorý patrí k ATP- dependentným helikázam uvoľňujúcim a oddeľujúcim DNA a zároveň aj nukleázam, ktoré vytvárajú jednovlákové zárezy v DNA (Singleton *et al.*, 2004). Enzým RecBCD sa viaže na zlomený koniec dsDNA a rýchlo uvoľňuje duplex mechanizmom závislým na ATP (Taylor, Smith, 1995). Takto rozvinutá DNA je pripravená na opravu dvojlákových zlomov (Chadhury *et al.*, 1985). Rozvíjanie pokračuje a 3' koncové vlákno je kontinuálne degradované endonukleázovou aktivitou. Odvíjanie pokračuje kým enzým nenarazí na Chi sekvenciu. Vtedy enzým RecBCD „preťne“ DNA a vytvorí jednovlákový 3' ssDNA koniec (s Chi sekvenciou blízko jeho konca), na ktorý pripojí RecA proteín. RecA katalyzuje inváziu 3' konca ssDNA reťazca vzniknutého v predchádzajúcom kroku s donorovým duplexom za vzniku tzv. D-slučky. Donorová DNA pôsobí ako templát pre syntézu „opravenej“ DNA (Dillingham *et al.*, 2003). Po invázií a výmene reťazca DNA môže replikácia nastať z 3' konca inváznej ssDNA. RecA má tiež bipolárnu aktivitu čiže translokuje pozdĺž oboch reťazcov, pričom každý z nich má opačnú polaritu (Dillingham *et al.*, 2008). RecB aj RecD majú záhyby charakteristické pre DNA helikázy super-rodiny 1. C-koncová nukleázová doména je pripojená dlhým flexibilným linkerom k proteínu RecB. V aktívnom mieste nukleázy sa nahrádza natívny horčíkový ión vápenatým iónom. RecC proteín je doskový skelet, okolo ktorého je RecB zabalený. Má taktiež tri kanály prechádzajúce cez neho a to veľký kanál viažuci RecB a dva menšie kanály pre každý paralelný DNA koniec (Dillingham *et al.*, 2003). Po ukončení opráv DNA musia bunky vypnúť SOS dráhu kvôli zamedzeniu mutagenézy spôsobenej opravným systémom náchylným na chyby (Walker *et al.*, 1985). Dráha týchto proteínov pomáha tolerovať medzireťazcové spojenia v DNA spôsobené mutagénmi ako cisplatina alebo UV žiarenie (Keller *et al.*, 2001). Keďže SOS odozva môže byť zapnutá aj vypnutá, úloha

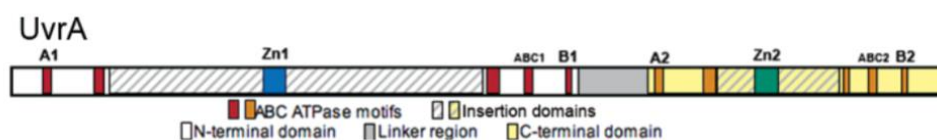
RecBCD môže spočívať vo vrátení bunky do stavu bez indukcie tejto odpovedi (Lloyd *et Thomas*, 1982). Tento enzým je taktiež zapojený do viacstupňového systému opráv a jeho deficit môže spôsobiť pretrvávajúce poškodenie ako zlyhanie replikačných vidličiek (Goodman *et al.*, 2000).

### 1.2.5. Opravy DNA po poškodení cisplatinou

Oprava jednovláknovej DNA sa deje tromi excíznymi opravami a to nukleotidová excisná oprava (NER), oprava chybného párovania DNA (MMR) a bázová excízna oprava (BER). NER je opravný mechanizmus, ktorý odstraňuje objemné poškodenie DNA spôsobené okrem cisplatinou ale aj napr. UV svetlom. To indukuje v DNA adukty a to najmä cyklobutánový pyrimidínový dimér a 6,4-fotoprodukty. Odstránenie cyklobutánového diméru pomocou NER bolo prvýkrát popísané u *Escherichia coli* (Setlow *et Carrier*, 1964). NER účinne organizuje odstránenie DNA lézií viacstupňovým systémom (Kisker *et al.*, 2013).

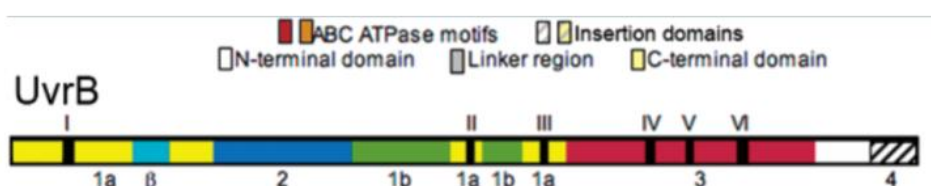
Proces NER je vysoko konzervatívny a môžeme ho opísať v niekoľkých krokoch: detekcia poškodenia, incízia, excízia a ligácia DNA. Pri prokaryotických organizmoch a u baktérií sú do opravného procesu zapojené proteíny UvrABC (Obr. 15). V prípade, že dôjde k zastaveniu RNA polymerázy v mieste poškodenia DNA platinovým aduktom ako prvé sa poškodenie zistí pomocou UvrA proteínu, ktorý pracuje v súčinnosti s UvrB. Polymeráza môže byť z miesta uvoľnená pomocou TRCF faktora (transcriptional repair coupling factor), ktorý následne pomáha usmerniť UvrAB mašineriu k poškodenému cieľu. UvrA obsahuje dve domény viažuce ATP (Domény 1 a 2). Prvá doména obsahuje dodatočné inzercie a to jednu zodpovednú za väzbu UvrB a druhú zodpovednú za väzbu na DNA (Timmins *et al.*, 2009). UvrA sa viaže pomocou týchto inzercii k DNA a následne k UvrB a vytvára komplex detekujúci poškodenie DNA. Poškodenie kontroluje UvrB (Kisker *et al.*, 2013), ktorý oddeľuje dva reťazce DNA aby sa overila poloha lézie. UvrA sa uvoľňuje z molekuly DNA. UvrB vytvorí tesné lešenie pre UvrC proteín obsahujúci dve nukleázové domény štiepiace fosfodiesterové väzby (Kisker *et al.*, 2013). Vytvorí sa komplex UvrBC. UvrC je zodpovedný za štiepenie nukleotidov na každej strane poškodenia DNA (Verhoeven *et al.*, 2000). Komplex UvrBC je nahradený pôsobením UvrD a DNA polymerázy, ktoré spoločne odstraňujú poškodenie spôsobené UvrC. DNA polymeráza dosyntetizováva na

základe komplementárneho vlákna DNA medzeru, ktorá vznikla pôsobením proteínového komplexu UvrBC (Caron *et al.*, 1985; Husain *et al.*, 1985). Posledným krokom je uzatvorenie novo vytvorenej opravovanej oblasti DNA ligázou (Kisker *et al.*, 2013).



Obrázok 13: Domény UvrA proteínov prevzaté z Croteau *et al.*, 2006

UvrA je prvý zo 4 proteínov v kaskáde NER. Je počiatočným senzorom poškodenia. Afinita UvrA pre neporušenú DNA je len dvoj- až päťnásobne nižšia ako afinita pre poškodenú DNA (Croteau *et al.*, 2006). UvrA patrí do skupiny ATP-viažucich super rodín ATPáz, ktoré spájajú hydrolyzu ATP s rôznymi bunkovými funkciami ako kondenzácia chromozómov, oprava DNA (Doolittle *et al.*, 1986; Junop *et al.*, 2001). Proteín UvrA je zložený z dvoch polovic oddelených linkerovou oblasťou (Croteau *et al.*, 2006, Obr.13). Sekvenčnou homológiou a mutačnou analýzou bola odhalená prítomnosť dvoch zinkových prstov typu C4 a dvoch ATP väzbových ATPázových domén (Doolittle *et al.*, 1986). Každá doména ATPázy obsahuje motív Walker A a Walker B oddelený intervenujúcimi sekvenciami. Pred každým Walker B motívom je charakteristická signálna sekvencia, Leu-Ser-Gly-Gly. Vo vnútri intervenujúcich sekvencií Walker A a Walker B sú dva zinkové prsty (Croteau *et al.*, 2006). UvrA však nevykazuje žiadnu sekvenčne špecifickú väzbu na DNA. Viaže sa a rozpoznáva širokú škálu porúch DNA (Zou *et al.*, 2002).



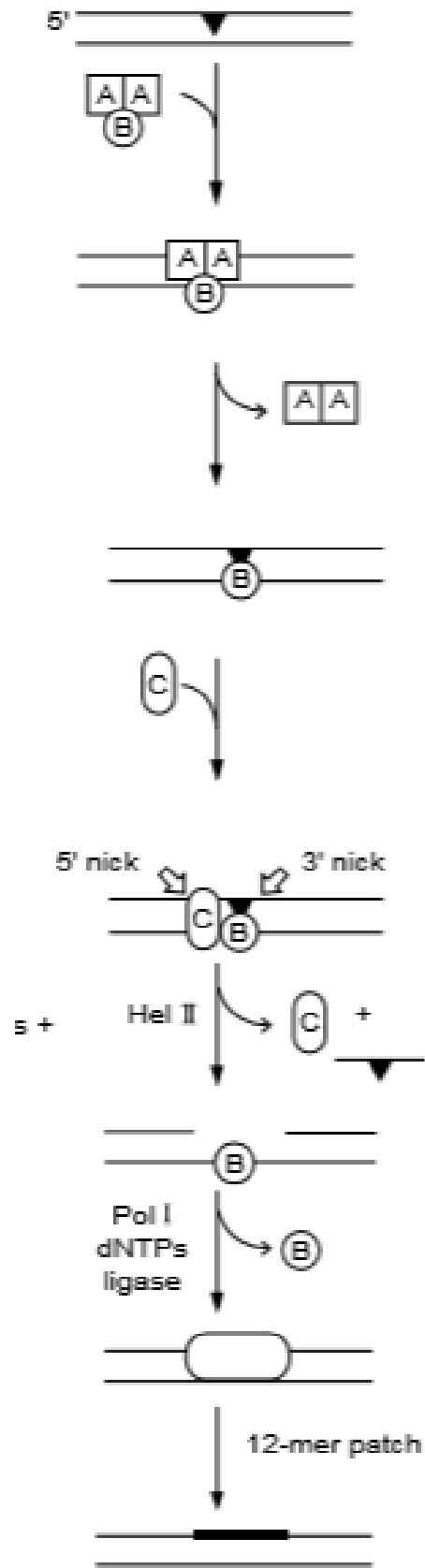
Obrázok 14: Domény UvrB proteínov prevzaté z Croteau *et al.*, 2006

UvrB interaguje so všetkými zložkami systému: UvrA, UvrC, UvrD, DNA polymerázou a DNA. Je rozhodujúci pri druhej fázy rozpoznávania škôd. Podieľa sa na overovaní škôd a zostáva naviazaná na DNA. Vytvára pre-incizívny komplex, ktorý je rozpoznávaný UvrC (Croteau *et al.*, 2006). UvrB sa skladá z piatich domén označovaných ako 1a, 1b, 2, 3, 4 (Obr. 14). Tento proteín je klasifikovaný ako člen

helikázovej rodiny (Machius *et al.*, 2000). Aktivuje sa v prítomnosti UvrA, poškodenej DNA alebo pri špirálovitom vinutí domény 4 UvrB (VanHouten *et al.*, 1988). Aktivita ATPázy UvrB je spojená s veľmi obmedzeným odvíjaním DNA vytesnením do 22 nukleotidov v závislosti od teploty topenia DNA (Gordienko *et al.*, 1997). UvrB nepoužíva domény na skenovanie pozdĺž reťazca, ale používa ich na rozpoznávanie deformácie DNA v miestach lézií, čo uľahčuje rozpoznávanie a incíziu UvrC (Croteau, *et al.*, 2006).

Proteín UvrC je najmenší zo štyroch Uvr proteínov a obsahuje dve odlišné katalytické miesta. UvrC katalyzuje aj 3' aj 5' incízie. Každá z týchto incízií sa uskutočňuje pomocou odlišného katalytického miesta, ktoré sa môže inaktivovať nezávisle na seba (Verhoeven *et al.*, 2000). C-koncová doména UvrB interaguje s UvrC (Hsu *et al.*, 1995). Delécia tejto domény ruší incíziu sprostredkovanú UvrABC. Interakcia medzi doménou 4 a UvrC je nevyhnutná pre 3' incíziu ale nie pre 5' (Moolenaar *et al.*, 1995). Ďalším znakom tejto domény je prítomnosť len jedného iónu kovu v aktívnom mieste koordinovaného kyselinou glutámovou a piatimi molekulami vody (Hsu *et al.*, 1995). Reakcia UvrC s DNA začína hydrolyzou štvrtej alebo piatej fosfodiesterovej väzby na 3' konci. Nasleduje incízia na ôsmej fosfodiesterovej väzbe na lézií 5' konca.

UvrD je helikáza patriaca do skupiny SF1 (superfamíli 1) a má širokospektrálnu úlohu pri opravách chybného párovania, replikácií, rekombinácií a NER (Dillingham 2011). UvrD je zložený zo štyroch domén a to 1A, 1B, 2A, 2B. Hydrolyza ATP umožňuje translokáciu komplexu UvrD v smere od 3' k 5' na jednovláknovej DNA prostredníctvom špirály 1B UvrD (Ahn, 2000). UvrAB stimuluje aktivitu helikázy UvrD pri štiepení špecifickým pre UvrD (Atkinson *et al.*, 2009). Syntéza komplementárneho vlákna DNA vyžaduje pôsobenie UvrD aj polymerázy 1. DNA polymeráza nevie pristúpiť pokiaľ sa neodstráni UvrC. UvrC sa odstraňuje pomocou UvrD (Husain *et al.*, 1985).



Obrázok 15: Kaskádová reakcia UvrABC systému (Reardon, Sancar, 2001)

Excízná oprava je ovplyvnená aj naviazaním regulačných proteínov na DNA, zhutňovaním do chromatínu, replikáciou, rekombináciou a transkripciou. Transkripcia stimuluje excíznú opravu aj u ľudí aj u *E. coli* (Bohr *et al.*, 1985, Mellon *et al.*, 1987). Transkripcia je spojená s NER transkripčným-opravným faktorom (TRCF) kódovaným *mfd* génom (Selby *et al.*, 1991). Transkripčný faktor má helikázový motív a funguje ako translokáza na RNA polymerázu (Park *et al.*, 2002). TRCF rozpoznáva pozastavenú RNA polymerázu ako aj UvrA v komplexe UvrAB. Súčasne uvoľňuje polymerázu a naberá UvrAB komplex na mieste lézie. Po dodaní UvrAB do miesta lézie, transkripčný faktor oddisociuje (Sancar *et al.*, 2004).

Ďalší typom opravy je mechanizmus opravy chybného párovania MMR. Okrem rozpoznania chybného párovania, sa MMR proteíny podieľajú aj na rozpoznaní poškodenia DNA spôsobeného chemoterapeutickými činidlami ako cisplatina, karboplatina (Massey *et al.*, 2003). MMR opravuje chyby vzniknuté pri syntéze DNA, čím napomáha k udržaniu stability genómu. Defekty v MMR oprave často vedú k vzniku rakoviny (Lynch *et al.*, 2009). MMR môže sprostredkovať aj mutagenicitu chemoterapeutík ako cisplatina. Okrem korekcie post-replikačných chýb, MMR rozpoznáva aj lézie spôsobené alkylačnými činidlami (akým je aj cisplatina), ktoré spôsobujú nesprávne spárovanie, najmä T/G. No dráha MMR nie je schopná opraviť tieto lézie. Pretože MMR nahrádza bázu oproti aduktu cisplatiny a adukt zostáva nedotknutý (Lippard *et al.*, 1996). Pretože sa MMR nepodarí léziu opraviť úplne, dráha sa spustí znova, čo vedie k márnemu cyklu. Tento neustály postup opravovania môže viesť k vytvoreniu dvojvláknových zlomov a k aktivácii signalizačných faktorov poškodenia DNA, vedúcich k spusteniu apoptózy (Rocha *et al.*, 2018). U baktérií *E. coli* je poškodené miesto rozpoznané proteínom MutS. V eukaryotických organizmoch je nutný MutS $\alpha$  k oprave chybné spárovaných báz a ku vkladaniu jedno-bázovej delečnej slučky a MutS $\beta$  opravuje pomocou jedno- alebo multi-bázovej inzerčnej delečnej slučky (Kunkel *et al.*, 2005). MutS vykazuje väzbovú aktivitu voči poškodenej DNA chemoterapeutikami ako cisplatina (Sedletska *et al.*, 2005). N-koncová časť MutS rozpoznáva chybné páry v DNA, zatiaľ čo C-koncová časť je zodpovedná za oligomerizáciu (Lamers *et al.*, 2000, Obmolova *et al.*, 2000).

HMG („High mobility group“) proteíny sa selektne viažu k DNA modifikovanej cisplatinou. Vyskytujú sa vo veľkom počte v jadrách eukaryotických buniek. Sú



súčasťou vytvárania vysoko organizovaných štruktúr v chromatine (Reeves, Adair, 2005). Proteíny obsahujú HMG box, ktorý umožňuje väzbu k DNA. Existujú dve rodiny HMG proteínov. Prvá skupina s jedným boxom a druhá skupina s dvoma a viacerými boxami. Viazu sa selektívne k 1,2-d(GpG) IAC a 1,2-d(ApG) IAC cisplatiny ale neviažu sa k 1.3-d(GpNpG) IAC a monofunkčným aduktom cisplatiny (Donahau *et al.*, 1990). Proteín sa viaže na DNA v malom žliabku a ohýba dvojzávitnicu (Wu *et al.*, 2003). HMG sa pevne viaže na adukty a tak bráni ich odstráneniu opravnými mechanizmami bunky (Ohndorf *et al.*, 1999).

### 1.3. Ďalšie možné ciele cisplatiny

Mnohé výskumy naznačujú, že DNA nie je výhradným cieľom všetkých platinových komplexov. Pre ich farmakologické a toxikologické vlastnosti sú dôležité aj iné biomolekuly ako RNA, fosfolipidy, peptidy a proteíny (Wang *et al.*, 1996). Bolo napríklad publikované, že len 10 % cisplatiny z celkového množstva podaného liečiva sa naviaže na DNA a zvyšok liečiva je naviazaného na rôzne proteíny a molekuly RNA (Akaboshi *et al.*, 1992). Boli taktiež študované modely interakcií medzi cisplatinou a nukleotidmi (Lippert, 1999). Purínové nukleotidy sú prítomné v bunkách a vykonávajú rôzne funkcie. Bolo preukázané, že Taq DNA polymeráza môže inkorporovať platinovaný dGTP nukleotid vytvárajúc platinovanú DNA (Benedetti *et al.*, 2008). Cisplatina sa viaže aj na pyrimidín cCMP (cyklický cytidínmonofosfát) a vytvára makrochelátový komplex s pyrimidínovými N3 dusíkmi a fosfátovými O atómami (Oswald *et al.*, 1998).

V *in vitro* podmienkach bolo taktiež zistené, že cisplatina vykazuje vyššiu väzbu na RNA v bunkách ľudského cervikálneho karcinómu HeLa (Pascoe *et al.*, 1974). Ďalšími testami bolo potvrdené, že cisplatina vo vodných roztokoch reaguje rýchlejšie s RNA ako s ssDNA (Papsai *et al.*, 2008). Vyššia väzba cisplatiny na RNA v porovnaní s DNA bola potvrdená aj u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* (Hostetter *et al.*, 2012). Cisplatina tiež reaguje s tRNA (Osborn *et al.*, 2014) a platinácia tRNA u *E. coli* vedie k inhibícii aminoacylačnej reakcie (Papsai *et al.*, 2007). Okrem narušenia translačného mechanizmu inhibíciou aminoacylačnej reakcie môžu interakcie cisplatiny a RNA prispievať k toxickým a terapeutickým účinkom prostredníctvom modulácie RNA procesov ako RNA zstrih (Schmittgen *et al.*, 2003) či RNA interferencia (Hedman *et al.*, 2003). Cisplatina sa viaže na špecifické sekundárne a terciálne štruktúry RNA

a nasleduje tvorba medzisieťových väzieb a pre-rRNA agregátov s vyššou molekulovou hmotnosťou (Danenberg *et al.*, 1991). Taktiež inhibovala zostrih ľudskej mRNA kódujúcej beta-globíny v jadrách HeLa buniek (Schmittgen *et al.*, 2003). Ukázalo sa, že platinácia interferujúcej siRNA, zapojenej do post-transkripčného umlčania génu, má za následok zníženie aktivity siRNA a tým aj znižuje umlčovanie expresie génov (Hedman *et al.*, 2003).

Cytochróm c sa radí medzi malé proteíny používané ako experimentálne modely. Hemoproteínový cytochróm c je normálne umiestnený v mitochondriálnom medzimembránovom priestore, kde je zapojený do elektrónového transportu (Ow *et al.*, 2008). Aplikovaním cisplatiny na cytochróm c sa vytvára monoaddukt (Zhao *et al.*, 2009). Je narušená konformácia a lokálne zloženie cytochrómu platináciou primárneho väzbového miesta (Zhang *et al.*, 2012).

Ďalším cieľom cisplatiny sú aj zinkové prsty, vďaka ktorým sa proteíny viažu na DNA a regulujú génovú expresiu. Cieľom je aj zinkový prst nachádzajúci sa v doméne DNA polymerázy A. Tento enzým je veľmi dôležitý pre presnú syntézu genetickej informácie. Štyri tiolové skupiny z cysteínových zvyškov koordinujú atóm zinku v zinkových prstoch. Cisplatina reaguje s iónom  $Zn^{2+}$  postupne a nahrádza tak  $Zn^{2+}$  ión v prste. Reakcia medzi zinkovým prstom a cisplatinou je rýchlejšia ako medzi cisplatinou a DNA. To znamená, že by zinkové prsty mohli byť cieľom cisplatinových liekov. Cisplatina mení štruktúru DNA polymerázy A, čím blokuje replikáciu DNA a spôsobuje bunkovú smrť (Makovec *et al.*, 2019).

Aktín je najrozšírenejší proteín vo veľa typoch ľudských buniek. Polymerizácia aktínového monoméru (G-aktín) a depolymerizácia filamentózneho aktínu (F-aktín) patrí k základným molekulárnym procesom. Tieto procesy ovplyvňujú morfológiu, transport a cytokinézu. Cisplatinou ošetrované vzorky inhibovali polymerizáciu G-aktínu na F-aktín (Wang *et al.*, 1996). Poškodenie F-aktínu cisplatinou v tubulárnych bunkách spôsobilo stratu stresových vlákien, následné oddelenie buniek a apoptózu (Kruidering *et al.*, 1998). Cisplatina mení konformáciu F-aktínu z alfa helixu na  $\beta$ -list (Zeng *et al.*, 1997).

Fosfolipidy a membránové proteíny patria k hlavným zložkám bunkových membrán. Preto patria k prvým štruktúram, ktoré prídu do styku s liečivom. Experimenty s fosfolipidmi vo forme veľkých unilamelárných vezikúl preukázali väzbu cDDP na negatívne nabitú kyselinu fosfatidovú, fosfatidylglycerol, fosfatidylserín,

fisfatidylinozitol a kardiolipín. Najčastejšia väzba bola pozorovaná za najvyššej koncentrácie pozitívne nabitých akvatovaných foriem cisplatiny, čo poukazuje na dôležitosť elektrostatickej interakcie medzi pozitívne nabitými komplexami platiny a negatívne nabitými fosfolipidmi. Reakcia fosfatidylglycerolu vo forme vezikúl s cDDP zvýšila teplotu prechodu medzi gélom a tekutinou. Následkom je spevnenie bunkovej membrány (Speelmans *et al.*, 1996). Zmena membránovej fluidity ovplyvňuje fungovanie buniek čo prispieva k cytotoxicite cisplatiny (Baritaki *et al.*, 2007).

#### 1.4. Komplexy na báze ďalších ťažkých kovov

Ako bolo už povedané, liečba chemoterapeutikami na bázy platiny bežne používanými v klinickej praxi je spojená s mnohými nevýhodami a nežiadúcimi účinkami na organizmus pacienta. Preto je snaha vyvinúť látky s lepšími protinádorovými účinkami bez nevýhod spojených so súčasou liečbou. Pozornosť sa teda upriamuje najmä na ďalšie komplexy kovov. Medzi biologicky účinné komplexy patria najmä zlúčeniny titánu, ruténia, medi, zlata, osmia a ródia. (Ott *et Gust*, 2007). Tieto prvky sa radia k prechodným a patria do bloku "d". Sú zaradené do skupín III-XII periodickej tabuľky (Pattan *et al.*, 2012). Majú jedinečné vlastnosti, medzi ktoré patrí kolísanie náboja. Tieto prvky sa teda na základe prostredia alebo v koordinačných zlúčeninách môžu vyskytovať vo forme katiónu, či bez náboja. Vo vodnom roztoku tvoria pozitívne nabité ióny, ktoré sa môžu viazať na záporne nabitú DNA (Frezza *et al.*, 2010). Kovové komplexy môžu agregovať do širokej škály koordinačných geometrií, ktoré im dodávajú jedinečný tvar. Dĺžka, uhol väzby a koordinačné miesto sa líšia v závislosti od typu kovu a jeho oxidačného stavu (Haas *et al.*, 2010). Existujú rôzne formy interakcie medzi kovom a ligandom. Zvyčajne vedú k tvorbe komplexov, ktoré sú jedinečné. Prechodné prvky kovov majú čiastočne naplnený d orbitál, preto majú variabilný počet elektrónov v plášti a teda aj elektrické a magnetické vlastnosti (Haas *et al.*, 2010).

Jedným z kovov, ktoré by mohli byť základom sľubných antineoplastických liečiv je titán. Jedná sa o kov hojne vyskytujúci sa v zemskej kôre. Titán sa radí k netoxickým kovom s historickými zmienkami o terapeutickej aktivite, vrátane nádorov. Jedna z prvých kovových zlúčenín so sľubnými protirakovinovými vlastnosťami bol titanocén dichlorid (Kopf *et al.*, 1979). Účinnosť tejto látky bola preukázaná na myších modeloch s tumormi rôzneho pôvodu (Tarillion *et al.*, 1997).

Titanocén dichlorid bol účinný aj na bunkách rezistentných na cisplatinu (Kurbacher *et al.*, 1995) a jeho najväčšia výhoda spočíva v nižšej toxicite pri *in vivo* testoch účinnosti na ľudský pľúcny karcinóm (Gerlach *et Kopf-Maier*, 1986). Po sľubných výsledkoch primárneho testovania bola látka podrobená klinickým skúškam. Tie však odhalili obmedzenú účinnosť voči nádorom rôznych typov a výrazné sprievodné vedľajšie účinky liečby u pacientov (Mross *et al.*, 2000).

Komplexy ruténia patria po cisplatine k najviac skúmaným komplexom s možným využitím v klinickej praxi vďaka ich nižšej toxicite a sľubným antiproliferačným účinkom. Výsledky mnohých štúdií naznačujú, že cieľom celej rady týchto komplexov je rovnako ako u látok na báze platiny DNA v jadre nádorových buniek. Vďaka oktaédrickej štruktúre niektorých komplexov ruténia (II a III), môžu tieto látky v porovnaní s klinicky využívanými platnatými komplexami s planárnou štruktúrou tvoriť s DNA nové typy interakcií (Clarke *et al.*, 1993). Vykazujú menšie toxické účinky v porovnaní s konvenčne používanou cisplatinou a účinkujú aj v nádorových bunkách rezistentných na cisplatinu (Coluccia *et al.*, 1993). Jeden z prvých ruténiových komplexov, ktorý bol testovaný na protinádorový účinok bol komplex *fac*-[Cl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ru]. Bol schopný inhibovať proliferáciu línie leukemických buniek s rovnakou mierou ako cisplatina (Clarke *et al.*, 1993). Ruténium patrí do rovnakej skupiny ako železo a preto vykazuje veľmi silnú afinitu k transferínu. Príjem sprostredkovaný transferínom je účinnejší, keď je transferín nasýtený železom. Nádorové bunky prijímajú viac železa, transportovaného transferínom, kvôli ich rýchlemu deleniu čo zabezpečuje dostatočné nasýtenie a účinnejší príjem zlúčeniny bunkou. Ruténiové komplexy sa akumulujú v bunke aj vďaka tomuto transportnému mechanizmu (Pongratz *et al.*, 2004).

Meď je ďalším prvkom nevyhnutným v ľudskom tele pri množstve biologických procesoch a používaným pre syntézu nových látok s potenciálnym protinádorovým účinkom (Santini *et al.*, 2014). Komplexy medi vykazujú v porovnaní s cisplatinou rozdielnu cytotoxickú účinnosť voči ľudským nádorovým bunkám a majú zrejme odlišný mechanizmus biologického účinku (Palma *et al.*, 2014). Spektrum vlastností komplexov medi sa rovnako ako aj u ďalších ťažkých kovov mení v závislosti od typu pripojeného liganda. Bolo zistené že niektoré komplexy medi môžu napríklad napodobňovať superoxid dizmutázu. To je dôležitý antioxidantný enzým chrániaci bunky pred poškodením radikálovými superoxidami prostredníctvom ich dizmutácie na

netoxické molekuly (Khalid *et al.*, 2013). V rámci *in vivo* štúdie s meďnatými komplexami bolo objavené, že tieto látky vykazujú zvýšenú cytotoxicitu na ľudských nádorových bunkových líniiach v porovnaní s konvenčnými liečivami na báze platiny a predovšetkým vysokú selektivitu pre nádorové bunky (Shokohi-pour *et al.*, 2015).

Ďalším prvkom využívaným pri vývoji potenciálnych nových liečiv proti rakovine je zlato. Behom poslednej dekády bolo pripravených mnoho foriem komplexov zlata s ligandami chlóru, brómu, síry alebo fosforu s cytotoxicitou preukázanou na nádorových bunkách (da Silva *et al.*, 2014). Väčšina týchto komplexov zlata mala výrazný vplyv na bunkové línie rezistentné voči cisplatine. Bolo preukázané že komplexy zlata v oxidačnom stupni tri majú sľubné cytotoxické vlastnosti, ktoré sa prejavujú protinádorovým mechanizmom líšiacim sa od cisplatiny a to indukciou apoptózy cez mitochondriálnu disfunkciu (Zou *et al.*, 2015).

Ďalším z kovov využívaných pre návrhy a prípravu nových látok, ktoré by mohli byť použité ako chemoterapeutiká je osmium. Komplexy osmia, ako napríklad  $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Os}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ , hydrolyzujú pomalšie v porovnaní s cisplatinou a reaktivita závisí na ligandoch naviazaných na centrálnom atóme osmia rovnako ako u všetkých komplexov s iným ťažkým kovom ako centrálnym atómom (Peacock *et al.*, 2007). Zväčša majú osmiové komplexy iné ciele než je DNA no cieľom niektorých osmiových zlúčenín je jadrová DNA. Vyššie uvedená látka tvorí monofunkčné adukty na DNA, ktoré vedú k inhibícii transkripcie. Výrazným rozdielom je skutočnosť, že komplexy osmia s arénmi neohýbajú DNA. Poškodenie spočíva výhradne v rozvinutí DNA (Kostrhunova *et al.*, 2008).

Metalové komplexy ródia vykazujú preferenčnú aktivitu v bunkách deficitných na opravu nesprávneho párovania. Prvé štúdie, ktoré boli vykonané v *in vitro* podmienkach preukázali, že sa komplexy viažu na zle spárovanú DNA s vysokou afinitou (Jackson *et al.*, 1999). Vďaka metódam kryštalografie sa odhalila „inercia“ komplexu ródia  $\Delta\text{-Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ , ktorého ligandy sa vkladajú priblížením k DNA zo strany malého žliabku. Ligand je vkladajú na miesto obsahujúce nesúladné báze, pričom sa vytlačujú zle spárované páre báz do veľkého žliabku. Toto vloženie má za následok konformačné zmeny v blízkosti inercie (Zeglis *et al.*, 2009). Dochádza k sterickej zrážke medzi pomocnými ligandmi a cukro-fosfátovou kostrou DNA (Barton *et al.*, 1986). Cukro-fosfátová kostra DNA sa mierne otvára aby sa do nej umiestnil sterickejšie expandívny ligand v mieste zle spárovaných báz (Zeglis *et al.*, 2009).

Vytlačenie zle spárovaných báz vedie k veľkej lézii, ktorá sa dá ľahko rozpoznať *in vivo* metódami molekulárnej biológie. Táto lézia je pravdepodobne zodpovedná za selektívnu bunkovú smrť v bunkách, ktoré nemajú opravný mechanizmus zle spárovaných báz. Zistilo sa, že enantiomér ( $\Lambda$ -Rh(bpy)<sub>2</sub>(phzi)<sup>3+</sup>) ródiového komplexu spomenutého vyššie sa taktiež viaže na zle spárované bázy čo naznačuje, že biologická aktivita tohto komplexu je spojená s väzbou na poškodenú DNA (Zieglis *et al.*, 2009). Počas *in vivo* štúdií bolo preukázané že oba zmienené komplexy inhibujú rast buniek s poškodením DNA. Po dlhšej inkubačnej dobe sú komplexy cytotoxické a indukujú nekrózu v testovaných bunkách (Ernst *et al.*, 2011). Schopnosť komplexov zamerať sa len na poškodené bunky je pre ne špecifická. Bežne používané chemoterapeutiká nerozpoznávajú poškodené a zdravé bunky, čo vedie k vzniku celej rady nežiaducich vedľajších účinkov (Carethers *et al.*, 1996).

Protirakovinová aktivita mnohých koordinačných komplexov na bázy platiny vychádza z ich schopnosti poškodiť DNA, vplyvom vzniku rôznych typov zosieťovacích väzieb a z následnej biologickej odpovedi na uvedené poškodenia vedúcich k smrti nádorových buniek (Johnson *et al.*, 1989; Cohen *et Lippard*, 2001; Brabec, 2002). Komplexy na báze iných ťažkých kovov ako aj platinové zlúčeniny potenciálne využiteľné v protinádorovej terapii, môžu mať podobný mechanizmus účinku ako cisplatina a jej analógy, kde je DNA taktiež ich farmakologickým cieľom. S vývojom nových komplexov sú však identifikované aj odlišné spôsoby mechanizmu interakcie týchto látok s DNA a ich účinku v porovnaní s konvenčnými cytostatikami aj ďalšie možné biologické ciele pôsobenia daných zlúčenín.

## 2. Materiál a metódy

### 2.1. Biologický materiál

*Escherichia coli* K12 CCM 7929 z Českej kolekcie mikroorganizmov (CCM).

### 2.2. Chemikálie :

Kvasnicový extrakt LP0021 (Sigma-Aldrich), trypton (Sigma-Adrich), chlorid sodný (Penta), hydroxid sodný (Sigma-Aldrich), deionizovaná voda

### 2.3. Použitý materiál, prístroje a softwér

pH meter, autokláva Tuttnaver, bakteriálna kľučka, trepačka, liehový kahan, spektrofotometer Synergy Mx od firmy Biotek, Software Gen5; Quick Photo Camera 3.2; GraphPad Prism (Prism Software), invertovaný mikroskop NIB-100 (Mikro)

### 2.4. Metódy

#### 2.4.1. Kultivácia baktérií

Na elektronickej váhe bolo odvážené 5 g kvasnicového extraktu, 10 g chloridu sodného (NaCl) a 10 g tryptonu. Po odvážení bolo pripravené LB médium z vyššie uvedených chemikálií, ktoré bolo doplnené na 10<sup>3</sup> ml deionizovanou vodou. Médium bolo prenesené na magnetickú miešačku nachádzajúcu sa v digestóriu. Po dôkladnom pomiešaní bolo zmerané pH média pomocou nakalibrovaného pH metru. Médium malo hodnotu pH 6,7. Požadovaná hodnota pre médium mala byť rovná približne fyziologickým podmienkam (7,5). Hodnota pH sa upravovala pomocou 5 mol/l roztoku hydroxidu sodného (NaOH). Výsledné pH média bolo 7,48. Takto pripravené médium bolo rozliate do štyroch sterilných erlenmayerových baniek, ktoré boli prikryté hliníkovou fóliou. Následne bolo médium autoklávované pri 121 °C 20 minút. V mikrobiologickom boxe bolo asepticky inokulované 25 ml LB média pomocou vyžihanej bakteriálnej kľučky. Naším kmeňom baktérií bola *Escherichia coli* K12 CCM 7929 z Českej kolekcie mikroorganizmov (CCM). Baktéria bola pred inokuláciou v tuhom médiu vpichu. Hrdlo skúmavky a baniek bolo pred prenosom vždy ošľahané v plameni z kahana. Skúmavka s *E. coli* bola uzavretá a inokulované médium bolo prenesené do trepačky nastavenej na 100 rpm a 37 °C. Baktérie boli kultivované cez noc.

## 2.4.2. Ošetrovanie baktérií testovanými látkami

K ošetrovaniu bakteriálnej kultúry boli použité cDDP a 1,3-DACH ([Pt(1,3-diaminocyclohexán)Cl<sub>2</sub>]). Ako prvé boli pripravené koncentrované roztoky týchto. Tieto boli ďalej riedené kultivačným médiom pre dosiahnutie výsledných koncentrácií 90; 45; 22,5; 11,25; 30; 15; 7,5; 3,75 mol/l použitých pre ošetrovanie baktérií. Tieto výsledné koncentrácie boli stanovené na základe predchádzajúcich experimentov s cDDP popísaných v odbornej literatúre.

Na viečko doštičky s 96 jamkami boli napísané výsledné koncentrácie účinných látok uvedených vyššie. Merania boli uskutočnené pre koncentrácie 90; 45; 22,5; 11,25; 30; 15; 7,5; 3,75 mol/l. Ďalšia jamka bola označená ako blank, ktorý obsahoval iba médium a nasledujúca bola jamka s nulovou koncentraciou účinnej látky avšak obsahujúcou baktérie v živnom médiu. Meranie sme opakovali triplicitne ako aj pre cDDP aj pre 1,3- DACH. Do kónickej skúmavky so šróbovacím viečkom bolo napipetované automatickou pipetou 10 ml média a následne bolo pridané asepticky 100 µl kultúry, ktorá bola kultivovaná cez noc. Následne sme napipetovali 100 µl čistého média do každej jamky v 96 jamkovej doštičke okrem jamky číslo 5, tam sme napipetovali 200 µl nakoľko sa jednalo o jamku s blankom. Čistou špičkou bolo odobrané 100 µl účinnej látky z koncentrovaného roztoku 90 mol/l a látka bola napipetovaná do prvej jamky. Obsah jamky bol jemne pipetou premiešaný a bolo prenesené z jamky číslo jedna 100 µl do jamky číslo dva. Tá bola opätovne premiešaná a bolo z nej prenesené 100 µl do tretej jamky. Tento postup bol zopakovaný aj pre štvrtú jamku, no odobraných 100 µl bolo vyhodnených do biologického odpadu spolu so špičkou. Následne bolo napipetované 100 µl bakteriálnej kultúry do všetkých jamiek okrem jamiek číslo 5. Týmto bolo dosiahnuté požadované zriedenie účinných látok. Jamka číslo 6 bola kontrolná bez účinnej látky na porovnanie pôsobenia cDDP a 1,3-DACH na bakteriálnu kultúru. Doštička s jamkami bola prikrytá a bola zmeraná jej absorbancia pri vlnovej dĺžke 600 nm na spektrofotometri v čase T = 0. Po odmeraní absorbancie pomocou softwéra Gen5 a uložení dát bola doštička vložená do trepačky, ktorá bola nastavená na 30 °C a 80 rpm. Merania absorbancie boli opakované každých 30 minút až po čas T = 330 min.



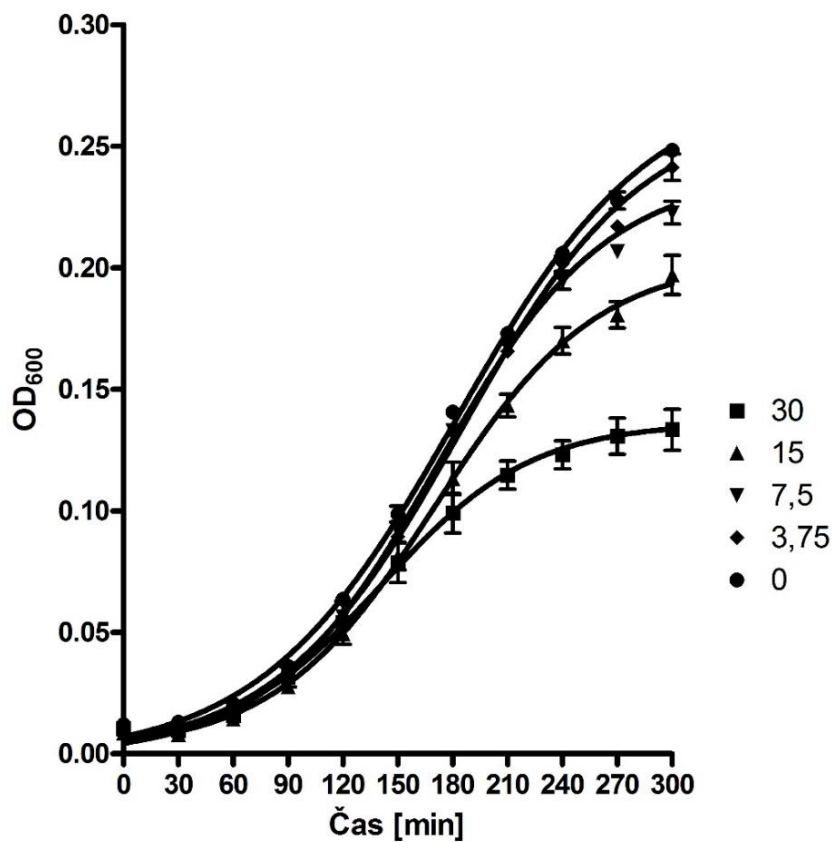
### 2.4.3. Pozorovanie baktérií a mikroskopia

Po odmeraní absorbančie bola bakteriálna kultúra ošetrená účinnými látkami inkubovaná na trepačke (30 °C, 80 rpm) cez noc. Potom bolo na podložné sklíčko prenesené 5 µl bakteriálnej kultúry z jamky s najvyššou koncentráciou (45 mol/l), prikryté krycím sklíčkom a vykvapnutá bola naň kvapka oleja na imerzný objektív. Preparát bol vložený na stolček a baktérie boli pozorované pri zväčšení 100x. Pomocou kamery pripojenej k mikroskopu a programu Quick Photo Camera 3.2 dodaného od firmy Promicra bolo pozorovanie odfotené.

## 3. Výsledky a diskusia

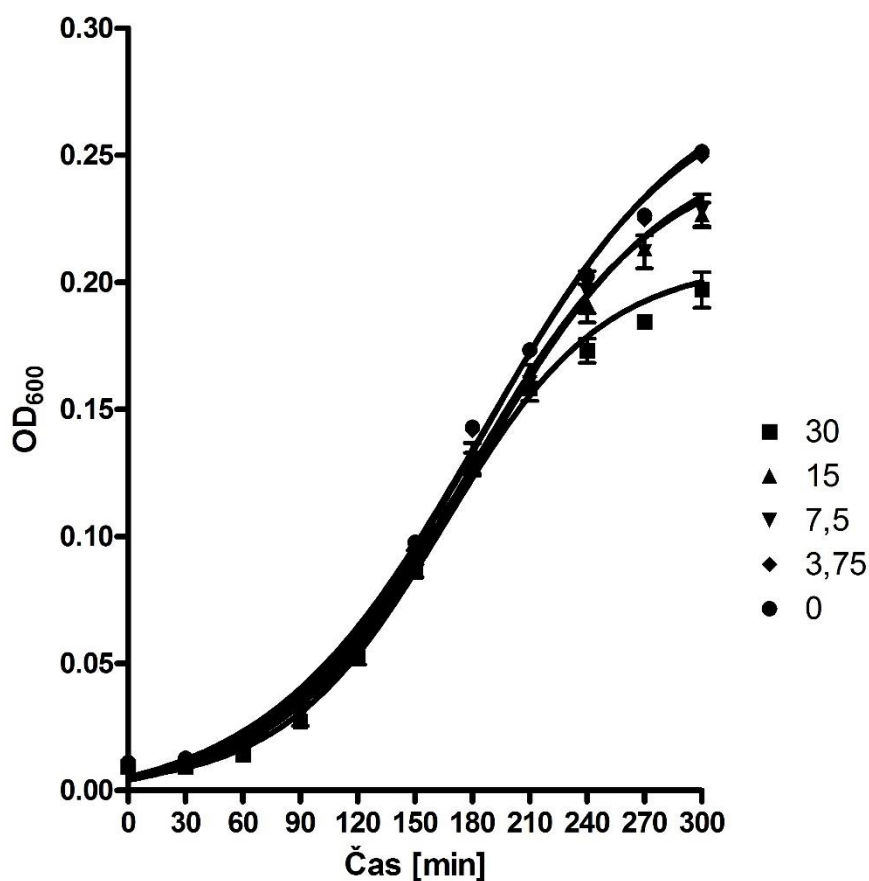
Úlohou predloženej práce bolo potvrdiť, či je DNA biologickým cieľom cDDP a komplexu 1,3-DACH na základe pozorovania vplyvu týchto látok na delenia baktérii *E. coli*, respektívne na ich filamentózny rast. Množenie baktérii je počas tohto experimentu najprv sledované v čase, keď sa pomocou spektrofotometra meria hodnota absorbančie pri optickej denzite OD<sub>600</sub>. Nárast počtu baktérii spôsobí zvýšený zákal média, ktorý sa pri spektrofotometrických meraniach prejaví ako stúpajúca hodnota absorbančie. Meraním získame rastovú krivku baktérii, z ktorej je možné zhodnotiť účinok zlúčenín na delenie baktérií. Baktérie ovplyvnené testovanou látkou môžu rásť pomalšie, čo je možné zistiť porovnaním vzoriek s neošetrenou kultúrou. V ďalšej fázy experimentu je potom pomocou svetelnej mikroskopie sledovaná indukcia filamentózneho rastu pri vzorkách ošetrených testovanými látkami (v našom prípade cisplatina a 1,3-DACH) a kontrolnou kultúrou neošetrenou žiadnymi zlúčeninami.

Efekt testovaných látok na rast baktérií *E. coli* sme vyhodnocovali pomocou údajov zo spektrofotometra. Exponenciálne rastúce baktérie boli ošetrené cDDP a 1,3-DACH (90-3,75 mol/l). Cisplatinu sme použili ako pozitívnu kontrolu. So znižujúcou sa koncentráciou cisplatiny rástli aj hodnoty OD<sub>600</sub>, čo pripisujem menšiemu účinku cDDP na rast, množenie a delenie baktérií. Koncentrácia cDDP 3,75 mol/l nevyvolala takmer žiadny rozdiel medzi neošetrenými a ošetrenými baktériami. Najvyššie spomalenie rastu baktérii ošetrených cDDP nastalo pri koncentrácii 30 mol/l (Graf č.1).

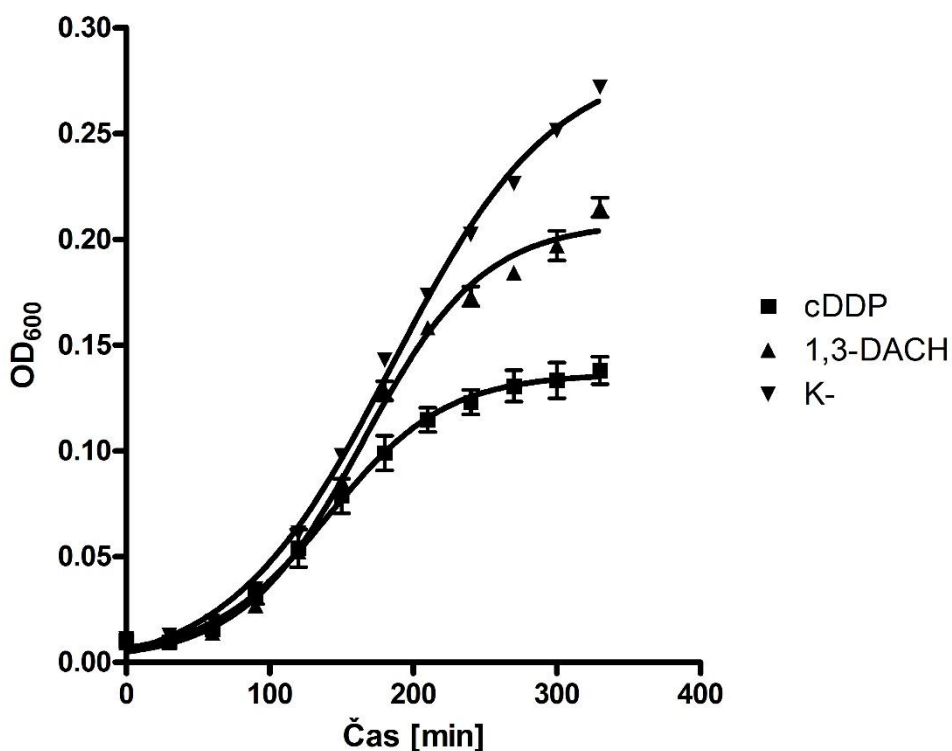


Graf č. 1 Účinnok cDDP na rast baktérií *E. coli* pri koncentrácii 30 -3,75 mol/l

Pri komplexe 1,3-DACH bolo vidieť neskoršiu odozvu na spomalenie množenia baktérií. Výraznejší rozdiel sme zaznamenali až pri čase  $T_{210}$  a to pri koncentrácií 1,3-DACH 30 mol/l. Koncentrácie 15 mol/l a 7,5 mol/l splynuli do jednej krivky a nápodobne splynula aj neošetrená kontrolná kultúra s najnižšia koncentráciou 1,3-DACH 3,75 mol/l. Vyvodzujem z toho záver, že najnižšia koncentrácia 1,3-DACH nemala žiadny účinok na delenie baktérií. Úspešné zastavenie delenia nastalo iba pri koncentrácií 1,3-DACH 30 mol/l. 1,3-DACH po začatí inhibície rastu spôsobilo stagnáciu rastu krivky (Graf č. 2). Pri porovnaní oboch aktívnych látok a kontroly môžeme vidieť, že cDDP má rýchlejší a vyšší účinok na spomalenie množenia buniek (Graf č. 3).



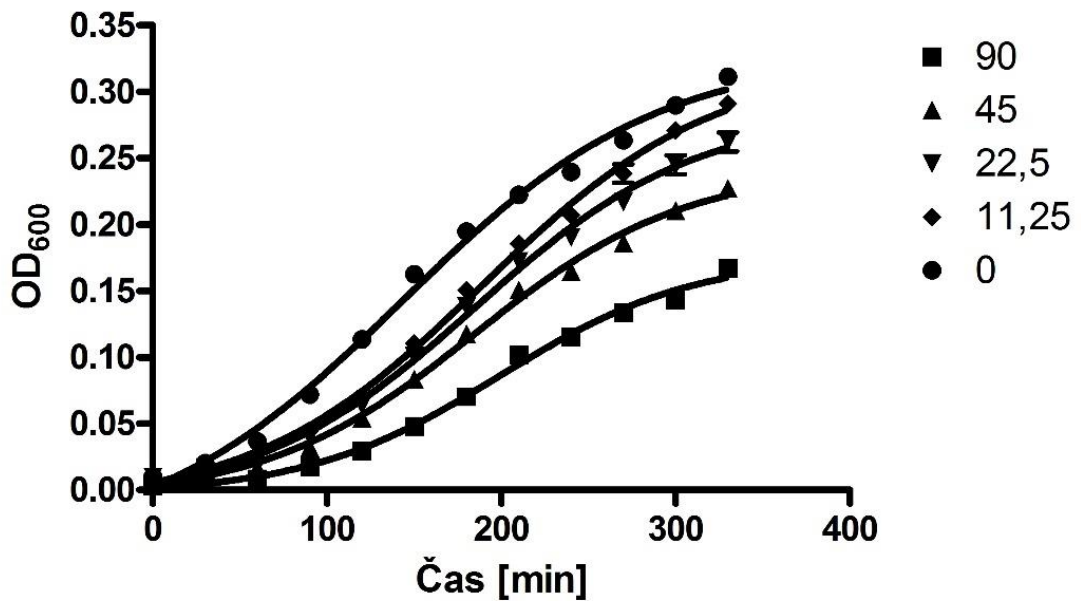
Graf č. 2: Účinok 1,3-DACH na rast *E. coli* pri koncentrácií 30-3,75 mol/l



Graf č. 3: Pozorovanie vplyvu na rast baktérii *E. coli* pri koncentráciách cDDP a 1,3-DACH 30 mol/l a kontroly

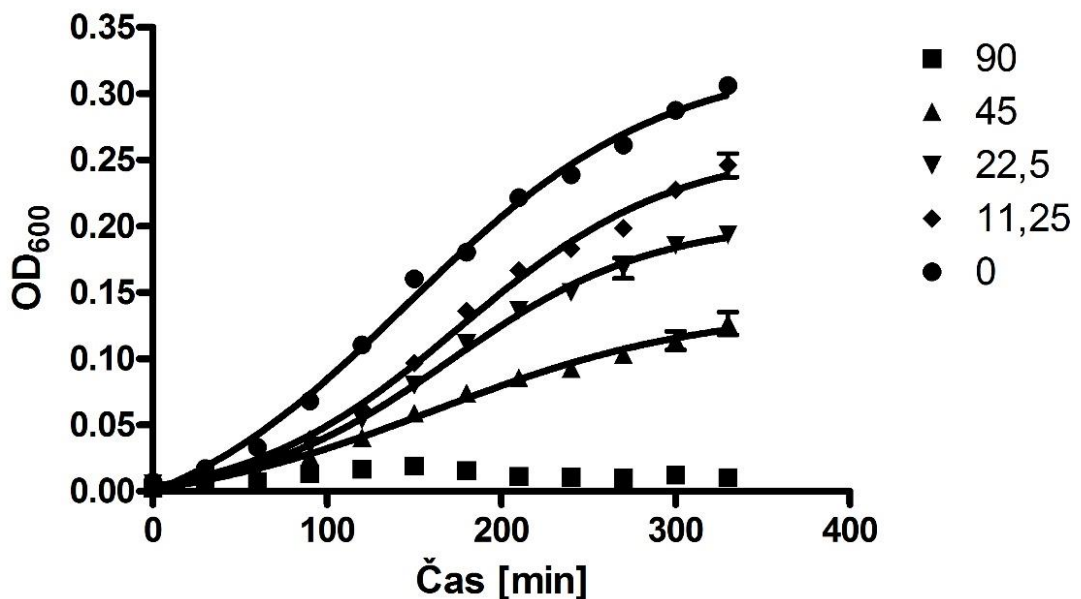
Nakoľko výsledky pre 1,3-DACH vykazovali pri použití vyššie uvedených koncentrácií tohto komplexu nižšiu účinnosť v inhibícii množenia v porovnaní s cDDP, baktérie sme ošetrili aj vyššou koncentráciou aktívnych látok (90-11,25 mol/l). Znova bola použitá cisplatina ako aktívna kontrola a kultúra s nulovou koncentráciou testovaných látok na porovnanie.

Graf č. 4 pre 1,3-DACH ukazoval úspešné spomalenie množenia a delenia baktérií pomocou tohto komplexu. Najúčinnějšía bola najvyššia koncentrácia (90 mol/l). Spomalenie množenia bolo, v porovnaní s vyššie uvedenou koncentráciou v grafe č. 3, intenzívnejšie a výraznejšie pri zvýšenej koncentracii. Rozdiel medzi nulovou koncentráciou a ošetrovanými kultúrami bol zreteľný.



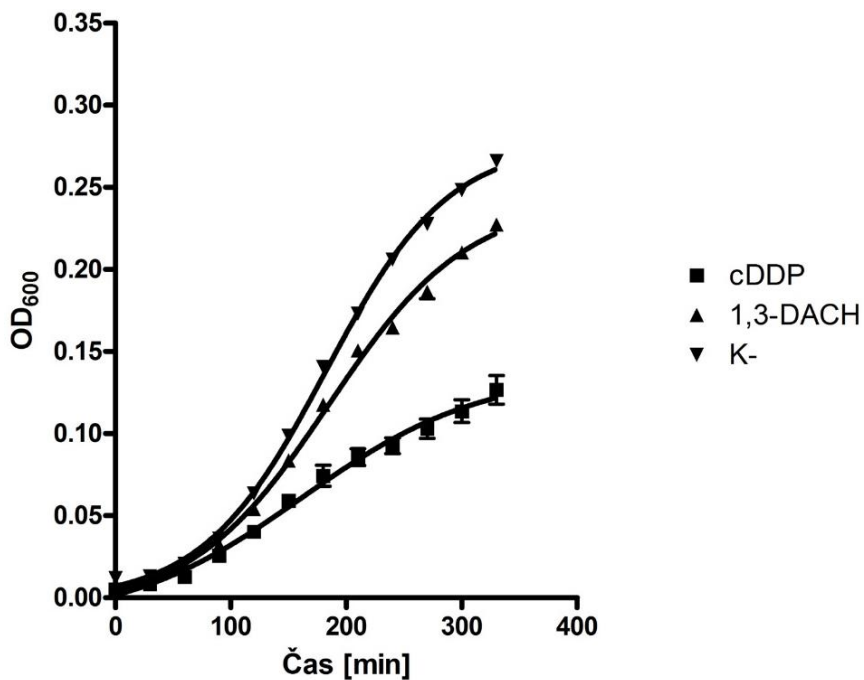
Graf č. 4: Vplyv vyšších koncentrácií 1,3-DACH (90-11,25 mol/l) na rast baktérií *E. coli*

Cisplatina pri koncentrácií 45 mol/l ovplyvňovala množenie kultúry s najväčšou mierou. Účinok sa dostavil už od času  $T_{60}$ , kde sme mohli vidieť výrazné odklonenie od hodnôt s nulovou koncentráciou. Baktérie pri koncentrácií 90 mol/l sa nemnožili, čo naznačuje že táto koncentrácia bola príliš vysoká a mohla spôsobiť úhyn bakteriálnej kultúry (Graf č. 5). Na rozdiel od cisplatiny, koncentrácia 90 mol/l 1,3-DACH sa neprejavila ako príliš vysoká a nespôsobila úplnú inhibíciu množenia baktérií vid' graf č. 4

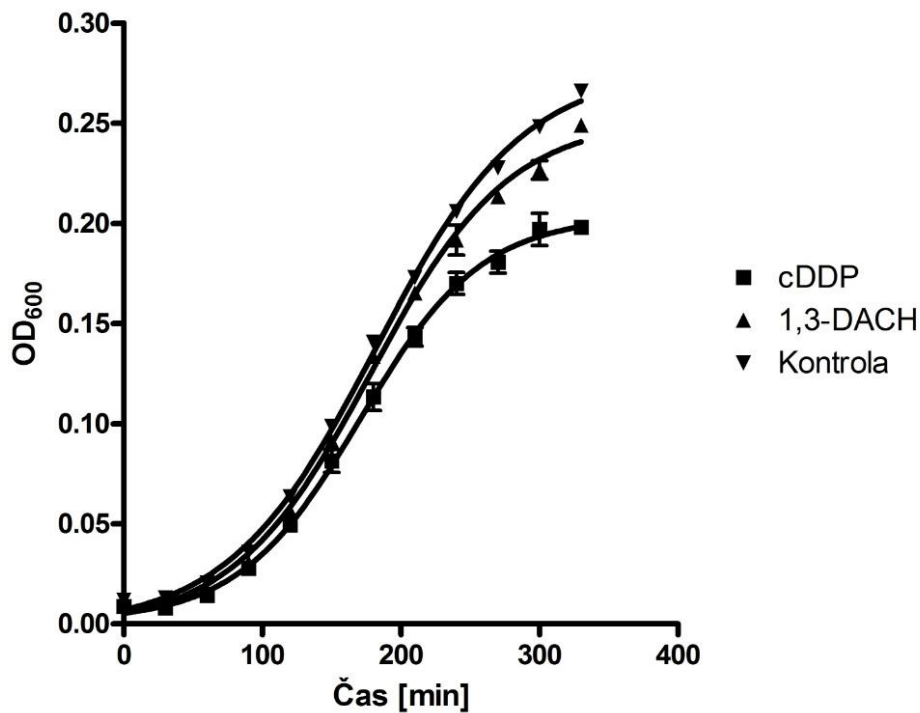


Graf č. 5: Účinok cDDP na rast baktérií *E. coli* pri koncentrácií 90-11,25 mol/l

Na ďalšie porovnávanie sme na základe výsledkov uvedených vyššie vybrali koncentráciu 45 mol/l 1,3-DACH a cDDP ako aktívnu kontrolu. Cisplatina aj naďalej ukazovala vyššiu inhibičnú schopnosť pri množení baktérií. 1,3-DACH komplex ukázal zastavenie množenia no s nižšou mierou. Pri rovnakej koncentrácii ukazuje cisplatina vždy vyššiu inhibíciu delenia (Graf č. 6).



Graf č. 6: Porovnanie č.2 45 mol/l cDDP, 1,3-DACH a neošetrená kontrola



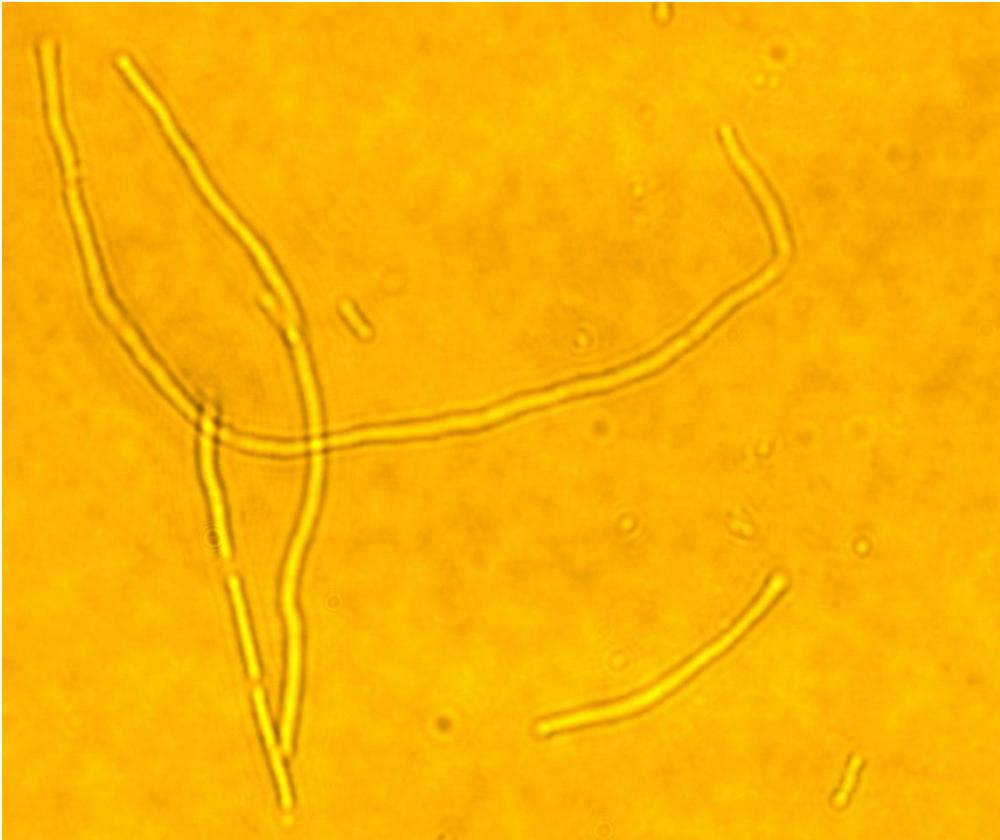
Graf č. 7: Porovnanie cDDP; 1,3-DACH a kontroly, koncentrácia 15 mol/l

Pri porovnávaní koncentrácie 15 mol/l sme nespozorovali veľký rozdiel medzi aktívnymi látkami (Graf č. 7). Tieto výsledky ukazujú aká dôležitá je správna koncentrácia jednotlivých komplexov. Ich účinok sa prejavuje až pri vyšších koncentráciách.

Vďaka výsledkom zo spektrofotometra sme očakávali úspešnú indukciu filamentačného rastu v bakteriálnej kultúre oštrenej cisplatinou a 1,3-DACH nakoľko obe spôsobili spomalenie delenia buniek. Filamentačný rast sme pozorovali v oboch prípadoch. V prípade cisplatinu boli filameny dlhé a zaznamenali sme ich pri veľkom počte baktérií. Filameny mali dĺžku od niekoľko desiatok mikrometrov až po menšie predĺžené bunky. Pozorovali sme aj bunky, ktoré neboli filamentované a odpovedali štandardnej veľkosti, no v menšom počte ako filamentované bunky pri oštreaní kultúry cisplatinou. Toto mohlo byť spôsobené spustením opravných mechanizmov v bunkách. Z pozorovania vyvodzujem, že cisplatinu po 24 hodinách inkubácie úspešne indukovala filamentačný rast buniek *E. coli* (Obrázok č. 16, 17).



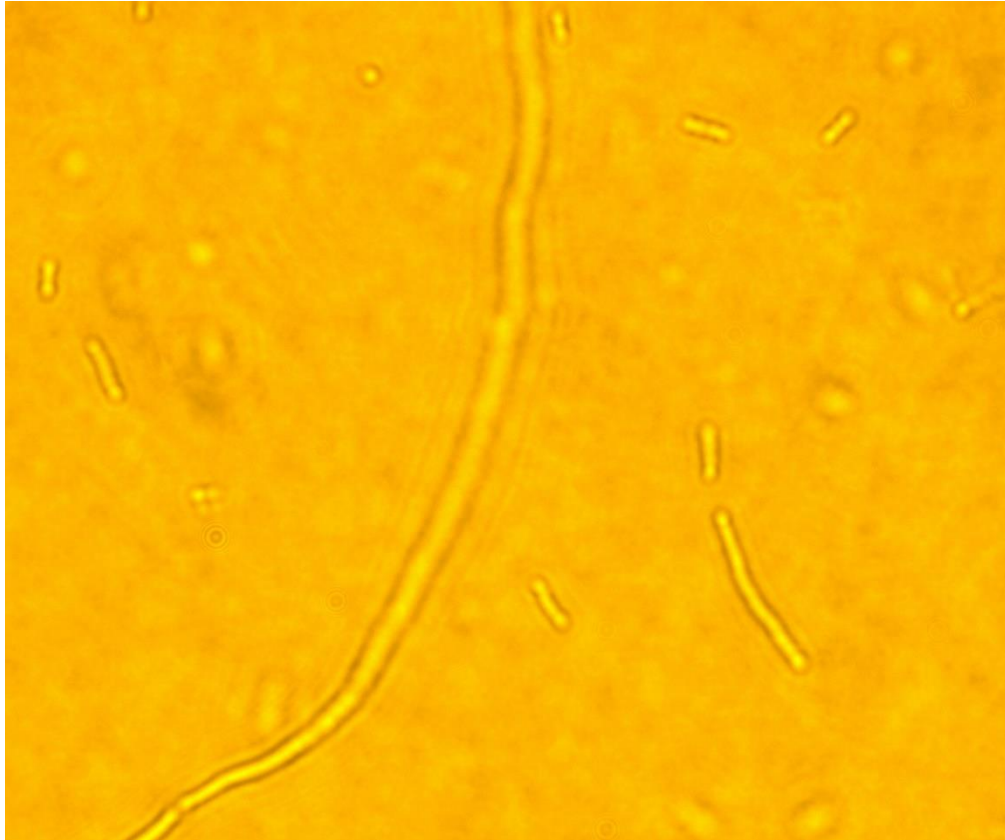
Obrázok 16: Filameny *E. coli* vzniknuté po aplikovaní 45 mol/l cDDP1



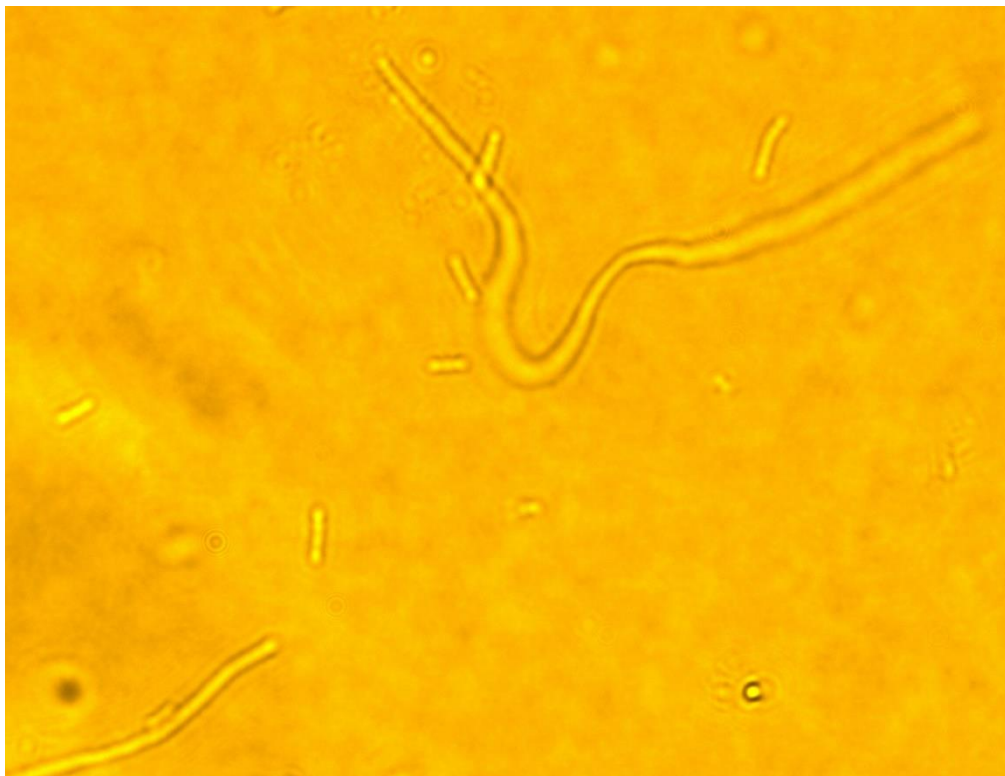
Obrázok 17: Filamentované bunky *E. coli* vzniknuté po ošetrovaní 45 mol/l cDDP

Komplex 1,3-DACH indikoval väčšie zachovanie delenia pri najvyššej koncentrácii v porovnaní s cDDP. Preto sme predpokladali, že pri pozorovaní pod mikroskopom budú zistené menšie filameny a väčší počet buniek, ktoré si zachovali svoju prirodzenú veľkosť. Na obrázkoch č. 18 a 19 môžeme pozorovať veľmi dlhý filament, tiahnucci sa cez celý obraz. Takýchto buniek sme zachytili niekoľko. Preto usudzujeme, že komplex 1,3-DACH úspešne indukoval filamentačný rast. Zvyšné bunky boli predĺžené, no s menšou mierou, čo možno pozorovať na obrázku č. 20. Taktiež sme mohli pozorovať väčší počet buniek, ktoré mali svoju pôvodnú veľkosť. Z tohto vyvodzujem, že pôsobenie komplexu spôsobuje bunkám menší stres a preto je indukcia filamentácie menšia v porovnaní s cDDP. Pre kontrolu sme spravili mikroskopické pozorovanie kontrolnej kultúry neošetrenej testovanými látkami. Vo vzorkách boli nájdené životaschopné bunky *E. coli* prirodzenej veľkosti. Kontrolu môžeme pozorovať na obrázku č. 21.

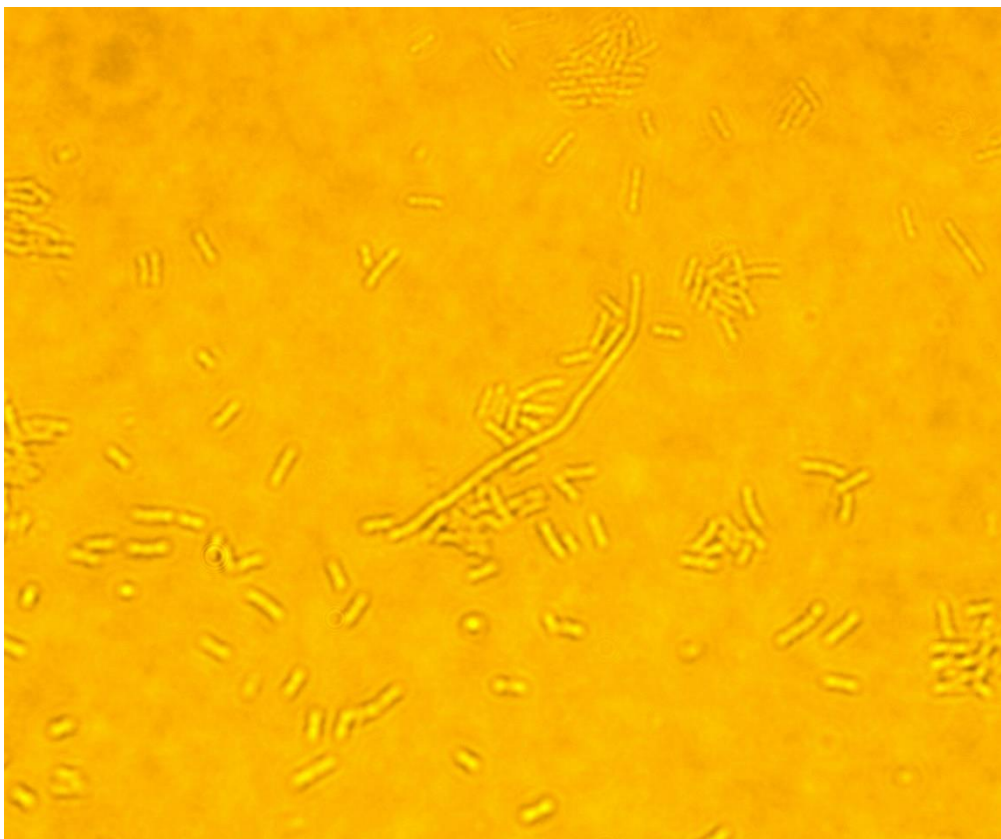




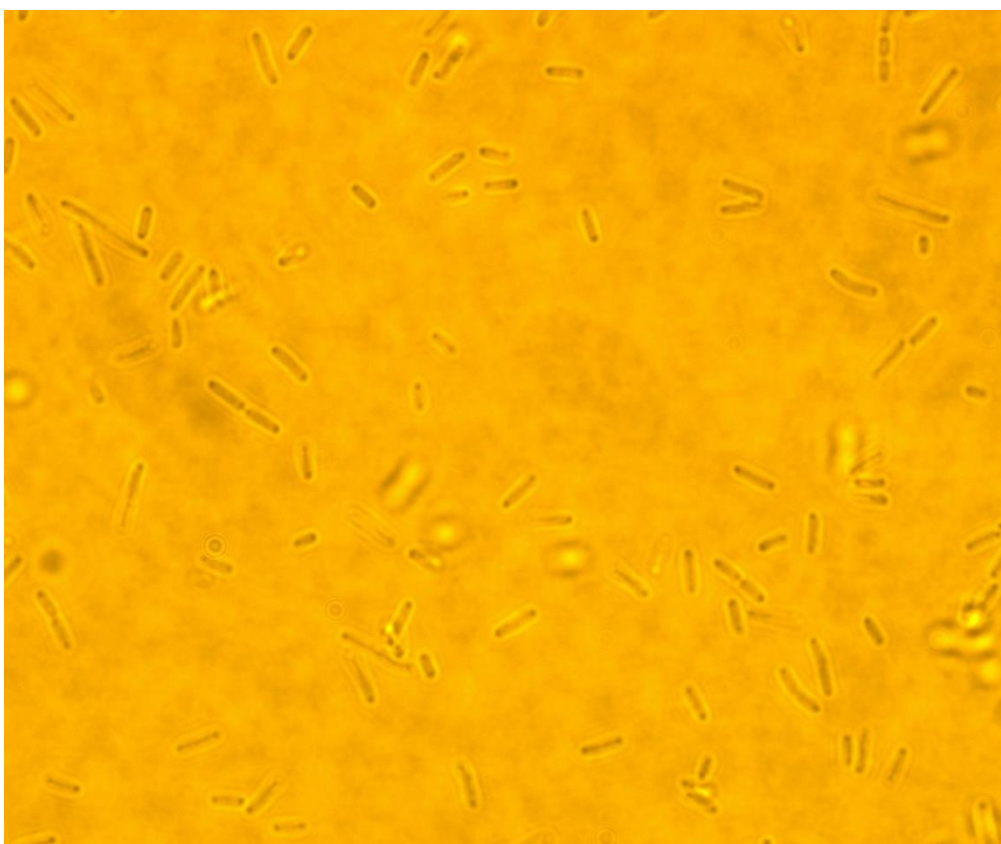
*Obrázok 18: Filament *E. coli* vzniknutý po ošetroení bakteriálnej kultúry 90 mol/l komplexu 1,3-DACH*



*Obrázok 19: Filament *E. coli* vzniknutý pri ošetroení bakteriálnej kultúry 90 mol/l 1,3-DACH*

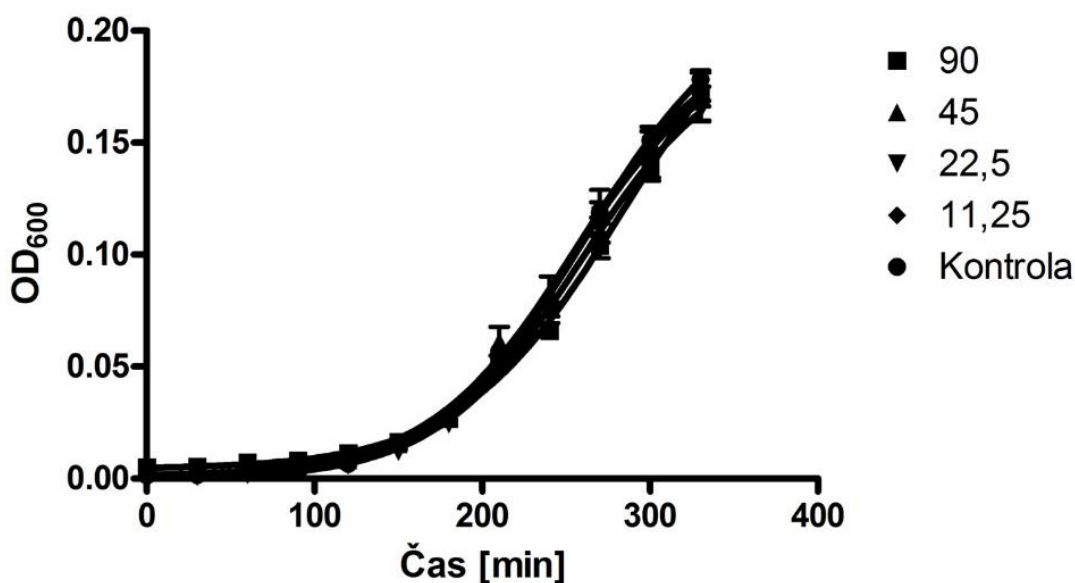


*Obrázok 20: Bunky E. coli po ošetrení bakteriálnej kultúry 90 mol/l 1,3-DACH*

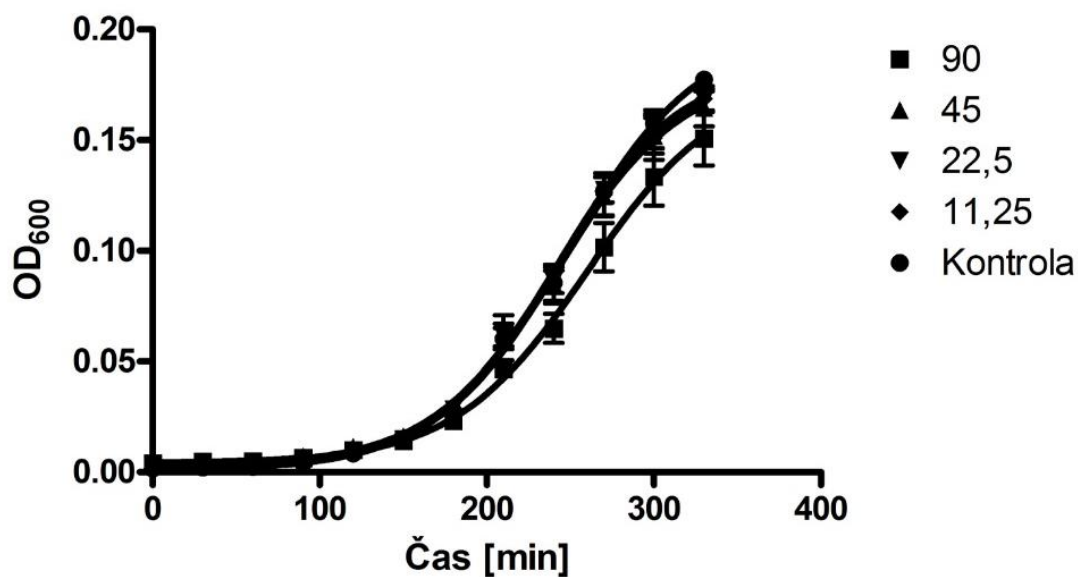


*Obrázok 21: Kontrolná neošetrená kultúra baktérii E. coli*

Dodatočne sme testovali ďalšie dva platínové komplexy  $R$ -[Pt(1,1'-binaphthyl-2,2'-diaminodichlorido)Cl<sub>2</sub>] (komplex 003:  $R$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]) a  $S$ -[Pt(1,1'-binaphthyl-2,2'-diaminodichlorido)Cl<sub>2</sub>] (komplex 005:  $S$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]) dodané od profesora Bednarski (Ernst-Moritz-Arndt University of Greifswald, Nemecko). V štúdií publikovanej profesorom Bednarski a spol. bolo preukázané, že oba komplexy (003 a 005) sa úspešne viažu na teľáciu DNA no s nižšiu mierou ako cisplatina. Taktiež zhodnotili, že DNA je cieľovým miestom pôsobenia týchto komplexov (Sorensen *et al.*, 2018). Nami namerané výsledky nepodporujú tieto závery. Meranie rastu bakteriálnej kultúry ošetrenej komplexom 003 s koncentráciou v rozmedzí 90-11,25 mol/l nepreukázalo takmer žiadny rozdiel oproti kontrolnej kultúre, ktorá nebola oštetrená žiadnou zlúčeninou. Teda usudzujeme, že tento komplex nemá žiadny účinok na rast a delenie baktérii *E. coli* (Graf č. 8). Komplex 005 taktiež neukázal signifikantnú zmenu oproti kontrolnej neošetrenej kultúre baktérii a to ani pri koncentrácii najvyššej použitej koncentrácie 90 mol/l (Graf č. 9). Inhibícia delenia bola pri komplexe 005 väčšia ako pri komplexe 003, no rozdiel medzi kontrolou a komplexami bol omnoho menší ako pri cisplatine a komplexe 1,3-DACH pri tej istej koncentrácii 90 mol/l (grafy č. 4 a 5, vid' vyššie).



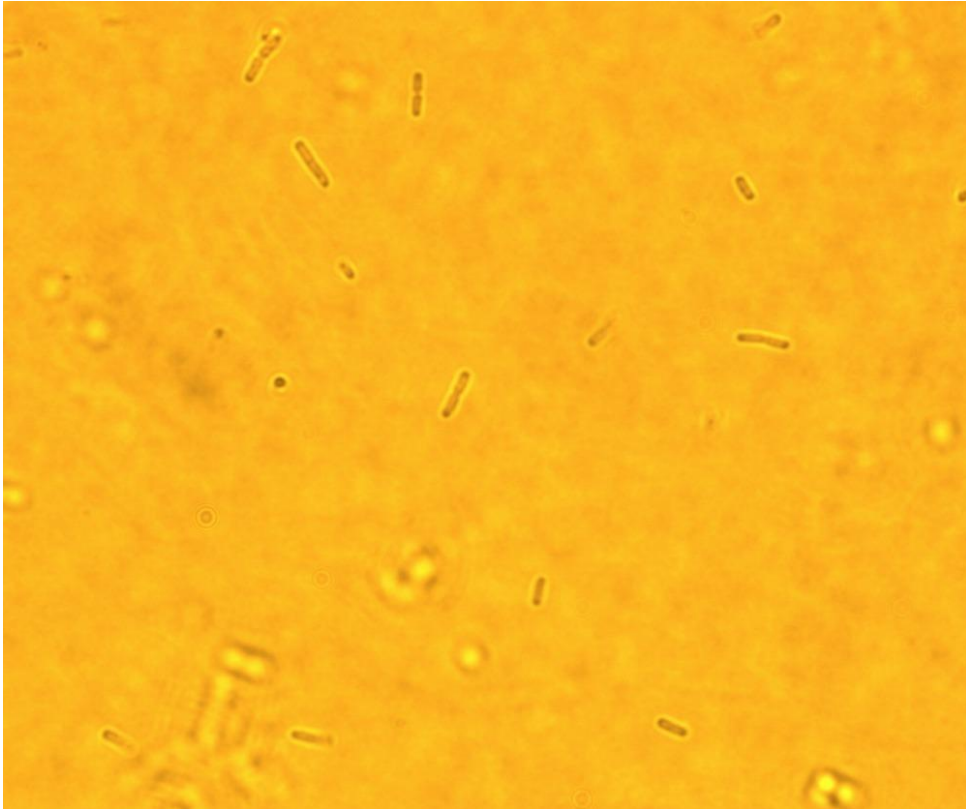
Graf č. 8: Vplyv komplexu 003 na rast bakteriálnej kultúry *E. coli* pri koncentráciách 90-11,25 mol/l



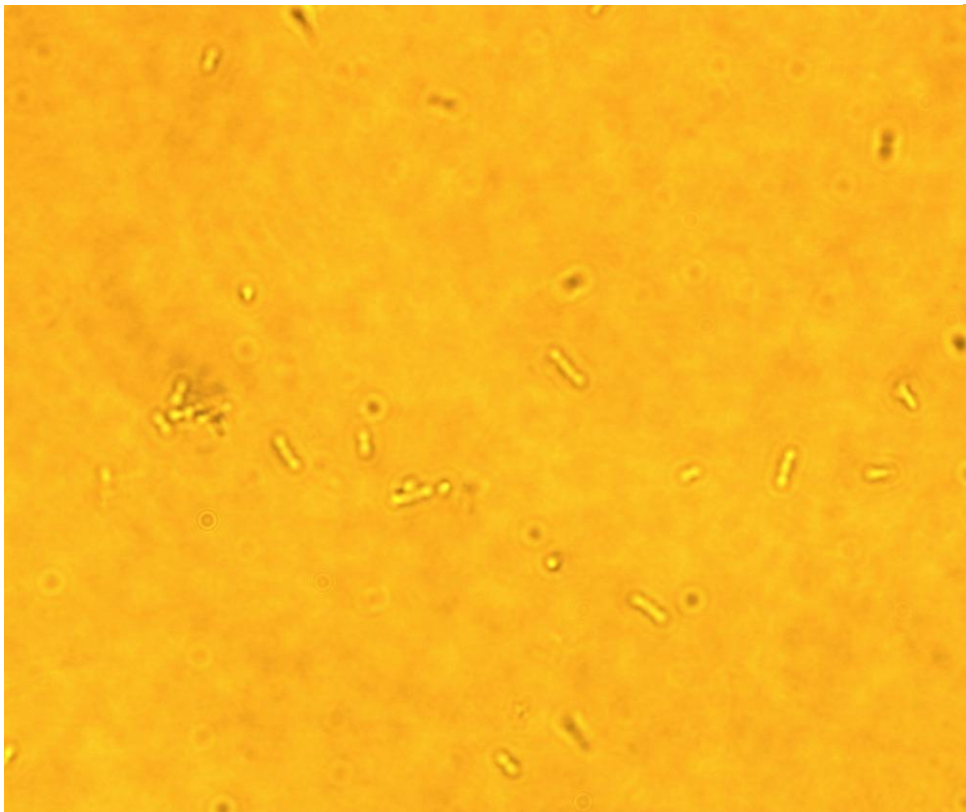
Graf č. 9: Vplyv 005 komplexu na rast bakteriálnej kultúry *E. coli* pri koncentráciách 90-11,25 mol/l

Skutočnosť, že tieto komplexy (003 a 005) neindukujú filamentačný rast sme potvrdili aj pozorovaním baktérii ošetrovaných 45 mol/l týchto komplexov (Obrázok č. 22, 23) a rovnaké výsledky boli dosiahnuté aj pri pozorovaní vzoriek ošetrovaných najvyššími koncentraciami testovaných látok. Nakoľko nami získané výsledky sú v rozpore s výsledkami zistenými v štúdiu prof. Bednarski, usudzujem že komplexy majú odlišný účinok na bakteriálne bunky *E. coli* a ľudský karcinóm lymfatických uzlín testovaný v spomenutej štúdiu. Mechanizmus účinku komplexov 003 a 005 je odlišný od cisplatiny, čo môže byť jeden z dôvodov prečo boli komplexy pri bakteriálnych bunkách neúčinné. Baktérie majú rozdielny opravný mechanizmus DNA ako ľudské bunky vďaka čomu sa bakteriálne bunky s týmito komplexami mohli vysporiadať a tak nemali žiadny účinok na delenie a rast bakteriálnej kultúry (Sorensen *et al.*, 2018).





*Obrázok 22: Filament *E. coli* vzniknutý pri ošetroení bakteriálnej kultúry 45 mol/l komplexom 003*



*Obrázok 23: Filament *E. coli* vzniknutý pri ošetroení bakteriálnej kultúry 45 mol/l komplexom 005*

Cieľom práce bolo pozorovať účinok komplexov cisplatiny a 1,3-DACH na filamentačný rast baktérií *E. coli* a stanoviť, či je DNA biologickým cieľom tohto nového platinového komplexu. Filamentačný rast bol pozorovaný pomocou svetelnej mikroskopie. Vzorky ošetrované cisplatinou preukázali morfológickú zmenu baktérií vedúcu k vzniku dlhých filamentov, čo korešponduje so štúdiou zaoberajúcou sa efektom monofunkčných platinových zlúčenín publikovanú Johnstonom a kolektívom v roku 2014. Filamentačný rast nastáva, keď je bunka vystavená stresu. Filamentácia je výsledkom zastavenia delenia u tyčinkovitých baktérií no zvyšné bunkové procesy prebiehajú. Rast pokračuje čo spôsobí predĺženie týchto buniek. Rýchlosť rastu sme testovali meraním turbidity v priebehu času. Nárast počtu buniek vo vzorkách ošetrovaných cisplatinou (45 mol/l) bol výrazne nižší ako nárast počtu buniek v kontrolnej vzorke bez akéhokoľvek komplexu. Tento údaj korešponduje so všeobecnou schopnosťou cDDP inhibovať delenie buniek a s jej protirakovinovými účinkami (Johnstone *et al.*, 2014). Zlúčenina 1,3-DACH vyvolala pri rovnakých koncentráciách menej výraznú inhibíciu delenia. Avšak kultivácia pri najvyššej koncentrácii 1,3-DACH (90 mol/l) nepreukázala úhyn baktérií ako cisplatina pri rovnakej vysokej koncentrácii. Z čoho vyvodzujem, že 1,3-DACH spôsobuje menší stres bunkám *E.coli*.

#### 4. Záver

V bakalárskej práci sme sa zaoberali efektom nového platinového komplexu 1,3-DACH na delenie a rast baktérií *Escherichia coli*. Pomocou merania rastových kriviek a svetelnej mikroskopie sme zistili, že uvedený komplex spôsobuje pri vysokých koncentráciách spomalenie delenia bakteriálnych buniek a vyvoláva filamentózny rast baktérii. Ďalej po zrovnaní s literatúrou usudzujem, že pravdepodobným biologickým cieľom tohto komplexu je DNA nakoľko filameny boli dlhé a vyskytovali sa v celej pozorovanej vzorke. Vzorky (bakteriálna kultúra *E.coli*) ošetrované cisplatinou, ktoré slúžili na porovnanie, vykazovali početnejšie morfológické zmeny a výraznejšiu inhibíciu delenia baktérií. Táto skutočnosť potvrdzuje, že DNA je jej biologickým cieľom.

## 5. Zoznam použitých skratiek

cDDP - cisplatina

DACH - diaminocyklohexán

Ctrl - control transporter 1; transportér medi 1

IAC - intrastrand crosslink; vnútroreťazcový mostík

IEC - interstrand crosslink; medzireťazcový mostík

RecBCD - enzým u baktérii spúšťajúci rekombinančné opravy DNA

NER - nucleotide excision repair; nukleotidová excízna oprava

MMR - DNA mismatch repair; oprava chybného spárovania báz

BER - base excision repair; bázová excízna oprava

UvrABC - multienzymový komplex v baktérii *E. coli*

TRCF - opravný transkripčný faktor

HMG - high mobility group protein; proteín s vysokou mobilitou

DMSO - dimetylsulfoxid

RP-HPLC - kvapalná chromatografia s reverznou fázou

LB médium - Luria-Bertani médium

## 6. Zoznam použitej literatúry:

AKABOSHI, Mitsuhiro, Kenichi KAWAI, Hirotohi MAKI, Keizo AKUTA, Yowri UJENO a Tokiharu MIYAHARA. The Number of Platinum Atoms Binding to DNA, RNA and Protein Molecules of HeLa Cells Treated with Cisplatin at Its Mean Lethal Concentration. *Japanese Journal of Cancer Research* [online]. 1992, 83(5), 522-526 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1992.tb01959.x. ISSN 09105050. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.1992.tb01959.x>

ALDERDEN, Rebecca A., Matthew D. HALL a Trevor W. HAMBLEY. The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education* [online]. 2006, 83(5) [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/ed083p728. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed083p728>

BACHMAIER, Annelies, Gerald JUST a Eggehard HOLLER. In vitro competition between adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine and deoxyribonucleic acid in the reaction with diamminedichloroplatinum(II). *European Journal of Biochemistry* [online]. 1986, 161(3), 621-627 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1986.tb10486.x. ISSN 0014-2956. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1986.tb10486.x>

BARITAKI, Stavroula, Stavros APOSTOLAKIS, Peggy KANELLOU, Marie-Therese DIMANCHE-BOITREL, Demetrios A. SPANDIDOS a Benjamin BONAVIDA. *Reversal of Tumor Resistance to Apoptotic Stimuli by Alteration of Membrane Fluidity: Therapeutic Implications* [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 149-190 [cit. 2019-04-24]. Advances in Cancer Research. DOI: 10.1016/S0065-230X(06)98005-1. ISBN 9780123738967. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065230X06980051>



BARTON, J. Metals and DNA: molecular left-handed complements. *Science* [online]. 1986, 233(4765), 727-734 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1126/science.3016894. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.3016894>

BENEDETTI, Michele, Cosimo DUCANI, Danilo MIGONI, et al. Experimental Evidence That a DNA Polymerase Can Incorporate N7-Platinated Guanines To Give Platinated DNA. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2008, 47(3), 507-510 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1002/anie.200703160. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200703160>

BOHR, V. DNA repair in an active gene: Removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* [online]. 1985, 40(2), 359-369 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90150-3. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867485901503>

BRABEC, Viktor. *DNA Modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: Their recognition and repair* [online]. Elsevier, 2002, 2002, s. 1-68 [cit. 2019-04-19]. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. DOI: 10.1016/S0079-6603(02)71040-4. ISBN 9780125400718. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660302710404>

BREIER, Albert, L. GIBALOVÁ, Mário ŠEREŠ, Miroslav BARANČÍK a Zdena SULOVÁ. New insight into p-glycoprotein as a drug target. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013, 13(1), 159-170.

CALMANN, Melissa A. a M.G. MARINUS. Differential effects of cisplatin and MNNG on dna mutants of Escherichia coli. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 2005, 578(1-2), 406-416 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.06.030. ISSN 00275107. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510705003854>

CARETHERS, J M, M T HAWN, D P CHAUHAN, M C LUCE, G MARRA, M KOI a C R BOLAND. Competency in mismatch repair prohibits clonal expansion of cancer cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1996, 98(1), 199-206 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1172/JCI118767. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/118767>

CLARKE, Michael J. Ruthenium Chemistry Pertaining to the Design of Anticancer Agents. BAULIEU, Etienne, Donald T. FORMAN, Magnus INGELMAN-SUNDBERG, et al., ed. *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1989, 1989, s. 25-39 [cit. 2019-04-19]. Progress in Clinical Biochemistry and Medicine. DOI: 10.1007/978-3-642-74760-1\_2. ISBN 978-3-642-74762-5. Dostupné z: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-74760-1\\_2](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-74760-1_2)

COHEN, Seth M. a Stephen J. LIPPARD. *Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy* [online]. Elsevier, 2001, 2001, s. 93-130 [cit. 2019-04-19]. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. DOI: 10.1016/S0079-6603(01)67026-0.

ISBN 9780125400671. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660301670260>

COLUCCIA, Mauro, Angela BOCCARELLI, Maria A. MARIGGIÒ, Nicola CARDELLICCHIO, Paola CAPUTO, Francesco P. INTINI a Giovanni NATILE. Platinum(II) complexes containing iminoethers: a trans platinum antitumour agent. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 1995, 98(3), 251-266 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/0009-2797(95)03650-4. ISSN 00092797. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009279795036504>

DANENBERG, Peter V., Luke C.C. SHEA, Kathleen D. DANENBERG a Tetsuro HORIKOSHI. Inactivation of Tetrahymena rRNA self-splicing by c/s -platin proceeds through dissociable complexes. *Nucleic Acids Research* [online]. 1991, 19(11), 3123-3128 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1093/nar/19.11.3123. ISSN 0305-1048. Dostupné z:  
<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/19.11.3123>

DA SILVA MAIA, Pedro Ivo, Victor M. DEFLON a Ulrich ABRAM. Gold(III) complexes in medicinal chemistry. *Future Medicinal Chemistry* [online]. 2014, 6(13), 1515-1536 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.4155/fmc.14.87. ISSN 1756-8919. Dostupné z:  
<http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.14.87>

DILLINGHAM, Mark S., Maria SPIES a Stephen C. KOWALCZYKOWSKI. RecBCD enzyme is a bipolar DNA helicase. *Nature* [online]. 2003, **423**(6942), 893-897 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1038/nature01673. ISSN 0028-0836. Dostupné z:  
<http://www.nature.com/articles/nature01673>

Dillingham, Mark S, and Stephen C Kowalczykowski. "RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* vol. 72,4 (2008): 642-71, Table of Contents. doi:10.1128/MMBR.00020-08. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2593567/>

DONAHUE, Brian A., Marianne AUGOT, Steven F. BELLON, Daniel K. TREIBER, Jeffrey H. TONEY, Stephen J. LIPPARD a John M. ESSIGMANN. Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry* [online]. 1990, 29(24), 5872-5880 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1021/bi00476a032. ISSN 0006-2960. Dostupné z:  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00476a032>

ERNST, Russell J., Alexis C. KOMOR a Jacqueline K. BARTON. Selective Cytotoxicity of Rhodium Metalloinsertors in Mismatch Repair-Deficient Cells. *Biochemistry* [online]. 2011, 50(50), 10919-10928 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/bi2015822. ISSN 0006-2960. Dostupné z:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi2015822>

FREZZA, Michael, Sarmad HINDO, Di CHEN, Andrew DAVENPORT, Sara SCHMITT, Dajena TOMCO a Q. PING DOU. Novel Metals and Metal Complexes as

Platforms for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2010, 16(16), 1813-1825 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.2174/138161210791209009. ISSN 13816128. Dostupné z:

<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=16&issue=16&spage=1813>

GALLUZZI, L, I VITALE, J MICHELS, C BRENNER, G SZABADKAI, A HAREL-BELLAN, M CASTEDO a G KROEMER. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death & Disease* [online]. 2014, 5(5), e1257-e1257 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1038/cddis.2013.428. ISSN 2041-4889. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/cddis2013428>

GARCIA SAR, Daniel, Maria MONTES-BAYÓN, Elisa BLANCO GONZÁLEZ a Alfredo SANZ-MEDEL. Speciation studies of cis-platin adducts with DNA nucleotides via elemental specific detection (P and Pt) using liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and structural characterization by electrospray mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom* [online]. 2006, 21(9), 861-868 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1039/B603434A. ISSN 0267-9477. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B603434A>

GIBSON, Dan a Catherine COSTELLO. A mass spectral study of the binding of the anticancer drug cisplatin to ubiquitin. *European Journal of Mass Spectrometry* [online]. 1999, 5(1) [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1255/ejms.314. ISSN 1356-1049. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1255/ejms.314>

GIRAULT, Jean Pierre, Genevieve CHOTTARD, Jean Yves LALLEMAND a Jean Claude CHOTTARD. Interaction of cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> with ribose and deoxyribose diguanosine phosphates. *Biochemistry* [online]. 2002, 21(6), 1352-1356 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/bi00535a038. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00535a038>

GONZALEZ, Victor M., Miguel A. FUERTES, Carlos ALONSO a Jose M. PEREZ. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?. *Molecular Pharmacology* [online]. 2001, 59(4), 657-663 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1124/mol.59.4.657. ISSN 0026-895X. Dostupné z: <http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/mol.59.4.657>

GOODMAN, Myron F. Coping with replication 'train wrecks' in Escherichia coli using Pol V, Pol II and RecA proteins. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2000, 25(4), 189-195 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/S0968-0004(00)01564-4. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000400015644>

GULLO, John J., Charles L. LITTERST, Patrick J. MAGUIRE, Branimir I. SIKIC, Daniel F. HOTH a Paul V. WOOLLEY. Pharmacokinetics and protein binding of cis-dichlorodiammine platinum (II) administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 1980, 5(1), 21-26 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1007/BF00578558. ISSN 0344-5704. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00578558>

GULLO, John J., Charles L. LITTERST, Patrick J. MAGUIRE, Branimir I. SIKIC, Daniel F. HOTH a Paul V. WOOLLEY. Pharmacokinetics and protein binding of cis-dichlorodiammine platinum (II) administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 1980, 5(1), 21-26 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1007/BF00578558. ISSN 0344-5704. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00578558>

HAAS, Kathryn L. a Katherine J. FRANZ. Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology. *Chemical Reviews* [online]. 2009, 109(10), 4921-4960 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/cr900134a. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr900134a>

HART, J. R., O. GLEBOV, R. J. ERNST, I. R. KIRSCH a J. K. BARTON. DNA mismatch-specific targeting and hypersensitivity of mismatch-repair-deficient cells to bulky rhodium(III) intercalators. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, 103(42), 15359-15363 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1073/pnas.0607576103. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607576103>

HEDMAN, Hanna K., Finn KIRPEKAR a Sofi K. C. ELMROTH. Platinum Interference with siRNA Non-seed Regions Fine-Tunes Silencing Capacity. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2011, 133(31), 11977-11984 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/ja111082e. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja111082e>

HOSTETTER, Alethia A., Maire F. OSBORN a Victoria J. DEROSE. RNA-Pt Adducts Following Cisplatin Treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Chemical Biology* [online]. 2011, 7(1), 218-225 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/cb200279p. ISSN 1554-8929. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cb200279p>

HOWARD, G C, U K MISRA, D L DECAMP a S V PIZZO. Altered interaction of Cis-dichlorodiammineplatinum(II)--modified alpha 2-macroglobulin (alpha 2M) with the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2M receptor but not the alpha 2M signaling receptor. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1996, 97(5), 1193-1203 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1172/JCI118533. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/118533>

HOWELL, S. B., R. SAFAEI, C. A. LARSON a M. J. SAILOR. Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs. *Molecular Pharmacology* [online]. 2010, 77(6), 887-894 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1124/mol.109.063172. ISSN 0026-895X. Dostupné z: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.109.063172>

HU, Wenbing, Qun LUO, Kui WU, et al. The anticancer drug cisplatin can cross-link the interdomain zinc site on human albumin. *Chemical Communications* [online]. 2011, 47(21) [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1039/c1cc11627d. ISSN 1359-7345. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1cc11627d>

CHAUDHURY, Abdul M. a Gerald R. SMITH. Role of *Escherichia coli* RecBC enzyme in SOS induction. *MGG Molecular & General Genetics* [online]. 1985, 201(3),

525-528 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1007/BF00331350. ISSN 0026-3925. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00331350>

ISOE, Toshiyuki, Mikihiro NAITO, Akio SHIRAI, Reiko HIRAI a Takashi TSURUO. Inhibition of different steps of the ubiquitin system by cisplatin and aclarubicin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1992, 1117(2), 131-135 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/0304-4165(92)90070-B. ISSN 03044165. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030441659290070B>

IMAMURA, Toshihiro, Hiroto IZUMI, Gunji NAGATANI, Tomoko ISE, Minoru NOMOTO, Yukihide IWAMOTO a Kimitoshi KOHNO. Interaction with p53 Enhances Binding of Cisplatin-modified DNA by High Mobility Group 1 Protein. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, 276(10), 7534-7540 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1074/jbc.M008143200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M008143200>

ALEKSEYEV a Jacqueline K. BARTON. A Versatile Mismatch Recognition Agent: Specific Cleavage of a Plasmid DNA at a Single Base Mismatch. *Biochemistry* [online]. 1999, 38(15), 4655-4662 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/bi990255t. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi990255t>

JAIN, Aayushi, Devashree JAHAGIRDAR, Pritish NILENDU a Nilesh Kumar SHARMA. Molecular approaches to potentiate cisplatin responsiveness in carcinoma therapeutics. *Expert Review of Anticancer Therapy* [online]. 2017, 17(9), 815-825 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1080/14737140.2017.1356231. ISSN 1473-7140. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737140.2017.1356231>

JAMIESON, Elizabeth R. a Stephen J. LIPPARD. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chemical Reviews* [online]. 1999, 99(9), 2467-2498 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1021/cr980421n. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr980421n>

JIRICNY, J. Postreplicative Mismatch Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2013, 5(4), a012633-a012633 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1101/cshperspect.a012633. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a012633>

JOHNSON, Neil P., Jean-Luc BUTOUR, Giuseppe VILLANI, Franz L. WIMMER, Martine DEFAIS, Veronique PIERSON a Viktor BRABEC. Metal Antitumor Compounds: The Mechanism of Action of Platinum Complexes. BAULIEU, Etienne, Donald T. FORMAN, Magnus INGELMAN-SUNDBERG, et al., ed. *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1989, 1989, s. 1-24 [cit. 2019-04-19]. Progress in Clinical Biochemistry and Medicine. DOI: 10.1007/978-3-642-74760-1\_1. ISBN 978-3-642-74762-5. Dostupné z: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-74760-1\\_1](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-74760-1_1)

JOHNSTONE, Timothy C., Sarah M. ALEXANDER, Wei LIN a Stephen J. LIPPARD. Effects of Monofunctional Platinum Agents on Bacterial Growth: A Retrospective

Study. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2013, 136(1), 116-118 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/ja411742c. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja411742c>

JOHNSTONE, Timothy C., Sarah M. ALEXANDER, Wei LIN a Stephen J. LIPPARD. Effects of Monofunctional Platinum Agents on Bacterial Growth: A Retrospective Study. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2013, 136(1), 116-118 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1021/ja411742c. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja411742c>

KELLER, Kimberly L., Terri L. OVERBECK-CARRICK a Doris J. BECK. Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutation Research/DNA Repair* [online]. 2001, 486(1), 21-29 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/S0921-8777(01)00077-5. ISSN 09218777. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921877701000775>

KEPPLER, Bernhard K. *Metal complexes in cancer chemotherapy*. New York: VCH, c1993. ISBN isbn1-56081-216-8.

KHALID, Huma, Muhammad HANIF, Muhammad HASHMI, Tariq MAHMOOD, Khurshid AYUB a Muhammad MONIM-UL-MEHBOOB. Copper Complexes of Bioactive Ligands with Superoxide Dismutase Activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2013, 13(13), 1944-1956 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.2174/13895575113136660092. ISSN 13895575. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=13&issue=13&spage=1944>

KÖPF, Hartmut a Petra KÖPF-MAIER. Titanocene Dichloride-The First Metallocene with Cancerostatic Activity. *Angewandte Chemie International Edition in English* [online]. 1979, 18(6), 477-478 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1002/anie.197904771. ISSN 05700833. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.197904771>

KOSTRHUNOVA, Hana, Jakub FLORIAN, Olga NOVAKOVA, Anna F. A. PEACOCK, Peter J. SADLER a Viktor BRABEC. DNA Interactions of Monofunctional Organometallic Osmium(II) Antitumor Complexes in Cell-Free Media. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2008, 51(12), 3635-3643 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/jm701538w. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm701538w>

KOWALCZYKOWSKI, Stephen C. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2000, 25(4), 156-165 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/S0968-0004(00)01569-3. ISSN 09680004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000400015693>

KÖPF-MAIER, P. a S. GERLACH. Pattern of toxicity by titanocene dichloride in mice. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [online]. 1986, 111(3), 243-247 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1007/BF00389240. ISSN 0171-5216. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00389240>

KRAUSE-HEUER, Anwen M., Renate GRÜNERT, Sybill KÜHNE, et al. Studies of the Mechanism of Action of Platinum(II) Complexes with Potent Cytotoxicity in Human Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2009, 52(17), 5474-5484 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/jm9007104. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm9007104>

KRAUSE-HEUER, Anwen M., Renate GRÜNERT, Sybill KÜHNE, et al. Studies of the Mechanism of Action of Platinum(II) Complexes with Potent Cytotoxicity in Human Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2009, 52(17), 5474-5484 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/jm9007104. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm9007104>

KRUIDERING, Maricke, Bob VAN DE WATER, Yi ZHAN, Johan J BAELDE, Emile DE HEER, Gerard J MULDER, Jim L STEVENS a JFred NAGELKERKE. Cisplatin effects on F-actin and matrix proteins precede renal tubular cell detachment and apoptosis in vitro. *Cell Death & Differentiation* [online]. 1998, 5(7), 601-614 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400392. ISSN 1350-9047. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/4400392>

KUI, W. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 151(1), 53-88 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/0010-8545(95)01217-6. ISSN 00108545. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0010854595012176>

LAMERS, Meindert H., Anastassis PERRAKIS, Jacqueline H. ENZLIN, Herrie H. K. WINTERWERP, Niels DE WIND a Titia K. SIXMA. The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G·T mismatch. *Nature* [online]. 2000, 407(6805), 711-717 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1038/35037523. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/35037523>

LIAN, Wen-Jing, Xin-Tian WANG, Cheng-Zhi XIE, He TIAN, Xue-Qing SONG, He-Ting PAN, Xin QIAO a Jing-Yuan XU. Mixed-ligand copper( ii ) Schiff base complexes: the role of the co-ligand in DNA binding, DNA cleavage, protein binding and cytotoxicity. *Dalton Transactions* [online]. 2016, 45(22), 9073-9087 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1039/C6DT00461J. ISSN 1477-9226. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6DT00461J>

Front Matter. LIPPERT, Bernhard, ed. *Cisplatin* [online]. Zürich: Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999, 2006-12-11, I-XII [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1002/9783906390420.fmatter. ISBN 9783906390420. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783906390420.fmatter>

LIPPERT, Bernhard. *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*. New York: Wiley-VCH, c1999. ISBN isbn3906390209.

LITTLE, John W. a David W. MOUNT. The SOS regulatory system of Escherichia coli. *Cell* [online]. 1982, 29(1), 11-22 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/0092-8674(82)90085-X. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286748290085X>

LLOYD, Robert G. a Allyn THOMAS. On the nature of the RecBC and RecF pathways of conjugal recombination in *Escherichia coli*. *MGG Molecular & General Genetics* [online]. 1983, 190(1), 156-161 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1007/BF00330339. ISSN 0026-8925. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00330339>

LYNCH, HT, PM LYNCH, SJ LANSPA, CL SNYDER, JF LYNCH a CR BOLAND. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics* [online]. 2009, 76(1), 1-18 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x. ISSN 00099163. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x>

MAHAFFY, J. A genetic switch: Gene control and phage lambda. *Bulletin of Mathematical Biology* [online]. 1987, 49(6), 763-764 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/S0092-8240(87)90021-8. ISSN 00928240. Dostupné z: [http://www.springerlink.com/index/10.1016/S0092-8240\(87\)90021-8](http://www.springerlink.com/index/10.1016/S0092-8240(87)90021-8)

Makovec, Tomaz. "Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy." *Radiology and oncology* vol. 53,2 148-158. 28 Mar. 2019, doi:10.2478/raon-2019-0018. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6572495/>

MANDAL, Rupasri, Robyn KALKE a Xing-Fang LI. Interaction of Oxaliplatin, Cisplatin, and Carboplatin with Hemoglobin and the Resulting Release of a Heme Group. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2004, 17(10), 1391-1397 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/tx049868j. ISSN 0893-228X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx049868j>

MARZANO, Cristina, Maura PELLEI, Francesco TISATO a Carlo SANTINI. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* [online]. 2009, 9(2), 185-211 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.2174/187152009787313837. ISSN 18715206. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=9&issue=2&spage=185>

MASSIMILIANO DAIUTO, Giuseppe Palma. Organo-Metallic Compounds: Novel Molecules in Cancer Therapy. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access* [online]. 2014, 03(06) [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.4172/2167-0501.1000149. ISSN 21670501. Dostupné z: <http://omicsgroup.org/journals/organometallic-compounds-novel-molecules-in-cancer-therapy-2167-0501.1000149.php?aid=35281>

MATSUMOTO, M, T TSUCHIDA a K KAWAMOTO. Cisplatin-induced cell death in human glioma. *International Journal of Oncology* [online]. 1997 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.3892/ijo.11.6.1209. ISSN 1019-6439. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.11.6.1209>

MATSUMOTO, M, T TSUCHIDA a K KAWAMOTO. Cisplatin-induced cell death in human glioma. *International Journal of Oncology* [online]. 1997 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.3892/ijo.11.6.1209. ISSN 1019-6439. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.11.6.1209>



MATTERN, I.E., L. COCCHIARELLA, C.G. VAN KRALINGEN a P.H.M. LOHMAN. Prophage induction and mutagenicity of a series of anti-tumour platinum(II) and platinum(IV) co-ordination complexes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 1982, 95(2-3), 79-93 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/0027-5107(82)90248-2. ISSN 00275107. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0027510782902482>

MELLON, I. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* [online]. 1987, 51(2), 241-249 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90151-6. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867487901516>

MESTRONI, Giovanni, Enzo ALESSIO, Mario CALLIGARIS, et al. Chemical, Biological and Antitumor Properties of Ruthenium(II) Complexes with Dimethylsulfoxide. BAULIEU, Etienne, Donald T. FORMAN, Magnus INGELMAN-SUNDBERG, et al., ed. *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1989, 1989, s. 71-87 [cit. 2019-04-19]. Progress in Clinical Biochemistry and Medicine. DOI: 10.1007/978-3-642-74760-1\_4. ISBN 978-3-642-74762-5. Dostupné z: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-74760-1\\_4](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-74760-1_4)

MEZENECV, Roman. Interactions of Cisplatin with non-DNA Targets and their Influence on Anticancer Activity and Drug Toxicity: The Complex World of the Platinum Complex. *Current Cancer Drug Targets* [online]. 2015, 14(9), 794-816 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.2174/1568009614666141128105146. ISSN 15680096. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0096&volume=14&issue=9&spage=794>

MROSS, K., P. ROBBEN-BATHE, L. EDLER, J. BAUMGART, W.E. BERDEL, H. FIEBIG a C. UNGER. Phase I Clinical Trial of a Day-1, -3, -5 Every 3 Weeks Phase I Clinical Trial of Day-1, -3, -5 Every 3 Weeks Schedule with Titanocene Dichloride (MKT 5) in Patients with Advanced Cancer. (Phase I Study Group of the AIO of the German Cancer Society). *Oncology Research and Treatment* [online]. 2000, 23(6), 576-579 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1159/000055009. ISSN 2296-5270. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/55009>

NAFISI, Shohreh a Zeinab NOROUZI. A Comparative Study on the Interaction of Cis - and Trans -Platin with DNA and RNA. *DNA and Cell Biology* [online]. 2009, 28(9), 469-477 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1089/dna.2009.0894. ISSN 1044-5498. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/dna.2009.0894>

NDAGI, Umar, Ndumiso MHLONGO a Mahmoud SOLIMAN. Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. 2017, Volume11, 599-616 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.2147/DDDT.S119488. ISSN 1177-8881. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/metal-complexes-in-cancer-therapy-ndash-an-update-from-drug-design-per-peer-reviewed-article-DDDT>

OBMOLOVA, Galina, Changill BAN, Peggy HSIEH a Wei YANG. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*

[online]. 2000, 407(6805), 703-710 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1038/35037509. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/35037509>

OHNDORF, Uta-Maria, Mark A. ROULD, Qing HE, Carl O. PABO a Stephen J. LIPPARD. Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature* [online]. 1999, 399(6737), 708-712 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1038/21460. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/21460>

OSBORN, Maire F., Jonathan D. WHITE, Michael M. HALEY a Victoria J. DEROSE. Platinum-RNA Modifications Following Drug Treatment in *S. cerevisiae* Identified by Click Chemistry and Enzymatic Mapping. *ACS Chemical Biology* [online]. 2014, 9(10), 2404-2411 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/cb500395z. ISSN 1554-8929. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cb500395z>

OSWALD, Gerda, Ingo ROMBECK, B. SONG, H. SIGEL a B. LIPPERT. Cis-diammineplatinum(II) forms a macrochelate with 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate (dCMP2-)! Reactivity and acid-base properties of cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dCMP). *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* [online]. 1998, 3(3), 236-245 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1007/s007750050227. ISSN 0949-8257. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s007750050227>

OW, Yong-Ling P., Douglas R. GREEN, Zhenyue HAO a Tak W. MAK. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2008, 9(7), 532-542 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1038/nrm2434. ISSN 1471-0072. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrm2434>

PAPSAI, Pal, Åse Sykfont SNYGG, Jasmin ALDAG a Sofi Karin Cecilia ELMROTH. Platination of full length tRNA<sup>Ala</sup> and truncated versions of the acceptor stem and anticodon loop. *Dalton Transactions* [online]. 2008, (38) [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1039/b719542g. ISSN 1477-9226. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b719542g>

PARK, Joo-Seop, Michael T. MARR a Jeffrey W. ROBERTS. E. coli Transcription Repair Coupling Factor (Mfd Protein) Rescues Arrested Complexes by Promoting Forward Translocation. *Cell* [online]. 2002, 109(6), 757-767 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00769-9. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402007699>

PASCOE, Janet M. a John J. ROBERTS. Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds—II. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1974, 23(9), 1359-1365 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/0006-2952(74)90355-4. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295274903554>

PEACOCK, Anna F. A., Abraha HABTEMARIAM, Stephen A. MOGGACH, Alessandro PRESCIMONE, Simon PARSONS a Peter J. SADLER. Chloro Half-Sandwich Osmium(II) Complexes: Influence of Chelated N,N-Ligands on Hydrolysis, Guanine Binding, and Cytotoxicity. *Inorganic Chemistry* [online]. 2007, 46(10), 4049-4059 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1021/ic062350d. ISSN 0020-1669. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ic062350d>

- PEACOCK, Anna F. A., Abraha HABTEMARIAM, Rafael FERNÁNDEZ, et al. Tuning the Reactivity of Osmium(II) and Ruthenium(II) Arene Complexes under Physiological Conditions. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, 128(5), 1739-1748 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/ja055886r. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja055886r>
- PEACOCK, Anna F. A., Simon PARSONS a Peter J. SADLER. Tuning the Hydrolytic Aqueous Chemistry of Osmium Arene Complexes with N,O-Chelating Ligands to Achieve Cancer Cell Cytotoxicity. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2007, 129(11), 3348-3357 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/ja068335p. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja068335p>
- PELEG-SHULMAN, Tal, Yousef NAJAJREH a Dan GIBSON. Interactions of cisplatin and transplatin with proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry* [online]. 2002, 91(1), 306-311 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/S0162-0134(02)00362-8. ISSN 01620134. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013402003628>
- PONGRATZ, Martina, Petra SCHLUGA, Michael A. JAKUPEC, Vladimir B. ARION, Christian G. HARTINGER, G nter ALLMAIER a Bernhard K. KEPPLER. Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2004, 19(1) [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1039/b309160k. ISSN 0267-9477. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b309160k>
- RANA, Bidyut Kumar, Abhishek NANDY, Valerio BERTOLASI, Christopher W. BIELAWSKI, Krishna DAS SAHA a Joydev DINDA. Novel Gold(I)– and Gold(III)–N-Heterocyclic Carbene Complexes: Synthesis and Evaluation of Their Anticancer Properties. *Organometallics* [online]. 2014, 33(10), 2544-2548 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1021/om500118x. ISSN 0276-7333. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/om500118x>
- REARDON, J.T. a A. SANCAR. Excision Repair. *Encyclopedia of Genetics*[online]. Elsevier, 2001, 2001, s. 673-675 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1006/rwgn.2001.0437. ISBN 9780122270802. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122270800004377>
- REEDIJK, J. New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2003, 100(7), 3611-3616 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1073/pnas.0737293100. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0737293100>
- REEVES, Raymond a Jennifer E. ADAIR. Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair* [online]. 2005, 4(8), 926-938 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/j.dnarep.2005.04.010. ISSN 15687864. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786405000935>
- Rocha, Clarissa Ribeiro Reily et al. “DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship.” *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* vol. 73,suppl 1 e478s. 6 Sep. 2018,

doi:10.6061/clinics/2018/e478s. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113849/>

ROSENBERG, Barnett. Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the Search Goes On. LIPPERT, Bernhard, ed. *Cisplatin* [online]. Zürich: Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999, 2006-12-11, s. 1-27 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1002/9783906390420.ch1. ISBN 9783906390420. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783906390420.ch1>

SANCAR, Aziz, Laura A. LINDSEY-BOLTZ, Keziban ÜNSAL-KAÇMAZ a Stuart LINN. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2004, 73(1), 39-85 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>

SAVA, G a A BERGAMO. Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). *International Journal of Oncology* [online]. 2000 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.3892/ijo.17.2.353. ISSN 1019-6439. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.17.2.353>

SEDLITSKA, Yuliya, Marie-Josophe GIRAUD-PANIS a Jean-Marc MALINGE. Cisplatin Is a DNA-Damaging Antitumour Compound Triggering Multifactorial Biochemical Responses in Cancer Cells: Importance of Apoptotic Pathways. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* [online]. 2005, 5(3), 251-265 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.2174/1568011053765967. ISSN 15680118. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0118&volume=5&issue=3&spage=251>

SELBY, C. P. a A. SANCAR. Gene- and strand-specific repair in vitro: partial purification of a transcription-repair coupling factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1991, 88(18), 8232-8236 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1073/pnas.88.18.8232. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.88.18.8232>

SHOKOHI-POUR, Zahra, Hossein CHINIFOROSHAN, Amir Abbas MOMTAZI-BOROJENI a Behrouz NOTASH. A novel Schiff base derived from the gabapentin drug and copper (II) complex: Synthesis, characterization, interaction with DNA/protein and cytotoxic activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2016, 162, 34-44 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.06.022. ISSN 10111344. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134416300203>

SCHMITTGEN, Thomas, Jing-Fang JU, Kathleen DANENBERG a Peter DANENBERG. Inhibition of pre-mRNA splicing by cisplatin and platinum analogs. *International Journal of Oncology* [online]. 2003 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.3892/ijo.23.3.785. ISSN 1019-6439. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.23.3.785>

SCHWIETERT, Chad W. a John P. MCCUE. Coordination compounds in medicinal chemistry. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 1999, 184(1), 67-89 [cit. 2019-04-

19]. DOI: 10.1016/S0010-8545(98)00205-7. ISSN 00108545. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854598002057>

SILVESTRU, Cristian. Metal complexes in cancer chemotherapy. B. K. Keppler (ed) VCH, Weinheim and New York, 1993, 429 pp. DM 196, ISBN 3-527-28425-7 (VCH, Weinheim); ISBN 1-56081-216-8 (VCH, New York). *Applied Organometallic Chemistry* [online]. 1994, 8(5), 499-500 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1002/aoc.590080511. ISSN 0268-2605. Dostupné z:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/aoc.590080511>

SINGLETON, Martin R., Mark S. DILLINGHAM, Martin GAUDIER, Stephen C. KOWALCZYKOWSKI a Dale B. WIGLEY. Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature* [online]. 2004, **432**(7014), 187-193 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1038/nature02988. ISSN 0028-0836. Dostupné z:  
<http://www.nature.com/articles/nature02988>

SOORIYAARACHCHI, Melani, Aru NARENDRAN a Jürgen GAILER. Comparative hydrolysis and plasma protein binding of cis-platin and carboplatin in human plasma in vitro. *Metallomics* [online]. 2011, 3(1), 49-55 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1039/C0MT00058B. ISSN 1756-5901. Dostupné z:  
<http://xlink.rsc.org/?DOI=C0MT00058B>

SØRENSEN, Belinda H., Patrick WERTH, Ian H. LAMBERT a Patrick J. BEDNARSKI. In vitro evaluation of the enantiomeric R - and S -1,1'-binaphthyl-2,2'-diaminodichlorido-Pt( ii ) complexes in human Burkitt lymphoma cells: emphasis on cellular accumulation, cytotoxicity, DNA binding, and ability to induce apoptosis. *Metallomics* [online]. 2018, **10**(2), 323-336 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1039/C7MT00237H. ISSN 1756-5901. Dostupné z:  
<http://xlink.rsc.org/?DOI=C7MT00237H>

SPEELMANS, Gea, Wendy H.H.M. SIPS, Ruud J.H. GRISEL, Rutger W.H.M. STAFFHORST, Anne Marie J. FICHTINGER-SCHEPMAN, Jan REEDIJK a Ben DE KRUIJFF. The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 1996, 1283(1), 60-66 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/0005-2736(96)00080-6. ISSN 00052736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005273696000806>

WANG Kui, Lu Jingfen, Li Ronchang. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordination Chemistry Reviews*, Volume 151, 1996, Pages 53-88, ISSN 0010-8545, [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(96\)90195-2](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(96)90195-2)