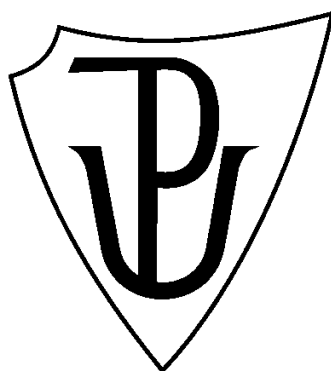


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA BIOFYZIKY



**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**VOJTĚCH NOVOHRADSKÝ**

**2015**



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA BIOFYZIKY

**MODIFIKACE BIOMAKROMOLEKUL METALOFARMAKY: ZDOKONALENÍ  
TEORETICKÉHO ZÁZEMÍ PRO VÝVOJ NOVÝCH LÉČIV PROTI RAKOVINĚ**

*MODIFICATION OF BIOMACROMOLECULES BY METALLODRUGS: IMPROVEMENT OF THE  
THEORETICAL BACKGROUND FOR THE DEVELOPMENT OF NEW ANTICANCER DRUGS*

ŠKOLITELKA:

prof. RNDr. Jana Kašpárková Ph.D.

**OLMOUC 2015**

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Vojtěch Novohradský
Název diplomové práce:	Modifikace biomakromolekul metalofarmaky: zdokonalení teoretického zázemí pro vývoj nových léčiv proti rakovině
Thesis:	Modification of biomacromolecules by metallodrugs: Improvement of the theoretical background for the development of new anticancer drugs
Studijní program:	Fyzika
Studijní obor:	Biofyzika
Vedoucí:	prof. RNDr. Jana Kašpárková Ph.D.
Oponent:	
Rok obhajoby:	2015
Klíčová slova:	protinádorově účinné komplexy kovů, buněčná smrt, buněčná akumulace
Key words:	metal-based anticancer drugs, cell death, cellular accumulation
Počet stran:	179

**ABSTRAKT**

Komplexy na bázi přechodných kovů se staly nedílnou součástí farmaceutického průmyslu a položily základ v oblasti moderní chemoterapie. V současné době je jedním z nejpoužívanějších a obecně nejúspěšnějších chemoterapeutik cisplatina, ( $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ ). Po objevu cisplatin odstartoval skutečný „boom“ v oblasti syntézy platinových cytostatik. Ze statistik však vyplývá, že bylo syntetizováno více než 3000 látek s centrálním atomem platiny, přibližně 30 z nich se dostalo až do fáze klinických testů a pouhých 6 je v současné době celosvětově v klinické praxi. Cílem rozsáhlých vědeckých výzkumů je získání cytostatik s vyšší účinností a širším spektrem aplikačních možností. V neposlední řadě se snahy upírají k přípravě takového preparátu, který by vykazoval minimum nežádoucích účinků jako je nefrotoxicita, nevolnosti pacientů v průběhu léčby, či dokonce efekt získané rezistence. Právě komplikace spojené s léčbou konvenčními cytostatiky neustále stimulují k vývoji nových a lepších léčiv. Hlavními strategiemi, pomocí nichž lze docílit kýženého benefitu v oblasti protinádorově účinných komplexů na bázi přechodných kovů, jsou například: změna geometrie dané látky (cis, trans konfigurace), záměna centrálního atomu (ruthenium, iridium, osmium, atd.), vytvoření polynukleárních komplexů, změna oxidačního stavu (např. platičité komplexy) a také modifikace stávající látky biologicky aktivními ligandy podporujícími duální efekt léčiva. Komplexy na bázi přechodných kovů představují velmi tvárný systém, pomocí něhož lze veškeré zmíněné přístupy realizovat.

Obecně uznávaným a experimentálně prokázaným cílovým místem působení pro konvenční platnatá cytostatika je molekula DNA. Konformační změny vyvolané vazbou molekul takového cytostatika k DNA mají za následek ovlivnění široké škály biochemických a molekulárně biologických procesů buněk. Akumulace veškerých změn ve fyziologické rovnováze buňky, vyvolané protinádorově účinnými komplexy, vyúsťuje v buněčnou smrt, nejčastěji apoptotického charakteru. Avšak k tomu, aby mohlo dojít k projevu cytotoxických účinků farmaka, musí být splněn základní předpoklad, a tím je akumulace daného léčiva v buňce.

Právě studiem mechanismů, které vedou k akumulaci farmak v buňkách nádorové tkáně, se zabývá první publikovaná práce. Během této studie byly zkoumány dva komplexy s centrálním atomem iridia v oxidačním stavu +III s oktahedrál ní geometrií. Látky se lišily v charakteru chelatačního ligandu. Hlavním cílem dané studie pak bylo objasnění specifických



mechanismů vedoucích k akumulaci iridiových komplexů v lidských nádorových buňkách. Z výsledků plyne, že jak pasivní difuze, tak i energeticky aktivní transport hrají roli v akumulaci iridiových komplexů. V odstraňování z buňky se významnou měrou zapojil MRP1, p-glykoprotein a metabolismus glutathionu. O všech těchto exportních mechanismech je známo, že v praxi mohou být komplikací při léčbě nádorových onemocnění, jelikož jejich činností dochází ke snižování hladiny účinné látky z nitra buněk.

Další publikace je zaměřena na studium molekulárních mechanismů buněčné smrti po působení nového iridiového komplexu  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ . U této látky byla pozorována vysoká účinnost vůči širokému spektru nádorových buněk jednak hematopoetického charakteru (leukemické), ale i solidních forem malignit (prsu, ovaria). Na velký terapeutický potenciál daného komplexu bylo poukázáno na základě zjištění jeho selektivity, kde při aplikaci vůči lidským nemaligním buňkám nevykazoval komplex výrazný cytotoxický efekt. Takto výjimečné vlastnosti se staly impulsem právě pro studium mechanismů působení na buněčné úrovni. Byl objasněn unikátní duální efekt na úrovni poškození DNA a mitochondrií. Bylo také prokázáno, že dominantním mechanismem buněčné smrti je apoptóza. Vlastnosti tohoto iridiového komplexu poukazují na jeho velký potenciál coby nové alternativy k léčbě nejrůznějších malignit a na jeho možné zahrnutí do budoucích experimentů na organismální úrovni.

Následující publikace uveřejněné během řešení disertační práce se týkají například problematiky platných komplexů s kyselinou valproovou (VPA) v pozici axiálních ligandů. V tomto případě bylo poukázáno na epigenetické změny vyvolané právě působením VPA. Dále byl studován klinicky již testovaný rutheniový komplex NAMI-A, kde byla identifikována biologicky aktivní forma a byly navrženy postupy zaručující vylepšení farmakokinetických parametrů tohoto rutheniového komplexu. V neposlední řadě bylo pojednáno o platných komplexech s trans geometrií, či o polynukleárních platných komplexech.

Obecným přínosem dané práce je použití celé řady experimentálních technik, pomocí nichž byla získána a publikována série výsledků zaměřených na mechanismus protinádorového působení nových metalofarmak. Studie provedené v rámci tematiky této disertační práce přispěly k řešení řady projektů zaměřených na problematiku molekulární farmakologie při terapii nádorových onemocnění.

**ABSTRACT**

Metal based anticancer compounds become a part of pharmaceutical industry and laid the development of modern chemotherapy. Cisplatin, (cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) complex, is currently one of the widely used and very successful chemotherapeutic agent. Since the discovery of antitumor activity of cisplatin a genuine “boom” in the synthesis of platinum compounds has started. More than 3000 compounds with central platinum atom have been synthesized, about 30 of them have entered clinical trials and only 6 are currently used in the clinic. The aim of this extensive research is to find the cytotoxic agent with higher antitumor efficiency and wider range of application possibilities. The main efforts are focused to prepare the drug, which exhibits minimum side effects or even to suppress acquired resistance. Limitations associated with the treatment with conventional compounds continuously stimulate the development of new and better drugs. The main strategies how to achieve the desired benefits are: modification of the complex geometry (cis/trans configurations), substitution of the central atom (ruthenium, iridium, osmium etc.), and synthesis of polynuclear complexes or complexes with the central atom in different oxidation state. Metal based anticancer compounds represent a uniquely modular system whereby all such possibilities can be implemented.

Widely accepted and experimentally proven pharmacological target of conventional cytotoxic platinum agents is intracellular DNA. Conformational changes introduced in DNA after the binding of such molecules affect a wide range of intracellular processes. Accumulation of these changes disrupts a physiological balance of the cells leading to the apoptotic or necrotic cell death. However, in order to stimulate cytotoxic effects, the basic assumption of intracellular accumulation should be fulfilled.

Mechanisms that lead to the accumulation of metal-based drugs were studied in the first published work. In this study two octahedral iridium (+III) complexes were investigated that differed in the nature of chelating ligand. The main objective of the study was to elucidate specific mechanisms leading to the accumulation of iridium complexes in human tumor cells. The results show that both passive diffusion and active transport play a role in the accumulation of such iridium complexes. MRP1, p-glycoprotein and glutathione metabolism significantly participate in the efflux mechanisms. All of these export mechanisms are well

known in the clinical practice for their ability of active detoxification of a large spectrum of drugs from the intracellular matrix of the cells.

The study described in the second publication focused on molecular mechanisms of cell death after the exposure of the tumor cells to a new iridium complex  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ . We observed a high efficacy of this compound against a broad spectrum of tumor cells, including hematopoietic (leukemia) as well as solid forms of malignancies (breast, ovary). A great therapeutic potential of this iridium complex should be stressed, based on the selectivity against nonmalignant cells. This exceptional qualities became an impetus for studying mechanisms of action at the cellular level. The results were interpreted to mean that the new iridium complex exhibits a unique dual effect on the level of DNA and mitochondria damage. It was also shown that the predominant mechanism of cell death is apoptosis. The observed properties of this iridium compound point out to its great potential as a new alternative for the treatment of various malignancies and its possible inclusion in further in vivo experiments.

The other publications were dedicated to platinum(IV) compounds with valproic acid (VPA) in the positions of axial ligands. The epigenetic changes on the cellular level induced by these agents were demonstrated. In addition, already clinically tested ruthenium compound NAMI-A was a subject of another research project. The biological active form of this ruthenium drug was identified and the procedure how to improve pharmacokinetic parameters in vivo was published. The last projects were dedicated to platinum complexes with trans geometry and to polynuclear platinum complexes.

The overall benefit of this research is the use of a large variety of experimental techniques, by which a series of results concerning the mechanisms of action of a new antitumor metallodrugs were obtained and published. The studies conducted in the context of the objectives of this thesis contributed to the implementation of a number of projects focused on the molecular pharmacology in cancer therapy.

Prohlašuji, že jsem předkládanou disertační práci vypracoval samostatně, s použitím literatury citované v závěru. Všechny použité výsledky byly zahrnuty do této práce po souhlasu spoluautorů.

V Brně dne.....

.....

Rád bych poděkoval mé školitelce, prof. Janě Kašpárkové, za skvělou spolupráci, motivaci do studia a řadu velmi užitečných rad a nápadů, které mi k řešení disertační práce poskytla. Děkuji také týmu oddělení Molekulární biofyziky a farmakologie, Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně, za mimořádně příjemnou atmosféru na pracovišti a za cenné rady. V neposlední řadě děkuji své rodinně za podporu a obětavost. Zvláštní poděkování patří mé ženě a dceři.

Disertační práce vznikla také díky finanční podpoře grantů PŘF\_2014\_029 a PŘF\_2015\_025.

## OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>12</b>
1.1 RAKOVINA.....	12
1.1.1 Vznik onemocnění.....	12
1.1.2 Statistiky.....	13
1.2 CYTOSTATIKA NA BÁZI PLATINY .....	14
1.2.1 Mechanismus působení, interakce s DNA .....	15
1.2.2 Možné komplikace při léčbě platnatými cytostatiky.....	17
1.2.3 Problematika trans geometrie platnatých komplexů .....	18
1.2.4 Platičité komplexy.....	19
1.2.4.1 Biologický potenciál platičitých komplexů .....	20
Fotodynamická terapie, fotoaktivovatelné platičité komplexy.....	20
Platičité komplexy s biologicky aktivními axiálními ligandy .....	22
1.3 ORGANOKOVOVÉ IRIDIOVÉ KOMPLEXY.....	27
1.3.1 Iridiové komplexy s čtvercově planární geometrií.....	27
1.3.2 Iridiové komplexy s pseudo-oktahedrání geometrií.....	28
1.3.2.1 Vliv ligandů na chemické parametry Ir <sup>III</sup> komplexů .....	28
Stabilizující ligand a jeho modifikace.....	29
Chelatační ligandy .....	30
Strukturně aktivní vztahy.....	31
1.4 RUTHENIOVÉ KOMPLEXY V KLINICKÉM TESTOVÁNÍ.....	32
1.5 TRANSPORT PROTINÁDOROVĚ ÚČINNÝCH KOMPLEXŮ KOVŮ.....	34
1.5.1 Transportéry kationtů mědi.....	35
1.5.2 Transportéry organických kationtů .....	36
1.5.3 Detoxifikační mechanismy .....	37

1.6	BUNĚČNÁ SMRT JAKO CÍL PRO CYTOSTATIKA .....	40
1.6.1	Apoptóza .....	41
1.6.1.1	Změny buněčné morfologie v průběhu apoptózy .....	41
1.6.1.2	Vnější dráha zprostředkovaná receptory buněčné smrti .....	42
1.6.1.3	Vnitřní dráhy apoptózy.....	43
1.6.1.4	Společná dráha apoptózy - konečné stádium.....	43
1.6.1.5	Vyústění znalosti molekulárních mechanismů apoptózy – návrh léčiv	44
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>46</b>
3.1	POUŽITÉ KOMPLEXY.....	46
3.1.1	Platičité komplexy s valproáty v pozici axiálních ligandů .....	46
3.1.2	Iridiové komplexy – studium buněčné akumulace komplexů kovů.....	47
3.1.3	Iridiový komplex – studium duálního mechanismu buněčné smrti .....	48
3.1.4	Rutheniový komplex NAMI-A.....	49
3.1.5	Platnatý komplex s trans geometrií a methylaminovým ligandem .....	49
3.1.6	Platnaté komplexy s cis/trans geometrií a methylazaindolovým ligandem	50
3.1.7	Dinukleární platnatý komplex s benzotriazolátovým můstkem .....	51
3.1.8	Dinukleární platnatý komplex s azolátovým můstkem.....	51
3.2	CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	52
3.2.1	Buněčné linie .....	52
3.3	METODY .....	53
3.3.1	Rozdělovací koeficient LogP.....	53
3.3.2	Kultivace nádorových a nenádorových buněčných linií.....	53
3.3.3	Cytotoxicita komplexů.....	54
3.3.3.1	Stanovení cytotoxicity komplexů s pomocí MTT .....	54

3.3.3.2	Stanovení cytotoxicity komplexů s pomocí SRB.....	55
3.3.3.3	Stanovení cytotoxicity komplexů s pomocí NR.....	55
3.3.4	Akumulace komplexů kovů v buňkách.....	55
3.3.4.1	Teplotní závislost akumulace komplexů kovů v buňkách.....	56
3.3.4.2	Inhibice Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> pumpy.....	56
3.3.4.3	Deplece ATP ke studiu aktivní transportních mechanismů.....	56
3.3.4.4	Metoda analýzy a inhibice exkrečních buněčných mechanismů.....	56
3.3.4.5	Inhibice CTR1 transportérů.....	57
3.3.4.6	Inhibice endocytózy.....	57
3.3.5	Vazba studovaných komplexů na DNA v buňkách.....	57
3.3.6	Příprava jaderných a cytoplasmatických extraktů z buněk.....	58
3.3.7	Aktivita histonových deacetyláz.....	58
3.3.8	Detekce buněčné smrti.....	59
3.3.8.1	DNA laddering assay.....	59
3.3.8.2	Elisa kit k určení druhu buněčné smrti.....	59
3.3.8.3	Mikroskopické pozorování průběhu buněčné smrti.....	60
3.3.9	Analýza buněčného cyklu.....	60
3.3.10	Detekce reaktivních forem kyslíku v buňkách.....	61
3.3.11	Role p53 v mechanismu působení protinádorově účinných komplexů... ..	61
3.3.12	Buněčná adheze.....	62
3.3.13	Animální studie ( <i>in vivo</i> experimenty).....	62
3.3.13.1	Aplikace léčiva.....	62
3.3.13.2	Odběr a procesování vzorků.....	63
3.3.13.3	FAAS analýza pro účely studia farmakokinetických parametrů.....	63
3.3.13.4	Farmakokinetické parametry.....	63



<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>64</b>
4.1 Protinádorově účinné komplexy oxaliplatinu s valproovou kyselinou v pozici axiálních ligandů ( <i>Publikace č. 1</i> ).....	65
4.2 Mechanismus buněčné akumulace protinádorově účinného pentametylcyklopentadyenilového iridiového komplexu s C, N chelatačním ligandem ( <i>Publikace č. 2</i> ) .....	66
4.3 Organokovový iridiový komplex s duálním mechanismem působení a iniciující apoptózu ( <i>Publikace č. 3</i> ).....	67
4.4 Vliv vazby redukované formy NAMI-A na lidský sérový albumin, ovlivnění farmakokinetiky a biologické aktivity ( <i>Publikace č. 4</i> ) .....	68
4.5 Aktivace trans geometrie u bifunkčních platnatých komplexů neobjemným methylaminovým ligandem ( <i>Publikace č. 5</i> ) .....	70
4.6 Nové protinádorově účinné deriváty cisplatinu a transplatinu s 1-metyl-7-azaindolovým ligandem: syntéza, charakterizace a buněčná odezva ( <i>Publikace č. 6</i> ).....	70
4.7 Mechanistická studie cytotoxického působení dinukleárního platnatého komplexu s benzo-triazolátovým můstkem ( <i>Publikace č. 7</i> ) .....	71
4.8 Energetika, konformace a rozpoznávání DNA modifikované dinukleárním platnatým komplexem s azolátovým můstkem ( <i>Publikace č. 8</i> ) .....	72
<b>5 ZÁVĚR</b> .....	<b>73</b>
<b>6 CITOVANÁ LITERATURA</b> .....	<b>74</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>89</b>
<b>8 CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>90</b>
<b>9 SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	<b>92</b>
<b>10 PŘÍLOHY</b> .....	<b>94</b>
10.1 Publikace č. 1.....	95
10.2 Publikace č. 2.....	97
10.3 Publikace č. 3.....	99

10.4	Publikace č. 4.....	101
10.5	Publikace č. 5.....	103
10.6	Publikace č. 6.....	105
10.7	Publikace č. 7.....	107
10.8	Publikace č. 8.....	109

# 1 ÚVOD

## 1.1 RAKOVINA

Rakovina je choroba známá od dob, kdy lidská společnost byla schopná jakýmkoli způsobem zaznamenávat svoje aktivity. První důkazy o existenci novotvarů pocházejí již z doby 1500 před naším letopočtem z území dávného Egypta. [1] Nádory se mohou vyskytovat nejen u lidí, ale obecně u všech vyšší savců a mnohobuněčných organismů. [2] Nádorová choroba je charakterizována vznikem maligních buněk, které získaly schopnost pronikat do okolní tkáně, kde mohou tvořit i vzdálené metastázy. Rakovina vzniká akumulací genetických změn a tím pádem i její incidence exponenciálně narůstá spolu s věkem. [3] Vzhledem ke komplexnosti onemocnění se výzkumem rakoviny zabývá řada vědních oborů, nejen medicínského zaměření. Výsledky snažení již nyní naznačují, že získané poznatky přesahují rámec mechanismů vzniku nádorové buňky, nýbrž jsou základem pochopení samotného vzniku života. Při zkoumání nádorů se nacházejí zcela konkrétní rozdíly v nádorech, stavuje se tzv. „nádorový podpis“, který může do budoucna tvořit základ pro individualizovanou léčbu. Obecně platí, že nádorovou chorobou mohou být postiženy všechny orgány a tkáně.

### 1.1.1 VZNIK ONEMOCNĚNÍ

Rakovina je chorobou genů, primárně jsou tedy její příčiny připisovány změnám v genomu. Na lidský organismus po dobu života působí nejrůznější fyzikální (záření), chemické (mutageny) a biologické vlivy (viry, bakterie), které mohou podnítit mutace v buňkách, jež se následně mohou stát primárním původcem onemocnění. [3] K těmto změnám může docházet jednak v buňce kmenové, tak již v buňce diferencované, kde mutační změny způsobí nekontrolovatelné znovuoobnovování. [2] Majoritní vliv na progresi rakoviny má aktivace onkogenů, inaktivace nádorových supresorových genů (TP53, RB, VHL, APC atd.) a genů zodpovědných za opravu DNA. [2]

### 1.1.2 STATISTIKY

S vývojem moderní civilizace a nárůstem průměrné délky života se ukazuje, že rakovina patří čím dál tím více k dnešnímu životu. Souhrnná data ukazují, že celosvětově bylo v roce 2014 na světě diagnostikováno 14,1 milionů nových případů a mortalita dosáhla hranice 8,2 milionu, čímž se toto onemocnění zařadilo na přední příčky v příčinách úmrtí. Při porovnání dle pohlaví bylo diagnostikován novotvar u 53% mužů a 47% žen, onemocnění pak podleho 57% mužů a 43% žen. Z tabulky č. 1 je pak patrné zastoupení jednotlivých forem onemocnění. [4] Masivní celosvětové finanční ztráty spojené s léčbou rakoviny byly pro zajímavost v roce 2010 vyčísleny na 1.16 bilionů Amerických dolarů. [5]

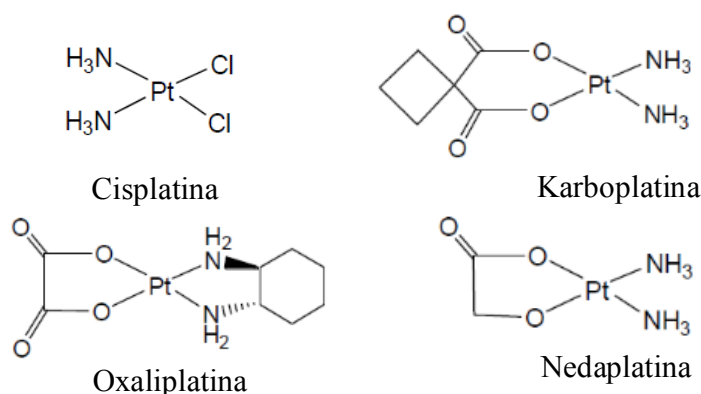
Česká Republika patří mezi státy se světově nadprůměrnou incidencí 293 a mortalitou 122 případů na sto tisíc obyvatel. V incidenci je tedy Česká republika na 8. místě v Evropě na 23. místě na světě, mortalita je zde 27. nejnížší v Evropě a 154. na světě. Je obecně známo, že Česká republika dominuje v četnosti výskytu rakoviny tlustého střeva. Nejčastější formou onemocnění u mužů je karcinom plic, tlustého střeva, konečníku a prostaty, u žen je pak nejčastěji indikován karcinom prsu, tlustého střeva a plic. [4]

Druh	Výskyt [%]	Druh	Výskyt [%]
Plíce	13,0	Močový měchýř	3,1
Prs	11,9	Non-Hodgkinovský lymfom	2,7
Tlusté střevo	9,7	Leukemie	2,5
Prostata	7,9	Ledvin	2,4
Žaludek	6,8	Slinivka	2,4
Játra	5,6	Děloha	2,3
Děložní čípek	3,7	Mozek	1,8
Jícen	3,2	Ostatní	36,4

**TABULKA Č. 1:** Celosvětové statistiky pro incidenci jednotlivých forem rakoviny. Data analyzována z databázi Světové zdravotnické organizace (WHO) [6] a fóra pro výzkum rakoviny (Cancer research UK) [4].

## 1.2 CYTOSTATIKA NA BÁZI PLATINY

Komplexy na bázi přechodných kovů se staly nedílnou součástí farmaceutického průmyslu a položily základ v oblasti moderní chemoterapie. Klinické aplikace kovových sloučenin jako terapeutik jsou známy již více než 5000 let. [7] V současné době je však jedním z nejpoužívanějších a obecně nejúspěšnějších chemoterapeutik cisplatina,  $\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ . Právě v roce 2015 tomu bude 50 let, kdy byla objevena protinádorová aktivita platinolu®, jak se komerčně tato látka označuje. [8] Po objevu cisplatiny byl odstartován skutečný „boom“ v oblasti syntézy platinových cytostatik. [9] Ze statistik vyplývá, že bylo syntetizováno více než 3000 látek s nosným atomem platiny, přibližně 30 z nich se dostalo až do fáze klinických testů a pouhých 6 je v současné době v klinické praxi. [10] Jsou to: karboplatina (paraplatin®), oxaliplatina (eloxatin®), nedaplatina (aqupla®), a konečně cisplatina (platinol®); (viz obrázek č. 1). Léčba platinolem je doporučována zejména v případě rakoviny vaječníků a varlat, kde mimořádným způsobem zvyšuje prognózu pacientů, která ve včasných stádiích nádoru, tzv. grading, představuje i více než 90% šanci na úplné vyléčení. Dále je platinol užíván při terapii nádorů hlavy a krku, močového měchýře a lymfatických cest, [11] avšak v tomto případě může být kombinován spolu s dalšími cytostatiky jako mitomycin C, antracykliny, cyklofosfamid, doxorubicin atd. Zhruba 50-70% všech pacientů s diagnostikovaným nádorovým onemocněním je léčeno některým z platnatých cytostatik. [12]

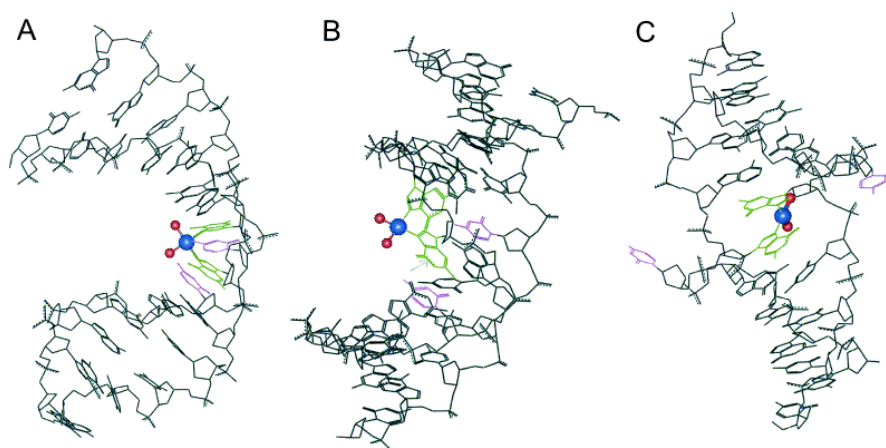


**OBRÁZEK Č. 1:** Příklady struktur nejpoužívanějších platnatých cytostatik schválených k léčebnému užití. Lobaplatina a heptaplatina používané k léčbě malignit v asijských zemích zde nejsou uvedeny. (kresleno v ChemSketch 12.01 dle ACS)

### 1.2.1 MECHANISMUS PŮSOBENÍ, INTERAKCE S DNA

Prvním nezbytným krokem pro funkci cisplatiny je tzv. aktivace, která probíhá skrze hydrataci odstupujících chloridových ligandů, za vytvoření nejprve monoqua  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$  a dále diagua formy  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ . Při průchodu krevním řečištěm je cisplatina chráněna před hydratací díky vysoké koncentraci chloridových iontů v plasmě ( $\geq 100$  mM). Samotná hydratace probíhá až uvnitř buněk, kde je výrazně snížena koncentrace chloridových iontů ( $\sim 3\text{-}20$  mM) a cisplatina přechází do vysoce reaktivní, hydratované (aktivované) formy. [13]

Obecně uznávaným a experimentálně potvrzeným faktem je, že cílovým místem působení cisplatiny a odvozených platnatých cytostatik je deoxyribonukleová kyselina (DNA). [14] V jádře buněk dochází k preferenční vazbě na pozice N7 purinových bází a vytváří tak primárně 1,2 a 1,3 vnitřetězcové můstky. Co se týče četnosti, je 1,2-GG vnitřetězcový můstek zastoupen z 65%, 1,2-AG 25%, 1,3-GxG můstek 5-10% a v minoritním počtu se pak vyskytují meziřetězcové můstky a monofunkční adukty. (viz obrázek č. 2) [15] V literatuře se také vyskytuje předpoklad tvorby můstků mezi sousedními molekulami DNA. Toto bylo prokázáno za podmínek in vitro, při simulaci prostředí napodobujícího zahuštěný heterochromatin. [16] Ostatní platnaté komplexy (oxaliplatina, karboplatina) pak tvoří obdobné formy aduktů v odlišném zastoupení. [17] Obecně se zcela přesně neví, která forma můstků na DNA je absolutně zodpovědná za protinádorovou aktivitu platinových komplexů.



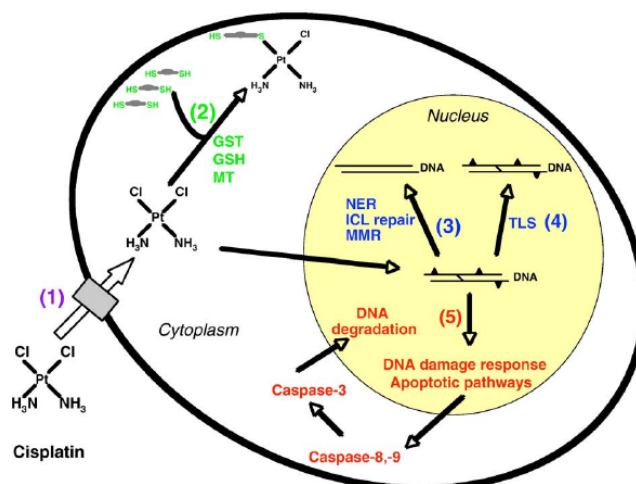
**OBRÁZEK Č. 2:** 3D model můstků vytvořených platnatým komplexem (cisplatinou) na duplexu DNA. A) 1,2 – GG IAC, (B) 1,3 – GTG IAC a (C) IEC můstek. [18]

Hlavním důsledkem vazby platinových komplexů do malého žlábků DNA je ovlivnění její nativní struktury, která se projevuje v podobě distorzí lokálního, ale i rozsáhlejšího charakteru. Zpravidla se jedná o rozvinutí, ohyb a zkracování. V případě majoritního typu aduktu, 1,2-GG, jsou konformační změny díky rentgenostrukturální analýze velmi dobře popsány. Dochází především k lokálnímu rozvinutí duplexu o  $13^\circ$  a ohybu směrem k velkému žlábků o  $35-40^\circ$ . [19]

Zcela zásadním zásahem do nativních biochemických procesů buňky, vzniklých vlivem aduktů platnatých komplexů na DNA, je inhibice replikace a transkripce. Narušení těchto prvních kroků následné proteosyntézy probíhá hlavně skrze mechanické bloky (vzniklé adukty), které zcela, či částečně zastavují DNA polymerázy (úroveň replikace) a RNA polymerázy (úroveň transkripce). [20] Další možností inhibice replikace je tzv. „vychytávání“ transkripčních faktorů vlivem podobnosti vzniklých distorzí s přirozenými promotorovými úseky. Transkripční faktory se tudíž váží do oblasti léze a jejich nedostatek poté představuje překážku v normálním průběhu transkripce. Při cytotoxickém působení je také ovlivněn buněčný cyklus a oprava DNA. [21] Veškeré tyto změny ve vnitřních procesech buňky vedou k buněčné smrti, převážně apoptotického charakteru. [13]

### 1.2.2 MOŽNÉ KOMPLIKACE PŘI LÉČBĚ PLATNATÝMI CYTOSTATIKY

Navzdory úspěchu a nespornému pokroku v terapii rakoviny díky vývoji platnatých komplexů, se i přesto současná medicína setkává s negativními efekty těchto farmak. K nejzávažnějším nežádoucím účinkům patří vysoká zátěž ledvin, někdy až nefrotoxicita, útlum činnosti kostní dřeně a v neposlední řadě nevolnosti. Některé z uvedených vedlejších účinků mohou být překážkou pro samotnou léčbu v závislosti na rozsahu (gradingu) stávajícího onemocnění. Nelze opomenout ani fakt, že platnatá cytostatika jsou účinná vůči relativně úzkému spektru nádorů a také možnost existence vrozené či získané rezistence na danou léčbu. [22] (shrnutí mechanismů rezistence viz obrázek č. 3) Všechny tyto aspekty léčby, které je nutné brát na zřetel, stimulovaly širokou vědeckou veřejnost k vývoji nových cytostatik, ať už na bázi platiny či jiných přechodných kovů.



**OBRÁZEK Č. 3:** Shrnutí mechanismů vedoucích k rezistenci vůči cisplatině. [23] 1) Změny v transportu cisplatině. 2) Inaktivace glutathionem (GSH) nebo metalothioneiny (MT) v cytoplasmě. 3) Změny v opravě DNA: odstranění aduktů cisplatině mechanismem nukleotidové excisní opravy (NER), nebo opravou meziřetězcových můstek (ICL-repair; interstrand crosslink repair), snížená aktivita „mismatch“ opravného systému (MMR). 4) Zvýšená exprese translázově aktivních polymeráz (TLS) umožňujících buňce tolerovat neopravené adukty. 5) Inhibice apoptózy snižující se expresí či ztrátou pro-apoptotických faktorů, nebo vzrůstající exprese anti-apoptotických faktorů. Převzato z [23].



### 1.2.3 PROBLEMATIKA TRANS GEOMETRIE PLATNATÝCH KOMPLEXŮ

Na příkladu pouhého geometrického analogu klinicky známé a velmi efektivní cisplatiny byl demonstrován vliv geometrie komplexů s centrálním atomem platiny na výsledný cytotoxický účinek. Při změně geometrie z cis na trans v komplexu  $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$  došlo k markantnímu potlačení protinádorové účinnosti. [24] Z chemického pohledu je trans izomer kineticky mnohem reaktivnější a z tohoto důvodu je i mnohem náchylnější k deaktivaci například síru obsahujícími látkami. Později však bylo ukázáno, že ne všechny platnaté komplexy jsou cytotoxicky inaktivní, a byl hlouběji studován mechanismus jejich působení. V některých případech dokonce trans izomer platnatých komplexů vykazoval mnohem lepší cytotoxické parametry nežli cis izomer. [25] [26]

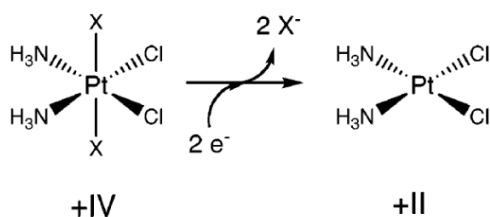
Nejpravděpodobnějším a nejuznávanějším zdůvodněním inaktivity transplatiny je rozdílný charakter můstků vytvářených na DNA v porovnání s cisplatinou. Stereochemické parametry transplatiny nedovolují formaci majoritního typu aduktu, který je pozorovatelný v případě cisplatiny, tedy především 1,2-GG/GA vnitřetězcový můstek. Transplatina tvoří na DNA především monofunkční typ aduktů, meziřetězcové můstky mezi guaniny a komplementárními cytosiny a v neposlední řadě také meziřetězcové můstky mezi neprotilehlými páry bazí. Na buněčné úrovni se však předpokládá, že převážná většina aduktů zůstává monofunkčních, jelikož druhý chloridový ligand odstupuje (hydratuje) řádově mnohem pomaleji než v případě cisplatiny. Adukty vytvořené transplatinou na DNA nevykazují takovou míru poškození nativní struktury DNA. [27]

Příkladem komplexů, které vykazují protinádorovou účinnost, odlišné spektrum aktivity oproti cisplatině či dokonce účinné v buňkách rezistentních vůči cisplatině, jsou například analoga cisplatiny s iminoéterovými skupinami, heterocyklickým aminovým ligandem a methylaminovým ligandem. [28]

### 1.2.4 PLATIČITÉ KOMPLEXY

Komplexy s centrálním atomem platiny v oxidačním stavu +IV nabízejí možnost obejít výše zmíněné nežádoucí účinky platnatých cytostatik. Hlavní myšlenkou je podání neaktivního proléčiva ve formě Pt<sup>IV</sup> komplexu, který nevykazuje cytotoxický efekt. Až za určitých podmínek dojde ke konverzi na biologicky aktivní formu. Aktivace proléčiva může být zprostředkována specifickými podmínkami v tkáni, například pH či přirozeně se vyskytujícími intracelulárními reduktanty [29] nebo také po aplikaci kvanta určitého záření. [30] Zavedením oktahedrálnej geometrie je možné získat navíc dvě axiální pozice pro obsazení dalšími ligandy. [31] Právě axiální ligandy poskytují prostor k racionálnímu návrhu léčiv s cílem vylepšit farmakokinetické parametry, lipofilicitu, mikroenvironmentální cílení a rychlost redukce. [32]

Pro platičité komplexy je rychlost redukce podstatným parametrem, jelikož předpokládaná aktivace Pt<sup>IV</sup> komplexů zahrnuje přechod na aktivní Pt<sup>II</sup> formu (viz obrázek č. 4). Charakter axiálních ligandů pak přímo ovlivňuje parametry redukce a jejich vhodným zvolením lze docílit specifických vlastností, které mohou být využity pro cílené uvolnění nosného léčiva a samotného ligandu. [32] Na jednoduchém případě chloridových (Cl), acetátových (Ac) a hydroxo (OH) axiálních ligandů bylo ukázáno, že „snadnost“ redukce klesala ve směru Cl > Ac > OH, kde komplex cisplatiny mající navíc dva chloridové ligandy v axiálních pozicích byl nejsnáze redukován. [33]

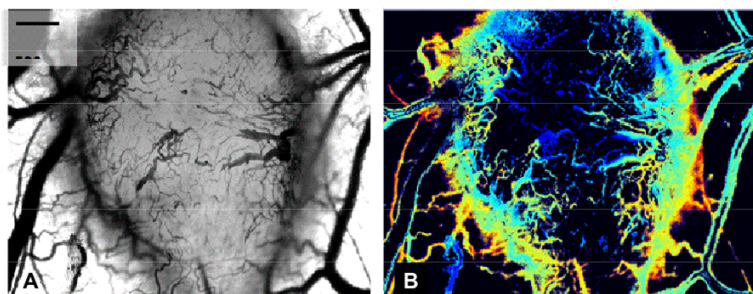


**OBRÁZEK Č. 4:** Schéma redukce platičitých komplexů. X jsou axiální ligandy uvolněné po redukcí Pt<sup>IV</sup> komplexu. Příklad demonstrován pro případ redukce obecného komplexu na cisplatinu. Redukovatelnost komplexu je odvislá od použitého axiálního ligandu. Převzato z [32].

#### 1.2.4.1 BIOLOGICKÝ POTENCIÁL PLATIČITÝCH KOMPLEXŮ

Do současné doby byly syntetizovány platičité komplexy s ligandy mající buď biologickou aktivitu, [34] nebo nabízející možnost fotoaktivovatelnosti, [30] či pouze s potřebnými redukčními parametry. [32] Při studiu solidních nádorů a na úrovni 3D buněčných kultur, tzv. sferoidů, bylo poukázáno také na fakt, že oproti běžným platnatým komplexům nabízejí platičité komplexy lepší terapeutické (cytotoxické) účinky. [35] Vysvětlením tohoto jevu je poměrně častá vlastnost nádorových tkání, a tou je hypoxie. [36] Určité typy nádorů jsou vlivem rychlého bujení hůře prostoupené krevními cévami a tím vytváří prostředí chudé na kyslík (hypoxické), tedy z chemického pohledu redukční (*viz obrázek č. 5*). Tyto případy přímo nahrávají k využití léčby platičitými komplexy, pro které jsou zde vytvořeny vhodné selektivní podmínky, založené na rozdílné schopnosti redukovat agens v nádorové tkáni. [35]

Dalším potenciálním benefitem je možnost orálního podání tohoto typu léčiv. V klinických studiích je již v režimu orálního podání, pro terapii nádorů prostaty, zkoušena satraplatina (JM216, bis(acetato)amindichloro(cyclohexylamin)platičitý komplex). [37] K roku 2015 ještě stále není dle FDA schválena k léčbě a klinické studie stále probíhají. [38]



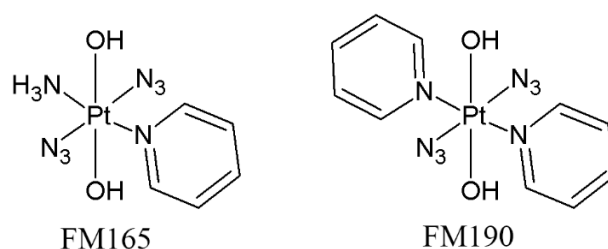
**OBRÁZEK Č. 5:** Intravitální mikroskopický snímek hypoxické tkáně nádoru prsu. A) Zobrazení ve světlém poli, B) fluorescenční snímek dokumentující saturaci hemoglobinem  $\leq 10\%$  v 70% plochy nádoru (tmavé oblasti-hypoxie). Měřítko 500  $\mu\text{m}$ , převzato z [39].

#### Fotodynamická terapie, fotoaktivovatelné platičité komplexy

Idea syntézy fotoaktivovatelných platičitých komplexů vychází z předchozích zkušeností s látkami užívanými ve fotodynamické terapii jako je photofrin®, foscan®, levulan® a metvix®. [40] Mechanismus působení těchto látek vyžaduje kyslík, na nějž je po ozáření

zmíněných fotosenzitizérů předávána energie tripletním stavem (T1) daného fotosenzitizéru. Tímto mechanismem vznikají reaktivní formy kyslíku, které jsou zodpovědné za výsledný protinádorový efekt. Z předchozího textu však je patrné, že v solidních nádorech panuje hypoxické prostředí, které výrazným způsobem limituje účinnost fotosenzitizérů. [41]

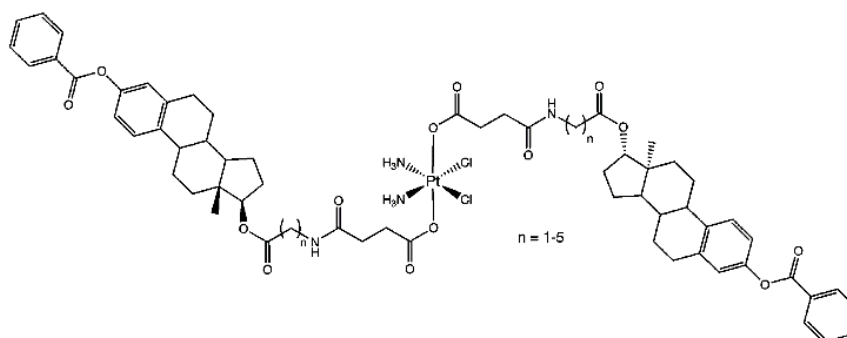
Fotochemoterapie založená na platičitých komplexech si klade za cíl obejít výše zmíněný problém spojený s fotodynamickou terapií. Dvě hlavní skupiny fotoaktivovatelných prolečiv tvoří diiodo a diazidoplaticité komplexy. V případě diiodoplaticitých komplexů se ukázalo, že dochází již před ozářením k reakci se síru obsahujícími látkami a redukcí na Pt<sup>II</sup> formy. [42] Výrazně slibnější výsledky byly získány u diazidoplaticitých komplexů, jako příklad lze uvést FM165 (*trans, trans, trans*-Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(pyridin)) či FM190 (*trans, trans, trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridin)<sub>2</sub>]). (strukтуры viz obrázek č. 6) Při studiu mechanismu působení bylo poukázáno na výrazně lepší cytotoxický efekt v porovnání s cisplatinou a také na významnější poškození DNA, spojené s horší reparovatelností vzniklých aduktů, vlivem působení FM165 popřípadě FM190. [30]



**OBRÁZEK Č. 6:** Struktury fotoaktivovatelných platičitých komplexů. FM165 (*trans, trans, trans*-Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(pyridin)) a FM190 (*trans, trans, trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridin)<sub>2</sub>]). (kresleno v ChemSketch 12.01 dle ACS)

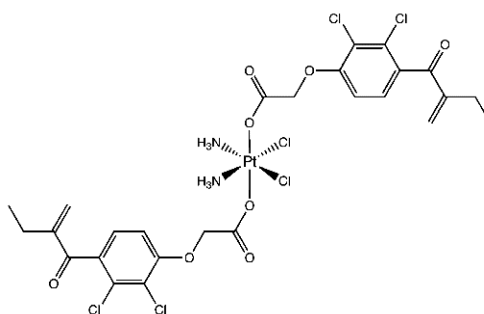
### Platičité komplexy s biologicky aktivními axiálními ligandy

Jeden z prvních pokusů o spojení klinicky schváleného léčiva s další bioaktivní složkou s cílem vytvořit zcela novou sloučeninu mající duální efekt vzešla z laboratoře prof. Lipparda. [43] Série Pt<sup>IV</sup> komplexů, kde jako centrální jednotka byla užita cisplatina, na níž byly kotveny deriváty estrogenu v axiálních pozicích (*obrázek č. 7*), byly navrženy za účelem cílení vůči buňkám rakoviny prsu s estrogenovým receptorem (linie MCF7). V tomto případě došlo po akumulaci daného komplexu v buňkách k jeho redukcí, což podnítilo uvolnění bioaktivních ligandů a aktivaci samotné nosné jednotky (cisplatiny). Studovaný molekulární mechanismus prokázal synergické působení obou složek, kde estradiol 3-benzoátové ligandy prokazatelně zvýšily expresi proteinu HMGB1. Tento protein je znám tím, že je schopen ochránit adukty vytvořené cisplatinou před jejich odstraněním mechanismem nukleotidové excizní opravy. [43]



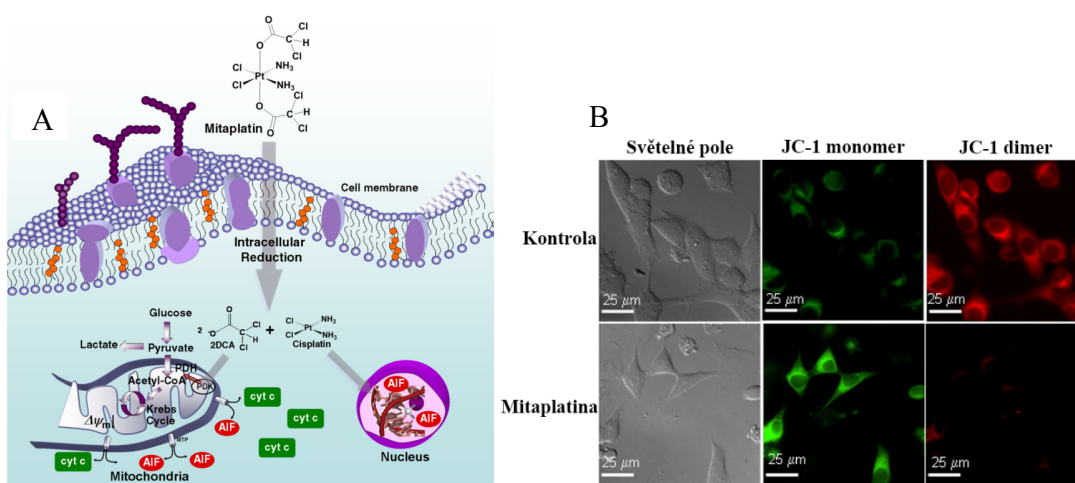
**OBRÁZEK Č. 7:** Derivát cisplatiny ve formě Pt(IV) komplexu s estradiol 3-benzoátovými ligandy v axiálních pozicích. Komplex je cíleně navržen k terapii karcinomu prsu s estradiolovým receptorem. [32]

Dalším platičitým komplexem s duální biologickou funkcí byla ethacraplatina, nesoucí kyselinu ethacrinovou v pozici axiálních ligandů (*obrázek č. 8*). Tento komplex byl navržen s cílem obejít mechanismus rezistence vzniklý vazbou platnatých cytostatik na síru obsahující látky, konkrétně glutathion. Ukázalo se, že ethacraplatina je účinným inhibitorem glutathion-S-transferázy (GST) a její cytotoxický účinek má mnohem efektivnější a rychlejší průběh v porovnání se samotnou cisplatinou, která je v komplexu obsažena jako nosná centrální jednotka. [44]



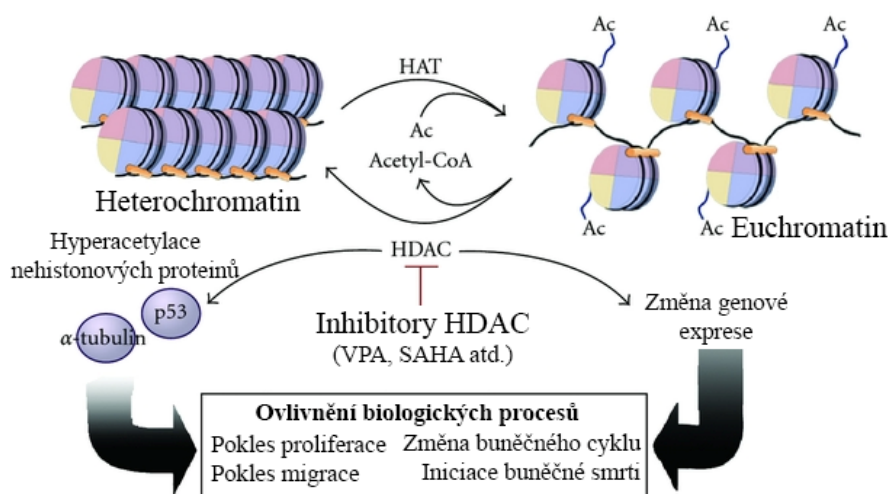
**OBRÁZEK Č. 8:** Ethacraplatina, Pt(IV) komplex s kyselinou ethacrinovou v pozici axiálních ligandů. Kyselina ethacrinová funguje jako inhibitor GST, klíčového enzymu v syntéze glutathionu. [44]

Mnohem aktuálnější je případ tzv. mitaplatiny, tedy konjugátu cisplatiny s dvěma dichloroacetáty (DCA) v pozici axiálních ligandů. Konceptně se jednalo o vysoce rafinovaně navrženou látku s cílovým místem působení na DNA, ale také v mitochondriích. U nádorových buněk je známo, že metabolismus glukózy probíhá preferenčně skrze glykolýzu namísto glukózové oxidace, jedná se o tzv. Warburgův efekt. [45] Po uvolnění DCA z komplexu s cisplatinou se předpokládá, že DCA funguje jako inhibitor pyruvát dehydrogenázové kinázy (PDK), což vede k návratu metabolismu z glykolýzy na nenádorovými buňkami upřednostňovanou glukózovou oxidaci. (*viz obrázek č. 9A*) Tento efekt může být mimo jiné pozorován snížením mitochondriálního membránového potenciálu ( $\psi_m$ ). (*obrázek č. 9B*) Změna v metabolismu glukózy v konečném důsledku také usnadňuje translokaci pro-apoptických mediátorů jako je například cytochrom c skrze mitochondriální membránu a usnadňuje tak spuštění apoptotické kaskády. [46] Zajímavé však je, že pozorovatelného efektu poklesu  $\psi_m$  bylo dosaženo až po aplikaci velmi vysokých dávek mitaplatiny, které však mohou být z fyziologického hlediska irelevantní. [47]



**OBRÁZEK Č. 9:** Mechanismus působení mitaplatiny. **A)** Schéma intracelulární redukce mitaplatiny na dichloroacetát a cisplatinu. Dichloroacetát působí v mitochondriích jako inhibitor PDK a mění tak metabolismus glukózy (zvrácení Warburgova efektu). **B)** Reálné pozorování poklesu mitochondriálního membránového potenciálu  $\psi_m$  pomocí konfokální mikroskopie a fluorescenční próby JC-1. Při poklesu  $\psi_m$  nedochází ke konverzi monomeru JC-1 (na obrázku zeleně) na dimer (na obrázku červeně). [47]

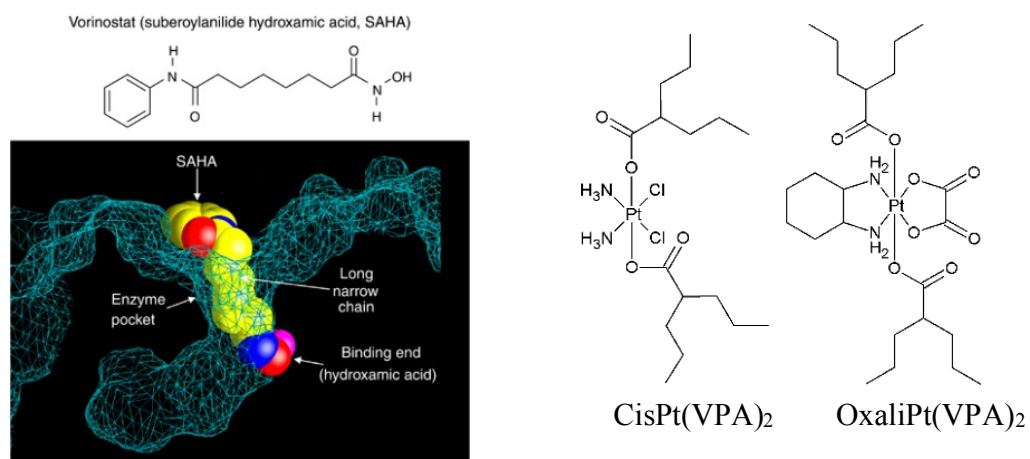
Velmi dobrých biologických efektů již za použití fyziologicky relevantních koncentrací bylo dosaženo při studiu na derivátech cisplatinu, [48] popřípadě oxaliplatinu [34] s jednou či dvěma valproovými kyselinami (VPA) v pozici axiálních ligandů. Idea syntézy takovýchto komplexů vycházela z experimentálních dat, které poukazují na schopnost VPA inhibovat histonové deacetylázy (HDAC). Inhibice HDAC vede k hyperacetylaci histonů H3 a H4, [48] což vede k rozvolnění struktury chromatinu (euchromatin) a tím potencuje vazbu cisplatinu, popřípadě oxaliplatinu, k DNA jakožto cílovému místu působení. (obrázek č. 10) Navíc bylo prokázáno, že VPA potlačuje tvorbu glutathionu v buňkách [49] a tím podporuje vyšší účinnost nosných platnatých cytostatik. Základním předpokladem synergického efektu VPA s platnatými cytostatiky je existence obou složek ve formě komplexu, jelikož samotná VPA jen velmi neochotně proniká přes cytoplasmatickou membránu a tak je její biologické působení silně omezeno. [34]



**OBRÁZEK Č. 10:** Schéma mechanismu působení inhibitorů histonových a nehistonových deacetyláz. Acetylace histonů je regulována pomocí protichůdné činnosti histonových deacetyláz (HDAC) a histonových acetyltransferáz (HAT). Acetylace chromatinu podněcuje restrukturalizaci chromatinu v tzv. euchromatin (relaxovaná forma). Změny ve struktuře chromatinu iniciují vnitřní biochemické pochody buňky, které mohou vyústit v buněčnou smrt. Převzato z [50] a upraveno.

Myšlenka inhibice histonových deacetyláz již vstoupila i do klinických aplikací. Suberoylanilid hydroxamová kyselina (SAHA) známá jako vorinostat, či komerčně Zolinza® se používá k léčbě non-Hodgkinovských lymfomů (CTCL). Její mechanismus působení je založen právě na inhibici HDAC prostřednictvím vazby do aktivního místa enzymu, kde mimo jiné vychytává ionty zinku, které jsou nezbytně nutné pro správnou činnost HDAC. (obrázek č. 11) [51] V konečném důsledku rozsáhlé epigenetické změny (hyperacetylace chromatinu) a acetylace proteinů (transkripční faktory) vedou k úplnému zastavení buněčné diferenciaci a navození buněčné smrti apoptózou. [52] Mechanismus účinku SAHA se stal inspirací pro návrh nových platičitých komplexů s inhibitorem HDAC. (obrázek č. 11) SAHA je v tomto textu uváděna pouze jako výchozí myšlenka, která byla dále rozvíjena v rámci problematiky platičitých, ale i platnatých cytostatik. [53]





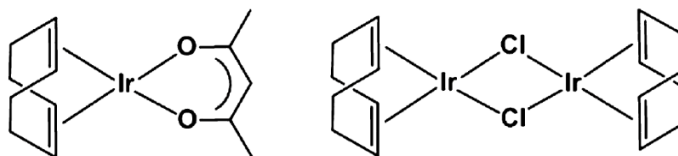
**OBRÁZEK Č. 11:** Vlevo-struktura a vazba SAHA do katalytického místa enzymu HDAC. [52] Vpravo-struktury Pt<sup>IV</sup> komplexů nesoucí biologicky aktivní axiální ligand, kyselinu valproovou (VPA). Komplexy jsou na bázi cisplatiny [CisPt(VPA)<sub>2</sub>], popřípadě oxaliplatin [OxaliPt(VPA)<sub>2</sub>]. (kresleno v ChemSketch 12.01 dle ACS)

### 1.3 ORGANOKOVOVÉ IRIDIOVÉ KOMPLEXY

Iridium je prvek se značně nízkým zastoupením v zemské kůře. Jeho objevení je datováno k roku 1803, kdy bylo nalezeno jako „nečistota“ při rozpouštění platiny za pomoci kyseliny chlorovodíkové popř. dusičné. [54] Iridium patří společně s platinou a osmiem do triády těžkých platinových kovů, tzv. přechodných kovů d-skupiny periodické tabulky. Elektronový obal pouze částečně zaplněná d-slupka obalu atomů iridia z chemického hlediska předurčuje k syntéze nejrozmanitějších organokovových komplexů s precizně definovanou 3D strukturou. Další výhodou je pak možnost přípravy iridiových komplexů v různých oxidačních stavech, což z praktického hlediska představuje výjimečnou vlastnost sloužící k ovlivnění stability připravované látky. [54] V následujícím textu bude pojednáno o sloučeninách, kde iridium je v oxidačním stavu +I, komplexy tohoto typu mají čtvercově planární geometrii, a dále pak o iridiových komplexech s pseudo-oktahedrání geometrií s centrálním iridiovým atomem v oxidačním stavu +III. Zejména tyto dvě skupiny komplexů představují možný potenciál pro vývoj protinádorově aktivních farmak na bázi jiných než platinových kovů.

#### 1.3.1 IRIDIOVÉ KOMPLEXY S ČTVERCOVĚ PLANÁRNÍ GEOMETRIÍ

Klinický úspěch protinádorově účinných platnatých farmak stimuloval k výzkumu podobných látek s jiným než platinovým centrálním kovem. Od 70. let 20. století se výzkum v tomto směru zaměřoval na iridiové komplexy s čtvercově-planární geometrií, právě pro jejich strukturální podobnost s již klinicky úspěšnými platnatými komplexy. [55] [56] Iridium bylo v tomto případě v oxidačním stavu +I. Mezi nejstudovanější čtvercově planární iridiové komplexy patřily mononukleární ( $[\text{Ir}(\text{acac})(\text{cod})]$ ; acetylacetonato(1,5-cyclooctadiene)iridium(I)) [55] a dinukleární ( $[\text{Ir}(\text{cod})]_2$ ; Chloro(1,5-cyclooctadiene)iridium(I) dimer [56] (viz obrázek č. 12), které v animálních studiích vykazovaly stoprocentní úspěšnost při léčbě Ehrlichova ascitického tumoru či antimetastatickou aktivitu vůči Lewisově plicnímu karcinomu. Negativním aspektem praktického použití výše zmíněných látek však byla nízká stabilita. Mechanismu protinádorového působení se již nevěnovala taková pozornost a spíše nežli ve farmacii, našly tyto látky uplatnění v chemickém průmyslu jako prekurzory pro syntézu strukturně složitějších organokovových komplexů, popřípadě jako katalyzátory chemických reakcí. [54]



**OBRÁZEK Č. 12:** Příklad struktury iridiových komplexů s čtvercově planární geometrií. Vlevo monomer  $[\text{Ir}(\text{acac})(\text{cod})]$ , vpravo dimer  $[\text{Ir}(\text{cod})]_2$ . (kresleno v ChemSketch 12.01 dle ACS)

### 1.3.2 IRIDIOVÉ KOMPLEXY S PSEUDO-OKTAHEDRÁLNÍ GEOMETRIÍ

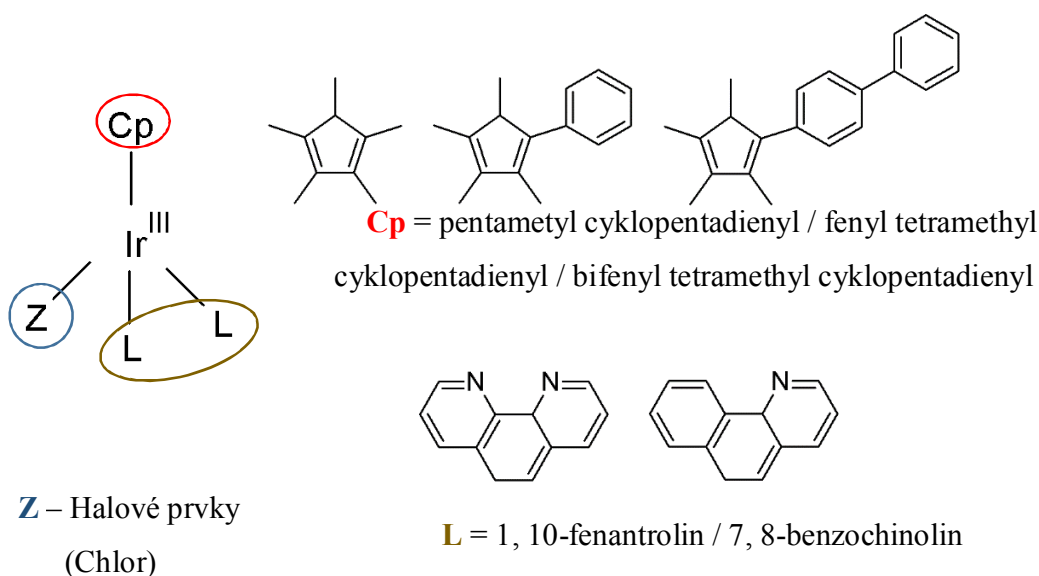
Výzkum v oblasti koordinační chemie se v současné době zaměřuje na vývoj iridiových komplexů s možností modulace jejich chemických parametrů. Lipofilicita, stabilita ve vodných roztocích, hydrolyza odstupujících ligandů, náboj dané sloučeniny a v neposlední řadě také rozpustnost, jsou parametry, které mají zcela zásadní význam v biologických aplikacích. [57] Dostatečně tvárný systém v tomto směru představují iridiové komplexy s pseudo-oktahedrání geometrií, kde centrální atom iridia je v oxidačním stavu +III. [54]

Systém, kde iridium je právě v tomto oxidačním stavu vykazuje mimořádnou kinetickou inertnost, kterou lze demonstrovat na příkladu sloučeniny  $[\text{Ir}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ . Tato výchozí látka vykazuje výměnu svých ligandů v řádu stovek let (300 let). [58] Naproti tomu po připojení cyklopentadienylového ligandu lze zvýšit rychlost výměny ligandů o čtrnáct řádů. Již na tomto příkladu lze jasně demonstrovat neobyčejnou možnost variability chemických parametrů, kde jak vysoce inertní, tak i labilní  $\text{Ir}^{\text{III}}$  komplexy mohou najít uplatnění v biologických aplikacích. [54]

#### 1.3.2.1 VLIV LIGANDŮ NA CHEMICKÉ PARAMETRY $\text{Ir}^{\text{III}}$ KOMPLEXŮ

Vhodně zvolené ligandy na základě konkrétních sterických a elektrochemických parametrů, vázané k centrálnímu atomu iridiových komplexů, hrají významnou roli v protinádorové aktivitě a biologickém působení. [59] Iridiové komplexy studované v rámci disertační byly typu  $[(\eta^5\text{-Cp}^{\text{x(ph/biph)})}\text{Ir}(\text{L}^{\wedge}\text{L}')\text{Z}]^{0/n+}$ , kde  $\text{Cp}^{\text{x}}$  je pentametyl cyklopentadienyl,  $\text{Cp}^{\text{xph}}$  fenyl tetramethyl cyklopentadienyl nebo  $\text{Cp}^{\text{xbiph}}$  bifenyl tetramethyl cyklopentadienyl. Dále pak L je chelatační ligand 1, 10-fenantrolin (vazba na centrální atom Ir skrze dusíky) nebo 7, 8-benzochinolin (vazba na centrální atom prostřednictvím uhlíku a dusíku). Obecná struktura těchto látek je znázorněna na obrázku č. 13. Stabilizující Cp ligandy jsou

k centrálnímu atomu ukotveny třemi vazbami, chelatační ligandy dvěma a odstupující chloridový ligand pak jednou vazbou, čímž je zcela vyplněné celkové koordinační číslo komplexu. V následujícím textu je podrobněji pojednáno o obecných vlastnostech jednotlivých ligandů a jejich vlivu na výsledné biologicko-chemické vlastnosti.



**OBRÁZEK Č. 13:** Obecné schéma struktur Ir<sup>III</sup> komplexů s pseudo-oktahedrání geometrií.  
(kresleno v ChemSketch 12.01 dle ACS)

### Stabilizující ligand a jeho modifikace

Pro zajištění stability Ir<sup>III</sup> komplexů se jako nejvhodnější jeví právě negativně nabitý pentametyl cyklopentadienylový (Cp<sup>x</sup>) ligand. [54] Navíc je možné ke stabilizujícímu ligandu kovalentně navázat i další arenové jednotky (Cp<sup>xph</sup> fenyl, Cp<sup>xbiph</sup> bifenyl atd.), které mají prokazatelný vliv při interakcích s bázemi DNA. [59] Při narůstajícím počtu arenových jednotek podněcují nekovalentní interakce, v případě DNA interkalaci. Ovlivňují také rychlost hydrolyzy samotného odstupujícího ligandu. Poločas a míra hydrolyzy chloridového ligandu klesá ve směru Cp<sup>xbiph</sup> > Cp<sup>xph</sup> > Cp<sup>x</sup>. [59]

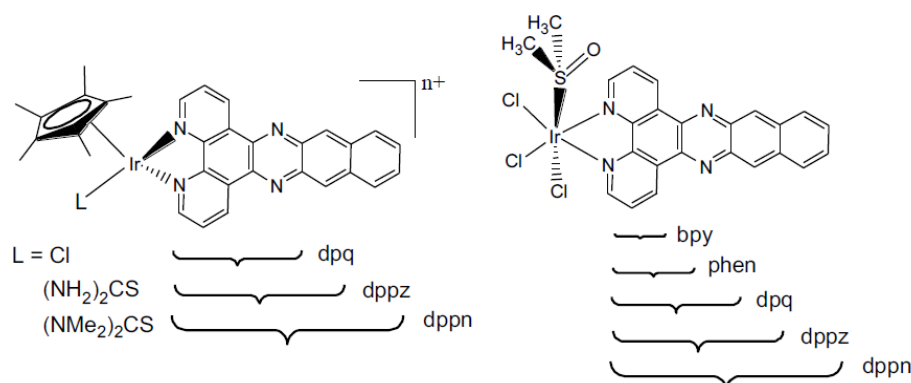
V neposlední řadě pak narůstající počet arenových ligandů zvyšuje lipofilitu komplexu, a tím pomáhá zvyšovat míru akumulace daného komplexu v buňkách či tkáni. Bylo přímo prokázáno, že s každou přibývajícím substitucí stabilizujícího ligandu phenylem narůstá

účinnost v inhibici růstu nádorových buněk. [60] V konečném důsledku lze již s pomocí modifikace  $Cp^x$  ligandu dosáhnout poměrně tvárného systému s pestrou biologickou aktivitou a rozdílnými hydrolyzačními parametry.

### Chelatační ligandy

Ačkoliv pro užití a modifikaci stabilizujících ligandů se v literatuře objevuje pouze mírná variabilita užitých vzorů, s chelatačními ligandy je tomu právě naopak. Z literatury lze uvést desítky různých variant chelatačních ligandů ve spojení s centrálním iridiovým atomem. Obecně lze však jednotlivé možnosti generalizovat do následujících skupin dle vazby na centrální atom, jsou to buď N/N, N/O či C/N vázající se ligandy. [59] [60] [61]

Chelatační ligandy obecně přispívají k navýšení stability vytvořených komplexů a mají vliv na elektrochemické parametry centrálního atomu. Je také známo, že se největší měrou podílejí na celkové specifitě komplexu při reakcích s bázemi DNA [59] a mají mimořádný vliv na výslednou cytotoxicitu. K iridiovému centrálnímu atomu jsou kotveny dvěma kovalentními vazbami. Na příkladu N, N vázaných chelatačních ligandů (viz obrázek č. 14) byl prokázán zvyšující se antiproliferativní účinek s přibývajícimi heterocykly chelatačního ligandu, tedy  $bpy < phen, dpq < dppy < dppn$ . Jedním z vysvětlení je zvyšující se stabilita interkalovaného komplexu v DNA s narůstající plochou chelatačního ligandu. [62]



**OBRÁZEK Č. 14:**  $Ir^{III}$  komplexy s N, N chelatačními polypyridylovými ligandy. [62] [63]

### Strukturně aktivní vztahy

Vzájemný vztah mezi strukturou a protinádorovou aktivitou, z literatury známé také jako tzv. „Structure Activity Relationships“ (SAR), představuje možnou cestu k úspěšnému, cílenému a zejména pak racionálnímu návrhu léčiv. U komplexů s centrálním iridiovým atomem v oxidačním stavu +III jsou již patrné vztahy mezi strukturou komplexu a jeho reálnou protinádorovou aktivitou. [64]

Při studiu vzájemných strukturně aktivních modelů a experimentech na buněčné úrovni je možné pozorovat významný rozdíl v protinádorové aktivitě při použití různých chelatačních ligandů, kde komplex s fenantrolinem lze označit jako zcela neaktivní, a naproti tomu komplex s benzochinolinem vykazoval hodnoty cytotoxicity v nízkých mikromolárních koncentracích. Toto však platí pouze v případě, že stabilizující  $Cp^x$  ligand není již jinak modifikován. Po modifikaci  $Cp^x$  ligandu bifenylyem,  $Cp^{xbiph}$ , byla protinádorová aktivita obnovena na úroveň komplexů s chelatačním benzochinolinovým ligandem. [61]

#### 1.4 RUTHENIOVÉ KOMPLEXY V KLINICKÉM TESTOVÁNÍ

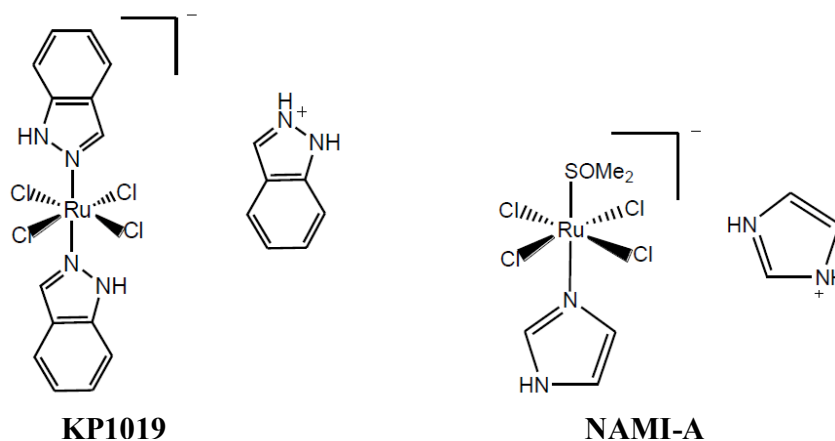
Rutheniové komplexy se staly dalšími vhodnými kandidáty k léčbě nádorových onemocnění. Celá řada syntetizovaných látek vykazovala velmi dobré výsledky při schopnosti inhibovat růst nádorových buněk a dva komplexy s centrálním atomem ruthenia v oxidačním stavu +III se dostaly až do fáze klinických studií. Jsou jimi KP1019 [*trans*-RuCl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>][IndH], kde Ind jsou indazolové neboli benzpyrazolové ligandy a NAMI-A [*trans*-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Im)][ImH], kde DMSO je dimethylsulfoxidový a Im je imidazolový ligand. (viz obrázek č. 15)

Molekulárně biologické experimenty provedené na KP1019 poukazují na možnost vazby tohoto farmaka k transferinu v krevní plasmě a jeho následný přenos do nitra buněk transferinovou, tedy endocytotickou cestou. Apoptóza je u tohoto komplexu spouštěna již při aplikaci sub-toxické dávky a je řízena vnitřní (mitochondriální) dráhou. Klinické studie prokázaly dobrou aktivitu KP1019 vůči nádorům tlustého střeva a byla pozorována výjimečná snášenlivost pacienty s minimem nežádoucích účinků.

NAMI-A („New Anti-tumour Metastasis Inhibitor“), jak již z názvu vyplývá je farmakem aktivním vůči metastázám, zejména vyskytujícím se v plicní tkáni. Z 24 pacientů zahrnutých v klinických studiích 83% vykazovalo na danou léčbu odezvu a u pacienta s pokročilým stádiem nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) došlo ke stabilizaci onemocnění. Benefitem NAMI-A se stala právě selektivita vůči metastázám, která převládá nad obecně toxickými vlastnosti, které jsou typické pro většinu současných platných cytostatik. Selektivita vůči plicní tkáni je mimo jiné dána extracelulární přítomností kolagenu IV, na který se NAMI-A váže a je takto selektivně vychytáváno právě v plicní tkáni. Tímto mechanismem dochází k prodloužení kontaktu s cílovým místem a eliminuje se pravděpodobnost odplavování krevním řečištěm s následnou detoxifikací ledvinami. [65]

Velmi obecné zdůvodnění selektivních vlastností rutheniových komplexů vychází z předpokladu, že centrální atom ruthenia v oxidačním stavu +III je více inertní vůči hydrolyze chloridových ligandů oproti redukované formě. Nádorové buňky pak mají obecně „redukčnější“ charakter vnitřního prostředí a tím nepřímo podporují aktivaci rutheniových komplexů redukcí kovového centra následovanou hydratací odstupujících chloridových ligandů. [66] Komplexy s centrálním atomem ruthenia by mohly být dobrou alternativou

v terapii nádorových onemocnění ze dvou důvodů, kde prvním je dobrá snášenlivost pacienty a tím druhým je selektivita vůči specifickým typům malignit. Níže vyobrazené látky představují první řadu rutheniových komplexů tohoto druhu a lze předpokládat, že dalším vývojem, který bude vycházet z úspěchů první řady, se dospěje k ještě účinnějším farmakům, které se zařadí na seznam látek používaných k léčbě nádorových onemocnění. [67]



**OBRÁZEK Č. 15:** Struktury protinádorově aktivních rutheniových komplexů, které vstoupily do klinických studií. (kresleno v ChemSketch 12.01 dle ACS)

Na okraj lze ještě zmínit další protinádorově aktivní komplexy, které byly připraveny skupinou prof. Sadlera, jako například aren-diaminový komplex RM175, [68] či skupinou prof. Dysona, fosfor-adamantanový rutheniový komplex RAPTA-C. [69] Zprávy z klinického testování těchto látek jsou již dlouhou dobu očekávány.



## 1.5 TRANSPORT PROTINÁDOROVĚ ÚČINNÝCH KOMPLEXŮ KOVŮ

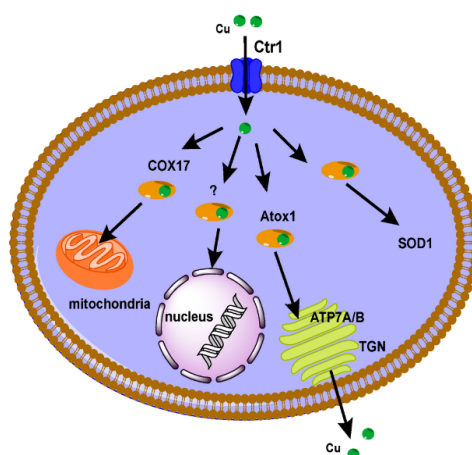
Mechanismy, kterými se protinádorově účinná metalofarmaka transportují do nitra buněk, byly středem pozornosti již od samotného prvotního výzkumu vedeného na cisplatině, kde se předpokládal majoritní příspěvek k celkové akumulaci léčiva především pomocí pasivní difuze skrze membránu. Je zřejmé, že malá neutrální molekula jakou je i cisplatina, nemusí využívat při svém průchodu skrze cytoplasmatickou membránu aktivního transportu. [70] Nově syntetizované komplexy s rafinovanou 3D strukturou, objemnými ligandy, či dokonce ne-neutrálního charakteru již zcela jistě musejí při svém transportu využívat aktivních nebo alespoň rafinovanějších mechanismů vedoucích jak k akumulaci, tak k detoxikaci. Výsledkem činnosti zmíněných dvou protichůdných procesů je získání celkové efektivní koncentrace dané látky uvnitř buňky, která zcela zásadním způsobem ovlivňuje účinnost cytostatik.

Do současné doby se převážná většina studií zabývala interakcemi protinádorově účinných komplexů kovů se sérovými proteiny jako například albumin či transferin, které jsou nedílným článkem v transportu těchto látek krevním řečištěm. Nelze však opomenout ani roli metalothioneinů, malých intracelulárních proteinů bohatých na cystein, jež jsou zapojeny v ukládání a detoxifikaci kovů. Z dosavadního poznání vyplývá, že právě interakce s proteiny hraje klíčovou roli v biodistribuci, buněčné akumulaci, obecném farmakologickém profilu cytostatik [71] a v neposlední řadě také při senzitivitě a případné rezistenci jednotlivých nádorů. [72] Výzkumy v oblasti membránové biologie odhalily existenci více než 400 jednotlivých membránových transportních proteinů, které jsou organizovány do dvou základních superrodin: tzv. ABC (ATP binding cassette) a SLC (solute carrier) transportéry. [73] Při vývoji léčiv a studiu farmakologických parametrů se pozornost upírá zejména na spektrum transportních proteinů, které jsou zastoupeny ve střevech, játrech a ledvinách, tedy v orgánech kde probíhá buď samotná absorpce, metabolizace, či detoxifikace léčiv. U komplexů na bázi přechodných kovů se předpokládá účast transportérů měďnatých iontů (Ctrs), organických kationtů (OCTs), a v menší míře i dalších proteinů ze skupiny SLC a ABC. [74]

### 1.5.1 TRANSPORTÉRY KATIONTŮ MĚDI

Měď je velmi důležitým prvkem v organismu, podílející se například na detoxifikaci volných radikálů, mitochondriální respiraci a také je kofaktorem mnoha enzymů. Na udržování homeostázy se podílejí transportéry mědi, které jsou dle sekvence aminokyselin v klasifikačním systému zařazeny do rodiny SLC31A. [75] Vzhledem k tomu, že kationty mědi  $\text{Cu}^+$  velmi ochotně reagují s molekulárním kyslíkem za tvorby kyslíkových radikálů, je v buňce vyvinut sofistikovaný systém hospodaření s mědí. (viz obrázek č. 16) Měď prochází do nitra buňky skrze lidský Cu transportér (hCtr1), odkud je předáván kaskádou specifických chaperonů jako je antioxidační protein 1 (Atox1), chaperon pro superoxid dismutázu (CCS) a homolog pro cytochrom c oxidázu (COX-17), aby byl doručen až do cílové organely či k cílovému enzymu. Pro udržení zmíněné homeostázy je ale také nutné zajistit exkreci mědi, která probíhá pomocí ATP-áz ATP1A a ATP1B, lokalizovaných v Golgiho aparátu. (obrázek č. 16) [76] U vezikulárních buněčných organel, jako jsou endosomy a lysosomy byl také identifikován homolog lidského Cu transportéru (Ctr2), o jehož přesném zapojení v popisované kaskádě nejsou žádné informace. [77]

Popsaný mechanismus hospodaření s mědí je i jedním z uznávaných procesů, které se podílejí na transportu platnatých chemoterapeutik. [78] Při experimentech, kdy byla navozena zvýšená exprese hCtr1 docházelo k výrazné senzitivizaci malobuněčných plicních nádorových buněk (SCLC) a byl pozorován i markantní nárůst akumulace cisplatiny, oxaliplatiny i karboplatiny. Naproti tomu při zvýšené expresi ATP7A/B byly buňky takřka rezistentní. [79]



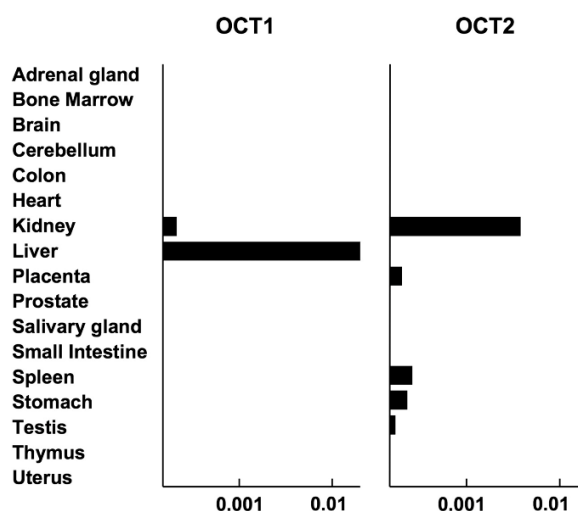
**Obrázek č. 16:** Obecné schéma mechanismu transportu mědi, sloužící k popisu transportu zejména platnatých citostatik. [76] Přenos dovnitř probíhá pomocí Ctr1, uvnitř buňky jsou molekuly např. cisplatinu distribuovány specifickými chaperonovými proteiny jako je Atox1 a dále vyloučeny do extracelulárního prostoru díky Golgiho aparátu a ATP-ázovým pumpám ATP7A/B.

### 1.5.2 TRANSPORTÉRY ORGANICKÝCH KATIONTŮ

Transportéry organických kationtů patří do rodiny SLC22A, jež se sestává ze tří podkategorií dělených na základě náboje transportéru. Konkrétně se jedná o skupinu elektrogenních transportérů (OCT1-3), elektroneutrální organické kationtové/kamitinové transportéry (OCTN1-3) a organické aniontové transportéry (OATs, URAT-1). Většina substrátů pro OCT je kladně nabitých při fyziologickém pH a hnací silou je elektrochemický gradient. Zdánlivou nevýhodou je výrazná polyspecifičnost přenosu. Převážná většina proteinů z rodiny SLC22A vykazuje vysokou druhovou a tkáňovou specificitu, s hlavním výskytem v sekrečních orgánech, kde je jejich činnost neodmyslitelně spjata s absorpcí a sekrecí léčiv obecně. [73]

Při studiu příčin vzniku nefrotoxicity po podání cisplatinu byla podpořena role OCT v transportu tohoto léčiva. Důkazem využití OCT při akumulaci cisplatinu byly kompetiční experimenty se známými substráty pro OCT jako je tetraethylamoniak (TEA) a cimetidin. Majoritní zastoupení hOCT2 je popsáno v proximálních tubulech ledvin a hOCT1 v jaterní tkáni, čímž se vysvětlují orgánově selektivní nežádoucí účinky (viz obrázek č. 17). [80]

Možnou cestou v potlačení nežádoucích efektů je podávání specifických inhibitorů konkrétních transportérů, které se vyskytují zejména v poškozované tkáni a nikterak neovlivňují výsledný protinádorový efekt. V konečném důsledku takováto podpůrná medikace vede k výrazně lepší snášenlivosti terapie. [81]

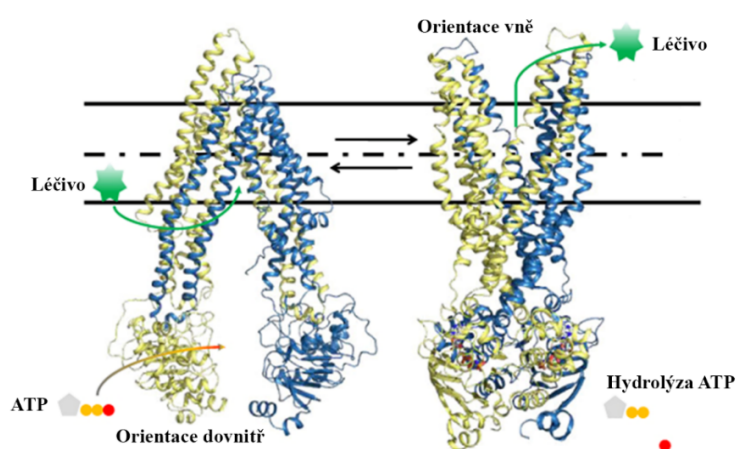


**OBRÁZEK Č. 17:** Expresní profil transportérů organických kationtů (OCT1/2) v různých tkáních. Úroveň m-RNA je vyjádřena poměrově vůči glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáze. Převzato z [82] a upraveno.

### 1.5.3 DETOXIFIKAČNÍ MECHANISMY

Mimo výše zmíněných ATP-ázových pump Golgiho aparátu (ATP7A/B), zahrnutých ve stati týkající se transportérů mědi, se na detoxifikačních mechanismech podílejí i další membránové proteiny. Často zmiňovaným proteinem ze superrodiny ABC transportérů, který je uváděn v souvislosti s rezistencí vůči široké škále terapeutik, je P-glykoprotein (p-gp), známý též jako „multidrug transporter“. Je produktem genu MDR1 a jedním ze 48 známých ABC transportérů. Výskyt P-gp zahrnuje širokou škálu nádorových tkání počínaje nádory gastrointestinálního traktu, pohlavního systému či močových cest a také hematopoetických onemocnění. Mezi substráty aktivně transportované P-gp patří zejména velké, amfipatické, neutrální ale i pozitivně nabitě molekuly. Mezi chemoterapeutika, která jsou exportována vně buňku skrze P-gp patří doxorubicin, daunorubicin, vicristin, vinblastin, taxoly, [83] rutheniový komplex KP1019 [84] a také mnoho dalších látek například ke

snížení cholesterolu, antiarytmika a antihistaminika. Vazba jakéhokoli vhodného substrátu způsobuje aktivaci jedné ze dvou ATP-vázajících domén. Po vazbě a následné hydrolýze ATP dochází k rozsáhlým konformačním změnám ve struktuře proteinu, které v konečném důsledku transportují navázané léčivo vně buňku. K tomu, aby se P-gp vrátil do výchozí polohy je zapotřebí opětovná vazba a hydrolýza ATP, a tím se celý cyklus opakuje. Struktura p-gp v obou konformacích je znázorněna na *obrázku č. 18*. Aktivní vývoj účinných inhibitorů představuje možnou cestu při snaze zvrátit rezistenci buněk způsobenou transportem léčiv právě skrze P-gp.



**OBRÁZEK Č. 18:** Struktura P-glykoproteinu ve dvou konformacích. Konformace dovnitř převzata z [85], konformace vně viz [86]. Vzájemný přechod mezi konformacemi probíhá vždy po hydrolýze ATP, která následně umožní strukturní změnu vedoucí k samotnému exportu léčiva.

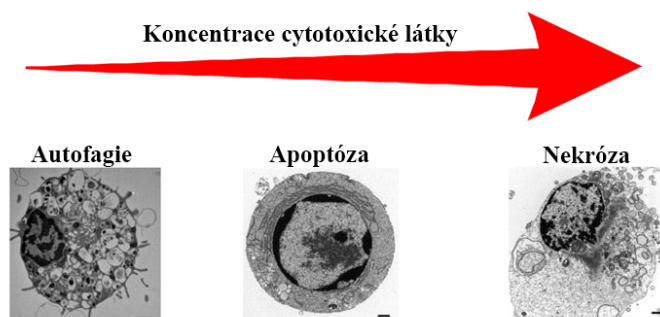
Po objevu funkce P-gp a demonstraci širokého spektra nádorových tkání kde je exprimován, bylo poukázáno na fakt, že ne ve všech typech nádorů, které však jsou rezistentní, je P-gp exprimován v takové míře, která by mohla být za zmíněnou rezistenci zodpovědná. Detailním studiem „multidrug-rezistentní“ linie nádoru plic byl objeven další protein podílející se na rezistenci vůči nejrůznějším chemoterapeutikům u zmíněné linie. [87] Byl jím další protein ze skupiny ABC transportérů, nyní známý jako MRP1 (multidrug resistance associated protein 1), kódovaný genem ABCC1. Na rozdíl od P-gp, patří mezi atraktivní substráty pro MRP1 negativně nabitě molekuly, či konjugáty komplexů kovů

s glutathionem. Proces exkrece vně buňku skrze MRP1 byl popsán například pro ko-transport vinblastinu s glutathionem. [88] V případě cisplatinu byl pozorován také přenos prostřednictvím MRP transportérů ve formě konjugátu s glutathionem [Pt(GS)<sub>2</sub>], chelatace cisplatinu je zprostředkována především sírou, popřípadě dusíkovými jednotkami glutathionu. [89]

Posledními ze skupiny ABC transportérů, spojované s rezistencí vůči mitoxantronu a antracyklinům, jsou proteiny MXR, BCRP a ABC-P. U těchto proteinů se vyskytuje pouze jedna ATP-vázací doména, avšak stále fungují jako dimer. U proteinu MXR se navíc předpokládá velmi úzká substrátová specifita. Některé studie hovoří také o účasti proteinu SPGP (sister of P-gp) [90] a ABCA2 [91] v mechanismech buněčné rezistence vůči cystostatikům. Tato data však vycházejí pouze z prvotních studií a jejich relevance tak bude postupem času prokazována.

## 1.6 BUNĚČNÁ SMRT JAKO CÍL PRO CYTOSTATIKA

Kontrolovaný způsob buněčné smrti hraje velmi důležitou roli v biologii všech organismů. Disbalance v konečném stádiu života buňky mívá za následek rozvoj nejrůznějších patologických stavů, jako jsou autoimunitní choroby, neurodegenerativní onemocnění a v neposlední řadě i rakovina. Obecně lze buněčnou smrt rozdělit na pasivní a aktivní. Pasivní buněčná smrt je odpovědí na nadměrné, zpravidla mechanické, či fyzikálně-chemické poškození. Aktivní buněčná smrt je iniciována ze strany samotné buňky. Nekrotický způsob smrti jako prosté selhání životaschopnosti buňky v reakci na toxické či neúnosné podmínky pak tvořil zcela základní představu, jakou smrt buňky probíhá. [92] Z obrázku č. 19 je patrná závislost druhu buněčné smrti na koncentraci léčiva či toxických látek. Zavedením nového modelu programované buněčné smrti (PCD, apoptózy) se rozvinula velmi složitá problematika, kde hlavním úkolem bylo, a stále je, identifikovat procesy iniciující a vykonávající smrt buňky. Poruchy v kaskádách biochemických procesů zpravidla tvoří charakteristický rozdíl mezi zdravou a nádorovou buňkou a jako takové jsou vhodným cílem pro cytostatika. Už jen samotné porozumění molekulární podstaty buněčné smrti odkrývá nové možnosti k racionálnímu návrhu léčiv a také k objasnění mechanismů vedoucím ke vzniku nádorových onemocnění.



**OBRÁZEK Č. 19:** Závislost mechanismu buněčné smrti na aplikovaném množství cytotoxických látek. Obecně lze předpokládat, že při aplikaci nižších dávek bude buněčná smrt probíhat skrze autofagii či apoptózu, vyšší dávky pak vyvolají nekrózu. Měřítka odpovídá 1  $\mu\text{m}$ . Převzato z [93] a upraveno.

### 1.6.1 APOPTÓZA

Během posledních dvaceti let se znalost v oblasti signálních drah, které mají vliv na regulaci buněčné smrti, značně rozšířila. Převážná většina protinádorově účinných chemoterapeutik indukuje apoptózu, což bylo prokázáno při léčbě leukémií trpících pacientů analýzou buněk periferní krve. [94] Apoptóza se tedy stala jedním z determinantů ovlivňujících citlivost či rezistenci nádorových buněk vůči aplikované léčbě. Dvě stěžejní dráhy představují pojitko mezi stimulací buněčné smrti a cytostatiky. Jsou jimi vnitřní, tzv. mitochondriální dráha, spouštěná uvolňováním proapoptotických molekul, která je kontrolována skupinou proteinů Bcl-2. A dále vnější dráha řízená receptory z rodiny TNF (tumor necrosis factor).

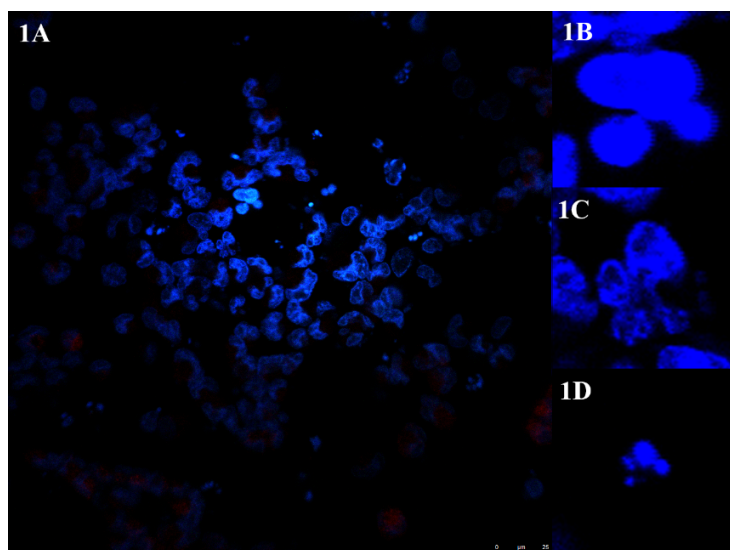
#### 1.6.1.1 ZMĚNY BUNĚČNÉ MORFOLOGIE V PRŮBĚHU APOPTÓZY

Průběh apoptózy může být zaznamenán již pouhým pozorováním morfologie buňky pod světelným či elektronovým mikroskopem. Znalost změněných morfologických jevů je užitečným a časově nikterak náročným experimentem, který však může poskytnout velmi užitečné informace o účincích cytotoxických látek na buňky. Společné morfologické rysy během apoptózy se projevují jak na jaderné, tak i cytoplasmatické, popřípadě membránové úrovni a jsou prakticky identické pro nejrůznější tkáně. [95] Vzájemné rozdíly v průběhu apoptózy se projevují zejména rozdílným časovým trváním, způsobem iniciace a konečně dráhou, jakou tento druh buněčné smrti probíhá. [96] Morfologické změny jsou velmi dobře patrné z *obrázku č. 20*.

Na jaderné úrovni lze pozorovat kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra, což se obecně projevuje jako celková redukce objemu jádra buňky (pyknóza), na membránové úrovni zatažením pseudopodií. [97] Kondenzace chromatinu postupuje směrem od okrajů jaderné membrány a vyúsťuje v jadernou fragmentaci (karyorhexe). [98]

V pozdějších stádiích apoptózy lze pozorovat různě velké vychlípeniny cytoplasmatické membrány (blebbing) a ztrátu membránové integrity. V konečné fázi se buňka zcela rozpadá a formuje apoptotická tělíska (apoptotic bodies). Na organismální úrovni je možné pozorovat obklopení apoptotické buňky fagocyty. [99]





**OBRÁZEK Č. 20:** Morfologické změny buňky jako důsledek apoptózy. 1A - obrázek obecného souboru buněk ovariálního karcinomu, 1 B – jaderná kondenzace (pyknóza), 1 C – počátek jaderné fragmentace (karyorhexe), 1 D – formace apoptotických tělísek. [100]

#### 1.6.1.2 VNĚJŠÍ DRÁHA ZPROSTŘEDKOVANÁ RECEPTORY BUNĚČNÉ SMRTI

Jak již samotný název této kapitoly napovídá, dráha vedoucí k apoptotickému průběhu smrti je v tomto případě spouštěna po vazbě specifických ligandů k receptorům buněčné smrti. Již byla identifikována řada receptorů, z nichž nejznámější je TNF typu 1 (TNFR1). Od něho jsou odvozeny i další receptory, jako například Fas, DR3, DR4 a DR5. Na počátku kaskády reakcí stojí vazba ligandů k daným receptorům, které vlivem vytvořené vazby oligomerizují. Tím dochází k vytvoření vazebného místa pro adaptorové proteiny na vnitřní straně cytoplasmatické membrány a aktivaci kaspázové kaskády (cystein proteázy). [101] Konkrétně receptory buněčné smrti TNF obsahují intracelulární doménu TRADD a Fas receptory pak intracelulární doménu FADD. [102] Po již zmíněné oligomerizaci dochází k vytvoření komplexu ligand-receptor-adaptorový protein, který je znám pod názvem DISC (death-inducing signalling complex). [103] DISC poté iniciuje aktivaci pro-kaspázy 8 na kaspázu 8, která spouští samotnou kaspázovou kaskádu tím, že odštěpí z dalších „podřízených“ kaspáz prodoménu udržující kaspázy v neaktivním stavu. Celá kaskáda reakcí dojde až k samotným vykonávajícím (exekučním) kaspázám (2, 3, 8). [99]

### 1.6.1.3 VNITŘNÍ DRÁHY APOPTÓZY

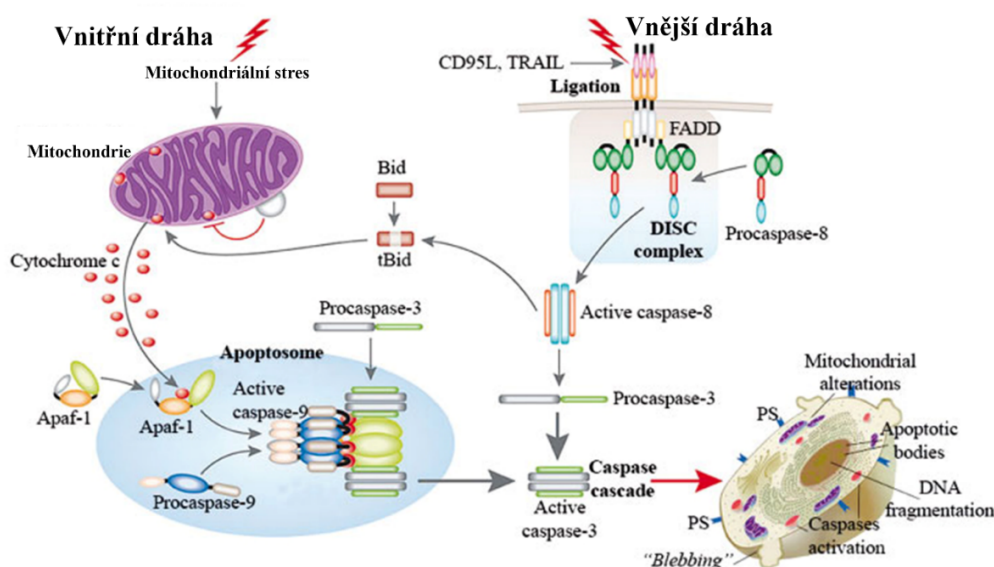
Tento mechanismus řízení apoptózy vychází čistě z nitra buňky a samotnými iniciátory se mohou stát neopravitelná poškození genetického aparátu, hypoxie, extrémně vysoké koncentrace cytosolárních vápenatých iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a také oxidativní stres. Veškeré tyto stimuly vyústí ve zvýšenou permeabilitu mitochondriální membrány, čímž je umožněno uvolnění pro-apoptotických molekul z nitra mitochondrií do cytosolárního prostoru. [104] Za regulaci vnitřní mitochondriální dráhy jsou přímo zodpovědné proteiny z rodiny Bcl-2. Celá rodina Bcl-2 zahrnuje jak pro-apoptotické proteiny, jako například (Bax, Bak, Bad, Bcl-X<sub>s</sub>, Bid, Bik, Bim a Hrk), tak i anti-apoptotické proteiny (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Bfl-1 a Mcl-1). [105] Rovnováha je řízena tak, že skupina anti-apoptotických proteinů reguluje vypouštění cytochromu-c mitochondriemi do cytosolárního prostoru a pro-apoptotické proteiny naopak stimulují tuto exkreci. Celé řízení, či případné spuštění apoptózy je výsledkem jemné rovnováhy mezi těmito dvěma skupinami proteinů z rodiny Bcl-2. Dalšími faktory, které ovlivňují spuštění apoptózy jsou AIF (apoptosis inducing factor), Smac (second mitochondria-derived activator of caspase), DIABLO protein (direct IAP binding protein with low pI) a HtrA2 (Omi/high temperature requirement protein A). [106] Funkce těchto nedávno objevených proteinů spočívá ve vazbě Smac/DIABLO nebo Omi/HtrA2 k AIP proteinům (inhibitor of apoptosis protein), což vede k narušení interakce mezi kaspázami 3 nebo 9 právě s IAP. Kaskáda spouštěná vlivem vypouštění cytochromu c z mitochondriální matrix je charakteristická tvorbou apoptosomu, tedy komplexu sestávajícího z cytochromu c, Apaf-1 a kaspázy 9. [107]

Méně známá je vnitřní dráha spouštěná po poškození endoplasmatického retikula, v jehož důsledku dochází ke snížení proteosyntézy či chybnému sbalování proteinů (folding). Do současné doby uznávaný mechanismus je založen na předpokladu disociace TRAF2 (TNF receptor associated factor 2) z komplexu s prokaspázou 12, což vede k její aktivaci a následnému spuštění společné dráhy apoptózy. [108]

### 1.6.1.4 SPOLEČNÁ DRÁHA APOPTÓZY - KONEČNÉ STÁDIUM

Pro vnitřní i vnější řízení společná, tzv. exekuční fáze apoptózy, zahrnuje aktivaci série kaspáz, které jsou přímo štěpeny buď iniciační kaspázou 8 (původem z vnější dráhy), nebo kaspázou 9 (z vnitřní dráhy). Následně neohledě na předchozí mechanismy spuštění dochází

ke štěpení kaspázy 3, která působí vůči kaspázou-aktivovaným deoxyribonukleázám, proteinovým kinázám, cytoskeletálním proteinům a v neposlední řadě také DNA reparačním proteinům. Veškeré tyto změny ovlivňují buněčný cyklus, celou řadu signálních kaskád nezbytně nutných k biochemické rovnováze buňky a také ke zhroucení cytoskeletu. [109] Vše vyústí v typické morfologické změny, které jsou charakteristické právě pro apoptózu. *Obrázek č. 21* ilustruje molekulární mechanismy apoptózy. [99]



**OBRÁZEK Č. 21:** Kompletní schéma apoptózy spouštěné vnější i vnitřní dráhou. Převzato z [110] a upraveno.

### 1.6.1.5 VYÚSTĚNÍ ZNALOSTI MOLEKULÁRNÍCH MECHANISMŮ APOPTÓZY – NÁVRH LÉČIV

Na základě předchozích několika odstavců, týkajících se řízení apoptotické kaskády, se lze domnívat, že takto komplexní mechanismus, jakým bezesporu apoptóza je, poskytuje řadu možností, jakým způsobem cílit nová terapeutika. Terapeutika jsou navrhována s cílem zasáhnout selektivně do drah, jež jsou v případě nádorového onemocnění disbalancovány, a podnítit směřování buňky do apoptotického průběhu buněčné smrti. Hlubší studium jednotlivých přístupů však zcela přesahuje rámec daného textu, tudíž jsou zde jednotlivé vědecké výzkumy shrnuty pouze formou odkazů na nejnovější literaturu. Cílení terapeutik vůči skupině proteinů Bcl-2, [111] p53 farmakologická terapie, [112] zásah do proteinů inhibujících apoptózu (AIPS) [113] či terapeutika ovlivňující samotnou kaspázovou kaskádu [114] představují nový a velmi slibný přístup v terapii nádorových onemocnění.

## 2 CÍLE PRÁCE

- Shrnutí poznatků o dosavadním vývoji problematiky týkající se tématu disertační práce
- Provedení specifických testů na buněčné úrovni vedoucí k objasnění mechanismu působení nových farmak s centrálním atomem platiny, iridia či ruthenia; studovat cytotoxické profily nových komplexů na maligních i nemaligních buněčných liniích
- Zaměřit se na mechanismus transportu nových iridiových komplexů do buněk
- Studovat mechanismus působení a objasnit druh buněčné smrti pro protinádorově aktivní iridiový komplex
- Studovat epigenetické změny v buňkách, které jsou vyvolány po působení platičitých komplexů s biologicky aktivními ligandy
- Provést *in vivo* experimenty s klinicky testovaným ruthenioým komplexem, identifikovat biologicky aktivní formu dané látky
- Zapojit se do řešení souvisejících projektů řešených na katedře biofyziky PřF UP v Olomouci a na BFÚ AV ČR v Brně

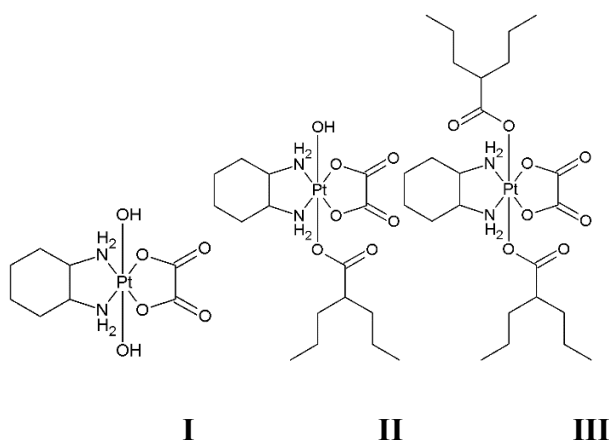
### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 POUŽITÉ KOMPLEXY

Zásobní roztoky platnatých, platičitých, iridiových a rutheniových komplexů studovaných v rámci této práce byly rozpouštěny prioritně ve vodných roztocích. Z chemického hlediska ve vodě velmi obtížně rozpustné komplexy byly rozpouštěny v DMSO (dimethylsulfoxid) či v DMF (dimethylformamid). Koncentrace připravených roztoků byly stanoveny pomocí s FAAS (Varian AA240Z s grafitovou atomizační celou GTA120).

##### 3.1.1 PLATIČITÉ KOMPLEXY S VALPROÁTY V POZICI AXIÁLNÍCH LIGANDŮ

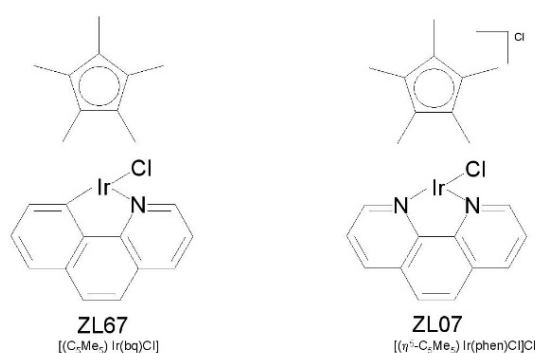
Rozpustnost platičitých komplexů s jednou či dvěma valproovými kyselinami v pozici axiálních ligandů byla omezena pouze na použití DMF. Komplexy byly rozpouštěny zpravidla na maximální možnou rozpustnost, tedy 25 mM, a dále použity při konkrétních experimentech. Skladování zásobních roztoků probíhalo maximálně po dobu 14 dní za pokojové teploty a ve tmě. Naproti tomu platičitý komplex oxaliplatiny s OH skupinami v pozici axiálních ligandů byly ve vodě rozpustné až na koncentraci 10 mM, jejich skladování probíhalo stejně jako v předešlém případě. Platičité komplexy byly syntetizovány zahraničním pracovištěm pod vedením prof. Gibsona, *Institute for Drug Research, School of Pharmacy, The Hebrew University, Jerusalem, Israel*.



**OBRÁZEK Č. 22:** Struktury platnatých a platičitých komplexů použitých v dané práci. [Pt(DACH)(OH)<sub>2</sub>(ox)] (**I**), [Pt(DACH)(OH)(VPA)(ox)] (**II**), [Pt(DACH)(VPA)<sub>2</sub>(ox)] (**III**), kde DACH = trans-(1R,2R)-1,2-cyclohexandiamin a ox = oxalát.

### 3.1.2 IRIDIOVÉ KOMPLEXY – STUDIUM BUNĚČNÉ AKUMULACE KOMPLEXŮ KOVŮ

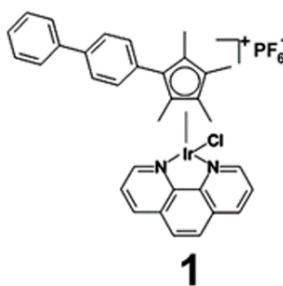
Komplexy použité ke studiu buněčné akumulace protinádorově účinných komplexů kovů byly rozpouštěny v DMSO na koncentraci 5 mM, a takto připravené byly okamžitě distribuovány do připravených experimentálních procedur. V této práci se konkrétně jednalo o komplex ZL67 (v publikaci jako komplex 1)  $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{bq})\text{Cl}]$ , který obsahoval 7, 8-benzochinolinový a komplex ZL07 (v publikaci jako komplex 2)  $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{phen})\text{Cl}]$  s 1,10-fenantrolinovým ligandem. Komplex byl syntetizován pracovní skupinou prof. Sadlera, *University of Warwick, Department of Chemistry, Warwick*.



**OBRÁZEK Č. 23:** Struktury iridiových komplexů použité při studiu buněčné akumulace. Komplex 1 (ZL67)  $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{bq})\text{Cl}]$  obsahoval 7, 8-benzochinolinový a komplex 2 (ZL07)  $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{phen})\text{Cl}]$  1,10-fenantrolinový ligand.

### 3.1.3 IRIDIOVÝ KOMPLEX – STUDIUM DUÁLNÍHO MECHANISMU BUNĚČNÉ SMRTI

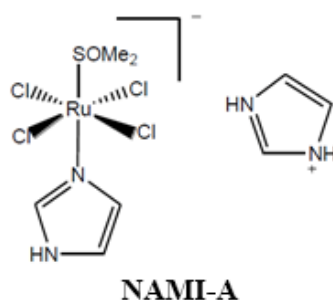
Iridiový komplex použitý ke studiu mechanismů buněčné smrti byl rozpouštěn v DMSO na koncentraci 5 mM, a takto připravený byl okamžitě používán v připravených experimentech. Jednalo se o komplex  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ , kde phen=phenanthroline. Zmíněný iridiový komplex byl syntetizován pracovní skupinou prof. Sadlera, *University of Warwick, Department of Chemistry, Warwick*. Syntéza probíhala dle již publikovaného postupu [59].



**OBRÁZEK Č. 24:** Struktura komplexu  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ . Komplex byl použit ke studiu mechanismu buněčné smrti, u něhož byl prokázán duální efekt.

### 3.1.4 RUTHENIOVÝ KOMPLEX NAMI-A

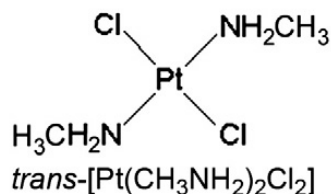
Rutheniový komplex NAMI-A („New Anti-tumour Metastasis Inhibitor“) byl rozpouštěn ve vodných roztocích, zpravidla PBS („Phosphate-buffered saline“) na koncentraci 10 mM. Vzhledem k rychlým hydratačním kinetikám tohoto komplexu byl po rozpuštění tento komplex okamžitě používán v připravených experimentech. Komplex byl syntetizován společností Serichim (Torviscosa, Italy).



**OBRÁZEK Č. 25:** Struktura rutheniového komplexu v klinickém testování NAMI-A (trans-imidazol(dimethylsulfoxid)tetrachloro-ruthenium). [115]

### 3.1.5 PLATNATÝ KOMPLEX S TRANS GEOMETRIÍ A METHYLAMINOVÝM LIGANDEM

Platnatý komplex  $\text{trans-[Pt(CH}_3\text{NH}_2)_2\text{Cl}_2]$  byl připravován jako vodný roztok (MQ) na koncentraci 3,5 mM. Jeho skladování probíhalo ve tmě při 4°C, po dobu maximálně jednoho týdne. Komplex byl syntetizován a charakterizován zahraničním pracovištěm pod vedením prof. Gibsona, *Institute for Drug Research, School of Pharmacy, The Hebrew University, Jerusalem, Israel*.

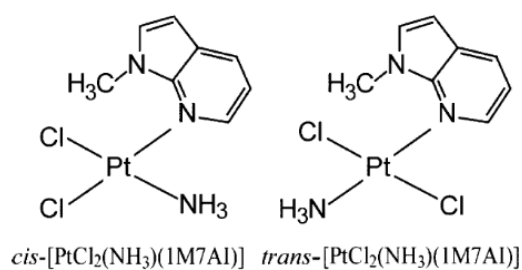


**OBRÁZEK Č. 26:** Trans platnatý komplex s aktivovanou trans geometrií, díky neobjemným methylaminovým ligandům. [28]



### 3.1.6 PLATNATÉ KOMPLEXY S CIS A TRANS GEOMETRIÍ A METHYLAZAINDOLOVÝM LIGANDEM

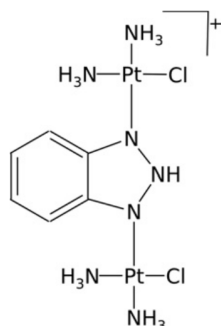
Komplex byl rozpouštěn v ethanolu popřípadě v DMF na koncentraci 5 mM. Syntéza a charakterizace daného komplexu byla provedena spolupracujícím zahraničním pracovištěm pod vedením prof. Natile, *Department of Chemistry, University of Bari "Aldo Moro", Bari, Italy*.



**Obrázek č. 27:** Struktury cis a trans platnatých komplexů s 1M7AI (1-methyl 7-azaindol) ligandem. Jmenovitě *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(1M7AI)] a *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(1M7AI)]. [25]

### 3.1.7 DINUKLEÁRNÍ PLATNATÝ KOMPLEX S BENZOTRIAZOLÁTOVÝM MŮSTKEM

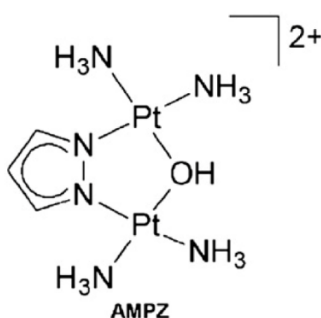
Zásobní roztok dinukleárního platnatého komplexu  $[\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-Btaz-H})]\text{Cl}$ , kde Btaz je benzotriazolátový můstek, byl připraven v chloristanu sodném na koncentraci 10 mM. Komplex byl syntetizován dle předem publikovaného postupu [116].



**OBRÁZEK Č. 28:** Struktura dinukleárního platnatého komplexu  $[\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-Btaz-H})]\text{Cl}$ .

### 3.1.8 DINUKLEÁRNÍ PLATNATÝ KOMPLEX S AZOLÁTOVÝM MŮSTKEM

Dinukleární platnatý komplex (AMPZ)  $[\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-pyrazolate})]^{2+}$ , kde jsou platinová centra spojena azolátovým můstkem byl rozpouštěn v chloristanu sodném na koncentraci 0,5 mM. Komplex byl připraven na zahraničním pracovišti pod vedením prof. S. Komedy, *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science, Suzuka, Japan*.



**OBRÁZEK Č. 29:** Struktura dinukleárního platnatého komplexu s azolátovým můstkem. Jmenovitě AMPZ  $[\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-pyrazolate})]^{2+}$ . [117]

### 3.2 CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Cisplatina (99,9%), dimethylsulfoxid (DMSO), oktanol (99%), 2-deoxy-D-glukóza ( $\geq 98\%$ ), oligomycin A (*Streptomyces diastatochromogenes*) lidský sérový albumin (99%), dihydrát chloridu měďnatého ( $\geq 99\%$ ), progesteron ( $\geq 99\%$ ), verapamil (5-[N-(3,4-dimethoxyphenylethyl)methylamino]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-isopropylvaleronitril hydrochlorid;  $\geq 99\%$ ), reversan (N-[3-(4-Morpholinyl)propyl]-5,7-diphenyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamid;  $\geq 99\%$ ), L-buthionine-sulfoximin (BSO,  $\geq 97\%$ ), methyl- $\beta$ -cyklodextrin, oubain oktahydrát, neutrální červeň, sulforhodamine B byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká Republika.

Agaróza, Nonidet NP-40, RNáza A a proteináza K byly zakoupeny u firmy Merck KGa, Darmstadt, Německo.

Sodium dodecyl sulfát (SDS) byly zakoupeny u firmy Serva, Heidelberg, Německo.

MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid) byl zakoupen u firmy Calbiochem (Darmstadt, Německo).

DNazol byl zakoupen u firmy MRC (Cincinnati, OH)

#### 3.2.1 BUNĚČNÉ LINIE

Lidské ovariální buňky A2780, senzitivní vůči cisplatině, lidské ovariální buňky se získanou rezistencí vůči cisplatině A2780cisR, vůči cisplatině přirozeně rezistentní buňky karcinomu prsu MCF7 a lidské leukemické buňky HL-60 byly poskytnuty pracovištěm prof. Kepplera z University of Vienna (Viedeň, Rakousko). Křeččí ovariální nemaligní buňky byly poskytnuty Dr. M. Piršelem z Cancer Research Institute, Slovak Academy of Sciences (Bratislava, Slovensko). Lidské primární kožní fibroblasty byly darovány prof. T. Adamem, Laboratory of Inherited Disorders, Department of Clinical Chemistry, Palacky University and Hospital (Olomouc, Česká republika). Lidské buňky střevního karcinomu s umlčeným genem pro p53 HCT-116 -/- a p53 wild tipe HCT-116 +/+ byly poskytnuty Dr. M. Brázdovou, Institute of Biophysics (Brno, Česká republika). Lidské ovariální buňky rezistentní vůči adriamycinu A2780Adr byly zakoupeny z Evropské banky pro buněčné kultury (ECACC; Salisbury, UK). Vysoce invazní buňky prsu MDA-MB-231 byly darovány od Dr. P. Spessotto (Aviano, Itálie).

### 3.3 METODY

#### 3.3.1 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT LOGP

Rozdělovací koeficient, neboli logP je velmi užitečným parametrem, pomocí něhož lze predikovat snadnost prostupu nově syntetizovaných komplexů do nitra buněk difuzí přes membránu. Obecně platí, že lipofilnější komplexy (kladný logP) pronikají skrze cytolasmatickou membránu snáze než hydrofilní komplexy (záporný logP). K určení rozdělovacího koeficientu je možné užít HLPC [118] stanovení, či jak bylo uděláno v tomto případě, tzv. „shake flask“ metodu. MQ vodou saturovaný 1-oktanol (WSO) a 1-oktanolem saturovaná MQ (OSW) byly připraveny vzájemným smícháním obou složek. Byl také přidán NaCl (0,2 M) k potlačení hydrolyzy odstupujících chloridových ligandů během stavení. Vzájemné smíchání složek proběhlo po 30-ti minutovém vortexování. Separace obou fází proběhla pomocí centrifugace (3000g, 5 min). V obou fázích byla pomocí FAAS stanovena koncentrace kovů, v závislosti na charakteru studovaného komplexu (Pt, Ir, Ru). Pro stanovení koeficientu bylo použito vzorce  $\log P = \log([X]_{WSO} / [X]_{OSW})$ , kde X je koncentrace kovu v dané frakci.

#### 3.3.2 KULTIVACE NÁDOROVÝCH A NENÁDOROVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ

Veškeré zásady práce s nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi vycházely z doporučení Evropské banky pro buněčné linie (ECACC) s ohledem na bezpečnost práce, platné vnitřní směrnice a předpisy Biofyzikálního ústavu AV ČR, v.v.i., Brno.

Ke kultivaci buněk byly používány média RPMI-1640 a DMEM (high glucose, 4,5 g·L<sup>-1</sup>) od firmy PAA (Pasching, Rakousko), dále média Lebowitz L-15 a McCoys' 5a od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. (Praha, Česká Republika). Média byla obohacena o fetální bovinní sérum (FBS; 10%) od firmy PAA a gentamycin (50 μg·mL<sup>-1</sup>) byl zakoupen u firmy Serva (Heidelberg, Německo). Kultivace buněk probíhala v podmínkách plně humidifikovaného inkubátoru při teplotě 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly pasážovány 2-3-krát týdně s ohledem na růstové profily konkrétních linií a jejich nasazení pro potřeby konkrétních experimentů se odvíjelo od aktuálního stavu buněčné linie, při dodržení maximálně 90% konfluence.

### 3.3.3 CYTOTOXICITA KOMPLEXŮ

Cytotoxicita komplexů, nebo také schopnost usmrtit či inhibovat růst nádorových buněk, je jedním z prvotních ukazatelů v rámci testování nových látek s potenciálně protinádorovým účinkem. Metody sloužící k zjištění tohoto důležitého parametru jsou zcela obecně založeny například na přeměně určité látky vlivem činnosti enzymů v živých buňkách (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT), kvantifikaci celkového množství proteinů v daném souboru buněk (sulforhodamin B, 2-(3-diethylamino-6-diethylazaniumylidene-xanthen-9-yl)-5-sulfo-benzenesulfonate; SRB) a v neposlední řadě na akumulaci látky živými buňkami v lysozomech (neutrální červeně, 3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride; NR).

Konkrétní buněčné linie jsou pro všechny výše zmíněné experimenty nasazeny na 96-jamkové destičky v počtech potřebných k dodržení exponenciálního růstu dané linie po čas experimentu (obvykle  $3 \cdot 10^3$  buněk/jamku). Časový harmonogram zahrnoval 24 h inkubaci buněk bez studovaných komplexů v objemu 100  $\mu\text{L}$  média na jamku, následovaný přidavkem studované látky v rostoucí koncentrační řadě. Inkubace buněk s komplexem probíhala po dobu 72 h, po uplynutí požadovaného času byly vzorky procesovány způsobem, charakteristickým pro zvolený hodnotící assay (MTT, SRB, NR; viz níže). Cytotoxické efekty byly vyjádřeny formou  $\text{IC}_{50}$ , tedy hodnotou, jež lze získat konstruováním křivek buněčného přežití vůči koncentraci daného komplexu. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  je vyjádřením koncentrace látky, která způsobí 50% inhibici růstu konkrétní linie buněk. Koncentrace studovaných látek, aplikované v rámci všech provedených studií, byly vždy zpětně kontrolovány na FAAS (Varian AA240Z, GTA120).

#### 3.3.3.1 STANOVENÍ CYTOTOXICITY KOMPLEXŮ S POMOCÍ MTT

Po uplynutí času definovaného v experimentálním harmonogramu (inkubace se studovaným komplexem po dobu 72 h) bylo do každé jamky přidáno 10  $\mu\text{L}$  roztoku MTT ( $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). 96-jamková destička byla následně inkubována po dobu 4 h při  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Na konci inkubace byly jamky odsáty a nerozpustné formazanové krystaly (produkt přeměny MTT mitochondriálními oxidoreduktázami) byly rozpuštěny přidavkem 100  $\mu\text{L}$  DMSO/jamku. Poté byla měřena absorbance při 570 nm (ref. 620 nm) s pomocí readru Sunrise Tecan Schoeller.

### 3.3.3.2 STANOVENÍ CYTOTOXICITY KOMPLEXŮ S POMOCÍ SRB

Po 72 h inkubaci buněk se studovanými komplexy bylo médium z jamek odsáto, jamky byly dvakrát opláchnuty PBS a adherované buňky byly fixovány 10% kyselinou trichloroctovou (TCA) po dobu 1 h při 4°C. Fixované buňky byly třikrát opláchnuty MQ. Buňky byly následně obarveny roztokem SRB (100 µL/jamku; 0,4% v 1% kyselině octové) po dobu 30 min. Poté byly jamky odsáty a třikrát opláchnuty 1% kyselinou octovou. Solubilizace barviva v jamkách byla provedena pomocí Tris (10 mM, pH 10,5 za kontinuálního míchání po dobu 5 minut. Na závěr byla měřena absorbance při 570 nm a konstruovány přežívací křivky v závislosti na koncentraci komplexu.

### 3.3.3.3 STANOVENÍ CYTOTOXICITY KOMPLEXŮ S POMOCÍ NR

Na konci inkubační doby buněk s komplexem byl přidán roztok neutrální červeně (NR) v PBS (0,33%), s následnou inkubací po dobu 2 h při 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Po uplynutí doby nezbytné k akumulaci NR v buňkách bylo médium odsáto a ihned byl přidán fixační roztok (0,1 % CaCl<sub>2</sub> v 0,5% formaldehydu). Inkorporovaná NR byla solubilizována s pomocí 1% kyseliny octové v 50% ethanolu, 200 µL na jamku. Následně byla měřena absorbance při 540 nm (ref. 690 nm) a konstruovány přežívací křivky v závislosti na koncentraci komplexu.

### 3.3.4 AKUMULACE KOMPLEXŮ KOVŮ V BUŇKÁCH

Akumulace komplexů kovů je prvotním předpokladem v mechanismu působení protinádorově aktivních farmak na bázi přechodných kovů. Ke studiu se zpravidla využívá buněčných linií, u nichž je předpoklad aktivity daného farmaka a výběr konkrétní linie je tedy individuální případ od případu. Počet buněk je volen tak, aby po skončení experimentu bylo dosaženo maximálně 90% konfluence. Pre-inkubace samotných buněk před podáním studované látky probíhá zpravidla 24-48 hodin v závislosti na růstových křivkách dané linie. Po pre-inkubační době je podána studovaná látka v definované koncentraci a v takovém roztoku, který sám o sobě neovlivňuje zásadním způsobem růst buněk. Až na výjimky zaměřující se na inhibici různých metabolických, či transportních procesů (viz níže) se jedná o standardní médium obohacené 10% FBS a antibiotikem. Po uplynutí definovaného času, po který je akumulace studována (0, 5, 12, 24 h atp.) jsou buňky opláchnuty PBS, trypsinizovány, sesbírány a spočítány. Následně probíhá centrifugace (300 g, 5 min, 4°C) ve

dvou cyklech, při kterých se eliminuje zbytkové množství extracelulárně přítomného studovaného komplexu. Buněčné pelety se mineralizují vysokotlakým mikrovlnným systémem (CEM Mars®) v koncentrované kyselině chlorovodíkové (11M). Takto připravené roztoky lze po patričném naředění ke snížení koncentrace kyseliny ( $\leq 5\%$ ) analyzovat na obsah kovů s pomocí FAAS, popřípadě ICP-MS). Výsledky jsou pak vyjádřeny v ng kovu na  $1 \cdot 10^6$  buněk, popřípadě v molech studovaného kovu (ne však celého komplexu) na  $1 \cdot 10^6$  buněk.

#### 3.3.4.1 TEPLOTNÍ ZÁVISLOST AKUMULACE KOMPLEXŮ KOVŮ V BUŇKÁCH

Teplotní závislost byla studována po 2 h inkubaci s iridiovým komplexem  $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{bq})\text{Cl}]$  při teplotách 4, 20 a 37°C. Z důvodu nestandardních podmínek pro růst buněčných linií byla v tomto případě sledována viabilita buněk, která během experimentu nepoklesla pod 98%.

#### 3.3.4.2 INHIBICE $\text{Na}^+/\text{K}^+$ PUMPY

Při experimentu bylo využito 24 h inkubace buněk ovarialního karcinomu A2780 s 10  $\mu\text{M}$  studovaného komplexu  $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{bq})\text{Cl}]$  při 37°C. Buňky byly koinkubovány s inhibítoem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpy ouabainem při koncentraci 200  $\mu\text{M}$ .

#### 3.3.4.3 DEPLECE ATP KE STUDIU AKTIVNÍ TRASPORTNÍCH MECHANISMŮ

Samotnému studiu aktivních transportů zúčastněných při akumulaci komplexů na bázi přechodných kovů, předcházelo vyřazení z činnosti biochemických procesů podílejících se na syntéze ATP v buňce. Konkrétně se jednalo o použití inhibitoru glykolýzy s pomocí 2-deoxy-D-glukózy (50 mM) a inhibitoru ATP-syntázy s pomocí oligomycinu (5  $\mu\text{M}$ ). Inhibiční médium se skládalo z PBS, zmíněných inhibitorů a 2,5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  HSA. Pre-inkubace s inhibitory probíhala po dobu 1 h při 37°C. Médium metabolicky inhibovaných buněk obsahovalo pouze PBS a 10% HSA, buňky s aktivním ATP metabolismem byly inkubovány v PBS s 10% HSA a 10 mM glukózou. Komplexy byly přidány v koncentraci 30  $\mu\text{M}$  a ponechány u buněk po dobu 30, 60, 120, 180 min.

#### 3.3.4.4 METODA ANALÝZY A INHIBICE EXKREČNÍCH BUNĚČNÝCH MECHANISMŮ

Exkreční (efluxní) mechanismy představují mechanismus, který reálně snižuje účinnost protinádorových, ale i jiných klinicky užívaných farmak. Na buněčné úrovni byl tento mechanismus sledován s pomocí aplikace studované látky ( $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{bq})\text{Cl}]$ ), cisplatina; 5

$\mu\text{M}$ ) na dobu 24 h s následnou inkubací dalších 24 h v médiu bez studovaných látek. Následně probíhá standartní analýza jako v případě buněčné akumulace (trypsinizace, počítání, promývání, mineralizace, FAAS analýza).

Pro zaměření se na konkrétní mechanismy působící při detoxifikaci studovaných látek bylo užito specifických inhibitorů. Verapamil (10, 20  $\mu\text{M}$ ) k inhibici p-glykoproteinu, reversan (10  $\mu\text{M}$ ) k inhibici transportního proteinu MRP1, buthionin-sulfoximin (BSO, 1 mM) k inhibici glutathion-S-transferázy.

#### **3.3.4.5 INHIBICE CTR1 TRANSPORTÉRŮ**

Kompetitivní inhibice CTR1 transportéru s pomocí chloridu měďnatého (0,1 mM) bylo využito rovněž při studiu akumulace komplexu ( $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{bq})\text{Cl}]$ ) a cisplatinu. Po 24 h inkubaci následoval standartní metodický postup analýzy akumulace komplexu v buňkách.

#### **3.3.4.6 INHIBICE ENDOCYTÓZY**

Endocytóza byla efektivně inhibována s pomocí cholesterol extrahujícího agens methyl- $\beta$ -cyklodextrinu (0,2 mM) při koinkubaci se studovaným komplexem ( $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{bq})\text{Cl}]$ ) a cisplatinou (10  $\mu\text{M}$ ). Po 24 h inkubaci bylo možné standartním způsobem analyzovat vzorky pro studium buněčné akumulace.

### **3.3.5 VAZBA STUDOVANÝCH KOMPLEXŮ NA DNA V BUŇKÁCH**

Vzhledem k důležitosti DNA jakožto cílové biomakromolekuly pro platná cytostatika, patří experiment zjištění metalace DNA ke klíčovým. Pomocí této metody lze mnohdy vysvětlit účinnost či neúčinnost mnohých komplexů na bázi přechodných kovů vůči nádorovým liniím.

K tomuto experimentu bylo nasazeno  $3 \cdot 10^6$  buněk požadované linie (počet opět v závislosti na růstových křivkách dané linie) s následnou inkubací 24 h. Poté byly přidány studované komplexy na požadovanou koncentraci. Inkubace probíhala za standartních podmínek 37°C, 5% CO<sub>2</sub> v médiu standartním pro kultivaci dané linie a po čas, který byl zvolen na počátku experimentu (5, 24 h atp.). Následně byly buňky opláchnuty PBS, trypsinizovány a dvojitým promytím PBS (4°C) se dvěma centrifugačními cykly (300g, 3 min, 4°C) byl získán buněčný pelet. K takto připraveným vzorkům byl přidán guanidinový



detergent DNazol® (DNazol genomic DNA isolation reagent, MRC), v objemu dle příloženého manuálu (zpravidla 1 mL reagentie na  $1 \cdot 10^7$  buněk). Dále byla přidána RNáza A ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). DNA byla následně z lyzační směsi vzorku precipitována pomocí ethanolu, vysušena a poté rozpuštěna v MQ, popřípadě v 8 mM roztoku NaOH. Koncentrace izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky při 260 nm. Ve vzorcích byla následně měřena koncentrace kovů s pomocí FAAS či ICP-MS. Výsledek je pak uváděn v pg kovu /  $\mu\text{g}$  DNA.

### 3.3.6 PŘÍPRAVA JADERNÝCH A CYTOPLASMATICKÝCH EXTRAKTŮ Z BUNĚK

Jaderné extrakty byly izolovány pro účely zjištění aktivity jaderních histonových deacetyláz. K tomuto byly použity buňky A2780 nasazené na 100 mm Petriho misky v hustotě  $3 \cdot 10^6$  buněk/misku a inkubovány 48 h při  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Následně byly k buňkám přidány testované komplexy na ekvitoxickou popřípadě ekvimolární koncentraci a probíhala další 24 h inkubace. Po této době byly misky opláchnuty dvakrát PBS ( $4^\circ\text{C}$ ), buňky byly seškrabány na ledu do zkumavek a centrifugovány (10 min,  $0^\circ\text{C}$ , 200g). Buněčné pelety byly resuspendovány v lyzačním pufru [Tris·HCl (10 mM, pH 8.0), KCl (60 mM), EDTA (1,2 mM), dithiothreitol (DTT, 1 mM), PMSF (0,1 mM) a nonidet NP-40 (0,04%)] a ponechány na ledu po dobu 10 minut. Následně byly vzorky centrifugovány (4 min,  $0^\circ\text{C}$ , 800g). Po tomto kroku bylo možné odebrat supernatant, čímž byl získán cytoplasmatický extrakt. Pelet byl opět rozsuspendován v lyzačním pufru bez PMSF a nonidet NP-40 a centrifugován (4 min,  $0^\circ\text{C}$ , 300g). Pelet byl poté rozsuspendován v nukleárním extrakčním pufru [Tris·HCl (20 mM, pH 8.0), NaCl (420 mM),  $\text{MgCl}_2$  (0,7 mM), EDTA (0,25 mM) a glycerol (25%)] a inkubovány 30 min při  $4^\circ\text{C}$  při kontinuálním míchání na end-over-end roller. Poté proběhla finální centrifugace (15 min,  $0^\circ\text{C}$ , 13000g) a byl odebrán supernatant (nukleární extrakt). V jaderném extraktu byla změřena koncentrace proteinů standartní Bradfordovou metodou. Vzorky byly procesovány okamžitě nebo uschovány při  $-80^\circ\text{C}$  do doby použití.

### 3.3.7 AKTIVITA HISTONOVÝCH DEACETYLÁZ

Jaderné extrakty z buněk A2780 byly analyzovány na aktivitu histonových deacetyláz. K buňkám byly aplikovány komplexy oxaliplatinu s dvěma valproovými kyselinami v pozici axiálních ligandů, z těchto buněk byl následně izolován jaderný extrakt dle výše uvedeného

postupu. Aktivita byla studována pomocí kolorimetrického HDAC Activity Assay Kit (Biovision Research Products, Mountain View, CA, USA), dle přiloženého manuálu. Stavení aktivity proběhlo na základě standardní křivky za pomoci standardu, jež byl součástí kitu. K analýze bylo použito 20  $\mu\text{g}$  jaderného proteinu.

### 3.3.8 DETEKCE BUNĚČNÉ SMRTI

Buněčná smrt způsobená komplexy na bázi přechodných kovů je zpravidla apoptotického či nekrotického charakteru. Oba tyto druhy buněčné smrti vykazují určité charakteristiky, které lze odhalit pomocí specifických molekulárně-biologických (biochemické markery) či mikroskopických metod (morfologické markery).

#### 3.3.8.1 DNA LADDERING ASSAY

Mezi rychlé a spolehlivé metody sloužící k odhalení apoptotického charakteru buněčné smrti jednoznačně patří assay založený na fragmentaci (z překladu „žebříčkování“) DNA. Celá metoda vychází z již publikovaného postupu. [119] Buňky ovlivněné studovaným komplexem  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ , či kontrolní buňky byly centrifugovány a buněčný pelet byl resuspendován v HBSS (Hanks' buffered salt solution). Buňky byly fixovány v ethanolu (70%) a následně přeneseny do  $-20^\circ\text{C}$  po dobu nejméně 24 h. Následně byly vzorky centrifugovány (800g, 5 min) a supernatant byl odebrán. Buněčný pelet byl rozsuspendován v 40  $\mu\text{L}$  fosfát-citrátového pufru [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.192 M), kyselina citronová (4 mM), pH 7.8] a ponechán při pokojové teplotě po dobu 30 min. Poté byly vzorky centrifugovány (1000g, 5 min), supernatant byl odebrán a zahuštěn lyofilizací na SpeedVac. 3  $\mu\text{L}$  0,25% Nonidet NP-40 spolu s 1  $\mu\text{L}$  RNázy-A (3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) byly přidány k lyofilizovaným vzorkům. Po 30 min inkubaci při  $37^\circ\text{C}$  byl přidán roztok proteinázy K (3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a opět inkubován dalších 30 min při  $37^\circ\text{C}$ . Následně byl přidán nanášecí pufr a vzorek byl přenesen na 1,5% agarózový gel (4  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ , 4 h). DNA na gelu byla vizualizována pod UV zářením po obarvení ethidium bromidem (5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Zvýšená fragmentace („žebříčkování“) poukazuje na apoptotický průběh buněčné smrti.

#### 3.3.8.2 ELISA KIT K URČENÍ DRUHU BUNĚČNÉ SMRTI

Podstatou Cell Death Detection ELISA plus kitu (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Německo) je detekce cytoplasmatických fragmentů DNA asociované s histony (tzv. mono/oligo nukleosomy). Lidské leukemické buňky HL-60 a lidské buňky karcinomu

ovaria A2780 byly ovlivněny studovanými komplexy  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ , popřípadě cisplatinou.  $1 \cdot 10^4$  buněk na jamku v 96jamkové desce bylo ovlivněno ekvimolární (3  $\mu\text{M}$ ), popřípadě ekvitoxickou ( $\text{IC}_{50}$ ) koncentrací studované látky po dobu 24 h. Následně byly desky se vzorky centrifugovány (200g) a 20  $\mu\text{L}$  supernatantu bylo odebráno k analýze nekrózy. Buňky byly rozsuspendovány v 200  $\mu\text{L}$  lyzačního pufru, jež byl součástí kitu a inkubovány 30 min při pokojové teplotě. Poté byla peletována jádra buněk (200g, 10 min) a supernatant (cytoplasmatická frakce) byla odebrána k analýze a detekci apoptózy pomocí ELISA kitu. Po 15 min inkubaci s peroxidázovým substrátem byla měřena absorbance při vlnové délce 405 nm (referenční 490 nm) na fluorescenčním readru Infinite 200 (TECAN, Schoeller, Mannendorf, Německo).

### 3.3.8.3 MIKROSKOPICKÉ POZOROVÁNÍ PRŮBĚHU BUNĚČNÉ SMRTI

S pomocí konfokální mikroskopie a multiparametrického apoptotického kitu (Multiparametric apoptosis assay kit; Cayman Chemical, Michigan, USA) bylo možné přímo pozorovat typické rysy apoptózy v buňkách. Buňky byly za tímto účelem nasazeny na speciální misky s ultratenkým skleněným dnem (P50G-0-30-F; Mattek, Ashland, USA) a po 24 hodinové inkubaci byly přidány studované komplexy. Po uplynutí požadované doby (3 - 48 h) byly buňky obarveny směsí TMRE (tetramethylrhodamin, ethylester)/Hoechst po dobu 15 min při 37°C. Vzorky byly vizualizovány konfokálním mikroskopem Leica TSC SP-5 X, vybaveným objektivem HCX PL APO lambda blue 63.0 x 1.20 water UV. Fluorescenční látky byly excitovány a signál byl detekován při následujících hodnotách: Hoechst (exc. 355/em. 465 nm), TMRE (exc. 560/em. 595 nm). S pomocí jaderného barviva Hoechst lze pozorovat typické charakteristiky apoptózy na jaderné úrovni a s pomocí TMRE na úrovni mitochondrií (měření poklesu mitochondriálního membránového potenciálu  $\psi_m$ ).

### 3.3.9 ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU

Buňky A2780 byly nasazeny na 60mm Petriho misky v hustotě  $2 \cdot 10^6$  buněk/misku a inkubovány přes noc při 37°C. Následně byly k buňkám přidány studované komplexy na ekvimolární, popřípadě ekvitoxickou koncentraci. Po 24 h inkubaci byly plovoucí buňky odebrány a adherentní buňky trypsinizovány. Veškeré buňky (plovoucí, adherentní) byly propláchnuty dvakrát v PBS (4°C), fixovány 70% ethanolem a uloženy při -20°C. Následně

byly buňky obarveny propidium iodidem ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), doplněným o RNázuA ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), za tmy po dobu 30 min při pokojové teplotě. Vzorky byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie (Cell Lab Quanta TM SC-MPL, Beckman Coulter) a analýza byla provedena v softwaru Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, USA). Byl využit také přístroj (BD FACSAria II Sorter) spolu se softwarem ModFit LT 2.0 software (Verity Software House).

### 3.3.10 DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU V BUŇKÁCH

Intracelulární reaktivní formy kyslíku (ROS) byly detekovány za účelem zjištění míry oxidativního stresu v buňkách po působení komplexu  $([(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6)$ . Ke zvýšené generaci reaktivních forem kyslíku dochází zpravidla při poškození mitochondrií, kde dochází k otevření dýchacího řetězce. Použitá metoda již byla publikována a patří mezi rychlé a efektivní způsoby stavení ROS přímo v buňce. [120] K experimentu byly použity buňky A2780, které byly nasazeny na 96-jamkové (vzájemně stíněné) tmavé desky, při hustotě  $2\cdot 10^4$  buněk/jamku. Poté byly přidány vzestupné koncentrační řady studovaných komplexů (0, 1, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ). Poté byl přidán DCHF-DA (Dichloro-dihydro-fluorescein diacetát; 10  $\mu\text{M}$ ) a desky se vzorky byly inkubovány 30 min při  $37^\circ\text{C}$ . Jamky byly propláchnuty PBS a fluorescence DCHF-DA byla skenována při exc. 504 nm a em. 529 nm na readru Infinite 200 (TECAN, Schoeller, Mannendorf, Německo). Narůstající fluorescence je pak indikátorem četnějších ROS.

### 3.3.11 ROLE P53 V MECHANISMU PŮSOBNÍ PROTINÁDOROVĚ ÚČINNÝCH KOMPLEXŮ

Z předchozích studií vyplynulo, že nově syntetizované trans komplexy vyžadují při mechanismu působení buněčnou expresi proteinu p53 [121], který v tomto případě hraje roli aktivátoru apoptotické kaskády. Bylo tedy zajímavé provést experiment pro platnaté komplexy cis/trans platiny, kde byl amino ligand nahrazen 1-methyl 7-azaindolovým ligandem. Aktivita proteinu p53 při progresi cytotoxicity protinádorově účinných komplexů kovů byla studována na základě již publikovaného postupu. [122] Experiment byl proveden na dvou izogenních buněčných liniích karcinomu tlustého střeva HCT-116 +/- s p53 wild type a HCT-116 -/- s umlčeným p53 (dle postupu viz [123]). Buňky byly nasazeny na 96-jamkové tmavé desky (Corning) v hustotě 4000 buněk/jamku ve 100  $\mu\text{L}$  DMEM média a inkubovány přes noc. Následně byly přidány komplexy na dobu 6 h. Po této době bylo

médium odsáto, buňky byly promyty dvakrát PBS a jamky doplněny čerstvým médiem (bez komplexu). Následovala inkubace po dobu 66 h. Na konci inkubace bylo médium vyměněno za Triton X-100 v MQ a během 30 min kontinuálního míchání došlo k lýze buněk. Následovalo pět 30 min cyklů rozmrazení a zmrazení. K vzniklému lyzátu (100  $\mu$ L) bylo přidáno stejné množství 2x SYBR Green I. Obsah DNA ve vzorcích byl měřen pomocí readru Infinite 200 (Tecan) při exc. 485 nm a em. 535 nm. Data byla normalizována na množství DNA v kontrole.

### 3.3.12 BUNĚČNÁ ADHEZE

Experiment byl proveden pro účely studia ovlivnění adheze vysoce invazních buněk karcinomu prsu, MDA-MB-231, po aplikaci NAMI-A. Buňky MDA-MB-231 byly kultivovány po dobu 48 h při 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Poté bylo kompletní médium s 10% FBS vyměněno na dobu 24 h roztokem PBS s 0,1 % BSA. Následně byl aplikován roztok PBS s NAMI-A, NAMI-A po redukci kyselinou askorbovou, popřípadě s lidským sérovým albuminem po dobu 1 h za standartních kultivačních podmínek. Následně byly buňky trypsinizovány (trypsin-EDTA), centrifugovány (200g, 5 min) a rozsuspendovány v PBS s 0,1% BSA. Po dobu 30 min byly vzorky ponechány za účelem rekonstituce membránových receptorů.  $1 \cdot 10^4$  buněk od každého vzorku bylo nasazeno na 96-jamkovou destičku, kde se nechaly adherovat po dalších 30 min. Jamky byly odsáty, opláchnuty PBS a adherované buňky obarveny sulforhdaminem B (SRB).

### 3.3.13 ANIMÁLNÍ STUDIE (*IN VIVO* EXPERIMENTY)

Experimenty na zvířatech probíhaly během zahraniční stáže na University of Trieste a Callerio Foundation (Terst, Itálie) s ohledem na tamní platnou legislativu (DDL 116 z 21. 2. 1992) a obecně platné zásady pro nakládání a použití laboratorních zvířat (NIH 86-23, Bethesda, MD, National Institutes of Health, 1985). Dané experimenty probíhaly na 10 týdnů starých myších typu ICR (CD-1; ♂). Průměrná váha zvířete činila  $39.0 \pm 3,5$  g (Rozmezí 33,0 - 48,4 g)

#### 3.3.13.1 APLIKACE LÉČIVA

Studované látky, NAMI-A a NAMI-A po redukci kyselinou askorbovou (5 min, 37°C) byly aplikovány intravenózně do ocasní cévy. Aplikovaný roztok byl na bázi fyziologického roztoku, sterilní a výsledná dávka činila  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , připravené k aplikaci při požadavku 0.05

ml roztoku na 10 g váhy zvířete. Injektáž byla usnadněna vasodilací ocasní cévy s pomocí horké vody. Aplikovaný objem byl kalkulován na základě předchozího vážení každého z 96 experimentálních jedinců zahrnutých v experimentu. Po uplynutí požadovaného času pro studium farmakokinetiky byla zvířatům podána intraperitoneálně anestetika: Zoletil (tiletamine/zolazepam)  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  a Xilor (xylazine)  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

### **3.3.13.2 ODBĚR A PROCESOVÁNÍ VZORKŮ**

Odběr krve byl proveden ze srdce, po podání a účinku anestezie. Plasma byla separována centrifugací ( $2000g$ , 3 min) po přidání heparinu ( $50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  krve). Zvířata byla usmrcena dislokací páteřního kanálu a podrobena chirurgickému zákroku, při němž byly odňaty fragmenty jater, plic a ledvin, moč byla také odebírána. Vzorky byly bezprostředně po odebrání zváženy a zmrazeny v kapalném dusíku, vzorky byly následně uchovávány při  $-80^\circ\text{C}$  až do dalšího zpracování.

### **3.3.13.3 FAAS ANALÝZA PRO ÚČELY STUDIA FARMAKOKINETICKÝCH PARAMETRŮ**

Vzorky kapalného charakteru, ale odebrané tkáně byly mineralizovány s pomocí hydroxidu tetramethylamonného 25% v MQ. Kompletní rozklad proběhl za stálého míchání po 24 hodinách. Analýza obsahu ruthenia ve vzorcích byla provedena s pomocí FAAS Varian AA220Z vybaveného grafitovou atomizační celou GTA110, popřípadě s pomocí Varian AA240Z a GTA 120.

### **3.3.13.4 FARMAKOKINETICKÉ PARAMETRY**

Na základě získaných dat z měření FAAS a definovaných časových intervalů bylo možné definovat a spočítat farmakokinetické parametry. Data byla podrobena bi-kompartimentální analýze a byly stanoveny koeficienty jako poločas života v plasmě ( $t_{1/2}$ ) s dělením na fázi  $\alpha$ -distribuční a  $\beta$ -eliminační. Dále pak byl vypočítán distribuční objem ( $V_d$ ) a eliminace ( $Cl$ ). Z konstruovaných průběhů byla vypočítána plocha pod křivkou ( $AUC$ ). Výpočet veškerých farmakokinetických parametrů probíhal standartním způsobem dle obecně platných farmakologických postupů a s pomocí softwaru k tomuto účelu určenému [124].

#### 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předkládaná disertační práce je založena na osmi rukopisech publikovaných v mezinárodních impaktovaných časopisech. Kopie prací jsou součástí přílohy. V této stati bude z důvodu rozsahu pouze velmi stručně pojednáno o stěžejních výsledcích jednotlivých výzkumných projektů, k detailnějšímu studiu slouží právě příloha disertační práce.

Tato kapitola je členěna do částí dle problematiky, jež se dílčí publikace týkají. Úvodní výsledkové shrnutí je zaměřeno na studium komplexů oxaliplatin s kyselinou valproovou v pozici axiálních ligandů. Další dvě části jsou věnovány studiu iridiových komplexů, konkrétně mechanismům transportu a prokázání duálního působení Ir<sup>III</sup> komplexů. Čtvrté shrnutí pojednává o rutheniovém komplexu NAMI-A, kde byla identifikována biologicky aktivní forma této látky, a byly navrženy postupy k vylepšení farmakokinetických parametrů. V pořadí pátá a šestá práce je věnována problematice trans-platnatých komplexů a jejich interakcím nejen na buněčné úrovni, ale také bližšímu studiu na úrovni DNA. Konečně závěrečné dvě práce jsou zaměřeny na studium polynukleárních platnatých komplexů, zejména na úrovni DNA.

#### 4.1 PROTINÁDOROVĚ ÚČINNÉ KOMPLEXY OXALIPLATINY S VALPROOVOU KYSELINOU V POZICI AXIÁLNÍCH LIGANDŮ (PUBLIKACE Č. 1)

##### *Antitumor platinum(IV) derivatives of oxaliplatin with axial valproato ligands.*

V této komplexní studii byla spolupracujícím pracovištěm (*Institute for Drug Sesearch, School of pharmacy, The Hebrew University, Jerusalem, Israel*) připravena série nových protinádorově účinných derivátů oxaliplatin s jednou či dvěma valproovými kyselinami (VPA) v poloze axiálních ligandů. Tyto konjugované sloučeniny na základě provedené studie vykazují schopnost inhibice histonových deacetyláz (HDAC) a výrazný nárůst akumulace v buňkách, obojí v důsledku činnosti axiálních ligandů. Navíc po inhibici HDAC (HDACi) dochází k rozvolnění chromatinu, což potencuje pravděpodobnost vazby oxaliplatinu coby nosného elementu dané sloučeniny na DNA. Po uvolnění VPA z komplexu s oxaliplatinou dochází k potlačení činnosti HDAC, což vede k hyperacetylaci chromatinu, která jako taková způsobuje jeho rozvolnění. Navíc tato studie přinesla hlubší pochopení v souvislosti s mechanismem činnosti klinicky již známé oxaliplatinu a dalších platinových farmak. Spojení VPA a oxaliplatinu se do budoucna jeví jako zajímavý alternativní přístup k terapii nádorových onemocnění. Hlavní výhodou daného systému založeného na synergickém efektu farmaka a axiálního ligandu je nižší pravděpodobnost vytvoření rezistence vůči takto komplexnímu mechanismu působení.

Konkrétní výsledky ukazují, že v buňkách karcinomu prsu MCF7 s přirozenou rezistencí vůči cisplatině došlo k řádovému zlepšení účinnosti. Akumulace komplexů a modifikace DNA se v buňkách A2780 senzitivních k cisplatině po aplikaci komplexu s dvěma VPA taktéž řádově zvýšila. V buňkách rezistentních vůči cisplatině A2780cisR byl pozorován méně výrazný nárůst akumulace. Cílové místo působení, DNA, pak u rezistentní linie vykazovalo zhruba dvakrát vyšší úroveň platinace při porovnání komplexu bez VPA a se dvěma VPA. Při experimentech studujících distribuci v buněčných kompartmentách narůstala se zvyšujícím se počtem axiálních VPA ligandů akumulace na membránách buněk. Po aplikaci nejpotentnějšího komplexu došlo k výraznému nárůstu acetylace histonu H3 a míra inhibice histonových deacetyláz byla srovnatelná s účinkem samotné VPA aplikované při o tři řády vyšší koncentraci. Získané výsledky přispěly k hlubšímu porozumění efektů, které hrají důležitou roli v biologickém (farmakologickém) působení této nové třídy



platičtých konjugátů a mohou přispět k racionálnímu navrhování nové generace těchto Pt-HDACi konjugátů.

#### 4.2 MECHANISMUS BUNĚČNÉ AKUMULACE PROTINÁDOROVĚ ÚČINNÉHO PENTAMETYL CYKLOPENTADYENILOVÉHO IRIDIOVÉHO KOMPLEXU S C, N CHELATAČNÍM LIGANDEM (PUBLIKACE Č. 2)

##### *Mechanism of cellular accumulation of an iridium(III) pentamethylcyclopentadienyl anticancer complex containing a C, N-chelating ligand.*

Během této studie byly studovány dva komplexy s centrálním atomem iridia v oxidačním stavu +III s oktahedrání geometrií. Látky se lišily v charakteru chelatačního ligandu, kde komplex 1  $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{bq})\text{Cl}]$  obsahoval 7, 8-benzochinolinový a komplex 2  $[\eta^5\text{-Cp}^*(\text{Ir})(\text{phen})\text{Cl}]$  1,10-fenantrolinový ligand. V komplexu 1 byl tedy ligand vázán k centrálnímu atomu skrze kovalentní vazbu mezi Ir a dvěma dusíky a v komplexu 2 prostřednictvím vazby na Ir pomocí uhlíku a dusíku. Pouhou záměnou dusíku za uhlík oproti komplexu 2 v chelatačním ligandu byl získán komplex 1 s velmi dobrou aktivitou vůči buňkám ovariaálního karcinomu A2780, dále pak vůči buňkám se získanou rezistencí vůči cisplatině A2780cisR a nakonec i v přirozeně rezistentních buňkách karcinomu prsu MCF7, s hodnotami cytotoxicity v oblasti jednotek mikromol. Takovouto záměnou došlo navíc u komplexu 1 k navýšení lipofilicity z -0,95 na 0,07, což mělo zásadní vliv na nárůst akumulace v buňkách A2780, která byla 50-krát vyšší pro komplex 1. Obdobně výsledky modifikace DNA in cellulo odhalily 50-krát nižší úroveň iridiace DNA pro komplex 2 ve srovnání s komplexem 1. Hlavním cílem dané studie pak bylo objasnění specifických mechanismů vedoucích k akumulaci komplexu 1 v lidských nádorových buňkách. Obecně byly studovány mechanismy založené na aktivním transportu (využívající energii z ATP) nebo bez využití ATP (pasivní difuze), a dále na mechanismy vedoucí k detoxikaci látek z buňky, tzv. efluxní mechanismy. Ke studiu konkrétních mechanismů bylo využito specifických inhibitorů. Veškeré výsledky byly porovnány s klinicky známou cisplatinou. Z výsledků plyne, že jak pasivní difuze, tak i energeticky aktivní transport hrají roli v akumulaci komplexu 1. V odstraňování komplexu 1 z buňky se významnou měrou zapojil MRP1, p-glykoprotein a metabolismus glutathionu. O všech těchto exportních mechanismech je známo, že v praxi

mohou být komplikací při léčbě nádorových onemocnění, jelikož jejich činností dochází ke snižování hladiny účinné látky uvnitř buněk.

#### **4.3 ORGANOKOVOVÝ IRIDIOVÝ KOMPLEX S DUÁLNÍM MECHANISMEM PŮSOBENÍ A INICIUJÍCÍ APOPTÓZU (PUBLIKACE Č. 3)**

##### ***A dual-targetting, apoptosis inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex.***

Cílem této studie bylo objasnit molekulární mechanismus působení nového protinádorově účinného iridiového komplexu  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ , kde phen je fenantrolinový chelatační ligand. U tohoto komplexu byla pozorována vysoká účinnost vůči širokému spektru nádorových buněk jednak hematopoetického charakteru (leukemické), ale i solidních forem malignit (prsu, ovaria) a to i se získanou rezistencí vůči cisplatině. Na velký terapeutický potenciál daného komplexu bylo poukázáno na základě zjištění jeho selektivity, kde při aplikaci vůči lidským nemaligním buňkám nevykazoval komplex výrazný cytotoxický efekt. Takto výjimečné vlastnosti se staly impulsem právě pro studium mechanismů působení na buněčné úrovni. Byl objasněn unikátní duální efekt tohoto komplexu, spočívající v jeho působení jednak na úrovni poškození DNA a jednak na úrovni mitochondrií. Poškození mitochondrií se projevilo poklesem mitochondriálního membránového potenciálu a zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku. Pomocí průtokové cytometrie a měření impedance adherentních buněk se projevila výrazně rychlejší kinetika působení vůči nádorovým buňkám v porovnání s cisplatinou. Bylo také prokázáno, že dominantním mechanismem buněčné smrti je apoptóza, která výrazným způsobem převládá nad nekrotózou. Veškeré tyto námi zjištěné unikátní vlastnosti daného iridiového komplexu poukazují na jeho velký potenciál coby nové alternativy k léčbě nejrůznějších malignit a na jeho možné zahrnutí do budoucích experimentů na organismální úrovni.

#### 4.4 VLIV VAZBY REDUKOVANÉ FORMY NAMI-A NA LIDSKÝ SÉROVÝ ALBUMIN, OVLIVNĚNÍ FARMAKOKINETIKY A BIOLOGICKÉ AKTIVITY (PUBLIKACE Č. 4)

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

Antimetastaticky aktivní rutheniový komplex trans-imidazoldimethylsulfoxid-tetrachlororuthenium (NAMI-A; „New Anti-tumour Metastasis Inhibitor“) je jedním ze dvou rutheniových komplexů, který se dostal až do fáze klinických studií. Hlavní motivací pro výzkum rutheniových komplexů k léčbě novotvarů je fakt, že experimenty již provedené na zmiňovaném NAMI-A prokázaly výrazně nižší míru toxicity pro lidský organismus a obecně lepší snášenlivost pacienty s nemalobuněčným nádorem plic (NSCLC) během první i druhé fáze klinických studií. [125] Z farmakokinetických parametrů in vivo vyplývá, že v krevním oběhu je relativně malá koncentrace volného léčiva, eliminační poločas je také poměrně dlouhý a existuje lineární vztah mezi aplikovanou dávkou a biodostupností (AUC). Vzhledem k nízké hladině volného léčiva v krvi zůstává otázkou, jaká forma, či již konjugát s proteiny krevní plasmy je zodpovědný za protinádorový účinek. Během dané studie byly sledovány interakce s lidským sérovým albuminem, což je nejhojněji zastoupený protein krevní plasmy (koncentrace ~1 mM), a jedná se tedy o nejpravděpodobnější „přenašeč“ NAMI-A krevním řečištěm. Získané výsledky také potvrzují, že ve významné míře dochází k vytváření vazby mezi tímto farmakem a sérovým albuminem. Navíc bylo zjištěno, že lidský sérový albumin je sám o sobě při nízkých koncentracích schopen redukovat NAMI-A, čímž se výrazně urychluje hydratace odstupujících chloridových ligandů. Faktem také je, že po redukcí NAMI-A například kyselinou askorbovou je interakce s albuminem výrazným způsobem urychlena. S pomocí testů adheze a migrace vysoce invazních buněk nádoru prsu MDA-MB-231 byl prokázán antimetastatický efekt NAMI-A, a to i ve formě aplikované se sérovým albuminem. Obecně vyššího antimetastatického efektu v porovnání s „čistou“ formou NAMI-A bylo dosaženo buď po aplikaci již předem redukované formy NAMI-A, či ve formě preparátu s lidským sérovým albuminem, kde NAMI-A bylo koncentračně a poměrově favorizováno. Vyvrcholením celé studie byly in vivo experimenty na myších ICR (CD-1). NAMI-A zde bylo aplikováno intravenózně v dávce 50 mg na kg tělesné hmotnosti a to buď ve formě redukované kyselinou askorbovou, či pouze ve fyziologickém roztoku. Farmakologické parametry pro případ aplikace předem redukované formy ukazují na výrazné

snížení eliminačního poločasu léčiva, zvýšení celkové koncentrace léčiva v krevní plasmě, navýšení koncentrace v plicní tkáni (cílové místo) a v neposlední řadě také významné snížení koncentrace léčiva v tkáni ledvin. Praktickými důsledky změn farmakokinetických parametrů při podání redukované formy NAMI-A jsou: možnost snížení podávané dávky pacientům, výrazně vyšší účinnost při léčbě primárních nádorů plic a plicních metastáz, omezení zátěže ledvin a potlačení nefrotoxicity. Z výsledků lze tedy předpokládat, že redukované NAMI-A je právě tou biologicky aktivní formou, která stojí za antimetastatickými účinky farmaka a podáním již předem redukované látky může významným způsobem vylepšit stávající léčbu. [115]

#### 4.5 AKTIVACE TRANS GEOMETRIE U BIFUNKČNÍCH PLATNATÝCH KOMPLEXŮ NEOBJEMNÝM METHYLAMINOVÝM LIGANDEM (PUBLIKACE Č. 5)

##### *Activation of trans geometry in bifunctional mononuclear platinum complexes by a non-bulky methylamine ligand.*

Další experimentální poznatky související s tématem disertační práce se týkají problematiky trans geometrie protinádorově aktivních komplexů platiny. Byl studován mechanismus účinku nového komplexu odvozeného od klinicky neefektivní transplatiny, jmenovitě trans-[Pt(NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. V tomto komplexu byly, na rozdíl od dosud testovaných protinádorově účinných derivátů transplatiny, skupiny NH<sub>3</sub> transplatiny nahrazeny pouze malým, neobjemným metylaminovým ligandem. Tato změna však vyvolala výrazné zvýšení cytotoxicity komplexu, stejně jako změny v mechanismu jeho vazby k DNA. Také buněčná akumulace studovaného komplexu korelovala s jeho zvýšenou cytotoxicitou v nádorových buňkách sensitivních i rezistentních k cisplatině.

#### 4.6 NOVÉ PROTINÁDOROVĚ ÚČINNÉ DERIVÁTY CISPLATINY A TRANSPLATINY S 1-METYL-7-AZAINDOLOVÝM LIGANDEM: SYNTÉZA, CHARAKTERIZACE A BUNĚČNÁ ODEZVA (PUBLIKACE Č. 6)

##### *Novel antitumor cisplatin and transplatin derivatives containing 1-methyl-7-azaindole: synthesis, characterization, and cellular responses.*

Následující práce se týkala problematiky cis/trans izomerie platnatých komplexů. Konkrétně se jednalo o komplexy cis nebo trans-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(L)], kde L je 1-methyl-7-azaindolový (1M7AI) ligand. V tomto případě byl aminový ligand cisplatiny, popřípadě transplatiny nahrazen 1M7AI, což vedlo k výraznému vylepšení cytotoxických účinků u řady maligních buněčných linií, byl ale pozorován i selektivní účinek vůči nenádorovým liniím. Ukázalo se, že obecně účinnější je trans izomer daného komplexu. Důvodem vyšší účinnosti je rozdílný charakter vazby studovaného komplexu k DNA, rozdílná schopnost ovlivnění buněčného cyklu a v neposlední řadě se ukázalo, že trans izomer působí prostřednictvím p53 independentní dráhy, což představuje jednoznačné unikum, protože u dosavadních trans platnatých komplexů byla součinnost s p53 proteinem nezbytnou podmínkou v mechanismu

cytotoxického působení. Do budoucna by tedy i tento komplex mohl představovat zajímavou alternativu při léčbě nádorů s mutací v p53 proteinu, které obecně vykazují horší senzitivitu po aplikaci komerčních platnatých cytostatik.

#### **4.7 MECHANISTICKÁ STUDIE CYTOTOXICKÉHO PŮSOBNÍ DINUKLEÁRNÍHO PLATNATÉHO KOMPLEXU S BENZO-TRIAZOLÁTOVÝM MŮSTKEM (PUBLIKACE Č. 7)**

##### ***Mechanistic insights into toxic effects of a benzotriazolate-bridged dinuclear platinum(II) compound in tumor cells.***

V práci jsou zahrnuty výsledky získané na polynukleárních platnatých sloučeninách. Tato konkrétní publikace je věnována komplexu, kde jsou dvě platnatá centra spojena benzotriazolátem (Btaz), konkrétně se jednalo o  $[\{cis-Pt(NH_3)_2Cl\}_2(\mu-Btaz-H)]Cl$ . Cytotoxická aktivita daného komplexu byla výrazně nižší v porovnání s konvenční cisplatinou. Testy byly provedeny pro buňky karcinomu ovarií, které jsou senzitivní vůči cisplatině a také buňkách karcinomu prsu, které jsou k cisplatině naopak přirozeně rezistentní. Akumulace v buňkách dinukleárního platnatého komplexu však byla v porovnání s cisplatinou 4-7-krát vyšší, což poukazuje na fakt, že akumulací komplexu nelze vysvětlit snížený cytotoxický efekt. Případné vysvětlení poskytla až analýza platinace DNA v buňkách, kde bylo zjištěno výrazně nižší množství navázané platiny po aplikaci dinukleárního platnatého komplexu. V tomto případě stojí za sníženou platinací DNA poměrně snadná opravitelnost aduktů vytvořených na DNA studovaným komplexem. Byla ale také prokázána velmi vysoká míra deaktivace síru obsahujícími látkami, jako je například glutathion. Tím také byl vysvětlen efekt snížené vazby na DNA, která korelovala i se sníženou cytotoxicitou daného komplexu v nádorových buňkách.

#### 4.8 ENERGETIKA, KONFORMACE A ROZPOZNÁVÁNÍ DNA MODIFIKOVANÉ DINUKLEÁRNÍM PLATNATÝM KOMPLEXEM S AZOLÁTOVÝM MŮSTKEM (PUBLIKACE Č. 8)

##### *Energetics, conformation, and recognition of DNA duplexes containing a major adduct of antitumor azolato-bridged dinuclear Pt II complex.*

Dinukleární platnatý komplex (AMPZ) [ $\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-pyrazolate})\}^{2+}$ , kde jsou platinová centra spojena azolátovým můstkem, představuje velmi zajímavou alternativu ke konvenční cisplatině. Na základě výsledků předchozí studie, [126] byly výsledky dále rozpracovány k objasnění detailních mechanismů interakce APMZ s DNA. V této práci byly vytvořeny 1,2-GG vnitrořetězcové můstky AMPZ. Byly studovány biofyzikální a biochemické vlastnosti pro tento typ aduktu, které byly za stejných podmínek srovnávány s aduktem cisplatin. Práce byla zaměřena na detailní studium konformačních změn na úrovni DNA, studium termodynamické stability duplexu DNA, rozlišení 1,2-GG vnitrořetězcových můstků proteinem HMGB1 a proteinem účastnícím se nukleotidové excizní opravy, XPA. O těchto proteinech je známo, že se podílí na výsledném cytotoxickém účinku cisplatin. Studie na úrovni DNA prokázaly nižší míru distorze DNA po vazbě AMPZ, což se projevilo v potlačení opravných mechanismů DNA. I rozeznání distorzí proteiny HMG (HMGB1) nebylo tak patrné jako v případě cisplatin. Tímto způsobem byl predikován možný vysoký terapeutický potenciál studované látky.

## 5 ZÁVĚR

Tato disertační práce se zabývá problematikou komplexů těžkých kovů, které do budoucna mohou představovat velmi slibný přístup v terapii nádorových onemocnění.

V rámci řešení disertační práce byla testována řada komplexů platiny, iridia a ruthenia. Převážná většina experimentálních technik byla založena na využití buněčných linií maligního i nemaligního charakteru. *In cellulo* experimenty sloužily zpočátku ke stanovení aktivity studovaných komplexů vůči nádorovým buňkám, posléze byly studovány složitější molekulárně biologické pochody, které byly pozměněny vlivem působení studovaných komplexů a participovaly na iniciaci a průběhu buněčné smrti.

Dílní práce byly zaměřeny zejména na identifikaci hlavních pochodů účastnících se akumulace iridiových a platnatých komplexů, odhalení dominantního druhu buněčné smrti po aplikaci iridiového komplexu, u něhož byl pozorován duální mechanismus působení na úrovni DNA a mitochondrií. Platičité komplexy s inhibitorem histonových deacetyláz, kyselinou valproovou, iniciovaly v nádorových buňkách rozsáhlé epigenetické změny související s hyperacetylací histonů jaderného chromatinu. Hyperacetylace byla výsledkem inhibice činnosti histonových deacetyláz, ale i potlačení exprese samotného enzymu. Projekt vedený na látce v klinickém testování, NAMI-A, odhalil jednu z biologicky aktivních forem, která je odpovědná za biologické působení dané látky. V tomto případě byl navržen postup jak zefektivnit možnou léčbu a potlačit nežádoucí účinky po podání NAMI-A.

Studie provedené v rámci disertační práce přispěly k řešení řady projektů zaměřených na problematiku molekulární farmakologie při terapii nádorových onemocnění. Některé z látek přímo testovaných v rámci disertační práce by se bez pochyby mohly stát pro svoje unikátní biologické vlastnosti novými kandidáty ke klinickým testům. Celkové pojetí práce demonstruje nutný komplexní pohled na tuto tematiku.



## 6 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] A. Sudhakar, „History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods,“ *Journal of Cancer Science & Therapy*, č. 1, pp. 1-4, 2009.
- [2] Č. Altaner, *Buněčná a molekulární biologie rakoviny*, Praha: Radix, spol. s r. o, 2008.
- [3] P. Anand, A. B. Kunnumakkara a A. B. Sundaram, „Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes,“ *Pharmaceutical Research*, č. 25, pp. 2097-116, 2008.
- [4] C. R. UK, „Cancer Research UK Angel Building; London EC1V 4AD,“ <http://www.cancerresearchuk.org>, 2015.
- [5] W. H. Organization, *World Cancer Report 2014*, 2014.
- [6] W. H. Organisation, „<http://www.who.int>,“ 2015.
- [7] C. Orvig a M. J. Abrams, „Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction,“ *Chemical Reviews*, č. 99, pp. 2201-4, 1999.
- [8] B. Rosenberg, L. Camp a T. Krigas, „Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode,“ *Nature*, č. 5, pp. 698-9, 1965.
- [9] K. H. Thompson a C. Orvig, „Boon and Bane of Metal Ions in Medicine,“ *Science*, č. 9, pp. 936-9, 2003.
- [10] D. Lebwohl a R. Canetta, „Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update,“ *European Journal of Cancer*, č. 34, pp. 1522-34, 1998.
- [11] I. Kostova, „Platinum complexes as anticancer agents,“ *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, č. 1, pp. 1-22, 2006.
- [12] G. Sava, A. Bergamo a P. J. Dyson, „Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: what comes next?,“ *Dalton Transactions*, č. 40, pp. 9069-75, 2011.

- [13] D. Wang a S. J. Lippard, „Cellular processing of platinum anticancer drugs,“ *Nature Reviews Drug Discovery*, č. 4, pp. 307-20, 2005.
- [14] E. R. Jamieson a S. J. Lippard, „Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts,“ *Chemical Reviews*, č. 99, pp. 2467-98, 1999.
- [15] V. Cepeda, A. F. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo a J. M. Pérez, „Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity,“ *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, č. 7, pp. 3-18, 2007.
- [16] A. Halamikova, O. Vrana, J. Kasparikova a V. Brabec, „Biochemical studies of the thermal effects on DNA modifications by the antitumor cisplatin and their repair,“ *ChemBioChem*, č. 8, pp. 2008-15, 2007.
- [17] F. A. Blommaert, H. C. Dijk-Knijnenburg, F. J. Dijt, L. Engelse, R. A. Baan, F. Berends a A. M. Fichtinger-Schepman, „Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells,“ *Biochemistry*, č. 34, pp. 8474-80, 1995.
- [18] M. Kartalou a J. M. Essigmann, „Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins,“ *Mutation Research*, č. 478, pp. 1-21, 2001.
- [19] J. A. Rice, D. M. Crothers, A. L. Pinto a S. J. Lippard, „The major adduct of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA bends the duplex by approximately equal to 40 degrees toward the major groove,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, č. 85, pp. 4158-61, 1988.
- [20] G. E. Damsma, A. Alt, F. Brueckner, T. Carell a P. Cramer, „Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA,“ *Nature Structural & Molecular Biology*, č. 14, pp. 1127-33, 2007.
- [21] R. C. Todd a S. J. Lippard, „Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds,“ *Metallomics*, č. 1, pp. 280-91, 2009.

- [22] V. Brabec a J. Kasparkova, „Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs,“ *Drug Resistance Updates*, č. 5, pp. 147-61, 2002.
- [23] B. Köberle, M. T. Tomicic, S. Usnova a B. Kaina, „Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications,“ *Biochimica et Biophysica acta*, č. x, pp. 1-11, 2010.
- [24] J. Reedijk, „Improved understanding in platinum antitumour chemistry,“ *Chemical Communications*, č. 7, pp. 801-6, 1996.
- [25] J. Pracharova, T. Saltarella, T. Radosova Muchova, S. Scintilla, V. Novohradsky, O. Novakova, F. P. Intini, G. Natile, P. Ilik, V. Brabec a J. Kasparkova, „Novel antitumor cisplatin and transplatin derivatives containing 1-Methyl-7-Azaindole: synthesis, characterization, and cellular responses,“ *Journal of Medicinal Chemistry*, č. 58, pp. 847-859, 2015.
- [26] N. Farrell, „Current status of structure-activity relationships of platinum anticancer drugs: Activation of trans geometry,“ *Metal ions in biological systems*, č. 32, pp. 603-39, 1996.
- [27] M. Leng, D. Locker, M. J. Giraud-Panis, A. Schwartz, F. P. Intini a G. Natile, „Replacement of an NH<sub>3</sub> by an iminoether in transplatin makes makes an antitumor drug from inactive compound,“ *Molecular Pharmacology*, č. 58, p. 1525, 2000.
- [28] M. Frybortova, O. Novakova, J. Stepankova, V. Novohradsky, D. Gibson, J. Kasparkova a V. Brabec, „Activation of trans geometry in bifunctional mononuclear platinum complexes by a non-bulky methylamine ligand,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, č. 126, pp. 46-54, 2013.
- [29] T. Fojo, N. Farrell, W. Ortuzar, H. Tanimura, J. Weinstein a T. G. Myers, „Identification of non-cross-resistant platinum compounds with novel cytotoxicity profiles using the NCI anticancer drug screen and clustered image map visualizations,“ *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, č. 53, pp. 25-34, 2005.

- [30] J. Pracharova, L. Zerzankova, J. Stepankova, O. Novakova, N. J. Farrer, P. J. Sadler, V. Brabec a J. Kasparikova, „Interactions of DNA with a new platinum(IV) azide dipyridine complex activated by UVA and visible light: relationship to toxicity in tumor cells,“ *Chemical Research in Toxicology*, č. 25, pp. 1099-111, 2012.
- [31] M. D. Hall a T. W. Hambley, „Platinum(IV) antitumour compounds; their bioinorganic chemistry,“ *Coordination Chemistry Reviews*, č. 232, pp. 49-67, 2002.
- [32] M. D. Hall, H. R. Mellor, R. Callaghan a T. W. Hambley, „Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes,“ *Journal of Medicinal Chemistry*, č. 15, pp. 3403-3411, 2007.
- [33] L. T. Ellis, H. M. Er a T. W. Hambley, „The influence of the axial ligands of a series of platinum(IV) anti-cancer complexes on their reduction to platinum(II) and reaction with DNA,“ *Australian Journal of Chemistry*, č. 48, pp. 793-806, 1995.
- [34] V. Novohradsky, L. Zerzankova, J. Stepankova, Vrana O., R. Raveendran, D. Gibson, J. Kasparikova a V. Brabec, „Antitumor platinum(IV) derivatives of oxaliplatin with axial valproato ligands,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, č. 140, pp. 72-79, 2014.
- [35] H. R. Mellor, S. Snelling, M. D. Hall, S. Modok, M. Jaffar, T. W. Hambley a R. Callaghan, „The influence of tumour microenvironmental factors on the efficacy of cisplatin and novel platinum(IV) complexes,“ *Biochemical Pharmacology*, č. 70, pp. 1137-46, 2005.
- [36] J. M. Brown, „Tumor hypoxia in cancer therapy,“ *Methods in Enzymology*, č. 435, pp. 297-321, 2007.
- [37] A. Bhargava a U. N. Vaishampayan, „Satraplatin: leading the new generation of oral platinum agents,“ *Expert Opinion on Investigational Drugs*, č. 18, pp. 1787-97, 2009.
- [38] Food and Drug Administration, „Oficiální zdroj FDA,“ *Food and Drug Administration*, 2015.

- [39] D. S. Terman, B. L. Viglianti, R. Zennadi, D. Fels, R. J. Boruta, H. Yuan a M. R. Dreher, „Sickle Erythrocytes Target Cytotoxics to Hypoxic Tumor Microvessels and Potentiate a Tumoricidal Response,“ *Plos One*, č. 8, pp. 1-11, 2013.
- [40] Z. Huang, „A review of progress in clinical photodynamic therapy,“ *Technology in Cancer Research & Treatment*, č. 4, pp. 283-293, 2005.
- [41] R. R. Allison a K. Moghissi, „Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms,“ *Clinical Endoscopy*, č. 46, pp. 24-9, 2013.
- [42] N. A. Kratochwil a P. J. Bednarski, „Relationships between reduction properties and cancer cell growth inhibitory activities of cis-dichloro- and cis-diiodo-Pt(IV)-ethylenediamines,“ *Archiv der Pharmazie*, č. 332, pp. 279-85, 1999.
- [43] K. R. Barnes, A. Kutikov a S. J. Lippard, „Synthesis, characterization, and cytotoxicity of a series of estrogen-tethered platinum(IV) complexes,“ *Chemical Biology*, č. 11, pp. 557-564, 2004.
- [44] W. H. Ang, I. Khalaila, C. S. Allardyce, L. Juillerat-Jeanneret a P. J. Dyson, „Rational design of platinum(IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance,“ *Journal of American chemical society*, č. 127, pp. 1382-1383, 2005.
- [45] P. W. Stacpoole, N. V. Nagaraja a A. D. Hutson, „Efficacy of dichloroacetate as a lactate lowering,“ *Journal of Clinical Pharmacology*, č. 43, pp. 683-691, 2003.
- [46] S. Bonnet, „A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth,“ *Cancer cell*, č. 11, pp. 37-51, 2007.
- [47] S. Dhar a S. J. Lippard, „Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate,“ *PNAS*, č. 52, pp. 22199-22204, 2009.
- [48] J. Yang, X. Sun, W. Mao, M. Sui, J. Tang a Y. Shen, „Conjugate of Pt(IV)-histone deacetylase inhibitor as prodrug for cancer chemotherapy,“ *Molecular pharmaceuticals*, č. 9(10), pp. 2793-800, 2012.

- [49] V. Tong, X. W. Teng, T. K. H. Chang a F. S. Abbott, „Valproic acid II: Effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes,“ *Toxicological sciences*, č. 86(2), pp. 436-443, 2005.
- [50] A. L. Rodd, K. Ververis a T. C. Karagiannis, „Current and emerging therapeutics for cutaneous T-Cell lymphoma: histone deacetylase inhibitors,“ *Lymphoma*, č. 2012, pp. 1-10, 2012.
- [51] S. Grant a C. Easley, „Vorinostat,“ *Nature Reviews Drug Discovery*, č. 6, pp. 21-2, 2007.
- [52] V. M. Richon, „Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor,“ *British Journal of Cancer*, č. 95, pp. 2-6, 2006.
- [53] V. Brabec, D. M. Griffith, A. Kisova, H. Kostrhunova a L. Zerzankova, „Valuable Insight into the Anticancer Activity of the Platinum-Histone Deacetylase Inhibitor Conjugate, cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>malSAHA-2H],“ *Molecular Pharmaceutics*, č. 9, pp. 1990-9, 2012.
- [54] Z. Liu a P. J. Sadler, „Organoiridium complexes: Anticancer agents and catalysts,“ *Accounts of Chemical Research*, č. 47, pp. 1174-85, 2014.
- [55] T. Giraldi, G. Sava, G. Mestroni, G. Zassinovich a D. Stolfà, „Antitumour action of Rhodium(I) and iridium(I) complexes,“ *Chemico-Biological Interactions*, č. 22, pp. 231-8, 1978.
- [56] G. Sava, S. Zorzet, L. Perissin, G. Mestroni, G. Zassinovich a A. Bontempi, „Coordination metal complexes of Rh(I), Ir(I) and Ru(II): Recent advances on antimetastatic activity on solid mouse tumors,“ *Inorganica Chimica Acta*, č. 137, pp. 69-71, 1987.

- [57] I. Romero-Canelón a P. J. Sadler, „Next-generation metal anticancer complexes: Multitargeting via redox modulation,“ *Inorganic Chemistry*, č. 52, pp. 12276-91, 2013.
- [58] L. Helm a A. E. Merbach, „Water exchange on metal ions: Experiments and simulations,“ *Coordination Chemistry Reviews*, č. 187, pp. 151-81, 1999.
- [59] Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, S. A. Fletcher, A. Kisova, O. Vrana, L. Salassa, P. C. A. Bruijninx, V. Brabec a P. J. Sadler, „Organometallic half-sandwich iridium anticancer complexes,“ *Journal of Medicinal Chemistry*, č. 54, pp. 3011-3026, 2011.
- [60] Z. Liu, L. Salassa, A. Habtemariam, A. M. Pizzaro, G. J. Clarkson a P. J. Sadler, „Contrasting reactivity and cancer cell cytotoxicity of isoelectric organometallic iridium(III) complexes,“ *Inorganic Chemistry*, č. 50, pp. 5777-83, 2011.
- [61] V. Novohradsky, Z. Liu, M. Vojtiskova, P. J. Sadler, V. Brabec a J. Kasparkova, „Mechanism of cellular accumulation of an iridium(III) pentamethylcyclopentadienyl anticancer complex containing a C,N-chelating ligand,“ *Metallomics*, č. 6, pp. 682-90, 2014.
- [62] S. Schafer a W. S. Sheldrick, „Coligand Tuning of the DNA Binding Properties of Half-Sandwich Organometallic Intercalators,“ *Journal of Organometallic Chemistry*, č. 692, pp. 1300-9, 2007.
- [63] M. A. Scharwitz, I. Ott, R. Gust, A. Kromm a W. S. Sheldrick, „Synthesis, cellular uptake and structure-activity relationships for potent cytotoxic trichloridoiridium(III) polypyridyl complexes,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, č. 102, pp. 1623-30, 2008.
- [64] J. M. Hearn, I. Romero-Canelón, B. Qamar, Z. Liu, I. Hands-Portman a P. J. Sadler, „Organometallic iridium(III) anticancer complexes with new mechanisms of action: NCI-60 screening, mitochondrial targeting, and apoptosis,“ *ACS Chemical Biology*, č. 8, pp. 1335-43, 2013.

- [65] G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto a A. Bergamo, „Dual Action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen,“ *Clinical Cancer Research*, č. 9, pp. 1898-905, 2003.
- [66] P. Schluga, C. G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M. A. Jakupec a B. K. Keppler, „Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP,“ *Dalton Transactions*, č. 14, pp. 1796-802, 2006.
- [67] I. Kostova, „Ruthenium complexes as anticancer agents,“ *Current Medicinal Chemistry*, č. 13, pp. 1085-107, 2006.
- [68] R. E. Moris, R. E. Aird, P. S. Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons a P. J. Sadler, „Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes,“ *Journal of Medicinal Chemistry*, č. 44, pp. 3616-21, 2001.
- [69] C. Scolaro, A. Bergamo, N. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurency, T. J. Geldbach, G. Sava a P. J. Dyson, „In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes,“ *Journal of Medicinal Chemistry*, č. 48, pp. 4161-71, 2005.
- [70] B. Rosenberg, „Clinical aspects of platinum anticancer drugs,“ *Metal Ions in Biological Systems*, č. 11, pp. 127-196.
- [71] A. Almeida, B. L. Oliveira, J. D. G. Correia, G. Soveral a A. Cassini, „Emerging protein targets for metal-based pharmaceutical agents: An update,“ *Coordination chemical reviews*, č. 257, pp. 2689-2704, 2013.
- [72] V. Brabec a J. Kasparkova, „Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs,“ *Drug resistance updates*, č. 5, pp. 147-161, 2002.
- [73] K. M. Giacomini, S. M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet a K. L. Z. Brouwer, „Membrane transporters in drug development,“ *Nature Reviews Drug Discovery*, č. 9, pp. 215-236, 2010.



- [74] H. Burger, W. J. Loos, C. Eechoute a J. Verweij, „Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance,“ *Drug Resistance Updates*, č. 14, pp. 22-34, 2010.
- [75] M. A. Hedinger, M. F. Romero, J. B. Peng, A. Rolfs, H. Takanaga a E. A. Bruford, „The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins-introduction,“ *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, č. 447, pp. 465-468, 2004.
- [76] S. Spreckelmeyer, C. Orvig a A. Casini, „Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallogrugs: An overview beyod cisplatin,“ *Molecules*, č. 19, pp. 15584-15610, 2014.
- [77] H. Ohrvik a D. J. Thiele, „The role of Ctr1 and Ctr2 in mammalian copper homeostasis and platinum-based chemotherapy,“ *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, č. 14, pp. 47-9, 2014.
- [78] S. B. Howel, R. Safaei, C. A. Larson a M. J. Sailor, „Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs,“ *Molecular Pharmacology*, č. 77, pp. 22-34, 2010.
- [79] I. S. Song, N. Savaraj, Z. H. Siddik, P. Liu a Y. Wei, „Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells,“ *Molecular Cancer Therapeutics*, č. 3, pp. 1543-1549, 2004.
- [80] G. Ciarimboli, T. Ludwig, D. F. Lang, H. Pavenstadt, H. Koepsell, H. J. Piechota a J. Haier, „Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2,“ *American Journal of Pathology*, č. 167, pp. 1477-84, 2005.
- [81] H. Katsuda, M. Yamashita, H. Katsura, J. Yu, Y. Waki, N. Nagata, Y. Sai a K. Miyamoto, „Protecting cisplatin-induced nephrotoxicity with cimetidine does not affect antitumor activity,“ *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, č. 33, pp. 1867-71, 2010.

- [82] M. Aoki, T. Terada, M. Kajiwara, K. Ogasawara, I. Ikai a O. Ogawa, „Kidney-specific expression of human organic cation transporter 2 (OCT2/SLC22A2) is regulated by DNA methylation,“ *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, č. 1, pp. 165-70, 2008.
- [83] K. Bogman, A. K. Peyer a M. Torok, „HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation,“ *British Journal of Pharmacology*, č. 132, pp. 1183-92, 2001.
- [84] P. Heffeter, M. Pongratz, E. Steiner, P. Chiba, M. A. Jakupec a L. Elbling, „Intrinsic and acquired forms of resistance against the anticancer ruthenium compound KP1019 [indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate (III)] (FFC14A),“ *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, č. 312, pp. 281-9, 2005.
- [85] S. G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng a S. Chittaboina, „Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding,“ *Science*, č. 323, pp. 1718-22, 2009.
- [86] J. Li, K. F. Jaimes a S. G. Aller, „Refined structures of mouse P-glycoprotein,“ *Protein Science*, č. 23, pp. 34-46, 2014.
- [87] S. P. Cole, G. Bhardway a J. H. Gerlach, „Overexpresion of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line,“ *Science*, č. 258, pp. 1650-54, 1992.
- [88] S. P. Cole a R. G. Deeley, „Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1,“ *Trends in Pharmacological Sciences*, č. 27, pp. 438-46, 2006.
- [89] T. Ishikawa a F. A. Osman, „Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells,“ *The Journal of Biological Chemistry*, č. 268, pp. 20116-125, 1993.
- [90] S. Childs, R. L. Yeh a D. Hui, „Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein,“ *Cancer Research*, č. 58, pp. 4160-67, 1998.

- [91] L. M. Laing, M. G. Belinsky a G. D. Kruh, „Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells,“ *Cancer research*, č. 58, pp. 1332-37, 1998.
- [92] S. W. G. Tait, G. Ichim a D. R. Green, „Die another way-non-apoptotic mechanisms of cell death,“ *The Company of Biologists, Journal of Cell Science*, č. 127, pp. 2135-44, 2014.
- [93] S. Orrenius, P. Nicotera a B. Zhivotovsky, „Cell death mechanisms and their implications in toxicology,“ *Toxicological sciences*, č. 119, pp. 3-19, 2011.
- [94] S. Yang, C. Wang, M. D. Minden a E. A. McCulloch, „Fluorescence labeling of nicks in DNA from Leukemic blast cells as a measure of damage following cytosine arabinoside: application to the study of drug sensitivity,“ *Leukemia*, č. 8, pp. 2052-59, 1994.
- [95] G. Hacker, „The morphology of apoptosis,“ *Cell Tissue Research*, č. 301, pp. 5-17, 2000.
- [96] U. Ziegler a P. Groscurth, „Morphological features of cell death,“ *News in Physiological Science*, č. 19, pp. 124-128, 2004.
- [97] G. Kroemer, W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele a B. Zhivotovsky, „Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death,“ *Cell Death & Differentiation - Nature*, č. 12, pp. 1463-67, 2005.
- [98] G. Manjo a I. Joris, „Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death,“ *American Journal of Pathology*, č. 146, pp. 3-15, 1995.
- [99] R. S. Y. Wong, „Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment,“ *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, č. 30, pp. 1-14, 2011.

- [100] V. Novohradsky, L. Zerzankova, J. Stepankova, J. Kasparikova a V. Brabec, „A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half sandwich,“ *Metallomics*, č. 6, pp. 1491-1501, 2014.
- [101] M. O. Hengartner, „Apoptosis: corralling the corpses,“ *Cell*, č. 104, pp. 325-8, 2000.
- [102] P. Schneider a J. Tschopp, „Apoptosis induced by death receptors,“ *Pharmaceutica Acta Helveticae*, č. 74, pp. 281-6, 2000.
- [103] M. A. O'Brien a R. Kirby, „Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease,“ *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, č. 18, pp. 572-85, 2008.
- [104] N. N. Danial a S. J. Korsmeyer, „Cell death: Critical control points,“ *Cell*, č. 116, pp. 205-19, 2004.
- [105] J. C. Reed, „Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in haematologic malignancies,“ *Seminars in Hematology*, č. 34, pp. 9-19, 1997.
- [106] G. Kroemer, L. Galluzzi a C. Brenner, „Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death,“ *Physiological Reviews*, č. 87, pp. 99-163, 2007.
- [107] E. C. LaCasse, D. J. Mahoney, H. H. Cheung, S. Plenchette, S. Baird a R. G. Komeluk, „IAP-targeted therapies for cancer,“ *Oncogene*, č. 27, pp. 6252-75, 2008.
- [108] E. Szegenzi a U. Fitzgerald, „Caspase-12 and ER stress mediated apoptosis: The story so far,“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, č. 1010, pp. 186-94, 2003.
- [109] I. M. Ghobrial, T. E. Witzig a A. A. Adjei, „Targeting apoptosis pathways in cancer therapy,“ *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, pp. 178-94, 55.
- [110] M. Calvino-Fernández a T. Parra-Cid, „H. pylori and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress,“ *Revista española de enfermedades digestivas*, č. 102, pp. 41-50, 2010.

- [111] T. C. Alberschardt, B. L. Salemi, R. S. Soderquist, D. J. Bates a A. A. Pletnev, „Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and upregulating BH-3 protein NOXA,“ *Journal of Biological Chemistry*, č. 286, pp. 24882-95, 2011.
- [112] F. M. Boeckler, A. C. Joerger, G. Jaggi, T. J. Rutherford a D. B. Veprintsev, „Targeted rescue of a destabilised mutant of p53 by an in silico screened drug,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, č. 105, pp. 1360-65, 2008.
- [113] C. T. Yang, J. M. Li, H. H. Weng, Y. C. Li, H. C. Chen a M. F. Chen, „Adenovirus-mediated transfer of siRNA against Survivin enhances the radiosensitivity of human non-small cell lung cancer cells,“ *Cancer Gene Therapy*, č. 17, pp. 120-30, 2010.
- [114] J. L. Rohn a M. H. Noteborn, „The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific processes,“ *Apoptosis*, č. 9, pp. 315-22, 2004.
- [115] V. Novohradsky, A. Bergamo, M. Cocchietto, J. Zajac, V. Brabec, G. Mestroni a G. Sava, „Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics and biological activity,“ *Dalton Transactions*, č. 44, pp. 1905-13, 2015.
- [116] K. I. Yakovlev, N. D. Rozhkova a A. I. Stetsenko, *Journal of Inorganic chemistry*, č. 41, p. 757, 1996.
- [117] J. Mlcouskova, J. Malina, V. Novohradsky, J. Kasparikova, S. Komeda a V. Brabec, „Energetics, conformation, and recognition of DNA duplexes containing a major adduct of an anticancer azolato-bridged dinuclear PtII complex,“ *Biochimica et Biophysica Acta*, č. 1820, pp. 1502-1511, 2012.
- [118] K. Valkó, „Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution,“ *Journal of Chromatography A*, č. 1037, pp. 299-310, 2004.

- [119] J. P. Gong, F. Traganos a Z. Darzynkiewicz, „A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry,“ *Analytical Biochemistry*, č. 218, pp. 314-19, 1994.
- [120] J. P. Robinson, L. H. Bruner, C. F. Bassoe, J. L. Hudson, P. A. Ward a S. H. Phan, „Measurement of intracellular fluorescence of human-monocytes relative to oxidative metabolism,“ *Journal of Leukocyte Biology*, č. 43, pp. 304-10, 1988.
- [121] S. M. Aris, D. A. Gewirtz, J. J. Ryan, K. M. Knott a N. P. Farrell, „Promotion of DNA strand breaks, interstrand cross-links and apoptotic cell death in A2780 human ovarian cancer cells by transplatinum planar amine complexes,“ *Biochemical Pharmacology*, č. 73, pp. 1749-57, 2007.
- [122] J. D. Amaral, J. M. Xavier, C. J. Steer a C. M. P. Rodrigues, „The role of p53 in apoptosis,“ *Discovery Medicine*, č. 9, pp. 145-52, 2010.
- [123] F. Bunz, A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, P. J. Brown, J. M. Sedivy, K. W. Kinzler a B. Vogelstein, „Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage,“ *Science*, č. 282, pp. 1497-1501, 1998.
- [124] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou a S. Xie, „PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel,“ *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, č. 99, pp. 306-314, 2010.
- [125] M. Vadori, F. Pacor, F. Vita, S. Zorzet, M. Cocchietto a G. Sava, „Features and full reversibility of the renal toxicity of the ruthenium-based drug NAMI-A in mice,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, č. 118, pp. 21-7, 2013.
- [126] J. Mlcouskova, J. Kasparikova, T. Suchankova, S. Komeda a V. Brabec, „DNA conformation and repair of polymeric natural DNA damaged by antitumor azolato-bridged dinuclear Pt(II) complex,“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, č. 114, pp. 15-23, 2012.

SEZNAM LITERATURY

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP7A/B	Měď transportující ATPáza
ABC	ABC transportní protein s ATP vázající doménou
AIF	Apoptózu indukující faktor
Bpy	Bipyridin
CTCL	Cutaneous T cell lymphoma
Ctrl	Transportér měďnatých kationtů
DCA	Dichloracetát
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dppn	Difenylpirazidin
Dppy	Difenylfosfino pyridin
Dpq	Difenyl chinolin
FAAS	Bezplamenová atomová absorpční spektrometrie
FBS	Bovinní fetální sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GST	Glutathion <i>S</i> -transferáza
HAT	Histon-acetyl transferáza
HDAC	Histonová deacetyláza
HtrA2	Omi/high temperature requirement protein A
MRP1	Multidrug resistantní protein
MTT	(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid)
NR	Neutrální červeň
NSCLC	Nemalobuněčný plicní karcinom
OCT	Transportér organických kationtů
PBS	Fosfátový pufr
PDK	Pyruvátdehydrogenázová kináza
PDT	Fotodynamická terapie
p-gp	P-glykoprotein
Phen	Fenantrolin
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SAHA	Suberoyl hydroxamová kyselina
SAR	Strukturně-aktivitní vztah
SLC	Solute carrier proteiny
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SRB	Sulforhodamin B
TNF	Tumor necrosis factor
VPA	Valproová kyselina
WHO	Světová zdravotnická organizace



## 8 CURRICULUM VITAE

### PERSONAL INFORMATIONS

Vojtěch Novohradský  
Purkyňova 452/3, Žďár nad Sázavou 2, 59102  
novohradskyv@gmail.com  
+420 722 749 487

### EDUCATION

- |   |  |
|---|--|
| Palacký University, Olomouc; Faculty of Science<br>Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the<br>Czech Republic, v. v. i.<br><i>Doctoral thesis: Modification of Biomacromolecules<br/>by Metallodrugs: Improvement of the Theoretical<br/>Background for the Development of new Anticancer<br/>Drugs.</i> | <b>2011-present</b><br>(Ph.D. Candidate) |
| Palacký University, Olomouc; Faculty of Science<br><i>Master thesis: Mechanistic study of translesion DNA<br/>synthesis across a damage by antitumor metal based<br/>complexes</i>  | <b>2009-2011</b><br>(Master, Mgr.)       |
| Palacký University, Olomouc; Faculty of Science<br><i>Bachelor thesis: Superparamagnetic iron oxides as<br/>negative contrast agents for MRI.</i>   | <b>2006-2009</b><br>(Bachelor, Bc.)      |

## TEACHING EXPERINCE

Practise of microscopy and spectroscopy

Spring 2012

## RESEARCH FELLOWSHIP

**9/2014 – 12/2014**

Department of Life Sciences, University of Trieste, via L. Giorgieri 7, 34127 Trieste, Italy  
Callerio Foundation, via A. Fleming 22-31, 34127 Trieste, Italy

## CONFERENCE CONTRIBUTIONS

Novohradský V. (2014; Poster) A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex. International Symposium on Bioorganometallic Chemistry – ISBOMC 2014, Vienna, July 22nd – 25th

Novohradský V. (2014). Dual mechanism of action of a new antitumor Pt(IV) derivatives of oxaliplatin. Metalodrugs III: “From DNA interactions to chemotherapy of cancer.” Olomouc, 29 – 31 May

Novohradský V. (2013). Cellular accumulation of cytotoxic iridium compounds. COST action CM1105, Working group #4 meeting. Metalodrugs II: “Design and mechanism of action.” Olomouc, 21 - 23 March

Novohradský V. (2012). Biophysical functions of some new anticancer metallo-based compounds. Conference of young scientists: Structure and interaction of biomolecules. Brno, 26 April

## LANGUAGE SKILLS

Czech – native

English – fluent

German – fluent

**9 SEZNAM PUBLIKACÍ**

**Novohradsky V.**, Zerzankova L., Stepankova J., Vrana O., Raveendran R., Gibson D., Kasparkova J., Brabec V. (2014) Antitumor platinum(IV) derivatives of oxaliplatin with axial valproate ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* 140, 72-79

**Novohradsky V.**, Liu Z., Vojtiskova M., Sadler P.J., Brabec V., Kasparkova J. (2014) Mechanism of cellular accumulation of an iridium(III) pentamethylcyclopentadienyl anticancer complex containing a C,N-chelating ligand. *Metallomics* 6, 682-690

**Novohradsky V.**, Zerzankova L., Stepankova J., Kisova A., Kostrhunova H, Liu Z., Adler P.J., Kasparkova J., Brabec V. (2014) A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex. *Metallomics* 6, 1491-1501

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

Pracharova J., Saltarella T., Radosova Muchova T., Scintilla S., **Novohradsky V.**, Novakova O., Intini F.P., Pacifico C., Natile G., Ilik P., Brabec V., Kasparkova J. (2015) Novel antitumor cisplatin and transplatin derivatives containing 1-methyl-7-azaindole: Synthesis, characterization, and cellular responses. *Journal of Medical Chemistry* 58, 847-859

Mlcouskova J., Malina J., **Novohradsky V.**, Kasparkova J., Komeda S., Brabec V. (2012) Energetics, conformation, and recognition of DNA duplexes containing a major adduct of antitumor azolato-bridged dinuclear Pt II complex. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1820, 1502-1511

Olivova R., Stepankova J., Muchova T., **Novohradsky V.**, Novakova O., Vrana O., Kasparkova J., Brabec V. (2012) Mechanistic insights into toxic effects of a benzotriazolate-

bridged dinuclear platinum(II) compound in tumor cells. *Inorganica Chimica Acta* 393, 204-211

Frybortova M., Novakova O., Stepankova J., **Novohradsky V.**, Gibson D., Kasparikova J., Brabec V. (2013) Activation of trans geometry in bifunctional mononuclear platinum complexes by a non-bulky methylamine ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry* 126, 46-54

## **10 PŘÍLOHY**

**10.1 PUBLIKACE Č. 1**

---

**ANTITUMOR PLATINUM(IV) DERIVATIVES OF OXALIPLATIN WITH  
AXIAL VALPROATO LIGANDS**

**Novohradsky V., Zerzankova L., Stepankova J., Vrana O., Raveendran R., Gibson D.,  
Kasparkova J., Brabec V.**

*Journal of Inorganic Biochemistry 140 (2014), 72-79*

---

Prohlašuji, že můj podíl na publikaci je následující:

Stanovení cytotoxicity komplexů, měření rozdělovacího koeficientu (logP), studium buněčné akumulace, stanovení platinace DNA v buňkách, příprava jaderných extraktů s následnou analýzou histon deacetylázové aktivity.

.....



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jinorgbio](http://www.elsevier.com/locate/jinorgbio)

## Antitumor platinum(IV) derivatives of oxaliplatin with axial valproato ligands



Vojtech Novohradsky<sup>a,b</sup>, Lenka Zerzankova<sup>a</sup>, Jana Stepankova<sup>a</sup>, Oldrich Vrana<sup>a</sup>, Raji Raveendran<sup>c</sup>, Dan Gibson<sup>c</sup>, Jana Kasparkova<sup>b</sup>, Viktor Brabec<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute for Drug Research, School of Pharmacy, The Hebrew University, Jerusalem 91120, Israel

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 April 2014

Received in revised form 1 June 2014

Accepted 6 July 2014

Available online 15 July 2014

#### Keywords:

Platinum(IV) prodrugs

Anticancer

Histone deacetylase

Oxaliplatin

Valproic acid

Dual targeting

### ABSTRACT

We report new anticancer prodrugs, platinum(IV) derivatives of oxaliplatin conjugated with valproic acid (VPA), a well-known drug having histone deacetylase inhibitory activity. Like most platinum(IV) derivatives, the cytotoxicity of the conjugates was lower in cell culture than that of oxaliplatin, but greater than those of its Pt(IV) derivative containing biologically inactive axial ligands in several cancer cell lines. Notably, these conjugates display activity in both cisplatin sensitive- and resistant tumor cells capable of both markedly enhanced accumulation in tumor cells and acting in a dual threat manner, concurrently targeting histone deacetylase and genomic DNA. These results demonstrate the dual targeting strategy to be a valuable route to pursue in the design of platinum agents which may be more effective in cancer types that are typically resistant to therapy by conventional cisplatin. Moreover, platinum(IV) derivatives containing VPA axial ligands seem to be promising dual-targeting candidates for additional preclinical studies.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Despite the success of conventional antitumor platinum drugs, such as cisplatin [*cis*-diamminedichloridoplatinum(II)], carboplatin [*cis*-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II)] or oxaliplatin [(1*R*,2*R*)-diaminocyclohexane]oxalatoplatinum(II)], the emergence of drug resistance is a major cause of treatment failure [1,2]. Studies, performed with the goal to put forth strategies to overcome resistance of tumor cells to conventional platinum drugs, have revealed that the mechanisms of resistance of tumor cells to platinum drugs are multifactorial processes. Moreover, these studies have also shown that the inhibition of single pathways that sustain cisplatin resistance fails to restore sensitivity to normal levels [3]. These findings gave impetus to design several conjugated platinum complexes with dual functionality to improve antitumor activity of platinum drugs.

A class of such platinum agents involves bifunctional molecules in which various histone deacetylase inhibitors (HDACis) were tethered to a Pt(II)-based DNA binding agent [4–6]. HDACs are key regulators of chromatin structure and transcription. The design of these conjugated metalloprodrugs was inspired by the thesis that combining classic chemotherapy by conventional antitumor agents with epigenetic drugs shows promise as the latter have been proven to have anticancer activity both

in vitro and in vivo [7–9]. Agents, such as HDACis, that induce hyperacetylation of histone proteins complexed with DNA could increase the accessibility of DNA within chromatin [3,10,11] and consequently potentiate the anticancer activities of metalloprodrugs, such as DNA-binding platinum complexes. These facts suggest that simultaneous HDAC inhibition and DNA damage triggering apoptosis, autophagy and cell death could be a viable alternative approach in cancer therapy.

As regards Pt(II)-HDACi conjugates [4–6], it was anticipated that these new conjugated agents after accumulation in tumor cells will aquate in the cytoplasm releasing simultaneously Pt(II) complex capable of coordinating to DNA base residues and HDACi which will increase the accessibility of DNA within chromatin to this Pt(II) agent so that a higher degree of DNA damage mediated by the Pt(II) agent would be achieved. Unfortunately, the anticipated enhancement of toxicity of these Pt(II)-HDACis in tumor cells (due to dual functionality of these conjugated Pt(II) complexes) has not been evident, apparently since the covalent linker group negatively impacted these processes [12].

We and others have been exploring strategies to conjugate an HDACi to Pt(IV) complex. These strategies employ substitutionally inert octahedral Pt(IV) compounds [13], which serve as prodrugs and release clinically effective levels of the square planar Pt(II) compounds, such as cisplatin, following cellular uptake and intracellular reduction [14–16]. Appropriately designed Pt(IV) complexes are less likely to be deactivated before reaching their cancer cell destination target, can modulate the lipophilicity (and thus the ability to enter the tumor

\* Corresponding author. Tel.: +420 541517148; fax: +420 541240499.  
E-mail address: [brabec@ibp.cz](mailto:brabec@ibp.cz) (V. Brabec).

## 10.2 PUBLIKACE Č. 2

---

**MECHANISM OF CELLULAR ACCUMULATION OF AN IRIDIUM(III)  
PENTAMETHYLCYCLOPENTADIENYL ANTICANCER COMPLEX  
CONTAINING A C, N-CHELATING LIGAND**

Novohradsky V., Liu Z., Stepankova J., Vojtiskova M., Sadler P. J., Brabec V.,  
Kasparkova J.

*Metallomics 6 (2014), 682-690*

---

Prohlašuji, že můj podíl na publikaci je následující:

Provedení, interpretace a vyhodnocení experimentů zaměřených na stanovení cytotoxicity studovaných komplexů, stanovení rozdělovacích koeficientů. Navržení, provedení a interpretace všech experimentů, týkajících se mechanismů transportu studovaného komplexu iridia dovnitř a ven z buněk.

.....





# Metallomics

## PAPER

View Article Online  
View Journal | View Issue

Cite this: *Metallomics*, 2014, 6, 682

## Mechanism of cellular accumulation of an iridium(III) pentamethylcyclopentadienyl anticancer complex containing a C,N-chelating ligand†

Vojtech Novohradsky,<sup>ab</sup> Zhe Liu,<sup>c</sup> Marie Vojtiskova,<sup>b</sup> Peter J. Sadler,<sup>c</sup> Viktor Brabec<sup>a</sup> and Jana Kasparkova<sup>a,b</sup>

The effect of replacement of the *N,N*-chelating ligand 1,10-phenanthroline (phen) in the Ir<sup>III</sup> pentamethylcyclopentadienyl (Cp\*) complex [(η<sup>5</sup>-Cp\*)(Ir)(phen)Cl]<sup>+</sup> (**2**) with the *C,N*-chelating ligand 7,8-benzoquinoline (bq) to give [(η<sup>5</sup>-Cp\*)(Ir)(bq)Cl] (**1**) on the cytotoxicity of these Cp\*Ir<sup>III</sup> complexes toward cancer cell lines was investigated. Complex **2** is inactive, similar to other Cp\*Ir<sup>III</sup> complexes containing the *N,N*-chelating ligands. In contrast, a single atom change (C<sup>-</sup> for N) in the chelating *N,N* ligand resulted in potency in human ovarian carcinoma cisplatin-sensitive A2780 cells, and, strikingly, **1** is active in the cisplatin-resistant human breast cancer MCF-7 and A2780/cisR cells. Replacement of the *N,N*-chelating ligand with the *C,N*-chelating ligand gives rise to increased hydrophobicity, leading to higher cellular accumulation, higher DNA-bound iridium in cells and higher cytotoxicity. The pathways involved in cellular accumulation of **1** have been further explored and compared with conventional cisplatin. The results show that both energy-independent passive diffusion and energy-dependent transport play a role in accumulation of **1**. Further results were consistent with involvement of p-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1 and glutathione metabolism in the efflux of **1**. In contrast, the internalization of **1** mediated by the endocytotic uptake pathway(s) seems less likely. Understanding the factors which contribute to the mechanism of cellular accumulation of this Ir<sup>III</sup> complex can now lead to the design of structurally similar metal complexes for antitumor chemotherapy.

Received 18th November 2013,  
Accepted 7th January 2014

DOI: 10.1039/c3mt00341h

www.rsc.org/metallomics

## Introduction

Very recently, iridium(III) organometallic complexes have been gaining interest as potential anticancer agents.<sup>1–11</sup> One group of these compounds that exhibit anticancer activity, including activity against cisplatin (*cis*-diamminedichloridoplatinum(II)) resistant cancer cells, comprises organoiridium half-sandwich complexes of the type [(η<sup>5</sup>-Cp\*)(Ir)(XY)Cl]<sup>0/+</sup>, where Cp\* is tetramethyl(phenyl)cyclopentadienyl or tetramethyl(biphenyl)cyclopentadienyl and XY is a chelating ligand, such as *N,N*-bound ethylenediamine, 2,2'-bipyridine, and 1,10-phenanthroline, or *N,O*-bound picolinate.<sup>12–15</sup> It has also been shown that

[(η<sup>5</sup>-Cp\*)(Ir)(XY)Cl] complexes where Cp\* = pentamethylcyclopentadienyl (Cp\*) are all nontoxic toward A2780 human ovarian cancer cells<sup>14</sup> although activity can be switched on by a single atom change (C<sup>-</sup> for N) in the chelating *N,N* ligand (2,2'-bipyridine) to afford a neutral complex.<sup>13</sup> Hence, the structure, chemical reactivity, and cancer cell cytotoxicity of the Cp\*Ir<sup>III</sup> complexes can also be controlled by variation of the chelating ligands although factors responsible for this phenomenon are not completely understood. It has been suggested that the strong nucleobase binding and high hydrophobicity of the Cp\*Ir<sup>III</sup> complexes with the *C,N*-chelating ligands probably contribute to their promising anticancer activity.

The enhanced hydrophobicity is likely to result in higher cancer cell uptake which can contribute to the higher cytotoxicity of the Cp\*Ir<sup>III</sup> complexes with the *C,N*-chelating ligands. This is so because before the active form of a metallodrug reaches its major pharmacological target in the cell, the metallodrug has to first accumulate in cells. It has been demonstrated that higher accumulation of metallodrugs generally correlates with enhanced cytotoxicity.<sup>16,17</sup> As the promising anticancer activity of the organometallic iridium(III) *C,N*-complexes provides a basis for further exploration of this new class of anticancer complexes,

<sup>a</sup> Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic. E-mail: jana@ibp.cz; Fax: +420 541240499; Tel: +420 541517174

<sup>c</sup> Department of Chemistry, University of Warwick, Gibbet Hill Road, Coventry CV4 7AL, UK

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3mt00341h

**10.3 PUBLIKACE Č. 3**

---

**A DUAL-TARGETTING, APOPTOSIS INDUCING ORGANOMETALLIC  
HALF-SANDWICH IRIIDIUM ANTICANCER COMPLEX**

**Novohradsky V., Zerzankova L., Stepankova J., Kisova A., Kostrhunova H., Liu Z.,  
Sadler P. J., Kasparkova J., Brabec V.**

*Metallomics 6 (2014), 1491-1501*

---

Prohlašuji, že můj podíl na publikaci je následující:

Stanovení cytotoxicity komplexů, metalace DNA v buňkách, analýza druhu buněčné smrti, pozorování buněčné smrti pomocí konfokální mikroskopie, měření generace reaktivních forem kyslíku.

.....



# Metallomics

## PAPER

View Article Online  
View Journal | View Issue

### A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex†

Cite this: *Metallomics*, 2014, 6, 1491

Vojtech Novohradsky,‡<sup>ab</sup> Lenka Zerzankova,‡<sup>a</sup> Jana Stepankova,<sup>a</sup> Anna Kisova,<sup>a</sup> Hana Kostrohunova,<sup>a</sup> Zhe Liu,§<sup>c</sup> Peter J. Sadler,<sup>c</sup> Jana Kasparkova<sup>b</sup> and Viktor Brabec\*<sup>a</sup>

The cellular mechanism of action of an iridium(III) half-sandwich complex  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$  (phen = phenanthroline) (**1**) is reported. Complex **1** was used to treat several cell lines, including cisplatin-sensitive, cisplatin-resistant (with intrinsic and acquired resistance) carcinoma cells with wild type p53 status as well as the cells with no intact p53 gene, and nontumorigenic cells. Complex **1** preferentially kills cancer cells over nontumorigenic cells and exhibits no cross-resistance with cisplatin. It appears to retain significant activity in human tumor cell lines that are refractory or poorly responsive to cisplatin, and in contrast to cisplatin it displays a high activity in human tumor cell lines that are characterized by both wild type and mutant p53 gene. The mechanism of cell killing was established through detailed cell-based assays. Complex **1** exhibits dual effects in killing cancer cells causing nuclear DNA damage and mitochondrial dysfunction involving ROS production simultaneously. Flow cytometric studies and impedance-based monitoring of cellular responses to **1** demonstrated that **1** acts more quickly than cisplatin to induce cell death and that **1** is a more effective apoptosis inducer than cisplatin in particular in early stages of treatment, when the apoptotic effects predominate over necrosis. Overall, our findings confirm that **1** and its iridium derivatives represent promising candidates for further pre-clinical studies and new additions to the growing family of nonplatinum metal-based anticancer complexes.

Received 16th April 2014,  
Accepted 8th May 2014

DOI: 10.1039/c4mt00112e

www.rsc.org/metallomics

## Introduction

A large number of organometallic transition metal-based complexes have been designed and researched as anticancer agents.<sup>1–4</sup> Impetus to the design of such metallodrugs is provided by a need to produce compounds with higher potency, a wider spectrum of activity, higher cancer cell selectivity, lower resistance, and reduced side effects in comparison with conventional antitumor metal-based (platinum) drugs already used in the clinic. In this respect, the most widely researched anticancer

metallodrugs are those derived from platinum and ruthenium complexes. Iridium complexes remain relatively unexplored (see 5–12 and references therein).

Quite recently, novel half-sandwich organometallic Ir<sup>III</sup> cyclopentadienyl complexes as potent cytostatic and cytotoxic anticancer agents were introduced.<sup>7</sup> These pseudo-octahedral complexes have carbon-bound cyclopentadienyl ligands that occupy three coordination sites, an *N,N*- or a *C,N*-chelating ligand that occupies the fourth and fifth sites, and a monodentate Cl ligand at the sixth site (see complex **1** in Fig. 1 as example). It has been shown<sup>13</sup> that these complexes exhibit higher potency than conventional cisplatin. Moreover, it was predicted with the aid of the National Cancer Institute COMPARE algorithm (which can provide insight into mechanism of action) that the mechanism underlying biological effects of these Ir<sup>III</sup> complexes does not correlate with that of cisplatin. On the other hand, the COMPARE analysis predicted that **1** may belong to the class of DNA interacting compounds and protein synthesis inhibitors.<sup>13</sup>

The results of previous initial studies aimed at probing this prediction<sup>13</sup> were consistent with the thesis that DNA interactions of **1** may be some of the factors involved in its mechanism

<sup>a</sup> Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic. E-mail: brabec@ibp.cz; Fax: +420 541240499; Tel: +420 541517148

<sup>b</sup> Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Chemistry, University of Warwick, Gibbet Hill Road, Coventry CV4 7AL, UK

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4mt00112e

‡ These authors equally contributed to the paper.

§ Current address: Department of Chemistry, University of Basel, Spitalstrasse 51, 4056 Basel, Switzerland.

**10.4 PUBLIKACE Č. 4**

---

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

**Novohradsky V., Bergamo A., Cocchietto M., Zajac J., Brabec V., Mestroni G., Sava G.**

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

---

Prohlašuji, že můj podíl na publikaci je následující:

Spektrofotometrické experimenty odhalující kinetiku reakcí NAMI-A s lidským sérovým albuminem popř. kyselinou askorbovou, experimenty adheze buněk, provedení *in vivo* experimentů, analýza orgánů na přítomnost kovů s pomocí FAAS, kalkulace a analýza farmakokinetických parametrů.

.....



Cite this: DOI: 10.1039/c4dt02865a

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

V. Novohradský,<sup>a,b</sup> A. Bergamo,<sup>c</sup> M. Cocchietto,<sup>c</sup> J. Zajac,<sup>a,b</sup> V. Brabec,<sup>a</sup> G. Mestroni<sup>c</sup> and G. Sava<sup>\*c,d</sup>

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

Received 17th September 2014.  
Accepted 14th November 2014

DOI: 10.1039/c4dt02865a

www.rsc.org/dalton

### Introduction

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

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

<sup>a</sup>Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic. Fax: +420 541240499; Tel: +420 541517148

<sup>b</sup>Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17.Listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup>Callero Foundation Onlus, via A. Fleming 22, 34127-Trieste, Italy.

E-mail: gsava@units.it

<sup>d</sup>Department of Life Sciences, University of Trieste, via A. Fleming 22, 34127-Trieste, Italy



10.5 PUBLIKACE Č. 5

---

**ACTIVATION OF TRANS GEOMETRY IN BIFUNCTIONAL  
MONONUCLEAR PLATINUM COMPLEXES BY A NON-BULKY  
METHYLAMINE LIGAND**

Frybortova M., Novakova O., Stepankova J., **Novohradsky V.**, Gibson D., Kasparikova J.,  
Brabec V.

*Journal of Inorganic Biochemistry* 126 (2013), 46-54

---

Prohlašuji, že můj podíl na publikaci je následující:

Stanovení cytotoxicity platnatého methylaminového komplexu, studium akumulace komplexu v buňkách.

.....



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jinorgbio](http://www.elsevier.com/locate/jinorgbio)



## Activation of trans geometry in bifunctional mononuclear platinum complexes by a non-bulky methylamine ligand



Michaela Frybortova<sup>a,b</sup>, Olga Novakova<sup>b</sup>, Jana Stepankova<sup>b</sup>, Vojtech Novohradsky<sup>a,b</sup>, Dan Gibson<sup>c</sup>, Jana Kasparkova<sup>a,b</sup>, Viktor Brabec<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute for Drug Research, School of Pharmacy, The Hebrew University, Jerusalem 91120, Israel

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 February 2013  
Received in revised form 23 May 2013  
Accepted 23 May 2013  
Available online 28 May 2013

#### Keywords:

Platinum(II)-based agents  
Activation of trans geometry  
Cytotoxicity  
DNA adducts

### ABSTRACT

In order to shed light on the mechanism that underlies activity of bifunctional mononuclear Pt<sup>II</sup> analogs of transplatin we examined in the present work a DNA binding mode of the analog of transplatin, namely *trans*-[Pt(CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], in which NH<sub>3</sub> groups were replaced only by a small, non-bulky methylamine ligand. This choice was made because we were interested to reveal the role of the bulkiness of the amines used to substitute NH<sub>3</sub> in transplatin to produce antitumor-active Pt<sup>II</sup> drug. The results indicate that *trans*-[Pt(CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] forms a markedly higher amount of more distorting intrastrand cross-links than transplatin which forms in DNA preferentially less distorting and persisting monofunctional adducts. Also importantly, the accumulation of *trans*-[Pt(CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] in tumor cells was considerably greater than that of transplatin and cisplatin. In addition, the results of the present work demonstrate that the replacement of ammine groups by the non-bulky methylamine ligand in the molecule of ineffective transplatin results in a radical enhancement of its activity in tumor cell lines including cisplatin-resistant tumor cells. Thus, activation of the trans geometry in bifunctional mononuclear Pt<sup>II</sup> complexes can be also accomplished by replacement of ammine groups in transplatin by non-bulky methylamine ligands so that it is not limited only to the replacement by relatively bulky and stereochemically more demanding amino ligands.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The platinum anticancer compounds currently in clinical use conform to the originally devised structure–pharmacological activity relationship delineated for platinum anticancer drugs soon after discovery of antitumor effects of cisplatin [1,2]. The paradigm for this original structure–pharmacological activity relationship of platinum complexes [3] was that the *trans* isomer of cisplatin (transplatin) was inactive at biologically relevant concentrations and that only neutral Pt<sup>II</sup> complexes with two cis oriented inert ligands [such as am(m)ines carrying at least one H atom] and semi-labile ligands in the other positions would possess anticancer activity. *Trans* compounds and complexes having only one leaving group were considered inactive.

However, the search for platinum compounds having novel pre-clinical properties, such as activity in cisplatin-resistant cells or a pattern of cytotoxicity significantly different from that of cisplatin [4]

casted doubts upon most of these early structure–activity rules. Several diverse classes of active platinum compounds that violate the classical structure–activity relationships for cisplatin have been identified, including Pt<sup>IV</sup> complexes [5], polynuclear platinum complexes [6], and platinum compounds with a *trans* stereochemistry (for reviews, see Refs. [7–10]). Thus, to this end several new complexes of the *trans* structure have been identified that exhibit an enhanced toxicity in tumor cell lines, such that cytotoxicity is equivalent or even better than that of the analogous *cis* counterparts and, indeed, cisplatin itself (for reviews, see Refs. [7–12]). Examples of such new antitumor *trans*-platinum compounds are: (i) those of general formula *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(L)(L')] in which L and L' represent planar or nonplanar heterocyclic ligands, aliphatic amines, heterocyclic aliphatic amines, iminoethers [7–10], and acetoxime [13]; (ii) *trans*-platinum(IV) complexes of general formula *trans*-PtCl<sub>2</sub>X<sub>2</sub>(L)(L'), where X represents chloride, hydroxide, carboxylate, or carbamate ligands, belong to the family of anticancer *trans*-platinum agents as well. Pt<sup>IV</sup> compounds serve as prodrugs being reduced to the Pt<sup>II</sup> analogs under physiological conditions (axial ligands of Pt<sup>IV</sup> compounds can be detached during cellular activation by reductive elimination yielding antitumor active Pt<sup>II</sup> analogs) [14]; (iii) bifunctional polynuclear Pt<sup>II</sup> complexes with up to four positive charges [6] in which two monofunctional Pt<sup>II</sup> spheres with the single chloride leaving group on each platinum are linked by

\* Corresponding author at: Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic. Tel.: +420 585634154 or Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic. Tel.: +420 541517148; fax: +420 541240499.  
E-mail address: [brabec@ibp.cz](mailto:brabec@ibp.cz) (V. Brabec).

## 10.6 PUBLIKACE Č. 6

---

**NOVEL ANTITUMOR CISPLATIN AND TRANSPLATIN DERIVATIVES  
CONTAINING 1-METHYL-7-AZAINDOLE: SYNTHESIS,  
CHARACTERIZATION, AND CELLULAR RESPONSES**

Pracharova J., Saltarella T., Radosova-Muchova T., Scintilla S., **Novohradsky V.**,  
Novakova O., Intini F. P., Pacifico C., Nalite G., Ilik P., Brabec V., Kasparkova J.

*Journal of Medicinal Chemistry 58 (2015), 847-859*

---

Prohlašuji, že můj podíl na publikaci je následující:

Buněčná akumulace komplexů cisplatin, transplatin s 1-methylazaindolovým ligandem v buňkách pro časy 5 a 12 hodin, stanovení role proteinu p53 v mechanismu působení komplexů, vizualizace komplexů pomocí konfokální mikroskopie, stanovení cytotoxicity v buňkách karcinomu střev exprimujícími p53 HCT-116 +/+, či s umlčeným p53 HCT-116 -/-.

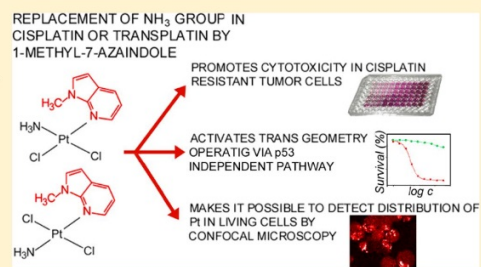


## Novel Antitumor Cisplatin and Transplatin Derivatives Containing 1-Methyl-7-Azaindole: Synthesis, Characterization, and Cellular Responses

Jitka Pracharova,<sup>†</sup> Teresa Saltarella,<sup>‡</sup> Tereza Radosova Muchova,<sup>†</sup> Simone Scintilla,<sup>‡</sup> Vojtech Novohradsky,<sup>§,||</sup> Olga Novakova,<sup>§</sup> Francesco P. Intini,<sup>‡</sup> Concetta Pacifico,<sup>‡</sup> Giovanni Natile,<sup>‡</sup> Petr Ilik,<sup>†</sup> Viktor Brabec,<sup>||</sup> and Jana Kasparkova<sup>\*,§</sup><sup>†</sup>Department of Biophysics, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Palacky University, Slechtitelu 11, 783 41 Olomouc, Czech Republic<sup>‡</sup>Department of Chemistry, University of Bari "Aldo Moro", 70125 Bari, Italy<sup>§</sup>Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic<sup>||</sup>Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Slechtitelu 11, 78371 Olomouc, Czech Republic

## Supporting Information

**ABSTRACT:** The current work investigates the effect of new bifunctional and mononuclear Pt(II) compounds, the cis- and trans-isomers of [PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(L)] (L = 1-methyl-7-azaindole, compounds 1 and 2, respectively), on growth and viability of human carcinoma cells as well as their putative mechanism(s) of cytotoxicity. The results show that substitution of 1-methyl-7-azaindole for ammine in cisplatin or transplatin results in an increase of the toxic efficiency, selectivity for tumor cells in cisplatin-resistant cancer cells, and activation of the trans geometry. The differences in the cytotoxic activities of 1 and 2 were suggested to be due to their different DNA binding mode, different capability to induce cell cycle perturbations, and fundamentally different role of transcription factor p53 in their mechanism of action. Interestingly, both isomers make it possible to detect their cellular uptake and distribution in living cells by confocal microscopy without their modification with an optically active tag.



## INTRODUCTION

Cisplatin [*cis*-diamminedichloridoplatinum(II)] and other platinum-based anticancer agents are well-known to be effective in the treatment of many human malignancies. However, the ultimate success of these agents is often limited by the natural or acquired drug resistance and side effects. These drawbacks have fostered the search for new antitumor platinum-based drugs with fewer side effects and more effective outcomes. New mononuclear bifunctional platinum drugs have been derived from cisplatin or ineffective transplatin [*trans*-diamminedichloridoplatinum(II)] by replacing one or both ammine groups with other nonleaving N-donor ligands. The design of such derivatives has been inspired by the observation that the carrier ligands can deeply affect the pharmacological behavior of the drug including cell accumulation and distribution, activation, DNA binding, and cellular responses to the DNA damage. In other words, nonleaving ligands of cisplatin or transplatin derivatives can modulate their biological properties.<sup>1–6</sup>

Some of us have shown in recent papers<sup>7,8</sup> that replacement of the ammine ligands of cisplatin by 7-azaindole derivatives

results in considerable enhancement of cytotoxicity against several human cancer cell lines. Thus, the rational chemical design can be applied also to this class of compounds because key substituents at the 7-azaindole ring system can play a major role in controlling the chemical and biological properties such as cellular accumulation and distribution, effects at the level of cell cycle regulation, binding to DNA, propensity for DNA adduct repair, and reactivity toward sulfur-containing nucleophiles. Hence, substituted 7-azaindoles can offer a good opportunity for the synthesis of novel therapeutic agents.

The rational design of novel platinum anticancer drugs can also benefit from early information on the trafficking and localization of platinum drugs in tumor cells. Therefore, confocal microscopy has been successfully applied to investigate the cellular distribution of Pt complexes. However, this relatively simple detection technique, which enables the visualization of compounds in living cells, requires the use of drugs which, after illumination, emit radiation detectable with

Received: September 16, 2014

Published: December 11, 2014

## 10.7 PUBLIKACE Č. 7

---

**MECHANISTIC INSIGHTS INTO TOXIC EFFECTS OF A  
BENZOTRIAZOLATE-BRIDGED DINUCLEAR PLATINUM(II)  
COMPOUND IN TUMOR CELLS**

Olivova R., Stepankova J., Muchova T., **Novohradsky V.**, Novakova O., Vrana O.,  
Kasparkova J., Brabec V.

*Inorganica Chimica Acta 393 (2012), 204-211*

---

Prohlašuji, že můj podíl na publikaci je následující:

Stanovení cytotoxicity dinukleárního platnatého komplexu s benzotriazolátovým můstkem,  
studium buněčné akumulace komplexu a platinace DNA v buňkách.

.....



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Inorganica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ica](http://www.elsevier.com/locate/ica)

## Mechanistic insights into toxic effects of a benzotriazolate-bridged dinuclear platinum(II) compound in tumor cells

Radana Olivova<sup>a,b</sup>, Jana Stepankova<sup>b</sup>, Tereza Muchova<sup>a,b</sup>, Vojtech Novohradsky<sup>a,b</sup>, Olga Novakova<sup>b</sup>, Oldrich Vrana<sup>b</sup>, Jana Kasparkova<sup>a,b</sup>, Viktor Brabec<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, 61265 Brno, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Available online 13 June 2012

Metals in Medicine Special Issue

#### Keywords:

Dinuclear platinum  
Antitumor  
Cellular accumulation  
DNA binding  
Sulfur-containing compounds

### ABSTRACT

We examined toxicity in tumor cells as well as some early phases of the mechanism underlying biological properties of benzotriazolate (Btaz)-bridged dinuclear Pt<sup>II</sup> complex ( $[(cis-Pt(NH_3)_2Cl)_2(\mu-Btaz-H)]Cl$  (**1**)). This dinuclear bifunctional Pt<sup>II</sup> complex utilizes rigid aromatic ring ofazole as a linker between two Pt atoms, featuring at the same time non-bridging chloride ions as leaving groups. The results of the present work demonstrate that the toxicity of **1** in several human tumor cell lines was lower than that of conventional cisplatin. The results obtained are consistent with the idea, and support the postulate that deactivation of **1** by sulfur-containing compounds is a significant factor contributing to reduced DNA binding of **1** in cells and subsequently to its reduced cytotoxicity. In addition, the observations that DNA adducts of **1** and cisplatin distort DNA conformation differently and that monofunctional DNA adducts of **1** are converted to more toxic bifunctional cross-links considerably more slowly in comparison with cisplatin may contribute to the reduced cytotoxicity of **1**. The results of the present work afford further details on the mechanism underlying biological effects of bifunctional polynuclear Pt<sup>II</sup> compounds and should provide a more rational basis for the design of new antitumor metallodrugs and chemotherapeutic strategies.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Polynuclear platinum agents are a structurally unique class of anticancer drugs. Clinical profile and mechanism of action of polyplatin complexes are different from the established platinum mononuclear compounds, such as the cisplatin (*cis*-diminedichloridoplatinum(II)) family. The biological activity of polynuclear platinum complexes may be modulated by the geometry and number of leaving groups in the coordination sphere of platinum atoms as well as by the nature of linkers connecting the platinum centers.

As regards molecular mechanisms of antitumor polynuclear Pt<sup>II</sup> complexes, an attention has been so far paid to various types of polynuclear Pt<sup>II</sup> complexes including several *trans* and *cis* Pt<sup>II</sup> complexes. The Pt centers in these complexes were bridged by various linkers which differed in rigidity. Spatial configuration of leaving groups predisposed these polynuclear Pt<sup>II</sup> complexes to react with their pharmacological target, presumably with DNA, in a unique way [1,2].

Some of the polynuclear (mostly dinuclear) antitumor active Pt<sup>II</sup> complexes described in the literature contain flexible [3,4] or semi-

flexible bridging ligands [5,6], while others possess rigid linkers [7–10]. The complexes with flexible linkers has been shown to form in DNA unique long-range cross-links (CLs) not formed by mononuclear bifunctional Pt<sup>II</sup> complexes [11,12].

Recently, a new class of dinuclear bifunctional azolato- or azinato-bridged Pt<sup>II</sup> compounds was synthesized by Reedijk, Komeda and their coworkers [9,10,13–17]. Both azolato- and azinato-bridged complexes contain a bridging hydroxide or non-bridging chloride ions as leaving groups, respectively and rigid linkers. Intriguingly, the structural properties predisposed the azolato-bridged dinuclear complexes to form in DNA the adducts identical to major DNA adducts of cisplatin, i.e. 1,2-intrastrand CLs [16]. However, in contrast to cisplatin, these adducts formed by the dinuclear azolato-bridged Pt<sup>II</sup> compounds induce only minimal conformational changes in double-helical DNA [14,18]. This may overcome the problem of acquired cellular resistance since small DNA perturbations may be hardly recognized and removed from DNA by DNA repair systems. Consistent with this was the observation that the dinuclear azolato-bridged Pt<sup>II</sup> compounds exhibited markedly higher toxic effects in some tumor cell lines than conventional mononuclear cisplatin [13,17,19]. Moreover, isomeric azines (pyrazine, pyrimidine, and pyridazine) as bridging ligands for the synthesis of dinuclear Pt<sup>II</sup> complexes have been used as well

\* Corresponding authors.

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

10.8 PUBLIKACE Č. 8

---

**ENERGETICS, CONFORMATION, AND RECOGNITION OF DNA  
DUPLEXES CONTAINING A MAJOR ADDUCT OF ANTITUMOR  
AZOLATO-BRIDGED DINUCLEAR PT II COMPLEX**

Mlcouskova J., Malina J., **Novohradsky V.**, Kasparkova J., Komeda S., Brabec V.

*Biochimica et Biophysica Acta 1820 (2012), 1502-1511*

---

Prohlašuji, že můj podíl na publikaci je následující:

Provedení, vyhodnocení a interpretace experimentů zaměřených na syntézu DNA přes templát modifikovaný komplexem AMPZ s využitím lidské DNA polymerázy.

.....





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbagen](http://www.elsevier.com/locate/bbagen)



## Energetics, conformation, and recognition of DNA duplexes containing a major adduct of an anticancer azolato-bridged dinuclear Pt<sup>II</sup> complex

Jarmila Mlcouskova<sup>a,b</sup>, Jaroslav Malina<sup>b</sup>, Vojtech Novohradsky<sup>a,b</sup>, Jana Kasparikova<sup>a,b</sup>, Seiji Komeda<sup>c</sup>, Viktor Brabec<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Kralovopolska 135, 61265 Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science, Suzuka 513-8670, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 April 2012  
Received in revised form 25 May 2012  
Accepted 30 May 2012  
Available online 7 June 2012

#### Keywords:

DNA conformation  
Dinuclear platinum  
Thermodynamic stability  
Damaged-DNA binding protein  
DNA repair  
Anticancer

### ABSTRACT

**Background:** The design of anticancer metallodrugs is currently focused on platinum complexes which form on DNA major adducts that cannot readily be removed by DNA repair systems. Hence, antitumor azolato-bridged dinuclear Pt<sup>II</sup> complexes, such as  $[[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2]_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-pyrazolate})]^{2+}$  (AMPZ), have been designed and synthesized. These complexes exhibit markedly higher toxic effects in tumor cell lines than mononuclear conventional cisplatin.

**Methods:** Biophysical and biochemical aspects of the alterations induced in short DNA duplexes uniquely and site-specifically modified by the major DNA adduct of AMPZ, namely 1,2-GG intrastrand cross-links, were examined. Attention was also paid to conformational distortions induced in DNA by the adducts of AMPZ and cisplatin, associated alterations in the thermodynamic stability of the duplexes, and recognition of these adducts by high-mobility-group (HMG) domain proteins.

**Results:** Chemical probing of DNA conformation, DNA bending studies and translesion synthesis by DNA polymerase across the platinum adduct revealed that the distortion induced in DNA by the major adduct of AMPZ was significantly less pronounced than that induced by similar cross-links from cisplatin. Concomitantly, the cross-link from AMPZ reduced the thermodynamic stability of the modified duplex considerably less. In addition, HMGB1 protein recognizes major DNA adducts of AMPZ markedly less than those of cisplatin.

**General significance:** The experimental evidence demonstrates why the major DNA adducts of the new anticancer azolato-bridged dinuclear Pt<sup>II</sup> complexes are poor substrates for DNA repair observed in a previously published report. The relative resistance to DNA repair explains why these platinum complexes show major pharmacological advantages over cisplatin in tumor cells.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Di- and trinuclear platinum complexes have attracted much interest as alternative drugs to cisplatin [cis-diamminedichloridoplatinum(II)] and its analogs in cancer chemotherapy [1–3]. Azolato-bridged

dinuclear Pt<sup>II</sup> complexes constitute a group of anticancer metallodrugs which exhibit a very promising in vitro cytotoxicity [4,5]. These bifunctional complexes appear to be novel anticancer agents with a mechanism of action different from those of mononuclear cisplatin and its analogs used in the clinic. There is a large body of evidence indicating that the cytotoxicity of platinum complexes correlates with their ability to bind DNA [6–8]. Azolato-bridged dinuclear Pt<sup>II</sup> complexes interact with DNA, and the DNA binding mode of these Pt<sup>II</sup> complexes is distinctly different from that of cisplatin and other polynuclear Pt<sup>II</sup> complexes [4,9,10].

A Pt<sup>II</sup> drug candidate belonging to the class of antitumor azolato-bridged dinuclear Pt<sup>II</sup> complexes is  $[[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2]_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-pyrazolate})]^{2+}$  (AMPZ) (Fig. 1). It contains two platinum centers that are each capable of binding DNA monofunctionally after loss of the bridging hydroxide [9]. Global platination of highly polymeric natural DNA with a random nucleotide sequence with AMPZ gives rise to major 1,2-GG intrastrand cross-links (CLs) similar to cisplatin [11]. Unlike cisplatin, AMPZ induces in highly polymeric DNA only small

**Abbreviations:** AMPZ,  $[[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2]_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-pyrazolate})]^{2+}$ ; cisplatin, [cis-diamminedichloridoplatinum(II)]; bp, base pair; CL, cross-link; CT, calf thymus; DSC, differential scanning calorimetry; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; FAAS, flameless atomic absorption spectrometry; DMS, dimethyl sulfate; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; HPLC, high-pressure liquid chromatography; HMG, high mobility group; HMGB1a, domain A of full length HMGB1 protein; HMGB1b, domain B of full length HMGB1 protein; LD, linear dichroism;  $T_m$ , melting temperature; NER, nucleotide excision repair; PAA, polyacrylamide; Pol $\eta$ , DNA polymerase  $\eta$ ;  $r_p$ , the number of molecules of the platinum complex bound per nucleotide residue; SDS, sodium dodecyl sulfate; XPA, xeroderma pigmentosum group A

\* Corresponding author. Tel.: +420 541517148; fax: +420 541240499.

E-mail addresses: sandrock@centrum.cz (J. Mlcouskova), malina@ibp.cz (J. Malina), novohradskyv@gmail.com (V. Novohradsky), jana@ibp.cz (J. Kasparikova), komeda@suzuka-u.ac.jp (S. Komeda), brabec@ibp.cz (V. Brabec).

0304-4165/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.bbagen.2012.05.014