

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2023

Marie Švitelová



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# TERAPIE OBTÍŽNĚ LÉČITELNÝCH NÁDORŮ SLINIVKY BŘIŠNÍ POMOCÍ NOVÝCH METALOFARMAK A JEJICH MECHANISMUS PŮSOBENÍ

THERAPY OF DIFFICULT-TO-TREAT PANCREATIC TUMOURS WITH NEW METALLOPHARMACEUTICALS  
AND THEIR MECHANISM OF ACTION

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Marie Švitelová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Vojtěch Novohradský, PhD

BRNO 2023

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1779/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: Marie Švitelová  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: Mgr. Vojtěch Novohradský, PhD

### Název bakalářské práce:

Terapie obtížně léčitelných nádorů slinivky břišní pomocí nových metalofarmak a jejich mechanismus působení

### Zadání bakalářské práce:

Nejprve bude popsána cytotoxicita obou enantiomeru v porovnání s výchozí mateřskou sloučeninou (oxaliplatinou). Dále bude podrobně studován mechanismus působení a penetrace enantiomeru do nádorových buněk. Následně bude studován typ buněčné smrti vyvolané po aplikaci studovaných komplexů. Hlavním cílem projektu je odhalit mechanismus působení nově syntetizovaných komplexů [Pt(OXA)(1R,2R-DACHEX)] a [Pt(OXA)(1S,2S-DACHEX)] a určit, zda tyto látky mohou představovat potenciální léčiva proti rakovině pankreatu.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Marie Švitelová  
studentka

Mgr. Vojtěch Novohradský, PhD  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu  
-----

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## ANOTACE

Nádorová onemocnění a protinádorová terapie představuje v současné době velmi aktuální problematiku, ve které jsou veškeré získané poznatky velkým přínosem pro společnost. I přes mimořádný rozvoj tohoto oboru jsou dostupné léčebné přístupy nádorů stále velmi omezené řadou faktorů, které motivují vědecké týmy k nalezení cílené, efektivní terapie. Hlavním cílem této bakalářské práce bylo provést klasifikační cytotoxické testy s nově syntetizovanými enantiomery [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)] odvozenými od oxaliplatinu na buněčné úrovni. Při testování výše zmíněných látek jsme se zaměřili na analýzu anti-proliferačního působení komplexů a odhalení mechanismu jejich působení. Z výsledků práce vyplývá, že R,R-enantiomer vykazuje vysoké terapeutické účinky při aplikaci na buňky adenokarcinomu pankreatu PSN1. Experimenty dále prokázaly, že mechanismus účinku tohoto komplexu v buňkách karcinomu slinivky břišní zahrnuje ovlivnění lipogeneze, konkrétně inhibici *de novo* syntézy lipidů. Protinádorové působení zaměřené na ovlivnění metabolismu lipidů představuje nový mechanismus účinku, který dosud nebyl užíván u klinicky používaných protinádorových platinových léků. Získané informace naznačují, že by R,R-enantiomer mohl představovat budoucí nadějný cytostatikum, které by potenciálně vykazovalo méně nežádoucích účinků na organismus pacienta.

## ANNOTATION

The issue of tumor diseases and anticancer therapy is extremely current nowadays, in which is all acquired knowledge a great benefit to society. Despite the extraordinary development of this field, the available treatment approaches for cancer are still very limited by a number of factors, that motivate research teams to find targeted, effective therapy. The main aim of this bachelor work was to test an *in vitro* cytotoxicity of newly synthesized enantiomers [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)] derived from oxaliplatin. During the testing of the above mentioned substances we focused on the analysis of the antiproliferative action of these complexes and their mechanism of action. The results of the work show that the R,R-enantiomer has high therapeutic effects when it is applied to the PSN1 pancreatic adenocarcinoma cells. The experiments also proved that the mechanism of action of this complex in pancreatic cancer cells involves influencing the lipogenesis pathway, namely inhibition of *de novo* lipid synthesis. The antitumor action aimed at influencing the metabolism represents a new mechanism of action that has not yet been considered for clinically used antitumor platinum drugs. The obtained information suggests that R,R-enantiomer could represent a future promising cytostatic that would cause fewer adverse effects on the patient.

## KLÍČOVÁ SLOVA

cytostatika, nádorové buňky, *de novo* syntéza lipidů

## KEYWORDS

cytostatics, tumour cells, *de novo* lipid synthesis

ŠVITELOVÁ, Marie. *Terapie obtížně léčitelných nádorů slinivky břišní pomocí nových metalofarmak a jejich mechanismus působení*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149067>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Mgr. Vojtěch Novohradský, PhD.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ:

*Ráda bych poděkovala panu Mgr. Vojtěchu Novohradskému, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, řadu velmi cenných rad a připomínek, které mi během řešení této práce poskytl. Dále bych chtěla poděkovat Oddělení molekulární biofyziky a farmakologie Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně za příjemnou atmosféru na pracovišti a úžasný kolektiv. Děkuji také panu Mgr. Janu Smetanovi, Ph.D. za pomoc při zpracování formální stránky této práce.*

# OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Nádorová onemocnění .....	8
2.1.1	Příčiny vzniku nádorů .....	8
2.1.2	Klasifikace nádorů .....	9
2.2	Nádory slinivky břišní .....	9
2.2.1	Metabolismus .....	11
2.2.2	Statistika.....	13
2.2.3	Diagnostika .....	13
2.2.4	Léčba.....	14
2.3	Platinová cytostatika .....	15
2.3.1	Oxaliplatina.....	16
2.3.2	Mechanismus působení oxaliplatiny .....	16
2.3.3	Rezistence .....	19
3	CÍLE PRÁCE .....	20
4	MATERIÁL A METODY .....	21
4.1	Chemikálie a biologický materiál .....	21
4.1.1	Studované platnaté komplexy .....	21
4.1.2	Buněčné linie .....	22
4.2	Metody .....	23
4.2.1	Rozmražení buněk .....	23
4.2.2	Zamražení buněk.....	23
4.2.3	Kultivace nádorových buněk .....	23
4.2.4	Antiproliferační aktivita.....	23
4.2.5	Monitorování buněčné impedance v reálném čase .....	25
4.2.6	Penetrace 3D sféroidů .....	27
4.2.7	Buněčná akumulace .....	28
4.2.8	Detekce lipidových kapének.....	29
4.2.9	Izolace RNA.....	30
4.2.10	Kvantitativní PCR v reálném čase .....	31
4.2.11	Analýza lipidových drah .....	33
4.2.12	Detekce reaktivních forem kyslíku .....	35

4.2.13	Detekce buněčné smrti .....	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5.1	Antiproliferační aktivita.....	38
5.2	Monitorování růstu buněk v reálném čase.....	40
5.3	Inhibice růstu 3D sféroidů vytvořených z buněk adenokarcinomu pankreatu .....	42
5.4	Studie buněčného příjmu .....	43
5.5	Tvorba lipidových kapiček v buňkách PSN1 adenokarcinomu pankreatu .....	44
5.6	Analýza lipidových metabolických drah .....	47
5.7	Mechanismus smrti buněk adenokarcinomu pankreatu PSN1 po ošetření zkoumanými Pt(II) komplexy .....	51
6	ZÁVĚR.....	53
7	REFERENCE .....	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	70
9	PŘÍLOHY .....	73

# 1 ÚVOD

Nádory patří mezi nejčastější závažná onemocnění dnešní doby jejichž incidence stále narůstá. Přesný mechanismus vzniku tumoru není prozatím zcela znám. Ovšem bylo prokázáno, že hlavní příčinou vzniku dědičné změny genetické informace způsobující nádorové bujení je působení fyzikálních, chemických a biologických faktorů z životního prostředí na lidský organismus po celou dobu života. Důležitou roli v incidenci rakoviny hrají také vrozené predispozice, věk a životní styl konkrétního jedince [1]. Účinkem více negativních vlivů zároveň může vést k vniku buněk s charakteristickými genetickými změnami na úrovni jaderné DNA, které vyvolají rezistenci buněk vůči apoptóze [2]. Při buněčném dělení předává poškozená buňka chybnou genetickou informaci dceřiným buňkám. Dochází tak k vzniku buněčné populace, která se nekontrolovaně dělí, velmi rychle roste a postupně vytváří nádor [3].

Navzdory velkému spektru dostupných cytostatik, biologických léků a léčebných přístupů patří karcinom pankreatu mezi nejhůře léčitelné a nejsmrtelnější typy rakoviny. Zároveň se jedná o jedno z nejrozšířenějších rakovinových onemocnění. Výskyt této rychle rostoucí malignity s velmi nepříznivou prognózou má v posledních letech stále vzestupný trend. Díky nespecifické symptomatologii a dlouhému asymptomatickému průběhu je toto onemocnění zachyceno převážně v pokročilých stádiích, která jsou obtížně léčitelná. Jedinou léčebnou metodou, která vede k významnému prodloužení přežití (u velmi malého procenta pacientů k vyléčení) je v současnosti radikální chirurgický zákrok [2]. Tuto operaci mohou ovšem podstoupit pouze osoby v časném stádiu nemoci. Při léčbě pacientů s pokročilými stádii nemoci se nasazuje především chemoterapie pro omezení šíření nádoru, prodloužení a zlepšení kvality života pacientů [4]. Principem chemoterapie je podávání farmak, tzv. cytostatik, která jsou zpravidla velmi toxická a ovlivňují proliferaci buněk. V těle pacienta však cytostatika působí nespecificky a zasahují nejen nádorová ložiska, ale také normální rychle se dělící zdravou tkáň, například buňky kostní dřeně [5].

Karcinom slinivky břišní je velmi chemorezistentní malignita [6], u které má chemoterapie provedená aplikací pouze jednoho cytostatika velmi malý efekt. Proto je obecně platným léčebným schématem podávání kombinací různých cytostatik, které navzájem zvyšují svoji aktivitu nebo snižují chemorezistenci nádoru a tím zvyšují celkovou účinnost této metody [7]. Nejběžněji využívané kombinace cytostatik při terapii karcinomu pankreatu jsou Folfirinox (5-fluorouracil, leukovorin, irinotekan, oxaliplatin) [2] a Gemox (gemcitabin, oxaliplatin) [8]. Bohužel i tyto léčiva působí terapeuticky jen u určité části pacientů a prodlužují jejich život jen o poměrně krátkou dobu (2-3 měsíce). Není tedy nijak překvapující, že mnohá pracoviště základního i aplikovaného výzkumu po celém světě v dnešní době věnují značné úsilí hledání nových terapeuticky účinných látek na bázi přechodných kovů, které by byly schopné překonat alespoň některá úskalí současné chemoterapeutické léčby nádoru slinivky břišní.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí na celém světě. Jejich výskyt se zvyšuje především v rozvinutých zemích, kde dochází, díky zdokonalování zdravotnické péče a zlepšování životních podmínek, k prodlužování věku populace. Rakovina se projevuje v každém věku, ovšem nejvíce se incidence tohoto onemocnění zvyšuje v dospělosti a ve stáří [9].

Každý organismus se skládá z mnoha typů buněk, které mají přesně definovaný tvar, strukturu a svoji specifickou funkci. Spojení více buněk dohromady tvoří tkáň, které spolupracují a zajišťují nezbytné funkce pro náš život [10]. Všechny buňky prochází buněčným cyklem zakončeným rozdělením původní buňky na dvě buňky dceřiné. Buněčný cyklus může být rozdělen do čtyř fází, G<sub>1</sub> (1. přípravná), S (syntetická), G<sub>2</sub> (2. přípravná) a M (mitotická) fáze [10] [11]. Po každé fázi následuje kontrolní bod, který ověřuje úspěšné dokončení veškerých procesů probíhajících v dané fázi buněčného cyklu a určuje, zda může buňka pokračovat do další fáze cyklu, nebo ji uvede do fáze řízené smrti (apoptózy) [11]. Ovšem v některých případech dochází v tomto komplexním procesu k mutaci genů v buňce, které mohou zapříčinit selhání kontrolního uzlu. Tyto změny v genetické informaci mohou vést k nekontrolovanému dělení buňky a vzniku nádoru [3].

Termínem nádor označujeme tedy populaci abnormálních buněk, které rostou a chovají se nezávisle na kontrolních mechanismech organismu. Jedná se o ireverzibilní změnu tkáně, jejíž patologické chování se projevuje i po ukončení působení původní příčiny vzniku nádoru [3].

#### 2.1.1 Příčiny vzniku nádorů

Nádorová onemocnění jsou velmi rozmanitou skupinou chorob, která vznikají ze širokého spektra typů buněk napříč celým tělem a postihují veškeré věkové skupiny lidí. Přesná příčina vzniku nádoru prozatím není zcela objasněna [3]. Jedná se o multifaktoriální progresivní proces, který trvá mnohdy až desítky let, během níž způsobí změnu genů buněk. O tom, zda onemocní zdravý člověk nádorovým onemocněním, rozhoduje velké množství faktorů [1].

Tyto faktory se mohou rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Ovlivnitelné faktory jsou takové, kterým se můžeme určitým způsobem vyvarovat nebo můžeme ovlivnit jejich dopad na naše zdraví [1].

První skupinou jsou vlivy fyzikální, kdy můžeme být vystaveni škodlivému záření (ionizující a UV záření). Rizikové je například časté opalování, které velmi často vede ke vzniku rakoviny kůže nebo nadměrné RTG a radioaktivní záření využívané ve zdravotnictví [1].

Další skupinou jsou chemické látky, jinak nazývané také jako karcinogeny [1], které na nás mohou působit například v prašném zaměstnání nebo při používání chemických

sloučenin v průmyslu. Jedná se především o deriváty polycyklických nebo aromatických uhlovodíků, těžké kovy, azbest, dále také vinylchlorid [12] či aflatoxin a řada jiných [13].

Třetí skupinou jsou vlivy biologické, mezi které patří především různé viry [1]. Bylo prokázáno, že lidský papilomavirus (HPV) [13], konkrétně jeho subtypy HPV 16 a 18, se podílí na vzniku rakoviny děložního čípku a karcinomů v oblasti hlavy a krku [14]. Karcinogenně působí také virus Epstein-Barrové (EBV), který souvisí se vznikem nazofaryngeálního karcinomu či Burkittova lymfomu [13].

Do poslední skupiny ovlivnitelných faktorů spadá životní styl, který má zásadní význam i při předcházení vzniku nádorů. Tento faktor zahrnuje především pravidelné kouření společně s nadměrnou konzumací alkoholu [1], který podporuje rozpouštění tabákových karcinogenů a usnadňuje tak jejich vstřebávání do buněk. V neposlední řadě přispívá ke vzniku nádorů i stres, který v dnešní době není žádnou výjimkou [15].

Mezi neovlivnitelné faktory patří věk a genetická výbava jedince [1]. Lidé, kteří mají v rodině někoho s tímto onemocněním, mají větší pravděpodobnost iniciace rakoviny a zpravidla starší lidé trpí nádorovými onemocněními více než mladší [9].

### **2.1.2 Klasifikace nádorů**

Nádory můžeme rozdělovat a charakterizovat podle několika kritérií. Nádorová onemocnění můžeme dělit na základě jejich chování k organismu na nezhoubné (benigní) a zhoubné nádory (maligní) [3]. Menší riziko pro organismus představují nádory benigní, které rostou pomalu a expanzivně, svým růstem ovšem utlačují okolní tkáň bez jejich podstatnějšího porušení a mohou případně omezit jejich funkce. Buňky benigního nádoru mají podobný charakter jako buňky okolní tkáň [16]. Nádory tohoto typu jsou většinou velmi dobře ohraničené od okolní tkáň a jejich chirurgické odstranění nebývá náročné [3]. Benigní nádory netvoří metastázy. Pro maligní nádor je typické nekontrolovatelné rychlé a agresivní dělení buněk a ztráta schopnosti apoptózy [16]. Nádory tohoto typu jsou neostře ohraničené od okolní tkáň a šíří se lymfogenní či hematogenní cestou do okolí, kde často vytvoří druhotná ložiska – metastázy [3].

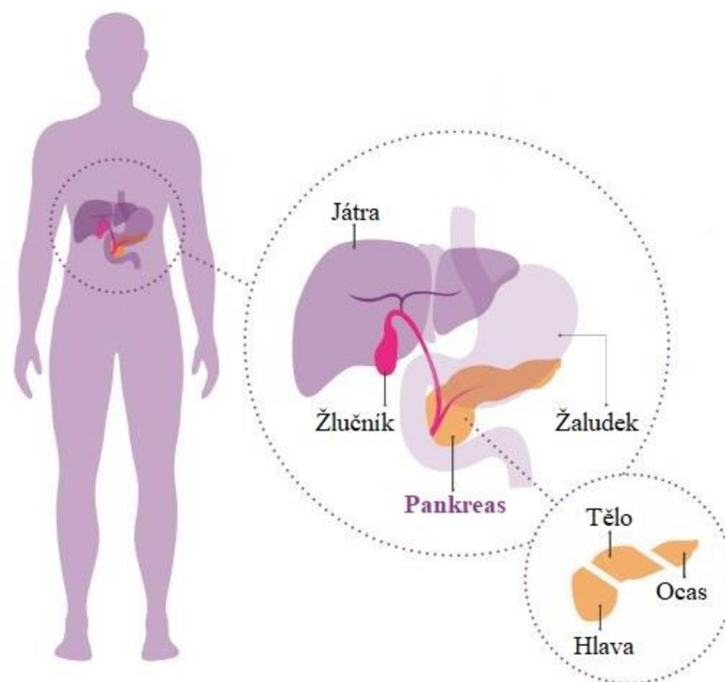
Nádory také můžeme dělit na primární, které se nacházejí v oblasti jejich vzniku, a sekundární, které jsou odvozené od nádorů primárních a metastázovaly z místa vzniku do jiných orgánů těla [16].

Dále můžeme rozlišovat nádory podle tkáň, ze které vznikají na epitelové (z epitelu krycího či žlázového), mezenchymové (z tkání pojivových, tukových, svaloviny, cév), neuroektodermové (z nervové tkáň, dřene nadledvin, melanocytů), germinální (prekurzorů pohlavních buněk) a nádory trofoblastu (z tkáň pokrývající klky placenty) [16].

## **2.2 Nádory slinivky břišní**

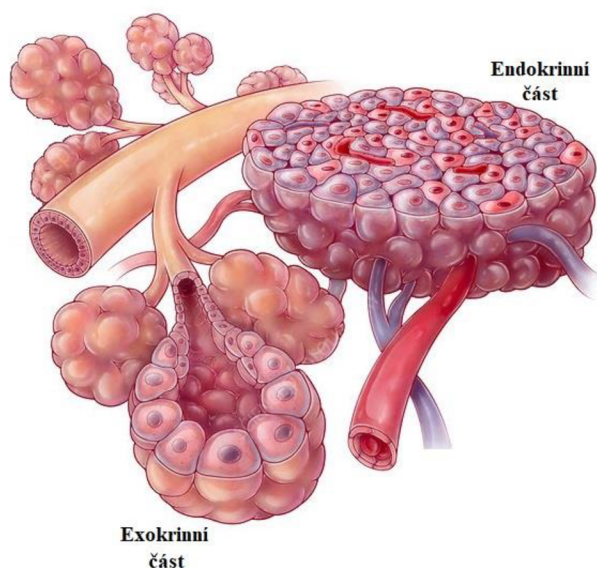
Slinivka břišní (pankreas) je asi 15 cm dlouhý vnitřní orgán, umístěný v zadní části břišní dutiny mezi žaludkem a páteří (Obrázek č. 1) [17]. Anatomicky se pankreas rozděluje na tři části: hlavu, tělo a ocas. Slinivka břišní je žláza s vnitřní (endokrinní) a vnější (exokrinní) sekrecí (Obrázek č. 2), která se řadí mezi orgány trávicí soustavy. Skládá se z velkého množství

exokrinních žlázek, které produkují pankreatické šťávy neboli enzymy pomáhají trávit potravu v tenkém střevě. Mezi žlázkami jsou rozmístěny Langerhansovy ostrůvky endokrinních buněk, jejichž činností je tvorba hormonů regulující hladinu cukru v krvi. Langerhansovy ostrůvky jsou tvořeny až z několika stovek buněk, které produkují různé hormony, ovšem nejvíce zastoupené jsou buňky B a A. B buňky produkují hormon inzulín a produktem buněk A je hormon glukagon. Pankreatické šťávy i hormony jsou nezbytně důležité pro správné fungování lidského těla [18]. Endokrinní i exokrinní část pankreatu má svá typická onemocnění. Zatímco u endokrinní složky je velmi častým onemocněním cukrovka (diabetes mellitus) a nádory Langerhansových ostrůvků, u exokrinní část pankreatu se jedná zejména o záněty, malformace pankreatu, cystickou fibrózu a nádory pankreatu [19].



Obrázek č. 1: Slinivka břišní a její uložení v dutině břišní [20].

Karcinom slinivky břišní je v současnosti jedním z nejagresivnějších a nejsmrtelnějších typů rakoviny [4]. Tato malignita vzniká stejně jako ostatní nádory v důsledku abnormální mutace DNA buňky slinivky, která způsobí nekontrolovaný růst a dělení buněk [17]. Nádory slinivky břišní jsou velmi pestrá skupina, kterou můžeme dělit podle postihnuté tkáně na exokrinní a endokrinní malignity. Exokrinní tumory se vyskytují častěji a dále se dělí na benigní a maligní nádory, které převažují. Přičemž solidní nádory tvoří až 95 % diagnostikovaných případů. Nejčastější maligní variantou je adenokarcinom vyrůstající z epitelu vývodů slinivky břišní tzv. duktální adenokarcinom [17], který je diagnostikován u 85–90 % pacientů [4]. Nejvyšší četnost výskytu této agresivní malignity je v oblasti hlavy pankreatu (caput pancreatis) [2]. U více jak 70 % pacientů s diagnostikovaným adenokarcinomem pankreatu dochází k metastatickému postižení regionálních uzlin. Zbývajících přibližně 5 % tvoří cystický intraduktální karcinom pankreatu [21], který se vyskytuje převážně v hlavě slinivky [17]. Cystické nádory jsou téměř vždy benigní. Endokrinní nádory slinivky břišní tvoří zhruba 2 % diagnostikovaných případů [22] a jsou lokalizovány převážně v caput pancreatis [17].



Obrázek č. 2: Ilustrace endokrinní a exokrinní části slinivky břišní [23]

### 2.2.1 Metabolismus

Nádorové buňky se nacházejí velmi často ve stresovém mikroprostředí s nízkou koncentrací kyslíku a živin. Tyto stresové podmínky je donutily přizpůsobit se a přijít s novou strategií pro umožnění další expanze nádoru [24]. Pro přežití a další proliferaci podstupují buňky tumoru komplexní přeprogramování svého energetického metabolismu tak, aby byly jejich zvýšené nutriční a energetické nároky uspokojeny [25]. V rámci metabolických změn nádorových buněk dochází ke zvýšení příjmu glukózy a glutaminu, zvýšení glykolýzy a produkce laktátu navzdory přítomnosti kyslíku (Warburgův efekt). Bylo prokázáno, že metabolické přeprogramování nádoru pankreatu úzce souvisí s jeho chemorezistencí, radiorezistencí a imunosupresí [26]. Tyto poznatky naznačují, že přeprogramovaný metabolismus nádorů může hrát klíčovou roli v pochopení karcinogeneze a progresu této malignity [27], a zároveň může představovat nový přístup léčby a prognózy tohoto onemocnění.

#### Metabolismus glukózy

Glukóza je hlavním zdrojem energie, uhlíku, kyslíku a vodíku využívaných v biosyntéze aminokyselin, mastných a nukleových kyselin. Glukóza je do buňky přes cytoplasmatickou membránu transportována prostřednictvím rodiny přenašečů GLUT obsahující 14 transportních proteinů [24]. Zdravé buňky získávají energii z glykolýzy a Krebsova cyklu. V glykolýze dochází k postupné degradaci glukózy na pyruvát. Ten je následně dekarboxylován pyruvátdehydrogenázovým komplexem na acetyl-CoA, který vstupuje do Krebsova cyklu. V Krebsově cyklu dochází k produkci velké části získané energie [28].

Nádorové buňky získávají na rozdíl od zdravých buněk i v přítomnosti kyslíku energii především z anaerobní glykolýzy, při které je glukóza přeměna na pyruvát, který je poté redukován prostřednictvím laktátdehydrogenázy A na laktát [29]. Krebsův cyklus využívají minimálně. Nádorové buňky upřednostňují glykolýzu, která produkuje 2 molekuly ATP z 1 molekuly glukózy, před kompletní oxidativní fosforylací, při které dochází k tvorbě 36 molekul ATP z 1 molekuly glukózy. Na základě těchto údajů se může zdát, že se jedná

o velmi neefektivní způsob získání energie. Ovšem rakovinné buňky tímto způsobem získávají větší množství molekul ATP za kratší čas, jelikož přijímají několikanásobně více glukózy a glykolýza probíhá rychleji než oxidativní fosforylace. Pro udržení vysoké aktivity glykolýzy je zapotřebí dostatečné množství NAD<sup>+</sup>, které je tvořeno při redukci pyruvátu na laktát [28]. Glykolytický tok také dodává prekurzory pro de novo syntézu nukleotidů a lipidů [30], [31].

I přes skutečnost, že nádorové a proliferující buňky využívají k získání energie primárně anaerobní glykolýzu, je pro ně Krebsův cyklus nepostradatelný [31]. Meziprodukt Krebsova cyklu citrát je v cytoplazmě buňky přeměněn na acetyl-CoA, který je využíván jako prekurzor pro syntézu lipidů [24].

### **Metabolismus mastných kyselin**

Metabolismus lipidů je jeden ze základních buněčných procesů, při kterém dochází k přeměně živin na metabolické produkty, které představují hlavní strukturní komponenty buněčné membrány (fosfoglyceridy, steroly a sfingolipidy), slouží k ukládání energie (triacylglyceridy) a pro tvorbu signálních molekul nebo hormonů [25]. Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s dlouhými uhlovodíkovými řetězci, které slouží jako substrát pro syntézu dalších lipidových sloučenin. Deregulace metabolismu lipidů je velmi často spojena s progresí nádorů a je nutná pro další karcinogenezi [27]. Buňka může získávat lipidy buď exogenním (z potravy) nebo endogenním (syntézou) způsobem. Většina zdravých buněk využívá primárně exogenní zdroj [32]. Charakteristickým znakem mnoha nádorových linií je zvýšení de novo syntézy mastných kyselin [25], přičemž u rakoviny slinivky břišní je až 93 % mastných kyselin nově syntetizováno z mitochondriálního citrátu [31].

De novo syntéza mastných kyselin udržuje neustálý přísun lipidových derivátů nezbytných pro syntézu membrán a signálních molekul [26]. Jedná se o anabolický děj, který vyžaduje značné množství energie, která je získávána z pentózového cyklu (NADPH), glykolýzy a Krebsova cyklu (ATP). Výchozí látkou pro tento proces je citrát, tvořený v Krebsově cyklu [25], který je exportován do cytoplazmy buňky transportním proteinem CIC (citrate carrier) [32]. Zde je citrát postupně přeměněn na oxaloacetát a acetyl-CoA prostřednictvím ATP-citrátlyázy. Acetyl-CoA je následně karboxylován na malonyl-CoA působením enzymu acetyl-CoA karboxylázy. Posledním krokem de novo syntézy mastných kyselin je vznik palmitátu postupnou kondenzací malonyl-CoA a acetyl-CoA katalyzovaný FASN (syntáza mastných kyselin). Vzniklý palmitát se může zapojit do následujících metabolických drah, ve kterých dochází k dalšímu prodloužení řetězce a tvorbě nenasyčených mastných kyselin [25], [32]. Tyto procesy probíhají v endoplasmatickém retikulu a v mitochondriích. Přebytečné lipidy mohou být uloženy ve formě lipidových kapének (LD) [33], které jsou v případě potřeby přeměněny zpět na mastné kyseliny pomocí adipózní triglyceridové lipázy a hormon-senzitivní lipázy (HSL) za uvolnění energie nutné pro expanzi metastázy rakoviny pankreatu [32].

Inhibice lipogeneze by proto mohla představovat novou strategii v léčbě pacientů s rakovinou pankreatu [32].

### 2.2.2 Statistika

Incidence i mortalita karcinomu slinivky břišní v posledních letech neustále stoupá [34]. V celosvětovém žebříčku incidence rakovin zaujímá rakovina slinivky břišní dvanácté místo. V případě mortality zaujímá místo sedmé [9]. Výskyt této malignity je 4krát až 5krát vyšší v zemích s vyšší hodnotou indexu lidského rozvoje (Human development index; HDI) [9], tedy ve státech s lepší životní úrovní [34]. Největší výskyt je pozorován v Evropě, Severní Americe, Austrálii a Novém Zélandu [34] [9]. Incidence tohoto onemocnění v České republice je velmi vysoká. Rakovina slinivky břišní je páté nejčastější zhoubné onkologické onemocnění a čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění v České republice [35]. Statistiky naznačují, že karcinom pankreatu se většinou vyskytuje více u mužů než u žen [36], a to ve vyšším věku. Četnost této choroby plynule stoupá od 45 let věku, nejčastější výskyt je ve věkovém rozmezí 65–75 let [37]. U mladších pacientů je onemocnění spojeno především s genetickou zátěží.

Karcinom pankreatu je velice závažné onemocnění s velmi špatnou prognózou, která říká že pěti let od stanovení diagnózy se dožije pouze 9 % nemocných pacientů, přičemž většina se nedožije ani jednoho roku [36]. Jedním z důvodů vysoké úmrtnosti je, že u většiny pacientů je toto onemocnění současnými prostředky často diagnostikováno až v pokročilém stádiu [2]. Klinicky je často dlouho asymptomatické, nebo jsou symptomy natolik nenápadné, že nevzbudí pozornost pacienta ani ošetřujícího lékaře [36]. Anatomická lokalizace pankreatu navíc ztěžuje diagnostiku této malignity. Dále také zvyšuje mortalitu tohoto tumoru skutečnost, že jediným současným terapeutickým přístupem je chirurgický zákrok, který se provádí pouze v raném stádiu nádoru [2]. Bohužel pouze přibližně 20 % pacientů má možnost podstoupit chirurgický zákrok [38]. A u více než 80 % pacientů, kteří tuto úspěšnou operaci podstoupí, se znovu vyvine lokální recidiva nebo metastázy [4]. Pro zlepšení prognózy tohoto onemocnění je tedy zásadní vyvinout nové včasné diagnostické a terapeutické přístupy.

### 2.2.3 Diagnostika

Diagnostika rakoviny slinivky břišní je velice problematická. Stěžuje ji nejen lokalizace samotného orgánu, ale také skutečnost, že raná stadia rakoviny slinivky břišní jsou obvykle klinicky němá a příznaky se ve většině případů projevují až u pokročilého nebo metastatického onemocnění. Symptomy jsou velmi nespecifické a zahrnují bolest břicha, úbytek hmotnosti a trávicí potíže. Díky širokému spektru nespecifických symptomů existuje velké množství onemocnění, které je třeba odlišit a vyloučit provedením mnoha vyšetření. Z tohoto důvodu může být lékařem diagnóza odložena nebo vynechána [2].

Při diagnóze nádorů pankreatu se většinou využívá kombinace více metod. Kombinace několika rozdílných přístupů zaručí přesné určení rozsahu nádoru a vyloučení nebo potvrzení metastáz. V současné době představují nejdůležitější přínos v diagnostice karcinomu pankreatu zobrazovací metody, které umožňují odhalit a sledovat rakovinu v těle pacienta. Mezi používané metody se řadí ultrasonografie (USG), počítačová tomografie (CT), zobrazování magnetická rezonance (MRI) [39], pozitronová emisní tomografie (PET) [4] a endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie (ERCP) [40]. Dále jsou k dispozici i diagnostické přístupy nevyužívající zobrazování nádoru, jako je biopsie [39], genetické testy a testy nádorových markerů (nádorový antigen 19-9; CA 19-9) [2].

Po určení co nejpřesnější polohy, rozsahu a stanovení klinického stádia nádoru je lékaři určen terapeutický postup pro daného pacienta.

#### 2.2.4 Léčba

Po provedení potřebných vyšetření je stanoven léčebný postup pro daného pacienta. Při rozhodování o typu léčby záleží především na biologickém chování tumoru, rozsahu malignity, celkovém stavu a věku pacienta [4]. Cílem léčby je především úplné odstranění nádorů, případně prodloužení a zlepšení kvality života pacienta s pokročilým stádiem nemoci. Mezi možné léčebné přístupy využívané při ošetřování nádorů slinivky břišní patří chirurgický zákrok, radioterapie a chemoterapie [2].

Ranné stadium této nemoci je většinou léčeno chirurgickým zákrokem, při kterém je odstraněna radikální část nebo celá slinivka břišní. Tato léčba prozatím představuje jedinou metodu, která skýtá naději na vyléčení. Ovšem tato intervence je možná pouze u 15 až 20 % pacientů s diagnostikovanou rakovinou slinivky břišní [2]. U většiny pacientů se nádor zjistí až v pokročilejších stádiích, kdy již radikální výkony nejsou možné. Existuje několik typů operačních výkonů, které závisí na lokalizaci tumoru v slinivce. Nejčastěji je prováděná Whippleova operace, která se využívá u pacientů s lokalizovanou lézí v hlavě pankreatu [41]. Při tomto zákroku dochází k odstranění hlavy slinivky s částí žaludku, žlučovými vývody a částí tenkého střeva [2]. Méně častým výkonem je distální pancreatectomie, při níž je odebráno tělo a ocas pankreatu napadené nádorem. Posledním využívaným operačním výkonem je totální pancreatectomie, při které je vyjmut celý pankreas, část žaludku, tenkého střeva, žlučník, slezina, žlučové kanálky a přilehlé lymfatické uzliny [41]. Operace pankreatu je velmi náročné ošetření s vysokým rizikem pooperačních komplikací a úmrtí [2]. Bohužel průměrné přežití pacientů po chirurgických výkonech je v rozmezí 15–19 měsíců. Pouze jedna pětina operovaných pacientů se dožije pěti a více let. Přibližně u poloviny pacientů dochází i po úspěšném zákroku k vzniku lokální recidivy či vývoji metastáz v lymfatických uzlinách [42].

Další metodou je radioterapie, která při léčbě nádoru využívá ionizující záření. Vysokoenergetický paprsek poškozují nádorové buňky a zabraňuje jejich další proliferaci [41]. Značnou komplikací při využití tohoto přístupu je anatomické umístění pankreatu v břišní dutině. V okolí slinivky břišní se nacházejí velmi radiosenzitivní orgány jako žaludek, tenké střevo, játra, ledviny a mícha [43]. Při léčbě této diagnózy může být využito zevní ozáření nebo kombinace zevního a intraoperačního způsobu ozáření, při kterém se snižuje dávka ozáření okolní tkáně. V případě samotné léčby lokálně pokročilých tumorů se doporučuje aplikovat dávku v rozmezí 45–54 Grayů (Gy) ve frakcích po 1,8–2 Gy [44]. Ovšem díky nízké radiosenzitivitě nádoru slinivky břišní se tato metoda nevyužívá primárně k léčbě tumoru. Radioterapie je většinou součástí kombinované léčby spolu s chemoterapií a chirurgickým zákrokem [43]. Využívá se k snížení pravděpodobnosti návratu rakoviny do původní lokality po chirurgickém odstranění. V kombinaci s chemoterapií se používá v podpůrné léčbě, která slouží k zmírnění bolesti pacientů s pokročilými nádory [4].

Chemoterapie využívá při léčbě nádorů chemické látky, tzv. cytostatika, která na malignitu působí různými mechanismy, které vedou k zastavení růstu a dělení, nebo k smrti

buněk. Cytostatika bohužel nepůsobí jen na nádorové buňky, ale i na ostatní buňky. Působí tak velké množství závažných vedlejších účinků na organismus pacienta (gastrointestinální problémy, změna krevního obrazu) [45].

Cytostatika se mohou podávat samostatně, nebo častěji v kombinaci. Výběr vhodného cytostatika nebo kombinace léků se odvíjí od diagnózy, stádia onemocnění, rozsahu postižení a celkového zdravotního stavu pacienta [2]. Mezi schválená cytostatika americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu rakoviny slinivky břišní patří 5-fluorouracil (Aduvicol) [46], gemcitabin (Gemzar), nab-paklitaxel (Abraxane) [41] či oxaliplatin (Eloxatin) [47] a jiné deriváty platiny [45]. Bohužel chemoterapie provedená aplikací pouze jednoho cytostatika přináší velmi malý přínos v léčbě nádoru pankreatu. Z tohoto důvodu se většinou využívá kombinovaná terapie [48]. Nejběžněji využívané kombinace cytostatik při terapii karcinomu pankreatu jsou Folfirinox složený z 5-fluorouracilu, leukovorinu, irinotekanu a oxaliplatin [2] a kombinace gemcitabinu a nab-paklitaxelu [4]. Za velmi účinnou se považuje také kombinace cytostatik gemcitabin a oxaliplatin (Gemox) [49]. Karcinom slinivky břišní je velmi chemorezistentní malignita, u kterého má chemoterapie pouze malý efekt. Chemoterapie se nasazuje především u pacientů s pokročilými stádii nemoci, většinou za účelem dočasně zamezit šíření nádoru, zmírnění bolesti a symptomů onemocnění a prodloužení života pacientů [4].

### **2.3 Platinová cytostatika**

Komplexy na bázi přechodných kovů jsou pilířem současné moderní chemoterapie. Platinové komplexy a jejich analoga působí jako velmi účinná chemoterapeutika a jsou hojně používána k léčbě široké škály typů nádorových onemocnění [5]. Závažné vedlejší účinky a zvyšující se rezistentnost po opakované aplikaci významně omezuje využití této skupiny cytostatik v klinické praxi. Tato omezení nás vedou k potřebě testování nových sloučenin na bázi přechodných kovů [50].

Dosud nejúspěšnější cytostatikum schválené k využití v protinádorové terapii je cisplatin (cis-diamindichloroplatinatý komplex, cDDP) [51]. CDDP se používá při léčbě nádorů vaječníků, varlat, močového měchýře, malobuněčných nádorů plic a některých malignit oblasti hlavy a krku [52]. I přes vysokou terapeutickou úspěšnost působí cisplatin mnoho závažných vedlejších účinků na organismus pacienta a efektivně léčí pouze úzké spektrum nádorů [53]. Bohužel cisplatin nevykazuje aktivitu u nejrozšířenějších rakovinových onemocnění slinivky břišní, prsu a u kolorektálního karcinomu, které jsou vůči cDDP přirozeně rezistentní [50]. Vzhledem k velkému množství nežádoucích a závažných nevýhod souvisejících s použitím cDDP se staly impulzem k vývoji méně toxických analogů cDDP a s odlišným spektrem účinnosti (karboplatin, oxaliplatin, ormaplatin, pikoplatin aj.). Pro klinické využití bylo doposud schváleno šest platnatých léčiv. Celosvětově se používají cisplatin, karboplatin a oxaliplatin. Nedaplatin, lobaplatin a heptaplatin jsou povoleny v klinické praxi pouze v Číně, Japonsku a Jižní Koreji [54].



### 2.3.1 Oxaliplatina

Oxaliplatina (1R,2R-diamin-cyklohexan-oxalátoplastnatý komplex) se řadí do druhé generace platnatých komplexů [55]. První klinické studie odhalily, že vykazuje mírnou aktivitu u pacientů s kolorektálním karcinomem, ovšem v kombinaci s 5-fluorouracilem a leucovorinem bylo pozorováno výrazné zvýšení její účinnosti vůči nádoru tlustého střeva rezistentnímu k cisplatině [50], [55]. Jako chemoterapeutikum pro léčbu rakoviny tlustého střeva byla schválena v Evropě v roce 1999 a roku 2002 byla oficiálně povolena ke klinickému využití Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) na území Spojených států amerických [54]. Dále je používána při léčbě rakoviny žaludku, pankreatu a u pacientů s metastatickým onemocněním. Účinná je také proti nádorům rezistentních k cisplatině [50].

Oxaliplatina je derivátem cisplatinu, u kterého byly odstupující atomy chloru nahrazeny oxalátovým ligandem a neodstupující amonné skupiny nahrazeny 1R,2R-diaminocyklohexanovým (DACH) nosným ligandem. Hydrolyza u oxaliplatinu probíhá pomaleji než v případě cisplatinu a dochází během ní k disociaci oxalátového ligandu. Díky pomalejší hydrolyze dochází k delšímu oběhu této sloučeniny v lidském těle, který zvyšuje pravděpodobnost její akumulace v nádorech [54]. Oxaliplatina působí obdobným mechanismem jako další deriváty platiny. Stejně jako cisplatinu tvoří adukty s DNA, které naruší průběh replikace a transkripce DNA, což vede ke smrti buňky. Bylo prokázáno, že mechanismus opravy chybného párování (tzv. MMR-mis-match repair) není schopen rozpoznat adukty vytvořené oxaliplatinou a z tohoto důvodu, i přes její menší reaktivitu s DNA, vykazuje podobnou nebo vyšší cytotoxicitu u několika typů lidských nádorů. Navíc oxaliplatina potřebuje méně DNA lézí k inhibici růstu nádorových buněk než cisplatinu [56]. Dále bylo zjištěno, že akumulace oxaliplatinu je méně závislá na transporteru CRT1 než cisplatinu nebo karboplatinu.

Omezením při aplikaci oxaliplatinu je především neurotoxicita [55] a chronická neuropatie neboli postižení nervů [57], která je závislá na zvyšujících se dávkách tohoto farmaka. Jedná se ovšem o reverzibilní poškození [47]. Dále může podávání oxaliplatinu způsobit poruchu polykání nebo nevolnost a zvracení [58].

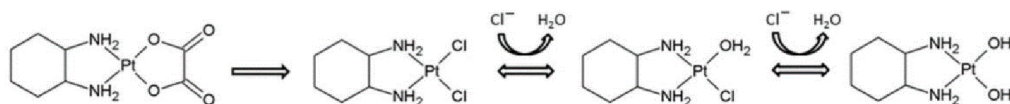
Ačkoli se jedná o analog cisplatinu vykazující méně závažné vedlejší účinky [55], nepředstavoval objev oxaliplatinu zásadní zlom v léčbě nádorových onemocnění, avšak například z hlediska léčby karcinomů tlustého střeva lze hovořit o významném pokroku. Stejně jako cisplatinu není oxaliplatina účinná proti nejčastějším typům nádorů. Z tohoto důvodu je stále vyvíjena velká snaha objevit preparáty aktivní vůči široké škále nádorů a způsobujících méně nežádoucích účinků na organismus pacienta.

### 2.3.2 Mechanismus působení oxaliplatinu

Oxaliplatině jsou připisovány různé mechanismy účinku, ovšem stejně jako i další deriváty platiny spočívá její primární cytotoxický účinek v poškození DNA buňky [56]. Oxaliplatina je relativně inertní platinový komplex pro jehož aktivaci je nutná hydrolyza. Ovšem díky chelatačnímu oxalátovému ligandu je oxaliplatina velmi stabilní vůči vodě [59].

## Mechanismus interakce oxaliplatinu s DNA

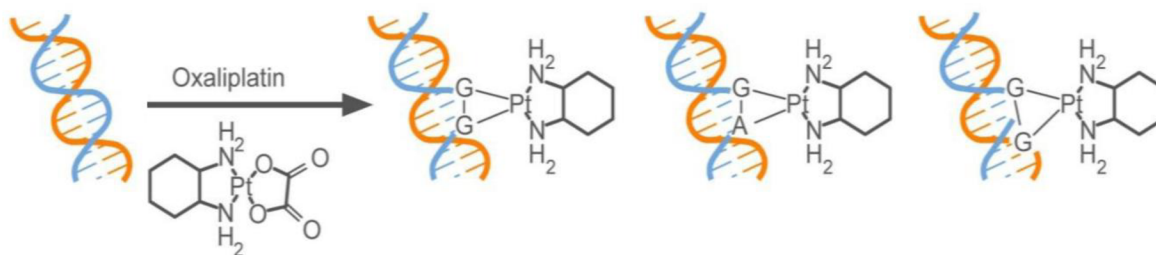
Po jejím intravenózním podání pacientům, koluje oxaliplatina krevním řečištěm obsahujícím vysokou koncentraci chloridových iontů (~100 mM) [60]. Dochází k disociaci a nahrazení oxalátového ligandu chloridovými ionty za vzniku stabilní dichloroformy (Obrázek č. 3). Tvorba těchto metabolitů zásadně odlišuje oxaliplatinu od cisplatinu [61]. Do nádorové buňky proniká oxaliplatina pasivní difúzí nebo aktivním transportem prostřednictvím proteinového transportéru mědi CTR1 [62]. Po vstupu chloridových derivátů oxaliplatinu do cytoplazmy s nižší koncentrací chloridových iontů (~3–20 mM) nastává její hydrolýza [61]. Při hydrolýze podléhá chloridový ligand derivátu oxaliplatinu substituci za molekulu vody a tvoří monoqua deriváty (cis~Pt-monoqua, Pt-DACH-monoqua). V dalším kroku se monoqua forma (cis~Pt-monoqua, Pt-DACH-monoqua) spontánně transformuje na diaqua komplex (cis~Pt-diaqua, Pt-DACH-diaqua) [59]. Hydrolyzováním vzniká hydratovaná a vysoce reaktivní forma této sloučeniny, která dále interaguje s nukleovou kyselinou, proteiny a dalšími buněčnými komponentami [62].



Obrázek č. 3: Schéma biotransformace oxaliplatinu při průchodu organismem pacienta [63].

Dichloro(DACH)platina akumulovaná v cytoplazmě buňky přechází do buněčného jádra [61], kde jeden její chloridový ligand disociuje za vzniku reaktivního monoquamonochlorového komplexu, který rychle vytváří kovalentní vazbu s atomem dusíku N<sub>7</sub> purinových bází (guanin nebo adenin) za vzniku monoaduktů na DNA [59]. Následně dochází k disociaci druhého chlorového ligandu a přeměně přechodných monoaduktů na stabilnější diadukty. Tyto reakce vedou k vytvoření vnitřetězcových a meziřetězcových příčných vazeb, které umožňují zesíťování vláken DNA způsobující změnu struktury DNA [62]. Tato poškození DNA mohou inhibovat replikaci DNA, zastavit buněčný cyklus a vyvolat apoptózu v rychle proliferujících nádorových buňkách.

Nejvíce nukleofilním místem DNA je atom N<sub>7</sub> guaninu. Tato pozice je přednostně platinována všemi klinicky využívanými platinovými léčivy. Oxaliplatina tvoří stejné typy DNA aduktů jako cisplatinu [59]. Na rozdíl od cisplatinu je ovšem oxaliplatina schopná tvořit vazby nejen s purinovými bázemi (Obrázek č. 4), ale také s cytosinem. Nejčastějším typem aduktů jsou vnitřetězcové bifunkční adukty spojující dva guaniny (1,2-d(GG)) DNA [56]. Tyto intrařetězcové adukty tvoří 60–65 % všech vytvořených vazeb. Způsobují inhibici replikace i transkripce DNA a jsou považovány za hlavní cytotoxické léze této sloučeniny. Dále vznikají méně časté intravláknové adukty mezi adeninem a guaninem, které tvoří přibližně 25–30 % všech aduktů [64]. V menší míře se platinové centrum koordinuje s guaninovými bázemi dvou různých řetězců DNA za vzniku meziřetězcových příčných vazeb (1–3 %) [56].



Obrázek č. 4: Struktury aduktů DNA tvořených oxaliplatinou [65].

Navzdory mnoha podobnostem mezi oxaliplatinou a cisplatinou existuje několik důležitých rozdílů v jejich biologickém cílení a mechanismech účinku, které souvisejí s jejich rozdílnými profily aktivity. Za prvé, adukty oxaliplatiny jsou objemnější a hydrofobnější než adukty cisplatiny [59]. Předpokládá se, že v důsledku jejich velikosti účinněji brání syntéze DNA a jsou více cytotoxické než adukty cisplatiny [64]. Kromě toho je transformace monoadduktu na diadukt v případě oxaliplatiny daleko pomalejší než v případě cisplatiny. Ačkoli je tvorba aduktů oxaliplatiny pomalejší a celkový počet vytvořených aduktů je výrazně nižší v porovnání s cisplatinou, potřebuje oxaliplatinu k vyvolání stejné cytotoxické reakce daleko nižší množství DNA lézí ve srovnání s cisplatinou [56].

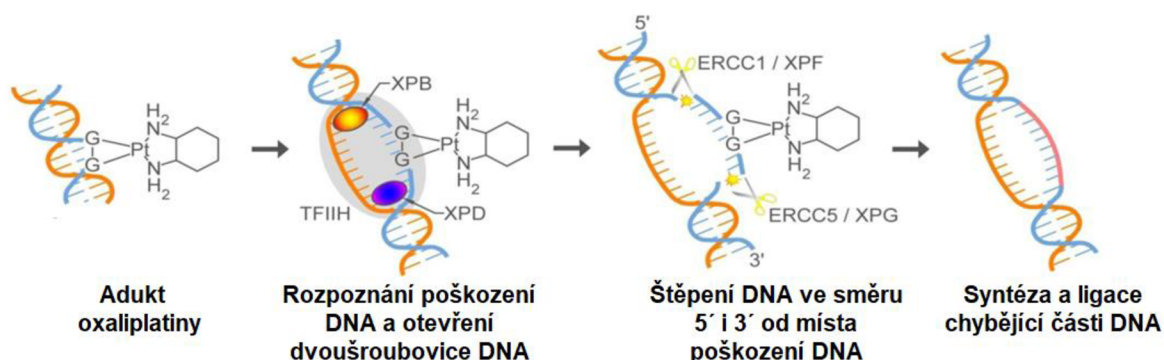
#### Další mechanismy působení oxaliplatiny

Ačkoli se předpokládalo, že oxaliplatinu působí stejným způsobem jako cisplatinu a inhibuje růst buněk a buněčnou smrt vyvoláním reakce na poškození DNA [61], bylo nedávno prokázáno, že kromě tohoto mechanismu také stimuluje apoptózu buněk vyvoláním stresu biogeneze ribozomů [66]. Přestože oxaliplatinu způsobuje deformace struktury DNA a inhibuje replikaci této nukleové kyseliny, nemusí se vždy jednat o dostatečné narušení pro zahájení buněčné smrti. Ovšem tyto modifikace mohou vést k inhibici syntézy rRNA, která by byla zodpovědná za indukci stresu biogeneze ribozomů v rakovinných buňkách [67]. V současné době se předpokládají tři hlavní mechanismy inhibice transkripce, a to zabránění navázání transkripčních faktorů na jejich promotorová místa na DNA, která jsou již obsazena platinovými adukty. Dále inhibicí RNA polymeráz, kdy se nemohou dusíkaté báze navázat na aktivní místo enzymu a vzniku nukleozomálních aduktů DNA, které blokují přístup RNA polymerázy k matici DNA. Dále byl prokázán vliv oxaliplatiny na translaci v nádorových buňkách [56]. U mnoha nádorových buněčných linií bylo stanoveno narušení syntézy proteinů již po 9hodinové aplikaci oxaliplatiny. Kromě těchto reakcí bylo prokázáno, že mechanismus účinku oxaliplatiny by mohl také způsobovat změny v metabolismu lipidů. Tuto hypotézu potvrdilo pozorování zvýšené produkce lipidových kapének v buňkách kolorektálního karcinomu po aplikaci oxaliplatiny, které naznačuje zapojení stresu metabolismu lipidů do buněčné smrti [68]. Tyto rozdíly v mechanismu působení vysvětlují, proč má oxaliplatinu odlišný profil cytotoxicity, vedlejší účinky a klinickou aplikaci ve srovnání s cisplatinou.

### 2.3.3 Rezistence

Ačkoli je oxaliplatina používaná k léčbě široké škály maligních onemocnění, je bohužel její využití omezeno přirozenou a získanou rezistencí nádorových buněk k tomuto léčivu, která může být zprostředkována vnějšími nebo vnitřními faktory. Existuje mnoho příčin, které přispívají k rozvoji rezistence [41]. V první řadě přispívá ke snížení terapeutického účinku inaktivace léčiva, způsobená interakcí platinových komplexů s různými biomolekulami obsahující síru (glutathion a metalothionein) při cestě krevním řečištěm k cílovému místu [69]. Při navázání chemoterapeutik k těmto biomolekulám dochází ke snížení množství dostupných molekul léčiv pro interakci s DNA, což zásadně ovlivňuje výslednou úspěšnost terapie.

Dalším faktorem přispívajícím k rozvoji rezistence je zvýšení četnosti oprav a změny v nejdůležitějších opravných drahách DNA lézí. V současnosti je uznáváno pět opravných drah, které chrání buněčnou DNA před poškozením, a to oprava vystřiženého nukleotidu, oprava chybného párování (MMR), oprava dvouřetězcových zlomů, básová excizní oprava a přímá oprava. Nejčastějším opravným procesem je nukleotidová excizní oprava (NER), během níž je poškozené místo rozpoznáno a vystřiženo (Obrázek č. 5). V místě odstraněné oblasti je poté znovu syntetizována DNA. V případě MMR dochází k rozpoznání poškození DNA Mut proteiny, které iniciují vyštěpení postižené oblasti [59] a dosyntetizování tohoto úseku DNA polymerázou  $\delta$  [60].



Obrázek č. 5: Schéma nukleotidové excizní opravy [65].

Je také zajímavé, že DNA adukty různých platinových komplexů jsou odlišně rozpoznávány řadou buněčných proteinů. Některé opravné proteiny mají vyšší afinitu k aduktům cisplatin než k aduktům oxaliplatiny. Například MMR proteiny nejsou schopny rozpoznat adukty tvořené oxaliplatinou, proto nespustí opravné dráhy. Tyto rozdíly v rozpoznávání aduktů cisplatin a oxaliplatiny přispívají k rozdílné cytotoxicitě cisplatin a oxaliplatiny a také k rozdílnému spektru senzitivních nádorů [59].

Tyto důvody vedou vědecké pracovníky k identifikaci sloučenin s vyšší účinností, sníženou toxicitou, které nevyvolávají rezistenci u nejrozšířenějších typů nádorových onemocnění

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit účinnost antiproliferativního působení nově syntetizovaných enantiomerů strukturně odvozených od oxaliplatiny a odhalit mechanismus jejich vlivu na vybraný panel nádorových i nenádorových buněčných linií.

Náš projekt si klade za úkol tyto konkrétní dílčí cíle:

- zjistit závislost akumulace sloučenin v nádorových buňkách,
- monitorovat buněčné odpovědi na studované cytotoxické sloučeniny v 2D i 3D podmínkách,
- detekovat generování lipidových kapiček v ošetřených buňkách,
- potvrdit tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) v nádorových buňkách po aplikaci testovaných látek,
- identifikovat typ buněčné smrti vyvolaný po aplikaci komplexů na vybraném modelu nádorových buněk,
- vytvořit rešerši na související témata.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Chemikálie a biologický materiál

Cisplatina (99,9%), oxaliplatina, N,N-dimethylformamid (DMF), ethanol ( $\geq 99\%$ ), dimethylsulfoxid (DMSO), formaldehyd (3,7%), kyselina octová (99%), kyselina trichloroctová ( $\geq 99\%$ ), tris a sulforhodamin B (SRB) byly zakoupeny u firmy Sigma–Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika.

Epidermální růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor (FGF2), hydrogenuhličitan sodný, L-glutamine, D-glukóza, puromycin, pyruvát sodný, rekombinantní lidský EGF (epidermální růstový faktor) a hovězí sérový albumin (BSA) byly pořízeny od společnosti Sigma Aldrich, Německo.

Gentamycin byl zakoupen od firmy Serva, Heidelberg, Německo.

ProLong™ Diamond Antifade Mountant s DAPI, B27, BODIPY™ 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene), trypsin, propidium jodid, Pacific Blue™ Annexin V a CellRox Deep red (oxidative stress deep red reagent) byly zakoupeny u firmy Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA.

CellTiter-Glo® 3D Reagent byl pořízen u Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA.

Fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS) byl zakoupen od firmy PAA, Pasching, Rakousko.

Kit NucleoSpin® RNA byl zakoupen u firmy Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA.

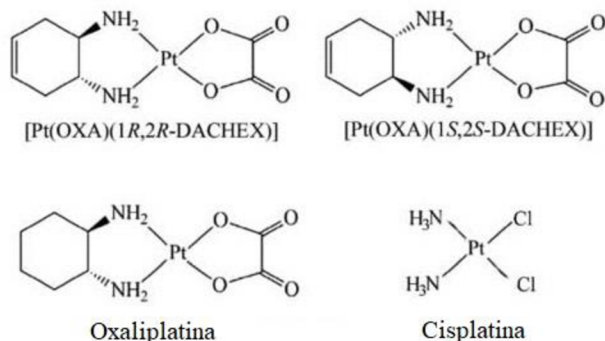
Kit RT-qPCR reakci Luna® byl pořízen od společnosti New England BioLabs, MA, USA.

#### 4.1.1 Studované platnaté komplexy

Komplexy na bázi přechodných kovů hrají již po několik desítek let důležitou roli v léčbě nádorových onemocnění. Platinové komplexy a jejich analoga představují velmi účinná chemoterapeutika, která jsou hojně využívána k léčbě řady typů rakovinových onemocnění. Používání této skupiny látek v klinické praxi je ovšem omezeno jejich poměrně výraznými vedlejšími účinky a postupným vývojem rezistence k těmto lékům při opakovaném podávání pacientům. Tato jejich omezení iniciují syntézu a testování nových sloučenin na bázi přechodných kovů.

Zavedení strukturně malé variace do nosného ligandu představuje jednu z možností, která umožňuje modulovat farmaceutické chování již používaných léčiv na bázi platiny. V nedávné době byla popsána nová skupina sloučenin strukturně odvozených od oxaliplatiny, konkrétně se jedná o racemickou směs a pár čistých enantiomerů [Pt(OXA)(1R,2R-DACHEX)] a [Pt(OXA)(1S,2S-DACHEX)] (OXA = oxalát, DACHEX = trans-1,2-diamino-4-cyklohexen) (Obrázek č. 6). V tomto případě došlo k vložení strukturní variace do

1,2-diaminocyklohexanového (DACH) nosného ligandu oxaliplatinu. Enantiomery obsahují ligand DACHEX vytvořený vložením nenasyčené dvojné vazby mezi uhlíky 4 a 5 1,2-diaminocyklohexanového kruhu. Tato strukturální modifikace snižuje flexibilitu cyklohexanového kruhu a zároveň zvyšuje jeho hydrofilicitu.



Obrázek č. 6: Struktury testovaných látek.

Nedávné studie ukázaly, že racemická směs [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)] vykazuje lepší cytotoxickou aktivitu než cisplatinu, ale srovnatelnou s oxaliplatinou. Dále bylo zjištěno, že směs je schopna překonat rezistenci vůči cisplatině (LoVo MDR) i oxaliplatině (LoVo OXP). Studie zaměřené na mechanismus působení racemické směsi [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)] odhalily, že směs nezpůsobuje buněčnou smrt klasickými mechanismy, jako je kondenzace DNA nebo poškození mitochondrií. Bylo prokázáno, že ošetření buněk LoVo OXP karcinomu tlustého střeva rezistentní k oxaliplatině racemickou směsí indukovalo zvýšenou produkci intracelulárních lipidových kapének v těchto buňkách, což naznačuje možnou interakci sloučenin [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)] s buněčným metabolismem lipidů.

Zásobní roztoky platnatých komplexů studovaných v rámci této práce byly rozpuštěny v DMF. Komplexy byly rozpuštěny na konečnou koncentraci 5 nebo 20 mM. Před testováním byly ze zásobních roztoků komplexů připraveny koncentrační řady sériovým zředěním v buněčném kultivačním médiu. Toxicitě DMF se předešlo zředěním zásobních roztoků komplexů, konečná koncentrace DMF v buněčném kultivačním médiu nepřesáhla 0,5 % v/v.

#### 4.1.2 Buněčné linie

Lidské buňky kolorektálního karcinomu HCT-116, lidské buňky ovariálního karcinomu senzitivní vůči cisplatině A2780 a lidské buňky ovariálního karcinomu se získanou rezistencí vůči cisplatině A2780cisR byly poskytnuty pracovištěm profesora Kepplera z University of Vienna (Vídeň, Rakousko). Vysoce invazní buňky adenokarcinomu prsu MDA-MB-231, buňky zhoubných sarkomů měkkých tkání příčně pruhované svaloviny rhabdomyosarkom (RD) a lidské buňky adenokarcinomu pankreatu PSN1 byly zakoupeny z Evropské banky pro buněčné kultury (ECACC; Salisbury, UK). Imortalizované lidské pankreatické buňky hTERT-HPNE byly zakoupeny z Americké sbírky tkáňových kultur (ATCC®).

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Rozmražení buněk

Podle čísel v systému laboratoře si najdeme umístění požadované buněčné kultury (1/1/5 – 1. válec, 1. stojan, 5. ampule od vrchu). Ampuli vyjmeme z pozice v dewarově nádobě, vložíme do kádinky s demineralizovanou vodou a umístíme na chvíli do inkubátoru. Rozmraženou ampuli otevřeme v boxu pomocí buničiny s ethanolem, kterým pečlivě zamraženou ampuli otřeme. Obsah ampule se spolu s 5 ml kultivačního média přeneseme do 15 ml falkonky a zcentrifuguje (250 g, 3 min). Medium se odsaje, k buněčnému peletu se přidá čisté kultivační médium.

### 4.2.2 Zamražení buněk

Speciální medium (cryo medium) – musí obsahovat 20% FBS a 5% DMSO (dimethylsulfoxid). Médium pro 4 ampule = 3,6 ml média (obsahuje již 10% FBS) + 400  $\mu$ l FBS nebo 9 ml média + 1 ml FBS. Do každé ampule se přidá 50  $\mu$ l přefiltrovaného DMSO (přes injekční 10 ml stříkačku s nasazeným filtrem s velikostí pórů 0,2 $\mu$ m). Buňky se zcentrifugují, původní médium se odsaje a buněčný pelet se zortexuje s novým mediem (speciálním médiem). Do jedné ampule se přidá 1 ml takto připravené suspenze.

### 4.2.3 Kultivace nádorových buněk

Ke kultivaci buněk HCT-116 a MDA-MB-231 bylo používáno médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, s vysokým obsahem glukózy, 4,5 g  $\cdot$  l<sup>-1</sup>) od firmy PAA (Pasching, Rakousko). Buňky PSN1, A2780, A2780cisR a RD byly kultivovány v médiu RPMI-1640 od firmy Biosera (Boussens, Francie). Média byla obohacena o gentamycin (50  $\mu$ g  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) zakoupen od firmy Serva (Heidelberg, Německo) a 10% tepelně inaktivované hovězí sérum (FBS; 10%) od firmy PAA (k 500 ml média se přidá 55 ml FBS a 2,5 ml gentamycinu). Získaná rezistence buněk A2780cisR byla udržována doplňováním média roztokem cisplatinu o finální koncentraci 1  $\mu$ M, tato suplementace probíhala opakovaně každou druhou pasáž. Buňky hTERT-HPNE byly kultivovány ve speciálně připraveném médiu, které se skládalo z 75 % DMEM bez glukózy a 25 % média M3 Base od firmy Sigma Aldrich (Německo). Toto médium bylo obohaceno o FBS (finální koncentrace 5 % v/v) od firmy PAA (Pasching, Rakousko), hydrogenuhličitan sodný v koncentraci 1,5 g/l od firmy Sigma Aldrich (Německo), L-glutamin v koncentraci 2 mM od firmy Sigma Aldrich (Německo), D-glukózu v koncentraci 5,5 mM od firmy Sigma Aldrich (Německo), puromycin v koncentraci 750 ng/ml od firmy Sigma Aldrich (Německo), rekombinantní lidský EGF v koncentraci 10 ng/ml a pyruvát sodný od firmy Sigma Aldrich (Německo). Buňky byly kultivovány v podmínkách plně humidifikovaného inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly pasážovány 2–3krát týdně s ohledem na růstové profily konkrétních linií. Nasazení buněk pro potřeby konkrétních experimentů se odvíjelo od aktuálního stavu buněčné linie, při dodržení maximálně 90% konfluence.

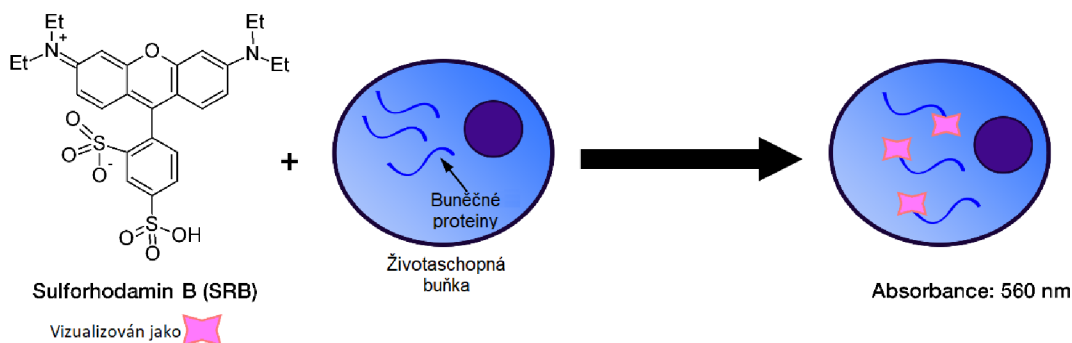
### 4.2.4 Antiproliferační aktivita

Cytotoxicita nebo antiproliferační aktivita komplexů je jedním z prvních ukazatelů v rámci testování nových komplexů s potenciálně protinádorovým účinkem. Pro zjištění tohoto důležitého parametru slouží celá škála metod založených například na kvantifikaci celkového



množství proteinů v daném souboru buněk (2-(3-diethylamino-6-diethylazaniumylidene-xanthen-9-yl)-5-sulfo-benzenesulfonate; SRB), akumulaci látky živými buňkami v lysozomech (neutrální červeně, 3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride; NR) a v neposlední řadě na přeměně určité látky vlivem činnosti enzymů v živých buňkách (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT nebo XTT 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxyanilid; MTT) [70].

Metoda SRB je založena na schopnosti barviva sulforhodaminu B vázat se v závislosti na pH na proteinové složky fixovaných buněk (Obrázek č. 7). Sulforhodamin B je jasně růžové, fluorescenční, aminoxanthenové barvivo se dvěma sulfonovými skupinami vázajícími se na bazické zbytky aminokyselin membránových buněčných proteinů za mírně kyselých podmínek. Navázaný sulforhodamin B za bazických podmínek disociuje a barvivo je extrahováno z buněk, vzniká tak stabilní kolorimetrický bod pro měření [71]. Množství navázaného barviva sulforhodaminu B je přímo úměrné celkovému množství buněčných proteinů, a tedy i celkovému počtu buněk [72]. SRB test je rychlá, levná, jednoduchá a neomezeně stabilní metoda (pokud je barvení vysušené na vzduchu) [73]. Výhodou této metody je malé ředění vzorků, které vede k menší chybě v analýze vzorků s vysokým obsahem bílkovin. Na rozdíl od XTT a MTT testu, nevyžaduje SRB test metabolickou aktivitu buněk, nerozlišuje tedy mezi životaschopnými a mrtvými buňkami [72]. SRB test poskytuje citlivé měření cytotoxicity léčiv pro *in vitro* testování na různých nádorových i nenádorových buněčných liniích. Díky testům cytotoxicity je možné přesně určit koncentraci látky, která je nutná k dosažení potřebné inhibice růstu nádorových buněk. Na základě výsledků této metody je následně možné porovnat známé látky z klinické praxe s těmi testovanými a stanovit další možný aplikační potenciál studovaných komplexů [71].



Obrázek č. 7: Princip testu SRB [74].

## Pracovní postup

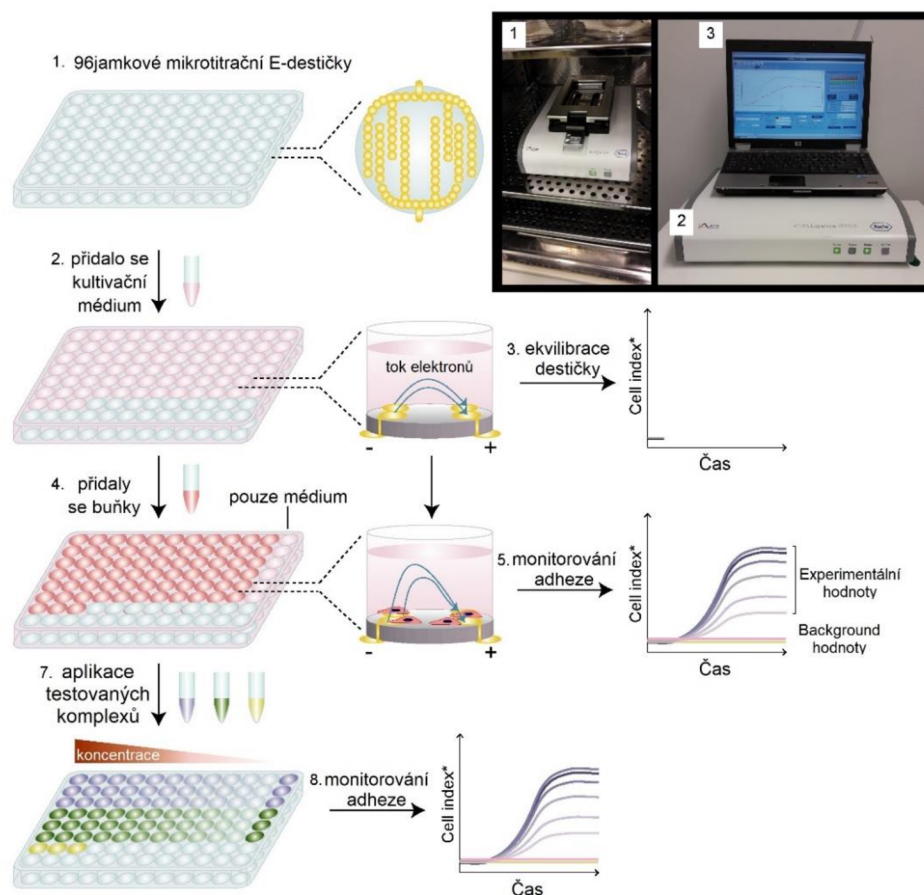
Antiproliferativní aktivita zkoumaných sloučenin byla hodnocena pomocí SRB testu. Jednotlivé buněčné kultury byly nasazeny na 96jamkové destičky (TPP) v počtech potřebných k dodržení exponenciálního růstu dané linie po čas experimentu. Buňky PSN1 a hTERT-HPNE byly nasazeny v hustotě 4000 buněk na jamku, buňky MDA-MB-231 a HCT-116 v hustotě 3000 buněk/jamku a buňky A2780 a A2780cisR v hustotě 10 000 buněk/jamku v 100  $\mu$ l příslušného kultivačního média na jamku. Po 24hodinové inkubaci v inkubátoru při 37  $^{\circ}$ C ve zvlhčené atmosféře a 5% CO<sub>2</sub> byly buňky ošetřeny testovanými sloučeninami (konečný

objem 200  $\mu\text{l}$  na jamku). Po 72-hodinové inkubaci buněk se studovanými komplexy bylo médium odsáto, jamky byly dvakrát opláchnuty 100  $\mu\text{l}$  PBS a adherované buňky byly fixovány po dobu 1 hodiny při 4°C 50  $\mu\text{l}$  10% kyselinou trichloroctovou (TCA). TCA byla odsáta, fixované buňky byly dvakrát opláchnuty 100  $\mu\text{l}$  MQ. Poté byly buňky obarveny 0,4% roztokem SRB (50  $\mu\text{L}$ /jamku; 0,4% v 1% kyselině octové) po dobu 30 minut. Následně byl roztok SRB odsát a jamky byly dvakrát opláchnuty 1% kyselinou octovou. Solubilizace barviva byla provedena pomocí Tris (10 mM, pH 10,5) za kontinuálního míchání po dobu 15 minut na třepačce. Životaschopnost buněk byla vyhodnocena měřením absorbance při vlnové délce 570 nm s pomocí absorpční čtečky TECAN SPARK (SCHOELLER). Antiproliferativní účinky byly vyjádřeny jako  $\text{IC}_{50}$  (koncentrace testované látky, která způsobí 50% pokles životaschopnosti buněk). Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byly vypočteny z křivek konstruovaných vynesáním přežití buněk (%) versus koncentrace léčiva ( $\mu\text{M}$ ). Hodnoty poté byly převedeny na procento kontroly (% přežití buněk). Koncentrace studovaných sloučenin aplikovaná na buňky byla ověřena pomocí FAAS (Varian, Austrálie) nebo ICP-MS (Agilent, USA). Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních.

#### **4.2.5 Monitorování buněčné impedance v reálném čase**

Tradiční metody hodnocení cytotoxických vlastností sloučenin poskytují pouze omezené informace o časovém průběhu cytotoxických účinků [75]. Reakce buněčných linií se mohou lišit nejen citlivostí k různým koncentracím látky, ale také svým časovým průběhem. Schopnost sledovat časový průběh cytotoxických účinků může přinést důležité indicie týkající se mechanismu cytotoxického účinku a buněčné smrti [76]. Impedimetrické metody jsou založené na měření změn v impedanci (elektrickém odporu). Tyto metody představují neinvazivní a nedestruktivní způsob umožňující charakterizaci a sledování reakcí buněk v reálném čase a mohou být použity pro hodnocení rozmanitých typů buněčných odpovědí (buněčná proliferace, cytotoxicita, aktivace receptorů, adheze, migrace, invazivita) v reakci na působení různých podnětů, toxických látek nebo farmak (Obrázek č. 8) [77].

Pro měření impedance buněk byl použit real-time monitoring pomocí systému xCELLigence RTCA (z angl. real-time cell analyzer). Systém xCELLigence využívá speciálně navržené 96jamkové mikrotitrační E-destičky, které obsahují zlaté mikroelektrody elektrického biosenzoru. Čidlo měří elektrickou impedanci nanosené populace zkoumaných buněk v jamce [78]. Buňky, které jsou v kontaktu s elektrodami, způsobují pokles procházejícího proudu a nárůst hodnot impedance. Při postupném pokrývání elektrod buňkami se také úměrně mění hodnota elektrické impedance, až do úplného jednovrstevného pokrytí. Měření impedance poskytuje kvantitativní informace o stavu buněk, včetně relativního počtu buněk, životaschopnosti a morfologie v čase [79].



Obrázek č. 8: Schéma použití systému xCELLigence RTCA k monitorování buněčné adheze [80].

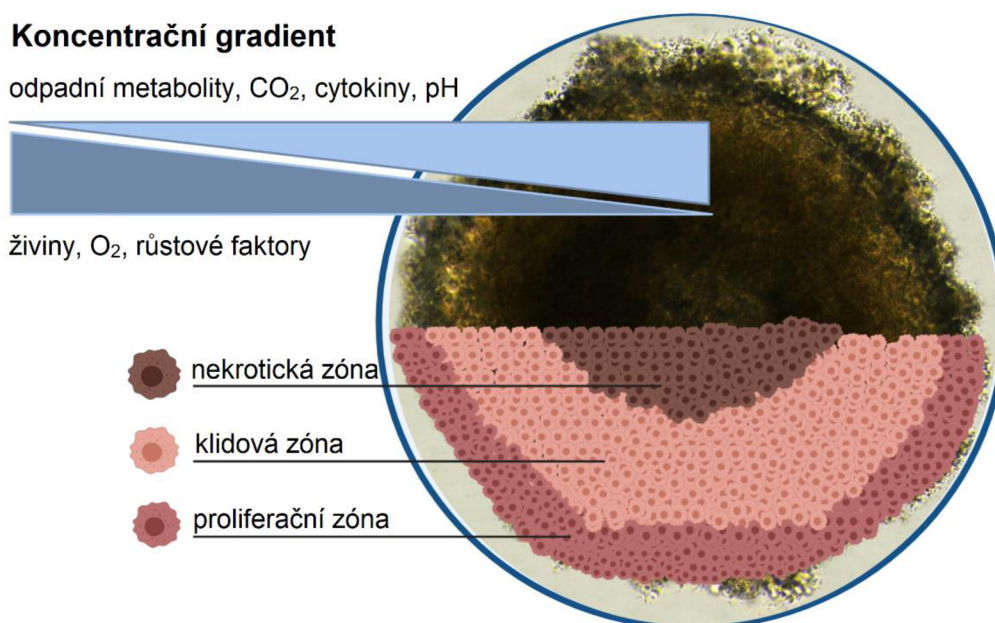
### Pracovní postup

Růst PSN1 buněk byl sledován buněčným analyzátozem v reálném čase (xCELLigence RTCA SP Instrument, ROCHE). Do každé jamky 96jamkové destičky s elektrodami (E-plate) bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  kultivačního média. Destička byla ekvilibrována s médiem pro ustálení kontaktu mezi médiem a elektrodami. Dále byly nastaveny parametry experimentu a byly naměřeny hodnoty pozadí, tedy impedance pro destičku s médiem. Buňky PSN1 byly naneseny na destičku v hustotě  $3 \times 10^3$  buněk na jamku (50  $\mu\text{l}$ ) a zkoumaná populace byla kultivována po inkubaci do druhého dne za fyziologických podmínek (37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Poté bylo k médiu přidáno 50  $\mu\text{l}$  testované sloučeniny o požadované koncentraci (dříve naředěno médiem) a impedance byla monitorována dalších 72 hodin v termostatu (37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Měření buněčného indexu probíhalo během celého průběhu inkubace. Hodnota buněčného indexu byla měřena v intervalu 5 minut po dobu celkového času 96 hodin.

Bezrozměrný parametr cell Index neboli buněčný index (CI) je kvantitativní míra odrážející stav buněk v jamce obsahující elektrodu (je to relativní změna naměřené elektrické impedance). Přítomnost buněk na horní části elektrody ovlivňuje místní iontové prostředí na rozhraní elektroda/roztok, což vede ke zvýšení impedance. Čím více buněk je přichyceno na elektrodě, tím větší je nárůst elektrické impedance. Normalizovaný CI v konkrétním časovém bodě se vypočítá jako CI v časovém bodě dělený CI v referenčním časovém bodě.

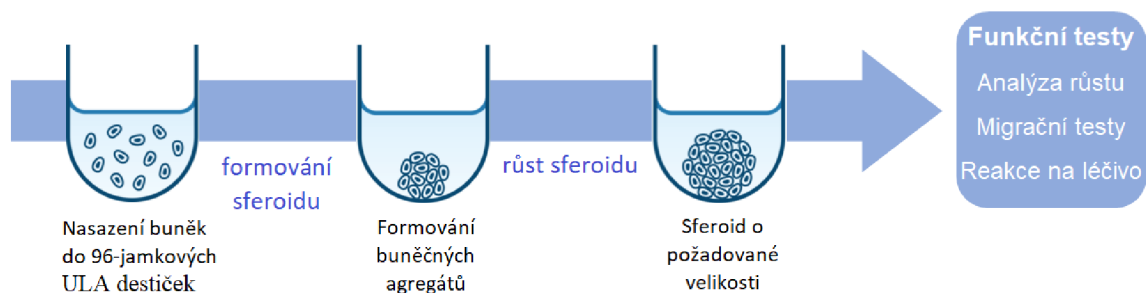
#### 4.2.6 Penetrace 3D sféroidů

Buňky *in vitro* můžeme kultivovat na 2D povrchu nebo ve 3D podmínkách. Buňky buď přisedají k povrchu kultivační misky a rostou v jedné vrstvě (2D) [81], nebo se zalévají do speciálních substrátů, které po ztuhnutí ukotvují buňky v nepolarizovaném stavu, a ve kterých buňky rostou ve formě kolonií (3D) [82]. Další, elegantní možností je kultivace buněk pro potřeby vytvoření 3D buněčných struktur na tzv. ULA (Ultra-low-attachment; nízko-adhezivních) plastech. Velkou výhodou tohoto systému je poměrně snadná příprava takovýchto modelových 3D buněčných systémů, tzv. sféroidů [83], [84]. Jedním z hlavních rozdílů pozorovaných při porovnávání buněk v 2D a 3D kulturách je odlišnost v morfologii buněk, která dále ovlivňuje její funkčnost [85]. 3D kolonie představují modelové prostředí, ve kterém probíhá velká část procesů běžných za *in vivo* podmínek (např. angiogeneze, buněčná diferenciaci, rozdílný přístup buněk k nutrientům, tedy tzv. nutriční gradient atd.) a trojrozměrné mikrotkaně se tedy velice blíží *in vivo* systému (Obrázek č. 9) [82], [86].



Obrázek č. 9: Model buněčného sféroidu [86].

Pro studium antiproliferativní aktivity studovaných komplexů na pokročilých stadiích adenokarcinomu pankreatu byly vytvořeny mikrotumory (3D sféroidy) různých velikostí z buněk PSN1. V 3D kultivaci buněk se využívají metody využívající speciální lešení (technologie zavěšených kapek, rotační kultury), bioreaktorů a živných gelů, případně kombinací zmíněných [87]. V tomto experimentu byla pro formování sféroidů použita technika kultivace buněk ve destičkách Ultra-Low Attachment se zaobleným dnem. Sféroidní mikrodestičky Corning® s kulatými dny potaženými Ultra-Low Attachment povrchovým povlakem zabraňují přichycení buněk k povrchu jamky a podporují tvorbu sféroidů buněk (Obrázek č. 10). V kombinaci se speciálně sestaveným médiem pak poskytuje tento systém vhodné podmínky k vytvoření 3D buněčných sféroidů [84].



Obrázek č. 10: Tvorba sféroиду [88].

### Pracovní postup

Antiproliferativní aktivita zkoumaných sloučenin byla studovaná na 3D sféroidech různých velikostí připravených z buněk PSN1. Buňky PSN1 byly kultivovány v DMEM-F12 médiu obohaceném růstovými a sféroidními faktory: 2 % B27 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), epidermální růstový faktor (EGF; Sigma Aldrich, Německo, 20 ng ml<sup>-1</sup>), fibroblastový růstový faktor (FGF2; Sigma Aldrich, Německo, 10 ng ml<sup>-1</sup>) a hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma Aldrich, Německo, 0,15 %). Buňky byly nasazeny v různé hustotě v rozmezí 1500–10 000 buněk na jamku 96jamkové destičky se zaobleným dnem potaženým Ultra-Low Attachment povrchem (Corning, USA), který zabraňuje ulpívání buněk na povrchu destičky a podporuje vznik sféroidních 3D buněčných struktur. Nasazení různého počtu buněk má za cíl vytvoření 3D sféroidů o různých definovaných velikostech, cca od 680 μm až po 1,5 mm. Buňky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin, během tohoto času došlo k efektivnímu zformování sféroidů s rozličnou velikostí. Následně byly sferoidy ošetřeny testovanými sloučeninami a inkubovány po dalších 144 hodin (6 dní). Antiproliferativní aktivita studovaných komplexů proti generovaným mikrotumorům byla určena změnami hodnot IC<sub>50</sub> stanovenými testem CellTiterGlo-3D (Promega), který umožňuje měření množství ATP i ve velkých sféroidních strukturách. Do každé jamky 96jamkové destičky bylo přidáno 100 μl CellTiter-Glo® 3D Reagent. Následně se destičky umístily na třepačku a za pokojové teploty intenzivně míchaly po dobu 5 minut. Pro stabilizaci luminiscence byly dále destičky inkubovány dalších 25 minut při pokojové teplotě. Životaschopnost buněk byla vyhodnocena měřením luminiscenčního signálu s pomocí čtečky SPARK (Tecan, Manedorf, Švýcarsko). Antiproliferativní účinky byly vyjádřeny jako IC<sub>50</sub> (koncentrace testované látky, která způsobí 50% pokles životaschopnosti buněk). Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vypočteny z křivek konstruovaných vynesemím přežití buněk (%) versus koncentrace léčiva (μM). Hodnoty poté byly převedeny na procento kontroly (% přežití buněk). Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních.

#### 4.2.7 Buněčná akumulace

Akumulace komplexů na bázi přechodných kovů představuje klíčovou vlastnost v mechanismu působení protinádorově aktivních farmak, která jednoznačně determinuje efektivitu cytostatik vůči nádorovým buňkám [89]. Látky, které nejsou schopny dostatečně penetrovat přes cytoplasmatickou membránu zpravidla bývají méně účinné, a navíc hrozí riziko

vzniku získané rezistence. Ke studiu se zpravidla využívá buněčných linií, u nichž je předpoklad aktivity daného farmaka a výběr konkrétní linie je tedy vždy individuální [90]. Ke stanovení schopnosti látek pronikat do nitra buněk se používají standartní postupy, s následným použitím analytické metody hmotnostní spektrometrie (ICP-MS) [89].

### **Pracovní postup**

Buněčná akumulace platiny byla stanovena v buňkách PSN1. Buňky byly nasazeny do 100 mm Petriho misek s hustotou  $2 \times 10^6$  buněk / misku. Po 24hodinové pre-inkubaci byly buňky ošetřeny testovanými sloučeninami platiny o finální koncentraci  $1 \mu\text{M}$ . Po aplikaci komplexů byly buňky inkubovány 24 hodin za fyziologických podmínek. Poté byly buňky promyty PBS ( $37^\circ\text{C}$ ), trypsinizovány, sesbírány a dvakrát promyty studeným PBS. Buňky byly spočítány automatickou počítačkou Biorad TC10. Dále byly buňky centrifugovány při 300 g, 3 minuty při  $4^\circ\text{C}$  ve dvou cyklech, při kterých se eliminovalo zbytkové množství extracelulárně přítomného studovaného komplexu. Buněčný pelet byl mineralizován roztokem kyseliny chlorovodíkové (5 M) za vzniku plně homogenního roztoku. Takto připravené roztoky byly patřičně naředěny pro snížení koncentrace kyseliny (doporučená koncentrace HCl pro měření na ICP-MS je do 5%). Konečné množství platiny absorbované buňkami bylo stanoveno pomocí ICP-MS.

Při studii zabývající se akumulací proteinů, jež byly předem modifikovány zkoumanými platinovými sloučeninami byly sloučeniny platiny pre-inkubovány po dobu 24 hodin při  $37^\circ\text{C}$  s FBS:PBS (1:1) (1,5 ml FBS + 1,5 ml PBS). Finální koncentrace testovaných komplexů byla pro tuto studii  $5 \mu\text{M}$ . Poté byly vzorky dialyzovány přes 3500 kDa cut-off membrány (Spectrum laboratories ®). Membrány byly před plněním převařeny v destilované vodě. Samotná dialýza byla provedena proti deionizované vodě (v MilliQ čistotě), při teplotě  $4-6^\circ\text{C}$ , ve třech cyklech po 1 hodině. V tomto kroku došlo k oddělení konjugátů protein-sloučenina od nenavázaných komplexů. Obsah platiny v připravených konjugátech byl analyzován pomocí ICP-MS. Pre-inkubované buňky PSN1 byly ošetřeny po dobu 24 hodin konjugáty protein-sloučenina s konečnou koncentrací platiny  $1 \mu\text{M}$ . Koncentrace aplikovaná na buňky byla ověřena pomocí FAAS. Poté byly buňky opláchnuty PBS ( $37^\circ\text{C}$ ), trypsinizovány, sesbírány a dvakrát promyty studeným PBS ( $4^\circ\text{C}$ ). Následně byly buňky centrifugovány a získaný buněčný pelet byl rozložen vysokotlakým mikrovlnným digestivním systémem (MARS5, CEM) s HCl (5 M). Obsah platiny byl určen pomocí ICP-MS.

#### **4.2.8 Detekce lipidových kapének**

Nádory jsou často vystaveny nutričně chudému prostředí s nízkou dostupností kyslíku a živin. Metabolický stres stimuluje buňky k vytvoření nových strategií pro překonání nepříznivých podmínek přizpůsobením metabolismu tak, aby byl efektivní pro další expanzi rakovinných buněk [91]. Mezi nejčastěji pozorované metabolické změny u rakoviny patří zvýšení glykolytické dráhy nezávisle na hladině kyslíku (Warburgův efekt) a transformace metabolismu lipidů ( $\beta$ -oxidace) [92]. Taková adaptace byla prokázána u rakoviny pankreatu, kde dochází ke zvýšení de novo syntézy mastných kyselin z mitochondriálního citrátu. Produkované mastné kyseliny jsou buňkami využívány pro syntézu triacylglycerolu nebo jiných jednoduchých lipidů, které se následně v buňkách akumulují [93].

Pro detekci produkovaných intracelulárních lipidových kapének byla využita fluorescenční hydrofobní sonda BODIPY 493/503, která po inkorporaci do lipidových intracelulárních kapének vykazuje intenzivní zelenou fluorescenci. BODIPY 493/503 (4,4-difluor-3a,4adiaza-s-indacen) je lipofilní sonda, která se lokalizuje do polárních lipidů a může být použita k značení buněčných lipidů lokalizovaných do lipidových kapének v živých i fixovaných buňkách [94]. BODIPY 493/503 je velmi malá molekula o molekulové hmotnosti 262 Da, která má výbornou permeabilitu přes membránu a je schopná rychle difundovat do buňky.

### **Pracovní postup**

Do každé 35 mm Petriho misky pro konfokální mikroskopii bylo nasazeno do 1 ml kultivačního média  $1,5 \times 10^5$  PSN1 buněk. Po 24 hodinách od nasazení byly buňky ošetřeny testovanými sloučeninami o koncentraci 5  $\mu$ M. Dále byly misky inkubovány při 37 °C ve zvlhčené atmosféře a 5% CO<sub>2</sub> po dobu 24 hodin. Poté byly buňky dvakrát promyty 1 ml PBS a obarveny fluorochromem BODIPY™ 493/503 (Molecular Probes) po dobu 2 hodin při 37 °C. Z misek bylo odstraněno barvivo a buňky byly dvakrát opláchnuty 1 ml PBS. Následně byly buňky zafixovány pomocí 500  $\mu$ l 3,7% formaldehydu, který se nechal působit 10 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí časového intervalu byl formaldehyd odsát a vzorky byly třikrát promyty 1 ml PBS. Nakonec byly preparáty překryty krycími sklíčky s pomocí kapky ProLong™ Diamond Antifade Mountant s DAPI, které zároveň obarvilo jádra buněk. Petriho misky byly obaleny parafilmem. Vzorky byly následně skenovány na konfokálním mikroskopu Leica TSC SP8 SMD (Leica Microsystems, Německo).

### **4.2.9 Izolace RNA**

Izolace nukleových kyselin je jednou z nejdůležitějších metod molekulární biologie, která představuje první a klíčový krok v analýze RNA nebo DNA [95]. Na její kvalitě a výtěžnosti závisí výsledek všech následně použitých metod [96]. Izolace nukleových kyselin stojí na počátku mnoha biochemických a molekulárně biologických metod, jako je například identifikace pachatelů trestných činů nebo testování nově vyvíjených protinádorových léčiv [95].

Izolaci RNA je třeba věnovat zvláštní pozornost, protože se jedná o velmi nestabilní molekulu s velmi krátkým poločasem rozpadu po extrakci z buněk nebo tkání [97]. Obecnou zásadou pro práci s RNA je ošetření vody i všech použitých pufrů, roztoků, povrchů a nástrojů proti RNázám. Získaná RNA se může dále analyzovat pomocí PCR testu [96].

### **Pracovní postup**

PSN1 buňky byly nasazeny na 6-ti jamkové destičky v hustotě  $0,3 \times 10^6$  buněk/jamku a inkubovány po dobu 24 hodin. Pre-inkubované buňky PSN1 byly ošetřeny po dobu 24 hodin ekvitoxickými koncentracemi testovaných komplexů, které odpovídaly hodnotám IC<sub>50,72</sub> h. Následně byla provedena izolace RNA s pomocí kolon NucleoSpin® RNA (Machery Nagel, GEL).

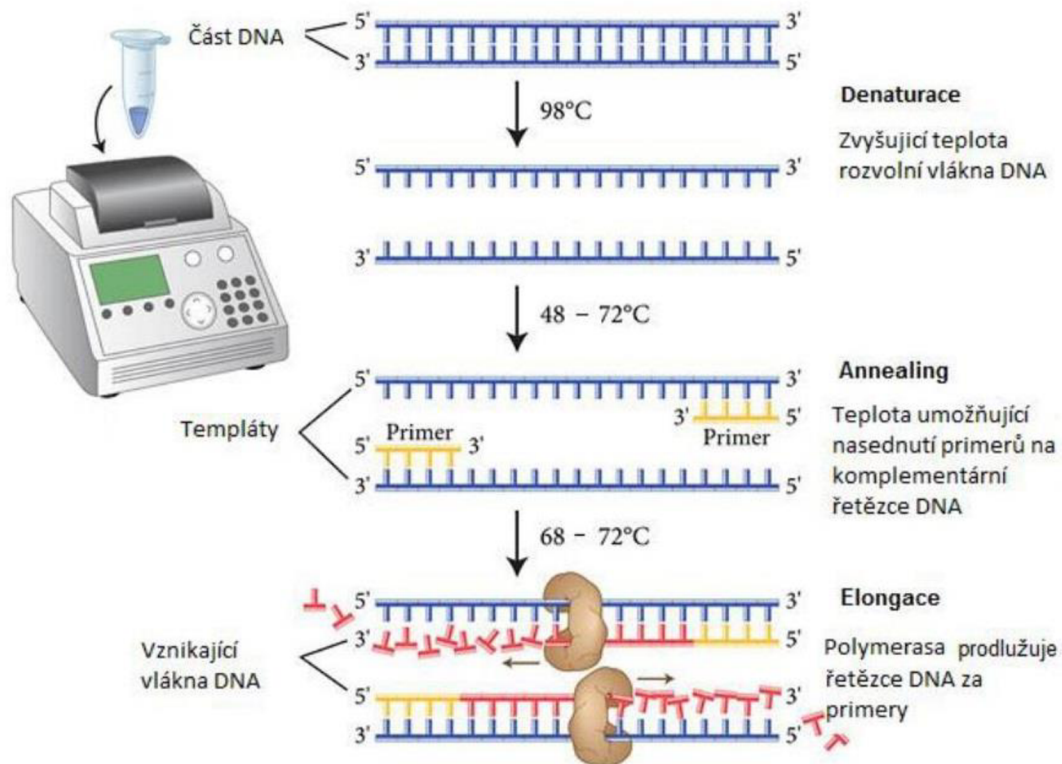
Buňky z každé jamky byly sklizeny seškrabáním v 1 ml PBS. Po centrifugaci bylo ze zkumavky odsáto PBS a k buněčnému peletu se přidalo 350  $\mu$ l Buffer RLT s 20  $\mu$ l 2M DDT (dithiothreitol). Homogenizovaný lyzát byl přenesen do kolony gDNA Eliminator umístěné ve 2ml sběrné zkumavce. Lyzát byl centrifugován po dobu 45 s při 10 000 g. K vodní fázi bylo přidáno 350  $\mu$ l 70% ethanolu a směs se přenesla do RNeasy kolony umístěné ve 2 ml sběrné zkumavce. Po centrifugaci a odstranění filtrátu byla RNA jednou promyta 700  $\mu$ l RW1 a dvakrát 500  $\mu$ l pufru RPE (centrifugace během každého přidavku 10000 g/45 s). Po posledním promývání RNA trvala centrifugace kolony po dobu 2 minut při plné rychlosti ( $\geq 12000$  g), aby se membrána vysušila a došlo k odstranění zbylého roztoku z RNA. Poté bylo k získané RNA přidáno 50  $\mu$ l vody a centrifugací se RNA eluovala z kolony RNeasy do nové sběrné zkumavky.

#### 4.2.10 Kvantitativní PCR v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda určená k rychlé amplifikaci definovaného úseku DNA nebo RNA z nepatrného množství materiálu zdrojové nukleové kyseliny *in vitro* [98]. PCR kopíruje pouze definované úseky genetického kódu ohraničených pomocí specifické sekvence. K známému ohraničujícímu úseku dané nukleové kyseliny, který má být amplifikován, se vyrábí syntetické komplementární oligonukleotidy zvané primery. Při PCR dochází k vytvoření jedné nebo několika exaktních kopií původního fragmentu DNA v několika řádech, čímž se vytvoří tisíce až miliony kopií konkrétní sekvence DNA. PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler [99]. PCR je revoluční a velmi významná metoda v molekulární biologii, která je používána k vědeckým potřebám, v prenatální diagnostice při diagnostice dědičných a infekčních onemocnění, dále ke kontrole potravin nebo pro účely identifikace osob v kriminalistice či genetické genealogii. S pomocí PCR je také možné identifikovat geny, které se podílejí na rozvoji rakoviny [98].

Metoda zahrnuje tři kroky, které probíhají v opakujících se cyklech (Obrázek č. 11). Prvním krokem je denaturace, při které jsou rozděleny řetězce DNA na dvě samostatná vlákna rozpadem vodíkových můstků mezi vlákna při teplotě 92-95 °C. Druhým krokem je hybridizace, při které se na denaturovaná vlákna DNA navážou oligonukleotidové primery – jeden pro každé separované vlákno DNA. Hybridizace probíhá při 50-60 °C s nadbytkem primerů. Krok dvě vede k získání dvou samostatných DNA vláken se sekvencemi ohraničenými primery. Obě vlákna jsou připravená na zkopírování. Třetím krokem je polymerace, která probíhá obvykle při 70-72 °C po dobu 1-1,5 minuty, kdy DNA-polymeráza replikuje úsek DNA mezi komplementárními místy k primerům [100]. Primer obsahuje volnou 3'-OH skupinu potřebnou pro kovalentní navázání dalšího nukleotidu a následné prodlužování řetězce a denaturovaná DNA zde funguje jako templát. Výsledkem elongace jsou dvě identické kopie originální DNA. Po proběhnutí těchto tří kroků následuje další cyklus, při kterém se použije nová, duplikovaná DNA [101]. Každý nový řetězec poskytuje měřitelný signál díky fluorescenční značce. Čím vyšší signál, tím více označených molekul DNA bylo v původním vzorku [100]. V případě jednořetězcové molekuly RNA je nutné provést tzv. reverzní transkripci, kdy je RNA nejprve „kopírována“ do dvouřetězcové molekuly DNA [101].





Obrázek č. 11: Průběh polymerasové řetězové reakce [102].

### Pracovní postup

Izolovaná RNA z buněk byla analyzovaná pomocí jednokrokové qPCR kombinující reverzní transkripci s následným amplifikačním tepelným cyklováním s využitím univerzálního mixu pro jednokrokovou RT-qPCR reakci Luna® (New England BioLabs, MA, USA). Purifikované primery byly od Generi Biotech (Česká republika). Sekvence primerů byly:

GAPDH-F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG,  
 GAPDH-R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA;  
 FASN1-F: TTCTACGGCTCCACGCTCTTCC,  
 FASN1-R: GAAGAGTCTTCGTCAGCCAGGA;  
 ACLY-F: GCTCTGCCTATGACAGCACCAT,  
 ACLY-R: GTCCGATGATGGTCACTCCCTT;  
 SCD1-F: CCTGGTTTCACTTGGAGCTGTG,  
 SCD1-R: TGTGGTGAAGTTGATGTGCCAGC;  
 SREBP1-F: ACTTCTGGAGGCATCGCAAGCA,  
 SREBP1-R: AGGTTCCAGAGGAGGCTACAAG.

Nejprve byly připraveny roztoky pro vybrané primery (GAPDH-F, GAPDH-R; FASN1-F, FASN1-R; ACLY-F, ACLY-R; SCD1-F, SCD1-R; SREBP1-F, SREBP1-R). Do každé jamky qPCR destičky bylo přidáno 11,2  $\mu$ l roztoku příslušného primeru a 8,8  $\mu$ l daného RNA templátu. Dále byla destička qPCR utěsněna opticky průhlednou fólií a krátce centrifugována, aby se odstranili bubliny (1 min 400 g). Experimenty byly prováděny na Illumina Eco real-time PCR (Illumina, CA, USA). Tepelný profil byl následující: reverzní transkripce po dobu 10 minut při 55 °C, počáteční denaturace po dobu 1 minuty při 95 °C, následovalo 43 tepelných cyklů denaturace po dobu 10 s při 95 °C a extenze po dobu 30 s při 60 °C.

#### 4.2.11 Analýza lipidových drah

Metabolismus lipidů je soubor katabolických a anabolických procesů, při kterých dochází k trávení nebo syntéze mastných kyselin a lipidů v lidském těle.

##### Kvantifikace lipolýzy

Lipolýza je metabolický proces, při kterém se triacylglyceroly (TAG) štěpí hydrolýzou na glycerol a volné mastné kyseliny (FFA). Glycerol a volné mastné kyseliny se uvolňují do krevního řečiště nebo v případě *in vitro* experimentů do kultivačního média. Jednotlivé složky mohou být následně oxidovány za vzniku metabolické energie ve formě ATP a redukovaných koenzymů (NADH, FADH<sub>2</sub>), nebo využívány v biosyntetických dráhách jako substrát [103]. K tomuto katabolickému procesu dochází ve všech buňkách, přičemž nejčastější je v bílé a hnědé tukové tkáni [104]. Díky rychlému a nekontrolovatelnému dělení vykazují nádorové buňky zvýšené nároky na energii a makromolekuly, kterým je vyhověno díky modifikaci metabolismu nádorových buněk. U nádorových buněk například dochází k Warburgově efektu, při kterém vytváří nádorová buňka ATP přednostně přeměnou glukózy prostřednictvím glykolýzy na laktát. Metabolismus glukózy je velmi těsně spojen s lipogenezí neboli syntézou lipidů. Jednou z důležitých charakteristik mnoha nádorových buněčných linií je zvýšená *de novo* syntéza mastných kyselin. V závislosti na typu nádoru mohou buňky syntetizovat až 95 % nasycených a mononenasycených mastných kyselin touto metabolickou cestou, což je neobvyklé v porovnání s normální tkání. Právě tyto aberantní metabolické dráhy představují potenciální cíl pro nová terapeutika [105].

Z biochemického hlediska začíná lipolýza navázáním molekul katabolického hormonu katecholaminu (isoproterenol) na specifický receptor na membráně adipocytu. V našem případě se po navázání adrenalinu aktivuje  $\beta$ -adrenergní receptor. Ve stimulovaném stavu  $\beta$ -adrenergní receptory aktivují adenylylcyklázu, která přeměňuje ATP cyklický AMP (cAMP) [106]. Cyklický AMP poté aktivuje hydrolýzu triglyceridů hormonálně citlivou lipázou. Cyklický AMP se váže na proteinový komplex zahrnující inaktivovanou proteinkinázu A (PKA) a způsobí její aktivaci. Aktivovaná PKA katalyzuje fosforylaci hormon-senzitivní lipázy (HSL), kterou ji uvede do aktivního stavu [107]. PKA zároveň katalyzuje fosforylaci perilipinu, proteinu tvořící ochrannou vrstvu tukových kapének uvnitř adipocytu, a zpřístupňuje tak povrch tukové kapénky HSL. Enzym následně katalyzuje štěpení triacylglycerolů. TAG je hydrolytickým štěpením rozložen na glycerol a mastné kyseliny. Glycerol uvolněný do média je v reakci katalyzované glycerolkinázou fosforylován adenosintrifosfátem (ATP) za vzniku glycerol-1-fosfátu (G-1-P) a adenosin-5'-difosfátu (ADP). G-1-P je dále oxidován

glycerolfosfát oxidázou na dihydroxyacetonfosfát (DAP) a peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Chinoniminové barvivo vzniká peroxidázou katalyzovanou kopolací 4-aminoantipyrinu a N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)m-anisidinu sodného (ESPA) s peroxidem vodíku [108]. Množství získaného produktu je úměrné množství přítomného glycerolu ve vzorku. Absorpční maximum tohoto barviva je při vlnové délce 540 nm. Výsledný produkt lipolýzy byl v našem případě stanoven pomocí kitu High Sensitivity Triglyceride Assay Kit.

### **Pracovní postup**

Do každé jamky 96jamkové černé destičky s plochým dnem (Corning) byly nasazeny PSN1 buňky v hustotě  $1 \times 10^4$  buněk na jamku. Buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin v humidifikovaném inkubátoru ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Poté byly buňky ošetřeny testovanými sloučeninami o zvyšující se koncentraci (dříve naředěno médiem) a koinkubovány po dalších 24 hodin. Lipolýza byla kvantifikována pomocí vysoce citlivého testu Lipolysis Fluorimetric Assay Kit (Sigma, Praha, Česká republika). Po ukončení 24hodinové inkubace buněk s aplikovanými komplexy bylo médium z jamek odebráno a buňky byly dvakrát promyty 100  $\mu\text{l}$  promývacím pufrem pro lipolýzu. Dále se do každé jamky 96jamkové destičky napipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru pro lipolýzu a vzorky pro pozitivní kontroly byly treatovány 1,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  isoproterenolu (konečná koncentrace 100 nM), který stimuluje průběh lipolýzy. Takto připravená destička se inkubovala po dobu 1–3 hodin. Po uplynutí tohoto časového intervalu bylo 50  $\mu\text{l}$  tohoto média z každé jamky přemístěno do nové 96jamkové popsané destičky (Corning). Buňky v 96jamkové destičce se použily pro stanovení hladiny triglyceridů pomocí triglyceridového kvantifikačního fluorometrického testu. Jamky byly následně doplněny pufrem pro lipolýzu na celkový objem 100  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{l}$  vzorku + 50  $\mu\text{l}$  reakčního mixu). Reakční směs byla připravena smícháním 42  $\mu\text{l}$  glycerolového pufru, 4  $\mu\text{l}$  vysoce citlivé sondy, 2  $\mu\text{l}$  glycerolové enzymové směsi a 2  $\mu\text{l}$  Glycerol Developer. Roztoky v jamkách se promíchaly pomocí horizontální třepačky. Destička se inkubovala po dobu 60 minut ve tmě při pokojové teplotě. Fluorescenční signál, úměrný množství glycerolu, byl kvantifikován měřením fluorescence při 535/587 nm na fluorescenční čtečce SPARK (Tecan).

### **Kvantifikace lipogeneze**

Lipogeneze je syntéza lipidů probíhající v játrech a tukové tkáni [109]. Během tohoto procesu vznikají v organismu mastné kyseliny z acetylkoenzymu A, které jsou dále využity v syntéze molekul triacylglycerolů. Triacylglyceroly (TAG) jsou tvořeny třemi mastnými kyselinami estericky navázanými na molekulu glycerolu [110]. Triacylglyceroly jsou nejhojnějšími přirozeně se vyskytujícími lipidy. TAG představuje hlavní složku rostlinných olejů (olivový, palmový a slunečnicový) [111], živočišných tuků (lůj, sádlo a máslo), lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) a chylomikronů [112]. V organismu představují hlavní zásobárnu mastných kyselin a metabolické energie. Vysoké koncentrace TAG v krvi zvyšují riziko vzniku aterosklerózy [112], pankreatitidy, srdečních chorob a mozkové mrtvice [113].

Pro stanovení hladiny triacylglycerolů ve vzorcích byla použita sada High Sensitivity Triglyceride Assay Kit. Jedná se o nepřímou analýzu, při níž je TAG hydrolyzován lipázou na glycerol a mastné kyseliny. Glycerol dále reaguje s redukčními látkami přirozeně obsaženými ve vzorku ( $O_2$  a ATP) a využívá se ve sdružené enzymatické reakci, jejímž výsledkem je fluorescenční produkt. Množství produktu (míra fluorescence) je úměrné množství přítomných triacylglycerolů ve vzorku.

### **Pracovní postup**

Lipogeneze byla kvantifikována pomocí High Sensitivity Triglyceride Assay Kit (Sigma, Praha, Česká republika). Tento test byl proveden ihned po dokončení kvantifikace lipolýzy a využívá pro lipolýzu dále nepotřebný buněčný pelet v 96jamkových destičkách. Buňky v každé jamce byly homogenizovány ve 100  $\mu$ l studeného pufru pro stanovení triglyceridů po dobu 10 minut na ledu za využití horizontální třepačky. Vzorky se následně centrifugovaly při 12 000  $\times$  g po dobu 5 minut při 4  $^{\circ}$ C. Do nové 96jamkové destičky se duplicitně napipetovalo 50  $\mu$ l získaného supernatantu každého vzorku. Vzorky se doplnily pufrem pro stanovení triglyceridů na konečný objem 50  $\mu$ l. Následně se do každé jamky přidaly 2  $\mu$ l lipázy, destičky se krátce promíchaly na horizontální třepačce a inkubovaly při 37  $^{\circ}$ C po dobu 20 minut. Během inkubace byla připravena triglyceridová reakční směs smísením potřebných objemů činidel pro celkový počet analyzovaných vzorků. Do každé jamky se přidává 50  $\mu$ l reakční směsi, která je složená z 45  $\mu$ l Triglyceride Assay Buffer, 1  $\mu$ l High Sensitivity Probe, 2  $\mu$ l Triglyceride Enzyme Mix a 2  $\mu$ l Triglyceride Developer. Destičky se krátce promíchaly na horizontální třepačce a inkubovaly se po dobu 30 minut při 37  $^{\circ}$ C ve tmě. Intenzita fluorimetrického produktu, úměrná množství přítomných triglyceridů ve vzorku, byla měřena při vlnových délkách 535/587 nm na fluorescenční čtečce SPARK (Tecan).

#### **4.2.12 Detekce reaktivních forem kyslíku**

Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) probíhá ve zdravých buňkách řízenou rychlostí. Při oxidačním stresu je produkce ROS dramaticky zvýšena, což má za následek oxidaci membránových lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Volné radikály vykazují velmi vysokou reaktivitu a od určité míry mohou působit destruktivně, čehož se právě využívá v protinádorové terapii [114]. Ke stanovení hladiny ROS v nitru buněk je možné použít řadu známých metod (např. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetát; DCFH<sub>2</sub>-DA), avšak při výběru metody je nutné zohlednit spektrální charakteristiku dané sondy a její možnou reaktivitu se samotnými studovanými komplexy kovů [115].

Pro stanovení množství volných kyslíkových radikálů byla použita fluorescentní sonda CellROX Deep red. Sonda CellROX® Deep red proniká do buňky v redukovaném stavu, po její reakci s ROS dochází k iniciaci fluorescence, změně spektrální fluorescenční charakteristiky, popřípadě zvýšení fluorescence o několik řádů. Tento signál je následně možné detekovat na fluorimetru, popřípadě s pomocí průtokové cytometrie či konfokální mikroskopie. Míra fluorescence je přímo úměrná množství vznikajících volných radikálů [116].

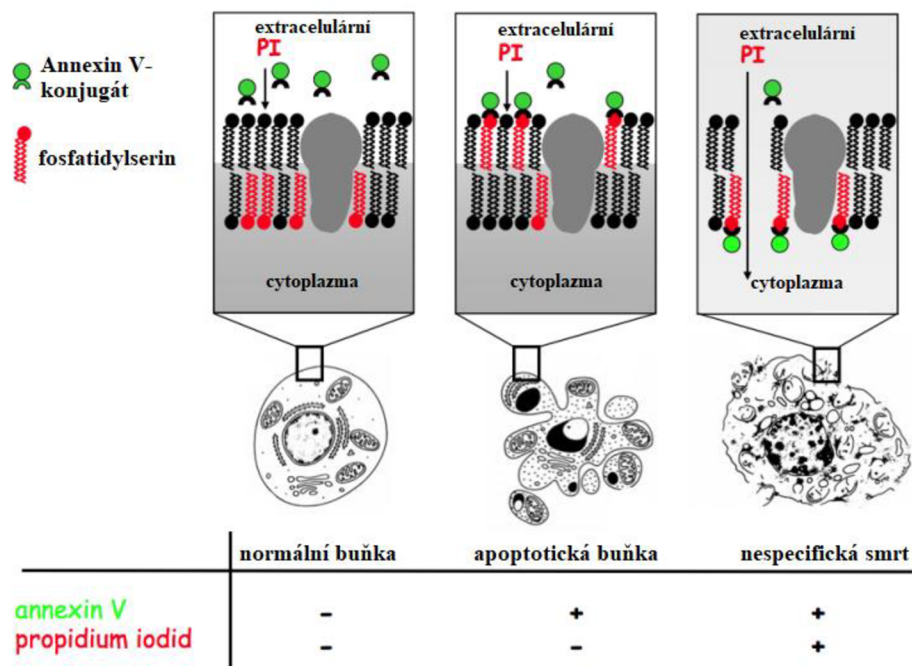
## **Pracovní postup**

Reaktivní formy kyslíku byly stanoveny pomocí CellRox® (Oxidative stress Deepredreagent; LifeTechnologies™, USA). PSN1 buňky byly nasazeny na 6ti-jamkové destičky při hustotě  $0,25 \times 10^6$  buněk / jamku a inkubovány po dobu 24 hodin. Dále byly buňky ošetřeny testovanými sloučeninami. Po 24hodinové inkubaci buněk se studovanými komplexy byly buňky sklizeny a barveny po dobu 30 minut fluorescenční sondou CellRox Deep red (ThermoFisher Sci.) o finální koncentraci 50  $\mu\text{M}$ . Ještě přidat centrifugaci. Následně byl buněčný pelet třikrát opláchnut v PBS. Po každém oplachu byl pelet centrifugován a původní roztok byl nahrazen čistým. Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru (BD FACS Verse). Data byla analyzována pomocí FSC Express 7 (De Novo Software, CA). Experimenty byly opakovány třikrát.

### **4.2.13 Detekce buněčné smrti**

Buněčná smrt je souhrn procesů vedoucích ke konci života buňky. Buněčnou smrt můžeme také definovat jako nevratnou ztrátu integrity plazmatické membrány. Buněčná smrt způsobená komplexy na bázi přechodných kovů má zpravidla apoptotický nebo nekrotický charakter. Oba tyto typy buněčné smrti vykazují specifické charakteristiky, které lze odhalit pomocí specifických mikroskopických (morfologické markery) či molekulárně-biologických metod (biochemické markery)[117].

Duální barvení annexin V/propidium jodid je jednou z nejčastěji používaných metod pro stanovení typu buněčné smrti buněk [118]. Živé buňky jsou negativní na oba fluorochromy, buňky po apoptóze jsou pozitivní pouze na Annexin V a buňky nekrotické jsou pozitivní na propidium jodid (Obrázek č. 12) [119]. Annexin V je velký vazebný protein, který má vysokou afinitu k fosfatidylserinu membránového fosfolipidu, které byly transportovány do vnějších vrstev membrány při apoptóze [118]. V našem případě byl annexin konjugovaný s fluorochromem pacific blue, tedy buňky pozitivní na apoptózu vykazují modrou fluorescenci.



Obrázek č. 12: Průkaz apoptózy [120].

### Pracovní postup

Typ buněčné smrti stimulovaný po ošetření testovanými sloučeninami byl kvantifikován testem annexin V/propidium jodid a analyzován s pomocí dvoudimenzionální průtokové cytometrie. Do každé jamky 6-ti jamkové destičky byly nasazeny PSN1 buňky v hustotě  $0,2 \times 10^6$  buněk/jamku a inkubovány po dobu 24 hodin. Poté byly buňky ošetřeny po dobu 24 hodin ekvitoxickou koncentrací testovaných sloučenin odpovídající hodnotě  $IC_{50}$  stanovené po 72 hodinách. Po uplynutí této periody (24h) byly buňky sklizeny, tedy medium bylo odebráno do označených 15 ml centrifugačních zkumavek, buňky byly promyty 1 ml PBS a trypsinizovány po dobu 3 minut v 300  $\mu$ l 1x trypsinu, pelet byl centrifugován a rozsuspendován ve 300  $\mu$ l „assay bufferu“ a obarveny 5  $\mu$ l annexinu V a 1  $\mu$ l propidium jodidu. Vzorokly byly analyzovány na průtokovém cytometru BD FACS Verse (Becton Dickson, USA) a analýza byla provedena v softwaru FSC Express 7 (De Novo software, CA).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Antiproliferační aktivita

Antiproliferační aktivita nebo cytotoxicita komplexů je jedním z nejdůležitějších prvních ukazatelů v rámci testování nových potenciálních cytostatik. Cytotoxicita či antiproliferační aktivita studované látky odkazuje na její schopnost cytotoxicky či cytostaticky působit na cílovou nádorovou buňku a tím ji usmrtit či inhibovat její růst [70]. Antiproliferativní aktivita studovaných komplexů Pt(II)-DACHEX v této práci byla stanovena testem SRB (sulforhodamin B), který je založený na měření obsahu buněčných proteinů. Tato metoda tedy nevyžaduje metabolickou přeměnu sloučeniny jako je tomu v případě testu XTT [72]. Cytotoxicita komplexů Pt(II)-DACHEX byla stanovena testem SRB po 72hodinové inkubaci sloučenin s buňkami. Na základě výsledků této metody byly následně stanoveny hodnoty  $IC_{50}$ , které stanovují koncentraci studované látky, která je nutná k dosažení 50% inhibice růstu nádorových buněk. Cytotoxické studie byly provedeny se sadou lidských rakovinných buněčných linií různého původu – buňky ovariálního karcinomu (A2780 – senzitivní vůči cisplatině a A2780cisR se získanou rezistencí k cisplatině), vysoce invazní buňky adenokarcinomu prsu MDA-MB-231, buňky kolorektálního karcinomu HCT-116, buňky rhabdomyosarkomu (RD) a buňky adenokarcinomu pankreatu PSN1. Kromě těchto linií byly do studie také zahrnuty lidské nemaligní pankreatické buňky hTERT-HPNE (viz Tabulka č. 1). Identické testy byly provedeny také s klinicky schválenými platinovými protinádorovými léky, cisplatinou a oxaliplatinou, které sloužily k porovnání výsledků. Dále byl vypočten selektivní (SI) (viz rovnice (1)) a rezistenční (RI) index (viz rovnice (2)).

$$SI = \frac{IC_{50,hTERT-HPNE}}{IC_{50,PSN1}} \quad (1)$$

$$RI = \frac{IC_{50,A2780cisR}}{IC_{50,A2780}} \quad (2)$$

Ze získaných výsledků vyplývá, že v případě ošetření buněk oběma enantiomery Pt(II)-DACHEX byly naměřené hodnoty  $IC_{50}$  v řádech mikromolů pro všechny zkoumané nádorové linie. Komplex [Pt(OXA)(1R,2R-DACHEX)] vykazoval nejvyšší účinnost ze zkoumaných látek, byl 3–27krát účinnější než klinicky využívaná cisplatina a stejně nebo 3–7krát účinnější než oxaliplatin. Účinnost komplexu [Pt(OXA)(1S,2S-DACHEX)] byla ve všech případech nižší v porovnání s R,R-enantiomerem a ve většině případů horší než v případě oxaliplatiny. Pouze u nádorové linie PSN1 byly naměřené hodnoty  $IC_{50}$  S,S-enantiomeru lepší než u oxaliplatiny (Tabulka č. 1).

Nejvyšší antiproliferační aktivita v buňkách adenokarcinomu prsu MDA-MB-231 byla stanovena pro R,R-enantiomer komplexu [Pt(OXA)(1S,2S-DACHEX)]. Nejnižší aktivita v této nádorové linii byla stanovena pro cisplatinu. V buněčné linii kolorektálního karcinomu HCT-116 jsme stejně jako v případě předchozí nádorové linie pozorovali nejlepší antiproliferační aktivitu v případě R,R-enantiomeru. Ovšem při porovnání s ostatními testovanými liniemi je patrná mírně zvýšená aktivita S,S-enantiomeru. V případě buněk rhabdomyosarkomu (RD) byly získané hodnoty  $IC_{50}$  pro R,R-enantiomer a jeho parentální sloučeninu (oxaliplatinu) velmi blízké až téměř shodné. Na základě těchto poznatků lze usoudit,

že R,R-enantiomer má stejnou ne-li lepší antiproliferační aktivitu k vybraným nádorovým liniím než oxaliplatinu.

Oba enantiomery obsahující ligand DACHEX vykazovaly výbornou antiproliferativní aktivitu v buňkách lidského karcinomu vaječníků A2780 a variantě tohoto nádoru se získanou rezistencí k cisplatině A2780cisR. Naměřené hodnoty  $IC_{50}$  pro R,R-enantiomer v případě těchto nádorových linií vykazovaly sub-mikromolární hodnoty. Získaný faktor rezistence pro R,R-enantiomer byl výrazně nižší (1,9) než faktory stanovené pro S,S-enantiomer (2,3), oxaliplatinu (4,7) nebo cisplatinu (5,9) (viz. Tabulka č. 2). Tyto výsledky ukazují na schopnost R,R-enantiomeru překonat rezistenci k cisplatině nebo oxaliplatině v případě této buněčné linie rakoviny vaječníků (A2780cisR). Tento závěr koreluje se zjištěním dříve provedené studie profesora Paride Papadia [68].

Z výsledků dále vyplývá, že chiralita zkoumaných sloučenin Pt(II)-DACHEX má významný vliv na jejich celkovou antiproliferativní aktivitu, přičemž enantiomer R,R byl 3,5–6,5krát aktivnější než enantiomer S,S v případě všech zkoumaných maligních buněčných linií. R,R-enantiomer vykazoval také velmi vysokou účinnost vůči buněčné linii PSN1 rakoviny pankreatu v porovnání s ostatními komplexy. V neposlední řadě je z výsledků patrné, že antiproliferativní aktivita komplexu [Pt(OXA)(1R,2R-DACHEX)] má výbornou selektivitu, a to až 37krát vyšší, pro maligní pankreatické buňky (PSN1) oproti nenádorovým pankreatickým buňkám hTERT-HPNE.

Tabulka č. 1: Antiproliferativní aktivita studovaných komplexů v panelu maligních a nemaligních buněčných linií stanovená testem SRB.

$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	A2780	A2780cisR	MDA-MB-231	HCT-116	RD	PSN1	hTERT-HPNE
R,R-enantiomer	0,31 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,20	1,80 $\pm$ 0,20	0,37 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,10	37,00 $\pm$ 3,00
S,S-enantiomer	1,20 $\pm$ 0,10	2,70 $\pm$ 0,30	9,00 $\pm$ 1,00	1,30 $\pm$ 0,20	4,10 $\pm$ 0,90	6,00 $\pm$ 0,40	20,00 $\pm$ 1,00
Mix	0,64 $\pm$ 0,08	1,40 $\pm$ 0,50	4,50 $\pm$ 1,70	0,66 $\pm$ 0,16	1,20 $\pm$ 0,30	4,70 $\pm$ 0,30	38,40 $\pm$ 2,30
Cisplatinu	2,70 $\pm$ 0,20	16,00 $\pm$ 3,00	22,00 $\pm$ 6,00	4,50 $\pm$ 0,80	8,00 $\pm$ 1,00	3,30 $\pm$ 0,20	40,00 $\pm$ 5,00
Oxaliplatinu	0,38 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,30	2,40 $\pm$ 0,30	0,51 $\pm$ 0,07	1,20 $\pm$ 0,30	7,00 $\pm$ 1,00	9,30 $\pm$ 0,70

Tabulka č. 2: Selektivní (SI) a rezistenční (RI) indexy studovaných komplexů.

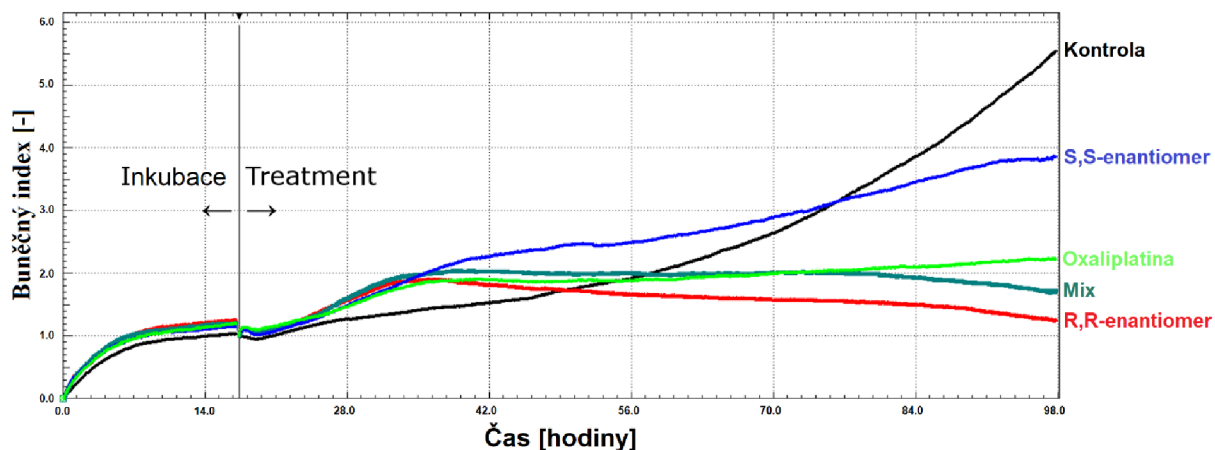
	SI [-]	RI [-]
R,R-enantiomer	37,00	1,94
S,S-enantiomer	3,33	2,25
Mix	8,17	2,19
Cisplatinu	12,12	5,93
Oxaliplatinu	1,33	4,74



Oba zkoumané enantiomery působí cytotoxicky na řadu nádorových buněčných linií, přičemž R,R-enantiomer je účinnější než S,S-enantiomer. Komplex [Pt(OXA)(1R,2R-DACHEX)] vykazoval velmi atraktivní a selektivní schopnost inhibovat životaschopnost buněčné linie PSN1 rakoviny pankreatu. Pro lepší pochopení jeho účinku byly další experimenty zaměřeny především na buněčnou linii PSN1.

## 5.2 Monitorování růstu buněk v reálném čase

Klasické cytotoxické testy, jako je MTT nebo SRB, poskytují hodnocení cytotoxických vlastností studovaných sloučenin pouze v daném časovém intervalu (tzv. endpoint analýza) [76]. Bylo prokázáno, že biologicky aktivní sloučeniny vyvolávají časově závislé specifické profily buněčné odezvy (time-dependent cell response profiles, TCRP), které umožňují predikovat mechanismus účinku zkoumaných komplexů [78], [121]. Pro lepší charakterizaci mechanismu působení enantiomeru R,R v buněčné linii pankreatického nádoru PSN1 byl použit detekční systém xCELLigence RTCA (z angl. real-time cell analyzer). Systém xCELLigence je založen na měření impedance buněk v reálném čase, čímž umožňuje monitorování a charakterizaci buněčných odpovědí a predikci mechanismu působení cytotoxických látek. Pre-kultivované buňky PSN1 byly ošetřeny testovanými sloučeninami v jejich ekvitoxických koncentracích odpovídajících hodnotám  $IC_{50}$  stanovených po 72 hodinách ( $IC_{50,72\text{ h}}$ ). Měření buněčného indexu (CI) probíhalo během celého průběhu inkubace buněk PSN1. V čase, kdy byly k buňkám přidány studované komplexy byl stanoven jako čas, pro nějž byl CI normalizován, tedy všechny křivky byly v tomto čase normalizovány na hodnotu 1.



Obrázek č. 13: Monitorování buněčné odezvy PSN1 buněk po aplikaci studovaných komplexů v reálném čase.

Ze získaných dat je patrné, že v průběhu 17 hodin (inkubace buněk do druhého dne) od nasazení došlo k rychlému nárůstu hodnot CI. Tyto změny odpovídají adhezi buněk na elektrody. Po aplikaci studovaných komplexů k buňkám došlo k poklesu hodnot CI, který je způsoben změnami původních podmínek jako je teplota média a mírným ovlivněním dosavadní rovnováhy v jednotlivých jamkách přidáním 50  $\mu$ l roztoků testovaných komplexů nebo média v případě kontroly. Pokud by se přidal k buňkám větší objem roztoků došlo by k významnějšímu poklesu hodnot CI v důsledku výraznějšího ovlivnění rovnováhy

v jednotlivých jamkách, na kterou reagují nasazené buňky (např.: uvolněním z elektrod, změna morfologie). Jedná se ovšem o zcela běžný jev, který neovlivňuje výsledky experimentu. Po treatmentu buněk bylo pozorováno zvýšení hodnot buněčné aktivity nad hodnoty stanovené pro kontrolu. Tento nárůst byl způsoben specifickou odpovědí buněk vyvolanou stresovým faktorem, aplikovanými komplexy. Mohlo dojít k růstu nebo dělení buněk, při kterých dochází k zvětšení objemu a povrchu buňky a změně nasedání buněk na elektrodu, případně k změně morfologického stavu buněk. Po uplynutí 16 hodin od ošetření (33 hodin) buňky v případě všech komplexů dále neproliferují, případně je jejich růst pouze mírně ovlivněn.

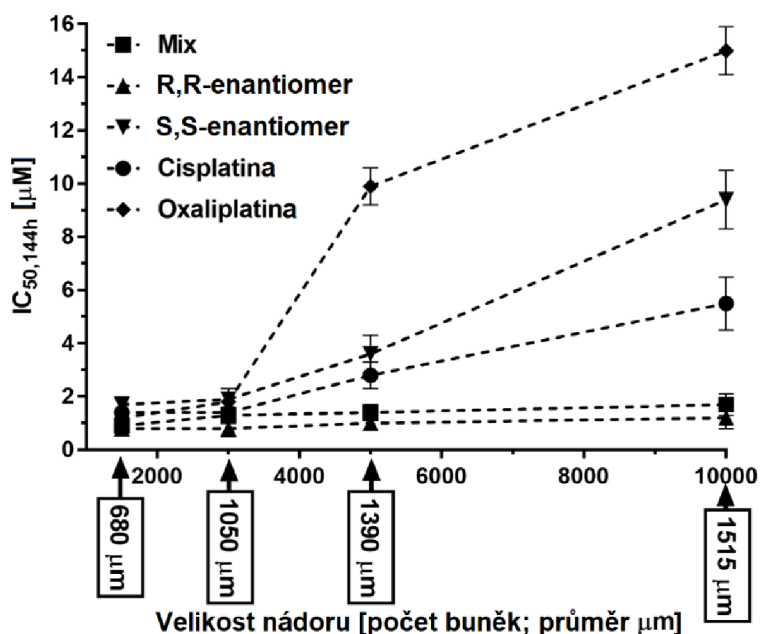
Profil TCRP enantiomeru R,R byl velmi podobný profilu pro oxaliplatinu (Obrázek č. 13). Ovšem po 16 hodinách od ošetření buněk (33 hodin od zahájení experimentu) začal normalizovaný buněčný index (CI) enantiomeru R,R klesat, zatímco v případě oxaliplatinu nedošlo k zásadní změně nebo pouze k mírnému zvýšení CI. Profil TCRP pro oxaliplatinu tedy naznačuje, že po ošetření buněk adenokarcinomu pankreatu PSN1 oxaliplatinou se buňky po 16 hodinách uvedou do klidového nebo mírně proliferativního režimu. Na rozdíl od oxaliplatinu hodnoty CI pro R,R-enantiomer nepřetržitě klesaly i po 16 hodinách od aplikace komplexu. Z těchto výsledků vyplývá, že antiproliferativní aktivita R,R-enantiomeru působí na buňky PSN1 po delší časový interval. TCRP získané pro R,R-enantiomer a oxaliplatinu v koncentracích blízkých jejich hodnotám  $IC_{50,72\text{ h}}$  byly charakterizovány mírným počátečním zvýšením CI ve srovnání s kontrolou, po kterém následoval časově závislý pokles CI pod kontrolní hladinu bez jakékoli známky opětovného zvýšení. Pokles hodnoty CI odráží cytotoxickou aktivitu komplexů. Profily TCRP R,R-enantiomeru a oxaliplatinu odpovídají růstovým křivkám sloučenin, které interferují se syntézou a replikací DNA, transkripcí a translací. Tyto agens poškozením DNA buněk indukují zastavení buněčného cyklu následovaného buněčnou smrtí. Kontinuální pokles CI v případě R,R-enantiomeru, ale nikoliv v případě oxaliplatinu, ukazuje na další mechanismus účinku enantiomeru v buňkách adenokarcinomu slinivky břišní, mimo interakci komplexů s buněčnou DNA. Profil TCRP pro S,S-enantiomer byl také shodný s profily TCRP sloučenin poškozujících DNA buněk. V případě S,S-enantiomeru byla ovšem pozorovaná mírná proliferace buněk i po ošetření buněk komplexem, avšak rychlost proliferace byla pod úrovní rychlosti proliferace u kontrolních (netreatovaných) buněk. Tyto výsledky ukazují na výrazně nižší antiproliferativní aktivitu tohoto komplexu.

R,R-enantiomer tedy působí antiproliferativní aktivitou na buňky PSN1 po delší dobu a daleko intenzivněji než S,S-enantiomer. Výsledky také naznačují, že R,R-enantiomer působí na nádorové buňky dvěma odlišnými mechanismy, které zvyšují jeho antiproliferativní působení. Na základě profilu TCRP lze předpokládat, že R,R-enantiomer interaguje s buněčnou DNA, ale také stejně jako oxaliplatinu působí i jiným mechanismem, který stimuluje buněčnou smrt. V dalších studiích jsme se tedy snažili podrobněji prozkoumat působení R,R-enantiomeru na PSN1 buňky a odhalit druhý mechanismus působení R,R-enantiomeru.

### 5.3 Inhibice růstu 3D sféroidů vytvořených z buněk adenokarcinomu pankreatu

I po provedení všech základních testů určených pro primární charakterizaci nových potencionálně protinádorově účinných komplexů není zcela jasná jejich efektivita na reálné nádory. Pro ověření antiproliferativní aktivity komplexů mohou být použity 3D buněčné kultury, které představují alternativu v první fázi hodnocení možného budoucího cytostatika pro testy za *in vivo* podmínek. Během tohoto experimentu se z nádorových buněk kultivovaných ve 3D prostředí formují kulovité kolonie s typickým rozdělením buněk do vrstev podle přísunu živin a kyslíku tzv. sféroidy [84]. Tyto 3D kolonie představují modelové prostředí, ve kterém probíhá velká část procesů běžných v *in vivo* a blíží se tedy více podmínkám *in vivo* než 2D kultury [86]. V této studii jsme se zaměřili na zhodnocení účinnosti zkoumaných látek na viabilitu adenokarcinomu pankreatu v různých fázích jeho vývoje (Obrázek č. 14).

Pro tento experiment byly vytvořeny z buněk PSN1 za nízko-adhezivních podmínek mikrotumory (3D sféroidy) o průměru od 0,6 mm do 1,5 mm. Antiproliferativní účinnost studovaných komplexů na mikrotumorech byla stanovena bioluminiscenčním testem CellTiter-Glo 3D, navrženým pro studii cytotoxicity v buněčných sféroidech a dalších mnohobuněčných strukturách rostoucích za 3D podmínek pomocí měření ATP. Při tomto testu byl k sféroidům inkubovaných po dobu 144 hodin se studovanými komplexy přidán luciferin, který reaguje s buněčnou ATP za současného generování luminiscenčního signálu. Luminiscenční signál je úměrný množství přítomného ATP, které koreluje s počtem životaschopných buněk v 3D buněčné kultuře.



Obrázek č. 14: Grafické znázornění aktivity zkoumaných komplexů v 3D sféroidech adenokarcinomu pankreatu v jeho různých fázích vývoje.

Získaná data naznačují relativně malé rozdíly v účinnosti zkoumaných sloučenin Pt(II) v mikronádorech o průměru asi 1 mm a méně. R,R-enantiomer vykazoval hodnoty  $IC_{50}$  poněkud nižší než ostatní testované sloučeniny (Obrázek č. 14). Při zvýšení průměru

mikrotumorů došlo k významnému snížení účinnosti oxaliplatinu, cisplatinu a S,S-enantiomeru, ovšem nikoliv R,R-enantiomeru. Tyto výsledky naznačují, že R,R-enantiomer má mnohem větší schopnost pronikat do pankreatických nádorů než jeho S,S enantiomer, oxaliplatinu a cisplatinu. Z těchto poznatků lze vyvodit závěr, že R,R-enantiomer daleko účinněji inhibuje životaschopnost buněk PSN1 obsažených v mikrotumorech než konvenční oxaliplatinu a cisplatinu. Vykazuje tedy lepší schopnost pronikat do nádorů pankreatu než ostatní studované komplexy. Tyto jeho vlastnosti z něj činí slibného kandidáta na budoucí cytostatikum, které by mohlo nahradit oxaliplatinu v chemoterapeutické léčbě rakoviny pankreatu.

Schopnost R,R-enantiomeru pronikat velmi účinně do pankreatických nádorů v porovnání s ostatními testovanými komplexy nás přiměla k podrobnějšímu prozkoumání mechanismu akumulace tohoto komplexu do nádorových buněk PSN1.

#### **5.4 Studie buněčného příjmu**

Buněčná akumulace je jedním z klíčových předpokladů cytostatického účinku protirakovinných sloučenin [122]. Po úspěšném naakumulování v rakovinných buňkách mohou sloučeniny dosáhnout svého molekulárního cíle a podporovat všechny následné reakce vedoucí k buněčné smrti nádorů. Klinicky používané platinové léky se pacientům nejčastěji podávají formou intravenózní injekce nebo infuze. Po intravenózním podání se značné množství platinového cytostatika naváže na plazmatické proteiny v krvi. Vazba cytostatika na vhodné proteiny představuje zásadní usnadnění transportu platinových léčiv v krevním řečišti k nádorovým ložiskům a klíčový faktor pro léčbu nádorů [123]. Ovšem v případě navázání cytostatika na proteiny obsahující síru (glutathion) dochází k inaktivaci komplexu a ztrátu jeho terapeutických vlastností [124]. Nádory akumulují přednostně transferin, lipoproteiny s nízkou hustotou a albumin zejména mechanismem receptorově zprostředkované endocytózy [125]. Dřívější studie prokázaly, že expandující nádory mají dvakrát až osmkrát vyšší příjem transferinu než okolní normální tkáň a ve vyšší míře využívají lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) k syntéze nových plazmatických membrán [126]. Vazba platinových léčiv na vhodné proteiny představuje slibný přístup, jak obejít nežádoucí vedlejší účinky komplexů na normální buňky a zvýšit jejich celkovou protinádorovou účinnost. Tento přístup tak umožní efektivnější a selektivnější transport komplexů do cílových nádorových buněk.

Hodnocení schopnosti zkoumaných sloučenin akumulovat se v buňkách adenokarcinomu pankreatu PSN1 bylo provedeno na buňkách inkubovaných se studovanými komplexy v ekvimolární koncentraci (1  $\mu$ M) po dobu 24 hodin. Obsah platiny v homogenním roztoku buněčného peletu byl stanoven pomocí ICP-MS. Z výsledků vyplývá, že v případě aplikace samotných sloučenin byla nejvyšší hodnota akumulované platiny zjištěna v případě ošetření buněk cisplatinou, přičemž nejnižší hodnota byla stanovena pro enantiomer R,R. S,S-enantiomer vykazoval v tomto případě lepší schopnost akumulovat se než oxaliplatinu a R,R-enantiomer. Tato skutečnost mohla být způsobena prostorovým uspořádáním komplexu, které je odlišné od R,R-enantiomeru a oxaliplatinu. Trend buněčné akumulace v tomto experimentu tedy byl cisplatinu > S,S-enantiomer > oxaliplatinu > R,R-enantiomer (Tabulka č. 3).

Tabulka č. 3: Buněčná akumulace testovaných komplexů v buňkách PSN1.

	Akumulace samotných komplexů (ng Pt na 10 <sup>6</sup> buněk)	Akumulace komplexů navázaných na plazmatické proteiny (ng Pt na 10 <sup>6</sup> buněk)
R,R-enantiomer	1,2 ± 0,2	0,70 ± 0,04
S,S-enantiomer	2,1 ± 0,4	0,52 ± 0,08
Mix	2,0 ± 0,1	0,61 ± 0,05
Cisplatina	3,5 ± 0,1	0,53 ± 0,04
Oxaliplatina	1,6 ± 0,1	0,57 ± 0,05

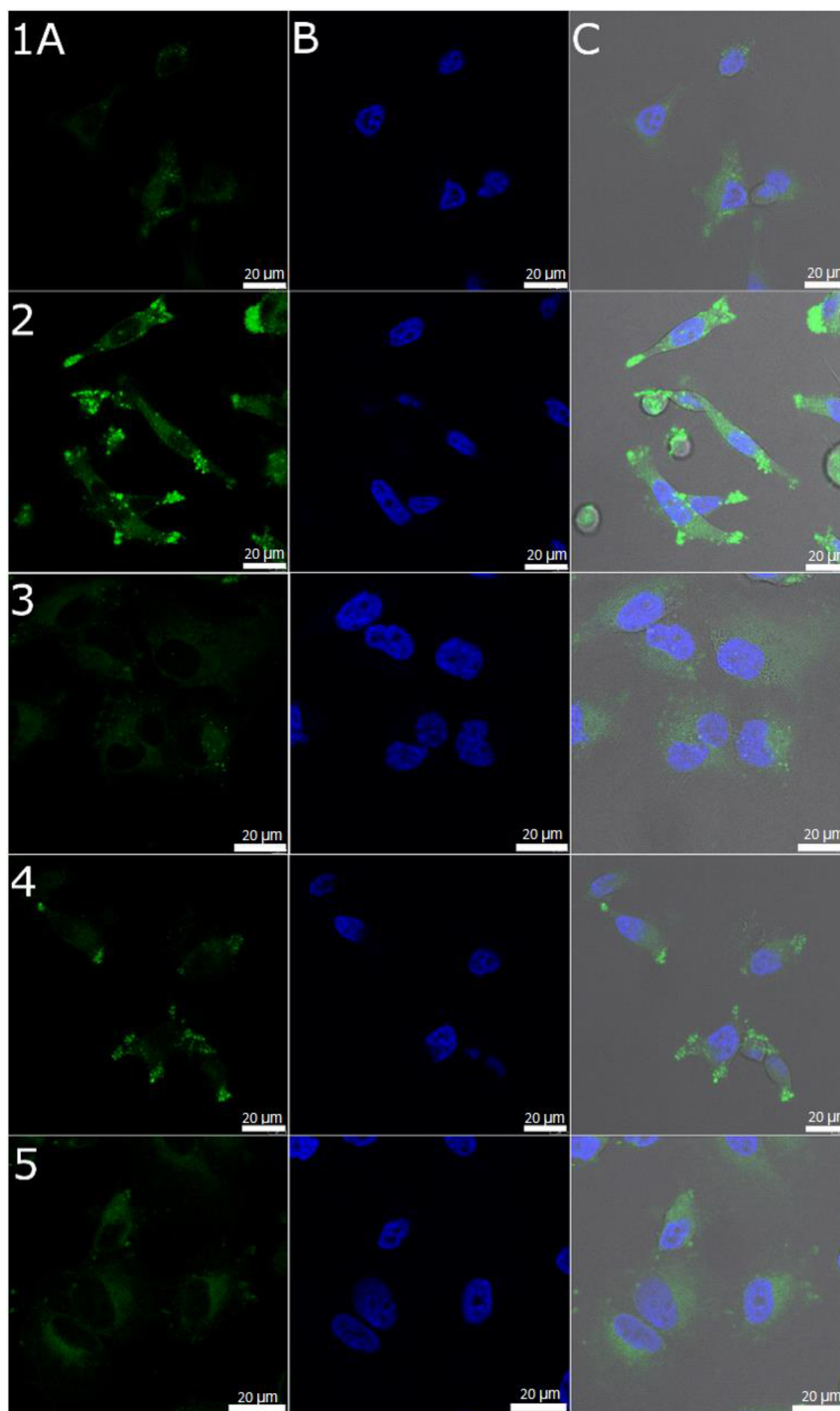
Dříve zmíněné interakce klinicky používaných platnatých cytostatik s plazmatickými proteiny nás inspirovaly ke stanovení akumulace zkoumaných sloučenin Pt(II) v buňkách PSN1 zprostředkované sérovými proteiny [127]. Za tímto účelem byly nejprve vytvořeny konjugáty protein-sloučenina inkubací testovaných látek po dobu 24 hodin při 37 °C s fetálním bovinním sérem (FBS). Vzorky byly následně dialyzovány pomocí 3500 kDa cut-off membrán. Získané vzorky obsahovaly pouze platinu vázanou na plazmatické proteiny. Dále byly buňky PSN1 ošetřeny po dobu 24 hodin předem připravenými konjugáty protein-sloučenina tak, aby konečná koncentrace platiny byla 1 μM. Konečný obsah platiny v buňkách byl stanoven pomocí ICP-MS. Při inkubaci buněk s proteinovými konjugáty testovaných komplexů byla nejvyšší hodnota akumulované platiny pozorována u R,R-enantiomeru. Naproti tomu hladiny akumulované platiny pozorované u ostatních komplexů byly téměř stejné a významně nižší než v případě R,R-enantiomeru (Tabulka č. 3). Tyto výsledky naznačují, že nižší schopnost R,R-enantiomeru akumulovat se v buňkách PSN1 jako volný komplex může být kompenzována jeho vyšší schopností být transportován do buněk jako navázaný na plazmatické proteiny.

### 5.5 Tvorba lipidových kapiček v buňkách PSN1 adenokarcinomu pankreatu

Předchozí studie ukázaly, že některé sloučeniny Pt(II)-DACHEX, jmenovitě racemická směs [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)] a oxaliplatina v buňkách karcinomu tlustého střeva rezistentních vůči oxaliplatině (LoVo OXP) a směs cis,trans,cis-[Pt(OXA)(OBz)<sub>2</sub>(1S,2S-DACHEX)] a oxaliplatiny v buňkách karcinomu tlustého střeva HCT-15 indukovaly tvorbu lipidových kapiček (LD) [68], [128]. Tvorba LD představuje indikátor indukce metabolického stresu v ošetřených buňkách [129], [130]. Z tohoto důvodu byly výsledky studií interpretovány tak, že mechanismus účinku sloučenin Pt(II)-DACHEX může zahrnovat změny v metabolismu lipidů léčených buněk rakoviny tlustého střeva [68], [128]. Otázkou ovšem je, zda sloučeniny Pt(II)-DACHEX mohou vyvolat změny v lipidovém mechanismu také v buňkách adenokarcinomu pankreatu a zda schopnost R,R a S,S enantiomerů sloučenin Pt(II)-DACHEX indukovat LD v PSN1 buňkách koreluje s jejich antiproliferativní aktivitou v těchto buňkách (Tabulka č. 1).

Pro získání dalších informací o mechanismu antiproliferativního působení zkoumaných sloučenin Pt(II)-DACHEX v buňkách adenokarcinomu pankreatu, jsme se zaměřili na zkoumání tvorby LD v buňkách PSN1 ošetřených R,R-enantiomerem, S,S-enantiomerem a oxaliplatinou pomocí fluorescenční sondy BODIPY™ 493/503 za využití konfokální

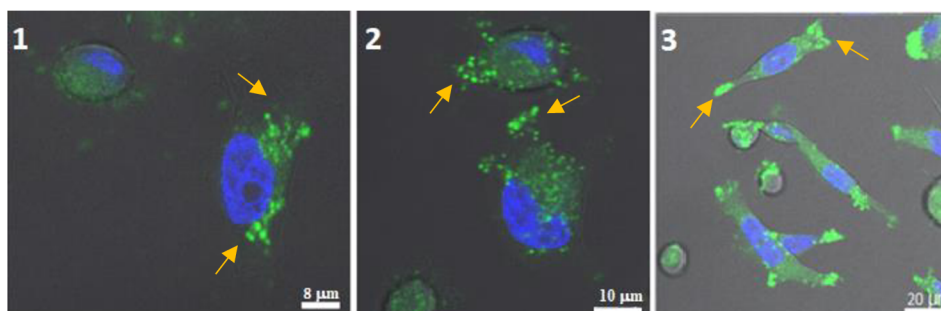
mikroskopie [131]. Buňky PSN1 byly inkubovány s aplikovanými komplexy o různých koncentracích (1 až 25  $\mu\text{M}$ ) a po různou dobu (1–24 hodin).



Obrázek č. 15: Konfokální mikrofotografie lipidových kapének detekovaných v PSN1 buňkách ošetřených studovanými komplexy.

V případě neošetřených buněk PSN1 (Obrázek č. 15; panel 5) a buněk ošetřených S,S-enantiomerem (Obrázek č. 15; panel 3) nedošlo ke generování LD. Naproti tomu po ošetření buněk R,R-enantiomerem byla pozorována významná tvorba LD (Obrázek č. 15; panel 2) a pouze střední množství LD se vytvořilo po aplikaci oxaliplatinu na buňky LD

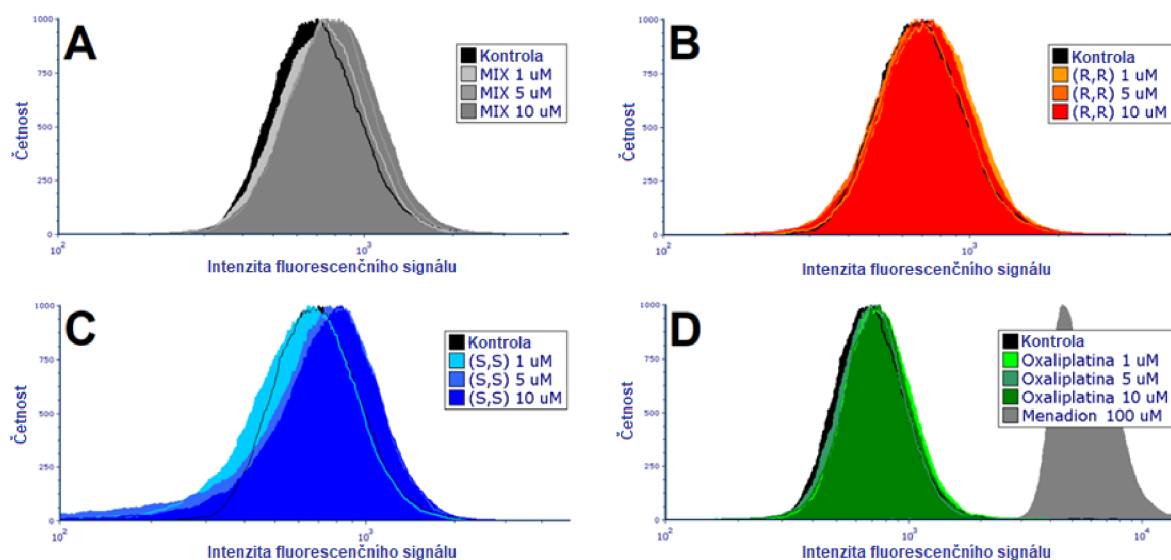
(Obrázek č. 15; panel 4). Je pozoruhodné, že po ošetření buněk PSN1 R,R-enantiomerem nebo oxaliplatinou se LD generovaly v oblastech blízko buněčného jádra (zobrazeno na Obrázek č. 15 pro buňky ošetřené zkoumanými sloučeninami v koncentraci 5  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin), což naznačuje, že LD se pravděpodobně vytvořily v endoplazmatickém retikulu (ER) podle obecně uznávaného modelu biogeneze LD [132], [133]. V případě racemické směsi komplexů Pt(II)-DACHEX (Obrázek č. 15; panel 1) došlo k vytvoření pouze velmi malého množství LD. Tato skutečnost může naznačovat větší zastoupení S,S-enantiomeru ve směsi nebo poukazovat na jeho větší reaktivitu v porovnání s R,R-enantiomerem.



Obrázek č. 16: Snímky časově závislého apikálně řízeného pohybu LD v PSN1 buňkách ošetřených R,R-enantiomere.

Dále byl v buňkách PSN1 po ošetření R,R-enantiomerem nebo oxaliplatinou pozorován časově závislý apikálně řízený pohyb LD (Obrázek č. 16), který ustal po 24 hodinách. Během tohoto pohybu se LD přemístily na periferii intracelulární matrice buněk, blízko pseudopodií buněk. Na obrázku číslo 16 jsou zachyceny PSN1 buňky po 3 (panel 1), 4 (panel 2) a 24 (panel 3) hodinách od aplikace R,R-enantiomeru. Snímky zachycují počátek biogeneze LD, které jsou zatím méně výrazné a lokalizované do perinukleárních oblastí, popřípadě se začínají volně distribuovat v cytoplasmě. Následný posun k periferiím buňky je výrazně patrný až po oněch 24 hodinách. Tento pohyb má napomáhat růstu a rozkladu LD, umožňoval tedy přenos živin z míst syntézy do míst potřeby [134]. Výsledky experimentů tedy ukazují, že R,R-enantiomer může vyvolat metabolický stres a pravděpodobně způsobuje změny v lipidovém mechanismu.

Ve dřívějších studiích bylo také prokázáno, že v buňkách vystavených účinkům reaktivních forem kyslíku (ROS) dochází k zvýšené stimulaci tvorby LD v důsledku buněčné obrany k molekulám ROS [135]. Cílem této reakce je odstranit ROS z buněk tak, aby dále na buňku nepůsobily. Pro potvrzení, že k tomuto mechanismu může docházet také v případě pankreatických buněk PSN1 ošetřených studovanými sloučeninami této studie, jsme stanovili přítomnost ROS v buňkách PSN1 ošetřených 1, 5 a 10  $\mu\text{M}$  sloučeniny Pt(II)-DACHEX a oxaliplatinou po dobu 24 hodin. Reaktivní formy kyslíku byly kvantifikovány průtokovou cytometrií pomocí fluorescenční sondy CellRox®. Naše pozorování neodhalila žádnou tvorbu ROS (Obrázek č. 17). Tyto výsledky nás vedou k závěru, že tvorba LD v buňkách PSN1 ošetřených R,R-enantiomerem nebo oxaliplatinou nebyla vyvolaná v důsledku účinků ROS.



Obrázek č. 17: Histogram četnosti molekul ROS v buňkách PSN1 po aplikaci studovaných komplexů.

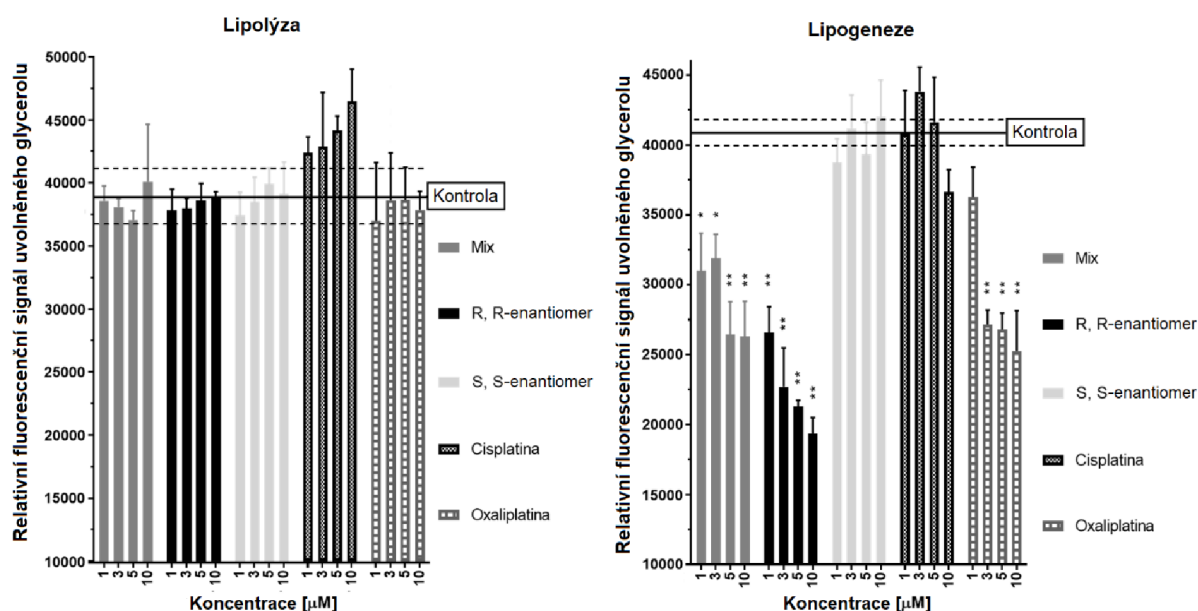
Výsledky experimentů zaměřených na tvorbu LD v buňkách adenokarcinomu pankreatu PSN1 (Obrázek č. 15) ukazují, že oxaliplatin a především R,R-enantiomer sloučeniny Pt (II)-DACHEX, ale nikoli její S,S-enantiomer, může vyvolat metabolický stres a s tím související změny v metabolismu lipidů. V dalších pokusech jsme se tedy zaměřily na odhalení způsobených změn v metabolismu lipidů způsobených po aplikaci R,R-enantiomeru Pt (II)-DACHEX v buňkách PSN1.

## 5.6 Analýza lipidových metabolických drah

Lipidy představují účinné stimulatory proliferace buněk lidského karcinomu slinivky břišní. Ovšem v případě nepankreatických buněčných linií nedochází k stejnému efektu, tedy v případě jiných linií nedochází k účinné stimulaci proliferace [136]. Tato skutečnost činí z metabolismu lipidů velmi atraktivním faktor pro modulaci růstu buněk rakoviny slinivky břišní [137]. Stimulace produkce LD by tedy mohla být jedním z faktorů odpovědných za změnu esenciálních metabolických cest lipidů v buňkách adenokarcinomu pankreatu PSN1 ošetřených RR-enantiomerem nebo oxaliplatinou. Nedávné studie navíc také odhalili, že po ošetření buněk kolorektálního karcinomu oxaliplatinou dochází ke změnám v zastoupení druhů a metabolických drah lipidů [138]. Oxaliplatin významně snižuje expresi genů (downregulované) MOAGT2, LIPE a AADAC, které souvisejí se syntézou a odbouráváním TAG. Dřívější studie prokázaly, že downregulace MOGAT2 může hrát zásadní roli při snižování množství TAG v buňkách kolorektálního karcinomu. Současně se předpokládá, že arylacetamid deacetyláza (AADAC) by mohl hydrolyzovat TAG a produkovat mastné kyseliny pro beta-oxidaci, jeho snížením tedy dochází k omezení produkci mastných kyselin. Gen LIPE kóduje hormon-senzitivní lipázu (HSL), enzym zodpovědný za lipolýzu (rozklad) TAG. Buňka tedy snižuje nejen produkci ale i rozklad TAG na mastné kyseliny [138]. Oxaliplatin je schopná vyvolat stres v endoplazmatickém retikulu [139], [140] které představuje hlavní buněčnou organelu účastnící se lipogeneze a je místem syntézy lipidových kapének [132], [141].



Hladiny lipolýzy a lipogeneze v buňkách PSN1 ošetřených RR-enantiomerem, S,S-enantiomerem, oxaliplatinou nebo cisplatinou po dobu 24 hodin byly stanoveny pomocí vysoce citlivých kitů Lipolysis Fluorimetric Assay Kit (Sigma) a Triglyceride Fluorimetric Assay Kit (Sigma) v daném pořadí. Fluorescenční signál získaný z obou testů byl úměrný množství glycerolu v jednotlivých vzorcích, který se měří přímo v případě lipolýzy a po přidání lipázy v případě lipogeneze.



Obrázek č. 18: Analýza lipolýzy a lipogeneze v buňkách PSN1 po aplikaci zkoumaných sloučenin o různé koncentraci.

Výsledky analýzy lipolýzy a lipogeneze jsou vyjádřeny v relativních fluorescenčních jednotkách. Získaná data představují průměry ze tří nezávislých experimentů ve čtyřech opakováních pro každý soubor vzorků. Statistická analýza byla provedena pomocí neparametrického studentova T-testu porovnáním naměřených hodnot pro kontrolu s vzorky. Tento statistický test rozdělí získané výsledky podle nulové hypotézy na statisticky významné a nevýznamné, tedy určí, zda ve vzorku došlo k významnému poklesu nebo nárůstu v porovnání s kontrolou v sledovaném parametru. Nulová hypotéza byla definována jako  $**p \leq 0,01$ , tedy vzorek s koeficientem pravděpodobnosti  $p$  vypočítaným ze statistického studentova T-testu menším než 0,01 je statisticky významný výsledek a je označen značkou (\*\*). Kromě vzájemného rozdílu naměřených hodnot se také bere v úvahu u statistických testů i počet opakování experimentu.

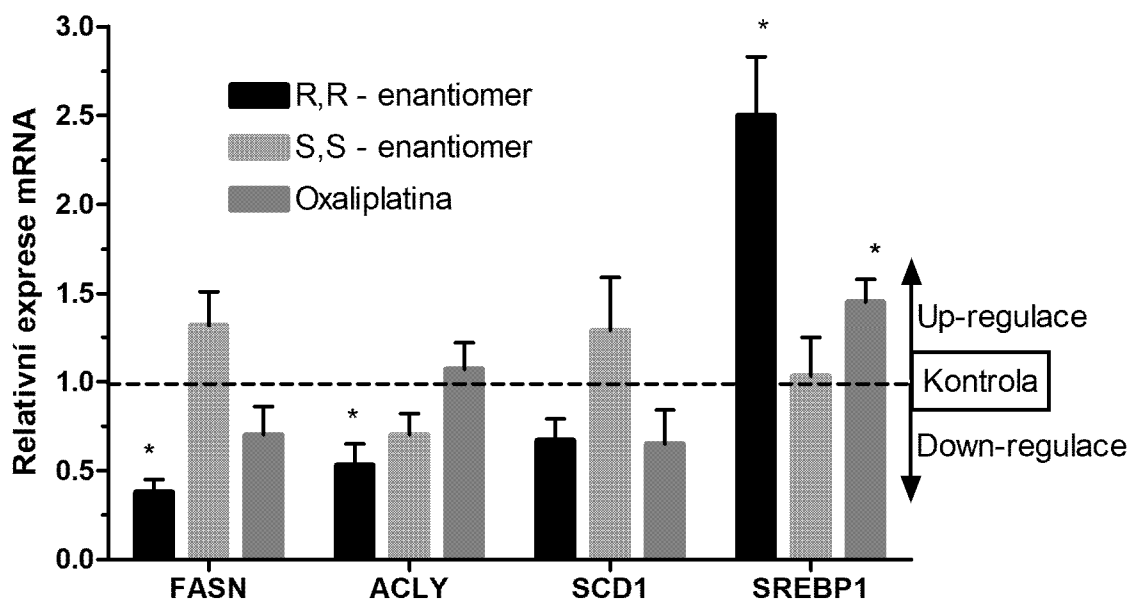
Získaná data (Obrázek č. 18) nenaznačují žádnou změnu v úrovni lipolýzy po ošetření buněk všemi zkoumanými Pt(II) sloučeninami ve srovnání s neošetřenými kontrolními vzorky. Naproti tomu v případě lipogeneze byly patrné značné změny v naměřených hodnotách pro některé studované komplexy v porovnání s kontrolními vzorky. Velmi zajímavým zjištěním bylo, že studované enantiomery komplexu [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)] vykazovaly velmi odlišné účinky na lipogenezi v buňkách PSN1. Zatímco S,S-enantiomer a cisplatin nevykazovaly žádný účinek na lipogenezi v buňkách PSN1, R,R-enantiomer vykazoval

relativně vysoký inhibiční účinek lipogeneze závislý na koncentraci. Stejně jako R,R-enantiomer i oxaliplatina účinně inhibovala lipogenezi v buňkách PSN1, ovšem v menší míře než R,R-enantiomer.

Skutečnost, že R,R-enantiomer inhibuje de novo syntézu lipidů v PSN1 buňkách (Obrázek č. 18) a zároveň podporuje tvorbu LD (Obrázek č. 15), představovala velké překvapení. Již dříve bylo prokázáno, že nádorové buňky získávají lipidy nejen syntézou de novo, ale také vychytáváním z extracelulárního prostředí a lipolýzou [142]. Tvorba LD tedy může být zcela nezávislá na de novo syntéze lipidů [143]. Bylo navrženo, že inhibice de novo syntézy lipidů může představovat nový přístup v boji proti rakovině slinivky [144]. Na základě získaných výsledku lze tedy navrhnout, že mechanismus účinku R,R-enantiomeru a oxaliplatiny v buňkách rakoviny slinivky břišní může zahrnovat změny v lipogenezi.

Dále jsme se zaměřili na získání více informací o mechanismu, kterým zkoumané sloučeniny [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)] ovlivňují dráhu lipogeneze v buňkách PSN1. Za tímto účelem jsme provedli kvantitativní analýzu hladin mRNA pro několik předem vybraných proteinů zahrnutých v dráze lipogeneze v buňkách PSN1 ošetřených zkoumanými sloučeninami pomocí RT-qPCR. Naměřené hladiny mRNA klíčových enzymů pro tuto metabolickou dráhu by mohly indikovat mechanismus inhibice lipogeneze a zároveň by mohly identifikovat up- nebo down-regulované geny buněk PSN1 ošetřených testovanými komplexy [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)].

V této studii jsme tedy analyzovali hladinu mRNA odpovídající proteinům, které ovlivňují metabolismus lipidů. Pro tento experiment byly vybrány čtyři enzymy jmenovitě: protein FAS, ACLY, SCD1 a SREBP1. Syntáza mastných kyselin (FAS; Fatty Acid Synthase) je multienzymový protein katalyzující de novo syntézu mastných kyselin. U lidí je tento enzym kódován genem FASN. FASN představuje klíčový regulační faktor syntézy mastných kyselin. V případě změny exprese genu FASN by došlo k výraznému ovlivnění kapacity dráhy lipogeneze. Dalším klíčovým enzymem v dráze lipogeneze je ATP-citrátlyáza (ACLY), která zodpovídá za syntézu cytosolového acetyl-CoA a uplatňuje se v několika dalších biosyntetických drahách. ACLY je klíčovým enzymatickým prostředníkem mezi uhlohydrátovými a lipidovými metabolickými dráhami, tedy propojuje metabolismus glukózy a lipidů [145]. V neposlední řadě byl vybrán protein SCD1, tedy poslední enzym v dráze lipogeneze. Tento protein představuje metabolický kontrolní bod v lipogenezi, který katalyzuje syntézu nenasyčených mastných kyselin [146]. Posledním analyzovaným proteinem byl SREBP1, který hraje klíčovou roli při usnadňování ukládání mastných kyselin a triglyceridů [147]. Bylo prokázáno, že zvýšená exprese SREBP1 indukuje biogenezi lipidových kapének, zejména prostřednictvím aktivace TRC8 genu [148], [149].



Obrázek č. 19: Relativní exprese mRNA vybraných genů souvisejících s dráhou lipogeneze stanovená v buňkách PSN1 ošetřených testovanými sloučeniny.

Z naměřených hodnot pro jednotlivé mRNA vybraných genů byla vypočítána metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  relativní kvantifikace genové exprese, přičemž jako endogenní referenční kontrola byl použit gen GAPDH a vzorky izolované z neošetřených buněk PSN1 (kontrol) byly použity jako arbitrární kalibrátory. Data byla podrobena statistické analýze pomocí Studentova t-testu a významný rozdíl ( $*p \leq 0,05$ ) od neošetřených kontrolních vzorků byl označen hvězdičkou v horní části sloupce. Chybové úsečky jsou standardní odchylky vypočítané ze čtyř nezávislých experimentů s triplikáty v každém experimentu. Získaná data naznačují (Obrázek č. 19), že po ošetření buněk PSN1 R,R-enantiomerem došlo k významnému poklesu hladin mRNA pro geny FASN a ACLY. Down-regulované hladiny mRNA pro enzym SCD1 nebyly hodnoceny jako významné podle statistické nulové hypotézy ( $p \geq 0,05$ ). Pozoruhodné je, že po léčbě buněk PSN1 oxaliplatinou byla pozorována určitá, ale statisticky nevýznamná down-regulace mRNA enzymů FASN1 a SCD1. Naproti tomu S,S-enantiomer vyvolal mírnou up-regulaci FASN a SCD1, zatímco ACLY byl mírně down-regulovaný v porovnání s neošetřenými vzorky. V případě enzymu SREBP1, který ovlivňuje ukládání lipidů do lipidových kapének v buňkách, byla pozorována po ošetření buňkách PSN1 R,R-enantiomerem zvýšená exprese tohoto proteinu (Obrázek č. 19). Velmi podobný, ale méně výrazný jev up-regulace SREBP1 byl pozorován i po léčbě buněk oxaliplatinou (Obrázek č. 19). Po aplikaci S,S-enantiomeru nedošlo k vyvolání žádných změn, tedy tento komplex neovlivňuje expresi genu SREBP1. Tento závěr koreluje s výsledky pozorování detekce lipidových kapének v buňkách PSN1 po aplikaci studovaných komplexů [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)].

Výsledky tedy naznačují, že ze série testovaných sloučenin pouze R,R-enantiomer účinně snížil hladiny mRNA studovaných genů z dráhy lipogeneze. Je velmi pravděpodobné, že konsenzuální downregulace vede k inhibici nebo alespoň zpomalení celé dráhy lipogeneze v buňkách PSN1 ošetřených R,R-enantiomerem.

## 5.7 Mechanismus smrti buněk adenokarcinomu pankreatu PSN1 po ošetření zkoumanými Pt(II) komplexy

Posledním velmi zásadním testem prováděným u všech komplexů s potencionálním protinádorovým působením je stanovení mechanismu buněčné smrti vyvolané po aplikaci sloučeniny na nádorové buňky. Je všeobecně známo, že apoptotické dráhy přispívají k cytotoxickému působení většiny chemoterapeutických léků, včetně klinicky používaných protirakovinných platinových léků, jako je cisplatina a oxaliplatina [150]. Pokud způsobují potencionální chemoterapeutika primárně nekrózu, hrozí po aplikaci této sloučeniny do organismu pacienta vyvolání řetězové nekrotické reakce okolní zdravé tkáně v blízkosti ložiska nádoru. U nádorů nereagujících (necitlivé/rezistentní) na chemoterapii často selhává aktivace apoptózy. Z výše uvedených důvodů jsme hodnotili, zda je apoptóza klíčovým mechanismem buněčné smrti indukovanou v buňkách adenokarcinomu pankreatu po aplikaci R,R-enantiomeru, S,S-enantiomeru, oxaliplatiny a cisplatiny.

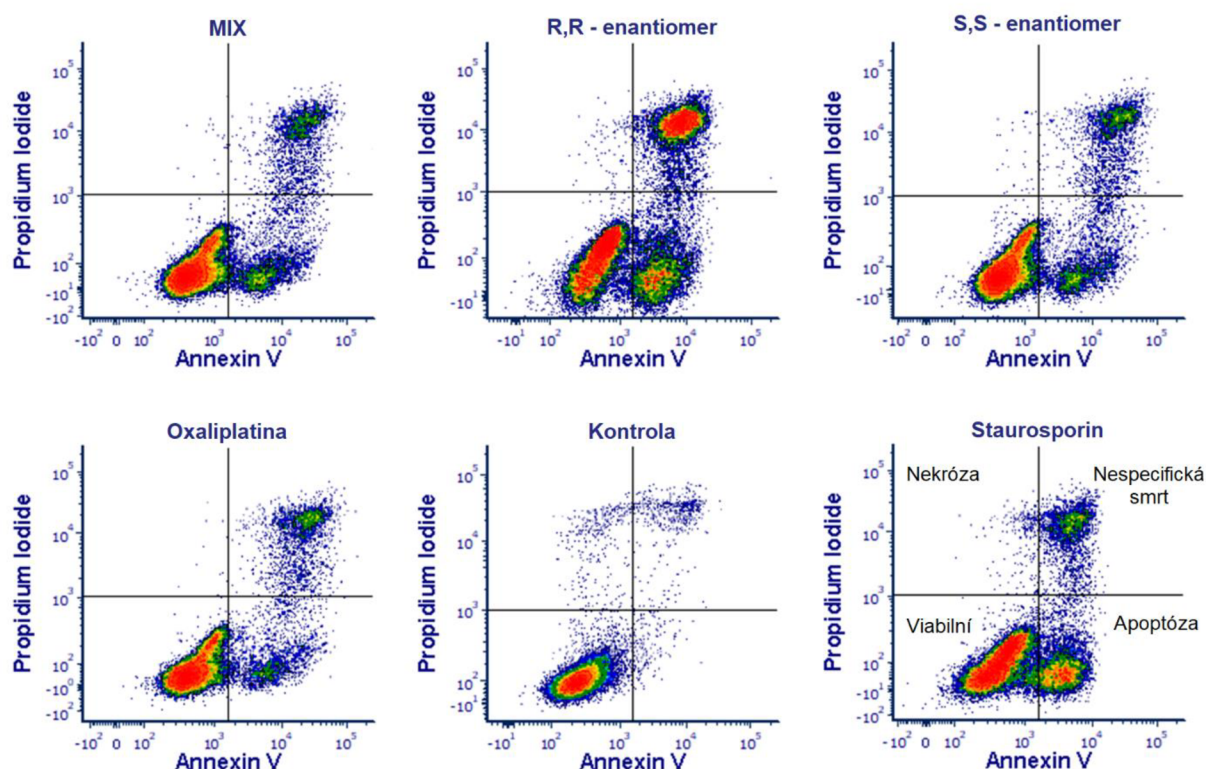
V tomto experimentu byly buňky PSN1, které byly ošetřeny zkoumanými sloučeninami v koncentraci odpovídající jejich  $IC_{50,72\text{ h}}$  po dobu 24 hodin a následně byly obarveny. Typ a četnost buněčné smrti stimulované po ošetření testovanými sloučeninami byli kvantifikováni běžným testem Annexin V/propidium jodid a analyzovány s pomocí dvoudimenzionální průtokové cytometrie.

Po provedení testu můžeme buňky rozdělit do čtyř populací: živé (Annexin V negativní, PI negativní), raně apoptotické (Annexin V pozitivní, PI negativní), nekrotické (Annexin V negativní, PI pozitivní) buňky a populaci s nespecifickou buněčnou smrtí. Živé buňky nejsou obarveny žádnými fluorochromy. Ve vstupu PI do živé buněk brání integrita membrány a zároveň není na vnějším povrchu membrány lokalizován fosfatidylserin, se kterým by mohl reagovat annexin V. Během ranných stádií apoptózy dochází k indukci velmi časně membránové modifikace, při níž je translokalizován fosfatidylserin z vnitřní strany plazmatické membrány na vnější, což umožňuje jeho označení annexinem. Annexin sám o sobě není schopen vizualizovat buňku, proto se při značení apoptotických buněk využívá tento protein konjugovaný s fluorofory (pacific blue), které po navázání buňku označí fluorescenčním signálem. Ovšem i přes membránové modifikace si membrána udržela integritu, která zabraňuje vstupu PI do buněk [151]. V případě double pozitivních (nespecifická buněčná smrt) populací se jedná již o značně poškozené buňky, u kterých se degradací vytváří póry v plazmatické membráně umožňující vstoupit PI i annexinu do nitra buněk. Ovšem není známý průběh, kterým se buňky do tohoto stavu dostaly. Zároveň není tento průběh díky porušené integritě membrány možné přesně určit. Předpokládá se, že tato double pozitivní populace je výsledkem nesčetného množství dějů, které jsou nám prozatím známy (různé typy buněčných smrtí) [152]. Nekróza je charakterizovaná ztrátou cytoplazmatické membrány. Z tohoto důvodu není možné označení této populace annexinem. DNA nekrotických buněk je obarveno červeným fluorescenčním barvivem propidium jodid [151]. Naměřené hodnoty našich vzorků byly porovnány s měřením pozitivní kontroly na apoptózu. Pro kontrolu byl využit Staurosporin, který se ve výzkumu používá k indukci apoptózy inaktivací kaspázy-3 (CDK-3) [153].

Tabulka č. 4: Detekce buněčné smrti v buňkách PSN1 po ošetření studovanými komplexy testem Annexin V/propidium jodid.

	Viabilita (Anx-/PI-) [%]	Apoptóza (Anx+/PI-) [%]	Nekróza (Anx-/PI+) [%]	Nespecifikována BS (Anx+/PI+) [%]
R,R-enantiomer	55,0 ± 5,0	20,0 ± 3,0	0,5 ± 0,3	25,0 ± 4,0
S,S-enantiomer	77,0 ± 7,0	12,0 ± 1,0	0,2 ± 0,1	11,0 ± 1,0
Mix	70,0 ± 3,0	20,0 ± 2,0	0,3 ± 0,1	10,0 ± 2,0
Oxaliplatina	75,0 ± 2,0	13,0 ± 3,0	0,6 ± 0,2	12,0 ± 2,0
Staurosporin	65,0 ± 4,0	23,0 ± 4,0	1,2 ± 0,8	11,0 ± 3,0
Kontrola	95,0 ± 1,0	0,7 ± 0,3	1,5 ± 0,7	3,0 ± 1,0

Data naznačují (Tabulka č. 4 a Obrázek č. 20), že všechny zkoumané sloučeniny stimulují apoptózu v buňkách PSN1. Data (2D density plot) z průtokového cytometru ukazují diskrétní populaci pozitivní na annexin (ANX-V) s dalším přechodem na dvojitě pozitivní (ANX-V +/PI+) populace. Směr jednotlivých populací přes kvadrant ANX-V +/PI- do kvadrantu ANX-V+/PI+ ukazuje, že apoptóza je základním mechanismem smrti buněk PSN1 indukovaným všemi zkoumanými sloučeninami Pt(II). V kvadrantu PI+, který slouží ke stanovení četnosti nekrózy, nebyly pozorovány žádné buňky. Apoptotická odpověď byla nejvýraznější po ošetření buněk PSN1 R,R-enantiomerem, což je v souladu s jeho nejvyšší antiproliferativní aktivitou v těchto buňkách (Tabulka č. 1).



Obrázek č. 20: Dot plot zobrazující zastoupení jednotlivých typů buněčné smrti v populaci PSN1 buněk ošetřených studovanými komplexy stanovené testem Annexin V/propidium jodid.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo charakterizovat mechanismus působení nově syntetizovaného páru enantiomerů [Pt(OXA)(1,2-DACHEX)] na vybrané škále nádorových a nenádorových buněčných linií. Zaměřili jsme se především na antiproliferační působení zkoumaných komplexů v nádorových buňkách a 3D modelech maligních tkání, akumulaci studovaných sloučenin, a také identifikaci specifického vlivu testovaných látek na životaschopnost PSN1 buněk. Hlavní výsledky lze shrnout do následujících bodů.

Při studii antiproliferační aktivity studovaných komplexů, byly naměřené hodnoty IC<sub>50</sub> obou enantiomerů v řádech mikromolů pro všechny zkoumané nádorové linie. Z výsledků vyplývá, že R,R-enantiomer vykazoval pozoruhodnou schopnost inhibovat životaschopnost buněk nádoru slinivky břišní, u kterých byli jeho S,S-enantiomer a strukturálně příbuzná klinicky používaná oxaliplatinu méně účinné. Důležitou vlastností R,R-enantiomeru ve srovnání s S,S - enantiomerem byla jeho selektivita k maligním buňkám. Pro lepší pochopení jeho účinku byly další experimenty zaměřeny především na buněčnou linii PSN1. Experimenty provedené se 3D sféroidy prokázali trvalé a účinné potlačení růstu nádoru slinivky břišní po aplikaci R,R-enantiomeru, nezávisle na velikosti tumoru. Tyto výsledky ukazují na mnohem větší schopnost R,R-enantiomeru pronikat do pankreatických nádorů v porovnání s S,S-enantiomerem.

Ze studie zabývající se akumulací studovaných komplexů v PSN1 buňkách vyplývá, že R,R-enantiomer je transportován do maligních buněk jako konjugát s plazmatickými proteiny, čímž je pravděpodobně kompenzována jeho nižší schopnost akumulovat se ve formě volného komplexu. Naproti tomu S,S-enantiomer se primárně akumuluje ve formě volného komplexu. Odlišný způsob transportu krevním řečištěm by potenciálně mohl přispět k prodloužení intervalu působení R,R-enantiomeru v lidském organismu a zvýšit jeho účinnost.

Při odhalování specifického mechanismu působení testovaných sloučeniny, byla pozorována významná tvorba a akumulace lipidových kapének v buňkách PSN1 po aplikaci R,R-enantiomeru. Výsledky dalších experimentů potvrdily, že R,R-enantiomer může vyvolat metabolický stres a změny v lipidovém mechanismu, konkrétně inhibovat de novo syntézu lipidů v buňkách pankreatického adenosarkomu a stimulovat apoptózu nádorových buněk.

Komplex [Pt(OXA)(1R,2R-DACHEX)] vykazuje tedy vysoké terapeutické účinky a mohl by představovat budoucí nadějný cytostatikum účinné při léčbě adenokarcinomu pankreatu. Současně jsme prokázali zcela nový mechanismus působení platinových komplexů v protinádorové chemoterapii cílený na metabolismus nádorových buněk, který představuje velmi atraktivní přístup pro budoucí léčbu rakoviny.

## 7 REFERENCE

- [1] WU, Song, Wei ZHU, Patricia THOMPSON a Yusuf A HANNUN. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature Communications* [online]. 2018, 9(1) [cit. 2023-04-05]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-05467-z.
- [2] MCGUIGAN, Andrew, Paul KELLY, Richard C TURKINGTON, Claire JONES, Helen G COLEMAN a R Stephen MCCAIN. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2018, 24(43), 4846-4861 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846.
- [3] COOPER, Geoffrey. The Development and Causes of Cancer. In: *The Cell: A Molecular Approach* [online]. 2nd edition. Sinauer Associates, 2000 [cit. 2023-04-05]. ISBN 978-0878931064. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.
- [4] GROSSBERG, Aaron J., Linda C. CHU, Christopher R. DEIG, et al. Multidisciplinary standards of care and recent progress in pancreatic ductal adenocarcinoma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2020, 70(5), 375-403 [cit. 2023-04-06]. ISSN 0007-9235. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21626.
- [5] KLENER, Pavel a Pavel KLENER jr. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4171-0.
- [6] CARVALHO, Tiago M. A., Daria DI MOLFETTA, Maria Raffaella GRECO, et al. Tumor Microenvironment Features and Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Insights into Targeting Physicochemical Barriers and Metabolism as Therapeutic Approaches. *Cancers* [online]. 2021, 13(23) [cit. 2023-04-23]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13236135.
- [7] REBELO, Rita, Bárbara POLÓNIA, Lúcio Lara SANTOS, et al. Drug Repurposing Opportunities in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pharmaceuticals* [online]. 2021, 14(3) [cit. 2023-04-23]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph14030280.
- [8] POPLIN, Elizabeth, Yang FENG, Jordan BERLIN, et al. Phase III, Randomized Study of Gemcitabine and Oxaliplatin Versus Gemcitabine (fixed-dose rate infusion) Compared With Gemcitabine (30-minute infusion) in Patients With Pancreatic Carcinoma E6201: A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2009, 27(23), 3778-3785 [cit. 2023-04-23]. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2008.20.9007.
- [9] SUNG, Hyuna, Jacques FERLAY, Rebecca L. SIEGEL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2021, 71(3), 209-249 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0007-9235. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21660.

- [10] DANG C, TA GILEWSKI, A SURBONE , et al. Cell Proliferation. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12640/>.
- [11] ANDREEFF Michael, David W. GOODRICH, Arthur B. PARDEE. Proliferation. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13035/>.
- [12] BARSOUK, Adam, Krishna Chaitanya THANDRA, Kalyan SAGINALA, et al. Chemical Risk Factors of Primary Liver Cancer: An Update. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* [online]. 2020, 12, 179-188 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1179-1535. Dostupné z: doi:10.2147/HMER.S278070.
- [13] BOUZA, Emilio, Miguel MARTÍN JIMÉNEZ, Laia ALEMANY, et al. Overview of virus and cancer relationships. Position paper. *Revista Española de Quimioterapia* [online]. 2021, 34(6), 525-555 [cit. 2023-04-05]. ISSN 02143429. Dostupné z: doi:10.37201/req/058.2021.
- [14] SAIDU, Nathaniel Edward Bennett, Vedrana FILIĆ, Miranda THOMAS, et al. PDZ Domain-Containing Protein NHERF-2 Is a Novel Target of Human Papillomavirus 16 (HPV-16) and HPV-18. *Journal of Virology* [online]. 2019, 94(1), e00663-19 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00663-19.
- [15] C. Burgess, "Stress and cancer.," *Cancer Surv*, vol. 6, no. 3, pp. 403–16, 1987.
- [16] WEINBERG, Robert A. *The biology of cancer*. 2nd ed. New York: Garland Science, c2014. ISBN 978-081-5342-199.
- [17] HU, Jian-Xiong, Cheng-Fei ZHAO, Wen-Biao CHEN, Qi-Cai LIU, et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2021, 27(27), 4298-4321 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v27.i27.4298.
- [18] RHIM, Andrew D. a Ben Z. STANGER. *Molecular Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression. Development, Differentiation and Disease of the Para-Alimentary Tract* [online]. Elsevier, 2010, 2010, 41-78 [cit. 2023-04-06]. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. ISBN 9780123852335. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385233-5.00002-7.
- [19] GUO, Xiao-Yu, Fan XIAO, Jie LI, Yi-Nan ZHOU, Wang-Jun ZHANG, et al. Exosomes and pancreatic diseases: status, challenges, and hopes. *International Journal of Biological Sciences* [online]. 2019, 15(9), 1846-1860 [cit. 2023-04-07]. ISSN 1449-2288. Dostupné z: doi:10.7150/ijbs.35823.



- [20] Why we focus on early diagnosis? In: Pancreatic Cancer Action: saving lives through early diagnosis [online]. 02.10.2022 [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: <https://pancreaticcanceraction.org/about/early-diagnosis/why-we-focus-on-early-diagnosis/>.
- [21] KAROUMPALIS, Loannis`. Cystic lesions of the pancreas. *Annals of Gastroenterology* [online]. 2016, 29(2) [cit. 2023-04-07]. ISSN 17927463. Dostupné z: doi:10.20524/aog.2016.0007.
- [22] DESHPANDE, Vikram a Gregory Y. LAUWERS. Cystic pancreatic endocrine tumor. *Cancer* [online]. 2007, 111(1), 47-53 [cit. 2023-04-07]. ISSN 0008543X. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.22422.
- [23] WITKOWSKI, Piotr, Jon ODORICO, Jordan PYDA, et al. Arguments against the Requirement of a Biological License Application for Human Pancreatic Islets: The Position Statement of the Islets for US Collaborative Presented during the FDA Advisory Committee Meeting. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2021, 10(13) [cit. 2023-04-09]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm10132878.
- [24] WANG, Shun, Yan ZHENG, Feng YANG, et al. The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2021, 6(1) [cit. 2023-05-08]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-021-00659-4.
- [25] FERNÁNDEZ, Lara P., Marta GÓMEZ DE CEDRÓN a Ana RAMÍREZ DE MOLINA. Alterations of Lipid Metabolism in Cancer: Implications in Prognosis and Treatment. *Frontiers in Oncology* [online]. 2020, 10 [cit. 2023-05-08]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2020.577420.
- [26] TADROS, Saber, Surendra K. SHUKLA, Ryan J. KING, et al. De Novo Lipid Synthesis Facilitates Gemcitabine Resistance through Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer. *Cancer Research* [online]. 2017, 77(20), 5503-5517 [cit. 2023-05-08]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3062.
- [27] LIU, Qiuping, Qing LUO, Alexander HALIM a Guanbin SONG. Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Letters* [online]. 2017, 401, 39-45 [cit. 2023-05-08]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2017.05.002.
- [28] MORENO-SÁNCHEZ, Rafael, Sara RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, et al. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal* [online]. 2007, 274(6), 1393-1418 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.
- [29] FERON, Olivier. Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology* [online]. 2009, 92(3), 329-333 [cit. 2023-05-09]. ISSN 01678140. Dostupné z: doi:10.1016/j.radonc.2009.06.025.

- [30] HUME, David A., Judith L. RADIK, Ernst FERBER, et al. Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation. *Biochemical Journal* [online]. 1978, 174(3), 703-709 [cit. 2023-05-09]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj1740703.
- [31] QIN, Cheng, Gang YANG, Jinshou YANG, et al. Metabolism of pancreatic cancer: paving the way to better anticancer strategies. *Molecular Cancer* [online]. 2020, 19(1) [cit. 2023-05-09]. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-020-01169-7.
- [32] CURRIE, Erin, Almut SCHULZE, Rudolf ZECHNER, et al. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism* [online]. 2013, 18(2), 153-161 [cit. 2023-05-08]. ISSN 15504131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2013.05.017.
- [33] SHYU, Peter, Xing Fah Alex WONG, Karen CRASTA, et al. Dropping in on lipid droplets: insights into cellular stress and cancer. *Bioscience Reports* [online]. 2018, 38(5) [cit. 2023-05-08]. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20180764.
- [34] KLEIN, Alison P. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors [online]. 2021, 18(7), 493-502 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1759-5045. Dostupné z: doi:10.1038/s41575-021-00457-x.
- [35] Pancreatic cancer statistics. In: *World Cancer Research Fund International* [online]. 23 March 2022 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/pancreatic-cancer-statistics/>.
- [36] RAWLA, Prashanth, Tagore SUNKARA a Vinaya GADUPUTI. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology* [online]. 2019, 10(1), 10-27 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1920-4531. Dostupné z: doi:10.14740/wjon1166.
- [37] ILIC, Milena a Irena ILIC. Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2016, 22(44) [cit. 2023-04-05]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694.
- [38] PEREIRA, Stephen P, Lucy OLDFIELD, Alexander NEY, et al. Early detection of pancreatic cancer [online]. 2020, 5(7), 698-710 [cit. 2023-04-05]. ISSN 24681253. Dostupné z: doi:10.1016/S2468-1253(19)30416-9.
- [39] YANG, Jinshou, Ruiyuan XU, Chengcheng WANG, Jiangdong QIU, et al. Early screening and diagnosis strategies of pancreatic cancer: a comprehensive review. *Cancer Communications* [online]. 2021, 41(12), 1257-1274 [cit. 2023-04-09]. ISSN 2523-3548. Dostupné z: doi:10.1002/cac2.12204.
- [40] YOUSAF, Muhammad Nadeem, Hamid EHSAN, Ahsan WAHAB, et al. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography guided interventions in the management of pancreatic cancer. *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 2020, 12(10), 323-340 [cit. 2023-04-09]. ISSN 1948-5190. Dostupné z: doi:10.4253/wjge.v12.i10.323”.

- [41] PEREIRA, Nabyla Paixão a José Raimundo CORRÊA. Pancreatic cancer: treatment approaches and trends. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* [online]. 2018, 4(6) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2454-2857. Dostupné z: doi:10.20517/2394-4722.2018.13.
- [42] CANTO, Marcia Irene, Tossapol KERDSIRICHAIRAT, Charles J. YEO, et al. Surgical Outcomes After Pancreatic Resection of Screening-Detected Lesions in Individuals at High Risk for Developing Pancreatic Cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery* [online]. 2020, 24(5), 1101-1110 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1091-255X. Dostupné z: doi:10.1007/s11605-019-04230-z.
- [43] LIND, Pehr A., Bengt ISAKSSON, Markus ALMSTRÖM, et al. Efficacy of preoperative radiochemotherapy in patients with locally advanced pancreatic carcinoma. *Acta Oncologica* [online]. 2009, 47(3), 413-420 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0284-186X. Dostupné z: doi:10.1080/02841860701592384”.
- [44] CORSINI, Michele M., Robert C. MILLER, Michael G. HADDOCK, et al. Adjuvant Radiotherapy and Chemotherapy for Pancreatic Carcinoma: The Mayo Clinic Experience (1975-2005). *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2008, 26(21), 3511-3516 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2007.15.8782.
- [45] PRINCIPE, Daniel R., Patrick W. UNDERWOOD, Murray KORC, et al. The Current Treatment Paradigm for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Barriers to Therapeutic Efficacy. *Frontiers in Oncology* [online]. 2021, 11 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2021.688377.
- [46] DUCREUX, M., E. MITRY, M. OULD-KACI, et al. Randomized phase II study evaluating oxaliplatin alone, oxaliplatin combined with infusional 5-FU, and infusional 5-FU alone in advanced pancreatic carcinoma patients. *Annals of Oncology* [online]. 2004, 15(3), 467-473 [cit. 2023-05-13]. ISSN 09237534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdh098.
- [47] YAMAMOTO, Shota a Nobuaki EGASHIRA. Drug Repositioning for the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Mechanism- and Screening-Based Strategy. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2021, 11 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2020.607780.
- [48] HAJATDOOST, Leva, Keyvan SEDAGHAT, Erin WALKER, Jackson THOMAS a Sam KOSARI. Chemotherapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review. *Medicina* [online]. 2018, 54(3) [cit. 2023-05-13]. ISSN 1648-9144. Dostupné z: doi:10.3390/medicina54030048.
- [49] AFCHAIN, P., B. CHIBAUDEL, G. LLEDO, et al. First-line simplified GEMOX (S-GemOx) versus classical GEMOX in metastatic pancreatic cancer (MPA): results of a GERCOR randomized phase II study. *Bulletin du Cancer* [online]. 2009, 96(5), e18-e22 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0007-4551. Dostupné z: doi:10.1684/bdc.2009.0871.

- [50] KELLAND, Lloyd. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2007, 7(8), 573-584 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2167.
- [51] DASARI, Shaloam a Paul BERNARD TCHOUNWOU. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2014, 740, 364-378 [cit. 2023-04-24]. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- [52] BRABEC, Viktor a Jana KASPARKOVA. Modifications of DNA by platinum complexes. *Drug Resistance Updates* [online]. 2005, 8(3), 131-146 [cit. 2023-04-24]. ISSN 13687646. Dostupné z: doi:10.1016/j.drug.2005.04.006.
- [53] DILRUBA, Shahana a Ganna V. KALAYDA. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2016, 77(6), 1103-1124 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0344-5704. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-016-2976-z.
- [54] JOHNSTONE, Timothy C., Kogularamanan SUNTHARALINGAM, et al. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical Reviews* [online]. 2016, 116(5), 3436-3486 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00597.
- [55] BEKAI-SAAB, Tanios S., Jing LIU, Kenneth K. CHAN, Stanley P. BALCERZAK, Percy S. IVY, Michael R. GREVER a Eric H. KRAUT. A Phase I and Pharmacokinetic Study of Weekly Oxaliplatin Followed by Paclitaxel in Patients with Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* [online]. 2008, 14(11), 3434-3440 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4903.
- [56] ALCINDOR, Thierry a N. BEAUGER. Oxaliplatin: A Review in the Era of Molecularly Targeted Therapy. *Current Oncology* [online]. 2011, 18(1), 18-25 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1718-7729. Dostupné z: doi:10.3747/co.v18i1.708.
- [57] YANG, Yang, Bing ZHAO, Xuejiao GAO, Jinbing SUN, Juan YE, Jun LI a Peng CAO. Targeting strategies for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical syndrome, molecular basis, and drug development [online]. 2021, 40(1) [cit. 2023-05-09]. ISSN 1756-9966. Dostupné z: doi:10.1186/s13046-021-02141-z.
- [58] RAPUTOVÁ, Jana, Eva VLČKOVÁ, Lenka ŠMARDOVÁ, Aneta RAJDOVÁ a Andrea JANÍKOVÁ. Chemotherapy-induced polyneuropathy. *Neurologie pro praxi* [online]. 2017, 18(1), 25-31 [cit. 2023-04-24]. ISSN 12131814. Dostupné z: doi:10.36290/neu.2017.129.
- [59] SEETHARAM, R. N. Oxaliplatin: Preclinical perspectives on the mechanisms of action, response and resistance. *Ecancermedicalscience* [online]. 2010 [cit. 2023-05-09]. ISSN 17546605. Dostupné z: doi:10.3332/ecancer.2009.153.

- [60] MARTINEZ-BALIBREA, Eva, Anna MARTÍNEZ-CARDÚS, Alba GINÉS, et al. Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2015, 14(8), 1767-1776 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1535-7163. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0636.
- [61] SAŁAT, Kinga. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy—part 2: focus on the prevention of oxaliplatin-induced neurotoxicity. *Pharmacological Reports* [online]. 2020, 72(3), 508-527 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1734-1140. Dostupné z: doi:10.1007/s43440-020-00106-1.
- [62] ZHOU, Jiabei, Yu KANG, Lu CHEN, Hua WANG, Junqing LIU, Su ZENG a Lushan YU. The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2020, 11 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2020.00343.
- [63] SZEFLER, Beata, Przemysław CZELEŃ, Kamil WOJTKOWIAK a Aneta JEZIEŃSKA. Affinities to Oxaliplatin: Vitamins from B Group vs. Nucleobases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, 23(18) [cit. 2023-05-10]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms231810567.
- [64] CHANEY, Stephen G., Sharon L. CAMPBELL, et al. Protein interactions with platinum–DNA adducts: from structure to function. *Journal of Inorganic Biochemistry* [online]. 2004, 98(10), 1551-1559 [cit. 2023-05-09]. ISSN 01620134. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.04.024.
- [65] KLINE, Christina a Wafik EL-DEIRY. Personalizing Colon Cancer Therapeutics: Targeting Old and New Mechanisms of Action. *Pharmaceuticals* [online]. 2013, 6(8), 988-1038 [cit. 2023-05-10]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph6080988.
- [66] BRUNO, Peter M, Yunpeng LIU, Ga Young PARK, et al. A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nature Medicine* [online]. 2017, 23(4), 461-471 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm.4291.
- [67] T. C. Johnstone, G. Y. Park, and S. J. Lippard, Understanding and improving platinum anticancer drugs--phenanthriplatin, *Anticancer Res*, vol. 34, no. 1, pp. 471–6, Jan. 2014.
- [68] PAPADIA, Paride, Valentina GANDIN, Alessandra BARBANENTE, et al. A minimal structural variation can overcome tumour resistance of oxaliplatin: the case of 4,5-dehydrogenation of the cyclohexane ring. *RSC Advances* [online]. 2019, 9(56), 32448-32452 [cit. 2023-03-31]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C9RA07760J.
- [69] RAYMOND, E., S.G. CHANEY, A. TAAMMA a E. CVITKOVIC. Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies. *Annals of Oncology* [online]. 1998, 9(10), 1053-1071 [cit. 2023-05-09]. ISSN 09237534. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008213732429.

- [70] LI, W., J. ZHOU a Y. XU. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports* [online]. 2015, 3(5), 617-620 [cit. 2022-08-30]. ISSN 2049-9434. Dostupné z: doi:10.3892/br.2015.481.
- [71] VICHAI, Vanicha a Kanyawim KIRTIKARA. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* [online]. 2006, 1(3), 1112-1116 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.179.
- [72] VAN TONDER, Alet, Annie M JOUBERT a A Duncan CROMARTY. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes* [online]. 2015, 8(1) [cit. 2023-03-30]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/s13104-015-1000-8.
- [73] ASLANTÜRK, Özlem Sultan. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* [online]. InTech, 2018, 2018-07-11 [cit. 2023-03-30]. ISBN 978-1-78923-418-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.71923.
- [74] SRB Cytotoxicity Assay Kit. CEPHAM LIFE SCIENCE [online]. [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://www.cephamlife.com/srb-cytotoxicity-assay-kit-colorimetric/>.
- [75] XIAO, C., B. LACHANCE, G. SUNAHARA a J. H. T. LUONG. Assessment of Cytotoxicity Using Electric Cell–Substrate Impedance Sensing: Concentration and time response function approach. *Analytical Chemistry* [online]. 2002, 74(22), 5748-5753 [cit. 2022-08-30]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac025848f.
- [76] Otero-González, L., et al. Application and Validation of an Impedance-Based Real Time Cell Analyzer to Measure the Toxicity of Nanoparticles Impacting Human Bronchial Epithelial Cells. *Environmental Science & Technology*[online]. 2012, 46(18), 10271-10278 [cit. 2022-08-30]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es301599f.
- [77] LEI, K. Review on Impedance Detection of Cellular Responses in Micro/Nano Environment. *Micromachines* [online]. 2014, 5(1), 1-12 [cit. 2022-08-30]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi5010001.
- [78] KE, Ning, Xiaobo WANG, Xiao XU a Yama A. ABASSI. The xCELLigence System for Real-Time and Label-Free Monitoring of Cell Viability. *Mammalian Cell Viability* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-3-9, 33-43 [cit. 2023-04-09]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-61779-107-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-108-6\_6.
- [79] ABASSI, Yama A., Biao XI, Wenfu ZHANG, et al. Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects [online]. 2009, 16(7), 712-723 [cit. 2023-03-29]. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2009.05.011.

- [80] HAMIDI, Hellyeh, Johanna LILJA a Johanna IVASKA. Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion. *BIO-PROTOCOL* [online]. 2017, 7(24) [cit. 2023-04-14]. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.2646.
- [81] Hutchinson L, Kirk R. 2011. High drug attrition rates? Where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol*. 8(4):189-190. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.34>.
- [82] Myungjin Lee J, Mhaweche-Fauceglia P, Lee N, Cristina Parsanian L, Gail Lin Y, Andrew Gayther S, Lawrenson K. 2013. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Invest*. 93(5):528-542. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2013.41>.
- [83] HOARAU-VÉCHOT, Jessica, Arash RAFII, et al. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(1) [cit. 2023-03-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19010181.
- [84] GUPTA, Nilesh, Jeffrey R. LIU, Brijeshkumar PATEL, et al. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research [online]. 2016, 1(1), 63-81 [cit. 2023-03-29]. ISSN 2380-6761. Dostupné z: doi:10.1002/btm2.10013.
- [85] WEISWALD, Louis-Bastien, Dominique BELLET a Virginie DANGLES-MARIE. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* [online]. 2015, 17(1), 1-15 [cit. 2023-03-29]. ISSN 14765586. Dostupné z: doi:10.1016/j.neo.2014.12.004.
- [86] GILAZIEVA, Zarema, Aleksei PONOMAREV, Catrin RUTLAND, Albert RIZVANOV a Valeriya SOLOVYEVA. Promising Applications of Tumor Spheroids and Organoids for Personalized Medicine. *Cancers* [online]. 2020, 12(10) [cit. 2023-03-30]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12102727.
- [87] CHEN, Q. a Y. WANG. The application of three-dimensional cell culture in clinical medicine. *Biotechnology Letters* [online]. 2020, 42(11), 2071-2082 [cit. 2022-08-30]. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-020-03003-y.
- [88] 3D Tumor Spheroid Assay (mono-spheroids). *Reaction Biology* [online]. April-2020 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://www.reactionbiology.com/services/cell-based-assays/3d-tumor-spheroid-assay>.
- [89] COLE, Christopher B., Susan BATES a Antonio FOJO. Overview of mechanisms of chemoresistance in ovarian cancer. *Overcoming Ovarian Cancer Chemoresistance* [online]. Elsevier, 2021, 2021, 25-42 [cit. 2023-03-30]. ISBN 9780128198407. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819840-7.00011-X.
- [90] DAWIDCZYK, Charlene M., Luisa M. RUSSELL, et al. Tumor accumulation of liposomal doxorubicin in three murine models: Optimizing delivery efficiency. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2017, 13(5), 1637-1644 [cit. 2023-03-30]. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2017.02.008.

- [91] YADAV, Umesh Prasad, Tashvinder SINGH, Pramit KUMAR, et al. Metabolic Adaptations in Cancer Stem Cells. *Frontiers in Oncology* [online]. 2020, 10 [cit. 2023-04-01]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2020.01010.
- [92] DANIÉLS, Veerle W., Karine SMANS, Ines ROYAUX, Melanie CHYPRE, et al. Cancer Cells Differentially Activate and Thrive on De Novo Lipid Synthesis Pathways in a Low-Lipid Environment. *PLoS ONE* [online]. 2014, 9(9) [cit. 2023-04-01]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0106913.
- [93] FERNÁNDEZ, Lara P., Marta GÓMEZ DE CEDRÓN a Ana RAMÍREZ DE MOLINA. Alterations of Lipid Metabolism in Cancer: Implications in Prognosis and Treatment. *Frontiers in Oncology* [online]. 2020, 10 [cit. 2023-04-01]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2020.577420.
- [94] QIU, Bo a M. SIMON. BODIPY 493/503 Staining of Neutral Lipid Droplets for Microscopy and Quantification by Flow Cytometry. *BIO-PROTOCOL* [online]. 2016, 6(17) [cit. 2023-03-31]. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.1912.
- [95] TAN, S. C. a B. C. YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, 2009, 1-10 [cit. 2022-08-30]. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2009/574398.
- [96] THATCHER, Stephanie A. DNA/RNA Preparation for Molecular Detection. *Clinical Chemistry* [online]. 2015, 61(1), 89-99 [cit. 2023-03-29]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2014.221374.
- [97] HOLLAND, Nina T, Martyn T SMITH, Brenda ESKENAZI a Maria BASTAKI. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2003, 543(3), 217-234 [cit. 2023-03-29]. ISSN 13835742. Dostupné z: doi:10.1016/S1383-5742(02)00090-X.
- [98] KRÁLOVÁ, B., L. FOUKAL, P. RAUCH, et al. *Bioanalytické metody. 3., přeprac. vyd.* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254. ISBN 80-708-0449-1.
- [99] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie.* Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [100] KADRI, K. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications.* *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* [online]. IntechOpen, 2020, 2020-2-12 [cit. 2022-08-30]. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.86491.
- [101] MACKAY, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2004, 10(3), 190-212 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x.



- [102] Master Mixes. NEW ENGLAND BioLabs [online]. [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://international.neb.com/products/pcr-qpcr-and-amplification-technologies/master-mixes/master-mixes>.
- [103] BOLSONI-LOPES, Andressa a Maria Isabel C. ALONSO-VALE. Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Archives of Endocrinology and Metabolism* [online]. 2015, 59(4), 335-342 [cit. 2023-02-17]. ISSN 2359-3997. Dostupné z: doi:10.1590/2359-3997000000067.
- [104] SCHWEIGER, Martina, Thomas O. EICHMANN, Ulrike TASCHLER, et al. Measurement of Lipolysis. *Methods of Adipose Tissue Biology, Part B* [online]. Elsevier, 2014, 2014, 171-193 [cit. 2023-02-17]. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780128002803. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800280-3.00010-4.
- [105] ZAIDI, Nousheen, Leslie LUPIEN, Nancy B. KUEMMERLE, et al. Lipogenesis and lipolysis: The pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Progress in Lipid Research* [online]. 2013, 52(4), 585-589 [cit. 2023-03-16]. ISSN 01637827. Dostupné z: doi:10.1016/j.plipres.2013.08.005.
- [106] SZTALRYD, Carole, Guoheng XU, Heidi DORWARD, John T. TANSEY, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *Journal of Cell Biology* [online]. 2003, 161(6), 1093-1103 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200210169.
- [107] EICHMANN, Thomas O., Manju KUMARI, Joel T. HAAS, et al. Studies on the Substrate and Stereo/Regioselectivity of Adipose Triglyceride Lipase, Hormone-sensitive Lipase, and Diacylglycerol-O-acyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2012, 287(49), 41446-41457 [cit. 2023-03-31]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.400416.
- [108] Lipolysis Assay Kit for 3T3-L1 Cells Detection of Both Free Glycerol and Non-Esterified Fatty Acids [online]. In: 06.10.2016 [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.zen-bio.com/pdf/ZBM0042-LIP-3-L1.pdf>.
- [109] KERSTEN, Sander. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports* [online]. 2001, 2(4), 282-286 [cit. 2023-02-16]. ISSN 1469-221X. Dostupné z: doi:10.1093/embo-reports/kve071.
- [110] SAPONARO, Chiara, Melania GAGGINI, Fabrizia CARLI a Amalia GASTALDELLI. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* [online]. 2015, 7(11), 9453-9474 [cit. 2023-02-16]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu7115475.
- [111] ANDRIKOPOULOS, Nikolaos K. Triglyceride species compositions of common edible vegetable oils and methods used for their identification and quantification. *Food Reviews International* [online]. 2002, 18(1), 71-102 [cit. 2023-02-16]. ISSN 8755-9129. Dostupné z: doi:10.1081/FRI-120003418.

- [112] KARUPAIAH, Tilakavati a Kalyana SUNDRAM. Effects of stereospecific positioning of fatty acids in triacylglycerol structures in native and randomized fats: a review of their nutritional implications [online]. 4(1) [cit. 2023-02-17]. ISSN 17437075. Dostupné z: doi:10.1186/1743-7075-4-16.
- [113] ZHANG, Bingjun, Lingling LIU, Hengfang RUAN, et al. Triglyceride-Glucose Index Linked to Hospital Mortality in Critically Ill Stroke: An Observational Multicentre Study on eICU Database. *Frontiers in Medicine* [online]. 2020, 7 [cit. 2023-02-17]. ISSN 2296-858X. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2020.591036.
- [114] PIZZINO, Gabriele, Natasha IRRERA, Mariapaola CUCINOTTA, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2017, 2017, 1-13 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2017/8416763.
- [115] MURPHY, Michael P., Hülya BAYIR, Vsevolod BELOUSOV, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism* [online]. 2022, 4(6), 651-662 [cit. 2023-03-31]. ISSN 2522-5812. Dostupné z: doi:10.1038/s42255-022-00591-z.
- [116] LANÇONI, R., R. P. ARRUDA, M. B. R. ALVES, L. Z. OLIVEIRA, et al. Validation of the CellRox Deep Red® fluorescent probe to oxidative stress assessment in equine spermatozoa. *Animal Reproduction* [online]. 2017, 14(2), 437-441 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1984-3143. Dostupné z: doi:10.21451/1984-3143-AR842.
- [117] CUMMINGS, Brian S. a Rick G. SCHNELLMANN. Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. *Current Protocols in Pharmacology* [online]. 2004, 25(1) [cit. 2023-03-30]. ISSN 1934-8282. Dostupné z: doi:10.1002/0471141755.ph1208s25.
- [118] RIEGER, Aja M., Kimberly L. NELSON, Jeffrey D. KONOWALCHUK a Daniel R. BARREDA. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2011, (50) [cit. 2023-03-30]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/2597.
- [119] VERMES, István, Clemens HAANEN, Helga STEFFENS-NAKKEN a Chris REUTELLINGSPERGER. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1995, 184(1), 39-51 [cit. 2023-03-30]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(95)00072-I.
- [120] Průkaz apoptózy. In: *Childhood Leukaemia Investigation Prague* [online]. [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://clip.lf2.cuni.cz/file/8.pdf>.
- [121] ABASSI, Yama A., Biao XI, Wenfu ZHANG, et al. Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects [online]. 2009, 16(7), 712-723 [cit. 2023-04-09]. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2009.05.011.

- [122] BRABEC, Viktor, Ondrej HRABINA a Jana KASPARKOVA. Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2017, 351, 2-31 [cit. 2023-04-11]. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2017.04.013.
- [123] WANG, Jingchen, Jianmei TAO, Shuailong JIA, Meiqin WANG, et al. The Protein-Binding Behavior of Platinum Anticancer Drugs in Blood Revealed by Mass Spectrometry. *Pharmaceuticals* [online]. 2021, 14(2) [cit. 2023-04-11]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph14020104.
- [124] DE LUCA, Anastasia, Lorien J. PARKER, Wee Han ANG, et al. A structure-based mechanism of cisplatin resistance mediated by glutathione transferase P1-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2019, 116(28), 13943-13951 [cit. 2023-04-11]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1903297116.
- [125] S. Vitols. Uptake of low-density lipoprotein by malignant cells--possible therapeutic applications. *Cancer Cells*, vol. 3, no. 12, pp. 488–95, Dec. 1991.
- [126] KRATZ, Felix a Ulrich BEYER. Serum Proteins as Drug Carriers of Anticancer Agents: A Review. *Drug Delivery* [online]. 2009, 5(4), 281-299 [cit. 2023-04-11]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.3109/10717549809065759.
- [127] TAO, Jianmei, Shuailong JIA, Meiqin WANG, et al. Systematic Identification of Proteins Binding with Cisplatin in Blood by Affinity Chromatography and a Four-Dimensional Proteomic Method. *Journal of Proteome Research* [online]. 2021, 20(9), 4553-4565 [cit. 2023-04-11]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.1c00535.
- [128] PAPADIA, Paride, Alessandra BARBANENTE, Nicoletta DITARANTO, et al. Effect of chirality on the anticancer activity of Pt(ii) and Pt(iv) complexes containing 1R,2R and 1S,2S enantiomers of the trans -1,2-diamino-4-cyclohexene ligand (DACHEX), an analogue of diaminocyclohexane used in oxaliplatin. *Dalton Transactions* [online]. 2021, 50(43), 15655-15668 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1477-9226. Dostupné z: doi:10.1039/D1DT02255E.
- [129] J.-S. Lee, R. Mendez, H. H. Heng, Z.-Q. Yang, and K. Zhang. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am J Transl Res*, vol. 4, no. 1, pp. 102–13, 2012.
- [130] CURRIE, Erin, Almut SCHULZE, Rudolf ZECHNER, Tobias C. WALTHER a Robert V. FARESE. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism* [online]. 2013, 18(2), 153-161 [cit. 2023-04-11]. ISSN 15504131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2013.05.017.
- [131] FAM, Tkhe, Andrey KLYMCHENKO a Mayeul COLLOT. Recent Advances in Fluorescent Probes for Lipid Droplets. *Materials* [online]. 2018, 11(9) [cit. 2023-04-11]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma11091768.

- [132] BROWN, Deborah A. Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat. *Current Biology* [online]. 2001, 11(11), R446-R449 [cit. 2023-04-11]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-9822(01)00257-3.
- [133] DUCHARME, Nicole A. a Perry E. BICKEL. Minireview: Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis. *Endocrinology* [online]. 2008, 149(3), 942-949 [cit. 2023-04-11]. ISSN 0013-7227. Dostupné z: doi:10.1210/en.2007-1713.
- [134] WELTE, Michael A. Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2009, 37(5), 991-996 [cit. 2023-04-11]. ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/BST0370991.
- [135] OLZMANN, James A. a Pedro CARVALHO. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2019, 20(3), 137-155 [cit. 2023-04-11]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-018-0085-z.
- [136] P. Clerc, N. Bensaadi, P. Pradel, A. Estival, F. Clemente, and N. Vaysse. Lipid-dependent proliferation of pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res*, vol. 51, no. 14, pp. 3633–8, Jul. 1991.
- [137] BLUM, R a Y KLOOG. Metabolism addiction in pancreatic cancer [online]. 2014, 5(2), e1065-e1065 [cit. 2023-04-12]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2014.38.
- [138] YU, Jing, Dongli HU, Yu CHENG, Jiwei GUO, Yicheng WANG, et al. Lipidomics and transcriptomics analyses of altered lipid species and pathways in oxaliplatin-treated colorectal cancer cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2021, 200 [cit. 2023-04-12]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2021.114077.
- [139] SHI, Yan, Bin TANG, Pei-Wu YU, et al. Autophagy Protects against Oxaliplatin-Induced Cell Death via ER Stress and ROS in Caco-2 Cells. *PLoS ONE* [online]. 2012, 7(11) [cit. 2023-04-12]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0051076.
- [140] CHEN, WeiQian, WeiShuai LIAN, YiFeng YUAN a MaoQuan LI. The synergistic effects of oxaliplatin and piperlongumine on colorectal cancer are mediated by oxidative stress [online]. 2019, 10(8) [cit. 2023-04-12]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-019-1824-6.
- [141] BASSERI, Sana a Richard C. AUSTIN. ER Stress and Lipogenesis: A Slippery Slope toward Hepatic Steatosis. *Developmental Cell* [online]. 2008, 15(6), 795-796 [cit. 2023-04-12]. ISSN 15345807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2008.11.013.

- [142] LIU, Qiuping, Qing LUO, Alexander HALIM a Guanbin SONG. Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Letters* [online]. 2017, 401, 39-45 [cit. 2023-04-12]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2017.05.002.
- [143] ZIRATH, Hanna, Anna FRENZEL, Ganna OLIYNYK, et al. MYC inhibition induces metabolic changes leading to accumulation of lipid droplets in tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, 110(25), 10258-10263 [cit. 2023-04-12]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1222404110.
- [144] TADROS, Saber, Surendra K. SHUKLA, Ryan J. KING, et al. De Novo Lipid Synthesis Facilitates Gemcitabine Resistance through Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer. *Cancer Research* [online]. 2017, 77(20), 5503-5517 [cit. 2023-04-12]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3062.
- [145] FERNÁNDEZ, Lara P., Marta GÓMEZ DE CEDRÓN a Ana RAMÍREZ DE MOLINA. Alterations of Lipid Metabolism in Cancer: Implications in Prognosis and Treatment. *Frontiers in Oncology* [online]. 2020, 10 [cit. 2023-04-12]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2020.577420.
- [146] DOBRZYN, Pawel, Agnieszka DOBRZYN, Makoto MIYAZAKI, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2004, 101(17), 6409-6414 [cit. 2023-04-12]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0401627101.
- [147] LEWIS, C A, C BRAULT, B PECK, et al. SREBP maintains lipid biosynthesis and viability of cancer cells under lipid- and oxygen-deprived conditions and defines a gene signature associated with poor survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* [online]. 2015, 34(40), 5128-5140 [cit. 2023-04-12]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2014.439.
- [148] SHYU, Peter, Xing Fah Alex WONG, Karen CRASTA a Guillaume THIBAUT. Dropping in on lipid droplets: insights into cellular stress and cancer. *Bioscience Reports* [online]. 2018, 38(5) [cit. 2023-04-12]. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20180764.
- [149] HUANG, Wen-Chin, Xiangyan LI, Jian LIU, Jentai LIN a Leland W.K. CHUNG. Activation of Androgen Receptor, Lipogenesis, and Oxidative Stress Converged by SREBP-1 Is Responsible for Regulating Growth and Progression of Prostate Cancer Cells. *Molecular Cancer Research* [online]. 2012, 10(1), 133-142 [cit. 2023-04-12]. ISSN 1541-7786. Dostupné z: doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0206.
- [150] JOHNSTONE, Ricky W., Astrid A. RUEFLI a Scott W. LOWE. Apoptosis. *Cell* [online]. 2002, 108(2), 153-164 [cit. 2023-04-11]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(02)00625-6.

- [151] BASMACIYAN, Louise, Nadine AZAS, Magali CASANOVA a Yara M. TRAUB-CSEKÖ. Calcein /PI- as an early apoptotic feature in Leishmania. PLOS ONE [online]. 2017, 12(11) [cit. 2023-04-13]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0187756.
- [152] PAN, Yu, Matthias BARTNECK a Willi JAHNEN-DECHENT. Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. Nanomedicine - Infectious Diseases, Immunotherapy, Diagnostics, Antifibrotics, Toxicology and Gene Medicine [online]. Elsevier, 2012, 2012, 225-242 [cit. 2023-04-13]. Methods in Enzymology. ISBN 9780123918581. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-391858-1.00012-5.
- [153] BELMOKHTAR, Chafké Ahmed, Josette HILLION a Evelyne SÉGAL-BENDIRDJIAN. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. Oncogene [online]. 2001, 20(26), 3354-3362 [cit. 2023-04-13]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1204436.

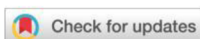
## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AADAC	arylacetamid deacetyláza
ACLY	ATP-citrátlyáza
ADP	adenosindifosfátu
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CA 19-9	nádorový antigen 19-9
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDDP	cis-platina
CDK-3	cyklin-dependentní kináza 3
CI	buněčný index
CIC	mitochondriální transportním protein citrátu
CRT1	transportér kreatinu 1
CT	počítačová tomografie
DAP	dihydroxyacetonfosfát
DCFH <sub>2</sub> -DA	2',7'-Dichlorofluorescein diacetát
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
ER	endoplazmatické retikulum
ERCP	endoskopická retrogradní cholangiopankreatografie
ESPA	N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)m-anisidin sodný
FAAS	plamenový atomový absorpční spektrometr
FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid
FAS	syntáza mastných kyselin
FBS	bovinní fetální sérum

FDA	Správa potravin a léčiv v USA
FFA	volné mastné kyseliny
FGF2	fibroblastový růstový faktor
G-1-P	glycerol-1-fosfát
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GLUT	přenašeče glukózy
Gy	jednotka Gray
HDI	index lidského rozvoje
HPV	lidský papilomavirus
HSL	hormon-senzitivní lipáza
IC <sub>50</sub>	polovina maximální inhibiční koncentrace
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LD	lipidové kapénky
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MMR	oprava chybného párování
MQ voda	deionizovaná voda v čistotě Milli-Q z přístrojů firmy Millipore
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí
mRNA	informační nebo mediátorová RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NER	nukleotidová excisní oprava
NR	neutrální červeň (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride)
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PET	pozitronová emisní tomografie



pH	potenciál vodíku
PI	propidium jodid
PAK	proteinkináza A
RI	resistenční index
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RTCA	monitorování buněk v reálném čase
RTG	rentgenové záření
RT-qPCR	reverzní transkripční kvantitativní PCR
SCD1	stearoyl-CoA desaturáza 1
SI	selektivní index
SRB	sulforhodamin B (2-(3-diethylamino-6-diethylazaniumylidene-xanthen-9-yl)-5-sulfo-benzenesulfonate)
TAG	triacylglycerol
TCA	kyselina trichloroctová
TCRP	časově závislý profil buněčné odezvy
ULA	nízko-adhezivní povrch
USG	ultrasonografie
UV záření	ultrafialové záření
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxyanilid



Cite this: DOI: 10.1039/d2qi00778a

## Pt(II) complex containing the 1*R*,2*R* enantiomer of *trans*-1,2-diamino-4-cyclohexene ligand effectively and selectively inhibits the viability of aggressive pancreatic adenocarcinoma cells and alters their lipid metabolism†

Vojtech Novohradsky,<sup>a</sup> Lenka Markova,<sup>a</sup> Hana Kostrhunova,<sup>a</sup> Marie Svitolova,<sup>a</sup> Jana Kasparikova,<sup>a,b</sup> Alessandra Barbanente,<sup>c</sup> Paride Papadia,<sup>d</sup> Nicola Margiotta,<sup>e</sup> James D. Hoeschele<sup>e</sup> and Viktor Brabec<sup>ib</sup>\*<sup>a</sup>

Here, we investigated the mechanism of antiproliferative action in cancer cells of new compounds structurally derived from oxaliplatin, namely a pair of enantiomers [Pt(OXA)(1*R*,2*R*-DACHEX)] (**1**) and [Pt(OXA)(1*S*,2*S*-DACHEX)] (**2**) (OXA = oxalate, DACHEX = *trans*-1,2-diamino-4-cyclohexene). While oxaliplatin is used almost exclusively to treat colorectal and other gastrointestinal cancers, new complex **1** shows instead high potency in malignant pancreatic adenocarcinoma PSN1 cells including superior selectivity for pancreatic cancer over noncancerous cells. Utilizing a multi-platform biochemical approach to study the unique features of the mechanism of action of this new platinum-based drug, we show that **1** has a much greater ability to penetrate pancreatic tumors than its *S,S* enantiomer **2** and oxaliplatin, and to be transported into cells as bound to plasma proteins. Additionally, the mechanism of action of **1** and, to a lesser extent, oxaliplatin in pancreatic cancer cells involves alterations of the lipogenesis pathway, namely inhibition of *de novo* lipid synthesis, acting by a new mechanism not yet considered for anticancer action of clinically used antitumor platinum drugs. These data highlight the functional diversity of platinum anticancer compounds and the potential benefits of finding new anticancer drugs applying a mechanism-based rationale.

Received 11th April 2022  
Accepted 24th May 2022  
DOI: 10.1039/d2qi00778a

rsc.li/frontiers-inorganic

### Introduction

High incidence of malignancies continuously stimulates the search for therapeutically active compounds, bringing at least a higher life expectancy for newly diagnosed patients. Despite the large spectrum of available cytostatic drugs, biological medicines, and treatment approaches, pancreatic carcinoma is still one of the worst treatable, most aggressive, and finally the most lethal type of cancer. The main treatments of pancreatic

cancer include chemotherapy which may be used at any stage of pancreatic cancer to kill cancer cells. Chemotherapeutic drugs that are commonly given alone or with other drugs to treat pancreatic cancer also encompass conventional oxaliplatin (1*R*,2*R*-DACH(OXA)platinum(II), DACH = diaminocyclohexane, OXA = oxalate).<sup>1</sup>

Metabolic changes are currently gaining prominence in pancreatic cancer research, bringing new opportunities to develop new therapies for this disease. Previous studies show that in pancreatic cancer, metabolic reprogramming occurs at the level of all main cell nutrient supplies, such as glucose, amino acid, and lipids.<sup>2</sup> Cancer cells are often exposed to nutritionally poor environments with low availability of oxygen and other primary energy sources. Hence, metabolic stress stimulates cancer cells to develop a new strategy for overcoming unfavorable conditions and adapting the metabolism to be effective for the expansion of cancer cells.<sup>3</sup> The critical characteristic of many cancer cells is the elevated *de novo* synthesis of fatty acids, where up to 93% of fatty acids are newly synthesized from mitochondrial citrate.<sup>4</sup> Moreover, detailed pan-

<sup>a</sup>Czech Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic. E-mail: brabec@ibp.cz

<sup>b</sup>Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Slechtilu 27, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup>Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Via Orabona, 4, I-70125 Bari, Italy

<sup>d</sup>Department of Biological and Environmental Sciences and Technologies (DiSTeBA), University of Salento, 73100 Lecce, Italy

<sup>e</sup>Department of Chemistry, Eastern Michigan University, Ypsilanti, MI 48197, USA

† Electronic supplementary information (ESI) available: Cell death detection in PSN1 cells. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2qi00778a>